

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA E BIOFÍSICA

PAPEL DO SISTEMA COLINÉRGICO NA LESÃO CEREBRAL E RECUPERAÇÃO FUNCIONAL APÓS ISQUEMIA

Daniela Fontes Gonçalves

Belo Horizonte

2013

PAPEL DO SISTEMA COLINÉRGICO NA LESÃO CEREBRAL E RECUPERAÇÃO FUNCIONAL APÓS ISQUEMIA

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. André Ricardo Massensini
Co-orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Máximo Prado

Belo Horizonte
2013

***“Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis,
as pedras no caminho se tornam montanhas,
os fracassos se transformam em golpes fatais.***

Mas, se você tiver grandes sonhos...

***Seus erros produzirão crescimento,
Seus desafios produzirão oportunidades,
seus medos produzirão coragem.***

Por isso, meu ardente desejo é que você

NUNCA DESISTA DOS SEUS SONHOS”

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, André Ricardo Massensini, pela oportunidade e credibilidade desde os momentos iniciais. Por ter, além de me ensinado e me acompanhado durante toda essa caminhada, também me encorajou e incentivou na busca dos meus objetivos pessoais e profissionais. Muito obrigada!

Ao meu co-orientador, Marco Prado, por ter me recebido e incluído em seu grupo de pesquisa, me fazendo sentir parte integrante dele desde o início. Seus valiosos ensinamentos, orientação atenciosa, competência e profissionalismo contribuíram de maneira especial para meu crescimento científico. Muito Obrigada!

Aos meus queridos professores do NNC por todo suporte e ensinamentos! A professora Grace pelas colaborações e disponibilidade em ajudar. Prof. Márcio pelo exemplo de amor a ciência e enorme boa vontade compartilhar tanto conhecimento. À professora Carol pela brilhante capacidade de colocar conhecimentos científicos em favor da comunidade. À professora Juliana pelo carinho, atenção e ensinamentos. E ao prof. Bruno: Boas vindas!!!

A TODOS queridos amigos do Núcleo de Neurociências pelos conhecimentos compartilhados, colaborações, incentivo e agradável convivência durante esses anos. Em especial aos meus amigos veteranos de NNC, “ladies e lords”!

As minhas queridas amigas Pat, Mairoca e Lulu; e ao meu querido amigo Gustavo Rezende (Craminha) pelo carinho, apoio e amizade que ultrapassam barreiras da universidade. A vocês meu especial e sincero agradecimento!

Aos queridos amigos do laboratório do Prof. Marco Prado e em geral todas as valiosas amizades conquistadas no Canadá. Meu sincero agradecimento. Todo o carinho e suporte que recebi foram fundamentais para que eu me sentisse em casa! Em especial as minhas queridas amigas Iaci, Fabi, Aninha e Lia. Muito obrigada!

Aos queridos amigos e colaboradores, Mónica Guzman, Flávio Beraldo, Anu Thomas, Amanda Martyn, Nevin McVicar e Simona Nikolova. Muito obrigada por todo apoio, incentivo, conversas e efetiva colaboração!

Agradeço também à professora Vânia Prado, sempre tão prestativa e dedicada à pesquisa. Aos professores Robert Bartha e Robert Gros da universidade Western Ontario que me deram livre acesso aos seus laboratórios, independente dos horários dos meus experimentos. Muito obrigada a todos vocês pela colaboração e valiosas reuniões científicas!

Aos muitos amigos que sempre me acompanham em diversos momentos importantes em minha vida! Em especial aos queridos amigos Lu (Fi), Tati, Heveline e Pablito , sempre muito presentes independente da distância.

Aos meus familiares, avós, tios e primos, pelo apoio, carinho, incentivo e ainda, por entenderem a minha ausência em muitos momentos durante este período.

Ao meu lindo irmão Juninho, pelo apoio, amizade, companheirismo e acima de tudo pelo infinito e único amor de irmão. Te amo Nu!

Aos meus pais... os melhores pais do mundo! Vocês são minha fortaleza, fonte de renovação da minha energia, são a ponte que me conduz ao alcance dos meus objetivos. O amor, apoio e confiança em mim depositados fazem com que eu tente a cada dia ser uma pessoa melhor. Muito obrigada por tudo!!! AMO VOCÊS!

Agradeço a Deus por tantas bênçãos, por iluminar e direcionar a minha vida colocando pessoas especiais como todos vocês em meu caminho!

**Dedico esse trabalho aos meus amados pais,
José Daniel e Joana d’Arc,
e ao meu irmão e grande amigo,
Juninho...**

... porque sem o amor e apoio de cada um de vocês, nada seria possível.

APOIO FINANCEIRO

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG
- Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG – PRPq/UFMG
- PRIONET Canada
- Canadian Institutes of Health Research – CIHR
- Heart and Stroke Foundation of Ontario
- Canadian Foundation for Innovation
- Ontario Research Fund

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	3
1.1	ISQUEMIA CEREBRAL.....	3
1.1.1	Patofisiologia da isquemia cerebral	4
1.1.2	Modelos experimentais de isquemia cerebral.....	7
1.2	SISTEMA COLINÉRGICO	10
1.2.1	Sistema colinérgico e neuroproteção.....	12
1.2.2	Estriado.....	14
1.2.3	Receptores nicotínicos alfa 7	16
1.3	PRP ^C E STI1.....	18
1.4	ANIMAIS GENETICAMENTE MODIFICADOS.....	21
2	OBJETIVOS.....	26
•	OBJETIVO GERAL	26
•	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1	ANIMAIS	27
3.2	GRUPOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	28
3.3	CIRURGIA DE ISQUEMIA (OCLUSÃO DA ARTÉRIA CEREBRAL MÉDIA).....	30
3.3.1	Cuidados pós-operatórios.....	32
3.3.2	Critérios de inclusão	32
3.3.3	Teste da eficácia do método de oclusão da ACM	34
3.4	LASER DOPPLER FLUXOMÉTRICO	34
3.5	PARÂMETROS FISIOLÓGICOS.....	35
3.6	IMAGENS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA ESTRUTURAL	36
3.7	PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qPCR).....	37
3.8	WESTERN BLOTTING.....	38
3.9	TUNEL.....	39
3.10	TESTES COMPORTAMENTAIS	41
3.10.1	Assimetria bilateral	41
3.10.2	Catwalk.....	41
3.10.3	Campo aberto	42
3.11	HISTOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA	43
3.11.1	Hematoxilina e eosina	43
3.11.2	Trifeniltetrazolium-2.3.5 Cloreto.....	43
3.12	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
4	RESULTADOS.....	45
4.1	PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL POR OCLUSÃO DA ARTÉRIA CEREBRAL MÉDIA	45
4.2	COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DE DIFERENTES TEMPOS DE ISQUEMIA NA LESÃO CEREBRAL E RECUPERAÇÃO FUNCIONAL	46
4.3	AValiação DO DESEMPENHO FUNCIONAL DE ANIMAIS COM DEFICIÊNCIA COLINÉRGICA PREVIAMENTE À ISQUEMIA	54
4.4	AValiação DO EFEITO DA ACETILCOLINA ESTRIATAL NA ISQUEMIA CEREBRAL IN VIVO E RECUPERAÇÃO FUNCIONAL.....	57
4.5	INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DA PROTEÍNA STI1 NA LESÃO CEREBRAL E RECUPERAÇÃO FUNCIONAL.....	73
5	DISCUSSÃO	79
6	CONCLUSÕES.....	93
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
8	ANEXOS	106
8.1	APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA - UFMG.....	106
8.2	LISTA DE ANTICORPOS.....	107
8.3	SEQUÊNCIA DE PRIMERS	107
8.4	ARTIGOS.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC _ artéria carótida comum
ACE _ artéria carótida externa
Acetil-CoA _ acetil coenzima A
ACh _ acetilcolina
AChE _ acetilcolinesterase
ACI _ artéria carótida interna
ACM _ artéria cerebral média
AVE _ acidente vascular encefálico
BDNF _ Brain-derived neurotrophic factor
Ca²⁺ _ íons cálcio
cDNA _ ácido desoxirribonucleico complementar
ChAT _ colina acetiltransferase
CHT1 _ transportador de colina de alta afinidade
Hop _ *Human Heat Shock cognate Protein*
HSP70 _ Proteína de Choque Térmico de 70 kDa
HSP90 _ Proteína de Choque Térmico de 90 kD
KD _ knockdown
KD^{HET} _ knockdown heterozigoto
KD^{HOM} _ knockdown homozigoto
MRI – Imagens de ressonância magnética (Magnetic resonance imaging)
oACM _ Oclusão da artéria cerebral média
PBS _ tampão fosfato (*Phosphate-buffered Solution*)
PCR _ reação em cadeia da polimerase
PFA _ paraformaldeído
pH _ Potencial de hidrogênio
PRION _ Partícula infecciosa proteinácea
PrP^c _ Proteína prion celular
PrP^{Sc} _ Proteína prion scrapie
RM _ Ressonância Magnética
RNA _ ácido ribonucleico
RT-PCR _ reação em cadeia da polimerase reversa
SNC _ sistema nervoso central
SNP _ sistema nervoso periférico
STI-1 _ *Stress Inducible Protein 1*
TBS _ tampão tris base (Tris-Buffered Saline)
Trk-B _ tyrosine kinase receptor, type 2
VACHT _ transportador vesicular de acetilcolina
WT _ wild type (selvagem)

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 1.....	29
FIGURA 2: MODELO DE ISQUEMIA POR OCLUSÃO DA ARTÉRIA CEREBRAL MÉDIA.	31
FIGURA 3: IMAGENS REPRESENTATIVAS DE ANIMAIS ISQUEMIADOS APRESENTANDO DÉFICITS NEUROLÓGICOS.	33
FIGURA 4: RESSONÂNCIA MAGNÉTICA ESTRUTURAL.	37
FIGURA 5: IMAGEM DO SOFTWARE DE ANÁLISE CATWALK.	42
FIGURA 6: VERIFICAÇÃO DA EFETIVIDADE DA CIRURGIA EM OCLUIR A ARTÉRIA CEREBRAL MÉDIA E INDUZIR A LESÃO FOCAL.	45
FIGURA 7: IMAGENS DE FATIAS CEREBRAIS (MARCAÇÃO COM TTC) DE ANIMAIS SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPOS DE ISQUEMIA.	47
FIGURA 8: IMAGENS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DO CÉREBRO DE ANIMAIS SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPOS DE ISQUEMIA.	48
FIGURA 9: COMPARAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE ISQUEMIA NA LESÃO CEREBRAL EM ANIMAIS WT.	49
FIGURA 10: TESTE DE ASSIMETRIA BILATERAL: ANIMAIS WT SUBMETIDOS À 45MIN E 60MIN DE ISQUEMIA.	50
FIGURA 11: TESTE DE CAMPO ABERTO: ANIMAIS WT SUBMETIDOS À 45MIN E 60MIN DE ISQUEMIA.	51
FIGURA 12: AVALIAÇÃO DO PESO E CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE ANIMAIS WT SUBMETIDOS A 45 E 60MIN DE ISQUEMIA.	52
FIGURA 13: MARCAÇÃO DE FATIAS CEREBRAIS DE ANIMAIS WT ISQUEMIADOS (H&E).	53
FIGURA 14: TESTE FUNCIONAL CAMPO ABERTO: PRÉ TESTE COM VACHT ^{HOM}	55
FIGURA 15: TESTES FUNCIONAIS DE ASSIMETRIA BILATERAL E CAMPO ABERTO - PRÉ TESTES COM VACHT ^{D2-CRE-FLOX/FLOX}	56
FIGURA 16: TESTES FUNCIONAL CATWALK: PRÉ TESTE COM VACHT ^{D2-CRE-FLOX/FLOX}	57
FIGURA 17: ANÁLISE DO VOLUME DE INFARTO E PERCENTUAL DO TAMANHO HEMISFÉRICO DA LESÃO: GRUPO VACHT ^{D2-CRE-FLOX/FLOX}	58
FIGURA 18: PCR QUANTITATIVO (qPCR) PARA DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MRNA EM CAMUNDONGOS VACHT ^{D2-CRE-FLOX/FLOX}	60
FIGURA 19: ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA (AKT) EM CAMUNDONGOS D2CRE-FLOX/FLOX.....	62
FIGURA 20: ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA (GSK3P ^{SER21/9}) EM CAMUNDONGOS D2CRE-FLOX/FLOX.....	63
FIGURA 21: ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA (GSK3 P ^{TYR279/216}) EM CAMUNDONGOS VACHT ^{D2-CRE-FLOX/FLOX}	64
FIGURA 22: ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA (GSK3 TOTAL) EM CAMUNDONGOS D2CRE-FLOX/FLOX.....	65
FIGURA 23: ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA (BAX, BCL-2) EM CAMUNDONGOS VACHT ^{D2-CRE-FLOX/FLOX}	66
FIGURA 24: MARCAÇÃO E ANÁLISE DE CÉLULAS APOPTÓTICAS POR TUNEL EM CAMUNDONGOS VACHT ^{D2-CRE-FLOX/FLOX}	67
FIGURA 25: TESTES FUNCIONAIS ASSIMETRIA BILATERAL E CAMPO ABERTO: 7º DIA APÓS CIRURGIA - VACHT ^{D2-CRE-FLOX/FLOX}	68
FIGURA 26: TESTE FUNCIONAL CATWALK: 7º DIA APÓS CIRURGIA – VACHT ^{D2-CRE-FLOX/FLOX}	70
FIGURA 27: TESTES FUNCIONAIS ASSIMETRIA BILATERAL E CAMPO ABERTO: 14º DIA APÓS CIRURGIA – VACHT ^{D2-CRE-FLOX/FLOX}	71
FIGURA 28: PESO CORPORAL E CURVA DE SOBREVIVÊNCIA: VACHT ^{D2-CRE-FLOX/FLOX}	72
FIGURA 29: TESTE FUNCIONAL ASSIMETRIA BILATERAL: PRÉ TESTE COM STI1.	73
FIGURA 30: ANÁLISE DO VOLUME DE INFARTO E PERCENTUAL DO TAMANHO HEMISFÉRICO DA LESÃO: GRUPO STI1.....	74
FIGURA 31: TESTE FUNCIONAL ASSIMETRIA BILATERAL: 7º E 14º DIA APÓS CIRURGIA – STI1.....	76
FIGURA 32: PESO CORPORAL E CURVA DE SOBREVIVÊNCIA: STI1.	77
FIGURA 33: ANÁLISE DO VOLUME DE INFARTO E PERCENTUAL DO TAMANHO HEMISFÉRICO DA LESÃO: GRUPO TgSTA.	78

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: AVALIAÇÃO DO FLUXO SANGUÍNEO CEREBRAL ATRAVÉS DO LASER DOPPLER.....	54
TABELA 2: PARÂMETROS FISIOLÓGICOS AVALIADOS ANTES, DURANTE E 24H DEPOIS DA ISQUEMIA: VACHT ^{D2-CRE-FLOX/FLOX}	59
TABELA 3: PARÂMETROS FISIOLÓGICOS AVALIADOS ANTES E DURANTE ISQUEMIA: STI1.....	75

RESUMO

A Isquemia cerebral está entre as principais causas de mortalidade no Brasil e no mundo, sendo uma das principais causas de incapacidade funcional e seqüelas neurológicas em adultos. Existem evidências de que o sistema colinérgico está envolvido em ações neuroprotetoras nos diferentes tipos de lesões cerebrais. Interneurônios colinérgicos do estriado são mais resistentes à isquemia quando comparado com outras células, no entanto, a contribuição específica da acetilcolina estriatal na lesão cerebral isquêmica não é completamente entendida. Trabalhos têm demonstrado que o receptor nicotínico $\alpha 7$ é um importante alvo para estudos em neuroproteção, e esse receptor interage com STI1 (stress inducible protein 1) e PrP^C (proteína príon celular) formando um complexo que promove ações neuroprotetoras. Sendo assim, o propósito deste trabalho foi investigar o papel do sistema colinérgico, e fatores que possam influenciar sua função, na lesão cerebral e recuperação funcional após isquemia.

Camundongos nocaute condicional para o VACHT (transportador vesicular de acetilcolina) no estriado (VACHT^{D2Cre-flox/flox}) e camundongos geneticamente modificados para a proteína STI1 (STI^{-/+} e TgSTA) foram usados para avaliação da lesão cerebral induzida pela oclusão da artéria cerebral média esquerda e avaliação da recuperação funcional através de testes de assimetria bilateral, campo aberto e catwalk. Animais VACHT^{D2Cre-flox/flox} apresentaram um maior volume de infarto, menor percentual de sobrevivência e pior desempenho funcional após a lesão. A investigação de fatores inflamatórios, BDNF e apoptose não demonstrou qualquer diferença entre genótipos de animais isquemiados, no entanto, a expressão de GSK3 fosforilada (tirosina 279, 219) foi significativamente maior em camundongos VACHT^{D2Cre-flox/flox} quando comparados com controles isquemiados. Camundongos com a deleção parcial da proteína STI1 (STI^{-/+}) apresentaram maior lesão cerebral, maior percentual de mortalidade e maiores déficits funcionais após isquemia, no entanto, camundongos transgênicos que superexpressam 4x mais STI1, adultos ou idosos, não apresentaram maior proteção quando submetidos ao mesmo tipo de lesão.

Nossos resultados indicam que a acetilcolina estriatal age de maneira importante limitando a lesão e facilitando a recuperação funcional, possivelmente através da inibição da fosforilação de GSK3. Adicionalmente, a deleção parcial de STI1 aumenta a vulnerabilidade ao insulto isquêmico, mas o excesso dessa proteína não parece ser capaz de conferir proteção nas condições estudadas.

Palavras chave: Acetilcolina, sistema colinérgico, isquemia cerebral, recuperação funcional, STI1.

ABSTRACT

Stroke is one of the leading causes of mortality in Brazil and in the world. It is one of the most common causes of functional disability and neurologic deficits in adults. There is evidence that the cholinergic system has neuroprotective effects in different types of brain lesions. Striatal cholinergic interneurons have been shown to be more resistant to ischemic insult when compared to other cells. However, the specific contribution of striatal acetylcholine in ischemic lesions is poorly understood. The $\alpha 7$ nicotinic receptor is another important cholinergic target when investigating ischemia. Studies have shown that this receptor can interact with STI1 (Stress Inducible Protein 1) and PrP^C (prion protein) to promote neuroprotective effects. The purpose of this work was to investigate the role of the cholinergic system in cerebral lesions and functional recovery after stroke.

Striatal conditional knockout VAcHT (vesicular acetylcholine transporter) mice and STI1 genetically modified mice were used to evaluate cerebral lesion induced by left middle cerebral artery occlusion. Evaluation of functional outcomes was made through adhesive removal, open field and catwalk tests. VAcHT^{D2Cre-flox/flox} mice showed larger infarct volumes, lower survival rates and worse functional outcomes after lesion. Further investigation of inflammatory markers, BDNF and apoptosis did not show any difference between genotypes after stroke, however, the levels of phosphorylated GSK3 (Tyr 279,219) was significantly increased in VAcHT^{D2Cre-flox/flox} when compared to ischemic controls.

Mutant mice haploinsufficient for STI1 (STI1^{-/+}) showed larger infarct areas, larger mortality rates and worse functional outcomes after stroke. However, STI1 transgenic mice, overexpressing this protein 4 fold, adults or aged, did not present improved recovery.

Our results indicate that striatal acetylcholine has an important role in limiting the injury and facilitating functional recovery of mice, possibly through the inhibition of GSK3 phosphorylation. Additionally, partial depletion of STI1 increased the vulnerability to ischemic insult, however excess of this protein does not provide protection under the conditions studied.

Key-words: Acetylcholine, Cholinergic system, Cerebral ischemia, functional recovery, Stress inducible protein 1.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Isquemia Cerebral*

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é uma definição clínica usada para descrever sintomas de distúrbios neurológicos agudos causados por alterações do fluxo sanguíneo cerebral. É uma doença caracterizada pela rápida progressão dos sintomas e sinais de perda de função cerebral (Feuerstein et al.,2000). Os AVE's estão associados com a alta incidência de déficits cognitivos e sensório-motores. São a causa mais comum de incapacidade funcional em adultos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), incapacidade funcional caracteriza-se por restrição, limitação ou falta da capacidade para realizar uma atividade de uma maneira considerada normal para um ser humano. De acordo com American Heart and Stroke Association, cerca de 30 bilhões de dólares são gastos por ano, em decorrência da incapacidade funcional em longo prazo causada pelos AVE's (Carmichael,2005). Os AVE's são considerados uma das principais causas de morte no mundo. Nos Estados Unidos, são registrados 700.000 novos casos/ ano, a cada 3 minutos uma pessoa morre em decorrência de doenças cerebrovasculares (Carmichael,2005). Cerca de 30% dos pacientes com mais de 65 anos morrem no primeiro ano, e um total de 55% nesta mesma faixa etária morrem nos primeiros 5 anos após o AVE (Roger et al.,2011). Segundo Painel de indicadores do SUS, no Brasil as doenças cerebrovasculares ocupam o primeiro lugar no *ranking* das causas de mortalidade (Brasil,2006). De acordo com dados oficiais de mortalidade no país, nos últimos 40 anos, doenças cerebrovasculares vêm sendo responsáveis por mais óbitos que as doenças cardíacas (Lotufo,2000,Lotufo,2005). No ano de 2010, o banco de dados do sistema único de saúde do Brasil (SUS,2010) registrou 99.732 óbitos e uma taxa de mortalidade específica de 52.3 por 100.000 habitantes devido a doenças cerebrovasculares. Todos estes fatos levam a um crescente esforço para o desenvolvimento de estratégias que visam o reparo neural e melhor recuperação funcional após a lesão cerebral (Carmichael,2005).

Os AVE's são classificados em duas grandes categorias, AVE isquêmico e AVE hemorrágico. O AVE isquêmico ou isquemia cerebral, é caracterizada por interrupção do fluxo sanguíneo para o encéfalo em consequência de uma obstrução nas artérias que irrigam determinada área. O AVE hemorrágico ocorre devido ao rompimento de uma artéria causando extravasamento de sangue dentro ou ao redor do tecido encefálico (Brown,2002,Wise et al.,2005). De acordo com American Stroke Association, a isquemia cerebral representa 87% dos AVE's (Roger et al.,2011). A maioria dos casos de isquemia resulta de infartos da circulação anterior que envolve as artérias cerebrais anterior e média (Winstein et al.,1999), sendo que a oclusão da artéria cerebral média (ACM) representa a forma mais prevalente de AVE e corresponde à aproximadamente 60% das isquemias em humanos (Modo et al.,2000).

A gravidade da lesão cerebral durante a isquemia depende da região vascular afetada, da presença de circulação colateral e do tempo de duração do evento isquêmico (Gert et al.,1997,Hossmann,1998). Nas últimas décadas, estudos têm identificado fatores de riscos modificáveis e não modificáveis para AVE, que podem interferir na gravidade e incidência da lesão. Dentre os fatores de risco modificáveis encontram-se o sedentarismo, o tabagismo e a hipertensão; dentre os não modificáveis, a hereditariedade, a idade e o sexo são os mais importantes (Chaves,2000).

1.1.1 Patofisiologia da isquemia cerebral

O cérebro é altamente dependente de um adequado aporte energético que é realizado através do fornecimento contínuo de oxigênio e glicose, sendo, portanto mais vulnerável ao dano isquêmico que outros tecidos. A bioenergética cerebral normal tem algumas características especiais, como uma alta taxa metabólica, estoques limitados de energia e uma grande dependência do metabolismo aeróbico da glicose. Portanto, a redução ou interrupção deste fornecimento energético pode resultar em déficits funcionais e bioquímicos instantâneos e irreversíveis em neurônios (Hossmann,1998,Lipton,1999).

A patogênese da isquemia cerebral resulta da diminuição ou interrupção do fluxo sanguíneo em determinada região com conseqüente redução do aporte de oxigênio e glicose, culminando em uma crise celular energética. As taxas de glicólise e fosforilação oxidativa diminuem e os níveis de ATP intracelular caem. Os níveis de ATP diminuem substancialmente 2 minutos após início da privação energética, causando deterioração das funções da membrana e da homeostase iônica que ativam vários processos biológicos (Turner et al.,2013). Esta “crise energética” interrompe a atividade de bombas iônicas que dependem de energia para sua funcionalidade. Como consequência, há um aumento da concentração intracelular de cálcio, cloreto e sódio, e aumento da concentração extracelular de potássio, prevenindo assim a manutenção de gradientes iônicos normais e levando à despolarização da membrana neuronal e edema celular (Lipton,1999,Turner et al.,2013).

Durante o processo isquêmico, há aumento da liberação de neurotransmissores, principalmente de glutamato, principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos. Sob condições homeostáticas normais, o glutamato é rapidamente removido da fenda sináptica via recaptação por transportadores presentes na membrana pré-sináptica e nos astrócitos, mas essa resposta é alterada durante isquemia levando a um quadro de excitotoxicidade (Kass et al.,1982,Rothman,1983,Turner et al.,2013). O excesso de glutamato na fenda sináptica resulta na ativação pós sináptica de receptores NMDA e AMPA, resultando em despolarização do neurônio pós sináptico e propagando uma onda de despolarização chamada despolarização periinfarto. A despolarização periinfarto, pelo menos nas 3 horas iniciais de isquemia, têm sido correlacionada com o volume de infarto final em estudos pré clínicos (Hossmann,2006). Adicionalmente, a liberação excessiva de glutamato contribui ainda mais para rompimento da homeostasia do cálcio, prejudicando múltiplos processos celulares (Arundine et al.,2003).

O excesso de Ca^{2+} no meio intracelular resulta em danos mitocondriais, produção de radicais livres e indução de várias enzimas, incluindo fosfolipases e proteases. A ativação dessas enzimas resulta em degradação da membrana e de proteínas, diminuindo assim a

integridade e sobrevivência celular. Além disso, o influxo de cálcio potencializa a excitotoxicidade do glutamato, que por sua vez mantêm a onda de despolarização da membrana e consequentemente o desbalanço iônico, gerando assim uma cascata de eventos que levam à morte celular (Turner et al.,2013).

Todos esses eventos citados anteriormente são desencadeados rapidamente após o início da isquemia. No período subagudo após início da isquemia, os principais causadores de danos celulares são apoptose e inflamação (Turner et al.,2013). A apoptose é induzida principalmente através de duas vias. Uma delas é através da expressão alterada de genes de mediadores apoptóticos como por exemplo: Bax, Bcl-2 e Bcl-XL. A segunda via é resultante do influxo de cálcio e subsequente dano mitocondrial que resulta na ativação de caspases proteolíticas e finalmente morte celular (Turner et al.,2013).

O início da isquemia resulta em uma rápida ativação de células inflamatórias cerebrais (micróglia), seguida pelo influxo de células inflamatórias circulantes como leucócitos, granulócitos, células T e monócitos (Turner et al.,2013). Similarmente, nas primeiras horas após início da isquemia, uma série de mediadores pro inflamatórios (citocinas e quimiocinas) são liberados pelo tecido danificado induzindo a expressão de molécula de adesão e subsequente migração transendotelial de células inflamatórias circulantes (Turner et al.,2013). A infiltração de leucócitos da corrente sanguínea no tecido cerebral resulta na liberação adicional de citocinas e quimiocinas, que por fim resultam em excessivo estresse oxidativo. Embora, a inflamação seja iniciada num período subagudo após início da isquemia, ela tem se mostrado persistente mesmo no período crônico, dias após início da lesão (Turner et al.,2013).

O retorno do fluxo sanguíneo e restauração do aporte de oxigênio e glicose é denominado período de reperfusão (Hallenbeck et al.,1990). Durante este período ocorre uma normalização dos processos energéticos celulares, no entanto, a reperfusão tecidual desencadeia reações bioquímicas que aceleram o processo de glicólise, aumentando a

acidose láctica e a produção de radicais livres tóxicos. Esse processo é classificado como lesão de reperfusão (Hallenbeck et al.,1990).

Os processos de isquemia e reperfusão envolvem múltiplos mecanismos letais não somente na região central do infarto, mas também em áreas ao redor do trauma inicial, que são atingidas por produtos tóxicos produzidos pelo evento traumático inicial (White et al.,2000). Esta região é denominada “penumbra isquêmica”, e apesar de também ter o aporte energético reduzido, ainda é uma área viável. Sendo assim, um alvo importante para intervenções terapêuticas e estudos em neuroproteção é a redução ou prevenção da morte celular na área de “penumbra isquêmica” (Kidwell et al.,2001,Freitas et al.,2005).

Entende-se por neuroproteção qualquer intervenção, farmacológica ou não, que interfira nos mecanismos intracelulares da cascata isquêmica diminuindo a área de penumbra (Freitas et al.,2005). Diante do impacto das doenças cerebrovasculares no âmbito mundial, uma variedade de trabalhos é conduzida utilizando diferentes intervenções farmacológicas como possíveis agentes neuroprotetores.

1.1.2 Modelos experimentais de isquemia cerebral

Pesquisas que investigam lesão cerebral e neuroproteção têm se tornado, cada vez mais, alvo de interesse na comunidade científica. No caso da isquemia cerebral, isso se deve em grande parte, a alarmante estatística de incidência e sobrecarga econômica que essa doença representa (Carmichael,2005).

Modelos experimentais de isquemia cerebral são designados para gerar uma lesão consistente com o mínimo de manipulação cirúrgica possível. Além disso, um modelo de lesão isquêmica deve ser relevante para a situação clínica, relativamente fácil de ser executado, altamente reprodutível e deve evitar efeitos colaterais, permitindo assim a determinação de mecanismos de morte celular e avaliação de terapias neuroprotetoras. A interpretação das informações experimentais sobre isquemia cerebral requer íntimo

conhecimento do modelo utilizado e das condições em que os dados foram coletados (Hossmann,1998,Carmichael,2005).

O tempo de isquemia tolerado pelo cérebro depende, entre outros fatores, do tipo de oclusão da artéria (parcial ou completa), do conteúdo energético, da velocidade de consumo de energia, da temperatura, do grau de atividade funcional e da ausência ou presença de anestésicos e outras drogas (Hossmann,1998).

Modelos experimentais de lesão celular induzida pela isquemia têm sido desenvolvidos em diferentes espécies animais como por exemplo em primatas não-humanos (Hudgins et al.,1970), gatos (O'Brien et al.,1973) e roedores (Longa et al.,1989) utilizando-se diferentes procedimentos. Em geral, esses estudos têm o objetivo de investigar a patofisiologia da isquemia cerebral e a eficácia de específicos tratamentos (Sakuma et al.,2008).

Existe uma razoável variedade de modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* disponíveis para estudo da lesão isquêmica em animais. Modelos *in vitro*, permitem aos pesquisadores usar sistemas mais simples, onde ações diretas e indiretas do evento isquêmico podem ser investigadas. Nesses modelos, fatias cerebrais/hipocampus isoladas, culturas organotípicas ou culturas neuronal ou neuronal/glia são submetidas à anóxia ou à anóxia e ausência de glicose (isquemia *in vitro*). Já os modelos *in vivo* tentam replicar situações clínicas de injúrias cerebrais, englobando todo o contexto da complexidade fisiológica de um animal (Wise et al.,2001).

As principais classes de modelos experimentais *in vivo* usadas em roedores são a isquemia global, isquemia focal, hipóxia/isquemia e o microembolismo (Hossmann,1998,Lipton,1999). A isquemia global é obtida através da indução de parada cardíaca ou oclusão das quatro artérias que irrigam o encéfalo. Já a isquemia focal resulta da interrupção sanguínea de uma específica artéria que irriga determinado território cerebral. A hipóxia isquêmica é caracterizada pela redução transitória do aporte energético

no encéfalo e o modelo de microembolismo envolve a injeção de micro esferas no interior da artéria carótida resultando em oclusão de vasos cerebrais (Hossmann,1998).

Dentre as várias técnicas cirúrgicas que resultam em lesão isquêmica, aquelas que não utilizam a craniotomia são consideradas as mais eficientes. A cirurgia com craniotomia pode alterar a pressão intracraniana e é considerada uma técnica complexa e invasiva (Longa et al.,1989,Memezawa et al.,1992).

O modelo experimental de isquemia focal pela oclusão da Artéria cerebral média (oACM) é o mais amplamente utilizado em pesquisas. Tem a vantagem de não necessitar de craniotomia e além disso, é o mais relevante clinicamente, uma vez que a maioria das isquemias cerebrais em humanos envolve a oclusão dessa artéria (Hossmann,1998) (Carmichael,2005).

A oACM produz danos celulares primariamente no estriado e regiões sobrejacentes, incluindo córtex frontal, parietal, temporal e porções do córtex occipital. Adicionalmente, a lesão pode resultar em danos variáveis no hipocampo, tálamo, substância negra e hipotálamo. Em geral, os danos são amplamente difundidos nas regiões cerebrais e funcionalmente diversos, incluindo déficits motores, sensoriais, autonômicos e cognitivos. A lesão e déficits funcionais resultantes variam de acordo com o tempo de privação energética e condições de indução da lesão (Carmichael,2005).

Esse modelo de oACM permite a sobrevivência do animal por longos períodos, possibilitando assim a investigação da eficácia de determinados testes em detectar melhoras funcionais (Riek-Burchardt et al.,2004), investigação do efeito do treinamento e aprendizado motor após lesão (Winstein et al.,1999,Bland et al.,2001,Ding et al.,2002a,Ding et al.,2002b,Ding et al.,2004b) e além disso, é o modelo mais utilizado para estudos em neuroproteção (Reglodi, Tamas, and Lengvari 2003).

1.2 Sistema colinérgico

A Acetilcolina (ACh) foi o primeiro neurotransmissor a ser descoberto. Experimentos realizados por Loewi em 1921, contribuíram para a identificação da acetilcolina através de evidências claras demonstrando que este neurotransmissor era liberado após estimulação nervosa (Brown,2006).

A ACh é sintetizada no citoplasma de neurônios colinérgicos pela enzima colina acetiltransferase (ChAT) a partir dos substratos colina e acetil-CoA, e posteriormente é captada para o interior de vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de acetilcolina (VACHT). Uma vez sintetizada, a ACh é transportada e armazenada em vesículas sinápticas. Esse processo é realizado pelo transportador vesicular de ACh (VACHT), capaz de elevar em até 100 vezes sua concentração no interior dessas vesículas (Ventura et al.,2010,Prado et al.,2013). Quando um estímulo despolarizante alcança o terminal sináptico ocorre abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem. O influxo de cálcio induz a fusão de vesículas sinápticas com a membrana celular e consequente liberação do conteúdo vesicular, ACh, na fenda sináptica (Sudhof,2004). Com a exocitose, o neurotransmissor pode se ligar a receptores pré e pós sinápticos. Na fenda sináptica, a ACh é rapidamente hidrolisada em colina e acetato por ação da enzima acetilcolinesterase (AChE). A colina é recaptada pelo transportador de colina de alta afinidade (CHT1) para neurônio pré-sináptico e utilizada para a síntese de novas moléculas de ACh (Prado et al.,2002,Ribeiro et al.,2006).

Em 1914, Dale classificou as ações da ACh em muscarínicas e nicotínicas. Essa classificação foi baseada nos subtipos de receptores colinérgicos capazes de se ligar a nicotina e a muscarina, respectivamente, e que respondem a ativação colinérgica com alta afinidade (Dale,1914,Brown,2006). Os receptores colinérgicos nicotínicos (RCN) pertencem a família de receptores ionotrópicos que, quando ativados, adquirem a conformação de canal aberto permeável aos íons Na^+ e K^+ . Esses receptores são constituídos por cinco subunidades proteicas α , β , γ , δ e ϵ . Já os receptores muscarínicos pertencem a

superfamília de receptores acoplados a proteína G e estruturalmente são proteínas de membrana contendo sete domínios transmembranares (Levey,1993,Levey et al.,1995,Hsu et al.,1996,Ventura et al.,2010).

A acetilcolina (ACh) desempenha um papel importante tanto no sistema nervoso central (SNC), como também no sistema nervoso periférico (SNP), o que faz do sistema colinérgico alvo de inúmeras pesquisas (Gold,2003). No sistema nervoso central, a acetilcolina está envolvida em processos cognitivos como atenção, memória, aprendizado e plasticidade (Pepeu et al.,2004,Conner et al.,2005). No sistema nervoso periférico (SNP), a ACh participa da neurotransmissão somática e visceral. No sistema nervoso autônomo é o transmissor das fibras pré e pós-ganglionares parassimpáticas e fibras pré-ganglionares simpáticas, controlando inúmeras funções mantenedoras da homeostase corporal.

As vias colinérgicas são filogeneticamente antigas e anatomicamente ubíquas. A presença de vias colinérgicas é identificada através de marcadores como AChE, ChAT, CHT1, receptores muscarínicos e nicotínicos. Vários trabalhos empregando técnicas de imunohistoquímica foram realizados a fim de definir a população de neurônios colinérgicos no cérebro e suas projeções (Roghani et al.,1996,Schafer et al.,1998,Okuda et al.,2000,Misawa et al.,2001,Kobayashi et al.,2002).

No sistema nervoso central, os neurônios colinérgicos podem ser classificados por grupos (Ch1 a Ch8) de acordo com suas características celulares e topografia das projeções nervosas (Mesulam et al.,1983). Experimentos realizados em espécies animais demonstraram que neurônio dos grupos Ch1 e Ch2 fornecem maior inervação colinérgica para o complexo hipocampal, Ch3 para o bulbo olfatório, Ch4 para o córtex cerebral e amígdala, Ch5 e Ch6 para o tálamo, Ch7 para o núcleo interpeduncular e Ch8 para o colículo superior (Mesulam et al.,1983). Os gânglios da base possuem uma inervação colinérgica generalizada. O estriado e núcleo subtalâmico apresentam uma alta densidade de inervação colinérgica, enquanto no globo pálido e substância nigra a inervação é moderada. A maior parte da inervação colinérgica estriatal é intrínseca, proveniente de interneurônios colinérgicos. O estriado também recebe algumas poucas aferências

provenientes de Ch4, Ch5 e Ch6. Já a inervação colinérgica do globo pálido, núcleo subtalâmico e substância nigra são exclusivamente extrínsecas, originados em sua grande parte dos grupos Ch5 e Ch6. (Mesulam et al.,1983,Mesulam,1995,Schafer et al.,1998).

A neurotransmissão colinérgica é essencial para o funcionamento do sistema nervoso. Seu bloqueio agudo é geralmente letal; enquanto um déficit gradual nesta neurotransmissão é associado com a deterioração progressiva de funções neurais. Um grande número de evidências aponta o envolvimento do sistema colinérgico em algumas doenças neurológicas e neurodegenerativas como, por exemplo, na doença de Alzheimer (Blusztajn et al.,2000), na esclerose lateral amiotrófica (ALS) e na Miastenia Gravis (Kothari,2004). Especialmente em isquemia cerebral, devido à interrupção do fornecimento sanguíneo e consequente déficit do aporte energético, uma importante área de concentração de interneurônios colinérgicos (estriado) e áreas de projeções colinérgicas (córtex e núcleo basal de Meynert) são lesadas (Mesulam et al.,1983,Kawaguchi,1993), resultando potencialmente em importantes déficits funcionais.

1.2.1 Sistema colinérgico e neuroproteção

O desenvolvimento de drogas específicas para neurônios colinérgicos tem facilitado o estudo e fornecido subsídios para maiores esclarecimentos quanto às possíveis ações neuroprotetoras desse sistema (Baxter et al.,1999). Entre os fármacos mais utilizados para intervir em ações colinérgicas estão: Inibidores de colinesterase (ChEIs), agonistas e antagonistas de receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos, e a imunotoxina 192-IgG saporina, que é capaz de lesar seletivamente e irreversivelmente neurônios colinérgicos. Recentemente, modelos animais geneticamente modificados têm sido amplamente utilizado em pesquisas. Prado e colaboradores desenvolveram modelos animais de hipofunção colinérgica generalizada e específica (Prado et al.,2006,Guzman et al.,2011). Esses animais representam uma valiosa ferramenta para o entendimento da relação entre sistema colinérgico, isquemia cerebral e neuroproteção.

As primeiras evidências diretas de que inibidores de colinesterase (ChEIs) protegem células de danos citotóxicos foram demonstradas por Zhou e colaboradores (Zhou et al.,2001). Vários estudos posteriores confirmaram estes achados. Estudos *in vitro* indicam que a estimulação colinérgica, utilizando ChEI possibilita a neurogênese e sobrevivência de precursores de células neurais (Kaneko et al.,2006). Akaike (2006) expôs culturas de células à privação de glicose e oxigênio por 30 minutos, e observou que células previamente tratadas com inibidores de colinesterase apresentavam uma maior viabilidade quando comparadas com células controle (Akaike,2006). Adicionalmente, experimentos *in vivo* utilizando modelo de isquemia transitória global obtiveram resultados semelhantes, indicando que efeitos neuroprotetores de donepezil (ChEI) observados em modelos de cultura celular também estão presentes no modelo *in vivo*. Outros estudos demonstraram que os ChEIs também promoveram proteção contra lesão por excitotoxicidade do glutamato. Takada-Takatori e colaboradores (2006) sugerem que esta proteção envolve vias de apoptose e ocorre de maneira tempo e concentração dependentes (Takada-Takatori et al.,2006), enquanto Akaike e colaboradores em 1994 já haviam fornecido as primeiras evidências de que esta proteção parecia ser mediada por receptores nicotínicos (Akaike et al.,1994). Em modelo de neurotoxicidade por glutamato, os efeitos do donepezil foram mediados via receptores nicotínicos, mas isso não ficou aparente em outros modelos de injúria, como por exemplo, em modelo de privação de oxigênio e glicose (Akaike,2006).

Vários trabalhos têm sugerido que a plasticidade cerebral associada à reorganização cortical é a base para recuperação funcional após muitos tipos de injúrias do sistema nervoso, incluindo acidente vascular encefálico (Green,2003) e traumatismos crânio-encefálicos (Jang et al.,2002). A base neuronal da plasticidade mediando a reorganização do mapa cortical após lesão não é completamente entendida. Recentes estudos de Conner e colaboradores (2005) utilizando 192-IgG saporina (SAP), demonstraram que o sistema colinérgico têm sido claramente implicado como substrato necessário para plasticidade, reorganização cortical e recuperação funcional após lesão cerebral (Conner et al.,2005).

Trabalhos deste mesmo grupo de pesquisadores indicam que o sistema colinérgico também é capaz de possibilitar a reorganização cortical associada com a aprendizagem motora normal (Conner et al.,2003).

Muitos estudos têm mostrado que regiões do cérebro respondem de maneira diferenciada a insultos isquêmicos. Isso se deve principalmente a heterogeneidade das populações neuronais e suas propriedades intrínsecas. Alguns grupos celulares são mais vulneráveis e outros mais resistentes ao insulto isquêmico (Andsberg et al.,2001) (Larsson et al.,2001). Trabalhos têm mostrado que interneurônios estriatais exibem uma notável resistência contra a lesão cerebral isquêmica, o que faz dessa região alvo de interesse em estudos que visam o delineamento de estratégias neuroprotetoras (Larsson et al.,2001,Deng et al.,2008,Sakuma et al.,2008).

1.2.2 Estriado

Os gânglios ou núcleos da base são um conjunto de neurônios subcorticais localizados no prosencéfalo. Tradicionalmente são associados a processos motores, embora existam evidências de um papel paralelo em funções cognitivas (Middleton et al.,2000,Grahn et al.,2008). Em humanos e primatas não-humanos, os núcleos da base são formados pelo estriado (caudado e putâmen), estriado ventral (núcleo *accumbens* e a parte ventral do caudado e putâmen), globo pálido (interno e externo), substância nigra, e núcleo subtalâmico. Em não-primatas a anatomia é similar (Grahn et al.,2008).

A etiologia do nome estriado é latina, *striatum*, por causa da sua aparência cheia de estrias, quando observado ao microscópio. Essas estrias vêm dos axônios mielinizados da porção anterior da cápsula interna que, em humanos, atravessam o estriado de forma a separar o caudado do putâmen. Essa estrutura em humanos, não é proporcionalmente tão grande quando comparado ao estriado de roedores. Em roedores, caudado e putâmen representam uma estrutura única (Mink,1999).

O estriado é a maior “porta de entrada” dos núcleos da base e recebe aferências de todas as regiões do córtex (revisto por Woolf, 1991). Trabalhos indicam que atividade estriatal tem papel importante no controle de funções motoras e comportamentos relacionados com recompensa (Williams et al.,2008).

O estriado é composto em sua grande maioria por neurônios GABAérgicos (MSN - neurônios espinhosos médios). Adicionalmente, contêm uma rica rede de grandes interneurônios colinérgicos (Woolf,1991), interneurônios gabaérgicos contendo parvalbumina ou calretina e finalmente interneurônios contendo somatostatina, neuropeptídeo Y e óxido nítrico síntase (NOS), os quais provavelmente também são gabaérgicos (Andsberg et al.,2001).

Os interneurônios colinérgicos do estriado representam uma importante fonte de inervação e fornecem vários níveis de modulação estriatal. Neurônios colinérgicos regulam a liberação de dopamina (Zhou et al.,2001,Cachope et al.,2012,Threlfell et al.,2012), assim como a excitabilidade de MSNs através de múltiplos mecanismos (Wang et al.,2006,English et al.,2012).

O estriado é a primeira região afetada após a oACM (Carmichael,2005), no entanto trabalhos indicam que interneurônios dessa região são mais resistentes à insultos isquêmicos (Andsberg et al.,2001). A privação de oxigênio e glicose por 20 à 30 min é capaz de causar danos irreversíveis na maioria dos MSN dentro de 24 h após a lesão, enquanto neste mesmo período interneurônios colinérgicos permanecem intactos (Pulsinelli et al.,1982,Deng et al.,2008). Achados semelhantes observados em modelos de isquemia focal e global também indicaram maior resistência desse grupo de interneurônios (Andsberg et al.,2001,Deng et al.,2008). O tônus colinérgico pode potencialmente modular a sobrevivência da circuitaria estriatal.

O papel da ACh na isquemia ainda é desconhecido, no entanto, trabalhos têm demonstrado que a ACh confere proteção a neurônios através da ativação de distintos receptores nicotínicos (Takarada et al.,2012,Yakel,2013). Embora diferentes subtipos de receptores possam estar envolvidos em efeitos neuroprotetores de agonistas nicotínicos,

receptores nicotínicos alfa 7 ($\alpha 7$ nAChR) são considerados o principal alvo para neuroproteção (Akaike et al.,2009,Miwa et al.,2011,Krafft et al.,2012).

1.2.3 Receptores nicotínicos alfa 7

Os Receptores Colinérgicos Nicotínicos (RCN) pertencem à família de receptores ionotrópicos que, quando ativados, adquirem a conformação de canal aberto permeável aos íons Na^+ e K^+ . Os RCNs presentes no cérebro são constituídos predominantemente por subunidades α e β (Miwa et al.,2011).

Akaike e colaboradores em 1994, forneceram as primeiras evidências de que a proteção conferida pelo sistema colinérgico parecia ser mediada por receptores nicotínicos (Akaike et al.,1994). Durante os últimos anos foram descritas várias evidências sugerindo um papel importante de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) em doenças neurológicas e degenerativas (O'Neill,2002). Interessantemente, diferentes trabalhos têm demonstrado o efeito neuroprotetor de agonistas de receptores nicotínicos contra a morte celular induzida por glutamato, (Donnelly-Roberts et al.,1996,Gahring et al.,2003,Stevens et al.,2003,Sun et al.,2004) pelo peptídeo Beta-amiloide (Kihara et al.,1997,Gahring et al.,2003,Liu et al.,2004) e por hipóxia (Hejmadi et al.,2003).

A questão de quais subtipos de receptores nAChR estão envolvidos em efeitos neuroprotetores de agonistas nicotínicos é altamente relevante no contexto de design e desenvolvimento de ligantes seletivos de receptores nicotínicos que podem, eventualmente, serem utilizados para o tratamento de pacientes com isquemia cerebral.

Receptores nicotínicos de acetilcolina alfa 7 (nAChR $\alpha 7$) são expressos em neurônios, neuroglia e células endoteliais do cérebro de mamíferos (Takada-Takatori et al.,2006,Duris et al.,2011). Trabalhos recentes têm demonstrado que a estimulação desse receptor atenua a apoptose neuronal em vários modelos de doença, particularmente através da ativação da fosfatidilinositol 3-kinase/Akt (PI3K) (Takada-Takatori et al.,2006,Duris et al.,2011,Krafft et al.,2012). A ação da via colinérgica antiinflamatória capaz de regular respostas inflamatórias

através do receptor nicotínico alfa 7, tem sido evidenciada tanto a nível de sistema nervoso central quanto periférico (Wang et al.,2003,Shytle et al.,2004). Bloqueadores seletivos para receptor alfa 7, metillicaconitine (MLA) e alfa-bungarotoxina, atenuam efeitos neuroprotetores da nicotina contra neurotoxicidade do glutamato (Donnelly-Roberts et al.,1996,Kaneko et al.,1997) e da hipóxia (Hejmadi et al.,2003); sugerindo que os receptores nicotínicos alfa7 ($\alpha 7$ nAChRs) mediam tais efeitos neuroprotetores. Krafft e colaboradores (2012) demonstraram que a estimulação do $\alpha 7$ nAChRs resultou em redução da expressão da enzima pro-apoptótica GSK-3 β através da via de sinalização PI3K-Akt, promovendo assim, a redução do edema cerebral e melhor resultados funcionais após lesão cerebral hemorrágica (Krafft et al.,2012).

Adicionalmente, Egea e colaboradores (2007) demonstraram, em modelo *in vitro* de privação de oxigênio de glicose (OGD), que fatias hipocampais de camundongos selvagens tratadas com nicotina apresentaram uma redução de 54.4% da morte celular. No entanto, a nicotina foi incapaz de conferir neuroproteção em fatias hipocampais de camundongos nocautes para $\alpha 7$ nAChRs. Esses dados reforçam a visão de que efeitos neuroprotetores são predominantemente relacionados aos receptores alfa7 (Egea et al.,2007). Até o momento, não foram encontrados trabalhos na literatura que avaliam a performance de animais nocaute para $\alpha 7$ nAChRs em modelo de lesão cerebral *in vivo*.

Beraldo e colaboradores (2010), demonstraram que o $\alpha 7$ nAChR interage com a proteína príon celular e STI1 (Stress Inducible Protein1) modulando o influxo de cálcio e promovendo diferenciação e sobrevivência neuronal (Beraldo et al.,2010). O conhecimento de vias de sinalizações e interações desse receptor com outras proteínas é importante no sentido de facilitar o entendimento de mecanismos envolvidos em efeitos neuroprotetores e o seu papel na patofisiologia da isquemia cerebral.

1.3 PrP^C e STI1

O termo Prion, partícula infecciosa proteinácea, foi originalmente proposto para nomear partículas infecciosas que eram resistentes aos tratamentos que modificavam os ácidos nucleicos (Prusiner,1982a,Prusiner,1982b). Doenças priônicas são desordens degenerativas fatais, de origem genéticas, infecciosas ou esporádicas, sendo que todas estas envolvem a modificação da proteína príon celular, um constituinte normal de células de mamíferos (Prusiner,1991b).

A isoforma patológica da proteína príon (PrP^{Sc}) está presente em encefalopatias espongiformes transmissíveis como a doença de Creutzfeldt–Jakob em humanos, scrapie em ovelhas e a encefalopatia espongiforme bovina em gado. Todas essas desordens são caracterizadas patologicamente por perda neuronal e pelo acúmulo da isoforma anormalmente enovelada da proteína prion celular (PrP^C), denominada PrP^{Sc}, que representa o principal componente de *scrapie* (Prusiner,1998). Essas desordens apresentam características clínicas comuns tais como demência, disfunções motoras como ataxia cerebelar e um longo período de incubação, que pode variar de 1,5 a 40 anos.

Alguns anos após a descoberta da proteína Príon, pesquisadores identificaram uma proteína de mesma massa molecular (27 a 30 KDa) no cérebro de animais não infectados com scrapie. Interessantemente, essa proteína não era mais detectável após o tratamento e digestão enzimática com Proteinase K. Estudos demonstraram que o nível de mRNA da proteína príon eram similares em tecidos infectados e não infectados, levando assim à proposição da existência de uma proteína príon endógena (Prusiner,1998). Sendo assim, de acordo com a hipótese proposta, a proteína príon scrapie induz alterações conformacionais em PrP^C, levando a formação de novas moléculas de PrP^{Sc} em uma reação autocatalítica (Harris,1999b).

PrP^C é uma glicoproteína ligada à membrana plasmática por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Stahl et al.,1987), expressa em neurônios, células

neuroendócrinas e do sistema imune, entre outras. Sua expressão parece ser regulada ao longo do desenvolvimento, sendo notavelmente detectada durante a sinaptogênese (Sales et al.,2002).

A alta homologia e conservação de PrP^C entre as espécies sugerem um papel fisiológico importante para esta proteína, e apesar da sua função não ser completamente esclarecida, alguns aspectos da atividade normal de PrP^C já são conhecidos. Em contraste à PrP^{Sc}, a PrP^C tem sido descrita como mediadora de vários processos fisiológicos como, por exemplo, a formação e consolidação da memória, a proteção contra apoptose e estresse oxidativo, a neuritogênese e a modulação de resposta imunológica (Martins et al.,Linden et al.,2008).

Recentes estudos sugerem que a PrP^C tem propriedades neuroprotetoras e que sua deleção aumenta a susceptibilidade à injúria neuronal *in vitro* e *in vivo* (Weise et al.,2006). Interessantemente foi demonstrado que animais *nocaut* para PrP^C apresentam maior volume de infarto após isquemia cerebral transitória e permanente, quando comparados com camundongos controle (Spudich et al.,2005,Weise et al.,2006). Além disso, os animais que apresentam expressão geneticamente aumentada dessa proteína recuperam a viabilidade tecidual e apresentam menores danos pós-isquêmicos (Spudich et al.,2005). Adicionalmente, a deleção de PrP^C prejudica a via antiapoptótica fosfatidilinositol3-kinase/Akt, possibilita a ativação pós-isquêmica da caspase 3 (Weise et al.,2006) e aumenta a susceptibilidade ao estresse oxidativo (Brown et al.,1997,White et al.,1999).

Em busca de funções chave para a essa proteína, numerosos estudos realizados nos últimos anos foram destinados a identificar proteínas ligantes da PrP^C (Lee et al.,2003), (Revisado por (Linden et al.,2008), sendo que a proteína STI1 talvez seja o ligante de PrP^C mais extensivamente estudado até agora.

A proteína STI1 foi inicialmente identificada em leveduras através de testes de indução ao estresse por choque térmico. Esses testes investigavam fatores envolvidos na indução do aumento da expressão de genes nessas condições de estresse. Quando

pesquisadores identificaram então, pela primeira vez, essa proteína e a distinguiram de outras chaperonas já conhecidas, a nomearam como Stress Inducible Protein1 (STI1) (Nicolet et al.,1989).

As chaperonas moleculares são uma família de proteínas adaptadas para facilitar o enovelamento correto de outras proteínas em condições fisiológicas ou de estresse, um mecanismo essencial para a manutenção homeostática celular. A principal família de chaperonas é chamada proteínas de choque térmico (Hsp). As proteínas co-chaperonas medeiam a regulação e a especificidade das chaperonas. A regulação em particular das proteínas Hsp70 e Hsp90 é mediada principalmente pela co-chaperona Hop que se liga simultaneamente a essas proteínas facilitando a aproximação e transferência do substrato para que o enovelamento seja completado (McClellan et al.,2001,Song et al.,2005). Sendo assim, a proteína STI1 é considerada uma co-chaperona homóloga à proteína organizadora da HSP70 e HSP90 (Hop), que entre outras funções, atua no enovelamento de proteínas recém sintetizadas (Zanata et al.,2002,Longshaw et al.,2004).

STI1 é uma proteína predominantemente citoplasmática, no entanto pode ser encontrada em vários compartimentos intracelulares e existem indícios de que esta proteína transita entre núcleo e citoplasma dinamicamente. Longshaw e colaboradores demonstraram que mudanças na localização de STI1 (aumento de sua expressão no núcleo) se deve a estresse citotóxico (Longshaw et al.,2000,Longshaw et al.,2004).

Em camundongos, STI1 foi detectada no oitavo dia do desenvolvimento embrionário (E8), tendo sua expressão aumentada ao longo do desenvolvimento e sendo constitutivamente expressa em quase todos os tecidos (Hajj et al.,2009). Trabalhos demonstraram que a deleção de STI1 em *C elegans* abrevia a vida de vermes mutados (Song et al.,2009) e que a deleção de STI1 em leveduras é letal quando associadas a alterações na função de Hsp90 (Chang et al.,1997). Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a deleção de STI1 em camundongos é letal e os animais *nocaut* para STI1 não sobrevivem após 10-11 dias do desenvolvimento embrionário, apresentando

perceptíveis atrasos e deformidades quando comparados com embriões controles. Adicionalmente, a expressão de STI1 pode ser observada desde fases iniciais de desenvolvimento em blastocistos (Beraldo et al, 2013 in press).

Altos níveis de STI1 são secretados por astrócitos e esta secreção apresenta impacto significativo nas funções neuronais e gliais (Lima et al.,2007,Arantes et al.,2009) e na renovação de células tronco (Santos et al.,2011). Lima e colaboradores (2007) demonstraram que além de STI1, astrócitos também secretam PrP^C, e essas proteínas agem em conjunto como mediadores da sobrevivência neuronal.

A interação de STI1 como um ligante de PrP^C está associada a importantes processos biológicos no sistema nervoso central. Lopes e colaboradores mostraram que a interação de PrP^C e STI1 promove neuritogênese e neuroproteção em culturas de hipocampo, através da ativação de ERK (cinase regulada por sinais extracelulares) e Proteína Kinase A (PKA) (Lopes et al.,2005). Recentemente, Beraldo e colaboradores demonstraram que a ativação de ERK e PKA, assim como a neuroproteção e diferenciação neuronal, induzida pela interação STI1/PrP^C, envolve um aumento intracelular de Ca²⁺, via modulação de receptores nicotínicos $\alpha 7$. Quando esse receptor foi bloqueado com um antagonista específico, a alfa-bungarotoxina, todos efeitos protetores foram inibidos, indicando que STI1 interage com o complexo PrP^C e $\alpha 7$ nAChRs, promovendo neuroproteção, sendo assim um potencial alvo para modulação dos efeitos neuroprotetores em doenças neurológicas (Beraldo et al.,2010).

Todos os trabalhos demonstrando efeitos neuroprotetores da proteína STI1 até o momento foram realizados *in vitro*.

1.4 Animais geneticamente modificados

O uso de ferramentas farmacológicas e, mais recentemente, genéticas em pesquisas, tem contribuído de maneira significativa para importantes achados na ciência. O uso de drogas direcionadas ao sistema colinérgico (por exemplo: agonistas e antagonistas de

receptores colinérgicos e inibidores da acetilcolinesterase) trouxe valiosas contribuições para a compreensão do papel da ACh nas funções cognitivas e motoras (Greferath et al.,2002). No entanto, algumas das técnicas necessárias para a administração de fármacos são complexas, como por exemplo, a implantação de cânulas no cérebro. A implantação de cânulas tem a vantagem de ser direcionada ao local desejado e no tempo desejado, no entanto, essa técnica além de requerer anestesia, também pode promover um aumento da tensão intracranial e causar lesões em regiões do cérebro.

Uma outra abordagem, realizada na tentativa de entender diferentes funções do sistema colinérgico, foi realizada através do uso de excitotoxinas, mas a falta de seletividade contra neurônios colinérgicos limitou as conclusões obtidas a partir desses estudos (Hepler et al.,1985). O desenvolvimento de toxinas seletivas para neurônios colinérgicos veio com o intuito de sanar tais limitações. Primeiramente, a toxina 192IgG-saporin foi testada em ratos (Wiley et al., 1991; Schliebs et al., 1996) e recentemente, a toxina p75 IgG-saporin foi testada em camundongos (Moreau et al.,2008).

O uso de imunotoxinas específicas para o sistema colinérgico tem sido questionado, uma vez que a lesão pode afetar não somente o tônus colinérgico, mas também a atividade glutamatérgica, já que neurônios colinérgicos parecem ser capazes de liberar glutamato como um co-neurotransmissor (Prado et al.,2013). Sendo assim, isso tem particular importância no estriado, onde neurônios colinérgicos expressam VGLUT3 (Gras et al.,2008) e secretam glutamato (Higley et al.,2011).

Avanços recentes na manipulação molecular de genes de mamíferos permitem a alteração da expressão de genes específicos *in vivo*. O nocauteamento de genes é uma ferramenta poderosa que possibilita o estudo *in vivo* do papel fisiológico de específicas proteínas.

Nos últimos anos, camundongos nocaute para diferentes componentes do sistema colinérgico vêm sendo utilizados com o intuito de elucidar a participação desse sistema em aspectos fisiológicos e patológicos.

Diferentes grupos de pesquisadores geraram animais nocaute para a enzima colina acetiltransferase (ChAT) (Misgeld et al., 2002, Brandon et al., 2003), para o transportador de colina de alta afinidade (CHT1) (Ferguson et al., 2004) e para o transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) (de Castro et al., 2009). No entanto, todos esses animais nocautes morreram poucos minutos após o nascimento, possivelmente por asfixia resultante da incapacidade de contração do diafragma. A sobrevivência de animais nocautes para proteínas envolvidas com a síntese e liberação de ACh é um dos maiores problemas encontrados por pesquisadores, uma vez que o sistema colinérgico tem importantes funções tanto no sistema nervoso central quanto periférico. Sendo assim, como estratégia alternativa para o estudo dessas proteínas *in vivo* e sem intervenção farmacológica, pesquisadores de diferentes grupos geraram os animais *knockdown*, que apresentam a expressão diminuída da proteína estudada.

O VACHT controla o último passo da armazenagem de acetilcolina em vesículas sinápticas, sendo assim, é um importante alvo para intervenção na função de neurônios colinérgicos. Prado e colaboradores vêm se dedicando ao desenvolvimento de modelos animais com disfunção colinérgica a fim de entender melhor o papel da ACh no sistema nervoso.

Através de técnicas de recombinação homóloga, animais geneticamente modificados com uma redução da expressão de VACHT (*Knockdown*) foram gerados. Os animais *knockdown* heterozigotos (KD^{HET}), assim denominados por expressarem apenas 60% da proteína VACHT, apresentam déficits de memória de reconhecimento social e de objetos. Já os animais *knockdown* homozigotos (KD^{HOM}) assim denominados por expressarem apenas 30% da proteína VACHT, apresentaram pronunciadas alterações neuromusculares (Prado et al., 2006).

Recentemente, Martins-Silva e colaboradores desenvolveram diferentes modelos animais de disfunção colinérgica usando novas mutações do VACHT em camundongos. Para esse trabalho, esse grupo gerou uma linhagem de camundongos VACHT $^{flox/flox}$ com o alelo VACHT flanqueado por sequências loxP (Martins-Silva et al., 2011). Eles

demonstraram que camundongos VACHT^{flox/flox} apresentam a expressão de VACHT e fenótipo normal, semelhantes a camundongos WT (Martins-Silva et al.,2011).

Guzman e colaboradores (2011) desenvolveram uma linhagem de camundongos transgênicos expressando o cromossoma artificial de bactéria (BAC - Bacterial Artificial Chromosome). Esses pesquisadores usaram o D2-Cre BAC que expressa Cre recombinase na presença do receptor de dopamina D2 que é expresso primariamente no estriado (Guzman et al.,2011). Através do cruzamento de camundongos D2-Cre com VACHT^{flox/flox} gerado por Martins-Silva e colaboradores, Guzman e colaboradores geraram os camundongos VACHT^{D2-Cre-flox/flox} que são deficientes para o VACHT especificamente no estriado. A caracterização bioquímica desses animais demonstrou que a expressão protéica e de RNA mensageiro para ChAT e CHT1 no estriado é similar em camundongos nocautes e selvagens. No entanto, a expressão do VACHT foi praticamente abolida, assim como a liberação de ACh em resposta a despolarização com KCl no estriado, enquanto na região do hipocampo tanto a expressão do VACHT como a liberação de ACh permanecem inalterados quando comparados a animais selvagens. Adicionalmente, experimentos comportamentais demonstram que a eliminação do VACHT no estriado não afetou a locomoção espontânea, a hiperatividade induzida por cocaína e as propriedades de recompensa nestes animais (Guzman et al.,2011).

Sendo assim, esses animais representam uma importante ferramenta para estudo da lesão cerebral e participação da ACh em neuroproteção e recuperação funcional, uma vez que, além de serem nocautes para o VACHT no estriado, esses camundongos também não apresentam prévios déficits comportamentais, podendo então ser igualmente comparado aos animais selvagens após isquemia. Esse trabalho é o primeiro estudo que utiliza essa linhagem de animais para estudo da lesão cerebral e neuroproteção.

Mais recentemente, nosso grupo utilizou uma abordagem similar a de Guzman e colaboradores para eliminar a expressão de VACHT no prosencéfalo ventral. Os animais

gerados, VACHT^{Six3-Cre-flox/flox}, demonstraram hiperatividade e significativa redução da memória espacial e potenciação a longo prazo (Martyn et al.,2012).

Outras modificações genéticas em camundongos também foram realizadas com o intuito de estudar participação da neurotransmissão colinérgica em processos comportamentais. Diferentes camundongos nocaute foram desenvolvidos para os receptores colinérgicos, tanto para os receptores muscarínicos como para os receptores nicotínicos (Gomez et al.,1999,Yamada et al.,2001a,Yamada et al.,2001b,Salas et al.,2003).

Recentemente, Beraldo e colaboradores desenvolveram camundongos geneticamente modificados para a proteína STI1. Para estudar o papel de STI1, o alelo foi deletado usando a tecnologia Cre/Lox. Nós observamos que camundongos com 2 STI1^{-/-} alelos (STI1^{-/-}) são completamente deficientes para a proteína STI1 e a deleção de STI1 é letal. Animais nocautes para STI1 não sobrevivem após 9.5-10.5 dias do desenvolvimento embrionário. No entanto, camundongos STI1^{+/-} expressam 50% da proteína STI1 quando comparados com controles (STI1^{+/+}). Adicionalmente, camundongos transgênicos para STI1 foram desenvolvidos usando fragmentos de DNA de BAC contendo o alelo STI1. Esses animais expressam 4x mais a proteína STI1 (Beraldo et al, 2013 in press). Essas linhagens representam uma possibilidade a mais para investigação do papel de STI1 em ações neuroprotetoras, assim como a possível interação dessa proteína em ações neuroprotetoras do sistema colinérgico.

Sendo assim, através de rigoroso levantamento bibliográfico, do conhecimento e disponibilidade de uso de animais geneticamente modificados para proteínas de nosso interesse, e considerando algumas questões que ainda não estão claras na literatura, elaboramos as hipóteses e objetivos desse trabalho.

2 OBJETIVOS

- ***Objetivo Geral***

O objetivo geral desse trabalho é investigar o papel do sistema colinérgico na isquemia cerebral e recuperação funcional após a lesão isquêmica.

- ***Objetivos específicos***

- Padronizar o modelo de isquemia por oclusão da artéria cerebral média em camundongos no Núcleo de Neurociências - (UFMG) e Laboratório do prof. Marco Prado (Robarts Research, Western University - Canadá).
- Comparar efeitos de diferentes tempos de isquemia na lesão cerebral e recuperação funcional.
- Avaliar desempenho funcional de camundongos geneticamente modificados previamente à isquemia.
- Avaliar o efeito da acetilcolina estriatal na isquemia cerebral *in vivo* e recuperação funcional.
- Investigar efeitos da proteína STI1, que regula PrP^C e receptores nicotínicos, na lesão cerebral e recuperação funcional em camundongos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Nesse trabalho foram utilizados camundongos machos adultos (3-5 meses) de diferentes linhagens, incluindo: animais selvagens C57BL/6, animais knockdown homozigotos para o transportador vesicular de acetilcolina (VACHT^{HOM}) (Prado et al.,2006), camundongos geneticamente modificados com deleção específica do transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) no estriado (VACHT^{D2-Cre-flox/flox}) (Guzman et al.,2011), camundongos transgênicos para a proteína STI1 (TgSTA) (Beraldo et al, 2013 in press) e camundongos com deleção parcial da proteína STI1 (STI1^{-/+}) (Beraldo et al, 2013 in press). Como controle foram utilizados camundongos selvagens da mesma geração e *background* genético, usualmente da mesma ninhada, para cada respectivo grupo de animais geneticamente modificados. Adicionalmente, utilizamos um grupo de animais machos idosos (9-12meses) transgênicos para STI1 (TgSTA).

Os animais selvagens (C57BL/6) utilizados para padronização do modelo de isquemia foram fornecidos pelo CEBIO-ICB-UFMG. Animais geneticamente modificados utilizados neste trabalho foram fornecidos pelo “Animal Care and Veterinarian Service” (ACVS) da Universidade de Western Ontário, London, Canadá.

Todos os animais utilizados nesse trabalho foram mantidos em estante ventilada, com temperatura controlada em $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade 40-70%, ciclo claro-escuro 12/12 horas ou 14/10 horas, com livre acesso a água e comida.

Os protocolos realizados neste trabalho estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal conforme projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG) sob o protocolo nº134/2010, e também aprovados de acordo com o comitê da Universidade de Western Ontário, Robarts Research, London, Canadá (ACVS) sob protocolo nº2008-127. Todos os experimentos foram conduzidos de forma a evitar o sofrimento dos animais e minimizar o número de animais utilizados.

3.2 Grupos e delineamento experimental

Para cada linhagem estudada, os grupos e delineamento experimental foram organizados em protocolos, levando em consideração o objetivo a ser investigado e a disponibilidade e viabilidade do uso dos animais.

Para experimentos de padronização do modelo de isquemia e determinação do efeito de diferentes tempos de isquemia na lesão cerebral, somente animais selvagens (C57 BL/6) foram utilizados. Para avaliação do desempenho e caracterização funcional das diferentes linhagens de camundongos utilizadas, foram realizados testes funcionais (pré-testes) contendo somente 2 grupos experimentais: animais do genótipo analisado e respectivos controles.

- **Protocolo 1: Avaliação do efeito da acetilcolina estriatal na isquemia cerebral *in vivo* e recuperação funcional**

Para realização desse protocolo foram utilizados animais VAcHT^{D2-Cre-flox/flox} (deleção específica do VAcHT no estriado) e VAcHT^{Flox/Flox} (controles com o mesmo background genético). Dois delineamentos experimentais foram elaborados. O primeiro com o objetivo de avaliar o volume de infarto e a recuperação funcional após a isquemia, e o segundo teve o objetivo de investigar possíveis fatores e mecanismos que causam a lesão e morte celular.

Delineamento experimental 1

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: VAcHT^{D2-Cre-flox/flox}/Isquemia, VAcHT^{Flox/Flox}/Isquemia, VAcHT^{D2-Cre-flox/flox}/Sham e VAcHT^{Flox/Flox}/Sham. O design experimental consistiu na realização de pré-testes, cirurgia de isquemia (dia 0), realização de imagens por ressonância magnética (MRI) no 1º dia após cirurgia, testes funcionais no 7º e 14º dias após cirurgia como exemplificado na figura 1. Após a finalização dos testes funcionais os animais foram sacrificados e procedimentos histológicos realizados.



Figura 1: Delineamento experimental 1.

Pré testes foram realizados dias antes da cirurgia de oclusão da artéria cerebral média ou cirurgia Sham (dia 0). 24 horas após a cirurgia animais foram escaneados para obtenção de imagens de ressonância magnética estrutural. No dia 7 e 14 após a cirurgia os animais foram submetidos a testes para avaliação da recuperação funcional, e no 15º os animais foram sacrificados para realização de análises histológicas.

Delineamento experimental 2

Os animais foram divididos em 2 grupos experimentais: VACHT^{D2-Cre-flox/flox}/Isquemia e VACHT^{Flox/Flox}/Isquemia. Para os experimentos referentes a esse delineamento o hemisfério contralateral foi utilizado como controle. Todos os animais foram submetidos à cirurgia de isquemia (dia zero) e foram sacrificados 1 ou 3 dias após a cirurgia de acordo com o experimento a ser realizado. Animais de ambos os grupos sacrificados 1 dia após a cirurgia, foram utilizados para realização de Western blotting e camundongos sacrificados ao 3º dia após isquemia foram usados para experimentos de qPCR e TUNEL. Animais de ambos os grupos foram sacrificados 3 dias após a cirurgia e utilizados para a investigação da expressão de mRNA de interesse através da técnica de qPCR e para investigação de apoptose através da técnica de TUNEL. Todas as técnicas e testes serão descritos adiante.

- **Protocolo 2: Investigar efeitos da proteína STI1 na lesão cerebral e recuperação funcional.**

Para realização desse protocolo foram utilizados animais transgênicos para a proteína STI1 (TgSTA), animais com deleção parcial dessa proteína STI1^{-/+} e respectivos controles com o mesmo background genético. Devido a baixa disponibilidade dos animais TgSTA, essa linhagem foi utilizada somente para avaliação da lesão cerebral através de MRI.

A linhagem de animais STI1 foi dividida em 4 grupos experimentais: STI1^{-/+}/Isquemia, STI1^{+/+}/Isquemia, STI1^{-/+}/Sham e STI1^{+/+}/Sham. O design experimental consistiu na

realização de pré-testes, cirurgia de isquemia (dia 0), realização de MRI um dia após cirurgia, testes funcionais no 7º e 14º dias após cirurgia como exemplificado na figura 1. Após a finalização dos testes funcionais os animais foram sacrificados e procedimentos histológicos realizados.

3.3 Cirurgia de isquemia (oclusão da artéria cerebral média)

O procedimento cirúrgico utilizado para a indução da isquemia foi o de oclusão transitória da artéria cerebral média (ACM), baseado na modificação do método descrito por Zea Longa (Longa et al.,1989). A anestesia foi induzida pela inalação de 4% Isoflurano (em uma mistura NO₂/O₂ de 70/30%) e mantida pela inalação de 1.5-2% de Isoflurano. Após a anestesia, foi injetada atropina diluída em salina a 2%, via intra peritoneal, para a prevenção de arritmias cardíacas e hipersecreção brônquica secundária à estimulação mecânica do nervo vago durante o procedimento cirúrgico. Para realização da cirurgia o animal foi colocado na posição supina na mesa cirúrgica. As patas anteriores foram imobilizadas, os pelos da região anterior do pescoço foram retirados e em seguida foi realizada a assepsia dessa região com álcool iodado. Foi realizada uma pequena incisão sagital mediana na pele e os tecidos foram divulsionados até que a artéria carótida comum (ACC) esquerda, assim como, a bifurcação em artéria carótida externa (ACE) e artéria carótida interna (ACI) fossem visualizadas. A ACC foi ligada com um fio de seda em sua porção distal da bifurcação e a ACE foi ligada em sua porção proximal da bifurcação. Em seguida, o ramo da artéria carótida interna (ACI), pterigopalatino, e a ACI foram temporariamente ocluídos com um microclipe cirúrgico. A ACC foi parcialmente seccionada e o fio de oclusão (Doccol Corporation, MCAo suture 702256PK5Re) foi introduzido em direção a ACI até o local em que se encontrava o microclipe. Esse microclipe foi rapidamente retirado e o fio de oclusão continuou a ser introduzido através da ACI até a origem da Artéria cerebral Média (ACM) esquerda, ocluindo assim a irrigação sanguínea do território correspondente pelo período estabelecido (Figura 2).

Foram utilizados dois critérios para determinar se o fio de oclusão estava na origem da ACM: a inserção do fio a uma distância de 10-11mm da bifurcação da ACC e/ou se houve uma discreta resistência à passagem do fio nessa distância. O fio de oclusão foi mantido nessa posição através de uma ligadura à parede da ACC. O animal foi suturado, retirado do aparato anestésico e encaminhado para a mesa de recuperação. Durante o período da isquemia, os animais foram mantidos aquecidos sob a luz infravermelha e sem anestesia. Sendo assim, o comportamento do animal e seu score neurológico puderam ser observados durante esse período.

Após os 60 minutos de isquemia, o animal foi reanestesiado e o fio de oclusão retirado. Animais sham passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico, no entanto, sem a efetiva oclusão da artéria. O grupo sham também foi reanestesiado e suturado, embora não houvesse a necessidade de promover a reperusão uma vez que não houve o bloqueio da artéria com o fio de oclusão.

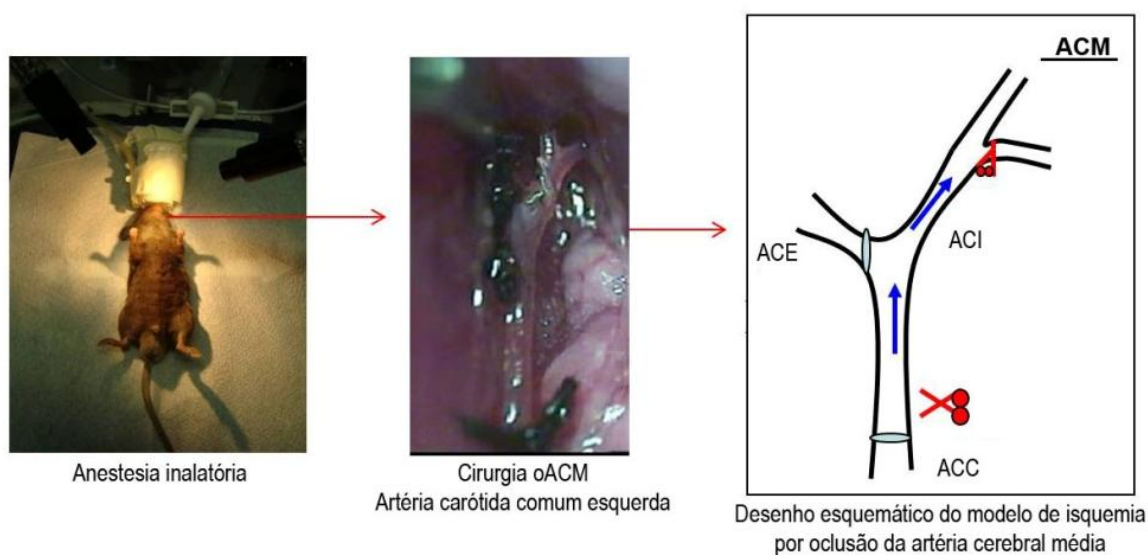


Figura 2: Modelo de isquemia por oclusão da artéria cerebral média.

A anestesia foi induzida pela inalação de Isoflurano. A oclusão da ACM foi realizada de acordo com o método proposto por Longa e colaboradores (1989). O fio de oclusão foi introduzido através da ACC em direção à ACI promovendo a oclusão temporária da ACM. ACM: Artéria Cerebral Média, ACC: Artéria Carótida Comum, ACE: Artéria Carótida Externa, ACI: Artéria Carótida Interna.

3.3.1 Cuidados pós-operatórios

Após a cirurgia, os animais foram mantidos aquecidos em uma mesa de recuperação por cerca de duas horas para a manutenção da temperatura corporal entre 36-38°C. Também foram monitorados quaisquer efeitos adversos. Água e ração umedecida foram disponibilizadas no fundo da gaiola para facilitar o acesso. O fundo da gaiola foi coberto com papel absorvente por até 12 horas após o fim da cirurgia, em seguida os animais foram transferidos para caixas forradas com maravalha. Os camundongos receberam duas doses diárias de 1 ml de salina intra peritoneal para a reposição de líquidos até o terceiro dia pós-operatório ou até começarem a recuperar peso. Os animais foram pesados nos 3 primeiros dias e a cada 2 dias até o dia do sacrifício.

3.3.2 Critérios de inclusão

- **Score neurológico**

Déficits neurológicos foram avaliados 1 hora após a cirurgia de acordo com a escala modificada de Bederson (Bederson et al.,1986,Hunter et al.,2000). Esta escala avalia importantes características da isquemia focal e é especialmente sensível a danos no estriado (Modo,2009). O índice 0 (zero) indica ausência de déficits; 1 - Fraqueza leve de membros anteriores; 2 - Fraqueza grave de membros anteriores e movimento circular para a esquerda (lado da lesão cerebral) quando suspenso pela cauda; 3 - Movimento circular espontâneo para a esquerda; 4 - Não-responsivo; 5 - Morto. Apenas animais isquemiados que apresentaram índice 2 e/ou 3 de gravidade foram incluídos no experimento (Figura 3). Os animais sham, incluídos no estudo, apresentaram índice de gravidade igual a zero. Essa avaliação foi realizada durante a isquemia, momentos antes da reperusão e até o 2º dia pós-operatório.

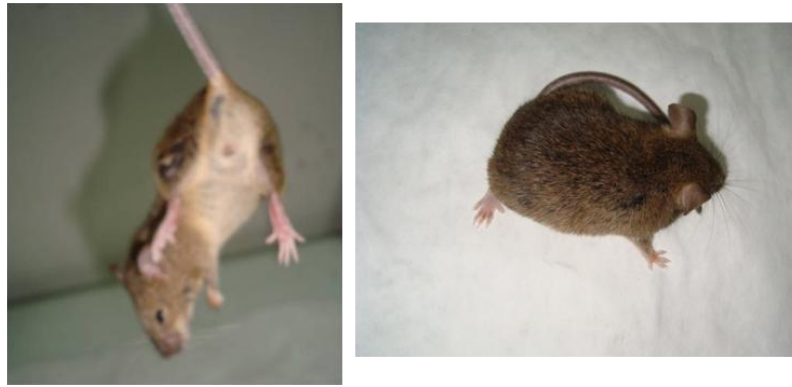


Figura 3: Imagens representativas de animais isquemiados apresentando déficits neurológicos.

Os déficits neurológicos foram avaliados de acordo com a escala de Bederson e colaboradores (1986). À esquerda: Animal apresenta movimento circular para o lado da lesão cerebral quando suspenso pela cauda (Score 2). À direita: Animal apresenta movimento circular espontâneo para o lado esquerdo (lado da lesão) (score 3).

- **Peso do animal**

O Peso corporal é um bom indicador do status de saúde do animal. Animais submetidos à cirurgia de isquemia tipicamente perdem em média 15% do peso corporal, se eles não o fazem, isso poderia ser um indicativo de que a oclusão da artéria não foi propriamente realizada ou o dano causado foi menor que o esperado (Modo,2009). Animais que apresentaram perda de peso maior que 30% em relação ao peso pré-operatório não foram incluídos nos experimentos.

- **Perfil da lesão cerebral**

A oclusão da ACM pode resultar em lesão estriatal e cortical, variando de acordo com o tempo de lesão, irrigação colateral e porcentagem de oclusão da artéria. Neste trabalho os animais isquemiados foram divididos em 2 grupos, por um avaliador cego ao genótipo, de acordo com o perfil da lesão: lesão do tipo predominantemente estriatal ou lesão estriatal e cortical. Essa divisão faz com que os grupos se tornem mais homogêneos e favorece a comparação entre grupos (Modo,2009).

3.3.3 Teste da eficácia do método de oclusão da ACM

Foram realizados dois testes para verificar a eficácia do método de oclusão da ACM, a perfusão transcardíaca com o corante azul de Evans e o marcador de viabilidade tecidual Trifeniltetrazolium-2.3.5 Cloreto (TTC). O primeiro com o objetivo de verificar se o método empregado na oclusão intraluminal da ACM era eficiente em interromper o fluxo sanguíneo para a área cerebral irrigada por essa artéria e o segundo com o objetivo de avaliar o efeito do dano isquêmico sobre o tecido cerebral.

Para certificação da eficácia do método utilizando o corante azul de Evans, o animal passou pelo procedimento cirúrgico e o fio de oclusão foi devidamente posicionado. Em seguida o animal foi perfundido transcardialmente com salina por 3 minutos e com 2ml do corante azul de Evans. Em seguida o cérebro foi removido e as áreas cerebrais perfundidas (azul) e não-perfundidas (coloração normal do tecido) foram avaliadas.

O Marcador TTC foi utilizado um dia (24h) após a cirurgia de oACM. Os cérebros foram rapidamente removidos e imersos na solução de TTC. Para fins qualitativos o cérebro inteiro (não fatiado) foi imerso e corado pelo TTC. Para fins quantitativos, fatias cerebrais foram imersas nessa solução corante (técnica descrita posteriormente). A marcação pelo TTC (vermelho) se correlaciona com a quantidade e atividade funcional das mitocôndrias, sendo que, áreas sem coloração (branco) representam a área de lesão. Após ambos os testes os cérebros foram fixados em tampão formalina 10%, fotografados e avaliados.

3.4 *Laser Doppler fluxométrico*

O laser Doppler foi utilizado para avaliar a perfusão tecidual na área de irrigação da ACM. Além disso, esse método confirmou a efetividade e consistência de repetição da oclusão em um grupo de animais submetidos a isquemia. Esse método é capaz de medir o fluxo da microcirculação sanguínea, através da radiação do laser em células vermelhas de tecidos periféricos.

Um grupo de animais selvagens foi submetido à cirurgia estereotáxica e craniotomia. Em seguida a probe do laser Doppler (OxyFlo AD Instruments, Colorado-USA) foi posicionado na região da artéria cerebral média e a porcentagem do fluxo sanguíneo da região foi registrada (Nikolova et al.,2009). Essa medida é obtida devido a reflexão das ondas irradiadas pelo laser em células vermelhas (backscattering). Foram registrados para cada animal: o valor basal do aparelho, 3 medidas antes e 3 medidas após a cirurgia de isquemia. Em seguida a média desses valores foi calculada e a porcentagem de oclusão foi quantificada.

3.5 Parâmetros fisiológicos

A medida dos parâmetros fisiológicos é um método adicional de confirmação que o insulto isquêmico foi equivalente entre todos os grupos avaliados (Zhang et al.,2012). Neste trabalho, a avaliação dos parâmetros fisiológicos foi realizada antes e durante a isquemia (30min de oclusão). Adicionalmente, parâmetros fisiológicos do grupo de animais VACHT^{D2Cre-flox/flox} também foram avaliados 24h após a lesão.

A medida da frequência cardíaca (FC) foi obtida através de um sistema computadorizado não invasivo CODA (Kent Scientific, Torrington, CT, USA). Resumidamente, os camundongos foram posicionados em uma caixa de contenção e um sensor foi colocado na base da cauda. A FC foi medida 3x e a média foi calculada. A saturação de oxigênio foi monitorada através de um pequeno oxímetro animal (STARR life sciences Corp., Allison Park, PA, USA) e a média de 3 medidas foi registrada.

Os animais foram mantidos numa plataforma aquecida e a temperatura retal foi monitorada através de um termômetro anal (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Vaselina foi aplicada na ponta da probe para facilitar o posicionamento da probe e evitar lesões no animal. A temperatura foi registrada a partir do momento em que a temperatura se estabilizou.

Para obtenção dos valores de pH e glicose, amostras de sangue (via punção cardíaca sob anestesia - isoflurano) foram colhidas antes, durante e/ou 24h após isquemia. As

amostras de sangue (30 µl) foram submetidas a análises através da utilização do sistema ABL-725 blood gas analyzer (Radiometer, Copenhagen, Denmark).

3.6 *Imagens de ressonância magnética estrutural*

Para obtenção das imagens de ressonância magnética animais foram anestesiados (4% isoflurano para indução e 1.5-2% para manutenção da anestesia) e a temperatura foi continuamente monitorada durante a varredura pelo scanner.

As Imagens de Ressonância Magnética (MRI) foram adquiridas através de um Scanner 9.4T (Agilent Tech. Palo Alto, Califórnia) (Figura 4). Foram obtidas imagens sequenciais, sensíveis a T2 (TR (tempo de repetição)=3000s; TE (tempo de eco)= 45ms) através de sequência de “spin-echo”, 31 fatias de 500µm de espessura, matriz=128x128 pixels, campo visual=19.2 x 19.2mm, em 38 minutos. Além disso, para confirmação dos resultados e maior precisão na avaliação das imagens, também foram obtidos imagens 3D isotópicas (125 µm. SSFP – Steady-state free precessing imaging) usando tfisp (True FISP) 3D com os seguintes parâmetros: TR/TE= 7.4/3.7ms, matriz=154 x 132 x 102 pixels e campo visual=19.2 x 16.4 x 12.8mm³, em 52 minutos. Os animais foram escaneados 24 horas após a cirurgia de oclusão da ACM esquerda e a lesão cerebral isquêmica foi caracterizada por um hipersinal na imagem (área clara, cheia de líquidos – hipersinal). As imagens foram analisadas utilizando-se o software *ImageJ – Image Processing and Analysis in Java* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). O volume absoluto da lesão (Área total* Espessura da fatia) e o seu percentual em relação ao hemisfério contralateral (Área de infarto/Hemisfério contralateral)*100) foram calculados. Essa última avaliação tem a vantagem de reduzir a variabilidade intra-animal, o que aumenta o poder de comparação estatística (Modo,2009).

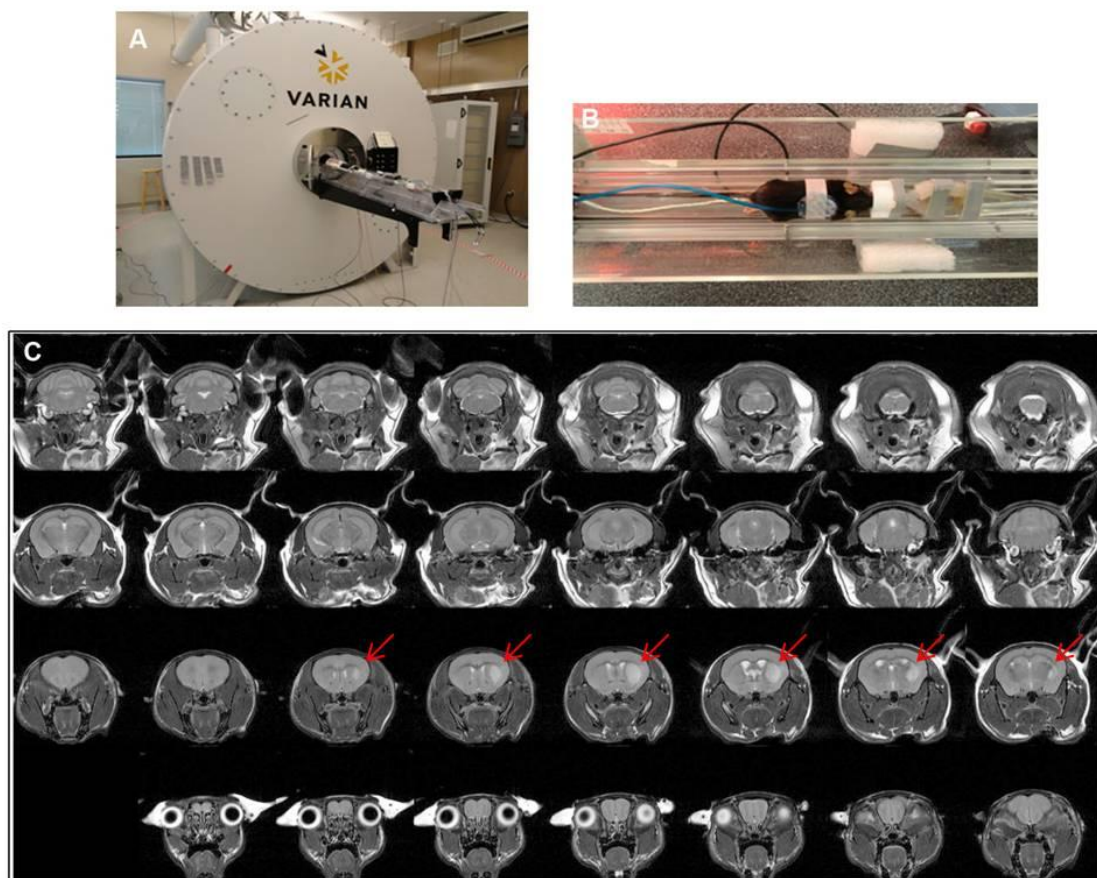


Figura 4: Ressonância magnética estrutural.

As imagens de ressonância magnética (MRI) foram adquiridas através de um scanner 9.4T (A). Os animais permaneceram anestesiados durante todo o procedimento. A frequência respiratória e temperatura foram continuamente monitoradas durante a aquisição das imagens (B). Sequência de MRI – T2. As setas apontam a área de lesão (região mais clara) (C).

3.7 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

O PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foi utilizado para avaliar a expressão de alguns genes de interesse para esse trabalho. Essa técnica permite que os processos de amplificação, detecção e quantificação de DNA sejam realizados em uma única etapa, de forma mais rápida, precisa e reprodutível (Greferath et al.,2002).

Para análise do RNA, amostras do tecido foram coletadas 3 dias após a cirurgia. As vias de sinalização da cascata isquêmica que levam a morte celular permanecem em atividade por vários dias após isquemia (Lakhan et al.,2009). Os tecidos foram congeladas em gelo seco e mantidas na temperatura de -80°C até o experimento. Os mRNAs do tecido cerebral foram extraídos com reagente Trizol (Kit de extração de RNA - BioRad) de acordo

com as especificações do fabricante. Para avaliação do PCR quantitativo (qPCR), o RNA total foi tratado com DNase 1 (Kit de extração de RNA - BioRad) e o cDNA foi sintetizado usando um kit de alta capacidade de transcrição de cDNA (Applied Biosystems, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Após transcrição reversa, o cDNA foi submetido ao qPCR no 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA) usando CFX96 (BioRad). Resumidamente, a amplificação foi carregada num volume total de 20 µl contendo 0.5 µM de cada primer, 10 µl de Power SYBR Green Master Mix 2X e 1 µl de cDNA. As reações de PCR foram em ciclos de 40x depois da desnaturação inicial (95°C por 2 minutes) com os seguintes parâmetros: 95°C por 15 segundos; 60°C de temperatura de anelamento por 30 segundos, 65°C de extensão por 30s. Para cada experimento, uma reação sem amostra foi incluída como controle negativo. Adicionalmente, a ausência de DNA contaminante foi avaliada em amostras de RT-negativo. A análise de curvas de desnaturação dos produtos da amplificação foram realizadas através do resfriamento das amostras para 60°C e em seguida aumentando a temperatura para 95°C. A especificidade das reações de PCR foram também confirmadas pela verificação do tamanho dos produtos ampliados em gel de agarose. A quantificação relativa da expressão do gene foi feita usando a expressão de beta actina para normalizar os dados (Lara et al.,2010,Guzman et al.,2011). A sequência de primers utilizada pode ser encontrada no item Anexo, ao final deste trabalho.

3.8 Western Blotting

Após dissecação, os tecidos dos camundongos (6mm centrais de ambos hemisférios cerebrais) foram congelados rapidamente em gelo seco/etanol e mantidos a -80°C até a utilização. Para preparar o extrato proteico, os tecidos foram coletados 24h após lesão, homogeneizados em tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% triton X-100 e coquetel de inibidores de protease (Sigma) e mantidos no gelo por 15 minutos. Após centrifugação a 10.000xg por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi recolhido e o conteúdo proteico dosado pelo método de Bradford (Bradford,1976). Em cada dosagem,

uma curva padrão de calibração com BSA (1 a 9 µg) foi utilizada. Amostras de 20µg de proteínas foram resolvidas em gel de SDS-PAGE de acordo com Laemmli e cols., 1970. As amostras foram misturadas ao tampão de amostra 2X (SDS 0,2% (p/v), glicerol 0,2% (v/v)), 2-mercaptoetanol 0,32% (v/v), azul de bromofenol 0,0001% (p/v) e Tris-HCl 12,5mM, pH 6.8, aquecidas a 90°C por 5 minutos. As amostras foram então resolvidas em gel de gradientes prontos (PAGeR® Gold Tris-Glycine Precast Gels, 8-16% gradiente, Lonza) e transferidas para membranas PVDF.

O Western blotting foi realizado como descrito por (Towbin et al.,1979). Ao término da eletroforese, o gel (PAGeR® Gold Tris-Glycine Precast Gels, 8-16% gradient, Lonza) foi lavado em tampão de transferência (48mM Tris; 39mM glicina; 20% metanol (v/v); 0,13mM SDS) e montado um sanduíche com papéis específicos para blotting (blotting pad 707 – VWR) e membrana de PVDF (GE Healthcare) previamente incubada em metanol. A transferência foi realizada a 25V, 300mA, por 35min (Transferência semi-seca) e em seguida, a membrana foi incubada por uma hora com TBS; Tween 0,1% (v/v) e 5% de leite desnatado (Molico). Adicionou-se o anticorpo e incubou-se overnight a 4°C. A membrana foi então lavada 3 vezes, 10 minutos cada lavagem, com TBS/Tween e incubada 1 hora com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase diluído em TBS/Tween e leite. Ao término da incubação, o processo de lavagem foi repetido. Os anticorpos utilizados neste trabalho estão listados no item Anexos, ao final desse trabalho.

A detecção foi realizada pelo processo de quimioluminescência, utilizando o kit ECL™ Prime (GE Healthcare). As imagens foram obtidas usando Fluor Chem Q apparatus (Alpha Innotech) e a análise densitométrica foi realizada através do software Alpha View (Alpha Innotech). As análises foram realizadas utilizando a actina para normalizar os dados.

3.9 TUNEL

O método TUNEL (terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling) foi utilizado para marcação de células apoptóticas. Essa técnica avalia a estrutura

da cromatina e integridade do DNA das células, detectando com confiabilidade fragmentações de DNA. As células são identificadas como TUNEL positivas (DNA fragmentado), devido à coloração verde do corante (Alexa 488), ou TUNEL negativas (DNA íntegro), de acordo com a presença de coloração azul, devido à contra-coloração com o corante fluorescente genômico *Hoechst*.

Para realização dos experimentos, 3 dias após a cirurgia de isquemia, os animais foram perfundidos transcardialmente com PBS e 4% PFA. Após fixação, o cérebro foi removido e parafinizado, em seguida, fatiado na espessura de 8µm (Rotary Microtome).

Os procedimentos de marcação foram realizados de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (TUNEL Alexa Fluor Imaging Assay - Invitrogen). As células TUNEL positivas foram contadas utilizando a amplificação de 400x no microscópio (Microscópio Confocal Zeiss LSM Meta 510). Para cada animal, 3 fatias cerebrais não consecutivas foram selecionadas, sendo que para cada uma, 5 diferentes áreas do estriado foram analisadas.

As lâminas silanizadas com os cortes histológicos passaram por dois banhos de xilol de 5 minutos cada um. A seguir, os cortes foram hidratados em banhos decrescentes de etanol, sendo dois banhos de álcool absoluto por 5 minutos cada e banhos de 3 minutos em álcool a 95%, álcool 90%, álcool 80% e álcool 70%. Os cortes foram então lavados em TBS 1X (137mM NaCl; 20mM Tris.HCl; pH 7.6). Para permitir maior penetração do tampão contendo TdT e nucleotídeos marcados, foi feita a imersão em Tampão Citrato pré-aquecido por 5 minutos e posteriormente aplicada proteinase K (2mg/ml) diluída em Tris 10 mM na proporção 1:100 durante 20 minutos, em seguida as amostras foram lavadas com TBS 1X. O excesso de solução ao redor do corte foi removido e as lâminas foram cobertas com tampão de equilíbrio por 30 minutos. Solução contendo 60 µl da enzima TdT diluída (57 µl do mix da reação de marcação e 3 µl de enzima TdT) foi aplicada sobre cada corte, que por sua vez foram cobertos com protetores plásticos (Parafilme) e incubados em câmara úmida a 37°C durante 1.5 horas.

As fatias foram lavadas 2x (5min) com 3% de BSA (albumina bovina) em temperatura ambiente, em seguida encubadas com 100ml do coquetel de reação (uma mistura de 97.5µl da reação buffer que contém Alexa Fluor 488 e 2.5µl da reação buffer aditiva) por 30min em temperatura ambiente e protegido da luz. As fatias foram então lavadas com 3% BSA por 5 min. Após a lavagem dos tecidos, os núcleos foram marcados com a sonda fluorescente Hoechst 33342, diluído 1:5000 em PBS. A marcação nuclear foi incubada por 15min em temperatura ambiente. Fatias foram lavadas com PBS 2x por 5 min. Finalmente, fatias foram montadas usando IMMU-MOUNT (Thermo Scientific).

3.10 Testes comportamentais

3.10.1 Assimetria bilateral

O teste de assimetria bilateral é particularmente relevante para estudos de lesão cerebral, principalmente aquelas em que a lesão é unilateral. É um dos poucos testes que tem se mostrado útil para detecção de déficits a longo prazo em camundongos após a oclusão da artéria cerebral média (Bouet et al.,2009). Esse teste pode avaliar tanto a função motora como a somatosensorial. Consiste na colocação de fitas nas patas anteriores do animal. A performance do animal é avaliada através da medida do tempo de percepção da fita (primeiro contato com a boca do animal) e o tempo de remoção da fita de cada pata separadamente, no máximo de 180 segundos. Para diminuir diferenças individuais os animais são treinados antes dos procedimentos cirúrgicos, e durante os testes pós cirúrgicos é realizada uma média após 3 tentativas.

3.10.2 Catwalk

Catwalk é um sistema de análise quantitativa assistido por um computador, usado para avaliação da marcha após lesão cerebral experimental (Figura 5) (Lubjuhn et al.,2009). É um método de análise locomotora que permite a quantificação de parâmetros de cada pata individualmente, bem como parâmetros relacionados à coordenação inter-membros (Gabriel et al.,2007,Gabriel et al.,2009,Vandeputte et al.,2010). O experimento é realizado

em uma sala escura e a passarela de vidro é iluminada com feixes de luz permitindo que as patas reflitam luz quando elas entram em contato com o vidro. Antes do primeiro dia de teste os animais são treinados para atravessar toda a passarela de vidro. Nos dias de teste, 3 ininterruptas corridas são gravadas pela câmera posicionada abaixo da plataforma. A média das 3 corridas é calculada para todos os parâmetros. Os parâmetros avaliados foram: área e intensidade de cada pegada, comprimento dos passos e velocidade das passadas.

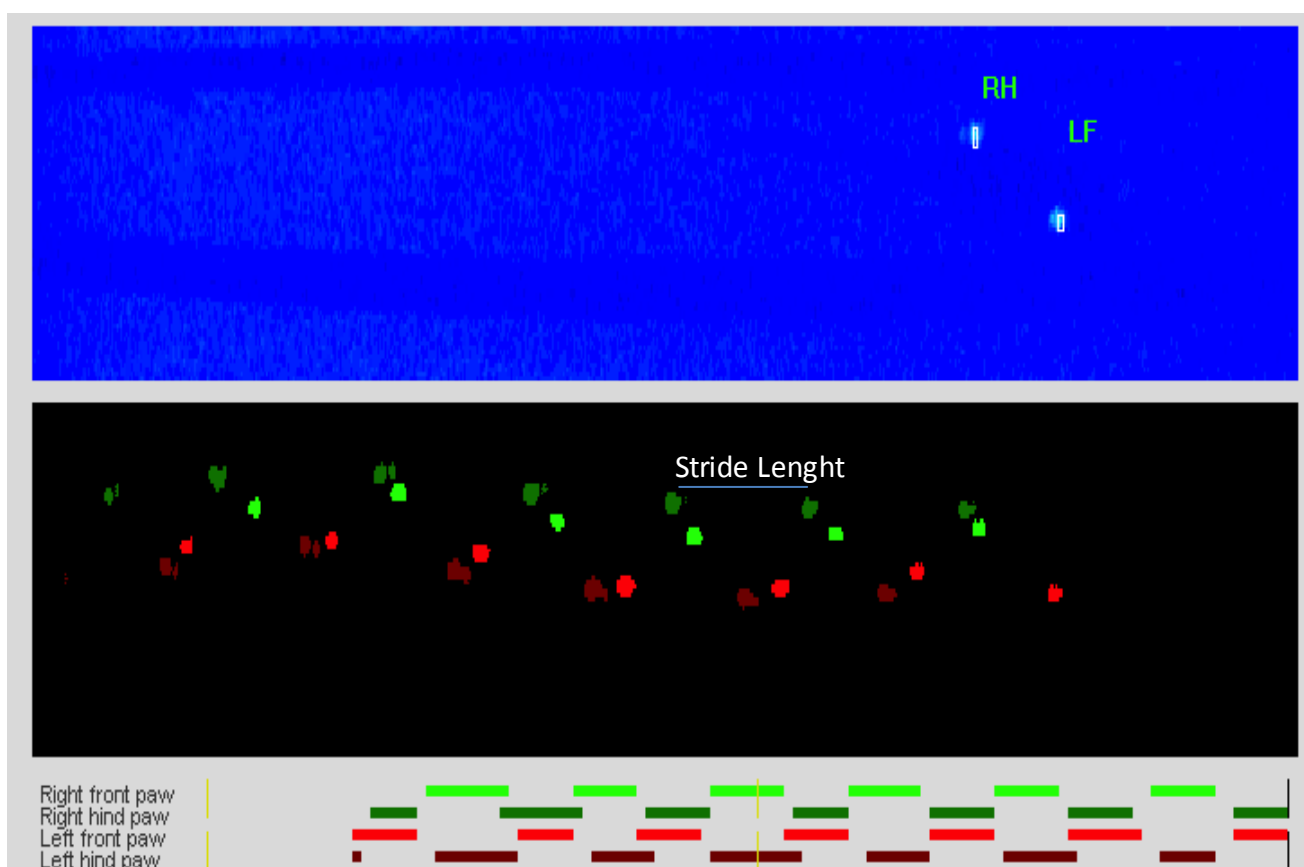


Figura 5: Imagem do software de análise CatWalk.

O Software identifica patas anteriores e posteriores, direita e esquerda e calcula parâmetros relacionados à marcha do animal.

3.10.3 Campo aberto

O teste de campo aberto permite a análise quantitativa da atividade locomotora e exploratória do animal, podendo ainda indicar atividades mais específicas como a reatividade emocional ao novo ambiente (Shen et al., Miles et al., 1991). A atividade

locomotora pode ser medida através da determinação do montante da distância percorrida e observações de vários comportamentos no sentido horizontal e vertical.

Os camundongos foram individualmente colocados na caixa de teste (AccuScan Instrument. Inc. Columbus. OH) e a atividade locomotora espontânea foi automaticamente gravada durante o período de total 2 horas, sendo que a cada intervalo de 5 min atividade foi registrada.

3.11 *Histologia e imunohistoquímica*

3.11.1 Hematoxilina e eosina

Quatorze dias após a cirurgia, os animais foram perfundidos transcardialmente com salina e 10% formalina. Após fixação, o cérebro dos animais foi fatiado no vibrátomo (Series 1000, Technical Products International, Inc., Saint Louis, EUA) na espessura de 8µm. As fatias foram coradas com Hematoxilina e eosina (H&E) e em seguida visualizadas em uma lupa (Stemi 2000-C, Zeiss, Alemanha) e fotografadas por uma câmera CCD (TCZ-984P, Fujitsu, Japão). As imagens obtidas com esse método foram utilizadas para análise qualitativa do tecido após 14 dias da lesão.

3.11.2 Trifeniltetrazolium-2.3.5 Cloreto

O marcador Trifeniltetrazolium-2.3.5 Cloreto (TTC) foi utilizado neste trabalho para padronização da técnica e avaliação da lesão após diferentes tempos de isquemia. Essa técnica histológica pode diferenciar macroscopicamente tecidos viáveis de tecidos lesados. A intensidade da marcação é correlacionada com o número e atividade funcional das mitocôndrias, sendo assim a área não corada pelo TTC é considerada área de infarto (Goldlust et al.,1996).

Após a decapitação, o cérebro foi removido e seccionado em fatias de 2mm de espessura. Essas fatias foram imersas em uma solução de 2% TTC à 37 °C durante 15 minutos e em seguidas fixadas com tampão formalina 10% para posterior obtenção de imagens. As imagens dos procedimentos histológicos foram obtidas ao Microscópio

Olympus e fotografadas por uma câmera CCD (TCZ-984P, Fujitsu, Japão). Essas imagens foram analisadas no programa *ImageJ – Image Processing and Analysis in Java*.

3.12 Análises estatísticas

As variáveis paramétricas serão expressas por média e erro padrão da média. A comparação das médias foi realizada por Teste t de *Student* e análise de variância (ANOVA – one-way, two-way e medidas repetidas), seguido de *Post-hoc* quando necessário. As curvas de sobrevivência foram analisadas usando o teste Log Rank (Mantel-Cox). A decisão para rejeição da hipótese nula foi para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Padronização do modelo de isquemia cerebral por oclusão da artéria cerebral média

Para implementação e padronização do modelo de isquemia cerebral *in vivo* em camundongos no Núcleo de Neurociências (UFMG) e Laboratório do prof. Marco Prado - Robarts Research Institute (Western University), utilizamos como referência o modelo de oclusão da artéria cerebral média proposto por Longa (1989).

Para confirmação inicial da efetividade do método em ocluir propriamente o território vascular irrigado pela ACM, nós utilizamos a marcação com azul de Evans e TTC para avaliação qualitativa. A área de lesão (branco) pôde ser observada em ambos métodos, confirmando a eficácia do modelo em ocluir o território da ACM no hemisfério esquerdo (Figura 6).

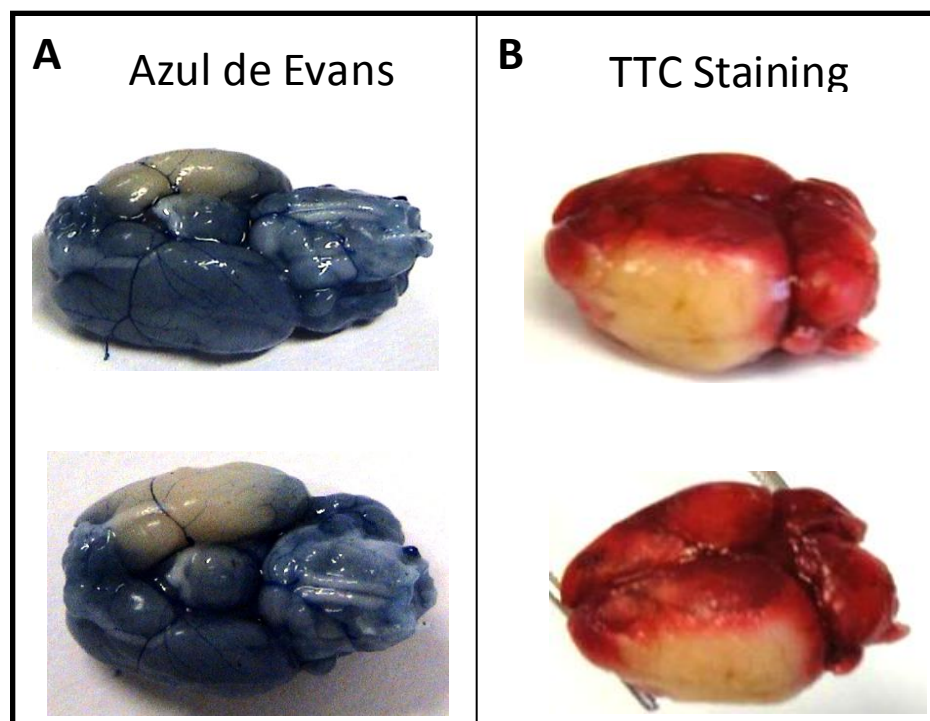


Figura 6: Verificação da efetividade da cirurgia em ocluir a artéria cerebral média e induzir a lesão focal.

A) Marcação com corante azul de Evans através de perfusão transcardíaca com o fio de oclusão devidamente posicionado. B) Marcação com Trifeniltetrazolium-2.3.5 Cloreto (TTC) 24h após cirurgia. A área sem coloração representa a área de lesão em ambos os métodos.

4.2 Comparação dos efeitos de diferentes tempos de isquemia na lesão cerebral e recuperação funcional

A determinação do tempo de isquemia é um fator determinante para a recuperação funcional e expectativa de sobrevivência do animal. Sendo assim, a avaliação do efeito de diferentes tempos de isquemia na lesão cerebral e recuperação funcional foram realizadas a fim de encontrar o tempo ideal de oclusão para a realização dos protocolos propostos neste trabalho.

A isquemia cerebral foi induzida através da oclusão da ACM por 30, 45, 60min e 24h (oclusão permanente) da ACM. A área de lesão foi avaliada 24h após a cirurgia, através da obtenção de imagens de fatias cerebrais coradas com TTC (Figura 7) e através de imagens de ressonância magnética (Figura 8). Diferentes grupos de animais (WT) foram utilizados para cada um dos métodos de avaliação. As imagens da lesão induzida pela oclusão permanente foram obtidas somente para avaliação qualitativa, enquanto as imagens obtidas pela indução de 30, 45 e 60min de isquemia foram utilizadas para avaliação do tamanho e localização da lesão.

TTC

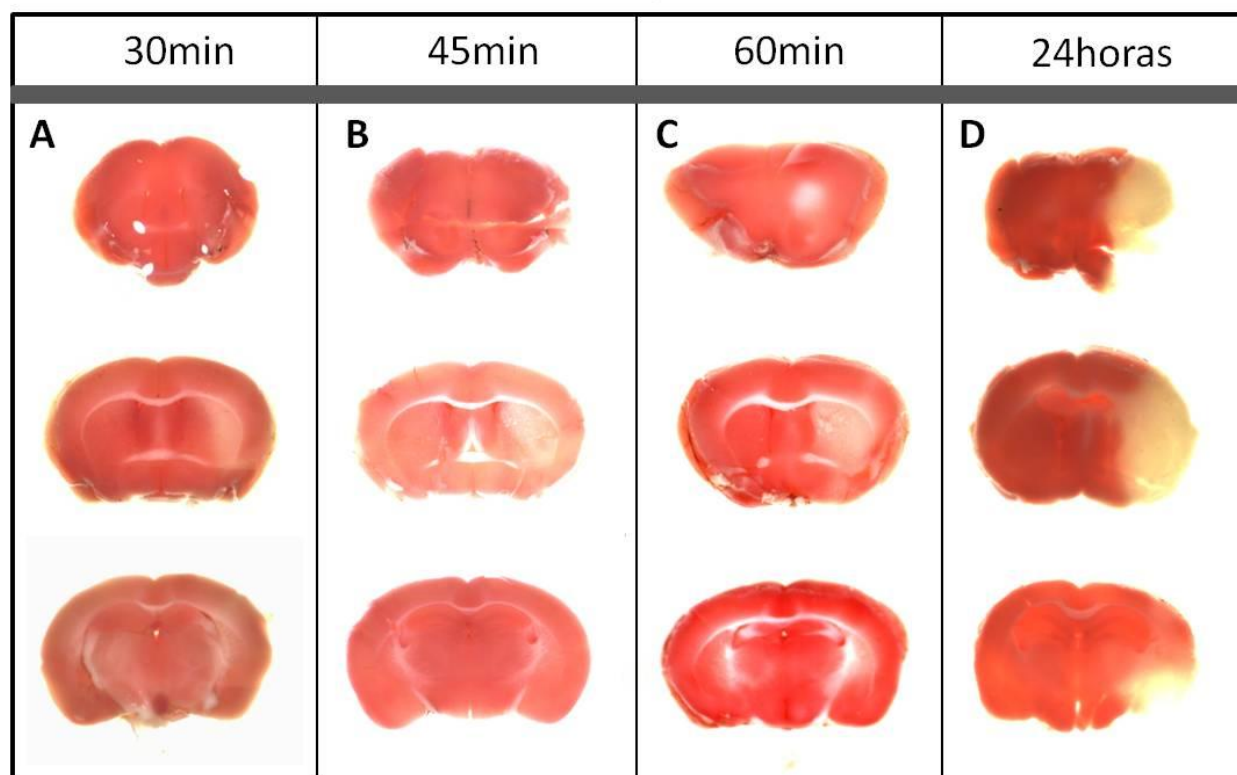


Figura 7: Imagens de fatias cerebrais (marcação com TTC) de animais submetidos a diferentes tempos de isquemia.

Animais selvagens foram submetidos à 30min (A), 45min (B), 60min (C) de isquemia e oclusão permanente (24h) (D) da artéria cerebral média esquerda. As fatias cerebrais (2mm) foram marcadas com o marcador de viabilidade celular Trifeniltetrazolium-2.3.5 Cloreto(TTC) 24 horas após a cirurgia. A área corada em vermelho representa o tecido viável e a área clara representa a área de lesão.

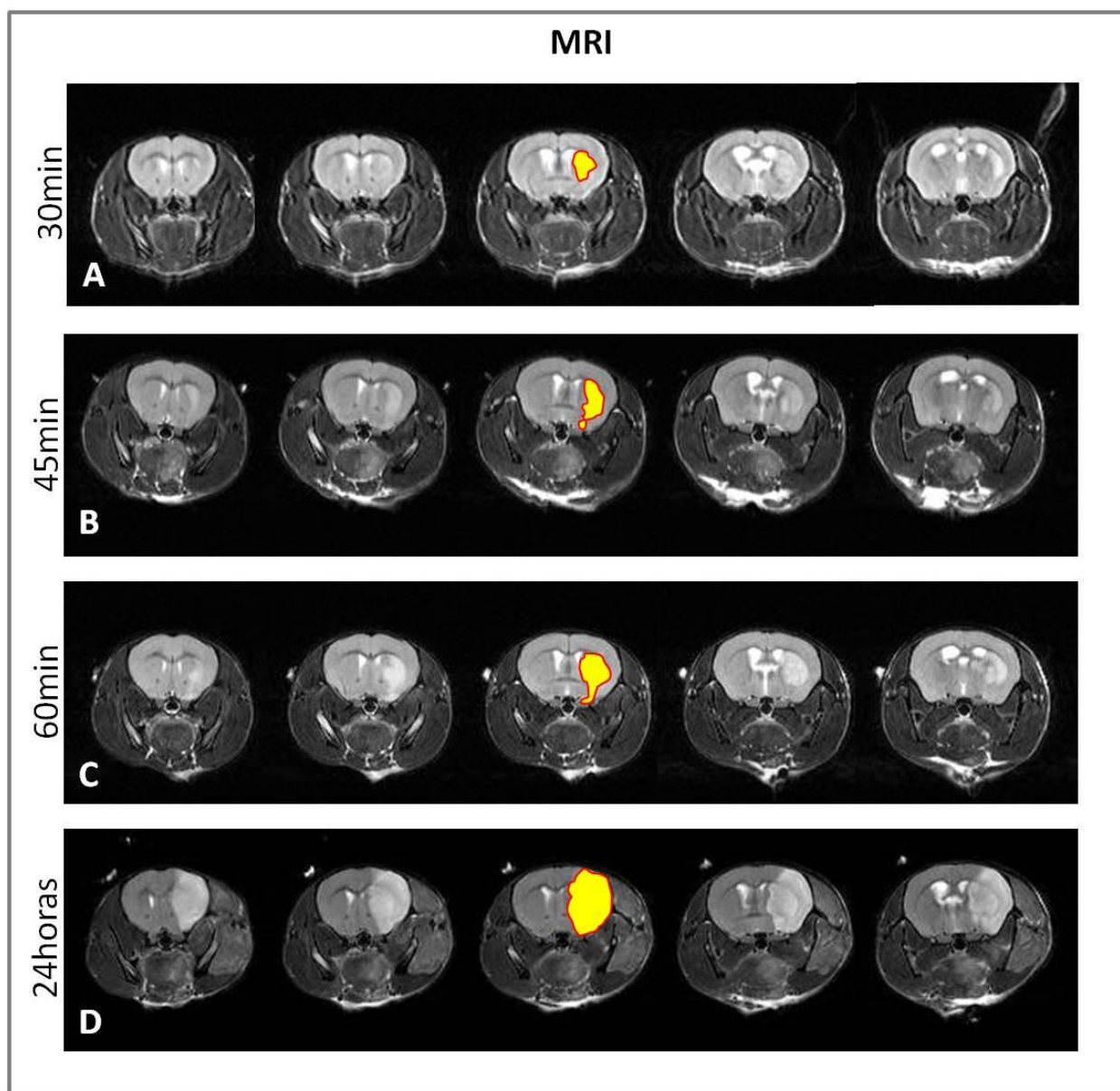


Figura 8: Imagens de ressonância magnética do cérebro de animais submetidos a diferentes tempos de isquemia.

Animais selvagens foram submetidos à 30min (A), 45min (B), 60min (C) de isquemia e oclusão permanente (24h) (D) da artéria cerebral média esquerda. As imagens foram obtidas 24horas após a lesão. A lesão cerebral isquêmica é caracterizada por área clara na imagem (cheia de líquidos).

Os resultados obtidos com a marcação de TTC corroboram os resultados obtidos com as imagens de RM. Em ambos os métodos utilizados, a lesão resultante da isquemia de 60min foi significativamente maior (TTC: $22.94 \pm 2.77\%$; MRI: $20.28 \pm 1.67\%$) quando comparada com a lesão induzida pela oclusão de 30min (TTC: $10.27 \pm 1.49\%$; MRI: $12.12 \pm 1.68\%$) e 45min (TTC: $14.27 \pm 0.67\%$; MRI: $12.59 \pm 0.62\%$). No entanto, não houve diferença significativa entre as lesões em resposta à isquemia por 30 e 45min (Figura 9).

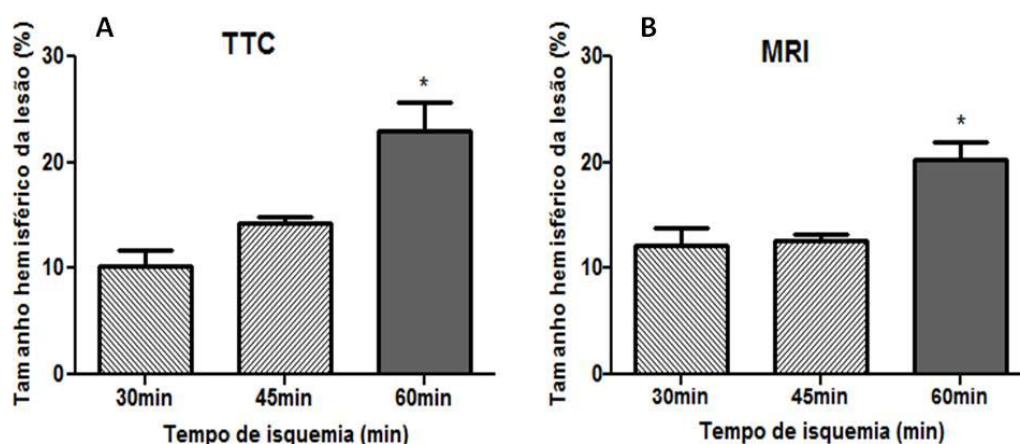


Figura 9: Comparação do efeito de diferentes tempos de isquemia na lesão cerebral em animais WT.

A avaliação do tamanho da lesão cerebral, induzida pela oclusão da artéria cerebral média esquerda durante 30, 45 e 60min, foi realizada através da técnica histológica utilizando o marcador Trifeniltetrazolium-2.3.5 Cloreto (TTC) (A) e através de imagens de ressonância magnética (MRI) (B). As imagens foram obtidas 24 horas após a isquemia. O tamanho percentual da lesão foi calculado em relação ao hemisfério contralateral {(Área de infarto/ área do hemisfério contralateral)*100}. (n=4-5/grupo). Resultados expressos como média $\pm$ EPM. *P<0,05 em relação aos outros grupos (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

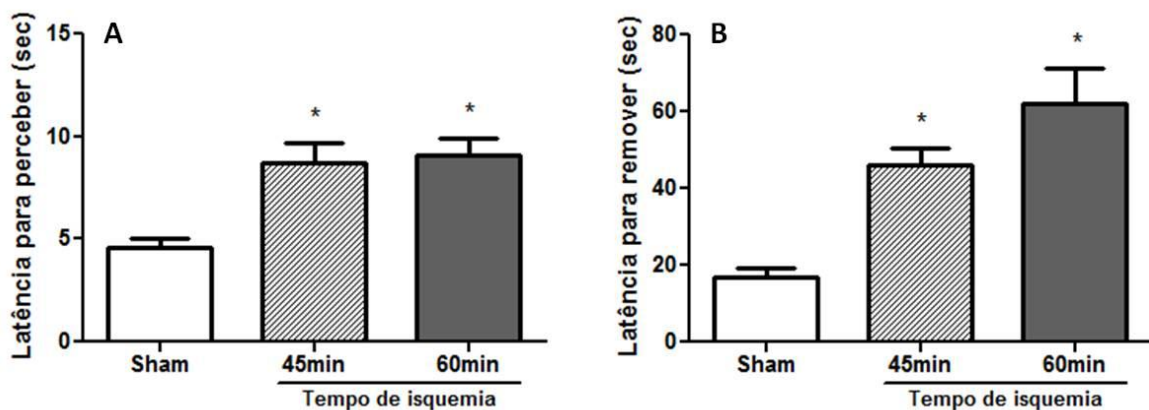
Para comparação do efeito do tempo de isquemia na recuperação funcional, animais WT foram submetidos à lesão isquêmica durante 45 e 60min e avaliados através dos testes de assimetria bilateral e campo aberto. Esses testes foram realizados 7 e 14 dias após isquemia.

No teste de assimetria bilateral realizado 7 dias após a cirurgia, animais isquemiados apresentaram maior latência para perceber a fita na pata direita (grupo 45min: 8.70 ± 0.98 seg; grupo 60min: 9.10 ± 0.81 seg), assim como, para remover a fita da mesma pata (grupo 45min: 46.10 ± 4.57 seg; grupo 60min: 62.10 ± 9.10 seg), quando comparados com animais sham operados (latência para perceber: 4.58 ± 0.47 seg; latência para remover: 17.00 ± 2.08 seg). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos isquemiados (Figura 10 A e B).

No 14º dia após cirurgia, a latência para perceber a fita foi semelhante em todos os grupos, não havendo diferença significativa entre eles. A latência para remover a fita foi significativamente maior no grupo isquemiado por 60min (31.80 ± 3.45 seg) quando comparado com sham (17.00 ± 2.08 seg). Não foram observadas diferenças entre ambos os grupos isquemiados ou entre isquemia de 45min e sham (Figura 10 C e D).

Teste de assimetria bilateral

7 dias após cirurgia



14 dias após cirurgia

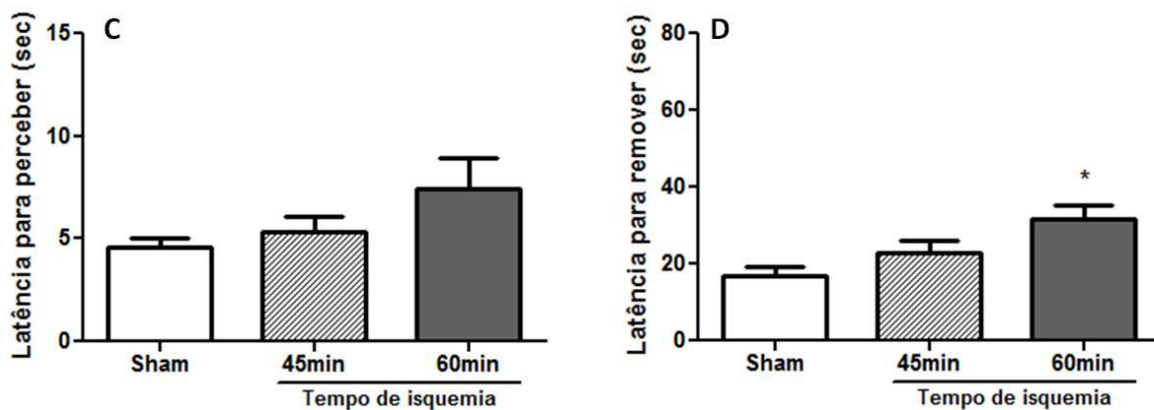


Figura 10: Teste de assimetria bilateral: Animais WT submetidos à 45min e 60min de isquemia. Um grupo de animais WT foi submetido a cirurgia de isquemia por 45min (n=6) e outro grupo por 60min (n=5). O teste de assimetria bilateral foi realizado 7 dias (A, B) e 14 dias (C, D) após a cirurgia. Foi realizada a oclusão da ACM ou cirurgia sham no lado esquerdo, portanto todos os resultados apresentados neste gráfico são em relação à pata direita do animal. Animais do grupo controle (n=4) foram submetidos à cirurgia sham. Uma fita adesiva foi colocada em cada uma das patas anteriores do animal e o tempo para que o animal perceba e retire a fita foi registrado. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. *P<0,05 em relação ao controle. (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

Animais isquemiados apresentaram uma menor atividade locomotora (45min: 937 ± 193 ; 60min: $1068 \pm 224\text{cm}/2\text{h}$) quando comparados com animais sham operados ($2505 \pm 88\text{cm}/2\text{h}$) no teste de campo aberto 7 dias após isquemia. Essa diferença não foi observada no 14º dia após a cirurgia (Figura 11).

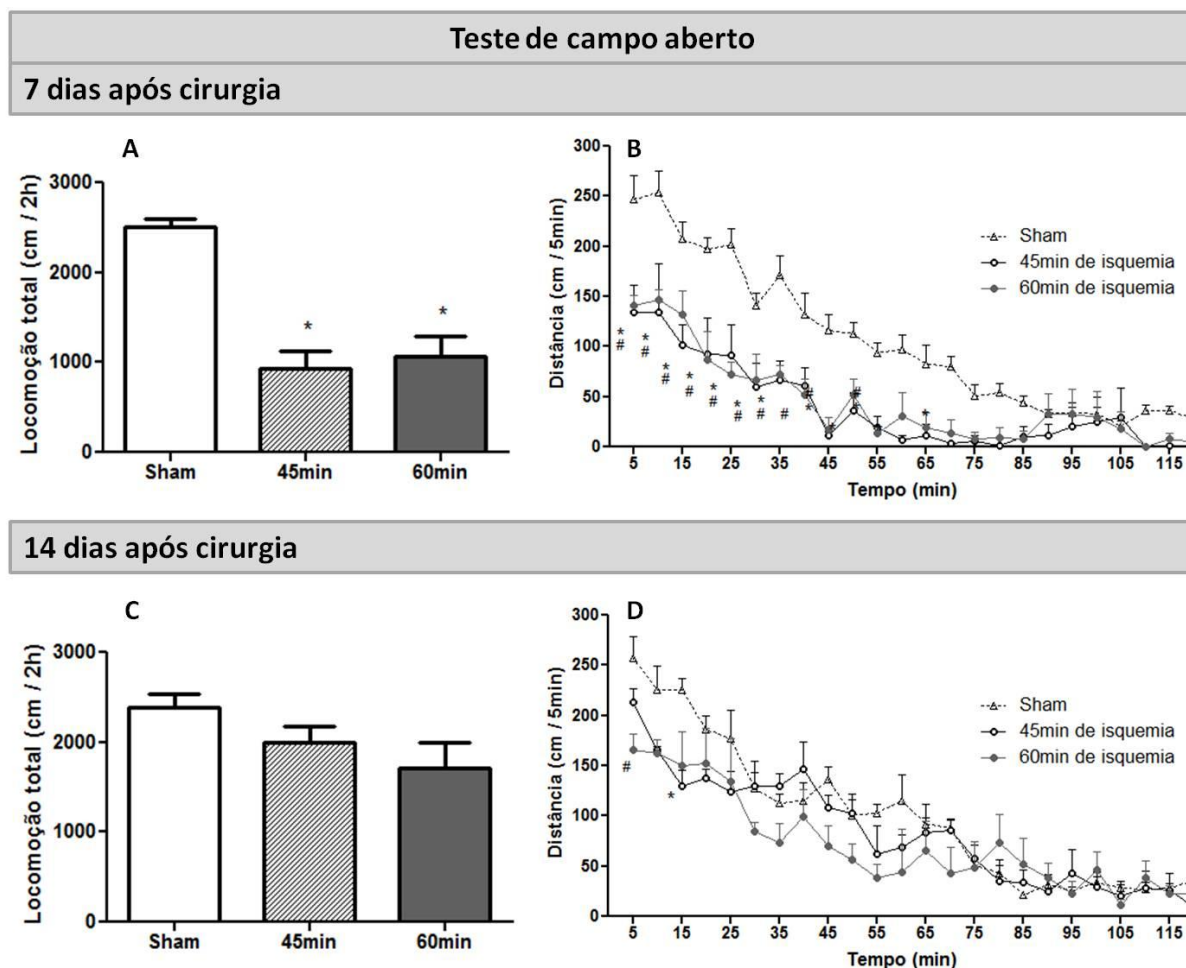


Figura 11: Teste de campo aberto: Animais WT submetidos à 45min e 60min de isquemia.

Um grupo de animais WT foi submetido a cirurgia de isquemia por 45min (n=6) e outro grupo por 60min (n=5) de oclusão da artéria cerebral média. Animais do grupo controle (n=4) foram submetidos à cirurgia sham. O teste de campo aberto foi realizado antes da cirurgia, 7 dias (A, B) e 14 dias (C, D) após a lesão. Animais submetidos a isquemia apresentaram menor atividade exploratória na primeira hora de teste (A) e menor locomoção no tempo total de teste (B) quando comparados com controles (sham operados). No entanto, não observamos diferença entre os diferentes tempos de isquemia. Não houve diferença na atividade locomotora entre os grupos isquemia e controle no 14º dia após a cirurgia (C e D). Resultados expressos como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ para grupo isquemia 45min em relação ao Controle, # $P < 0,05$ para grupo isquemia 60min em relação ao Controle (Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

O peso dos animais foi avaliado no dia e após a cirurgia. Ambos os grupos isquemiados apresentaram uma diminuição do peso nos primeiros 5 dias após a lesão, no entanto, não houve diferença significativa entre eles. Animais sham operados foram capazes de manter e/ou aumentar o peso corporal durante o experimento (Figura 12 A).

Durante todo o período de experimento (14 dias), 100% dos animais sham operados sobreviveram à cirurgia. Animais isquemiados submetidos à isquemia de 45min apresentaram um índice de sobrevivência de 86%, enquanto animais submetidos à

isquemia de 60min apresentaram um índice de sobrevivência de 62% (Figura 12B) nesse primeiro grupo experimental.

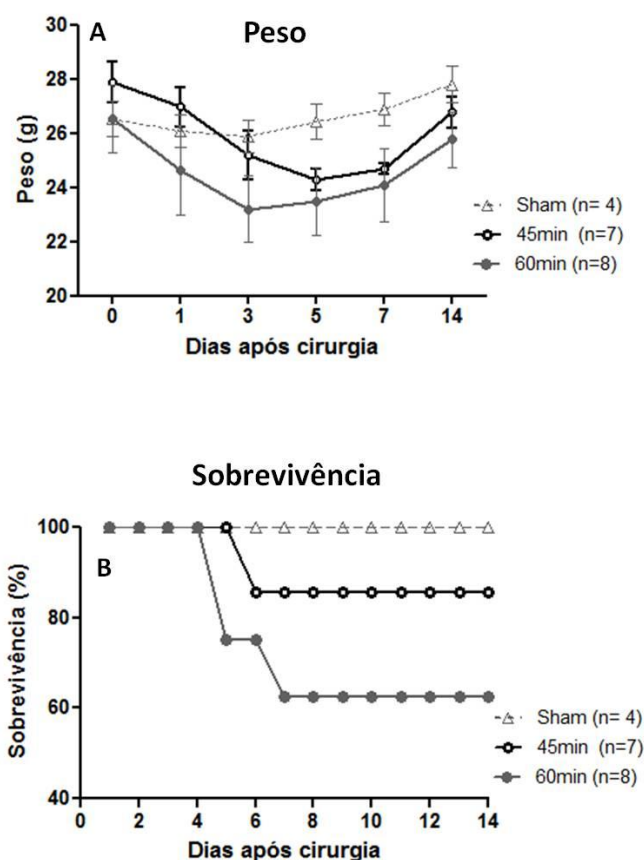


Figura 12: Avaliação do peso e curva de sobrevivência de animais WT submetidos a 45 e 60min de isquemia.

A) Peso corporal dos camundongos submetidos à isquemia de 45 e 60min e cirurgia sham. Resultados expressos como média $\pm$ EPM (Two Way Anova, pós-teste de Bonferroni). B) Curva de sobrevivência dos camundongos submetidos à isquemia de 45 e 60min e cirurgia sham no período de 14 dias (Mantel – Cox log-rank test, $p=0.046$, Comparação entre grupos isquemia).

A avaliação histológica através do método H&E foi realizada 14 dias após a isquemia para análise qualitativa e confirmação do dano tecidual a longo prazo. O hemisfério contralateral encontra-se intacto, com células preservadas e padrão de coloração típica de neurônios saudáveis com aparência avermelhada das estruturas celulares. No entanto, o hemisfério isquemiado apresenta perda tecidual e danos celulares irreversíveis (Figura 13).

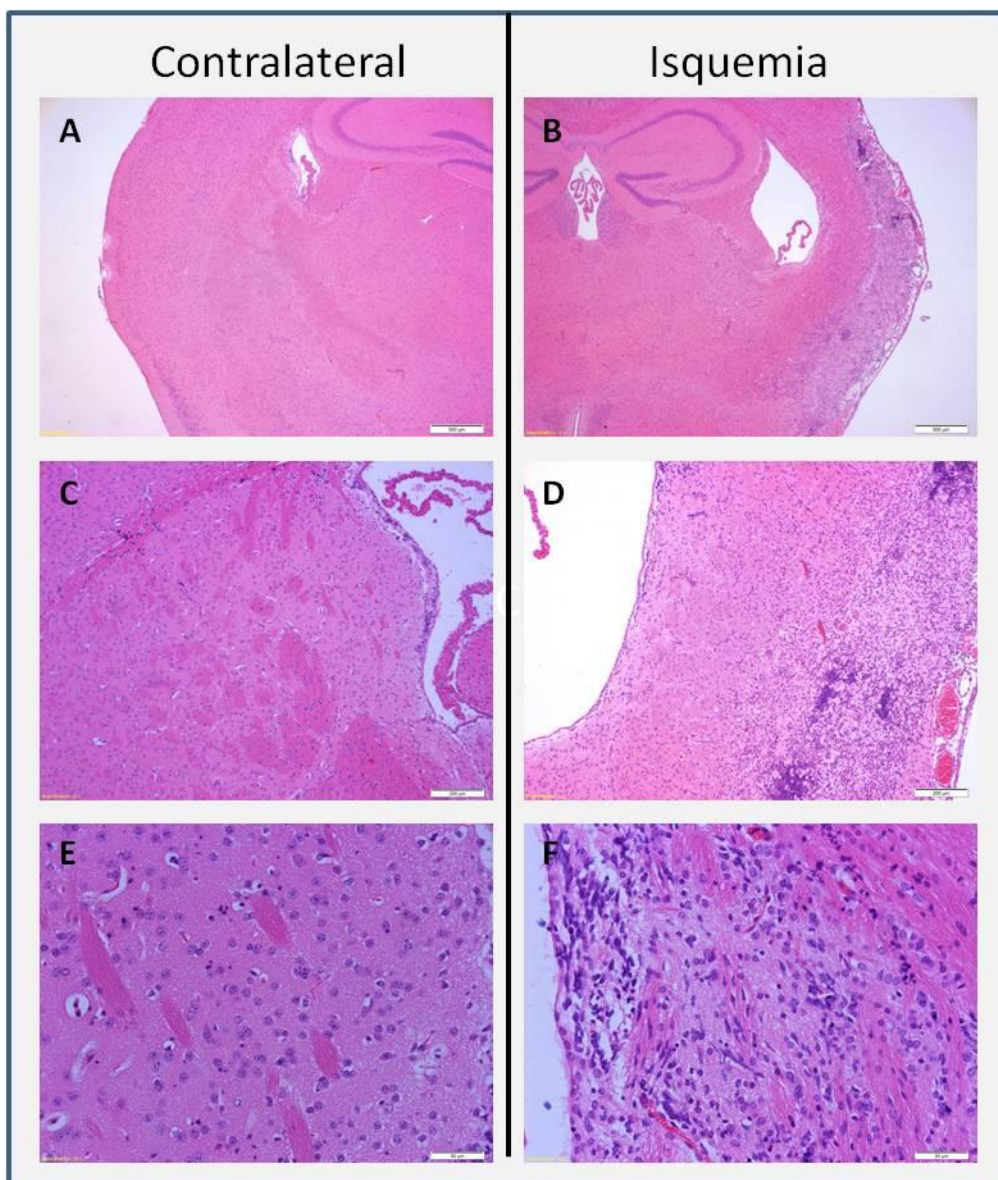


Figura 13: Marcação de fatias cerebrais de animais WT isquemiados (H&E).

Quatorze dias após a lesão isquêmica induzida pela oclusão da artéria cerebral média esquerda, os cérebros foram fixados e fatiados para procedimento de coloração através da técnica de Hematoxilina e Eosina (H&E). Imagens dos hemisférios isquemiados e contralateral foram obtidas utilizando os aumentos de 4x (A, B), 10x (C, D: região do estriado) e 40x (E, F: região do estriado).

A avaliação da perfusão tecidual foi realizada através da utilização do Laser Doppler fluxométrico em um grupo de animais WT. Durante a oclusão da ACM, camundongos submetidos à cirurgia apresentaram uma redução de $87 \pm 3\%$ do fluxo sanguíneo no território vascular dessa artéria (Tabela 1).

Tabela 1: Avaliação do fluxo sanguíneo cerebral através do Laser Doppler

Laser Doppler				
Camundongos (WT)	Valor basal (%BS)	Média antes da isquemia (%BS)	Média durante isquemia (%BS)	% de Oclusão da ACM
1	16	85	22	92
2	13	83	24	84
3	19	88	24	93
4	19	82	32	79

$$\text{Oclusão arterial (\%)} = \left[\frac{(\text{Durante isquemia} - \text{valor basal}) * 100\%}{(\text{Antes da isquemia} - \text{valor basal})} \right] - 100$$

*BS: Backscattering (Efeito doppler)

*ACM: Artéria Cerebral Média

4.3 Avaliação do desempenho funcional de animais com deficiência colinérgica previamente à isquemia

A avaliação da performance motora e sensorial de animais geneticamente modificados utilizados neste trabalho, foi realizada previamente a isquemia para a avaliação de possíveis déficits funcionais em razão da manipulação genética. Avaliamos o desempenho de camundongos que apresentam uma redução generalizada do VACHT (VACHT KD^{HOM}), camundongos nocaute com deleção específica dessa proteína no estriado (VACHT^{D2-Cre-flox/flox}) e seus respectivos controles.

Camundongos VACHT KD^{HOM} (3134 ± 476 cm/2h) submetidos ao teste de campo aberto apresentaram uma atividade locomotora significativamente maior quando comparados com WT (1384 ± 249 cm/2h) (Figura 14).

Pré Teste

Campo Aberto

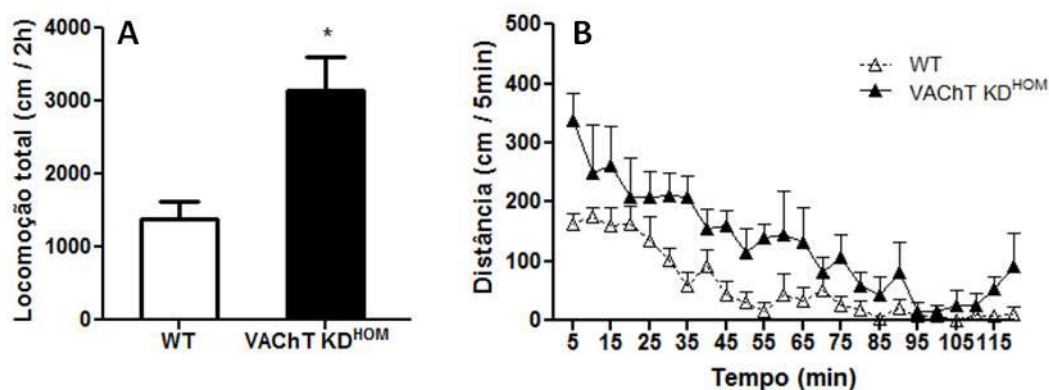


Figura 14: Teste funcional campo aberto: Pré teste com VACHT^{HOM}.

Avaliação funcional de camundongos VACHT^{HOM} e controles antes da cirurgia. Para realização do teste de campo aberto, os animais foram colocados individualmente em uma caixa de avaliação. A locomoção total (A) e a atividade exploratória (B) foram avaliadas durante 120min. (n=5-6/grupo). Resultados expressos como média $\pm$ EPM. *P<0,001 em relação ao Controle. (Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

O desempenho dos camundongos VACHT^{D2-Cre-flox/flox} foi avaliado através dos testes de assimetria bilateral (Figura 15 A e B), campo aberto (Figura 15 C e D) e catwalk (Figura 16). No teste de assimetria bilateral, camundongos VACHT^{D2-Cre-flox/flox} e VACHT^{flox/flox} apresentaram latências para percepção e remoção semelhantes. No teste de campo aberto, camundongos VACHT^{D2-Cre-flox/flox} apresentaram uma média de locomoção total de 3448 ± 115 cm/2h e camundongos VACHT^{flox/flox} de 3035 ± 299 cm/2h ($P>0.05$) (Figura 15 C e D). A análise da marcha através do teste CatWalk não demonstrou qualquer diferença estatisticamente significativa entre genótipos para nenhum dos parâmetros avaliados: Intensidade, área de impressão da pegada, velocidade das passadas e comprimento dos passos (Figura 16).

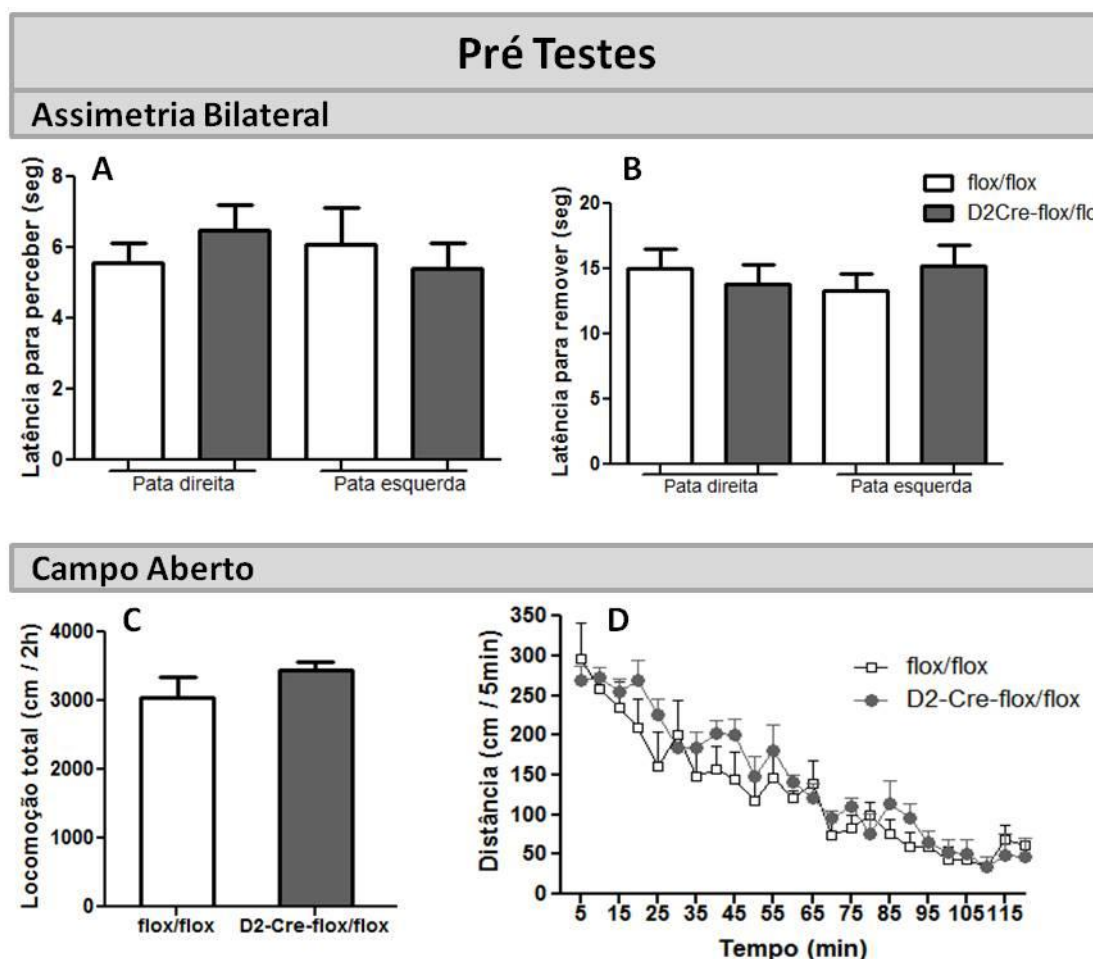


Figura 15: Testes funcionais de assimetria bilateral e campo aberto - Pré testes com VACHT^{D2-Cre-flox/flox}.

Avaliação funcional de animais VACHT^{D2-Cre-flox/flox} e controles antes cirurgia. Para realização do teste de assimetria bilateral, uma fita adesiva foi colocada em cada uma das patas anteriores do animal, e a latência para que o animal perceba (A) e retire (B) a fita foi registrado. Para realização do teste de campo aberto, os animais foram colocados individualmente em uma caixa e a Locomoção total (C) e a atividade exploratória (D) foram avaliadas durante 120min. Não foram observadas diferenças entre genótipos em nenhum dos testes avaliados. (n=6-8/grupo). Resultados expressos como média $\pm$ EPM (Tw o-way ANOVA).

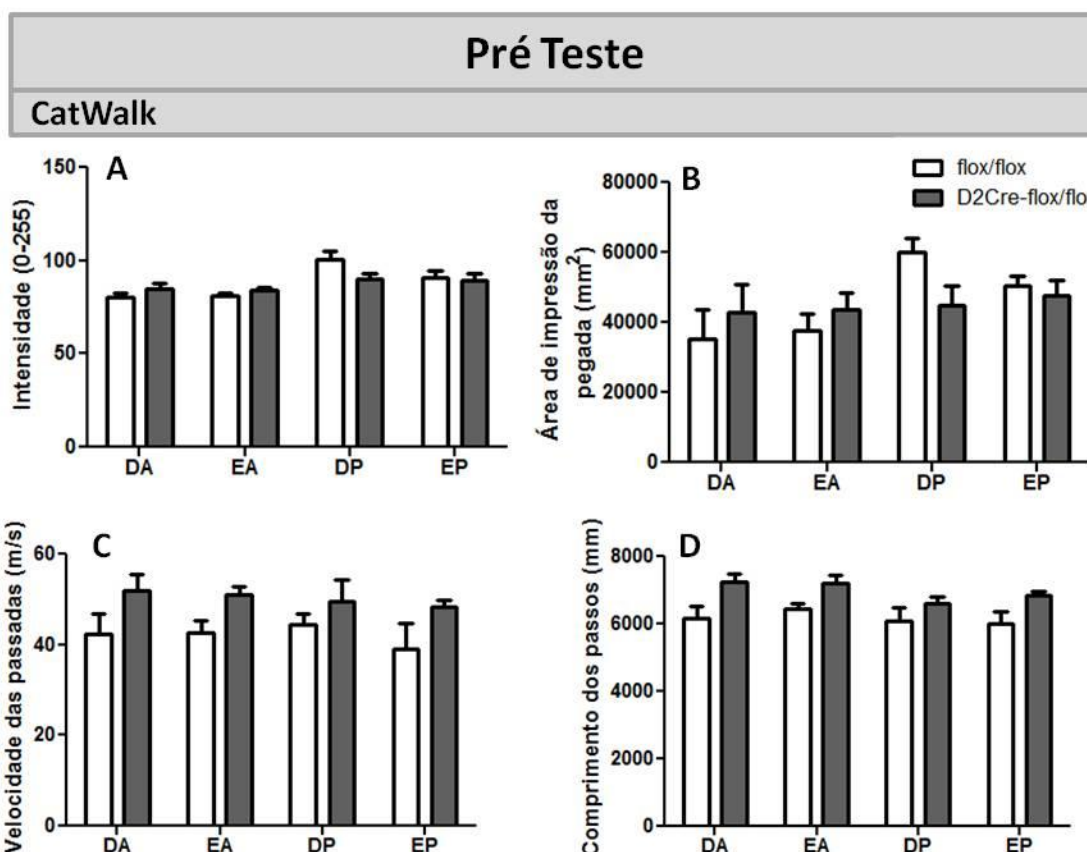


Figura 16: Testes funcional CatWalk: Pré teste com VACHT^{D2-Cre-flox/flox}
 Avaliação funcional através do teste CatWalk foi realizada antes da cirurgia em animais VACHT^{D2-Cre-flox/flox} e controles. As 4 patas do animal foram avaliadas separadamente: pata direita anterior (DA), pata esquerda anterior (EA), pata direita posterior (DP) e pata esquerda posterior (EP). Os parâmetros avaliados foram: A) Intensidade da pegada (0-255), B) Área de impressão da pegada (mm²), C) Velocidade das passadas (m/s) e D) Comprimento dos passos (mm). Não foram observadas diferenças entre genótipos para nenhum dos parâmetros avaliados (n=4-5/grupo). Resultados expressos como média ± EPM. (Two-way ANOVA).

4.4 Avaliação do efeito da acetilcolina estriatal na isquemia cerebral in vivo e recuperação funcional.

Após a realização dos pré-testes, animais foram submetidos à lesão cerebral isquêmica por oACM. A área de infarto foi avaliada 24h após a lesão através de uma série de imagens por RM. Nos experimentos apresentados a seguir, além dos controles sham operados, foram avaliados somente camundongos isquemiados que apresentaram lesão cerebral predominantemente estriatal.

Camundongos com déficit de acetilcolina estriatal (VACHT^{D2-Cre-flox/flox}) apresentaram significativamente maior volume de infarto ($13.68 \pm 1.01 \text{ mm}^3$) e maior percentual de lesão

hemisférica ($18.97 \pm 1.50\%$) quando comparado com controles ($9.64 \pm 0.86\text{mm}^3$, $12.87 \pm 1.00\%$) (Figura 17).

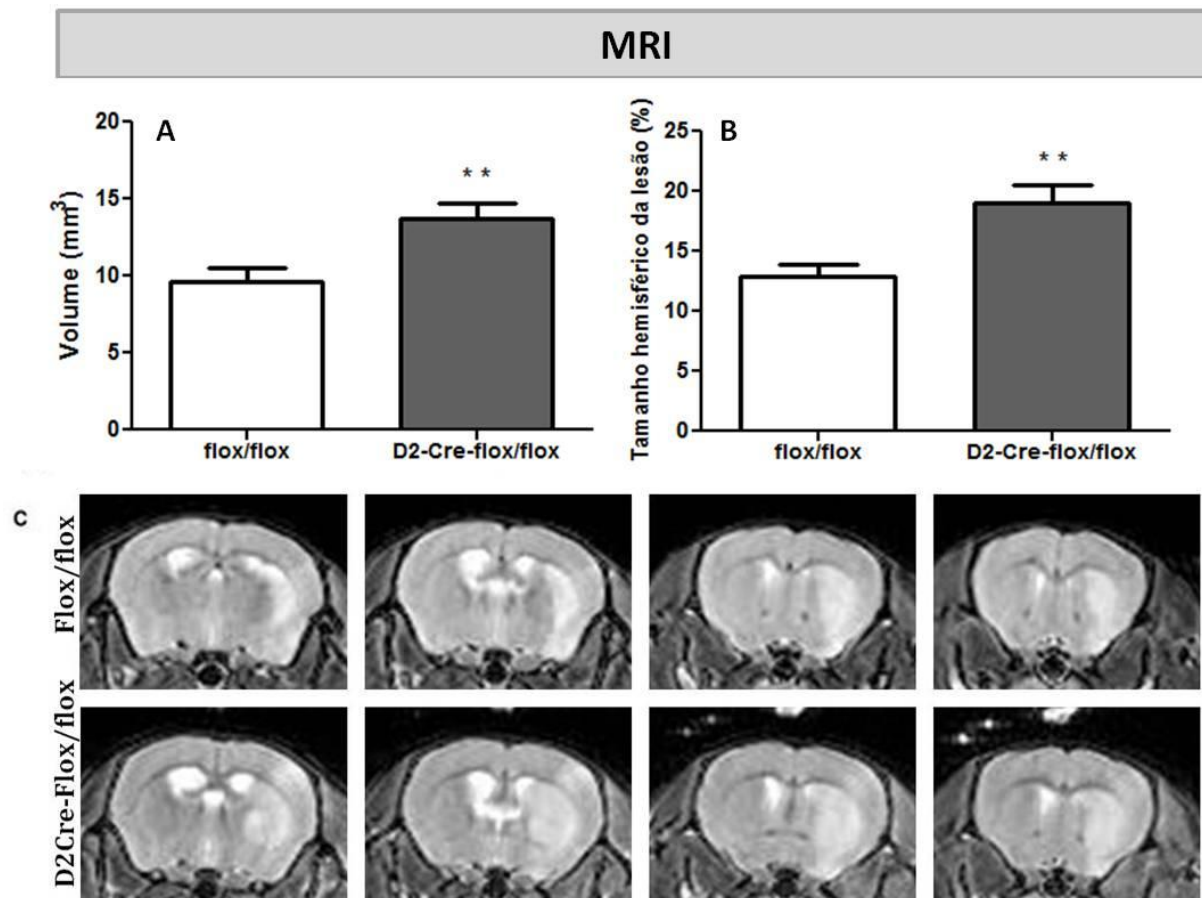


Figura 17: Análise do volume de infarto e percentual do tamanho hemisférico da lesão: Grupo VACHT^{D2-Cre-flox/flox}.
A) Volume de infarto. B) Percentual do tamanho hemisférico da lesão. C) Imagens de ressonância magnética estrutural, obtidas 24 horas após lesão. A figura C mostra imagens do cérebro de animais VACHT^{flox/flox} e VACHT^{D2-Cre-flox/flox}, no corte coronal. A área mais clara representa a área de infarto. (n=7-9/grupo). Resultados expressos como média ± EPM. **P<0,01 em relação ao controle (Teste t não-pareado).

A frequência cardíaca de animais VACHT^{D2-Cre-flox/flox} foi avaliada antes, durante e após isquemia e não houve nenhuma diferença significativa entre os genótipos. Outros parâmetros fisiológicos também foram avaliados 24h após a isquemia como: pH, saturação de oxigênio, temperatura e glicose. Nenhum desses parâmetros foi estatisticamente diferente na comparação entre genótipos (Tabela 2. n=4-5/grupo).

Tabela 2: Parâmetros Fisiológicos avaliados antes, durante e 24h depois da isquemia:
VACHT^{D2-Cre-flox/flox}

Parâmetros Fisiológicos		
	Flox/flox	D2-Cre-flox/flox
Antes da isquemia		
Frequência cardíaca (Batimentos/min)	732.4 ± 23.4	712.6 ± 46.0
Durante isquemia		
Frequência cardíaca (Batimentos/min)	724.6 ± 39.0	658.4 ± 36.5
24h depois da isquemia		
Frequência cardíaca (Batimentos/min)	682.2 ± 67.2	663.6 ± 35.3
pH (sangue arterial)	7.208 ± 0.036	7.206 ± 0.024
Saturação de oxigênio (%)	96.32 ± 3.95	98.38 ± 3.68
Temperatura (°C)	35.56 ± 0.25	35.44 ± 0.42
Glicose	3.320 ± 0.544	3.320 ± 0.342

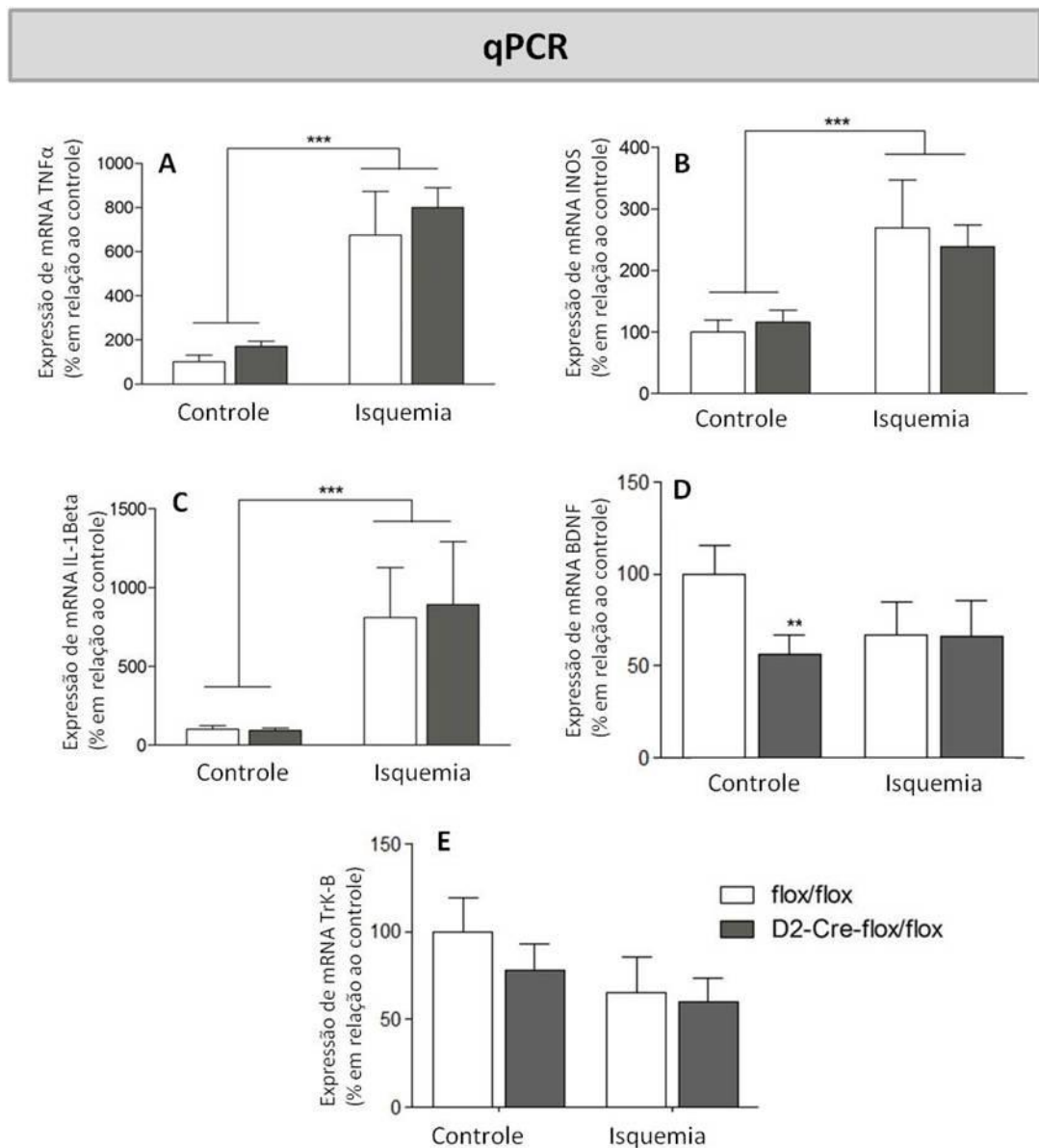


Figura 18: PCR quantitativo (qPCR) para determinação da expressão de mRNA em camundongos VACHT^{D2-Cre-flox/flox}.

Análise da expressão de mRNA de :A) TNF- α ; B) iNOS; C) IL-1 β ; D) BDNF; E) Trk-B. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. N=5/grupo. **P<0,01, ***P<0,001, Tw o-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

A inflamação é uma importante etapa da cascata isquêmica e umas das causas de morte celular (Zheng et al.,2004). A via colinérgica antiinflamatória é capaz de promover a sobrevivência neuronal através da inibição da liberação de citocinas inflamatórias após lesão cerebral (Pavlov,2008). Nós usamos qPCR para avaliar alguns mediadores inflamatórios, incluindo: TNF- α , iNOS e IL-1 β .

Os hemisférios isquemiados de ambos os grupos, VACHT^{D2-Cre-flox/flox} e controles, apresentaram um significativo aumento dos níveis de mRNA de TNF- α (Figura 18A. $F(1, 14) = 24.92$, $p < 0.001$), iNOS (Figura 18B. $F(1, 14) = 8.845$, $p = 0.010$) e IL-1 β (Figura 18C. $F(1, 14) = 8.957$, $p = 0.0097$). No entanto, não houve diferença significativa entre genótipos nas respostas inflamatória após isquemia (TNF- α : $F(1, 14) = 0.657$, $p = 0.431$; iNOS: $F(1, 14) = 0.021$, $p = 0.887$; IL-1 β : $F(1, 14) = 0.021$, $p = 0.886$).

A expressão de BDNF têm sido relacionada com efeitos neuroprotetores após isquemia (Zhang et al., 2001). Adicionalmente, a expressão de BDNF pode ser influenciada pela estimulação colinérgica, especificamente em prosencéfalo basal e estriado (Rylett et al., 1994). Portanto, nós avaliamos a expressão de BDNF e seu receptor Trk-B através da técnica de qPCR. Nossos resultados mostraram que não houve diferença na expressão de mRNA de BDNF e Trk-B quando comparamos hemisfério isquemiado e contralateral (tratamento: $p = 0.139$). No entanto, observamos uma maior expressão de BDNF no hemisfério contralateral à lesão de camundongos selvagens quando comparados com VACHT^{D2Cre-flox/flox} [genótipo: $F(1,12) = 10.48$, $p = 0.007$ para comparação de hemisférios contralaterais] (Figura 18).

A via de sinalização PI3K/Akt é conhecida por desencadear efeitos neuroprotetores após isquemia. Quando fosforilada, Akt induz atividade anti-apoptótica que envolve a inibição ou estimulação de outras proteínas como por exemplo GSK-3, Bcl-2 and Bax (Mullonkal et al., 2007). Adicionalmente estudos demonstram que efeitos neuroprotetores do sistema colinérgico são mediados pela ativação da via Akt (Kihara et al., 2001). Sendo assim, com o objetivo de investigar possíveis vias de sinalização envolvidas no processo de morte celular, nós avaliamos a expressão de Akt, Akt fosforilada, GSK3 (ativada e inativada), Bcl-2 e Bax através da realização de Western Blotting. As análises foram realizadas utilizando a actina para normalizar os dados.

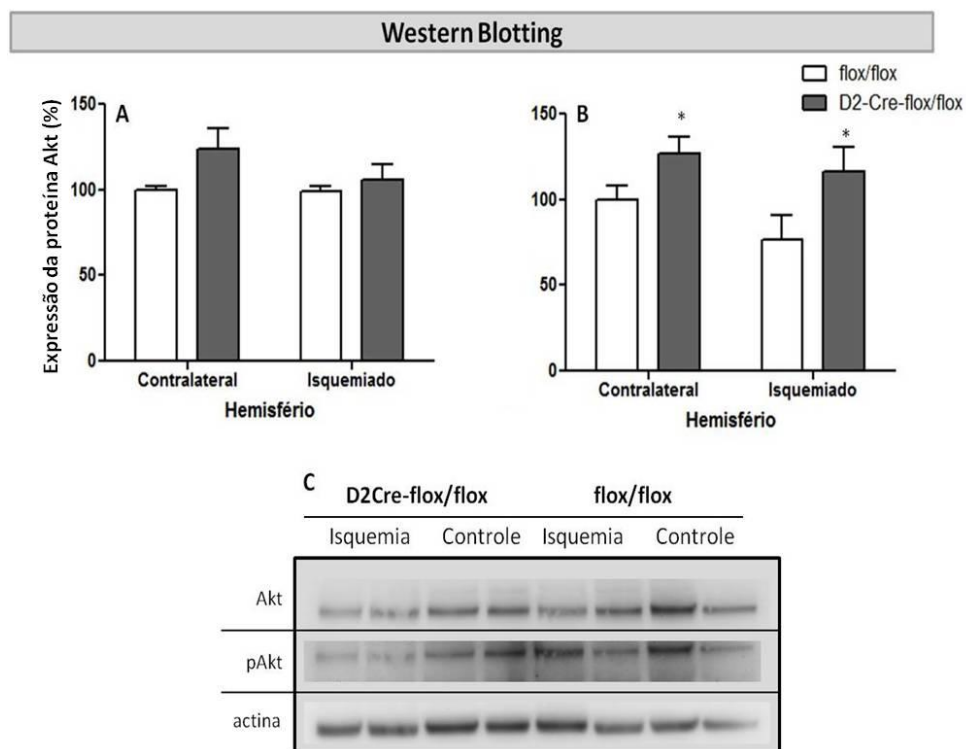


Figura 19: Análise da expressão proteica (Akt) em camundongos D2Cre-flox/flox.

A) Akt; B) pAkt (pSer473Akt; C) Imunoblot representativo da expressão de Akt, pAkt e actina no hemisfério isquemiado e contralateral. A expressão das proteínas (%) foi normalizada pela actina. N=5/grupo. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

Não observamos diferenças nos níveis de Akt [genótipo: $F(1, 8) = 3.290$, $p = 0.107$; tratamento: $F(1, 8) = 1.582$, $p = 0.244$]. No entanto, quantidade de Akt fosforilada (pAkt) foi significativamente maior no camundongos VACHT^{D2-Cre-flox/flox} [$F(1, 8) = 6.574$, $p = 0.033$]. Não foram observadas diferenças entre hemisférios [$F(1, 8) = 2.379$, $p = 0.162$] (Figura 19).

Adicionalmente, pAkt é conhecida por inativar os fatores pro-apoptóticos GSK3 α e GSK3 β pela fosforilação de serina 21 e serina 9, para GSK3 α e GSK3 β respectivamente (Beurel et al., 2010). A forma inativada de GSK3 α (pSer21 GSK3 α) apresentou-se significativamente maior nos tecidos isquemiados [$F(1, 8) = 6.351$, $p = 0.036$], sem qualquer diferenças entre genótipos [$F(1, 8) = 2.375$, $p = 0.162$]. No entanto, não observamos qualquer diferença na quantidade de GSK3 β (pSer9 GSK3 β) quando comparamos hemisférios [$F(1, 8) = 0.371$, $p = 0.559$] ou genótipos [$F(1, 8) = 0.703$, $p = 0.426$] (Figura 20).

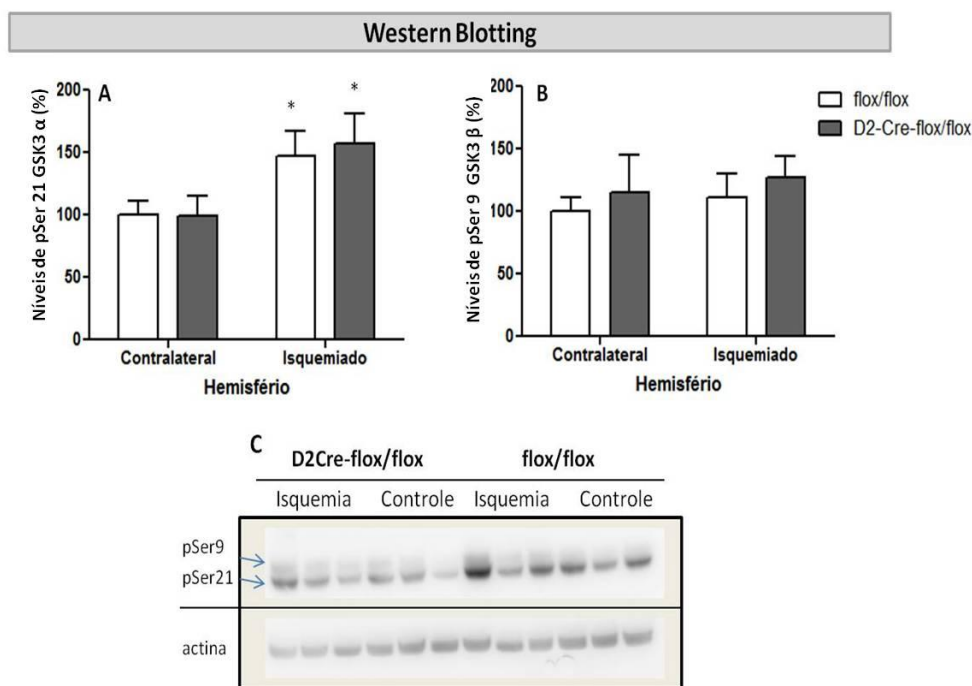


Figura 20: Análise dos níveis de GSK3 (GSK3pSer21/9) em camundongos D2Cre-flox/flox.

A) pSer21 GSK3α, B) pSer9 GSK3β. C) Imunoblot representativo da expressão de GSK3pSer21 e GSK3pSer9 e actina no hemisfério isquemiado e contralateral. A expressão das proteínas (%) foi normalizada pela actina. N=5/grupo. Resultados expressos como média ± EPM. *P<0,05 em relação ao hemisfério contralateral (Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

GSK3α e GSK3β são fosforilados respectivamente pela tirosina 216 e tirosina 279 através de mecanismos ainda não conhecidos. No entanto, sabe-se que a ativação dessas proteínas podem desencadear respostas pró apoptóticas. (Jope et al.,2007,Beurel et al.,2010).

A avaliação do hemisfério isquemiado de animais VACHT^{D2Cre-flox/flox} revelou um aumento significativo no nível de pGSK3α (pTyr216 pGSK3α) [genótipo: F(1, 8)= 4.632, p=0.064; tratamento: F(1, 8)= 12.20, p= 0.008] e pGSK3β (pTyr279 pGSK3β) [genótipo: F(1, 8)= 4.749, p=0.061; tratamento: F(1, 8)= 16.89, p= 0.003] quando comparado com o tecido isquemiado de camundongos controles (Figura 21). No entanto, a avaliação da expressão total de GSK3α e GSK3 β não demonstrou qualquer diferença entre genótipos ou tratamentos (Figura 22).

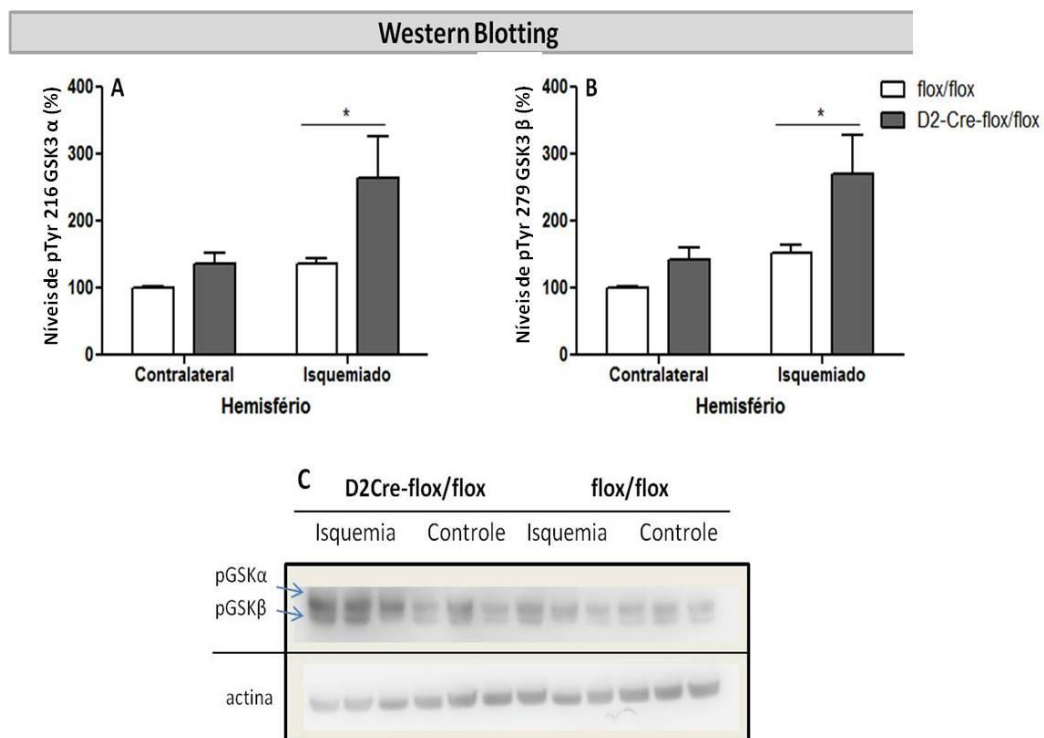


Figura 21: Análise dos níveis de GSK3 (GSK3 pTyr279/216) em camundongos VACHT^{D2Cre-flox/flox}.

A) pGSK3α pTyr216, B) pGSK3β pTyr279. C) Imunoblot representativo da expressão de pGSK3 e actina no hemisfério isquemiado e contralateral. A expressão das proteínas (%) foi normalizada pela actina. N=5/grupo. Resultados expressos como média ± EPM. *P<0,05 quando comparados genótipos nos grupos isquemiados (Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

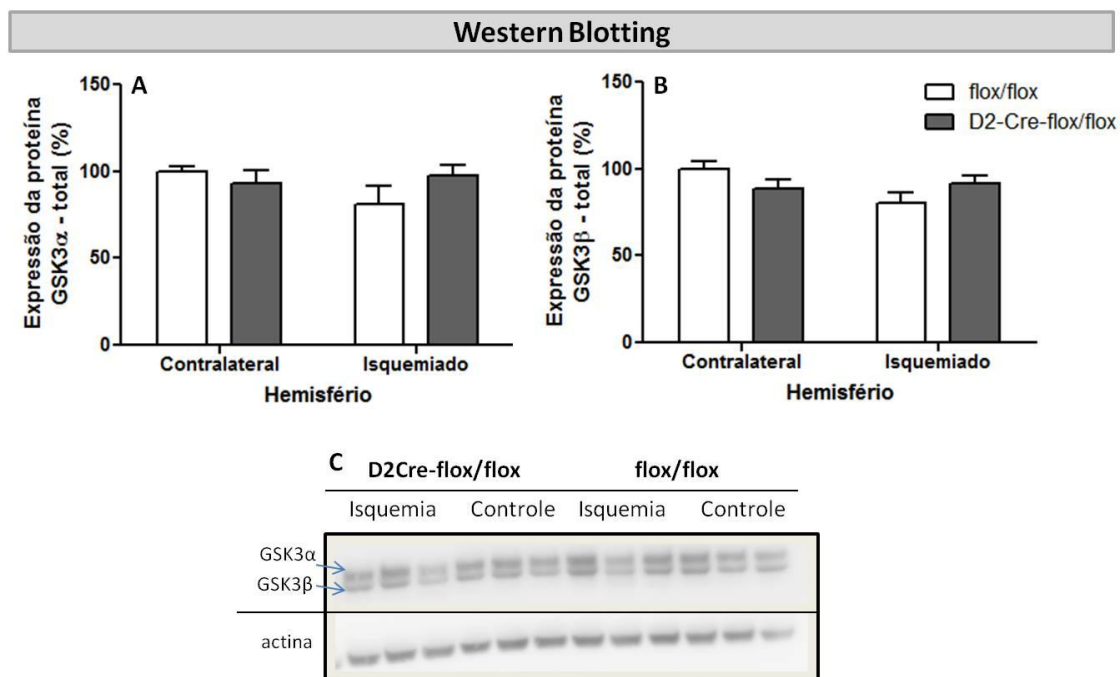


Figura 22: Análise da expressão proteica (GSK3 total) em camundongos D2Cre-flox/flox.

Análise da expressão proteica total de: A) GSK3; B) GSK3 α ; C) GSK3 β . D) Imunoblot representativo da expressão de GSK3 total e actina no hemisfério isquemiado e contralateral. N=5/grupo. Resultados expressos como média $\pm$ EPM (Two-way ANOVA).

Adicionalmente, não houve diferença na expressão de Bcl-2 e Bax nos tecidos isquemiados quando comparados com controle (Bcl-2: $F(1, 8) = 0.165$, $p = 0.695$. Bax: $F(1, 8) = 0.024$, $p = 0.880$), assim como não foram observadas diferenças entre genótipos (Bcl-2: $F(1, 8) = 0.583$, $p = 0.467$. Bax: $F(1, 8) = 0.261$, $p = 0.623$) (Figura 23).

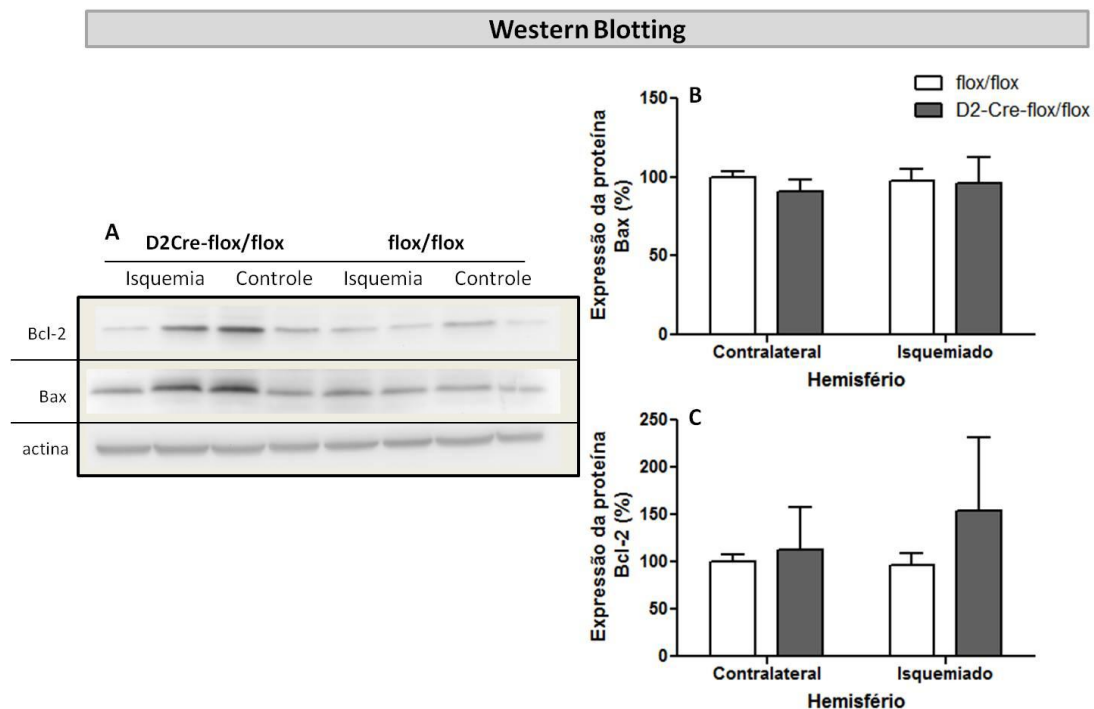


Figura 23: Análise da expressão proteica (Bax, Bcl-2) em camundongos VACHT^{D2Cre-flox/flox}.
 A) Imunoblot representativo da expressão de Bcl-2, Bax e actina no hemisfério isquemiado e contralateral; B) Bax; C) Bcl-2. A expressão das proteínas (%) foi normalizada pela actina. N=5/grupo. Resultados expressos como média $\pm$ EPM (Two-way ANOVA).

A isquemia cerebral resultou em significativo aumento do número de células TUNEL positivas no estriado ipsilateral à lesão de ambos genótipos quando comparados com hemisfério contralateral (Figura 24. Tratamento: $F_{(1,20)}=49.05$, $P<0.001$). Adicionalmente, o maior volume de infarto observado em camundongos VACHT^{D2-Cre-flox/flox} não resultou em aumento do número de células apoptóticas após isquemia quando comparados com camundongos isquemiados controle. Portanto, não foram observadas diferenças entre genótipos (Figura 24. Genótipo: $F_{(1,20)}=1.755$, $p=0.20$)

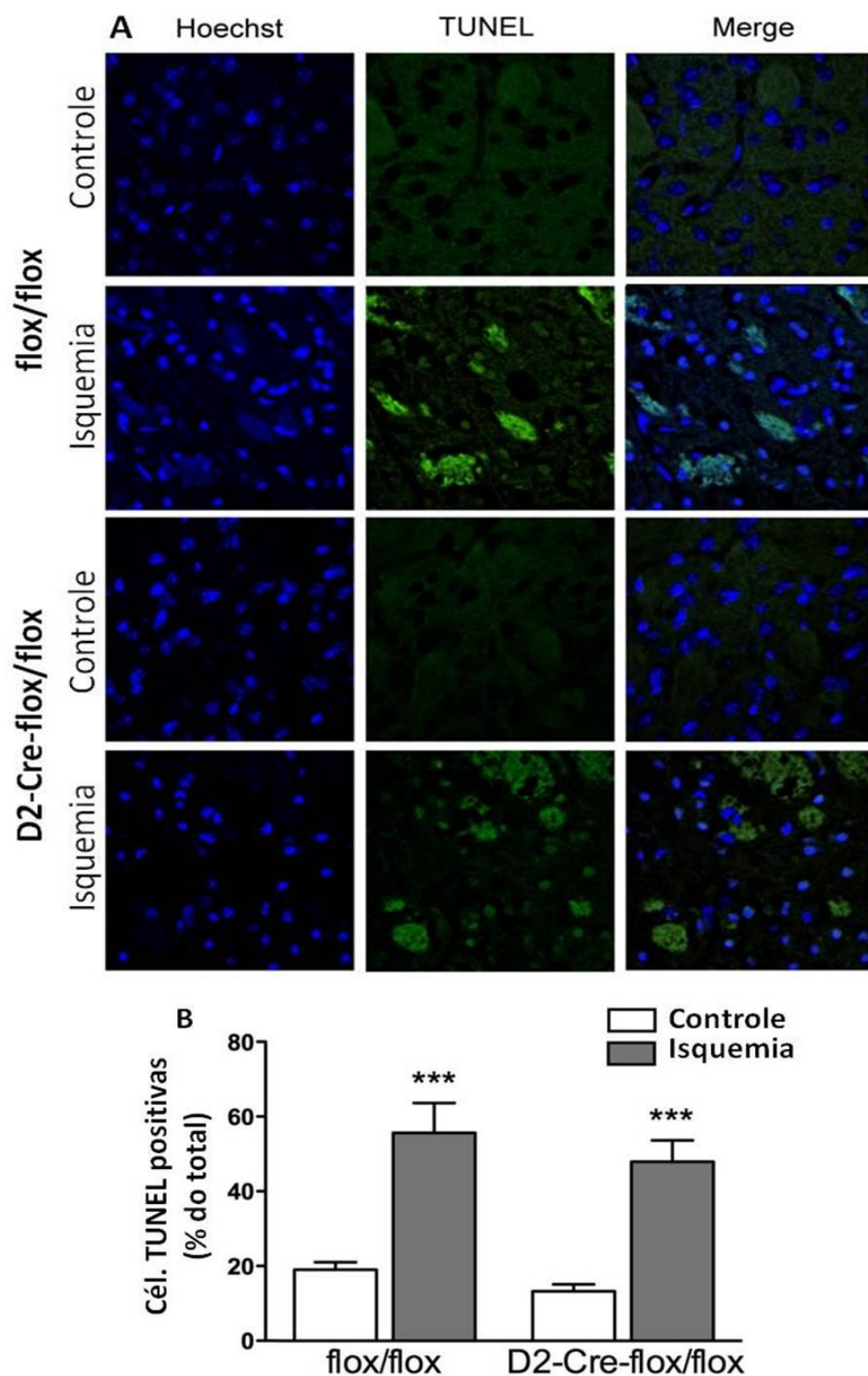


Figura 24: Marcação e análise de células apoptóticas por TUNEL em camundongos VACHT^{D2Cre-flox/flox}.

Imagens representativas de células apoptóticas marcadas por TUNEL na região do estriado. B) Histograma quantitativo de células TUNEL positivas. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. ***P<0,001 quando comparados isquemia em relação ao controle (Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni). Cálculo: Número total de cél. TUNEL positivas / Número total de núcleos Hoechst no hemisfério contralateral) $\times 100$.

Avaliações funcionais foram realizadas 7 e 14 dias após cirurgia. Camundongos com depleção colinérgica estriatal apresentaram maior latência para remover a fita no teste de assimetria bilateral quando comparados com controles 7 dias após cirurgia. Essa diferença pôde ser observada quando comparadas as patas anteriores direitas, uma vez que a lesão foi induzida no hemisfério cerebral esquerdo. Camundongos VACHT^{D2-Cre-flox/flox} apresentaram uma latência de 120.0 ± 20.0 seg para remover a fita, enquanto animais controle o fizeram em 61.00 ± 11.64 seg (Figura 25B). Não foram observadas diferenças entre genótipos na etapa do teste de percepção da fita (Figura 25A).

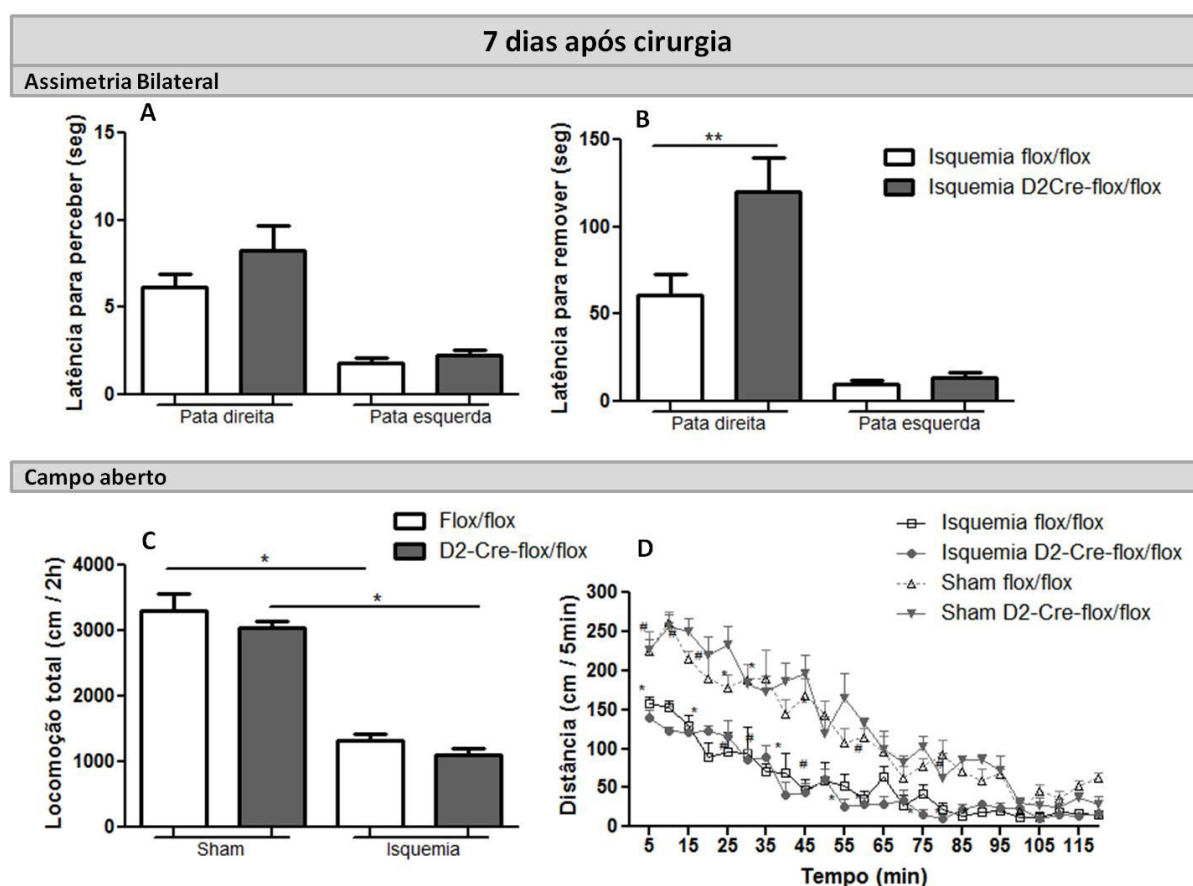


Figura 25: Testes funcionais assimetria bilateral e campo aberto: 7º dia após cirurgia - VACHT^{D2-Cre-flox/flox}

Avaliação funcional de animais VACHT^{D2-Cre-flox/flox} e controles 7 dias após cirurgia. Para realização do teste de assimetria bilateral, uma fita adesiva foi colocada em cada uma das patas anteriores do animal, e o tempo para que o animal perceba (A) e retire (B) a fita foi registrado. Para realização do teste de campo aberto, os animais foram colocados individualmente em uma caixa, e a locomoção total (C) e a atividade exploratória (D) foram avaliadas durante 120min. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. (n=6-8/grupo). **P<0,01 para grupo isquemia VACHT^{D2-Cre-flox/flox} em relação ao Controle, *P<0,05 para grupo isquemia em relação ao respectivo sham. #P<0,05 para grupo isquemia VACHT^{flox/flox} em relação ao sham (Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

Na avaliação da atividade locomotora pelo teste de campo aberto, observou-se uma redução da atividade locomotora em ambos genótipos isquemiados quando comparados com os respectivos controles sham operados. No entanto, não observamos diferença entre genótipos (Figura 25 C e D).

A avaliação de parâmetros relacionados à marcha, realizados no 7º dia pós-operatório, através do teste Catwalk, não demonstrou qualquer diferença entre genótipos de animais sham operados. Adicionalmente, nenhuma assimetria de lateralidade ou alteração da marcha foi observada nestes grupos não isquemiados (Figura 26: A, C, E, G). A análise do grupo de animais isquemiados demonstrou uma alteração da marcha em ambos os genótipos nos parâmetros que avaliam intensidade e área da pegada. Ambos os grupos de animais isquemiados apresentaram uma diminuição da intensidade (Figura 26D. Efeito da isquemia: $F_{(1,18)}=18.08$, $p<0.001$) e área de impressão da pegada (Figura 26D. Efeito da isquemia: $F_{(1,18)}= 18.762$, $p<0.001$) nas patas direita anterior e posterior quando comparados com as respectivas patas esquerdas. Adicionalmente, a análise dos parâmetros que avaliam velocidade e comprimento dos passos, demonstrou que animais VACHT^{D2-Cre-flox/flox} isquemiados apresentaram uma menor velocidade das passadas (Figura 26F. Efeito do genótipo: $F_{(1,18)}= 16.549$, $p= 0.007$), assim como, passos mais curtos (Fig. 26H. Efeito do genótipo: $F_{(1,18)}= 17.866$, $p=0.006$, quando comparados com controles isquemiados).

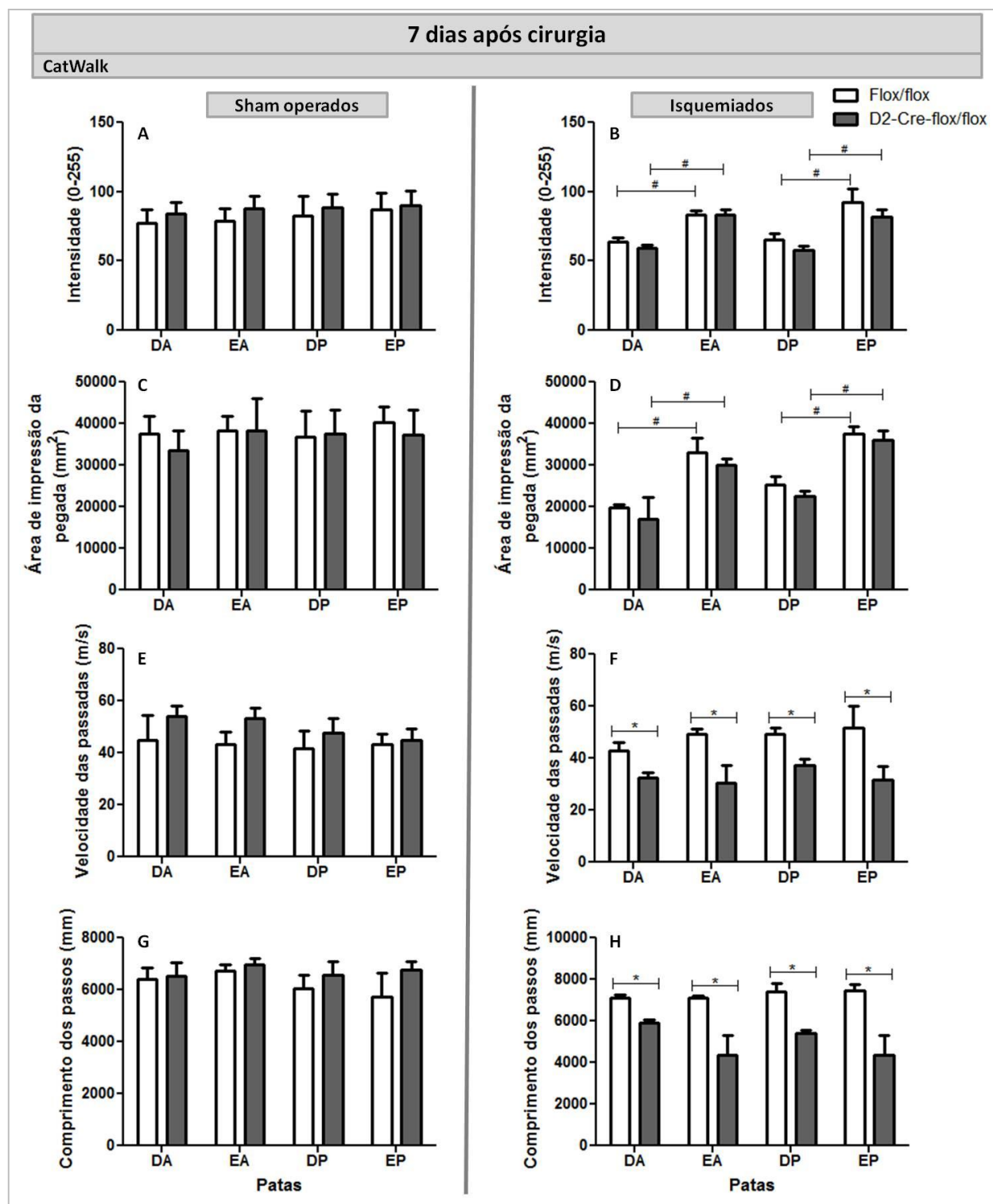


Figura 26: Teste funcional Catwalk: 7º dia após cirurgia – VACHT^{D2-Cre-flox/flox}

Avaliação funcional de animais VACHT^{D2-Cre-flox/flox} (B, D, F, H) e controles (A, C, E, G) 7 dias após cirurgia. As 4 patas do animal foram avaliadas separadamente: pata direita anterior (DA), pata esquerda anterior (EA), pata direita posterior (DP) e pata esquerda posterior (EP). Os parâmetros avaliados foram: Intensidade da pegada (0-255)(A e B), Área de impressão da pegada (mm²)(C e D), Velocidade das passadas (m/s) (E e F) e Comprimento dos passos (mm) (G e H). , *P<0,05 para VACHT^{D2-Cre-flox/flox} em relação ao respectivo controle. (n=4/grupo). #P<0,05 para comparação entre patas direita e esquerda do mesmo genótipo. Resultados expressos como média ± EPM. (Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

Na avaliação funcional, realizada no 14º dia após cirurgia, através dos testes de assimetria bilateral e campo aberto, não foi observada qualquer diferença estatisticamente significativa entre genótipos. No entanto, a diferença previamente existente, entre grupos isquemiados e respectivos sham operados, persistiu no teste de campo aberto. Animais isquemiados apresentaram uma menor atividade locomotora total quando comparados com sham (Figura 27).

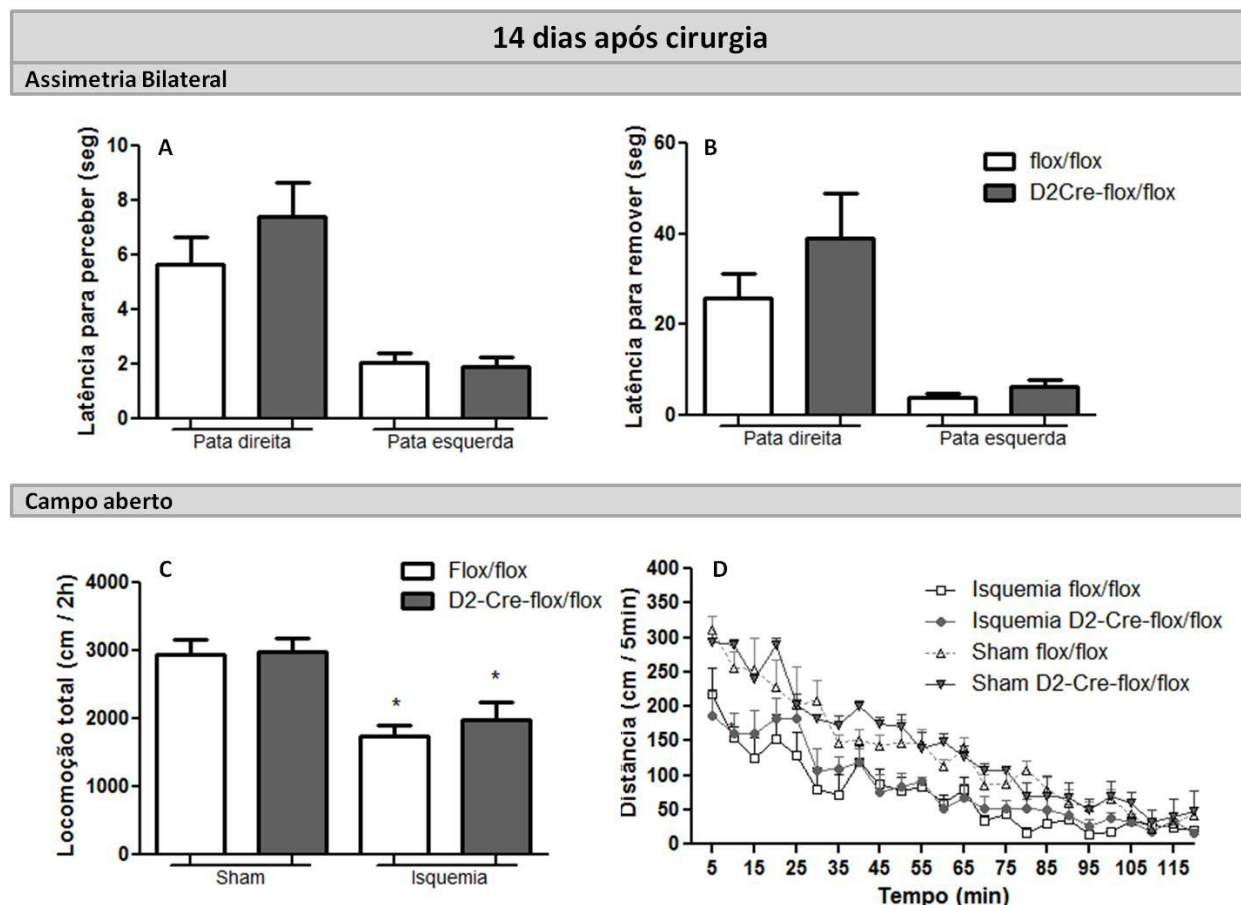


Figura 27: Testes funcionais assimetria bilateral e campo aberto: 14º dia após cirurgia – VACHT D2-Cre-flox/flox

Avaliação funcional de animais VACHT D2-Cre-flox/flox e controles 14 dias após cirurgia. Para realização do teste de assimetria bilateral, uma fita adesiva foi colocada em cada uma das patas anteriores do animal, e o tempo para que o animal perceba (A) e retire (B) a fita foi registrado. Para realização do teste de campo aberto, os animais foram colocados individualmente em uma caixa, e a locomoção total (C) e a atividade exploratória (D) foram avaliadas durante 120min. (n=5-6/grupo). Resultados expressos como média ± EPM. *P<0,05 para grupo isquemia em relação ao respectivo sham (Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

O peso dos animais foi avaliado durante todo o experimento até o dia do sacrifício. Ambos os grupos isquemiados apresentaram uma diminuição do peso corporal na primeira semana, mas foram capazes de manter ou ganhar peso na semana seguinte. Não houve

diferença significativa entre grupos de animais isquemiados. Animais sham operados mantiveram seu peso corporal estável durante todo período de avaliação (Figura 28 A).

Animais com déficit colinérgico estriatal submetidos a isquemia apresentam um menor percentual de sobrevivência quando comparados com animais do grupo controle isquemiado. Todos os camundongos submetidos à cirurgia sham permaneceram vivos durante todo o experimento (Figura 28B).

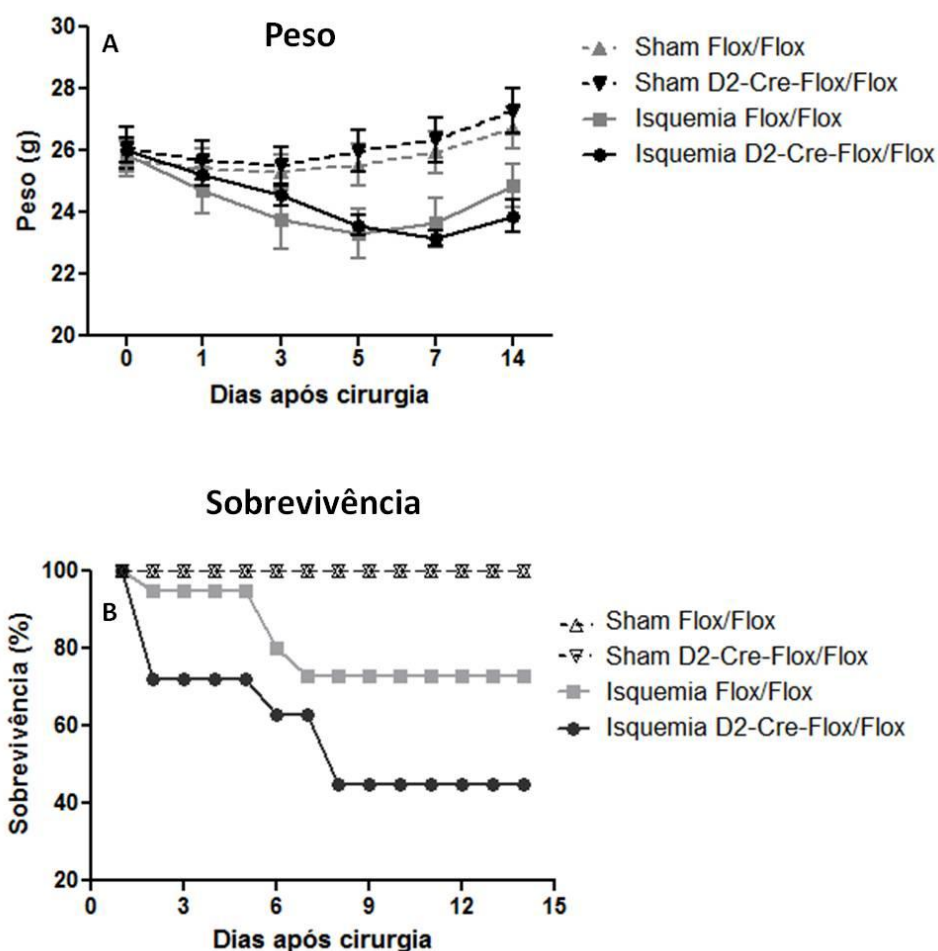


Figura 28: Peso corporal e curva de sobrevivência: VACHT^{D2-Cre-flox/flox}.

A) Peso dos animais no decorrer do experimento (14 dias). Resultados expressos como média $\pm$ EPM (n=6-8) (Two Way Anova). B) Curva de sobrevivência no período de 14 dias (Mantel – Cox log-rank test, $p=0.024$, Comparação entre grupos isquemia).

4.5 Investigação dos efeitos da proteína STI1 na lesão cerebral e recuperação funcional.

Para investigação dos efeitos dos níveis da proteína STI1 na lesão cerebral foram utilizados camundongos adultos com deleção parcial da proteína STI1 ($STI1^{-/+}$) e camundongos adultos e idosos transgênicos para STI1 (TgSTA). A lesão cerebral foi induzida através da oACM e foi avaliada 24h após a cirurgia através de uma série de imagens de RM.

Camundongos com depleção parcial da proteína STI1 ($STI1^{-/+}$) e controles ($STI1^{+/+}$) foram submetidos a testes funcionais antes da indução da lesão cerebral. O desempenho dos camundongos foi avaliado através do teste de assimetria bilateral. Não foram observadas diferenças significativas entre genótipos, tanto na avaliação da latência de percepção, quanto na latência de remoção da fita (Figura 29 A e B).

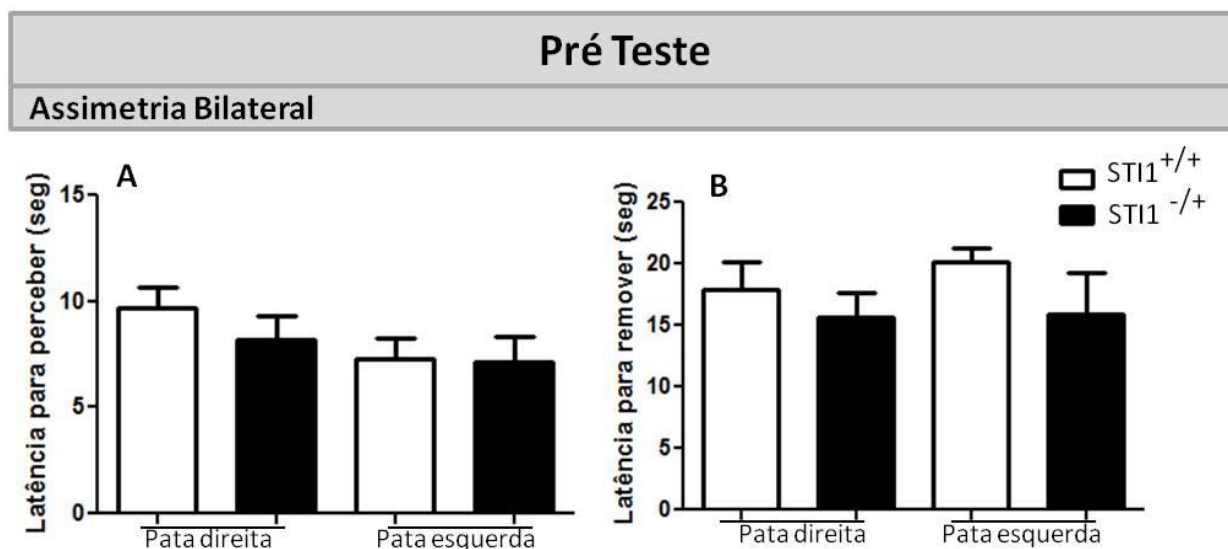


Figura 29: Teste funcional assimetria bilateral: Pré teste com STI1.

Avaliação funcional de animais $STI1^{+/+}$ e $STI1^{-/+}$ antes da cirurgia. Para realização do teste de assimetria bilateral, uma fita adesiva foi colocada em cada uma das patas anteriores do animal, e a latência para que o animal perceba (A) e retire (B) a fita foi registrada. Não foram observadas diferenças entre genótipos em nenhum dos critérios avaliados ($n=7-9$ /grupo). Resultados expressos como média $\pm$ EPM (Two-way ANOVA).

Para avaliação da lesão cerebral em camundongos $STI1^{-/+}$ e controles foram analisadas imagens de RM de camundongos isquemiados que apresentaram a lesão

cerebral predominantemente estriatal. Isso se deve à predominância desse tipo de lesão nestes grupos.

Interessantemente, a análise da lesão cerebral em camundongos STI1^{-/+} demonstrou um volume de infarto ($13.67 \pm 0.74 \text{ mm}^3$) e percentual de lesão hemisférica ($17.82 \pm 1.083\%$) significativamente maior quando comparados com controles ($9.71 \pm 0.60 \text{ mm}^3$, $13.96 \pm 0.78\%$) (Figura 30).

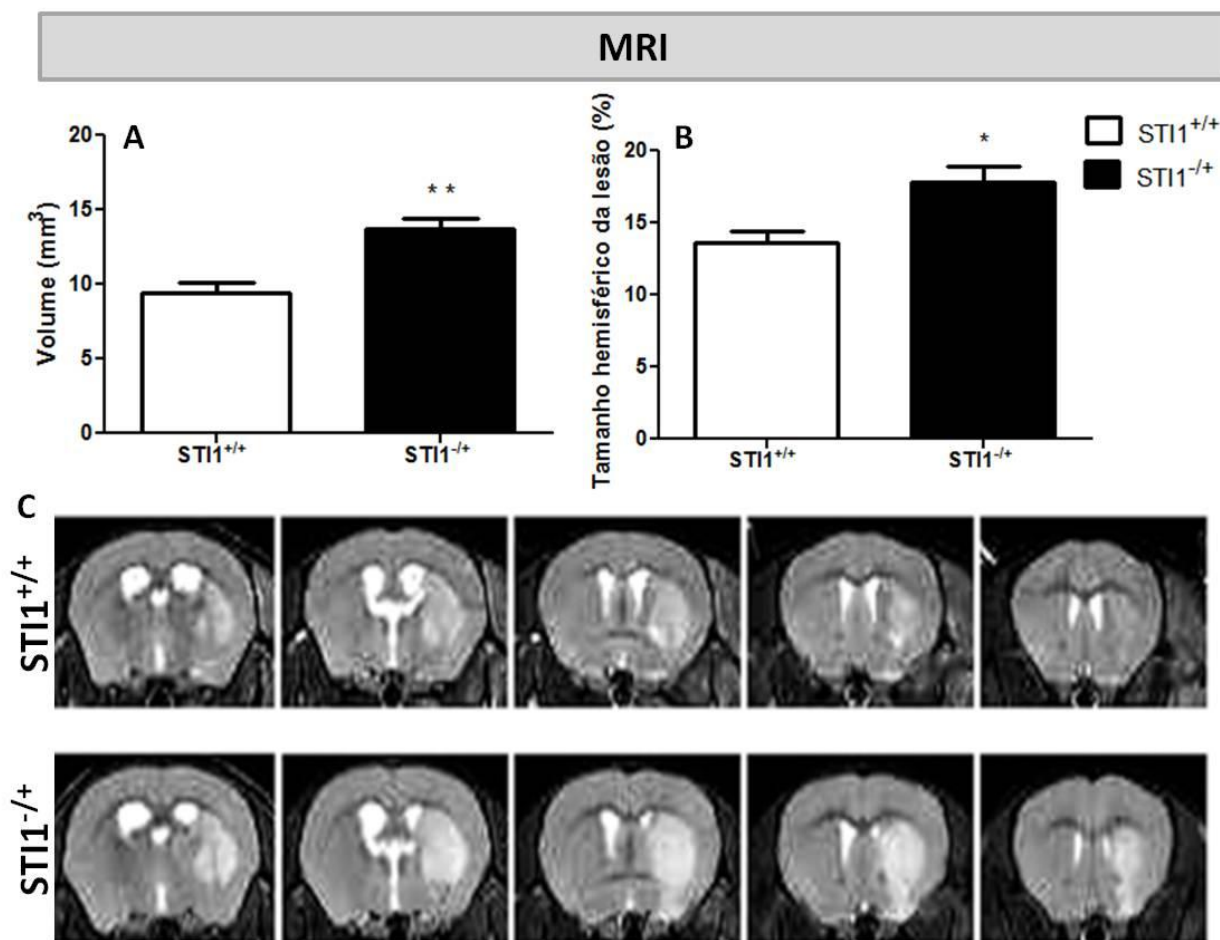


Figura 30: Análise do volume de infarto e percentual do tamanho hemisférico da lesão: Grupo STI1.

A) Volume de infarto. B) Percentual hemisférico da lesão. C) Imagens de ressonância magnética estrutural obtidas 24 horas após lesão: imagens do cérebro de animais STI1^{+/+} e STI1^{-/+}, no corte coronal. A área mais clara representa a área de infarto. Resultados expressos como média ± EPM (n=5-6/grupo). **P<0,01, *P<0,05 em relação ao controle (Teste t não-pareado).

Uma série de parâmetros fisiológicos foi avaliada antes e durante a lesão isquêmica em animais STI1^{-/+} e controles, entre eles: frequência cardíaca, pH, saturação de oxigênio, temperatura e glicose. Tanto na avaliação anterior à lesão, quanto durante a mesma, não houve diferença significativa entre genótipos em nenhum dos parâmetros analisados (Tabela 3. N=3-9/grupo)

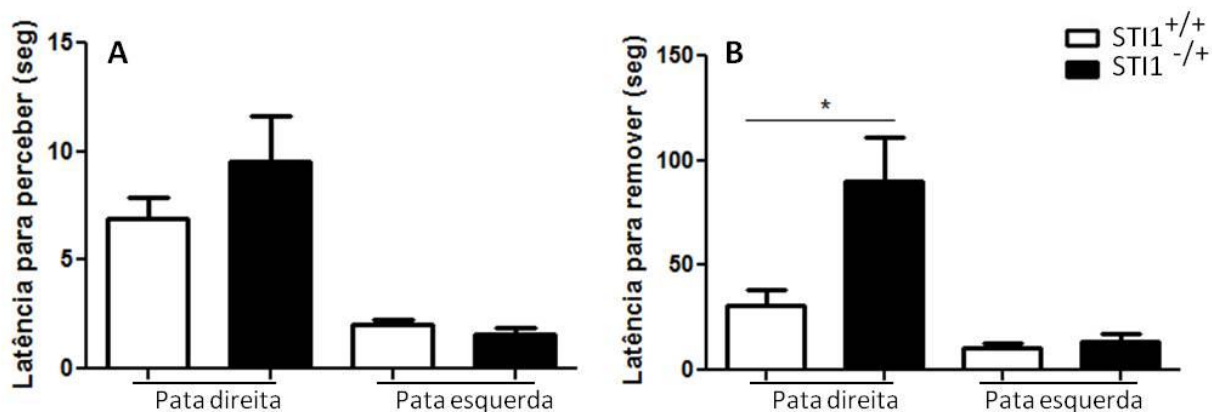
Tabela 3: Parâmetros fisiológicos avaliados antes e durante isquemia: STI1

Parâmetros Fisiológicos		
	STI1+/+	STI1-/+
Antes da isquemia		
Frequência cardíaca (Batimentos/min)	697.4 ± 43.8	669.2 ± 34.9
pH (sangue arterial)	7.193 ± 0.003	7.233 ± 0.006
Saturação de oxigênio (%)	99.37 ± 3.78	97.80 ± 5.85
Temperatura (°C)	35.90 ± 0.31	36.20 ± 0.36
Glicose	8.067 ± 0.633	8.833 ± 0.033
Durante isquemia		
Frequência cardíaca (Batimentos/min)	693.1 ± 42.9	693.1 ± 55.9
pH (sangue arterial)	7.107 ± 0.020	7.100 ± 0.044
Saturação de oxigênio (%)	99.32 ± 3.47	73.55 ± 10.31
Temperatura (°C)	34.35 ± 0.43	34.65 ± 0.52
Glicose	10.030 ± 1.729	9.650 ± 1.707

O teste de assimetria bilateral avaliou a função sensório-motora 7 e 14 dias após a isquemia. Sete dias após a lesão, ambos os genótipos demonstraram um déficit claro em realizar a função com a pata contralateral à lesão, mas não do lado ipsilateral, indicando ser um déficit devido à isquemia. Não foram observadas diferenças entre genótipos na avaliação da latência de percepção da fita, em nenhum dos lados direito ou esquerdo (Figura 31A). No entanto, camundongos STI1^{-/+} gastaram significativamente mais tempo para remover a fita da pata direita (90.28 ± 20.92seg) quando comparados com respectivos controles (30.80 ± 7.89seg) (Figura 31B). No 14º dia após a lesão, não houve diferença entre genótipos para nenhum dos parâmetros avaliados, latência para perceber e latência para remover a fita (Figura 31 C e D).

Assimetria Bilateral

7 dias após isquemia



14 dias após isquemia

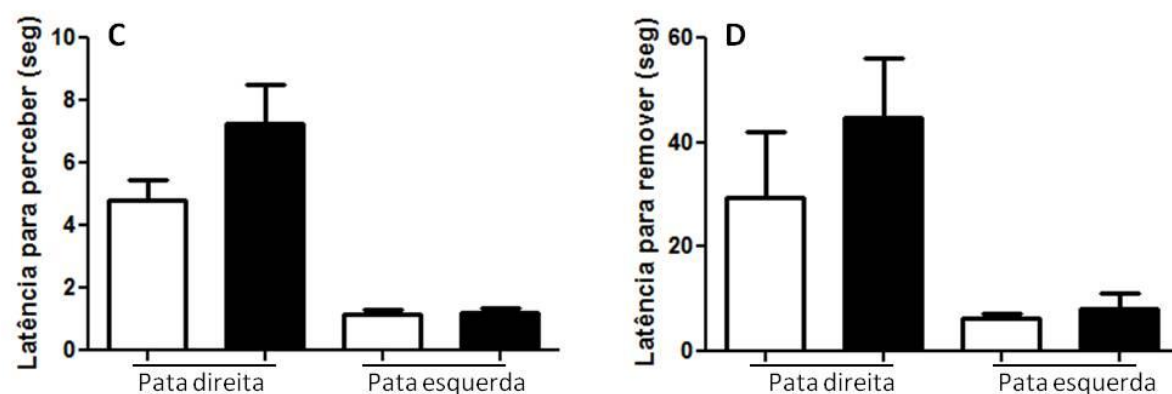


Figura 31: Teste funcional assimetria bilateral: 7º e 14º dia após cirurgia – STI1.

Avaliação funcional de animais STI1^{+/+} e STI1^{-/+} 7 e 14 dias após isquemia. Para realização do teste de assimetria bilateral, uma fita adesiva foi colocada em cada uma das patas anteriores do animal, e a latência para que o animal perceba (A) e retire (B) a fita foi registrada. N=4-6/grupo. Resultados expressos como média ± EPM (n=4-6/grupo). *P<0,05 para comparação entre genótipos e mesma pata. (Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

Existiu uma evolução comum do peso corporal em ambos os grupos isquemiados durante o período de experimento. A diminuição do peso observada nos primeiros dias após a isquemia indicou um efeito da lesão no peso corporal. No entanto, camundongos isquemiados foram capazes de manter ou mesmo ganhar peso depois da primeira semana após a lesão. Camundongos sham operados facilmente mantiveram seus pesos após a cirurgia (Figura 32A).

A avaliação da sobrevivência dos animais no decorrer do experimento demonstrou uma porcentagem significativamente menor em animais STI1^{-/+} isquemiados quando

comparados com controles isquemiados ($p=0.0002$). Todos os animais sham operados permaneceram vivos durante todo o experimento (Figura 32B).

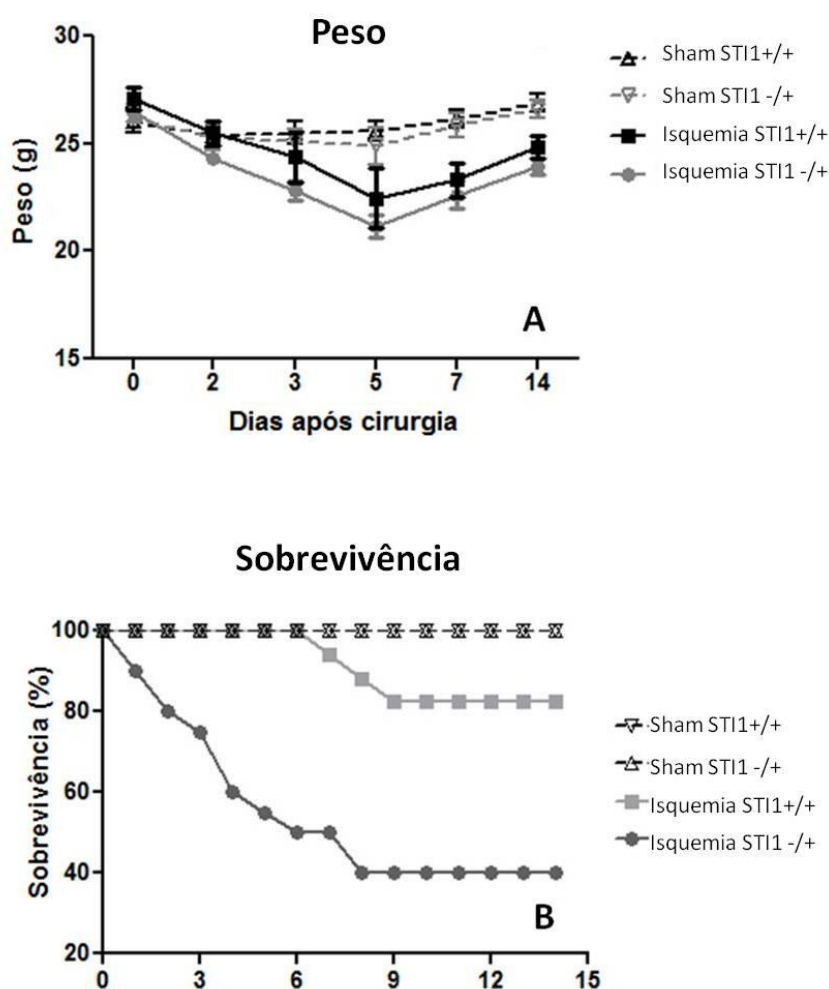


Figura 32: Peso corporal e curva de sobrevivência: STI1.

A) Peso dos animais no decorrer do experimento (14 dias). Resultados expressos como média $\pm$ EPM ($n=5-9$ /grupo) (Two Way Anova, pós-teste de Bonferroni). B) Curva de sobrevivência no período de 14 dias (Mantel – Cox log-rank test, $p=0.0002$, Comparação entre grupos isquemia).

Em função da menor disponibilidade para o uso de camundongos transgênicos para STI1 (TgSTA), nós decidimos investigar prioritariamente o efeito da superexpressão de STI1 na lesão cerebral isquêmica através da análise do volume de lesão e percentual hemisférico da lesão.

A superexpressão da proteína STI1 em camundongos transgênicos não resultou em alteração do volume de infarto ou diferença no percentual hemisférico da lesão quando comparados com WT. Não houve diferença estatisticamente significativa entre genótipos para os camundongos adultos (Figura 33 A e B). Na tentativa de avaliar se o efeito da

superexpressão de STI1 poderia variar de acordo com a idade, nos avaliamos o efeito da lesão cerebral em camundongos idosos transgênicos para STI1. Assim como em camundongos adultos, não houve diferença estatisticamente significativa entre genótipos (Figura 330 C e D). Nos experimentos realizados com camundongos TgSTA, foram avaliados somente camundongos isquemiados que apresentaram lesão cerebral estriatal e cortical, devido à predominância desse tipo de lesão nestes grupos.

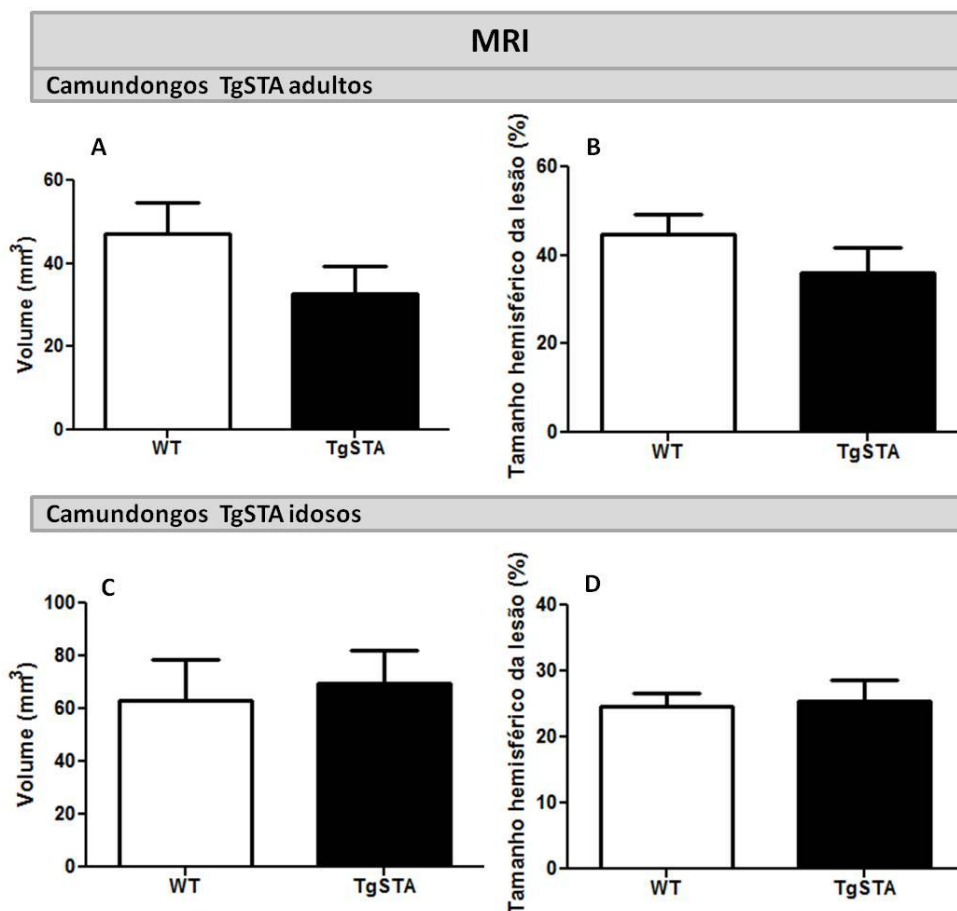


Figura 33: Análise do volume de infarto e percentual do tamanho hemisférico da lesão: Grupo TgSTA.

A) Volume de infarto de animais adultos TgSTA. B) Tamanho hemisférico da lesão em animais adultos TgSTA. C) Volume de infarto de animais idosos TgSTA. D) Tamanho hemisférico da lesão em animais idosos TgSTA. Imagens de ressonância magnética estrutural foram obtidas 24 horas após lesão (n=3-6/grupo). Resultados expressos como média $\pm$ EPM (Teste t não-pareado).

5 DISCUSSÃO

O objetivo geral desse trabalho é investigar o papel da liberação sináptica de ACh e fatores que possam influenciar a função colinérgica na lesão cerebral e recuperação funcional após isquemia. Para isso, nós implementamos e padronizamos o modelo de oclusão da artéria cerebral média em camundongos em nosso laboratório de acordo com o método de Longa e colaboradores (Longa et al.,1989). Esse modelo é o mais utilizado para pesquisas de lesão isquêmica no Sistema Nervoso Central (SNC). Tem a vantagem de induzir a lesão e permitir a reperfusão sem a necessidade de submeter o animal à craniotomia (Longa et al.,1989). Além disso, é também o mais relevante clinicamente, uma vez que a maioria das isquemias cerebrais em humanos envolve a região irrigada pela ACM (Hossmann,1998).

Diante da possibilidade de usar animais geneticamente modificados para investigar possíveis mecanismos envolvidos na lesão cerebral e neuroproteção, um dos objetivos desse trabalho, num primeiro momento, foi caracterizar as respostas em camundongos selvagens, investigando efeitos de diferentes tempos de isquemia na lesão cerebral e recuperação funcional. A partir daí, poderíamos determinar melhores parâmetros para se utilizar em animais mutantes. Nós avaliamos o efeito dos tempos de 30, 45 e 60min de isquemia na lesão cerebral e recuperação funcional em camundongos WT, a fim de identificar o tempo capaz de induzir uma lesão consistente e déficits funcionais compatíveis com a clínica observada neste tipo de lesão unilateral.

A área de lesão foi avaliada 24h após a oclusão da ACM através de imagens de ressonância magnética e imagens de fatias cerebrais coradas com TTC. Ambos os métodos mostraram que a lesão é significativamente maior na isquemia de 60min quando comparada com isquemia de 30 e 45min. Adicionalmente a lesão induzida por 60min de oACM, além de ser consistente, como observado em ambos os métodos, a lesão foi estriatal, ou seja, atingiu predominantemente a região alvo do nosso interesse para estudo do sistema colinérgico.

Com a realização de testes funcionais, nós observamos que a oclusão da artéria cerebral média por 45 e 60min promoveu resultados pós isquêmicos semelhantes. Ambos grupos isquemiados apresentaram maior déficit no teste de assimetria bilateral para tarefa de remoção da fita e menor atividade exploratória no teste de campo aberto quando comparados com controles sham operados. Adicionalmente, a isquemia de 60min resulta em menor percentual de sobrevivência quando comparada com animais submetidos à 45min de isquemia ao final de 14 dias de experimento. Esses resultados corroboram a achados na literatura que demonstram que a lesão cerebral é proporcional ao tempo de isquemia (Macrae, 2011). Trabalhos demonstram um maior percentual de mortalidade na primeira semana após oclusão transitória por 60min da artéria cerebral média em camundongos (Meisel et al.,2004), quando comparado com 45min de isquemia pelo mesmo método de oclusão (Braun et al.,2007,Macrae,2011).

A evolução do peso corporal é um dos mais importantes indicadores da recuperação do animal após a lesão cerebral (Modo et al.,2000). Em todos os nossos experimentos, animais submetidos à isquemia cerebral, independentemente do genótipo, apresentaram uma perda de peso corporal nos primeiros dias após a isquemia. No entanto, nos dias seguintes e principalmente durante a segunda semana após isquemia até o final do experimento, os animais foram capazes de manter o peso corporal. Adicionalmente, nenhuma alteração significativa foi observada em animais sham operados. Indicando assim, que essa diminuição inicial do peso corporal se deve a um efeito da lesão isquêmica e não da modificação genética.

Modo e colaboradores demonstraram que ratos submetidos à isquemia por oclusão da artéria cerebral média apresentaram substancial perda de peso na primeira semana após a cirurgia, entretanto ao longo de um mês após cirurgia os animais são capazes de manter e/ou recuperar o peso corporal inicial. Além disso, esse grupo de pesquisa considerou a perda de peso corporal, maior que 30% do peso inicial, como critério de exclusão do grupo experimental, uma vez que isso poderia indicar um déficit anormal na recuperação ou mesmo uma lesão maior que a esperada (Modo et al.,2000). Em nossos experimentos nós

adotamos os mesmos parâmetros com relação ao peso para inclusão de animais em nossos grupos experimentais.

Diante de todos os resultados observados em animais WT, nós consideramos a utilização da isquemia de 60min como a mais adequada para a condução dos experimentos seguintes com camundongos mutantes. Apesar da maior taxa de mortalidade, nós assumimos esse risco em função da característica e área de lesão induzida pela isquemia de 60min. Além disso, esse maior tempo de lesão resultou em melhor visualização e quantificação da lesão através de imagens adquiridas através de ressonância magnética.

A utilização de animais geneticamente modificados requer um cuidado a mais no delineamento dos experimentos e grupos controles. Sendo assim, antes de iniciar os experimentos com camundongos mutantes, nós avaliamos o desempenho funcional (pré-testes) de cada grupo antes de submetê-los à isquemia cerebral. A realização desses experimentos teve o objetivo de caracterizar a performance dos diferentes genótipos utilizados neste trabalho, e assim avaliar o melhor método de comparação após a isquemia.

Na avaliação funcional realizada previamente à isquemia, nós observamos uma hiperatividade locomotora em camundongos VACHT KD^{HOM} quando comparados com WT no teste de campo aberto (Martyn et al.,2012) . Esses dados corroboram os achados prévios de Martins-Silva e colaboradores (2011) (Martins-Silva et al.,2011). Camundongos VACHT KD^{HOM} apresentam a redução generalizada, de cerca de 70%, da expressão do VACHT, o que torna interessante a utilização desses animais na investigação de lesões cerebrais generalizadas ou não específicas. No entanto, a análise funcional desses animais demonstrou um perfil locomotor diferenciado de animais controle, o que tornaria difícil a comparação e diferenciação do efeito do genótipo ou da isquemia após a lesão. Adicionalmente, nosso laboratório também disponibiliza outras linhagens de animais com déficits colinérgicos específico e completo (nocaute condicional), sendo assim, nós optamos

por não utilizar esse grupo de animais, VACHT KD^{HOM} nós experimentos que envolvem avaliação da recuperação funcional após lesão.

Guzman e colaboradores, caracterizaram o VACHT^{D2Cre-flox/flox} e demonstraram que a ausência de acetilcolina no estriado não interrompe ou altera tarefas como o aprendizado motor e atividade locomotora espontânea (Guzman et al.,2011). Em concordância com esses resultados, nós observamos que animais VACHT^{D2Cre-flox/flox} não apresentam déficits funcionais, em nenhum dos testes avaliados, em comparação com resultados obtidos com controles. Sendo assim, esse genótipo apresenta um comportamento motor similar a animais WT antes da lesão cerebral, o que facilita a investigação da participação de neurônios colinérgicos após lesão cerebral, tanto a nível estrutural quanto funcional.

Adicionalmente, esses animais têm a vantagem de serem nocautes específicos para a região do estriado, ou seja, além deles apresentarem a deleção completa do VACHT, que resulta na ausência de liberação de acetilcolina, essa deleção seletiva para o corpo estriado. A primeira região afetada no insulto isquêmico ocasionado pela oclusão da ACM (Carmichael,2005). Estudos têm demonstrado que interneurônios colinérgicos são mais resistentes à lesão isquêmica quando comparados com neurônios de outras regiões cerebrais (Andsberg et al.,2001,Deng et al.,2008). Sendo assim, a utilização desse modelo animal nós permite investigar fatores e vias de sinalização que possam estar envolvidas nesses resultados.

Diante das análises funcionais realizadas previamente à cirurgia, nós optamos pela utilização camundongos VACHT^{D2Cre-flox/flox} para experimentos de avaliação funcional a longo prazo após isquemia.

Os animais submetidos aos experimentos de longa duração (14 dias) tiveram seus parâmetros fisiológicos avaliados antes, durante e/ou após a lesão isquêmica. A avaliação dos parâmetros fisiológicos dos animais tem o objetivo de verificar possíveis alterações prévias que possam interferir nos resultados após lesão, assim como, confirmar a

equivalência da indução da lesão isquêmica nos grupos estudados (Adelson et al.,2012,Zhang et al.,2012). Nenhuma alteração na frequência cardíaca, temperatura, glicose, pH e saturação de oxigênio foi observada em nenhum dos genótipos avaliados, confirmando assim a equivalência da lesão induzida, bem como a não interferência dos parâmetros fisiológicos analisados nos resultados observados.

O principal objetivo deste trabalho foi a investigação do papel do sistema colinérgico na lesão cerebral isquêmica. Trabalhos *in vitro* e *in vivo* demonstram que o aumento da disponibilidade de acetilcolina, promovido por inibidores de colinesterase, resulta em neuroproteção e aumento da viabilidade celular após isquemia (Sadoshima et al.,1995,Scremin et al.,1997,Akasofu et al.,2003,Zhao et al.,2011,Min et al.,2012), sendo assim, nossa hipótese era de que a ACh endógena tivesse um papel na recuperação da isquemia cerebral.

Nossos resultados demonstram que o déficit colinérgico resultou em maior dano tecidual e menor percentual de sobrevivência após isquemia. Esses resultados demonstram pela primeira vez que a acetilcolina liberada pelos neurônios colinérgicos estriatais é importante para neuroproteção. Em corroboração aos nossos achados, Zhao e colaboradores (2011) demonstraram que o tratamento prévio com anticolinesterásico preveniu a excitotoxicidade induzida pelo glutamato *in vitro* e reduziu significativamente a apoptose induzida pela isquemia na área de penumbra, reduziu o volume de infarto e edema após lesão cerebral induzida pela oclusão da artéria cerebral média (Sun et al.,2011).

Adicionalmente, trabalhos recentes têm demonstrado que agonistas colinérgicos são capazes de reduzir danos isquêmicos em ratos recém-nascidos submetidos à hipóxia (Furukawa et al.,2011), além de inibir o estresse oxidativo promovido pela isquemia transitória em ratos adultos (Kutsuna et al.,2010) e reduzir edema cerebral após hemorragia intracerebral em camundongos (Krafft et al.,2012).

Nossos dados sugerem que o sistema colinérgico estriatal pode agir de maneira neuroprotetora. Na tentativa de investigar possíveis fatores e vias de sinalização envolvidas no processo de morte celular que levaram à uma maior área de lesão em camundongos VACHT^{D2Cre-flox/flox}, nós avaliamos a expressão de marcadores inflamatórios, BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) e Trk-b (tyrosine kinase receptor, type 2).

A inflamação é uma importante etapa na cascata isquêmica que conduz ao dano celular. A liberação de mediadores inflamatórios como iNOS e citocinas como TNF α e IL-1 β inibem a neurogênese e induzem a apoptose. Muitos trabalhos têm demonstrado que o tônus colinérgico é capaz de regular respostas inflamatórias (de Jonge et al., 2007, Krafft et al., 2012). Wang e colaboradores (2008) demonstraram que a inibição da acetilcolinesterase (AChE) resultou em redução da expressão de TNF- α , IL- β e iNOS em ratos após isquemia por oACM. A redução de marcadores inflamatórios foi observada tanto no córtex quanto estriado do hemisfério cerebral isquemiado de animais tratados com Huperzine A (Inibidor seletivo da AChE) (Wang et al., 2008).

Em nosso trabalho, nós observamos uma elevação da expressão de TNF- α , IL- β e iNOS nos hemisférios cerebrais isquemiados de ambos os grupos, VACHT^{D2Cre-flox/flox} e controle. No entanto, não houve diferença significativa entre genótipos, sugerindo que o maior volume de lesão observado nos camundongos VACHT^{D2Cre-flox/flox}, pelo menos neste modelo, não foi devido ao aumento da atividade inflamatória.

BDNF e seu receptor Trk-B também têm papéis importantes na lesão cerebral, plasticidade sináptica e recuperação funcional (Kurozumi et al., 2004, Bejot et al., 2011, Grade et al., 2013). Trabalhos demonstram que os níveis de BDNF podem ser regulados pelo tônus colinérgico no hipocampo (da Penha Berzaghi et al., 1993, Zuccato et al., 2009, Navakkode et al., 2012) e que existem correlações entre os níveis de $\alpha 7$ -nACRs, BDNF e seu receptor Trk-B (Zhou et al., 2004, Massey et al., 2006, Fernandes et al., 2008, Johansson et al., 2009).

Muitos trabalhos têm demonstrado que as mudanças em BDNF e Trk-B após lesão são região específica (centro de infarto, área de penumbra e regiões que circundam a lesão) (Beck et al.,1994) (Endres et al.,2000) e células específica (Ferrer et al.,2001). Ferrer e colaboradores (2001) demonstraram que a expressão de BDNF e Trk-B em ratos isquemiados apresentou-se reduzida no centro de infarto, porém houve um aumento transitório dessas proteínas na área de penumbra 12h após a lesão quando comparados com controles (Ferrer et al.,2001). Kokaia e colaboradores (1995) demonstraram que a expressão de mRNA de BDNF e Trk-B aumentaram significativamente 2h após isquemia e em seguida retornaram aos valores normais comparados ao controle 24h após lesão (Kokaia et al, 1995). Em nosso trabalho, nós não observamos diferença significativa entre os grupos isquemiados e controle, no entanto, nós avaliamos a expressão dessas proteínas 72h após a lesão. Adicionalmente, em nosso trabalho nós avaliamos todo o tecido isquemiado e regiões adjacentes como um tecido único e não de maneira dependente da característica do tecido, como no trabalho realizado por Ferrer e colaboradores (Ferrer et al.,2001). O fato de trabalharmos com camundongos dificulta esse tipo de análise devido a pequena área do tecido lesado.

Uma vez que a função do sistema colinérgico estriatal na lesão cerebral ainda não está esclarecida, nós investigamos outras vias de sinalização que podem interferir no processo de morte celular e podem ser influenciadas pelo sistema colinérgico. A via de sinalização controlada pela fosforilação da Akt é particularmente importante por agir de maneira neuroprotetora e ativar moléculas anti-apoptóticas (Noshita et al.,2001). No entanto, nós não observamos diferenças na expressão de Akt quando comparados hemisférios contralateral e ipsilateral à lesão em ambos genótipos. Em concordância aos nossos achados, Noshita e colaboradores, não encontraram mudanças significativas nos níveis de Akt após isquemia no estriado ou córtex (Noshita et al.,2001).

Nossos resultados sugerem que o déficit colinérgico não afetou significativamente a expressão de Akt antes ou após isquemia, assim como não foram observadas diferenças

entre genótipos. No entanto, aumentados níveis de Akt fosforilada (pSer473Akt) foram observados em animais VACHT^{D2Cre-flox/flox} quando comparados com controles em ambos os hemisférios (contralateral e isquemiado). A elevada expressão de p-Akt sugere um potencial neuroprotetor aumentado pela ativação da via Akt/GSK-3 (Noshita et al.,2001,Mullonkal et al.,2007) no entanto, nós observamos uma maior susceptibilidade desses animais (VACHT^{D2Cre-flox/flox}) à lesão. Krafft e colaboradores (2012), demonstraram recentemente que o tratamento com PHA-543613, agonista específico do receptor nicotínico alfa7, também resultou em aumento dos níveis de p-Akt no cérebro (Krafft et al.,2012). Nossos resultados em adição aos resultados obtidos por Kraft e colaboradores (2012), poderiam sugerir que esse aumento da expressão de pAkt não depende de neurônios colinérgicos estriatais. Estudos adicionais mais detalhados, no sentido de investigar a expressão dessa proteína em diferentes regiões cerebrais e tipos de neurônios específicos, poderiam ajudar a responder essa questão.

Adicionalmente, pAkt é conhecida por inativar os fatores pro-apoptóticos GSK3 α e GSK3 β pela fosforilação de Ser21 e Ser9 para GSK3 α e GSK3 β respectivamente (Beurel et al.,2010). No entanto, nós não observamos qualquer diferença na expressão de pSer21 GSK3 α ou pSer9 GSK β entre genótipos. Nós observamos níveis aumentados de pSer21 GSK3 α nos hemisférios isquemiados de ambos genótipos quando comparados com hemisférios contralaterais. Esses resultados sugerem que neurônios estriatais colinérgicos não afetam neuroproteção via inativação de GSK3 α/β .

Com o objetivo de entender mudanças na via de Akt/GSK3 em camundongos VACHTD2Cre-flox/flox, nós avaliamos os níveis de 2 formas pró-apoptóticas de GSK-3 α/β ; p-Tyr279 GSK3 α e p-Tyr216 GSK3 β . Essas formas fosforiladas de GSK-3 são conhecidas por aumentar a inflamação e toxicidade neuronal após isquemia e reperfusão (Sayas et al.,2006,Beurel et al.,2010). Um significativo aumento na expressão de p-Tyr279 GSK3 α e p-Tyr216 GSK3 β foi observado nas regiões isquêmicas em camundongos VACHT^{D2Cre-flox/flox} comparados com regiões isquêmicas de camundongos controle. A expressão aumentada

de formas pro-apoptóticas de GSK3 α e β poderiam provavelmente contribuir com o aumentado volume de infarto e mortalidade observada em camundongos VACHT^{D2Cre-flox/flox}. Interessantemente, o tônus colinérgico estriatal parece agir de maneira importante inibindo a ativação de GSK3 α e β após isquemia.

Adicionalmente, nós avaliamos a expressão das proteínas de Bax e Bcl-2. Essas proteínas agem tardiamente na via de Akt. Bcl-2 é uma proteína anti-apoptótica e Bax é uma proteína pro-apoptótica (Kitagawa et al.,1998,Mullonkal et al.,2007). Trabalhos têm mostrado que a relação entre os níveis de Bcl-2/Bax é um indicador crucial de sobrevivência celular. Uma alta relação Bcl-2/Bax inibe apoptose e essa razão é, pelo menos em parte, controlada pela via de sinalização Akt (Kitagawa et al.,1998). Nossos resultados não mostraram qualquer diferença significativa na regiões cerebrais de ambos genótipos ou entre genótipos. Por tanto, o sistema colinérgico estriatal não parece influenciar a apoptose regulada por Bcl-2/Bax.

Estudos têm demonstrado que a apoptose é uma importante causa de morte neuronal, especialmente em células da área de penumbra (Yuan, 2009; Ribe et al, 2008; Taylor et al, 2008). Existem evidências de que a ativação do sistema colinérgico pode reduzir a morte celular devido a apoptose (Hejmadi et al.,2003,Resende et al.,2009). Hejmadi e colaboradores (2003) demonstraram que a ativação de receptores nicotínicos poderia proteger neurônios contra danos no DNA e apoptose induzida pela privação de oxigênio e glicose no modelo de hipóxia (Hejmadi et al.,2003). Nossos resultados demonstram que o hemisfério lesado apresenta um percentual de células em apoptose significativamente maior que o hemisfério contralateral em ambos os genótipos, mas surpreendentemente não observamos diferenças entre os genótipos. A deficiência colinérgica não resultou em maior dano celular devido a apoptose neste caso, sugerindo a possibilidade de outras formas de morte celular, como necrose, possam estar envolvidas no aumento da lesão observada nesses camundongos.

Trabalhos têm mostrado que a estimulação colinérgica é capaz de reduzir a permeabilidade da barreira hematoencefálica (Chen et al.,1998) e dilatar vasos sanguíneos cerebrais (Scremin et al.,1997), ambos importantes para proteger o cérebro após lesão isquêmica. Embora o mecanismo pelo qual o sistema colinérgico interfere na formação do edema ainda não esteja claro, recentes achados indicam que a vias de sinalização de Akt está envolvida (Takada-Takatori et al.,2006,de Jonge et al.,2007,Krafft et al.,2012). Recentemente, Krafft e colaboradores (2011) avaliaram o edema cerebral após lesão hemorrágica em camundongos. O tratamento com agonista para o receptor nicotínico $\alpha 7$ (PHA-543613) reduziu significativamente o edema cerebral em um grupo de camundongos. Outro grupo foi tratado com PHA-543613 e Wortmannin, um irreversível inibidor de PI3K que previne a ativação de Akt. Camundongos desse último grupo não apresentaram qualquer redução do edema, sugerindo que o sistema colinérgico reduz edema via Akt (Krafft et al.,2012).

As imagens de ressonância magnética do cérebro de animais isquemiados apresentam áreas claras caracterizadas pelo acúmulo de água em função do edema vasogênico (Carmichael,2005), sendo assim, um importante passo a seguir nessa pesquisa, seria a investigação do edema como um dos fatores causais do maior volume de lesão observado nos camundongos com depleção colinérgica estriatal.

Nossos resultados também indicaram maiores déficits na recuperação funcional, tanto sensório-motora (teste de assimetria bilateral), quanto na avaliação do padrão de marcha (Catwalk) de animais VACHT^{D2Cre-flox/flox} com controles. Conner e colaboradores (2005) demonstraram que a deleção específica de neurônios colinérgicos através da imunotoxina 192-IgG saporina (SAP), resulta em piores resultados na tarefa de alcance após lesão. Resultados desse trabalho indicam que sistema colinérgico é essencial para plasticidade, reorganização cortical e recuperação funcional após lesão cerebral (Conner et al.,2005). O tratamento com anticolinesterásico também têm se mostrado eficiente em resultados de recuperação funcional, tanto cognitivas quanto sensório-motora, após

isquemia (Scremin et al.,1997,Wang et al.,2002,Zhao et al.,2011). Barrett e colaboradores demonstraram recentemente em estudo clínico que a terapia com donepezil (inibidor de colinesterase), iniciada até 24h após isquemia, foi segura e tolerável nas doses de 5-10 mg/dia, e promoveu resultados favoráveis em pacientes adultos (Barrett et al.,2011).

Nós utilizamos o teste de campo aberto com o objetivo de avaliar a atividade locomotora geral dos animais. Neste teste nós não observamos diferença significativa entre genótipos, no entanto animais isquemiados apresentaram uma menor atividade locomotora quando comparados com grupos sham operados, tanto no tempo total, quanto na primeira hora de teste quando avaliados intervalos de 5min. Esses resultados corroboram a outros na literatura que mostram que animais submetidos a lesão cerebral são hipoativos quando comparados com sham operados na primeira semana após a cirurgia. Além disso, na segunda metade do teste, assim como animais sham, eles se adaptam ao ambiente e reduzem ainda mais a atividade locomotora (Willing et al.,2002,Kadam et al.,2009).

Muitos estudos têm demonstrado que efeitos neuroprotetores do sistema colinérgico são predominantemente relacionados à vias de sinalização que envolvem receptores nicotínicos alfa7 ($\alpha 7$ nAChR) (Shimohama et al.,1998,Hejmadi et al.,2003,Egea et al.,2007,Duris et al.,2011). Estudos demonstram que o receptor nicotínico alfa 7 é capaz de atenuar efeitos promovidos pela neurotoxicidade do glutamato (Donnelly-Roberts et al.,1996,Kaneko et al.,1997) e hipóxia (Hejmadi et al.,2003).

Recentemente, Beraldo e colaboradores demonstraram que o receptor nicotínico $\alpha 7$ é essencial para conferir neuroproteção e neuritogênese mediados pela interação STI1/PrP^C. Quando esse receptor foi bloqueado com um antagonista específico, alfa-bungarotoxina, todos efeitos protetores foram inibidos, indicando que o complexo STI1/PrPC/ $\alpha 7$ nAChR é capaz de promover neuroproteção, sendo um potencial alvo para modulação dos efeitos protetores em doenças neurológicas (Beraldo et al.,2010).

Adicionalmente, trabalhos sugerem que a PrP^C tem propriedades neuroprotetoras e que sua deleção aumenta a susceptibilidade à injúria neuronal *in vitro* e *in vivo* (Spudich et

al.,2005,Weise et al.,2006). Animais que apresentam expressão geneticamente aumentada dessa proteína recuperam a viabilidade tecidual e apresentam menores danos pós-isquêmicos (Spudich et al.,2005).

Sendo assim, diante da hipótese de que o complexo STI1/PrP^C mediados pelo receptor alfa7 seja um possível mecanismo, responsável pelos efeitos neuroprotetores observados no sistema colinérgico, um dos objetivos deste trabalho foi investigar, pela primeira vez em modelo de isquemia *in vivo*, o papel da proteína STI1 na lesão cerebral e recuperação funcional. A nossa hipótese é de que a proteína STI1 esteja envolvida em ações neuroprotetoras e a deleção parcial dessa proteína resultaria em uma maior susceptibilidade à lesão isquêmica, assim como, sua superexpressão poderia proteger ou minimizar os danos causados pela lesão cerebral. Sendo assim, se correta essa hipótese, nós poderíamos sugerir, somado a outros experimentos, que a neuroproteção conferida pela proteína STI1 ocorra através do complexo STI1/PrPc/ α 7nAChR em modelo de isquemia *in vivo*, como já demonstrado em experimentos *in vitro* (Beraldo et al.,2010).

Animais com deleção parcial da proteína STI1 (STI1^{-/+}) foram submetidos a testes funcionais previamente à isquemia. Nosso grupo de pesquisa caracterizou pela primeira vez esse modelo animal e nossos experimentos demonstraram que a modificação genética desses animais não resultou em déficits funcionais em relação ao grupo controle.

Experimentos realizados por nosso grupo, demonstraram recentemente que a deleção de STI1 é letal. Animais nocaute para STI1 não sobrevivem após 9.5-10.5 dias do desenvolvimento embrionário (Beraldo et al., 2013 in press). Nossos resultados demonstraram que animais deficientes para a proteína STI1 (STI1^{-/+}) apresentam maior volume de infarto e menor percentual de sobrevivência quando comparados com controles submetidos à oclusão da artéria cerebral média. Esses resultados corroboram a achados *in vitro*, onde culturas neuronais de animais STI1^{-/+}, expostas à privação de glicose e oxigênio, apresentam um maior percentual de morte celular quando comparados com controle (Beraldo et al.,2013 in press).

Interessantemente, a superexpressão de STI1 não foi capaz de conferir qualquer efeito protetor, em camundongos adultos ou idosos. Animais transgênicos para STI1 apresentaram o volume de infarto semelhante ao de animais controles. Esses resultados podem sugerir a existência de um fator limitante no mecanismo envolvido na neuroproteção mediada por STI1. Beraldo e colaboradores, demonstraram que o complexo PrP^C/STI1/alfa7 promove efeito neuroprotetores, mas o bloqueio de qualquer um dos componentes desse complexo resulta em falha do efeito neuroprotetor. Sendo assim, seria interessante investigar se a superexpressão das outras proteínas juntamente com STI1 poderia promover melhores resultados após a lesão isquêmica.

A avaliação funcional pós isquêmica de animais STI1^{-/+} foi realizada através do teste de assimetria bilateral. Nossos resultados demonstraram uma deficiência motora na realização de teste de assimetria bilateral em camundongos STI1^{-/+} quando comparados a controles submetidos à isquemia in vivo, indicando maior déficit na recuperação funcional após lesão.

A grande maioria dos trabalhos encontrados na literatura, demonstram que as vias de sinalizações e ações neuroprotetoras da proteína STI1, são mediados pela proteína Príon (PrP^C) (Chiarini et al.,2002,Zanata et al.,2002,Lopes et al.,2005,Caetano et al.,2008,Linden et al.,2008,Roffe et al.,2010). Essa interação específica e de alta afinidade, STI1/PrPc, é capaz de induzir sinais protetores em neurônios retinais através da via cAMP/PKA (Zanata et al.,2002) e conferir aumento da síntese proteica através da via de sinalização PI3K-mTOR. Interessantemente, algumas cascatas de sinalização ativadas pelo complexo STI1-PrPC são bloqueadas em células infectadas por príon (Roffe et al.,2010), e esse complexo é capaz de promover neuritogênese via ERK e neuroproteção via PKA (Lopes et al.,2005).

De acordo com Lopes e colaboradores, as proteínas PrPc e STI1 são abundantemente expressas e altamente co-localizadas na superfície de neurônios hipocâmpais, indicando que essas proteínas poderiam também interagir *in vivo* (Lopes et al.,2005). Nós ainda não temos evidências de que os efeitos STI1 são dependentes de PrP^C

ou $\alpha 7$ nAChR após a lesão cerebral *in vivo*. No entanto, nós não podemos descartar a possibilidade de que a maior susceptibilidade a danos isquêmicos, observada em animais STI1^{-/+} em nosso trabalho, seja em função da provável redução nas interações PrPc/STI1/ $\alpha 7$ nAChR. Experimentos adicionais ainda precisam ser realizados para confirmar essa hipótese.

Em resumo, nós mostramos através da utilização de animais geneticamente modificados, que a ausência de acetilcolina no estriado, assim como a redução da proteína STI1, resulta em maior volume de infarto, menor sobrevivência e maiores déficits funcionais após isquemia cerebral.

6 CONCLUSÕES

Nossos dados sugerem que:

- A acetilcolina estriatal é importante no processo de lesão cerebral e recuperação funcional após isquemia.
- Camundongos nocaute condicional para o VAcHT no estriado são mais susceptíveis à isquemia cerebral quando comparados com controles isquemiados.
- Camundongos com deleção parcial da proteína STI1 apresentam maior volume de infarto, maior susceptibilidade à isquemia e piores resultados funcionais quando comparados com controles.
- Em resultados preliminares, a superexpressão da proteína STI1 não resultou em melhores resultados na avaliação do volume de infarto realizada 24h após isquemia.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adelson, J. D., G. E. Barreto, L. Xu, T. Kim, B. K. Brott, Y. B. Ouyang, T. Naserke, M. Djuricic, X. Xiong, C. J. Shatz and R. G. Giffard (2012). "Neuroprotection from stroke in the absence of MHCI or PirB." *Neuron* **73**(6): 1100-1107.
- Akaike, A. (2006). "Preclinical evidence of neuroprotection by cholinesterase inhibitors." *Alzheimer Dis Assoc Disord* **20**(2 Suppl 1): S8-11.
- Akaike, A., Y. Takada-Takatori, T. Kume and Y. Izumi (2009). "Mechanisms of neuroprotective effects of nicotine and acetylcholinesterase inhibitors: role of alpha4 and alpha7 receptors in neuroprotection." *J Mol Neurosci* **40**(1-2): 211-216.
- Akaike, A., Y. Tamura, T. Yokota, S. Shimohama and J. Kimura (1994). "Nicotine-induced protection of cultured cortical neurons against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate cytotoxicity." *Brain Res* **644**(2): 181-187.
- Akasofu, S., T. Kosasa, M. Kimura and A. Kubota (2003). "Protective effect of donepezil in a primary culture of rat cortical neurons exposed to oxygen-glucose deprivation." *Eur J Pharmacol* **472**(1-2): 57-63.
- Andsberg, G., Z. Kokaia and O. Lindvall (2001). "Upregulation of p75 neurotrophin receptor after stroke in mice does not contribute to differential vulnerability of striatal neurons." *Exp Neurol* **169**(2): 351-363.
- Arantes, C., R. Nomizo, M. H. Lopes, G. N. Hajj, F. R. Lima and V. R. Martins (2009). "Prion protein and its ligand stress inducible protein 1 regulate astrocyte development." *Glia* **57**(13): 1439-1449.
- Arundine, M., G. K. Chopra, A. Wrong, S. Lei, M. M. Aarts, J. F. MacDonald and M. Tymianski (2003). "Enhanced vulnerability to NMDA toxicity in sublethal traumatic neuronal injury in vitro." *J Neurotrauma* **20**(12): 1377-1395.
- Barrett, K. M., T. G. Brott, R. D. Brown, Jr., R. E. Carter, J. R. Geske, N. R. Graff-Radford, R. B. McNeil and J. F. Meschia (2011). "Enhancing recovery after acute ischemic stroke with donepezil as an adjuvant therapy to standard medical care: results of a phase IIA clinical trial." *J Stroke Cerebrovasc Dis* **20**(3): 177-182.
- Baxter, M. G. and A. A. Chiba (1999). "Cognitive functions of the basal forebrain." *Curr Opin Neurobiol* **9**(2): 178-183.
- Beck, T., D. Lindholm, E. Castren and A. Wree (1994). "Brain-derived neurotrophic factor protects against ischemic cell damage in rat hippocampus." *J Cereb Blood Flow Metab* **14**(4): 689-692.
- Bederson, J. B., L. H. Pitts, M. Tsuji, M. C. Nishimura, R. L. Davis and H. Bartkowski (1986). "Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination." *Stroke* **17**(3): 472-476.
- Bejot, Y., C. Mossiat, M. Giroud, A. Prigent-Tessier and C. Marie (2011). "Circulating and brain BDNF levels in stroke rats. Relevance to clinical studies." *PLoS One* **6**(12): e29405.
- Beraldo, F. H., C. P. Arantes, T. G. Santos, N. G. Queiroz, K. Young, R. J. Rylett, R. P. Markus, M. A. Prado and V. R. Martins (2010). "Role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in calcium signaling induced by prion protein interaction with stress-inducible protein 1." *J Biol Chem* **285**(47): 36542-36550.
- Beurel, E., S. M. Michalek and R. S. Jope (2010). "Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3)." *Trends Immunol* **31**(1): 24-31.
- Bland, S. T., R. N. Pillai, J. Aronowski, J. C. Grotta and T. Schallert (2001). "Early overuse and disuse of the affected forelimb after moderately severe intraluminal suture occlusion of the middle cerebral artery in rats." *Behav Brain Res* **126**(1-2): 33-41.

- Blusztajn, J. K. and B. Berse (2000). "The cholinergic neuronal phenotype in Alzheimer's disease." Metab Brain Dis **15**(1): 45-64.
- Bouet, V., M. Boulouard, J. Toutain, D. Divoux, M. Bernaudin, P. Schumann-Bard and T. Freret (2009). "The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice." Nat Protoc **4**(10): 1560-1564.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Brandon, E. P., W. Lin, K. A. D'Amour, D. P. Pizzo, B. Dominguez, Y. Sugiura, S. Thode, C. P. Ko, L. J. Thal, F. H. Gage and K. F. Lee (2003). "Aberrant patterning of neuromuscular synapses in choline acetyltransferase-deficient mice." J Neurosci **23**(2): 539-549.
- Brasil, M. S. (2006). "Determinantes sociais da saúde." Painel de indicadores do SUS **1**.
- Braun, J. S., K. Prass, U. Dirnagl, A. Meisel and C. Meisel (2007). "Protection from brain damage and bacterial infection in murine stroke by the novel caspase-inhibitor Q-VD-OPH." Exp Neurol **206**(2): 183-191.
- Brown, D. A. (2006). "Acetylcholine." Br J Pharmacol **147 Suppl 1**: S120-126.
- Brown, D. R., W. J. Schulz-Schaeffer, B. Schmidt and H. A. Kretschmar (1997). "Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity." Exp Neurol **146**(1): 104-112.
- Brown, M. M. (2002). "Brain attack: a new approach to stroke." Clin. Med. **2**(1): 60-65.
- Cachope, R., Y. Mateo, B. N. Mathur, J. Irving, H. L. Wang, M. Morales, D. M. Lovinger and J. F. Cheer (2012). "Selective activation of cholinergic interneurons enhances accumbal phasic dopamine release: setting the tone for reward processing." Cell Rep **2**(1): 33-41.
- Caetano, F. A., M. H. Lopes, G. N. Hajj, C. F. Machado, C. Pinto Arantes, A. C. Magalhaes, P. Vieira Mde, T. A. Americo, A. R. Massensini, S. A. Priola, I. Vorberg, M. V. Gomez, R. Linden, V. F. Prado, V. R. Martins and M. A. Prado (2008). "Endocytosis of prion protein is required for ERK1/2 signaling induced by stress-inducible protein 1." J Neurosci **28**(26): 6691-6702.
- Carmichael, S. T. (2005). "Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose." NeuroRx **2**(3): 396-409.
- Chang, H. C., D. F. Nathan and S. Lindquist (1997). "In vivo analysis of the Hsp90 cochaperone Sti1 (p60)." Mol Cell Biol **17**(1): 318-325.
- Chaves, M. L. F. (2000). "Acidente vascular encefálico: conceituação e fatores de risco." Revista Brasileira de Hipertensão: 372-382.
- Chen, Y., E. Shohami, S. Constantini and M. Weinstock (1998). "Rivastigmine, a brain-selective acetylcholinesterase inhibitor, ameliorates cognitive and motor deficits induced by closed-head injury in the mouse." J Neurotrauma **15**(4): 231-237.
- Chiarini, L. B., A. R. Freitas, S. M. Zanata, R. R. Brentani, V. R. Martins and R. Linden (2002). "Cellular prion protein transduces neuroprotective signals." EMBO J **21**(13): 3317-3326.
- Conner, J. M., A. A. Chiba and M. H. Tuszynski (2005). "The basal forebrain cholinergic system is essential for cortical plasticity and functional recovery following brain injury." Neuron **46**(2): 173-179.
- Conner, J. M., A. Culbertson, C. Packowski, A. A. Chiba and M. H. Tuszynski (2003). "Lesions of the Basal forebrain cholinergic system impair task acquisition and abolish cortical plasticity associated with motor skill learning." Neuron **38**(5): 819-829.
- da Penha Berzaghi, M., J. Cooper, E. Castren, F. Zafra, M. Sofroniew, H. Thoenen and D. Lindholm (1993). "Cholinergic regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) but not neurotrophin-3 (NT-3) mRNA levels in the developing rat hippocampus." J Neurosci **13**(9): 3818-3826.
- Dale, H. (1914). "The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine." J Pharmacol Exp Ther **6**: 147-190.
- de Castro, B. M., X. De Jaeger, C. Martins-Silva, R. D. Lima, E. Amaral, C. Menezes, P. Lima, C. M. Neves, R. G. Pires, T. W. Gould, I. Welch, C. Kushmerick, C. Guatimosim, I. Izquierdo, M.

- Cammarota, R. J. Rylett, M. V. Gomez, M. G. Caron, R. W. Oppenheim, M. A. Prado and V. F. Prado (2009). "The vesicular acetylcholine transporter is required for neuromuscular development and function." *Mol Cell Biol* **29**(19): 5238-5250.
- de Jonge, W. J. and L. Ulloa (2007). "The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation." *Br J Pharmacol* **151**(7): 915-929.
- Deng, P., Y. Zhang and Z. C. Xu (2008). "Inhibition of Ih in striatal cholinergic interneurons early after transient forebrain ischemia." *J Cereb Blood Flow Metab* **28**(5): 939-947.
- Ding, Y., J. Li, Q. Lai, S. Azam, J. A. Rafols and F. G. Diaz (2002a). "Functional improvement after motor training is correlated with synaptic plasticity in rat thalamus." *Neurol Res* **24**(8): 829-836.
- Ding, Y., J. Li, X. Luan, Y. H. Ding, Q. Lai, J. A. Rafols, J. W. Phillis, J. C. Clark and F. G. Diaz (2004b). "Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin." *Neuroscience* **124**(3): 583-591.
- Ding, Y., Y. Zhou, Q. Lai, J. Li, H. Park and F. G. Diaz (2002b). "Impaired motor activity and motor learning function in rat with middle cerebral artery occlusion." *Behav Brain Res* **132**(1): 29-36.
- Donnelly-Roberts, D. L., I. C. Xue, S. P. Arneric and J. P. Sullivan (1996). "In vitro neuroprotective properties of the novel cholinergic channel activator (ChCA), ABT-418." *Brain Res* **719**(1-2): 36-44.
- Duris, K., A. Manaenko, H. Suzuki, W. B. Rolland, P. R. Krafft and J. H. Zhang (2011). "alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist PNU-282987 attenuates early brain injury in a perforation model of subarachnoid hemorrhage in rats." *Stroke* **42**(12): 3530-3536.
- Egea, J., A. O. Rosa, M. Sobrado, L. Gandia, M. G. Lopez and A. G. Garcia (2007). "Neuroprotection afforded by nicotine against oxygen and glucose deprivation in hippocampal slices is lost in alpha7 nicotinic receptor knockout mice." *Neuroscience* **145**(3): 866-872.
- Endres, M., G. Fan, L. Hirt, M. Fujii, K. Matsushita, X. Liu, R. Jaenisch and M. A. Moskowitz (2000). "Ischemic brain damage in mice after selectively modifying BDNF or NT4 gene expression." *J Cereb Blood Flow Metab* **20**(1): 139-144.
- English, D. F., O. Ibanez-Sandoval, E. Stark, F. Tecuapetla, G. Buzsaki, K. Deisseroth, J. M. Tepper and T. Koos (2012). "GABAergic circuits mediate the reinforcement-related signals of striatal cholinergic interneurons." *Nat Neurosci* **15**(1): 123-130.
- Ferguson, S. M., M. Bazalakova, V. Savchenko, J. C. Tapia, J. Wright and R. D. Blakely (2004). "Lethal impairment of cholinergic neurotransmission in hemicholinium-3-sensitive choline transporter knockout mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(23): 8762-8767.
- Fernandes, C. C., A. Pinto-Duarte, J. A. Ribeiro and A. M. Sebastiao (2008). "Postsynaptic action of brain-derived neurotrophic factor attenuates alpha7 nicotinic acetylcholine receptor-mediated responses in hippocampal interneurons." *J Neurosci* **28**(21): 5611-5618.
- Ferrer, I., J. Krupinski, E. Goutan, E. Marti, S. Ambrosio and E. Arenas (2001). "Brain-derived neurotrophic factor reduces cortical cell death by ischemia after middle cerebral artery occlusion in the rat." *Acta Neuropathol* **101**(3): 229-238.
- Feuerstein, G. Z. and X. Wang (2000). "Animal models of stroke." *Mol Med Today* **6**(3): 133-135.
- Freitas, G. R. E. K. N., J.; Haussen, S. R., F. N. Yamamoto, M.; Gagliardi, R. J.; e and S. B. d. D. Cerebrovasculares (2005). "Neuroproteção no acidente vascular cerebral." *Neuropsiquiatria*.
- Furukawa, S., H. Sameshima, L. Yang and T. Ikenoue (2011). "Acetylcholine receptor agonist reduces brain damage induced by hypoxia-ischemia in newborn rats." *Reprod Sci* **18**(2): 172-179.
- Gabriel, A. F., M. A. Marcus, W. M. Honig, G. H. Walenkamp and E. A. Joosten (2007). "The CatWalk method: a detailed analysis of behavioral changes after acute inflammatory pain in the rat." *J Neurosci Methods* **163**(1): 9-16.

- Gabriel, A. F., M. A. Marcus, G. H. Walenkamp and E. A. Joosten (2009). "The CatWalk method: assessment of mechanical allodynia in experimental chronic pain." Behav Brain Res **198**(2): 477-480.
- Gahring, L. C., E. L. Meyer and S. W. Rogers (2003). "Nicotine-induced neuroprotection against N-methyl-D-aspartic acid or beta-amyloid peptide occur through independent mechanisms distinguished by pro-inflammatory cytokines." J Neurochem **87**(5): 1125-1136.
- Gert, T., R. W. M. Hautvast, M. J. De Jongste and J. e KORF (1997). "Neuroanatomy of cardiac activity regulating circuitry; a transneuronal viral tracing study in the rat." Eur. J. Neuroscience **8**: 101-113.
- Gold, P. E. (2003). "Acetylcholine: cognitive and brain functions." Neurobiol Learn Mem **80**(3): 177.
- Goldlust, E. J., R. P. Paczynski, Y. Y. He, C. Y. Hsu and M. P. Goldberg (1996). "Automated measurement of infarct size with scanned images of triphenyltetrazolium chloride-stained rat brains." Stroke **27**(9): 1657-1662.
- Gomez, J., H. Shannon, E. Kostenis, C. Felder, L. Zhang, J. Brodtkin, A. Grinberg, H. Sheng and J. Wess (1999). "Pronounced pharmacologic deficits in M2 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(4): 1692-1697.
- Grade, S., Y. C. Weng, M. Snapyan, J. Kriz, J. O. Malva and A. Saghatelian (2013). "Brain-derived neurotrophic factor promotes vasculature-associated migration of neuronal precursors toward the ischemic striatum." PLoS One **8**(1): e55039.
- Grahn, J. A., J. A. Parkinson and A. M. Owen (2008). "The cognitive functions of the caudate nucleus." Prog Neurobiol **86**(3): 141-155.
- Gras, C., B. Amilhon, E. M. Lepicard, O. Poirel, J. Vinatier, M. Herbin, S. Dumas, E. T. Tzavara, M. R. Wade, G. G. Nomikos, N. Hanoun, F. Saurini, M. L. Kemel, B. Gasnier, B. Giros and S. El Mestikawy (2008). "The vesicular glutamate transporter VGLUT3 synergizes striatal acetylcholine tone." Nat Neurosci **11**(3): 292-300.
- Green, D. (2003). "Diagnosis, prevalence, and management of thromboembolism in patients with spinal cord injury." J Spinal Cord Med **26**(4): 329-334.
- Greferath, U., C. Mallard, E. Roufail, S. M. Rees, G. L. Barrett and P. F. Bartlett (2002). "Expression of the p75 neurotrophin receptor by striatal cholinergic neurons following global ischemia in rats is associated with neuronal degeneration." Neurosci Lett **332**(1): 57-60.
- Guzman, M. S., X. De Jaeger, S. Raulic, I. A. Souza, A. X. Li, S. Schmid, R. S. Menon, R. R. Gainetdinov, M. G. Caron, R. Bartha, V. F. Prado and M. A. Prado (2011). "Elimination of the vesicular acetylcholine transporter in the striatum reveals regulation of behaviour by cholinergic-glutamatergic co-transmission." PLoS Biol **9**(11): e1001194.
- Hajj, G. N., T. G. Santos, Z. S. Cook and V. R. Martins (2009). "Developmental expression of prion protein and its ligands stress-inducible protein 1 and vitronectin." J Comp Neurol **517**(3): 371-384.
- Hallenbeck, J. M. and A. J. Dutka (1990). "Background review and current concepts of reperfusion injury." Arch Neurol **47**(11): 1245-1254.
- Harris, D. A. (1999b). "Cellular biology of prion diseases." Clin Microbiol Rev **12**(3): 429-444.
- Hejmadi, M. V., F. Dajas-Bailador, S. M. Barnes, B. Jones and S. Wonnacott (2003). "Neuroprotection by nicotine against hypoxia-induced apoptosis in cortical cultures involves activation of multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes." Mol Cell Neurosci **24**(3): 779-786.
- Hepler, D. J., G. L. Wenk, B. L. Cribbs, D. S. Olton and J. T. Coyle (1985). "Memory impairments following basal forebrain lesions." Brain Res **346**(1): 8-14.
- Higley, M. J., A. H. Gittis, I. A. Oldenburg, N. Balthasar, R. P. Seal, R. H. Edwards, B. B. Lowell, A. C. Kreitzer and B. L. Sabatini (2011). "Cholinergic interneurons mediate fast VGLUT3-dependent glutamatergic transmission in the striatum." PLoS One **6**(4): e19155.
- Hossmann, K. A. (1998). "Experimental models for the investigation of brain ischemia." Cardiovasc.Res. **39**(1): 106-120.

- Hossmann, K. A. (1998). "Experimental models for the investigation of brain ischemia." Cardiovasc Res **39**(1): 106-120.
- Hossmann, K. A. (2006). "Pathophysiology and therapy of experimental stroke." Cell Mol Neurobiol **26**(7-8): 1057-1083.
- Hsu, J. C., L. Zhang, M. C. Wallace and J. H. Eubanks (1996). "Cerebral ischemia alters the regional hippocampal expression of the rat m1 muscarinic acetylcholine receptor gene." Neurosci Lett **219**(2): 87-90.
- Hudgins, W. R. and J. H. Garcia (1970). "Transorbital approach to the middle cerebral artery of the squirrel monkey: a technique for experimental cerebral infarction applicable to ultrastructural studies." Stroke **1**(2): 107-111.
- Hunter, A. J., J. Hatcher, D. Virley, P. Nelson, E. Irving, S. J. Hadingham and A. A. Parsons (2000). "Functional assessments in mice and rats after focal stroke." Neuropharmacology **39**(5): 806-816.
- Jang, S. H., B. S. Han, Y. Chang, W. M. Byun, J. Lee and S. H. Ahn (2002). "Functional MRI evidence for motor cortex reorganization adjacent to a lesion in a primary motor cortex." Am J Phys Med Rehabil **81**(11): 844-847.
- Johansson, J., E. Formaggio, G. Fumagalli and C. Chiamulera (2009). "Choline up-regulates BDNF and down-regulates TrkB neurotrophin receptor in rat cortical cell culture." Neuroreport **20**(9): 828-832.
- Jope, R. S., C. J. Yuskaitis and E. Beurel (2007). "Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics." Neurochem Res **32**(4-5): 577-595.
- Kadam, S. D., J. D. Mulholland, D. R. Smith, M. V. Johnston and A. M. Comi (2009). "Chronic brain injury and behavioral impairments in a mouse model of term neonatal strokes." Behav Brain Res **197**(1): 77-83.
- Kaneko, N., H. Okano and K. Sawamoto (2006). "Role of the cholinergic system in regulating survival of newborn neurons in the adult mouse dentate gyrus and olfactory bulb." Genes Cells **11**(10): 1145-1159.
- Kaneko, S., T. Maeda, T. Kume, H. Kochiyama, A. Akaike, S. Shimohama and J. Kimura (1997). "Nicotine protects cultured cortical neurons against glutamate-induced cytotoxicity via alpha7-neuronal receptors and neuronal CNS receptors." Brain Res **765**(1): 135-140.
- Kass, I. S. and P. Lipton (1982). "Mechanisms involved in irreversible anoxic damage to the in vitro rat hippocampal slice." J Physiol **332**: 459-472.
- Kawaguchi, Y. (1993). "Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum." J Neurosci **13**(11): 4908-4923.
- Kidwell, C. S., D. S. Liebeskind, S. Starkman and J. L. Saver (2001). "Trends in acute ischemic stroke trials through the 20th century." Stroke **32**(6): 1349-1359.
- Kihara, T., S. Shimohama, H. Sawada, K. Honda, T. Nakamizo, H. Shibasaki, T. Kume and A. Akaike (2001). "alpha 7 nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block A beta-amyloid-induced neurotoxicity." J Biol Chem **276**(17): 13541-13546.
- Kihara, T., S. Shimohama, H. Sawada, J. Kimura, T. Kume, H. Kochiyama, T. Maeda and A. Akaike (1997). "Nicotinic receptor stimulation protects neurons against beta-amyloid toxicity." Ann Neurol **42**(2): 159-163.
- Kitagawa, K., M. Matsumoto, Y. Tsujimoto, T. Ohtsuki, K. Kuwabara, K. Matsushita, G. Yang, H. Tanabe, J. C. Martinou, M. Hori and T. Yanagihara (1998). "Amelioration of hippocampal neuronal damage after global ischemia by neuronal overexpression of BCL-2 in transgenic mice." Stroke **29**(12): 2616-2621.
- Kobayashi, Y., T. Okuda, Y. Fujioka, G. Matsumura, Y. Nishimura and T. Haga (2002). "Distribution of the high-affinity choline transporter in the human and macaque monkey spinal cord." Neurosci Lett **317**(1): 25-28.
- Kothari, M. J. (2004). "Myasthenia gravis." J Am Osteopath Assoc **104**(9): 377-384.

- Krafft, P. R., O. Altay, W. B. Rolland, K. Duris, T. Lekic, J. Tang and J. H. Zhang (2012). "alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonism confers neuroprotection through GSK-3beta inhibition in a mouse model of intracerebral hemorrhage." *Stroke* **43**(3): 844-850.
- Kurozumi, K., K. Nakamura, T. Tamiya, Y. Kawano, M. Kobune, S. Hirai, H. Uchida, K. Sasaki, Y. Ito, K. Kato, O. Honmou, K. Houkin, I. Date and H. Hamada (2004). "BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model." *Mol Ther* **9**(2): 189-197.
- Kutsuna, S., R. Tsuruta, M. Fujita, M. Todani, T. Yagi, Y. Ogino, M. Igarashi, K. Takahashi, T. Izumi, S. Kasaoka, M. Yuasa and T. Maekawa (2010). "Cholinergic agonist physostigmine suppresses excessive superoxide anion radical generation in blood, oxidative stress, early inflammation, and endothelial injury in rats with forebrain ischemia/reperfusion." *Brain Res* **1313**: 242-249.
- Lakhan, S. E., A. Kirchgessner and M. Hofer (2009). "Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches." *J Transl Med* **7**: 97.
- Lara, A., D. D. Damasceno, R. Pires, R. Gros, E. R. Gomes, M. Gavioli, R. F. Lima, D. Guimaraes, P. Lima, C. R. Bueno, Jr., A. Vasconcelos, D. Roman-Campos, C. A. Menezes, R. A. Sirvente, V. M. Salemi, C. Mady, M. G. Caron, A. J. Ferreira, P. C. Brum, R. R. Resende, J. S. Cruz, M. V. Gomez, V. F. Prado, A. P. de Almeida, M. A. Prado and S. Guatimosim (2010). "Dysautonomia due to reduced cholinergic neurotransmission causes cardiac remodeling and heart failure." *Mol Cell Biol* **30**(7): 1746-1756.
- Larsson, E., O. Lindvall and Z. Kokaia (2001). "Stereological assessment of vulnerability of immunocytochemically identified striatal and hippocampal neurons after global cerebral ischemia in rats." *Brain Res* **913**(2): 117-132.
- Lee, K. S., R. Linden, M. A. Prado, R. R. Brentani and V. R. Martins (2003). "Towards cellular receptors for prions." *Rev Med Virol* **13**(6): 399-408.
- Levey, A. I. (1993). "Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain." *Life Sci* **52**(5-6): 441-448.
- Levey, A. I., S. M. Edmunds, V. Koliatsos, R. G. Wiley and C. J. Heilman (1995). "Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation." *J Neurosci* **15**(5 Pt 2): 4077-4092.
- Lima, F. R., C. P. Arantes, A. G. Muras, R. Nomizo, R. R. Brentani and V. R. Martins (2007). "Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation." *J Neurochem* **103**(6): 2164-2176.
- Linden, R., V. R. Martins, M. A. Prado, M. Cammarota, I. Izquierdo and R. R. Brentani (2008). "Physiology of the prion protein." *Physiol Rev* **88**(2): 673-728.
- Lipton, P. (1999). "Ischemic cell death in brain neurons." *Physiol Rev* **79**(4): 1431-1568.
- Liu, Q. and B. Zhao (2004). "Nicotine attenuates beta-amyloid peptide-induced neurotoxicity, free radical and calcium accumulation in hippocampal neuronal cultures." *Br J Pharmacol* **141**(4): 746-754.
- Longa, E. Z., P. R. Weinstein, S. Carlson and R. Cummins (1989). "Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats." *Stroke* **20**(1): 84-91.
- Longshaw, V. M., J. P. Chapple, M. S. Balda, M. E. Cheetham and G. L. Blatch (2004). "Nuclear translocation of the Hsp70/Hsp90 organizing protein mSTI1 is regulated by cell cycle kinases." *J Cell Sci* **117**(Pt 5): 701-710.
- Longshaw, V. M., H. W. Dirr, G. L. Blatch and M. Lasse (2000). "The in vitro phosphorylation of the co-chaperone mSTI1 by cell cycle kinases substantiates a predicted casein kinase II-p34cdc2-NLS (CcN) motif." *Biol Chem* **381**(11): 1133-1138.
- Lopes, M. H., G. N. Hajj, A. G. Muras, G. L. Mancini, R. M. Castro, K. C. Ribeiro, R. R. Brentani, R. Linden and V. R. Martins (2005). "Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways." *J Neurosci* **25**(49): 11330-11339.

- Lotufo, P. A. (2000). "Increasing obesity in Brazil: predicting a new peak of cardiovascular mortality." Sao Paulo Med J **118**(6): 161-162.
- Lotufo, P. A. (2005). "Stroke in Brazil: a neglected disease." Sao Paulo Med J. **123**(1): 3-4.
- Lubjuhn, J., A. Gastens, G. von Wilpert, P. Bargiotas, O. Herrmann, S. Murikinati, T. Rabie, H. H. Marti, I. Amende, T. G. Hampton and M. Schwaninger (2009). "Functional testing in a mouse stroke model induced by occlusion of the distal middle cerebral artery." J Neurosci Methods **184**(1): 95-103.
- Macrae, I. M. (2011). "Predinical stroke research--advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia." Br J Pharmacol **164**(4): 1062-1078.
- Martins, V. R., F. H. Beraldo, G. N. Hajj, M. H. Lopes, K. S. Lee, M. M. Prado and R. Linden "Prion protein: orchestrating neurotrophic activities." Curr Issues Mol Biol **12**(2): 63-86.
- Martins-Silva, C., X. De Jaeger, M. S. Guzman, R. D. Lima, M. S. Santos, C. Kushmerick, M. V. Gomez, M. G. Caron, M. A. Prado and V. F. Prado (2011). "Novel strains of mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter: insights on transcriptional regulation and control of locomotor behavior." PLoS One **6**(3): e17611.
- Martyn, A. C., X. De Jaeger, A. C. Magalhaes, R. Kesarwani, D. F. Goncalves, S. Raulic, M. S. Guzman, M. F. Jackson, I. Izquierdo, J. F. Macdonald, M. A. Prado and V. F. Prado (2012). "Elimination of the vesicular acetylcholine transporter in the forebrain causes hyperactivity and deficits in spatial memory and long-term potentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(43): 17651-17656.
- Massey, K. A., W. M. Zago and D. K. Berg (2006). "BDNF up-regulates alpha7 nicotinic acetylcholine receptor levels on subpopulations of hippocampal interneurons." Mol Cell Neurosci **33**(4): 381-388.
- McClellan, A. J. and J. Frydman (2001). "Molecular chaperones and the art of recognizing a lost cause." Nat Cell Biol **3**(2): E51-53.
- Meisel, C., K. Prass, J. Braun, I. Victorov, T. Wolf, D. Megow, E. Halle, H. D. Volk, U. Dimagl and A. Meisel (2004). "Preventive antibacterial treatment improves the general medical and neurological outcome in a mouse model of stroke." Stroke **35**(1): 2-6.
- Memezawa, H., M. L. Smith and B. K. Siesjo (1992). "Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats." Stroke **23**(4): 552-559.
- Mesulam, M. M. (1995). "Structure and function of cholinergic pathways in the cerebral cortex, limbic system, basal ganglia, and thalamus of the human brain." Psychopharmacology: The fourth generation of progress: 135-146.
- Mesulam, M. M., E. J. Mufson, A. I. Levey and B. H. Wainer (1983). "Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey." J Comp Neurol **214**(2): 170-197.
- Mesulam, M. M., E. J. Mufson, B. H. Wainer and A. I. Levey (1983). "Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6)." Neuroscience **10**(4): 1185-1201.
- Middleton, F. A. and P. L. Strick (2000). "Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits." Brain Res Brain Res Rev **31**(2-3): 236-250.
- Milesion, B. E. and R. D. Schwartz (1991). "The use of locomotor activity as a behavioral screen for neuronal damage following transient forebrain ischemia in gerbils." Neurosci Lett **128**(1): 71-76.
- Min, D., X. Mao, K. Wu, Y. Cao, F. Guo, S. Zhu, N. Xie, L. Wang, T. Chen, C. Shaw and J. Cai (2012). "Donepezil attenuates hippocampal neuronal damage and cognitive deficits after global cerebral ischemia in gerbils." Neurosci Lett **510**(1): 29-33.
- Mink, J. (1999). Basal ganglia. San Diego, Academic Press.
- Misawa, H., K. Nakata, J. Matsuura, M. Nagao, T. Okuda and T. Haga (2001). "Distribution of the high-affinity choline transporter in the central nervous system of the rat." Neuroscience **105**(1): 87-98.

- Misgeld, T., R. W. Burgess, R. M. Lewis, J. M. Cunningham, J. W. Lichtman and J. R. Sanes (2002). "Roles of neurotransmitter in synapse formation: development of neuromuscular junctions lacking choline acetyltransferase." *Neuron* **36**(4): 635-648.
- Miwa, J. M., R. Freedman and H. A. Lester (2011). "Neural systems governed by nicotinic acetylcholine receptors: emerging hypotheses." *Neuron* **70**(1): 20-33.
- Modo, M. (2009). "Long-term survival and serial assessment of stroke damage and recovery - practical and methodological considerations." *J Exp Stroke Transl Med* **2**(2): 52-68.
- Modo, M., R. P. Stroemer, E. Tang, T. Veizovic, P. Sowniski and H. Hodges (2000). "Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion." *J Neurosci Methods* **104**(1): 99-109.
- Moreau, P. H., B. Cosquer, H. Jeltsch, J. C. Cassel and C. Mathis (2008). "Neuroanatomical and behavioral effects of a novel version of the cholinergic immunotoxin mu p75-saporin in mice." *Hippocampus* **18**(6): 610-622.
- Mullonkal, C. J. and L. H. Toledo-Pereyra (2007). "Akt in ischemia and reperfusion." *J Invest Surg* **20**(3): 195-203.
- Navakkode, S. and M. Korte (2012). "Cooperation between cholinergic and glutamatergic receptors are essential to induce BDNF-dependent long-lasting memory storage." *Hippocampus* **22**(2): 335-346.
- Nicolet, C. M. and E. A. Craig (1989). "Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **9**(9): 3638-3646.
- Nikolova, S., S. Moyanova, S. Hughes, M. Bellyou-Camilleri, T. Y. Lee and R. Bartha (2009). "Endothelin-1 induced MCAO: dose dependency of cerebral blood flow." *J Neurosci Methods* **179**(1): 22-28.
- Noshita, N., A. Lewen, T. Sugawara and P. H. Chan (2001). "Evidence of phosphorylation of Akt and neuronal survival after transient focal cerebral ischemia in mice." *J Cereb Blood Flow Metab* **21**(12): 1442-1450.
- O'Brien, M. D. and A. G. Waltz (1973). "Transorbital approach for occluding the middle cerebral artery without craniectomy." *Stroke* **4**(2): 201-206.
- O'Neill, L. A. (2002). "Is there a novel brain interleukin 1 receptor that signals ischaemic brain damage?" *Trends Pharmacol Sci* **23**(3): 109-110.
- Okuda, T. and T. Haga (2000). "Functional characterization of the human high-affinity choline transporter." *FEBS Lett* **484**(2): 92-97.
- Pavlov, V. A. (2008). "Cholinergic modulation of inflammation." *Int J Clin Exp Med* **1**(3): 203-212.
- Pepeu, G. and M. G. Giovannini (2004). "Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes." *Learn Mem* **11**(1): 21-27.
- Prado, M. A., R. A. Reis, V. F. Prado, M. C. de Mello, M. V. Gomez and F. G. de Mello (2002). "Regulation of acetylcholine synthesis and storage." *Neurochem Int* **41**(5): 291-299.
- Prado, V. F., C. Martins-Silva, B. M. de Castro, R. F. Lima, D. M. Barros, E. Amaral, A. J. Ramsey, T. D. Sotnikova, M. R. Ramirez, H. G. Kim, J. I. Rossato, J. Koenen, H. Quan, V. R. Cota, M. F. Moraes, M. V. Gomez, C. Guatimosim, W. C. Wetzel, C. Kushmerick, G. S. Pereira, R. R. Gainetdinov, I. Izquierdo, M. G. Caron and M. A. Prado (2006). "Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition." *Neuron* **51**(5): 601-612.
- Prado, V. F., A. Roy, B. Kolisnyk, R. Gros and M. A. Prado (2013). "Regulation of cholinergic activity by the vesicular acetylcholine transporter." *Biochem J* **450**(2): 265-274.
- Prusiner, S. B. (1982a). "Research on scrapie." *Lancet* **2**(8296): 494-495.
- Prusiner, S. B. (1982b). "Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie." *Science* **216**(4542): 136-144.
- Prusiner, S. B. (1991b). "Molecular biology and transgenetics of prion diseases." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **26**(5-6): 397-438.
- Prusiner, S. B. (1998). "The prion diseases." *Brain Pathol* **8**(3): 499-513.

- Pulsinelli, W. A., J. B. Brierley and F. Plum (1982). "Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia." *Ann Neurol* **11**(5): 491-498.
- Resende, R. R. and A. Adhikari (2009). "Cholinergic receptor pathways involved in apoptosis, cell proliferation and neuronal differentiation." *Cell Commun Signal* **7**(20).
- Ribeiro, F. M., S. A. Black, V. F. Prado, R. J. Rylett, S. S. Ferguson and M. A. Prado (2006). "The "ins" and "outs" of the high-affinity choline transporter CHT1." *J Neurochem* **97**(1): 1-12.
- Riek-Burchardt, M., P. Henrich-Noack, G. A. Metz and K. G. Reymann (2004). "Detection of chronic sensorimotor impairments in the ladder rung walking task in rats with endothelin-1-induced mild focal ischemia." *J Neurosci Methods* **137**(2): 227-233.
- Roffe, M., F. H. Beraldo, R. Bester, M. Nunziante, C. Bach, G. Mancini, S. Gilch, I. Vorberg, B. A. Castilho, V. R. Martins and G. N. Hajj (2010). "Prion protein interaction with stress-inducible protein 1 enhances neuronal protein synthesis via mTOR." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(29): 13147-13152.
- Roger, V. L., A. S. Go, D. M. Lloyd-Jones, R. J. Adams, J. D. Berry, T. M. Brown, M. R. Carnethon, S. Dai, G. de Simone, E. S. Ford, C. S. Fox, H. J. Fullerton, C. Gillespie, K. J. Greenlund, S. M. Hailpern, J. A. Heit, P. M. Ho, V. J. Howard, B. M. Kissela, S. J. Kittner, D. T. Lackland, J. H. Lichtman, L. D. Lisabeth, D. M. Makuc, G. M. Marcus, A. Marelli, D. B. Matchar, M. M. McDermott, J. B. Meigs, C. S. Moy, D. Mozaffarian, M. E. Mussolino, G. Nichol, N. P. Paynter, W. D. Rosamond, P. D. Sorlie, R. S. Stafford, T. N. Turan, M. B. Turner, N. D. Wong and J. Wylie-Rosett (2011). "Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association." *Circulation* **123**(4): e18-e209.
- Roghani, A., A. Shirzadi, S. A. Kohan, R. H. Edwards and L. L. Butcher (1996). "Differential distribution of the putative vesicular transporter for acetylcholine in the rat central nervous system." *Brain Res Mol Brain Res* **43**(1-2): 65-76.
- Rothman, S. M. (1983). "Synaptic activity mediates death of hypoxic neurons." *Science* **220**(4596): 536-537.
- Rylett, R. J. and L. R. Williams (1994). "Role of neurotrophins in cholinergic-neurone function in the adult and aged CNS." *Trends Neurosci* **17**(11): 486-490.
- Sadoshima, S., S. Ibayashi, K. Fujii, T. Nagao, H. Sugimori and M. Fujishima (1995). "Inhibition of acetylcholinesterase modulates the autoregulation of cerebral blood flow and attenuates ischemic brain metabolism in hypertensive rats." *J Cereb Blood Flow Metab* **15**(5): 845-851.
- Sakuma, M., N. Hyakawa, H. Kato and T. Araki (2008). "Time dependent changes of striatal interneurons after focal cerebral ischemia in rats." *J Neural Transm* **115**(3): 413-422.
- Salas, R., A. Orr-Urtreger, R. S. Broide, A. Beaudet, R. Paylor and M. De Biasi (2003). "The nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha 5 mediates short-term effects of nicotine in vivo." *Mol Pharmacol* **63**(5): 1059-1066.
- Sales, N., R. Hassig, K. Rodolfo, L. Di Giamberardino, E. Traiffort, M. Ruat, P. Fretier and K. L. Moya (2002). "Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons." *Eur J Neurosci* **15**(7): 1163-1177.
- Santos, T. G., I. R. Silva, B. Costa-Silva, A. P. Lepique, V. R. Martins and M. H. Lopes (2011). "Enhanced neural progenitor/stem cells self-renewal via the interaction of stress-inducible protein 1 with the prion protein." *Stem Cells* **29**(7): 1126-1136.
- Sayas, C. L., A. Ariaens, B. Ponsioen and W. H. Moolenaar (2006). "GSK-3 is activated by the tyrosine kinase Pyk2 during LPA1-mediated neurite retraction." *Mol Biol Cell* **17**(4): 1834-1844.
- Schafer, M. K., L. E. Eiden and E. Weihe (1998). "Cholinergic neurons and terminal fields revealed by immunohistochemistry for the vesicular acetylcholine transporter. II. The peripheral nervous system." *Neuroscience* **84**(2): 361-376.
- Scremin, O. U., M. G. Li, A. M. Scremin and D. J. Jenden (1997). "Cholinesterase inhibition improves blood flow in the ischemic cerebral cortex." *Brain Res Bull* **42**(1): 59-70.
- Shen, H. and Y. Wang "Correlation of locomotor activity and brain infarction in rats with transient focal ischemia." *J Neurosci Methods* **186**(2): 150-154.

- Shimohama, S., D. L. Greenwald, D. H. Shafron, A. Akaika, T. Maeda, S. Kaneko, J. Kimura, C. E. Simpkins, A. L. Day and E. M. Meyer (1998). "Nicotinic alpha 7 receptors protect against glutamate neurotoxicity and neuronal ischemic damage." *Brain Res* **779**(1-2): 359-363.
- Shytle, R. D., T. Mori, K. Townsend, M. Vendrame, N. Sun, J. Zeng, J. Ehrhart, A. A. Silver, P. R. Sanberg and J. Tan (2004). "Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors." *J Neurochem* **89**(2): 337-343.
- Song, H. O., W. Lee, K. An, H. S. Lee, J. H. Cho, Z. Y. Park and J. Ahnn (2009). "C. elegans STI-1, the homolog of Sti1/Hop, is involved in aging and stress response." *J Mol Biol* **390**(4): 604-617.
- Song, Y. and D. C. Masison (2005). "Independent regulation of Hsp70 and Hsp90 chaperones by Hsp70/Hsp90-organizing protein Sti1 (Hop1)." *J Biol Chem* **280**(40): 34178-34185.
- Spudich, A., R. Frigg, E. Kilic, U. Kilic, B. Oesch, A. Raeber, C. L. Bassetti and D. M. Hermann (2005). "Aggravation of ischemic brain injury by prion protein deficiency: role of ERK-1/-2 and STAT-1." *Neurobiol Dis* **20**(2): 442-449.
- Stahl, N., D. R. Borchelt, K. Hsiao and S. B. Prusiner (1987). "Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid." *Cell* **51**(2): 229-240.
- Stevens, T. R., S. R. Krueger, R. M. Fitzsimonds and M. R. Picciotto (2003). "Neuroprotection by nicotine in mouse primary cortical cultures involves activation of calcineurin and L-type calcium channel inactivation." *J Neurosci* **23**(31): 10093-10099.
- Sudhof, T. C. (2004). "The synaptic vesicle cycle." *Annu Rev Neurosci* **27**: 509-547.
- Sun, B., L. Chen, X. Wei, Y. Xiang, X. Liu and X. Zhang (2011). "The Akt/GSK-3beta pathway mediates flurbiprofen-induced neuroprotection against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats." *Biochem Biophys Res Commun* **409**(4): 808-813.
- Sun, X., Y. Liu, G. Hu and H. Wang (2004). "Protective effects of nicotine against glutamate-induced neurotoxicity in PC12 cells." *Cell Mol Biol Lett* **9**(3): 409-422.
- SUS (2010). "Ministério da Saúde."
- Takada-Takatori, Y., T. Kume, M. Sugimoto, H. Katsuki, H. Sugimoto and A. Akaike (2006). "Acetylcholinesterase inhibitors used in treatment of Alzheimer's disease prevent glutamate neurotoxicity via nicotinic acetylcholine receptors and phosphatidylinositol 3-kinase cascade." *Neuropharmacology* **51**(3): 474-486.
- Takarada, T., N. Nakamichi, H. Kawagoe, M. Ogura, R. Fukumori, R. Nakazato, K. Fujikawa, M. Kou and Y. Yoneda (2012). "Possible neuroprotective property of nicotinic acetylcholine receptors in association with predominant upregulation of glial cell line-derived neurotrophic factor in astrocytes." *J Neurosci Res* **90**(11): 2074-2085.
- Threlfell, S., T. Lalic, N. J. Platt, K. A. Jennings, K. Deisseroth and S. J. Cragg (2012). "Striatal dopamine release is triggered by synchronized activity in cholinergic interneurons." *Neuron* **75**(1): 58-64.
- Towbin, M., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate--polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibodies and radio-iodinated protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 43-50.
- Turner, R. C., S. C. Dodson, C. L. Rosen and J. D. Huber (2013). "The science of cerebral ischemia and the quest for neuroprotection: navigating past failure to future success." *J Neurosurg*.
- Vandeputte, C., J. M. Taymans, C. Casteels, F. Coun, Y. Ni, K. Van Laere and V. Baekelandt (2010). "Automated quantitative gait analysis in animal models of movement disorders." *BMC Neurosci* **11**: 92.
- Ventura, A. L., P. A. Abreu, R. C. Freitas, P. C. Sathler, N. Loureiro and H. C. Castro (2010). "Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação ea relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo:[revisão]." *Rev. psiquiatr. clín.* **37**(2): 66-72.
- Wang, H., Y. Han and B. Wu (2002). "Roles of protein kinase C and inositol(1,4,5)-trisphosphate in the pathogenesis of hypoxic- ischemic brain injury in neonatal rats." *Chin Med J (Engl)* **115**(6): 829-832.

- Wang, H., M. Yu, M. Ochani, C. A. Amella, M. Tanovic, S. Susarla, J. H. Li, H. Yang, L. Ulloa, Y. Al-Abed, C. J. Czura and K. J. Tracey (2003). "Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation." *Nature* **421**(6921): 384-388.
- Wang, Z., L. Kai, M. Day, J. Ronesi, H. H. Yin, J. Ding, T. Tkatch, D. M. Lovinger and D. J. Surmeier (2006). "Dopaminergic control of corticostriatal long-term synaptic depression in medium spiny neurons is mediated by cholinergic interneurons." *Neuron* **50**(3): 443-452.
- Wang, Z. F., J. Wang, H. Y. Zhang and X. C. Tang (2008). "Huperzine A exhibits anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat model of transient focal cerebral ischemia." *J Neurochem* **106**(4): 1594-1603.
- Weise, J., R. Sandau, S. Schwarting, O. Crome, A. Wrede, W. Schulz-Schaeffer, I. Zerr and M. Bahr (2006). "Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury." *Stroke* **37**(5): 1296-1300.
- White, A. R., S. J. Collins, F. Maher, M. F. Jobling, L. R. Stewart, J. M. Thyer, K. Beyreuther, C. L. Masters and R. Cappai (1999). "Prion protein-deficient neurons reveal lower glutathione reductase activity and increased susceptibility to hydrogen peroxide toxicity." *Am J Pathol* **155**(5): 1723-1730.
- White, B. C., J. M. Sullivan, D. J. DeGracia, B. J. O'Neil, R. W. Neumar, L. I. Grossman, J. A. Rafols and G. S. Krause (2000). "Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury." *J Neurol Sci* **179**(S 1-2): 1-33.
- Williams, M. J. and B. Adinoff (2008). "The role of acetylcholine in cocaine addiction." *Neuropsychopharmacology* **33**(8): 1779-1797.
- Willing, A. E., L. Jiang, P. Nowicki, S. Poulos, M. Milliken, D. W. Cahill and P. R. Sanberg (2002). "Effects of middle cerebral artery occlusion on spontaneous activity and cognitive function in rats." *Int J Neurosci* **112**(5): 503-516.
- Winstein, C. J., A. S. Merians and K. J. Sullivan (1999). "Motor learning after unilateral brain damage." *Neuropsychologia* **37**(8): 975-987.
- Wise, P. M., D. B. Dubal, S. W. Rau, C. M. Brown and S. Suzuki (2005). "Are estrogens protective or risk factors in brain injury and neurodegeneration? Reevaluation after the Women's health initiative." *Endocr Rev* **26**(3): 308-312.
- Wise, P. M., D. B. Dubal, M. E. Wilson, S. W. Rau, M. Bottner and K. L. Rosewell (2001). "Estradiol is a protective factor in the adult and aging brain: understanding of mechanisms derived from in vivo and in vitro studies." *Brain Res Brain Res Rev* **37**(1-3): 313-319.
- Woolf, N. J. (1991). "Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord." *Prog Neurobiol* **37**(6): 475-524.
- Yakel, J. L. (2013). "Cholinergic receptors: functional role of nicotinic ACh receptors in brain circuits and disease." *Pflugers Arch*.
- Yamada, M., K. G. Lamping, A. Duttaroy, W. Zhang, Y. Cui, F. P. Bymaster, D. L. McKinzie, C. C. Felder, C. X. Deng, F. M. Faraci and J. Wess (2001a). "Cholinergic dilation of cerebral blood vessels is abolished in M(5) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24): 14096-14101.
- Yamada, M., T. Miyakawa, A. Duttaroy, A. Yamanaka, T. Moriguchi, R. Makita, M. Ogawa, C. J. Chou, B. Xia, J. N. Crawley, C. C. Felder, C. X. Deng and J. Wess (2001b). "Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean." *Nature* **410**(6825): 207-212.
- Zanata, S. M., M. H. Lopes, A. F. Mercadante, G. N. Hajj, L. B. Chiarini, R. Nomizo, A. R. Freitas, A. L. Cabral, K. S. Lee, M. A. Juliano, E. de Oliveira, S. G. Jachieri, A. Burlingame, L. Huang, R. Linden, R. R. Brentani and V. R. Martins (2002). "Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection." *EMBO J* **21**(13): 3307-3316.
- Zhang, Y. and W. M. Pardridge (2001). "Conjugation of brain-derived neurotrophic factor to a blood-brain barrier drug targeting system enables neuroprotection in regional brain ischemia following intravenous injection of the neurotrophin." *Brain Res* **889**(1-2): 49-56.

- Zhang, Y., X. Wei, L. Liu, S. Liu, Z. Wang, B. Zhang, B. Fan, F. Yang, S. Huang, F. Jiang, Y. H. Chen and F. Yi (2012). "TIPE2, a novel regulator of immunity, protects against experimental stroke." J Biol Chem **287**(39): 32546-32555.
- Zhao, Y., J. Dou, J. Luo, W. Li, H. H. Chan, W. Cui, H. Zhang, R. Han, P. R. Carlier, X. Zhang and Y. Han (2011). "Neuroprotection against excitotoxic and ischemic insults by bis(12)-hupyrindone, a novel anti-acetylcholinesterase dimer, possibly via acting on multiple targets." Brain Res **1421**: 100-109.
- Zheng, Z. and M. A. Yenari (2004). "Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications." Neurol Res **26**(8): 884-892.
- Zhou, F. M., Y. Liang and J. A. Dani (2001). "Endogenous nicotinic cholinergic activity regulates dopamine release in the striatum." Nat Neurosci **4**(12): 1224-1229.
- Zhou, J., Y. Fu and X. C. Tang (2001). "Huperzine A and donepezil protect rat pheochromocytoma cells against oxygen-glucose deprivation." Neurosci Lett **306**(1-2): 53-56.
- Zhou, X., Q. Nai, M. Chen, J. D. Dittus, M. J. Howard and J. F. Margiotta (2004). "Brain-derived neurotrophic factor and trkB signaling in parasympathetic neurons: relevance to regulating alpha7-containing nicotinic receptors and synaptic function." J Neurosci **24**(18): 4340-4350.
- Zuccato, C. and E. Cattaneo (2009). "Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases." Nat Rev Neurol **5**(6): 311-322.

8 ANEXOS

8.1 Aprovação do comitê de Ética - UFMG



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -**

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 134/2010**, relativo ao projeto intitulado **"Avaliação do efeito neuroprotetor do estradiol na isquemia cerebral in vivo em camundongos knockdown para transportador vesicular de acetilcolina"**, que tem como responsável(is) **André Ricardo Massensini**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **22/ 09/2010**.

Este certificado expira-se em **22/ 09/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 134/2010**, related to the project entitled **"Effect neuroprotective of estradiol in cerebral ischemia in vivo in deficient mice for the vesicular acetylcholine transporter"**, under the supervisors of **André Ricardo Massensini**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **September 22, 2010**.

This certificate expires in **September 22, 2015**.

Belo Horizonte, 24 de Setembro de 2010.

Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpo.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

8.2 Lista de Anticorpos

Anticorpo	Fabricante	Diluição
pAKT (Ser473) ^{Co}	Cell Signaling	1:500 em 5% BSA
Bcl2 ^{Co}	Cell Signaling	1:1000 em 5% leite
Caspase 3 ^{Co}	Cell Signaling	1:1000 em 5% BSA
Pre-BDNF ^{Co}	Pierce-Thermoscientific	1:2000 em 5% leite
TRKB ^{Co}	Phospho-solutions	1:1000 em TBST
AKT ^{Co}	Cell Signaling	1:500 em 5% leite
Bax ^{Co}	Thero-scientific	1:1000 em 2.5% BSA
p-GSK3 α , β ^{Co}	BD biosciences	1:5000 em 5% leite
GSK3 ^{Ca}	Santa cruz biotechnology	1:1000 em 5% leite
p-GSK3 (Ser9/21) ^{Co}	Cell Signaling	1:1000 em 3% BSA

^{Co}– Coelho, ^{Ca}– Camundongo

8.3 Sequência de primers

Sequência de Primers		
BDNF	F: AAATTACCTGGATGCCGCAA	R: CGCCAGCCAATTCTCTTTTT
IL-1	F: ACGGACCCCAAAAGATGAAG	R: TTCTCCACAGCCACAATGAG
INOS	F: AAGATGGCCTGGAGGAATGC	R: TGCTGTGCTACAGTTCCGAG
Trk-B	F: CCGCTAGGATTTGGTGTACTGAG	R: CCACTGTCATCAGATGAAATTC
TNF α	F: CTTCTGTCTACTGAACTTCGGG	R: CAGGCTTGTCACCTCGAATTTTG

F: Forward primer; R: Reverse primer

8.4 Artigos

Stress-inducible phosphoprotein 1 has unique cochaperone activity during development and regulates cellular response to ischemia via the prion protein.

[Beraldo FH](#), [Soares IN](#), [Goncalves DF](#), [Fan J](#), [Thomas AA](#), [Santos TG](#), [Mohammad AH](#), [Roffé M](#), [Calder MD](#), [Nikolova S](#), [Haji GN](#), [Guimaraes AL](#), [Massensini AR](#), [Welch I](#), [Betts DH](#), [Gros R](#), [Drangova M](#), [Watson AJ](#), [Bartha R](#), [Prado VF](#), [Martins VR](#), [Prado MA](#).

*Robarts Research Institute, †Department of Physiology and Pharmacology, ‡Department of Anatomy and Cell Biology, §Department of Obstetrics and Gynaecology, ||Animal Care and Veterinarian Services, and ¶Department of Medical Biophysics, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada;

Stress-inducible phosphoprotein 1 (STI1) is part of the chaperone machinery, but it also functions as an extracellular ligand for the prion protein. However, the physiological relevance of these STI1 activities in vivo is unknown. Here, we show that in the absence of embryonic STI1, several Hsp90 client proteins are decreased by 50%, although Hsp90 levels are unaffected. Mutant STI1 mice showed increased caspase-3 activation and 50% impairment in cellular proliferation. Moreover, placental disruption and lack of cellular viability were linked to embryonic death by E10.5 in STI1-mutant mice. Rescue of embryonic lethality in these mutants, by transgenic expression of the STI1 gene, supported a unique role for STI1 during embryonic development. The response of STI1 haploinsufficient mice to cellular stress seemed compromised, and mutant mice showed increased vulnerability to ischemic insult. At the cellular level, ischemia increased the secretion of STI1 from wild-type astrocytes by 3-fold, whereas STI1 haploinsufficient mice secreted half as much STI1. Interesting, extracellular STI1 prevented ischemia-mediated neuronal death in a prion protein-dependent way. Our study reveals essential roles for intracellular and extracellular STI1 in cellular resilience.-Beraldo, F. H., Soares, I. N., Goncalves, D. F., Fan, J., Thomas, A. A., Santos, T. G., Mohammad, A. H., Roffe, M., Calder, M. D., Nikolova, S., Haji, G. N., Guimaraes, A. N., Massensini, A. R., Welch, I., Betts, D. H., Gros, R., Drangova, M., Watson, A. J., Bartha, R., Prado, V. F., Martins, V. R., and Prado, M. A. M. Stress-inducible phosphoprotein 1 has unique cochaperone activity during development and regulates cellular response to ischemia via the prion protein.

PMID: 23729591

Elimination of the vesicular acetylcholine transporter in the forebrain causes hyperactivity and deficits in spatial memory and long-term potentiation.

[Martyn AC](#), [De Jaeger X](#), [Magalhães AC](#), [Kesarwani R](#), [Gonçalves DF](#), [Raulic S](#), [Guzman MS](#), [Jackson ME](#), [Izquierdo I](#), [Macdonald JF](#), [Prado MA](#), [Prado VF](#).

Molecular Brain Research Group, Robarts Research Institute, and Department of Anatomy and Cell Biology and Physiology, Schulich School of Medicine and Dentistry, University of Western Ontario, London, ON, Canada N6A 5K8.

Basal forebrain cholinergic neurons, which innervate the hippocampus and cortex, have been implicated in many forms of cognitive function. Immunolesion-based methods in animal models have been widely used to study the role of acetylcholine (ACh) neurotransmission in these processes, with variable results. Cholinergic neurons have been shown to release both glutamate and ACh, making it difficult to deduce the specific contribution of each neurotransmitter on cognition when neurons are eliminated. Understanding the precise roles of ACh in learning and memory is critical because drugs that preserve ACh are used as treatment for cognitive deficits. It is therefore important to define which cholinergic-dependent behaviors could be improved pharmacologically. Here we investigate the contributions of forebrain ACh on hippocampal synaptic plasticity and cognitive behavior by selective elimination of the vesicular ACh transporter, which interferes with synaptic storage and release of ACh. We show that elimination of vesicular ACh transporter in the hippocampus results in deficits in long-term potentiation and causes selective deficits in spatial memory. Moreover, decreased cholinergic tone in the forebrain is linked to hyperactivity, without changes in anxiety or depression-related behavior. These data uncover the specific contribution of forebrain cholinergic tone for synaptic plasticity and behavior. Moreover, these experiments define specific cognitive functions that could be targeted by cholinergic replacement therapy.

PMID: 23045697