

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-Graduação em Patologia

Eliana Cristina de Brito Toscano

INIBIÇÃO DO RECEPTOR DO FATOR ATIVADOR DE PLAQUETAS
PROMOVE REDUÇÃO DE DÉFICITS NEUROLÓGICOS E
NEUROPROTEÇÃO NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL
MURINA

Belo Horizonte
2016

Eliana Cristina de Brito Toscano

INIBIÇÃO DO RECEPTOR DO FATOR ATIVADOR DE PLAQUETAS
PROMOVE REDUÇÃO DE DÉFICITS NEUROLÓGICOS E
NEUROPROTEÇÃO NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL
MURINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Geral da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia Investigativa.

Orientadora: Dra. Milene Alvarenga Rachid

Co-orientador: Dr. Antônio Lúcio Teixeira Jr.

Belo Horizonte

2016

T713i Toscano, Eliana Cristina de Brito.
Inibição do receptor do fator ativador de plaquetas promove redução de déficits neurológicos e neuroproteção na isquemia e reperfusão cerebral murina [manuscrito]. / Eliana Cristina de Brito Toscano. - - Belo Horizonte: 2016.
93f.: il.
Orientador: Milene Alvarenga Rachid.
Coorientador: Antônio Lúcio Teixeira Jr.
Área de concentração: Patologia.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
1. Isquemia. 2. Reperfusão. 3. Encéfalo. 4. Fator de Ativação de Plaquetas. 5. Apoptose. 6. Inflamação. 7. Camundongos. 8. Dissertações Acadêmicas. I. Rachid, Milene Alvarenga. II. Teixeira Jr., Antônio Lúcio. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QZ 170

Aos meus pais, Sirlene e Eduardo, ao Vinícius, Gustavo,
colaboradores e equipe do Laboratório de Patologia Molecular e Celular.

AGRADECIMENTOS

Enfim, é chegada a hora de comemorar uma grande conquista, o início de um caminho idealizado desde o quarto período de graduação em Farmácia. Foi exatamente nesse ponto, em uma aula de Química Analítica Instrumental, às 13 horas no Instituto de Ciências Exatas da UFMG, que o professor Valmir, a quem tanto admiro, talvez por ter percebido meu esforço em conter o sono durante a aula, perguntou-me: “ei, sabia que quando você estiver trabalhando em indústrias multinacionais de tecnologia de ponta, conhecer o mecanismo de funcionamento dos equipamentos vai ser o grande diferencial na escolha da técnica empregada?”. E eu respondi, com uma segurança categórica: “concordo plenamente, mas serei professora de patologia”. Nesse momento, olhares curiosos e espantados dos demais alunos se voltaram para mim, pois, na época, a maioria deles sonhava em trabalhar na Bayer, Pfizer, Sanofi-Aventis, etc. Essa certeza só aumentou com o passar do tempo e, devo reconhecer, o fatídico dia na aula de analítica foi muito importante por dois motivos: foi a primeira vez dei voz a uma vontade subconsciente de ser professora e de patologia; o conselho do Valmir, realmente foi muito útil na programação e entendimento dos meus experimentos.

Mas, se é chegada a hora de comemorar, certamente é também de agradecer. Assim, deixo registrado meus sinceros agradecimentos:

A Deus, por me conceder uma vida saudável e muita força de vontade, apesar das intercorrências durante meu parto.

Aos meus pais pelo amor e oportunidades oferecidas. Mais especificamente, a minha mãe, Sirlene, pela constante presença em minha vida, ensinamentos e dedicação incondicional há 27 anos. Ao meu pai, Eduardo, pelo melhor exemplo de honestidade, altruísmo, competência e determinação que eu poderia ter.

Ao Vinícius, meu irmão, pelos conselhos sensatos, pelo apoio nas dificuldades e pela presença barulhenta que, apesar de irritante, alegria a casa.

Vocês são minhas melhores referências e os maiores responsáveis pelas minhas conquistas.

Ao Gustavo pelo carinho, por participar dos meus momentos de glória e de angústia, por me incentivar e me fazer enxergar a melhor parte de mim. Não posso me esquecer também de mencionar o auxílio com a formatação e com processamento de imagens desse trabalho. Além da paciência em ouvir leituras e releituras do mesmo.

Aos meus avós, Lourdes e José por sempre me colocarem em suas orações; Neli e Eduardo por estarem guiando e intercedendo por mim de onde quer que estejam. Vocês são a base do maior bem que possuo, a família.

À Dra. Milene Rachid pela orientação, amizade e compreensão, compartilhando comigo seus ilustres conhecimentos e fazendo com que esses dois anos fossem o mais agradáveis possível. Também por ser meu referencial em ética e dedicação não só ao trabalho, mas à equipe; e por me ensinar a importância da paciência e perseverança na dura, mas maravilhosa carreira de pesquisador. Estamos apenas começando.

Ao Dr. Antônio Lúcio Teixeira pelo exemplo de pesquisador, com seu olhar perspicaz, analítico e espírito visionário, instigando minha capacidade de querer e buscar além do óbvio.

À equipe LPCM, mais conhecida como “ratas do Lab”: Edna, Dani, Ana, Camila, Bárbara, Marcela, Larissa e Sabrina pela disponibilidade em ajudar, mesmo que o experimento terminasse às 22 horas; pelo companheirismo, risadas sinceras e crescimento pessoal e profissional que me propiciaram.

Ao amigo Bruno Costa por, mesmo distante, participar tão efetivamente da realização da cirurgia de indução de isquemia, sempre alegrando os experimentos e por ter me guiado nos momentos iniciais da pós-graduação.

Aos professores do departamento pelas riquíssimas discussões em sala de aula e nos corredores. Em especial, ao Dr. Anilton Vasconcelos, por desmistificar a apresentação de trabalhos científicos; ao Dr. Geovanni Cassali pela oportunidade oferecida na disciplina de estágio docente e por abrir as portas do seu laboratório muito cordialmente; à Dra. Tatiane Paixão pelas sugestões pertinentes referentes a esse trabalho na disciplina de Seminários II.

Aos professores e doutores Lirlândia Sousa, Mauro Teixeira, Antônio Carlos Oliveira e Lucíola Barcelos por oferecerem a infra-estrutura de seus laboratórios e possibilitarem colaborações imprescindíveis ao resultado final desse trabalho.

Aos colegas Michelle Amantea, Flávia Rodrigues, Fátima Brant, Ana Letícia, Diego Reis, Puebla Vieira e Lucas Kangussu pela brilhante colaboração, gentileza e disponibilidade.

Às meninas do Laboratório de Técnicas Histológicas, pelo trabalho que tanto facilita nossa rotina e pelo constante bom humor.

Aos membros da banca avaliadora:

Dra. Aline Miranda, sempre simpática, pela colaboração com ideias brilhantes, não apenas na etapa final, mas em várias durante o desenvolvimento desse trabalho e por não medir esforços em ajudar.

Dr. Marcelo Caliari, duplamente colega de profissão, por ser uma das primeiras e memoráveis referências que tive em patologia e por me indicar a professora Milene como orientadora, sendo o gatilho inicial da cascata que levou à conclusão desse trabalho de mestrado

Dra. Camila Megale por aceitar tão prontamente e gentilmente compor a banca.

Dr. Helton Reis, pela cordialidade em ceder a infraestrutura de seu laboratório, pelo convívio sempre agradável e disponibilidade em participar da banca de defesa.

Ao CNPq e FAPEMIG pela colaboração financeira durante todo o desenvolvimento dessa pesquisa.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

O acidente vascular encefálico (AVE) é uma das principais causas de morte e incapacidade em todo o mundo, levando a uma série de impactos clínicos e socioeconômicos. Diferentes mecanismos estão envolvidos na patogênese do AVE, como a resposta inflamatória pós isquemia, que contribui para a expansão da lesão cerebral. O receptor do fator ativador de plaquetas (PAFR) é constitutivamente expresso do tecido cerebral e participa da regulação de muitos eventos, como inflamação e morte neuronal. Em altas concentrações, o fator ativador de plaquetas (PAF) ativa exacerbadamente seu receptor, que transduz e amplifica a cascata de sinalização intracelular, levando à quebra da barreira hematoencefálica, formação de edema, recrutamento de células inflamatórias periféricas e morte neuronal. Por meio da utilização de camundongos C57/BL6, com 9 a 11 semanas de idade, selvagens (WT) e deficientes para receptor de PAF (PAFR^{-/-}), investigou-se a relevância desse receptor durante a isquemia cerebral global transitória por oclusão bilateral das carótidas comuns (BCCAO). Os camundongos foram subdivididos em grupos BCCAO e *sham*, sendo estes últimos submetidos aos mesmos procedimentos que os BCCAO à exceção da oclusão das carótidas. A deficiência de PAFR promoveu redução do déficit neurológico associada à diminuição da área de lesão tecidual detectada por cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) e da porcentagem da área de cavitações necróticas e da frequência de neurônios isquêmicos por análise histomorfométrica. Além disso, a deficiência de PAFR inibiu a ativação de caspase-3 clivada e o aumento da permeabilidade vascular e formação de edema. Outro achado foi a redução dos níveis cerebrais das citocinas fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 beta (IL-1 β) e da quimiocina C-X-C ligante 1 (CXCL1) detectada por ELISA nos animais PAFR^{-/-} submetidos à BCCAO comparados aos WT também submetidos à BCCAO. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a ativação de PAFR é importante no desenvolvimento dos danos ocasionados pela isquemia cerebral global seguida de reperfusão.

Palavras chaves: Encéfalo, Isquemia, Reperfusão, PAFR, PAF, Apoptose, Inflamação, Camundongo

ABSTRACT

Stroke is one of the most frequent causes of death and disability worldwide, and can cause a significant variety of clinical and socioeconomic burden. Different mechanisms are involved in the pathogenesis of stroke, for example, the inflammatory response after ischemia that contributes to the expansion of brain injury. Platelet activating factor receptor (PAFR) is constitutively expressed in the brain tissue and regulates several events, like inflammation and neuronal loss. Platelet activating factor (PAF) in high concentrations induces the exacerbated activation of PAF receptor that amplifies intracellular signaling cascades leading to blood-brain barrier damage, edema formation, recruitment of leukocytes and neuronal cell death. Using mice C57/BL6 (with 9 to 11 weeks old) wild type and lacking the PAF receptor (PAFR^{-/-}), we investigate the relevance of this receptor during experimental transient global cerebral ischemia and reperfusion by bilateral common carotids occlusion (BCCAO). The mice were divided into sham and BCCAO groups. The sham being subjected to the same procedures that BCCAO, except carotid occlusion. PAFR deficiency improved neurological deficits associated with reduction of infarcted areas analyzed by triphenyltetrazolium chloride (TTC) and of the percentage of necrotic cavities areas and frequency of ischemic neurons by histometric analysis. In addition, PAFR deficiency prevents cleaved caspase-3 activation and vascular permeability increase and brain edema. Moreover, decreased brain levels of the cytokines tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-1beta (IL-1beta) and of the chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1) by ELISA were detected in PAFR^{-/-} BCCAO animals compared with WT group. Taking together, our results suggest that PAFR activation is important for the development of global brain ischemia and reperfusion injury.

Keywords: Brain, Ischemia, Reperfusion, Inflammation, PAFR, PAF, Apoptosis, Mice

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos envolvidos no processo de neurotoxicidade.....	28
Figura 2. Biossíntese e metabolismo do PAF pela via de remodelação..	38
Figura 3. Delineamento experimental.....	43
Figura 4. Anatomia vascular cerebral de camundongos (vista ventral) e representação da oclusão das carótidas comuns (A). Incisão cervical mediana, mostrando o clampeamento bilateral das artérias carótidas comuns (B).....	44
Figura 5. Análise morfométrica da macroscopia.....	46
Figura 6. Análise histomorfométrica.	47
Figura 7. Avaliação do déficit neurológico após BCCAo.....	51
Figura 8. Efeito do PAF sobre o déficit neurológico em um escore de 0 a 5.....	52
Figura 9. Efeito do PAF sobre a área de infarto cerebral após I/R.....	53
Figura 10. Efeito do PAF sobre a área de infarto cerebral.....	53
Figura 11. Fotomicroscopia do cérebro de camundongos WT <i>Sham</i> , PAFR <i>Sham</i> , WT BCCAo e PAFR ^{-/-} BCCAo, corados por HE.....	55
Figura 12. Efeito do PAF sobre a área de cavitações necróticas cerebrais.	56
Figura 13. Avaliação morfométrica da frequência de áreas de neurônios isquêmicos e espongiöse em camundongos submetidos à BCCAo.	56
Figura 14. Avaliação de citocinas e quimiocina por ELISA no cérebro dos camundongos submetidos à isquemia por 25 minutos e reperfusão por 24 horas..	57
Figura 15. Redução da expressão de caspase-3 clivada em cérebro de camundongos selvagens e deficientes para receptor de PAF após isquemia seguida de 24 horas de reperfusão, avaliada por <i>Western blotting</i>	58
Figura 16. Avaliação da permeabilidade da BHE, por meio de análise espectrofotométrica da concentração do corante Azul de Evans no encéfalo dos camundongos submetidos à isquemia por 25 minutos e reperfusão por 24 horas.	59

LISTA DE SIGLAS

- AE: azul de Evans
- AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
- Apaf-1: fator de ativação de proteases apoptóticas-1
- ATP: adenina trifosfato
- AVC: acidente vascular cerebral
- AVE: acidente vascular encefálico
- AVEi: acidente vascular encefálico isquêmico
- BCCAO: oclusão bilateral das carótidas comuns
- BHE: barreira hematoencefálica
- BSA: albumina sérica bovina
- Ca^{2+} : íon cálcio
- CEBIO: Centro de bioterismo
- CETEA: Comitê de Ética em Experimentação Animal
- COX-2: ciclo-oxigenase 2
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- DTT: ditioneitol
- EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
- EPM: erro padrão da média
- EROS: espécies reativas de oxigênio
- Fas: *first apoptotic signal*
- FDA: *Food and Drug Administration*
- g: grama
- GFAP: proteína glial fibrilar ácida
- HCl: cloreto de hidrogênio
- H&E: hematoxilina e eosina
- ICAM-1: molécula de adesão intercelular-1
- ICB: Instituto de Ciências Biológicas
- IL: interleucina
- iNOS: óxido nítrico sintase induzida
- I/R: isquemia e reperfusão

- kDa: quilodaltons
- Kg: quilograma
- LT: leucotrieno
- M: molar
- MAPKs: proteínas quinases ativadas por mitógeno
- mg: miligrama
- mGluR: receptor metabotrópico de glutamato
- min: minuto
- MIP: proteína inflamatória de macrófago
- mL: mililitro
- mm: milímetro
- mM: micromolar
- MMP: metaloproteinase de matriz
- MPO: mieloperoxidase
- N: normal
- Na¹⁺: íon sódio
- NaCl: cloreto de sódio
- NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
- NaF: fluoreto de sódio
- NaVO₃: metavanato de sódio
- Na⁺/K⁺ ATPase: sódio/potássio ATPase
- NF-κB: fator de transcrição nuclear kappa B
- nm: nanômetro
- NMDA: N-metil-D-aspartato
- OCSP: *Oxford Community Stroke Project*
- OPD: ortofenildiamina
- PAF: fator ativador de plaquetas
- PAFR: receptor do fator ativador de plaquetas
- PAFR^{-/-}: deficiente para receptor do fator ativador de plaquetas
- PAF-AH: PAF acetilhidrolase
- PBS: tampão fosfato-salino
- pg: picograma

- pH: potencial hidrogeniônico
- PLA₂: fosfolipase A₂
- PMN: polimorfonuclear
- PMSF: fluoreto de fenilmetilsufonila
- p/v: peso por volume
- RM: ressonância magnética
- RPM: rotação por minuto
- SDS: dodecilsulfato de sódio
- SNC: sistema nervoso central
- TC: tomografia computadorizada
- TGF-β: fator de transformação de crescimento beta
- TNFR: receptor do fator de necrose tumoral
- TNF: fator de necrose tumoral
- TOAST: *Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*
- tPA: ativador do plasminogênio tecidual
- TTC: cloreto de trifeniltetrazólio
- UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
- UI: unidade internacional
- V: volts
- VCAM-1: molécula de adesão vascular-1
- VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular
- WT: *wild type* – selvagens
- μL: microlitro
- μm: micrômetro
- °C: graus Célsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1. O Acidente Vascular Encefálico.....	20
2.1.1. Classificação do AVE	21
2.1.1.1. Hemorrágico.....	21
2.1.1.2. Isquêmico	21
2.2. Epidemiologia do AVE.....	22
2.3. Fatores de risco do AVE	23
2.4. Fisiopatologia do AVE isquêmico.....	24
2.4.1. Neurotoxicidade.....	24
2.4.2. Resposta inflamatória.....	28
2.4.2.1. Micróglia e astrócitos na I/R cerebral.....	29
2.4.2.2. Permeabilidade da barreira hematoencefálica.....	30
2.4.2.3. Reperusão e o papel do neutrófilo.....	32
2.4.2.4. Mediadores inflamatórios	34
2.5. Fator ativador de plaquetas e AVE.....	36
2.5.1. Papel do PAF na fisiopatologia do AVEi	38
2.5.2. Receptor de PAF.....	39
2.5.3. Modelos animais envolvendo inibição de PAF ou de seu receptor.....	40
3. OBJETIVOS	42
3.1. Objetivo geral	42
3.2. Objetivos específicos	42
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1. Animais	43
4.2. Indução da isquemia e reperusão.....	43
4.3. Análise do Déficit Neurológico.....	45
4.4. TTC e histologia	45
4.5. Determinação das concentrações de citocinas/quimiocinas (ensaio imunoenzimático - ELISA).....	47
4.6. Avaliação da expressão de caspase-3 clivada no cérebro por Western Blotting.....	48
4.6.1. Obtenção dos extratos proteicos.....	48

4.6.2.	Quantificação de proteínas dos extratos proteicos	48
4.6.3.	Western Blot para análise da expressão de caspase-3 clivada	49
4.6.4.	Avaliação da permeabilidade da BHE pelo método de Azul de Evans	49
4.7.	Análise estatística	50
5.	RESULTADOS.....	51
5.1.	Déficit neurológico	51
5.2.	Avaliação da isquemia pela coloração com TTC	52
5.3.	Avaliação Histopatológica	54
5.3.1.	Avaliação descritiva.....	54
5.3.2.	Avaliação morfométrica.....	54
5.4.	Análise da expressão das citocinas e quimiocina por ELISA	56
5.5.	Análise da expressão de caspase 3-clivada no cérebro por <i>western blotting</i>	57
5.6.	Avaliação da permeabilidade a BHE por Azul de Evans.....	58
6.	DISCUSSÃO	60
7.	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
	ANEXOS.....	81

1. INTRODUÇÃO

O acidente vascular encefálico (AVE) é definido como uma síndrome neurológica com progressão rápida dos sintomas e sinais de perda de função súbita, como alterações motoras, visuais e de linguagem, de acordo com a região do encéfalo na qual ocorreu a interrupção do suprimento sanguíneo. O encéfalo é um tecido extremamente sensível à isquemia, isso é tão evidente e crítico, que até mesmo breves períodos isquêmicos podem iniciar uma complexa sequência de eventos, envolvendo neurotoxicidade e inflamação, os quais podem culminar em morte celular (Feuerstein e Wang, 2000; Smeltzer e Bare, 2005; Woodruff *et al.*, 2011). O AVE é subdividido em isquêmico e hemorrágico, sendo o isquêmico mais prevalente, englobando, aproximadamente, 87% dos casos e o alvo da maioria dos estudos com intervenção farmacológica (Gilgun-Sherki *et al.*, 2002, Ren *et al.*, 2013).

Com relação à epidemiologia, trata-se da doença do sistema nervoso central (SNC) de maior prevalência, mortalidade e morbidade tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento, e a segunda maior causa de óbitos no mundo (6.000.000 de mortes anuais). No Brasil, os dados de domínio público de Sistema de Saúde (DataSUS) apontam a notificação de 750.376 casos de internação e de 174.767 casos de morte (23%) por AVEs (isquêmicos e hemorrágicos) no período de 2010 a 2013. Além da alta mortalidade, a doença é a maior responsável pela incapacitação em adultos, sobretudo acima dos 55 anos, gerando um alto gasto para os sistemas de saúde (André *et al.*, 2006; Strong *et al.*, 2007; Woodruff *et al.*, 2011).

A interrupção do fluxo sanguíneo cerebral, devido à obstrução de um vaso, inicia uma série de eventos metabólicos complexos, denominada cascata isquêmica. Nesse quadro, os neurônios tornam-se incapazes de manter a respiração mitocondrial aeróbica, que é substituída pela anaeróbica, gerando grandes quantidades de ácido láctico e provocando redução do potencial hidrogeniônico (pH). Além disso, a respiração anaeróbica leva os neurônios a produzirem quantidade insuficiente de adenosina trifosfato (ATP) para fornecer energia aos processos de despolarização. Assim, os canais de membrana ATP-dependentes que mantêm o equilíbrio eletrolítico começam a falhar e as células entram em disfunção (Smeltzer e Bare, 2005).

A cascata isquêmica promove despolarização da membrana celular, ocorrendo aumento intracelular de cálcio e liberação de glutamato. Nessa fase, o dano celular é desencadeado, principalmente, por excitotoxicidade, distúrbios mitocondriais, produção de espécies reativas de oxigênio e apoptose. No entanto, em áreas em que o fluxo sanguíneo não é tão comprometido, surge uma região denominada penumbra isquêmica, que pode sobreviver durante várias horas e se recuperar caso o aporte sanguíneo seja normalizado (Amantea *et al.*, 2009; Tu *et al.*, 2009; Woodruff *et al.*, 2011; Østergaard *et al.*, 2013).

Paralelamente aos distúrbios metabólicos ocasionados pelo AVE, há ativação da resposta inflamatória. Sabe-se que mediadores inflamatórios desempenham um papel crucial na fisiopatologia da isquemia cerebral, exercendo tanto efeitos deletérios nas fases iniciais da inflamação, quanto efeitos benéficos durante a recuperação e reparação. Poucas horas após a isquemia, há aumento dos níveis de citocinas e quimiocinas, da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais cerebrais, com facilitação da migração transendotelial de neutrófilos e monócitos e produção de radicais livres. Vale lembrar que a reperfusão também desempenha um papel importante na liberação de radicais livres e amplificação da resposta inflamatória. Além disso, há ativação de metaloproteinases e de células residentes, incluindo a micróglia e os astrócitos. A ativação das metaloproteinases promove o rompimento da barreira hematoencefálica e facilitação da transmigração de leucócitos periféricos (Amantea *et al.*, 2009; Tuttolomondo *et al.*, 2009; Woodruff *et al.*, 2011).

A micróglia contribui para a inflamação pós-isquêmica pela produção do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 beta (IL-1 β), espécies reativas de oxigênio (EROS) e outros mediadores inflamatórios. Entretanto, estas células também participam do processo de reparo pela produção de interleucina-10 (IL-10) e fator de transformação de crescimento beta (TGF- β). Os neutrófilos, por sua vez, liberam EROS, enzimas proteolíticas e citocinas, que, durante a reperfusão, podem desempenhar um papel negativo, contribuindo para a expansão da lesão tecidual (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). Citocinas pró-inflamatórias, cuja liberação também se encontra aumentada, contribuem para a intensificação do dano tecidual isquêmico por aumentar os níveis de mediadores trombóticos endógenos, como o inibidor do ativador do plasminogênio tecidual tipo 1, o fator tecidual (tromboplastina) e o fator ativador de plaquetas (PAF) (Thomas *et al.*, 1993; Pantoni *et al.*, 1998; Barone *et al.*, 1999).

O PAF desempenha um duplo papel no SNC. Assim, quando presente em níveis fisiológicos, PAF atua na formação da memória e modula a potenciação de longa duração, aumentando a plasticidade neuronal. Entretanto, quando produzido em excesso, torna-se um potente mediador pró-inflamatório (Aspey *et al.*, 1997; Bozlu *et al.*, 2007; Belayev *et al.*, 2008). Segundo Panetta *et al.* (1989), os níveis de PAF cerebral em gerbilos aumentaram em resposta a cinco minutos de oclusão bilateral das carótidas em estágios iniciais de reperfusão, o que pode ser inibido pelo antagonista de PAF BN52021. Alguns modelos animais de isquemia e reperfusão, envolvendo o tratamento com antagonistas do receptor de PAF têm mostrado resultados promissores. O efeito neuroprotetor de inibidores do PAF foi demonstrado em lesão cerebral isquêmica em gerbils, ratos e camundongos (Zhang *et al.*, 2007; Kleinig e Vink, 2009; Belayev *et al.*, 2012).

Terapias convencionais para o AVE incluem a prevenção de hipercoagulação e trombose, além de cirurgia para reparar anomalias vasculares. No momento, só existe um tratamento aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o acidente vascular cerebral isquêmico agudo: o trombolítico ativador do plasminogênio tecidual (tPA), cujas limitações quanto ao tempo de administração e comorbidades apresentadas pelos pacientes caracterizam uma baixa abrangência da terapia (Armstead *et al.*, 2010; Belayev *et al.*, 2012). Assim, existe uma necessidade urgente de estratégias terapêuticas para minimizar as sequelas deixadas pela doença em questão, principalmente envolvendo mecanismos de neuroproteção.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O Acidente Vascular Encefálico

O acidente vascular encefálico (AVE), anteriormente chamado acidente vascular cerebral (AVC), é caracterizado pela perda súbita do aporte sanguíneo em uma ou algumas regiões do encéfalo, resultando em perda da função neurológica. O tecido cerebral é extremamente sensível à isquemia, de tal forma que até breves períodos de interrupção do fluxo podem iniciar uma sequência complexa de eventos, culminando em morte celular. Os AVEs podem ser classificados como hemorrágicos ou isquêmicos. Apesar dos avanços significativos em neuroimagem e manejo clínico, ainda é um desafio estabelecer o diagnóstico e tomar decisões terapêuticas para pacientes com AVE agudo. Nos últimos anos, uma grande quantidade de pesquisas foi direcionada para o entendimento da fisiopatologia e histopatologia de infartos cerebrais em seres humanos e em modelos animais experimentais (Mărgăritescu *et al.*, 2009; Woodruff *et al.*, 2011; Ren *et al.*, 2013).

Atualmente, o AVE é uma das principais causas, a nível mundial, de morte e incapacitação de adultos e está associado a condições clínicas e socioeconômicas, que impactam no acesso a terapias eficazes. As intervenções convencionais em quadros de AVE isquêmico (AVEi) incluem a terapia trombolítica, prevenção de coagulação inadequada e de trombose, além de cirurgia para o reparo de anomalias vasculares. Para o AVEi agudo, até o momento, apenas o tPA está aprovado pelo FDA. Entretanto, devido a comorbidades dos pacientes, contra-indicações, risco de hemorragia intracraniana e estreita janela de tempo na qual o tPA pode ser administrado com segurança e efetividade, poucos pacientes são elegíveis para tratamento (Armstead *et al.*, 2010; Belayev *et al.*, 2012). Estudos mostram que o tPA deve ser utilizado dentro de uma janela de três a quatro horas e meia após o início do AVEi e que apenas 3-8,5% dos pacientes recebem a intervenção em tempo hábil. Assim, há uma necessidade urgente de boas estratégias terapêuticas não somente destinadas a preservar ou re-estabelecer o fluxo sanguíneo cerebral, mas, sobretudo, a prevenir os mecanismos de morte neuronal e reduzir os déficits neurológicos resultantes da isquemia e reperfusão cerebral (Amantea *et al.*, 2009; Tu *et al.*, 2009; Fonarow *et al.* 2011, Woodruff *et al.*, 2011).

2.1.1. Classificação do AVE

Os AVEs podem ser classificados como hemorrágicos ou isquêmicos, sendo 87% dos casos isquêmicos e 13%, hemorrágicos. Como o manejo de cada um desses subtipos é bem diferente, a distinção clínica é um dos passos mais importantes e urgentes para uma intervenção efetiva. Nesse contexto, a imagiologia cerebral revolucionou o diagnóstico de acidente encefálico pela introdução da tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM). Embora a TC tenha sido o carro-chefe de diagnóstico de AVE durante os últimos 20 anos, a RM é agora tão útil, se não mais que TC (Donnan *et al.*, 2008; Hachinski *et al.*, 2010). Isso porque as imagens de RM têm maior capacidade de demonstrar diferentes estruturas no cérebro e alterações sutis na maioria das doenças (Wright *et al.*, 2014).

2.1.1.1. Hemorrágico

O AVE hemorrágico pode ser classificado em intracerebral e subaracnóideo. A hemorragia subaracnóidea é responsável por cerca de 5% de todos os derrames e, geralmente, é causada por ruptura de aneurisma sacular no interior do espaço subaracnóideo. Cerca de dois terços dos pacientes com hemorragia cerebral primária têm hipertensão pré-existente ou recém-diagnosticada. Nos demais pacientes, podem ser observadas malformações vasculares, como angiomas cavernosos ou malformações arteriovenosas; angiopatia amiloide cerebral; infarto em que ocorreu uma hemorragia secundária (Donnan *et al.*, 2008).

2.1.1.2. Isquêmico

A nível hospitalar, há algumas classificações que auxiliam a equipe de profissionais da saúde na tomada de decisão com relação à conduta para com o paciente que sofreu AVEi. Uma delas, baseada no sistema *Oxford Community Stroke Project* (OCSP), pode ser efetuada na própria sala de emergência, fornecendo informações importantes para a determinação do prognóstico do paciente. Já a classificação baseada no sistema *Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment* (TOAST) identifica o mecanismo que levou à oclusão do vaso (cardioembolia, embolia arterial ou de pequenos vasos, doença *in situ*), o que pode influenciar as estratégias adotadas para o tratamentos e prevenção (Donnan *et al.*, 2008). Dentre essas causas, a embolia corresponde 75% dos casos, sendo, assim, a causa mais frequente de

isquemia focal (Mergenthaler *et al.*, 2004). A distinção entre eventos isquêmicos transitórios, que duram 24 horas ou menos e eventos de maior duração (como o AVE), é totalmente arbitrária e baseada nas características clínicas de cada indivíduo (Donnan *et al.*, 2008).

2.2. Epidemiologia do AVE

O Acidente Vascular Encefálico é a segunda principal causa de mortalidade mundial, sendo responsável por uma média de 6 milhões de óbitos por ano. Estima-se que o risco de ocorrência de AVE é de 8 a 10% e que, em 2030, 23 milhões de pessoas terão o primeiro caso da doença, que poderá resultar em 7,8 milhões de mortes. A prevalência do AVE e os custos originados do cuidado requerido pelos pacientes tendem a crescer à medida que o envelhecimento da população aumenta. A incidência também aumenta com a idade, duplicando a cada década após os 55 anos. Entre adultos com idades entre 35 a 44 anos, ela fica em torno de 30 a 120 casos por 100 mil pessoas ao ano e, para a faixa de idade entre 65 e 74 anos, de 670 a 970 por 100 mil. Além disso, a incidência está aumentando em países menos desenvolvidos, nos quais o estilo de vida da população está mudando rapidamente. Em 2005, esses países concentravam 87% dos casos de AVE, culminando em morte de mais de 90% dos pacientes acima de 70 anos, contra apenas 6% nos países desenvolvidos, para a mesma faixa de idade. Sabe-se que a incidência do AVE é subestimada nos países em desenvolvimento, carecendo de um maior volume de pesquisas para avaliá-la ao longo do tempo (Strong *et al.*, 2007; Ovbiagele e Nguyen-Huynh, 2011; Woodruff *et al.*, 2011).

Em contrapartida, as taxas de incidência diminuíram nas últimas décadas em países como os EUA, Reino Unido e Canadá. Isso pode ser explicado pelo aumento dos tratamentos preventivos; melhor controle dos fatores de risco vasculares, como hipertensão, hiperlipidemia e tabagismo; e melhoria dos padrões de vida da população. Com relação à letalidade, observa-se uma redução mundial. Ainda assim, na última década, a taxa de mortalidade precoce por AVE em países em desenvolvimento foi cerca de 25% maior que a observada em países desenvolvidos (Donnan *et al.*, 2008; Ovbiagele e Nguyen-Huynh, 2011). No Brasil, segundo dados do DataSUS, no período de 2010 a 2013, dentre a mortalidade por doenças cerebrovasculares, 44% corresponderam a AVE, não especificado se isquêmico ou hemorrágico, sem contabilizar morte decorrente de sequelas geradas por esta doença. Ao relacionar o número de internações com a mortalidade por AVE (novamente excluindo morte

por sequelas), tem-se que a mortalidade corresponde a 23% das internações. Vale lembrar que, como óbitos por AVE não têm notificação compulsória no Brasil e que nem todos os pacientes passam por internação, esses números são subestimados. Analisando os dados por regiões brasileiras, o número absoluto tanto de internações quanto de mortes por AVE é maior no sudeste, seguido do nordeste, entretanto, a taxa de mortalidade de todas as regiões são muito próximas.

Pouca atenção tem sido dada à prevalência do AVE, ou seja, aos pacientes que sobrevivem com sequelas, os quais representam cerca de 500 pessoas a cada 100.000 habitantes. Como mortalidade está, aparentemente, diminuindo mais rapidamente do que incidência de AVE, a proporção de sobreviventes aumentará, impactando na economia dos países (Donnan *et al.*, 2008).

2.3. Fatores de risco do AVE

Em 1970, mostrou-se que a hipertensão é um forte fator de risco para todos os tipos de AVE. Posteriormente, foram identificados outros fatores e estudos comprovaram que a maioria deles pode ser revertidos com mudanças de hábito e/ou por meio de intervenções farmacológicas, contribuindo para a redução da incidência do AVE. Recentemente, um estudo de caso-controle com 3.000 pacientes que tiveram AVE e um número correspondente de controles mostrou que, aproximadamente, 90% dos AVEs podem ser ocasionados por dez principais fatores de risco: 1) hipertensão; 2) diabetes; 3) doenças cardíacas; 4) tabagismo; 5) obesidade abdominal; 6) hiperlipidemia; 7) sedentarismo; 8) consumo de álcool; 9) dieta e 10) estresse psicossocial e depressão (Hachinski *et al.*, 2010; Woodruff *et al.*, 2011; Ovbiagele e Nguyen-Huynh, 2011).

Há poucos estudos de associações entre histórico familiar e AVE. Sabe-se que há muitos fatores de risco em comum entre essa doença e o infarto do miocárdio, incluindo hipertensão arterial, diabetes mellitus e hipercolesterolemia, os quais têm componentes genéticos consideráveis. Fatores geográficos também parecem influenciar, uma vez que estão ligados à expressão de fenótipos caracterizados como fatores de risco para AVE (Donnan *et al.*, 2008; Kennedy *et al.*, 2012).

2.4. Fisiopatologia do AVE isquêmico

Isquemia é a redução total ou parcial do fluxo sanguíneo, o que pode alterar os mecanismos celulares fisiológicos. Como o cérebro é altamente sensível à redução do aporte sanguíneo, poucos minutos de isquemia podem engatilhar uma série de eventos patológicos, culminando em disfunção e/ou morte celular, que levam a déficits neurológicos impactantes na qualidade de vida dos pacientes (Woodruff *et al.*, 2011). A intensidade e durabilidade do comprometimento neurológico variam de acordo com a duração da isquemia, com o vaso afetado e, conseqüentemente, com a região cerebral comprometida, podendo gerar lesões focais ou globais e déficits transitórios ou permanentes, fatores que impactam diretamente no gasto com a reabilitação do paciente (Flynn *et al.*, 2008; del Zoppo *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2014).

Simplificadamente, os mecanismos envolvidos são excitotoxicidade, apoptose, ativação de células da glia, liberação de radicais livres, perda da integridade da barreira hematoencefálica (BHE) com infiltração de leucócitos periféricos no parênquima cerebral e conseqüente inflamação. Tais mecanismos orquestram uma cascata cíclica, que se inicia e amplifica rapidamente após a isquemia (Doyle *et al.*, 2008; Woodruff *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2014).

2.4.1. Neurotoxicidade

O cérebro apresenta alta demanda energética, sendo muito sensível à interrupção do aporte sanguíneo. Assim, os mecanismos de neurotoxicidade podem ser desencadeados minutos após início da isquemia. Em regiões com manutenção inferior a 20-30% do fluxo sanguíneo normal, surge a chamada área central da isquemia. Regiões adjacentes, cujo fluxo seja mantido em cerca de 30% a 50% do normal, ou seja, em que não haja redução superior a 70%, compoem a penumbra isquêmica (Amantea *et al.*, 2009; del Zopo *et al.*, 2011; Østergaard *et al.*, 2013).

Nas áreas centrais de isquemia, que sofreram uma interrupção abrupta do fornecimento de oxigênio e glicose, ocorre necrose, devido à ativação de uma série de eventos metabólicos complexos, compondo a cascata isquêmica. Nesse contexto, as células passam a realizar respiração anaeróbia, havendo redução da produção de ATP e, conseqüentemente, disfunção

dos transportadores de membrana dependentes de energia, como é o caso da bomba de sódio e potássio (Na^+/K^+ ATPase) e de cálcio (Ca^{2+} ATPase). Assim, o efluxo de cálcio na forma iônica (Ca^{2+}) torna-se limitado, bem como sua recaptação pelo retículo endoplasmático, havendo acúmulo desse íon no citoplasma e conseqüente intumescimento e despolarização celular e ativação de hidrolases (Smeltzer e Bare, 2005; Kalogeris *et al.*, 2012; Kassner e Merali, 2015). A despolarização celular permite que o glutamato atravesse a membrana plasmática por meio de transportadores de glutamato sódio dependentes. Então, esse neurotransmissor acumula-se nas fendas pré e pós-sináptica, levando à morte neuronal, fenômeno denominado excitotoxicidade (Kassner e Merali, 2015). De forma cíclica, o glutamato extracelular ativa seus receptores exacerbadamente e promove mais influxo de íons cálcio, além de sódio, amplificando a excitotoxicidade (Doyle *et al.*, 2008; Woodruff *et al.*, 2011). Os receptores de glutamato podem ser divididos em dois grupos, os ionotrópicos e os metabotrópicos (mGluR I, II e III). Os receptores ionotrópicos N-metil-D-aspartato (NMDA) e ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) são específicos para cátions Ca^{2+} e Na^+ , respectivamente (Meldrum, 2000). O NMDA está presente em toda a extensão cerebral, entretanto, o cérebro anterior e a região CA1 do hipocampo apresentam uma maior densidade desse receptor. Já os do tipo AMPA apresentam distribuição em todo o SNC e também são muito expressos no hipocampo (Bennett *et al.*, 1996; Ozawa *et al.*, 1998).

Além da falha do metabolismo energético, a respiração anaeróbia resulta em acidose, haja vista a produção de lactato que, com a escassez de oxigênio, passa a ser o aceptor final de hidrogênio na cadeia respiratória, formando ácido láctico e reduzindo o pH cerebral para cerca de 6 a 6,5. Nesse pH, a dissociação de prótons promove a ativação de canais iônicos sensíveis ao meio ácido, que são permeáveis a Ca^{2+} , fenômeno denominado acidotoxicidade (Simon, 2006; Doyle *et al.*, 2008).

Em um estudo cinético, utilizando oclusão da artéria cerebral média para induzir isquemia cerebral em ratos, Wu *et al.* (2014) não observaram alterações morfológicas neuronais significativas após 6 horas de reperfusão. Já após 12 horas, os autores relataram alterações necróticas, sendo o pico dessas alterações encontrado no período de 24 horas de reperfusão. Inicialmente, a necrose é caracterizada por intensa condensação da cromatina, retração do volume celular e basofilia (picnose); posteriormente, há ruptura de membrana plasmática, organelas e núcleo, havendo liberação de fragmentos para o meio extracelular (cariorrexe).

Mais tardiamente, a cromatina é hidrolisada por ácidos nucleicos, podendo resultar no desaparecimento nuclear (cariólise) (Majno e Joris, 1995).

Além de necrose, os mecanismos de neurotoxicidade podem levar à apoptose, que é caracterizada por retração celular, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos (Wu *et al.*, 2014), os quais, por serem envoltos por membrana plasmática, não promovem danos a células vizinhas. Ao contrário da necrose, é um processo isolado, organizado e dependente de energia (Woodruff *et al.*, 2011). Nas regiões de penumbra, como a isquemia é menos intensa, os processos de neurotoxicidade são mais lentos e, geralmente, ocorrem por apoptose e inflamação. Assim, as células dessas regiões podem sofrer apoptose somente algumas horas ou até dias após o comprometimento do fluxo sanguíneo. Modelos de isquemia *in vivo* demonstraram a rápida ocorrência de necrose na zona central isquêmica, enquanto que, na região de penumbra, a morte celular foi mais tardia e desencadeada por apoptose (Irving *et al.*, 2000). Wu *et al.* (2014) detectaram, em modelo focal de I/R cerebral em ratos, indícios iniciais de apoptose 4 horas após início da reperfusão, tendo pico em 4 dias e declínio após 6 dias de reperfusão. Portanto, intervenções rápidas no sentido de restabelecer o fluxo podem recuperar a funcionalidade da penumbra (Dohmen *et al.*, 2008; del Zoppo *et al.*, 2011; Woodruff *et al.*, 2011; Østergaard *et al.*, 2013). O tempo de chegada do paciente ao hospital, as comorbidades por ele apresentadas e a necessidade de uma rápida diferenciação entre AVE isquêmico e hemorrágico são fatores que limitam a administração de trombolítico em tempo hábil, comprometendo a recuperação dos neurônios da penumbra e a contenção da expansão da área central de lesão (Yuan, 2009).

No contexto da isquemia e reperfusão (I/R) cerebral, a apoptose pode ocorrer por ativação dos mecanismos da via intrínseca (mitocondrial) e extrínseca (citoplasmática), os quais convergem em uma via final comum (Broughton *et al.*, 2009). A hipóxia induz a expressão de p53 e, conseqüentemente, de genes pró-apoptóticos da família das proteínas Bcl-2, como o Bax. A translocação de Bax para a mitocôndria promove alteração de sua membrana e liberação de citocromo c para o citosol, onde ele ativa caspase-9, formando o complexo apoptossomo e, posteriormente, ativa caspase-3, via fator ativador de proteases apoptóticas (Apaf-1) (Jiang *et al.*, 2015). Tais mecanismos correspondem à via intrínseca. No caso da via extrínseca, ocorre ativação dos domínios de morte, presentes em receptores pertencentes à

família do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR), sendo os mais comuns o TNFR1 e *first apoptotic signal* (Fas). Com isso, a caspase 8 (iniciadora) e posteriormente a caspase 3 (efetora) são ativadas (Namura *et al.*, 1998). A caspase-8 também é capaz de clivar e ativar uma das proteínas da família Bcl-2, a Bid, que aumenta a permeabilidade mitocondrial e a liberação de citocromo c, iniciando a via intrínseca da apoptose (Sugawara *et al.*, 2003). Outro possível mecanismo de apoptose na isquemia cerebral é pela via de sinalização do retículo endoplasmático, iniciada pela caspase-12. Essa via pode ser ativada pelo acúmulo de proteínas mal enoveladas no retículo, devido à privação de glicose, alterações da homeostase do cálcio e estresse oxidativo (Fan *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2011).

As caspases pertencem à família das proteases com um sítio de cisteína ativo capaz de clivar substratos intracelulares que contenham resíduo de aspartato. As caspases são sintetizadas como precursores inativos (zimogênios) e, após estímulo fisiológico ou patológico, ativam e amplificam a cascata apoptótica, ou seja, elas garantem a organização e programação da morte celular (Hengartner, 2000; Guo *et al.*, 2011). Existem dois grupos de caspases, as iniciadoras (8, 9 e 12) e as efetoras (3, 6 e 7). As iniciadoras funcionam como o gatilho da cascata proteolítica ao ativar as caspases efetoras, as quais são responsáveis pela clivagem de substratos (Denault e Salvesen, 2002; Boatright e Salvesen, 2003).

A caspase-3 é uma protease importante para iniciar a apoptose e sua ativação ocorre após proteólise do zimogênio, originando a caspase-3 clivada. Uma vez que tanto a via intrínseca quanto a extrínseca podem convergir na forma clivada dessa protease e que ela atua no final da cascata apoptótica, a caspase-3 clivada funciona como um marcador bem específico e, portanto, sua detecção pode ser diretamente relacionada com a ocorrência de apoptose em diversas condições (Fox e Aubert, 2008; Broughton *et al.*, 2009; Tu *et al.*, 2009). Estudos em modelo murino já mostraram que tanto o bloqueio genético da expressão de caspase-3 quanto a administração de substâncias anti-apoptóticas, como a melatonina, reduziram o volume de lesão cerebral (Le *et al.*, 2002; Kilic *et al.*, 2004). Além disso, em seres humanos, já foi encontrada correlação positiva entre caspase-3 em plasma sanguíneo e expansão da lesão cerebral, o que indica que essa protease, bem como sua forma clivada, podem ser um importante biomarcador para se estimar danos neuronais e efetividade de terapias neuroprotetoras (Rosell *et al.*, 2008).

Em suma, a neurotoxicidade pode ocorrer de forma rápida, na zona central da lesão, por ativação da cascata isquêmica e decorrente necrose; ou após horas ou dias, nas regiões periféricas, como na penumbra isquêmica, por apoptose. Obviamente, essas subdivisões retratam a predominância do mecanismo de morte celular de acordo com a intensidade, região acometida e duração da isquemia, mas esses processos estão totalmente interligados (Figura 1). Wu *et al.* (2014) mostraram em modelo de I/R cerebral por oclusão da artéria cerebral média em ratos que a expansão da apoptose ocorre posteriormente ao início da resposta inflamatória, a qual estimula a cascata de morte celular programada.

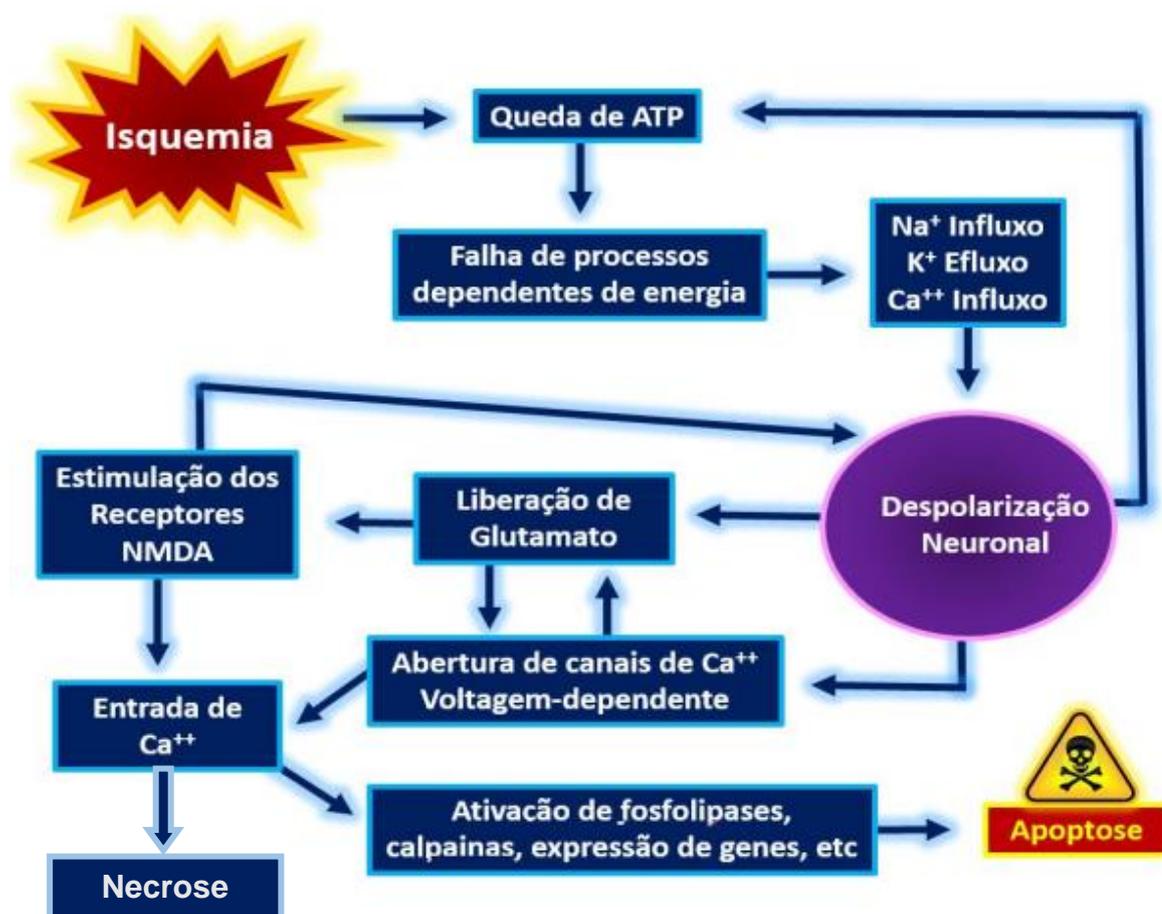


Figura 1. Mecanismos envolvidos no processo de neurotoxicidade. Os mecanismos de necrose e apoptose associam-se, exercendo efeito sinérgico para o aumento dos danos neuronais. Fonte: Silva, B.C., 2014 (adaptado).

2.4.2. Resposta inflamatória

A I/R cerebral é marcada por uma importante resposta inflamatória, caracterizada pela indução da expressão de citocinas, quimiocinas, metaloproteinases e moléculas de adesão;

pela quebra da BHE e pela infiltração de leucócitos periféricos. Em um primeiro momento, a população de células residentes (endoteliais, micróglia, astrócitos e neurônios) são responsáveis pelo aumento da produção de mediadores inflamatórios. Horas após redução do aporte sanguíneo, a migração leucocitária, sobretudo de neutrófilos, já é bastante intensa e, juntamente com a apoptose, a resposta inflamatória, apesar de essencial ao processo de reparo em condições controladas, leva à expansão da área central da lesão em uma resposta exacerbada (Amantea *et al.*, 2009; Kleinig e Vink, 2009; Tuttolomondo *et al.*, 2009; Jickling *et al.*, 2012).

2.4.2.1. *Micróglia e astrócitos na I/R cerebral*

A micróglia é uma linhagem de células mieloides residente do SNC, que corresponde a cerca de 20% do total de células da glia. Em situações fisiológicas, a micróglia apresenta morfologia ramificada e estado quiescente, mantendo a homeostase, vigilância imunológica, desativação de neurotransmissores e produção de fatores de crescimento. Entretanto, após disfunções do SNC, como é o caso da I/R cerebral, essa forma quiescente, a primeira célula residente responsiva à isquemia, é ativada e assume morfologia ameboide, apresentando atividade fagocítica. Essa ativação parece ser diretamente proporcional à duração da isquemia, entretanto, apesar da micróglia ser mais resistente à hipóxia que neurônios e oligodendrócitos, o aumento da durabilidade da hipóxia intensifica a vulnerabilidade e leva a uma diminuição da população microglial (Ronaldson e Davis *et al.*, 2012; Ritzel *et al.* 2015).

Minutos após o início da isquemia, a micróglia produz diretamente e induz o aumento dos níveis de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, de citocinas, quimiocinas e metaloproteinases. Assim, apesar de promover remoção dos debris e facilitar a plasticidade neuronal, a micróglia leva à expansão da lesão tecidual, devido a sua atividade pró-inflamatória (Amantea *et al.*, 2009; Summers *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2014). Inclusive, estudos já mostraram que a minociclina e o SB203580, ao inibirem a ativação microglial, reduziram morte neuronal (Yrjanheikki, 1999; Piao *et al.*, 2003) e endotelial (Yenari *et al.*, 2006). Além disso, a ativação de micróglia contribui para a quebra da BHE, por comprometer as junções oclusivas, aumentando a permeabilidade paracelular e por ativar a via da ciclo-oxigenase 2 (COX-2), produzindo mediadores inflamatórios que promovem o aumento da permeabilidade vascular, como óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e fator de necrose tumoral (TNF)

(Ronaldson e Davis, 2012). Com isso, a infiltração de leucócitos circulantes é facilitada e a resposta inflamatória, amplificada (Yenari *et al.*, 2006, Pun *et al.*, 2009).

O astrócito é o tipo de célula mais abundante do SNC, sendo essencial à sustentação do tecido nervoso e à transferência de nutrientes do sangue para os neurônios. Isso porque ele se associa anatomicamente às células endoteliais, funcionando como uma ponte entre elas e os corpos neuronais. Além disso, o astrócito é importante para remoção de quantidades críticas de glutamato na fenda sináptica, prevenindo a excitotoxicidade (Ronaldson *et al.*, 2012). No entanto, assim como a micróglia, assume um estado de reatividade após isquemia cerebral, contribuindo para a manutenção de um ambiente pró-inflamatório. Yasuda *et al.* (2004) mostraram, em modelo murino de isquemia cerebral focal, uma correlação positiva entre a expressão de proteína glial fibrilar ácida (GFAP), um marcador de reatividade astrocitária, e o aumento da expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS). Além disso, Endoh *et al.* (1994) encontraram aumento da expressão de iNOS em astrócitos reativos presentes no hipocampo poucos minutos após início de isquemia global.

Considerando a íntima relação entre astrócitos e células endoteliais e que eles participam da regulação da permeabilidade microvascular cerebral, a reatividade astrocitária leva ao comprometimento da integridade da BHE, ao romper as junções oclusivas (Ronaldson e Davis, 2012) e promover a secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, além de substâncias vasodilatadoras e moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e vascular-1 (VCAM-1) (Chen e Swanson, 2003).

2.4.2.2. Permeabilidade da barreira hematoencefálica

A BHE é constituída por células endoteliais, que, agrupadas, formam os capilares cerebrais. As células endoteliais do cérebro diferem das demais, devido à presença de junções oclusivas, perda de fenestrações e minimização da atividade pinocítica (Abbott, 2005). Além disso, elas apresentam maior volume mitocondrial, o que propicia alta capacidade de influxo e efluxo de solventes, satisfazendo a alta demanda energética e contribuindo para a manutenção da homeostase do SNC (Oldendorf *et al.*, 1977).

Para garantir sua funcionalidade, a barreira requer suporte de vários tipos celulares, como astrócitos, micróglia, neurônios e pericitos e da matriz extracelular. Ou seja, há comunicação e sinalização entre endotélio e células adjacentes, quebrando o conceito de isolamento e rigidez da BHE (Ronaldson e Davis, 2012). Assim, após AVEi, o endotélio torna-se mais responsivo aos estímulos das células adjacentes e circulantes (por exemplo, plaquetas e leucócitos), processo que, associado à degradação da lâmina basal, resulta em um perfil vascular pró-trombótico e pró-inflamatório, culminando no comprometimento da integridade da BHE (Woodruff *et al.*, 2011).

Conforme discutido anteriormente, a ativação de astrócitos e micróglia pós I/R cerebral contribui para o aumento da permeabilidade vascular. No entanto, outras células, como os pericitos, também apresentam papel relevante. Em condições fisiológicas, essas células, indiferenciadas e contráteis, distribuem-se ao longo dos capilares e induzem a expressão de ocludinas, garantindo a manutenção das junções oclusivas (Ronaldson e Davis, 2012). Hayashi *et al.* (2004) mostraram que a co-cultura de células endoteliais e pericitos reduziu a permeabilidade da monocamada endotelial submetida à hipóxia. Todavia, já foi demonstrado, em ratos, que os pericitos afastam-se do endotélio após AVEi agudo, o que leva ao aumento da permeabilidade da microvasculatura cerebral (Duz *et al.*, 2007).

Além disso, as metaloproteinases da matriz (MMPs), cujo aumento da produção é induzido por mediadores inflamatórios, contribuem para a instabilidade da matriz extracelular e degradação de proteínas da junção oclusiva (claudina-5 e ocludinas). Especificamente, MMP-2 e MMP-9 têm sido fortemente correlacionadas com a I/R cerebral tanto em modelos animais quanto em pacientes que sofreram AVEi (Amantea *et al.*, 2009; Ronaldson e Davis, 2012). Todas essas alterações, associadas ao aumento da expressão de proteínas de adesão ICAM-1 e VCAM-1, devido ao elevado nível tecidual de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, promovem o aumento da transmigração de leucócitos e plaquetas para o cérebro e, portanto, a intensificação dos danos neuronais (Woodruff *et al.*, 2011).

Uma maneira simples de avaliar a permeabilidade da BHE é pelo extravasamento de corantes para o parênquima cerebral, como é o caso do Azul de Evans (AE). Ao se ligar irreversivelmente à albumina, o AE permite uma análise indireta do extravasamento dessa proteína plasmática para o cérebro, condição que só ocorrerá caso a permeabilidade vascular

cerebral esteja aumentada, haja vista que a massa molar da albumina é 65 kDa (Nagaraja *et al.*, 2008; Kassner e Merali, 2015).

O rompimento da BHE é determinante para o prognóstico do paciente, uma vez que está intimamente relacionado com a infiltração de leucócitos periféricos, amplificação da resposta inflamatória e expansão da lesão tecidual e com complicações clínicas recorrentes, como edema cerebral e transformação hemorrágica (Nagaraja *et al.*, 2008; Kleinig e Vink, 2009; Kassner e Merali, 2015).

2.4.2.3. Reperusão e o papel do neutrófilo

A reperusão é uma condição necessária ao reparo tecidual, constituindo o protocolo terapêutico padrão empregado em casos de pacientes que sofreram AVEi. Sabe-se que, dentro de um limite de 3 a 4,5 horas após o início da isquemia, a promoção da reperusão é muito eficiente na recuperação das regiões de penumbra isquêmica e redução das sequelas neurológicas (Dohmen *et al.*, 2008; del Zoppo *et al.*, 2011; Jickling *et al.* 2012; Østergaard *et al.*, 2013). Entretanto, o re-estabelecimento do fluxo sanguíneo também intensifica o processo de neurotoxicidade e neuroinflamação já iniciados por distúrbios metabólicos e células residentes. Isso ocorre devido à infiltração leucocitária, principalmente de polimorfonucleares (PMNs) na fase aguda, e consequente estresse oxidativo promovidos pela reperusão (Witko-Sarsat *et al.*, 2000; Beray-Berthat *et al.*, 2003, Weston *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo estimula o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) e a proteína ativadora-1, além de comprometer o funcionamento de mitocôndrias e retículos endoplasmáticos. Assim, as EROs intensificam o acúmulo de íons Ca^{2+} no citoplasma celular, levando à necrose ou modulando as vias intrínseca e extrínseca da apoptose (Hayashi *et al.*, 2005; Malhotra *et al.*, 2007). Um intenso estresse oxidativo pode causar morte celular por necrose, enquanto que, em grau moderado, induz mecanismos de apoptose, sobretudo na região de penumbra isquêmica (Chen *et al.*, 2011; Ritzel *et al.*, 2015). Na tentativa de conter esse processo, a glutatona, um potente anti-oxidante hidrossolúvel, é produzida em altas quantidades, sendo um importante marcador de estresse oxidativo (Beray-Berthat *et al.*, 2003).

Os mecanismos supracitados ocorrem com a chegada de oxigênio nas regiões isquêmicas, o que ativa as oxidases citoplasmáticas e levam a uma intensa formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Ritzel *et al.*, 2015). Tais substâncias formam os radicais livres, que, por serem moléculas ávidas por prótons reagem espontaneamente com ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas. Os exemplos mais comuns são peróxido, superóxido, radicais contendo o grupamento hidroxila e o óxido nítrico (Woodruff *et al.*, 2011; Fann *et al.*, 2013). A primeira fonte de radicais livres são as mitocôndrias de células residentes, sobretudo da micróglia, por meio do transporte de elétrons na cadeia respiratória. Além disso, o metabolismo do ácido araquidônico, pela ativação das vias da cicloxigenase e lipoxigenase e a infiltração de leucócitos periféricos são outras importantes causas do estresse oxidativo pós I/R cerebral (Woodruff *et al.*, 2011).

Estudos cinéticos mostram que, dentro de horas a dias após a lesão inicial, os neutrófilos são os primeiros a chegarem ao parênquima cerebral, seguido por macrófagos e células *natural killers*. Os linfócitos T e B são detectados mais tardiamente (Kleinig *et al.*, 2009; Fu *et al.*, 2015). Assim, dentro de um processo agudo, o neutrófilo apresenta um papel de destaque. A transmigração desse PMN depende de sua ativação, bem como da ativação endotelial, além da adesão neutrófilo-endotélio, condições que são favorecidas pelo comprometimento da BHE e pelo aumento da expressão de moléculas de adesão (selectinas) na superfície de células endoteliais e de integrinas CD11b/CD18 na superfície de neutrófilos (Garcia *et al.*, 1994; Amantea *et al.*, 2009; Kenne *et al.*, 2012). A adesão dos neutrófilos ao endotélio pode obstruir a microvasculatura cerebral, fenômeno conhecido como *no-reflow*. Aliado a esse processo, a agregação plaquetária contribui para o aumento da viscosidade e alteração das propriedades reológicas do sangue, dificultando seu fluxo (Aspey *et al.*, 1989; Matsuo *et al.*, 1994).

Outro mecanismo envolvido no agravamento das lesões isquêmicas pelos neutrófilos é a liberação de radicais livres devido à atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) oxidase e mieloperoxidase (MPO). Além dessas enzimas, os grânulos neutrofílicos contêm elastase, gelatinase B (MMT-9) e catepsina G, que degradam colágeno e elastina da matriz extracelular e contribuem para o comprometimento da integridade da BHE, facilitando a transmigração de mais leucócitos e infiltração no parênquima cerebral (Witko-Sarsat *et al.*, 2000; Beray-Berthat *et al.*, 2003). Os neutrófilos apresentam vários receptores acoplados à proteína G, os quais promovem quimiotaxia, adesão e degranulação. Tais

receptores são ativados por quimiocinas e citocinas, sistema do complemento, leucotrienos e PAF (Yokomizo *et al.*, 1997). Dentre eles, destacam-se CXCR1 e CXCR2, que, ao serem ativados pelas quimiocinas CXCL1, CXCL2 e CXCL8, garantem ativação e recrutamento de neutrófilos (Richardson *et al.*, 2003; Nasser *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2009). Além disso, neutrófilos podem produzir proteína inflamatória de macrófagos, MIP-1 α e MIP-1 β , e proteína quimiotática de monócitos (Cassatella, 1999).

Vários trabalhos mostraram que a infiltração de neutrófilos no parênquima cerebral leva a uma expansão do infarto cerebral e que a depleção de infiltração de neutrófilos promove redução da lesão (Barone e Feuerstein, 1999; Garcia *et al.*, 1994; Tu *et al.*, 2009). Entretanto, esses trabalhos não comprovam, cineticamente, se há aumento significativo da lesão após a infiltração de neutrófilos ou se essas células chegam ao parênquima cerebral como uma resposta e não como um fator determinante do ápice dos eventos de neurotoxicidade em um processo agudo de I/R (Hayward *et al.*, 1996; Emerich *et al.*, 2002; Easton, 2013).

2.4.2.4. *Mediadores inflamatórios*

Os mediadores inflamatórios exercem efeitos deletérios importantes na progressão da fisiopatologia do AVE, mas também são essenciais ao reparo da lesão. Assim, algumas citocinas, como IL-1 β , IL-6 e TNF, atuam exacerbando danos neuronais, enquanto outras promovem neuroproteção, por exemplo, a IL-10 e o TGF- β (Amantea *et al.*, 2009; Fann *et al.*, 2013).

Sabe-se que a regulação positiva de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, bem como a produção de moléculas de adesão e a infiltração neutrofílica são eventos que marcam a fase aguda da I/R cerebral (Tuttolomondo *et al.*, 2009). Nesse contexto, a micróglia ativada destaca-se pela alta produção de IL-1 β e TNF, o que leva a disfunções e morte celular, sobretudo na região de penumbra. Os astrócitos reativos também participam do quadro pró-inflamatório desenvolvido horas após o início da isquemia cerebral (Summers *et al.*, 2009; Woodruff *et al.*, 2011; Ritzel *et al.*, 2015). A manutenção de altos níveis dos mediadores inflamatórios é garantida também pela infiltração de leucócitos periféricos, principalmente de neutrófilos na fase aguda, devido ao aumento da permeabilidade da BHE (Tuttolomondo *et al.*, 2009; Ronaldson e Davis, 2012).

Citocinas são glicoproteínas que agem como mensageiros intercelulares, capazes de induzir a produção de outros mediadores e de direcionar o recrutamento de células com perfil pró ou anti-inflamatório (Allan e Rothwell, 2001). No AVEi, as citocinas mais estudadas e, aparentemente, mais atuantes na fisiopatologia da doença são IL-1 β , TNF, IL-6, IL-10 e TGF- β (Han e Yenari, 2003). Além das células imunológicas e da glia, neurônios, células endoteliais e plaquetas também produzem essas glicoproteínas (Sairanen *et al.*, 2001).

A IL-1 β , rapidamente liberada por células cerebrais, exerce efeitos autócrinos e parácrinos ao ligar-se a receptores específicos, desencadeando assim uma cascata de sinalização, que resulta na ativação das vias de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e NF- κ B (Fann *et al.*, 2013). Dessa forma, a expressão gênica de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e de moléculas de adesão é aumentada, contribuindo para a lesão de reperfusão (Allan *et al.*, 2005; Denes *et al.*, 2011). Esse processo é agravado, ciclicamente, com a chegada de leucócitos circulantes, que, ao serem recrutados e ativados, liberam mais IL-1 β . Além disso, proteases derivadas de neutrófilos e macrófagos estão relacionadas com a clivagem da pro-IL-1 β a IL-1 β , forma ativada da citocina (Amantea *et al.*, 2014).

O TNF também está envolvido no desenvolvimento de lesões cerebrais isquêmicas e é rapidamente expresso após início da isquemia, pelas células residentes. Assim como a IL-1 β , TNF também ativa as vias MAPK e NF- κ B e promove deterioração da BHE, bem como a morte celular neuronal (Tuttolomondo *et al.*, 2009), estando relacionado com apoptose neuronal (Robertson *et al.*, 2001). A via da fosfolipase A₂ (PLA₂) é induzida pelo TNF (Ronaldson e Davis 2012), resultando no metabolismo do ácido araquidônico (gerando prostaglandinas e leucotrienos) e da liso-glicerilfosforilcolina (responsável pela produção de PAF). Wu *et al.* (2014) descreveram uma correlação positiva entre o aumento de IL-1 β e TNF na isquemia cerebral focal, associando-a a danos neurológicos.

O papel da IL-6 na I/R cerebral ainda é controverso (Amantea *et al.*, 2009). Apesar de seus níveis estarem aumentados no período em que há formação e extensão da lesão e de exercer, juntamente com IL-1 β e TNF, hiper-regulação do processo inflamatório, estudos em ratos demonstram um perfil anti-inflamatório dessa citocina, promovendo neuroproteção (Loddick *et al.*, 1998; Yamashita *et al.*, 2005).

A IL-10 e o TGF- β são citocinas com perfil anti-inflamatório, sendo importantes no reparo da lesão e neuroproteção. IL-10 é uma citocina pleiotrópica produzida, predominantemente, pela micróglia. Estudos *in vitro* indicam que essa citocina exerce efeito direto de proteção neuronal endógena contra excitotoxicidade (Sharma *et al.*, 2011). Em humanos, baixos níveis de IL-10 estão relacionados a maior risco de desenvolver AVE (van Exel *et al.*, 2002). Já o TGF- β é um peptídeo relacionado à modulação do ciclo e diferenciação celular e formação de matriz extracelular, sendo importante na remodelação tecidual após isquemia cerebral (Wang *et al.*, 1995).

Quimiocinas são peptídeos regulatórios responsáveis pelo recrutamento de leucócitos para o local da lesão e pela comunicação intercelular (Amantea *et al.*, 2009). Elas podem ser divididas em duas subfamílias: CC e CXC, sendo a primeira, predominantemente, mas não exclusivamente, responsável pela quimiotaxia de monócitos; e a segunda, pela de neutrófilos (Stanimirovic e Satoh, 2000). Conforme mencionado anteriormente, as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF promovem a supra-regulação dessas quimiocinas após isquemia e reperfusão cerebral, as quais, ao atrair leucócitos, levam ao aumento da concentração das referidas citocinas, o que caracteriza uma cascata cíclica de amplificação da resposta inflamatória (Tuttolomondo *et al.*, 2009). Alguns trabalhos têm mostrado que as quimiocinas CCL2, CCL3 e CCL5 desempenham um papel importante na inflamação do SNC (Banisor *et al.*, 2005; Chui e Dorovini-Zis, 2010). A fractalcina (CX3CL1) é superexpressa por neurônios e células endoteliais cerebrais e parece estar envolvida na sinalização neurônio-micróglia, sendo importante na ativação de células microgliais. Outras quimiocinas importantes, sobretudo na fase aguda da I/R cerebral, são a CXCL1 e CXCL2, que, por meio da ativação do receptor CXCR2 induzem uma potente quimioatração de neutrófilos (Brait *et al.*, 2011).

2.5. Fator ativador de plaquetas e AVE

O PAF (1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfolina) é um mediador fosfolipídico liberado por muitos tipos celulares, tais como plaquetas, micróglia, monócitos/macrófagos, neutrófilos e células endoteliais, que contribui para a patogênese da inflamação, choque endotóxico e lesão tecidual induzida por lipopolissacarídeo. O PAF desempenha um duplo papel no SNC. Quando presente no tecido nervoso em níveis fisiológicos, modula a potenciação de longa

duração, aumentando a plasticidade neuronal e atua na formação da memória. Entretanto, quando produzido em excesso, torna-se um potente mediador pró-inflamatório (Braquet *et al.*, 1987; Aspey *et al.*, 1997; Bozlu *et al.*, 2007; Belayev *et al.*, 2008). Segundo Panetta *et al.* (1989), os níveis de PAF cerebral em gerbilos aumentam em resposta a cinco minutos de oclusão bilateral das carótidas em estágios iniciais de reperfusão. Essa variação de concentração para determinar um perfil pró-inflamatório é bastante sutil, haja vista que apenas 0,1 nM de PAF já são o suficiente para obtenção de efeito fisiológico (Kumar *et al.*, 1988). Além da baixa biossíntese, a curta meia-vida de PAF, devido à rápida metabolização pela enzima PAF acetilhidrolase (PAF-AH), mantêm o nível basal desse fosfolípídeo bem abaixo do encontrado em condições patológicas (Karasawa *et al.*, 2003).

A biossíntese do PAF pode ocorrer por duas vias, a “de novo”, fisiológica, e a de remodelação, predominante em situações patológicas. A via “de novo” produz quantidades muito baixas de PAF, partindo de um glicerofosfato e, após três etapas, incluindo adição dos grupos colina e acetil, forma o PAF. A via de remodelação é concluída em duas etapas, nas quais glicerofosfocolinas de membrana, por ação da PLA₂, são convertidas em liso-PAF, que é acetilado, formando PAF. Em ambas as vias, a enzima acetiltransferase é essencial (MacLennan *et al.*, 1996; Sato e Ebina, 2013). Isso porque a molécula de PAF tem sua atividade biológica garantida devido à presença do grupamento acetil na posição sn-2 do glicerol (Figura 2). Assim, a metabolização desse fosfolípídeo envolve a enzima PAF acetilhidrolase, que, como o próprio nome diz, remove esse grupamento acetil, formando, predominantemente, o liso-PAF (Figura 2). A PAF-AH está presente tanto no ambiente intracelular quanto no plasma (Arai *et al.*, 2002).

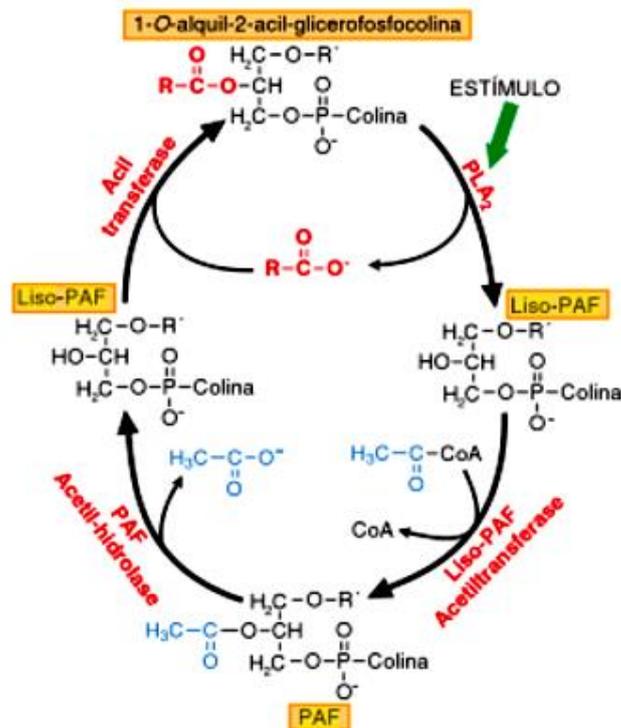


Figura 2. Biossíntese e metabolismo do PAF pela via de remodelação. Em azul, o grupo acetil, inserido pela liso-PAF acetiltransferase, ocupando a posição 2 e garantindo a atividade biológica da molécula de PAF. Em uma reação inversa, observa-se a remoção desse grupo pela acetilhidrolase, convertendo PAF a liso-PAF. A via de remodelação inicia-se com a ativação de fosfolipase A₂, devido aos distúrbios metabólicos promovidos pela isquemia cerebral.

Fonte: Goodman e Gilman, 2012.

2.5.1. Papel do PAF na fisiopatologia do AVEi

Minutos após o início da isquemia cerebral, ocorre rápida liberação de ácidos graxos essenciais não esterificados (ácidos araquidônico e docosahexaenóico), bem como de lisofosfolídeos, pela ação da fosfolipase A₂. O ácido araquidônico é metabolizado em leucotrienos (LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄) e prostaglandinas; enquanto lisofosfolídeos são convertidos em PAF, cuja concentração, durante a I/R cerebral e em outras condições patológicas envolvendo estresse oxidativo, aumenta excessivamente (He e Bazan, 2006; Cui *et al.*, 2007; Belayev *et al.*, 2012), conforme já discutido.

O PAF, em altas concentrações, promove aumento da liberação não específica de glutamato, principalmente no hipocampo, bem como a inibição de sua recaptção. Acredita-se que o aumento da ativação do receptor de glutamato NMDA, devido às disfunções metabólicas promovidas pelo déficit de oxigênio, estimula a liberação de óxido nítrico e PAF, os quais,

por sua vez, amplificam a expressão e atividade de NMDA, aumentando o influxo celular de cálcio. Portanto, o PAF está diretamente envolvido na intensificação da excitotoxicidade e consequente formação da zona central de lesão (MacLennan *et al.*, 1996; Boetkjaer *et al.*, 2007).

O aumento da concentração de Ca^{2+} microglial promovido pelo PAF é significativo, devido à alta expressão de receptor de PAFR por essas células. Com isso, PAF contribui para a ativação de micróglia e para o consequente aumento dos níveis de IL-1 β , TNF e EROs no cérebro. Como a micróglia é capaz de produzir PAF e os astrócitos e células endoteliais possuem receptor para este mediador, ele exerce um efeito autócrino e parácrino, que amplifica a neuroinflamação promovida pelas células residentes (Mori *et al.*, 1996; Amantea *et al.*, 2009, Wu *et al.*, 2014). Além disso, PAF induz apoptose cerebral e hipocampal (Umemura *et al.*, 2007); aumento da expressão de COX-2 (Boetkjaer *et al.*, 2007); comprometimento da BHE, devido ao aumento da produção de MMP-2 e MMP-9 e de moléculas de adesão (Kumar *et al.*, 1988; Fang *et al.*, 2011; Lacerda-Queiroz *et al.*, 2012; Fang *et al.*, 2014); aumento da quimiotaxia e infiltração de leucócitos no parênquima cerebral (Uhl *et al.*, 1999), os quais produzem mais PAF. Estudos mostraram uma relação direta entre aumento da liberação de PAF, acúmulo de neutrófilo no cérebro e indução da produção de EROs por esse PMN, após I/R cerebral (Matsuo *et al.* 1994).

Assim, a reperfusão, ao manter um ambiente de estresse oxidativo e permitir a transmigração leucocitária para o cérebro é importante para a manutenção de altas concentrações de PAF durante algumas horas, culminando no aumento na expansão da área central isquêmica por mecanismos tardios de apoptose e inflamação induzidos pela ativação de PAFR, principalmente na região de penumbra.

2.5.2. Receptor de PAF

O PAF liga-se a um receptor único, que é expresso tanto na superfície da membrana plasmática quanto na membrana nuclear (Mori *et al.*, 1996; Ishii e Shimizu, 2000). O PAFR possui sete domínios transmembrana e fica acoplado à proteína G (MacLennan *et al.*, 1996; Shimizu, 2009; Balestrieri *et al.*, 2010). Assim, ao ser estimulado, cascatas intracelulares de sinalização são ativadas via fosfolipase C (aumentando a concentração intracelular de cálcio e

ativando tirosina cinases), fosfolipase A₂ (culminando na produção de eicosanoides) e fosfolipase D (produzindo ácido fosfatídico, precursor de glicerofosfatos). Dessa forma, o PAF exerce potente efeito pró-inflamatório quando em altas concentrações (MacLennan *et al.* 1996).

As diferenças estruturais entre o PAF e seus precursores garante efetiva interação com os sítios ligantes do receptor. Já foi demonstrado que alterações nas posições 1 (grupo éter), 2 (grupo acetil) e 3 (grupo colina) da molécula de PAF promovem intensa redução ou até mesmo eliminam a afinidade entre esse fosfolípídeo e seu receptor. Portanto, o equilíbrio entre biossíntese e metabolização de PAF é essencial à regulação fisiológica do PAFR (Chao e Olson, 1993). Nesse contexto, a supressão da expressão ou antagonismo do receptor de PAF é um alvo terapêutico interessante para a redução das sequelas do AVEi.

2.5.3. Modelos animais envolvendo inibição de PAF ou de seu receptor

Atualmente, muitos mecanismos envolvendo neuroproteção têm sido estudados em modelos de AVE. Conceitualmente, a neuroproteção é uma consequência do emprego de estratégia ou conjunto de estratégias que visam à inibição de eventos bioquímicos e moleculares capazes de levar a danos neuronais irreversíveis (Ginsberg, 2008). Apesar de todas as limitações que dificultam a extrapolação dos achados pré-clínicos para aplicação clínica em humanos, estudos experimentais *in vitro* e, sobretudo, os envolvendo modelos animais de I/R cerebral fornecem dados importantes, reprodutíveis e comprovam que a neuroproteção é um caminho viável e promissor na melhora do prognóstico pós AVE (Ginsberg, 2008; Casals *et al.*, 2011; Fluri *et al.*, 2015).

Nesse sentido, alguns modelos já demonstraram o papel do PAF e de seu receptor na fisiopatologia do AVEi. Umemura *et al.* (2007) avaliaram o efeito da superexpressão da enzima PAF-AH humana em camundongos transgênicos, que foram submetidos à isquemia focal transitória. Nesse estudo foi encontrada, após 24 horas de reperfusão, redução de déficits neurológicos, associada à diminuição do volume de lesão tecidual, do edema e da apoptose no córtex e hipocampo dos animais transgênicos quando comparados aos selvagens. Posteriormente, Wu *et al.* (2014), por meio da administração de PAF-AH recombinante em camundongos submetidos à I/R focal, mostraram que o metabolismo de PAF a seu precursor

inativo promove neuroproteção, devido à redução da expressão de metaloproteinases e aumento da expressão de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF).

O bloqueio farmacológico de PAFR também tem sido bastante estudado, apresentando resultados positivos. Atualmente, já existe uma série de antagonistas desse receptor, que podem ser classificados, quanto à obtenção, em substâncias naturais, semi-sintéticas ou sintéticas (MacLennan *et al.*, 1996). O ginkgolídeo B é uma terpeno lactona, naturalmente encontrada no Ginkgo biloba, que funciona como antagonista seletivo de PAFR (Smith *et al.*, 1996; Akiba *et al.*, 1998). Yang *et al.* (2011) mostraram que o pré-tratamento com essa substância, resultou em redução de excitotoxicidade em modelo focal de I/R cerebral em ratos. O WEB 2086, um benzodiazepínico sintético que funciona como antagonista seletivo de PAFR, reduziu o volume de lesão cortical tanto ao ser administrado previamente à oclusão permanente da artéria cerebral média quanto posteriormente (Bielenberg *et al.*, 1992). Similarmente, Belayev *et al.* (2008, 2012) encontraram uma melhora significativa dos parâmetros comportamentais, associada à neuroproteção, em ratos submetidos à I/R focal e tratados duas horas após início da reperfusão com LAU-0901, outro antagonista de PAFR.

Dentre os modelos animais de AVE, os principais são isquemias focal (redução focal do fluxo sanguíneo encefálico), global (redução global do fluxo sanguíneo encefálico) e hipóxica, que podem ser permanentes ou transitórias, neste último caso, havendo reperfusão (Woodruff *et al.*, 2011). O modelo de isquemia cerebral global transitória é menos invasivo que o focal (Tajiri *et al.*, 2003) e é representativo do quadro de pacientes que sofreram AVE após parada cardíaca, choque ou cirurgias cardíacas complexas (Murkin, 1999).

Considerando o intenso aumento de PAF na resposta inflamatória aguda e os resultados promissores da inibição desse fosfolípídeo e de seu receptor na redução das sequelas neurológicas e promoção de neuroproteção, no presente trabalho, avaliou-se o efeito da deficiência de PAFR em camundongos C57BL/6 submetidos à I/R global transitória por oclusão bilateral das carótidas comuns, após 24 horas de reperfusão.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar o efeito do PAFR nas alterações histopatológicas e nos parâmetros inflamatórios e apoptóticos presentes no SNC de camundongos submetidos à isquemia e reperfusão cerebral por oclusão bilateral transitória das carótidas comuns.

Para tanto, os animais serão subdivididos nos seguintes grupos:

Sham: selvagem (WT) e deficientes para receptor de PAF (PAFR^{-/-}).

Submetidos à oclusão bilateral das carótidas comuns (BCCAo): WT e PAFR^{-/-}.

3.2. Objetivos específicos

1. Avaliar o déficit neurológico nos camundongos BCCAo.
2. Comparar as áreas acometidas e mensurar a frequência de alterações patológicas, bem como a extensão das lesões nos camundongos BCCAo.
3. Quantificar os níveis teciduais de TNF, IL1- β e CXCL1 nos camundongos *sham* e BCCAo.
4. Avaliar apoptose no cérebro, por meio da quantificação da expressão da proteína caspase-3 clivada, no cérebro dos camundongos *sham* e BCCAo.
5. Avaliar a permeabilidade da barreira hematoencefálica no encéfalo dos camundongos *sham* e BCCAo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos, entre nove e onze semanas de idade, da linhagem C57BL/6 (WT), obtidos no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-ICB-UFMG) e PAFR^{-/-} com *background* genético de C57BL/6, cedidos pelo Dr. Takao Shimizu (Universidade de Tokyo, Japão). Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (24°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso à água e ração. Os camundongos foram divididos em quatro grupos, segundo o delineamento experimental ilustrado pela figura 3. Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, sob o número de protocolo 232/2014.

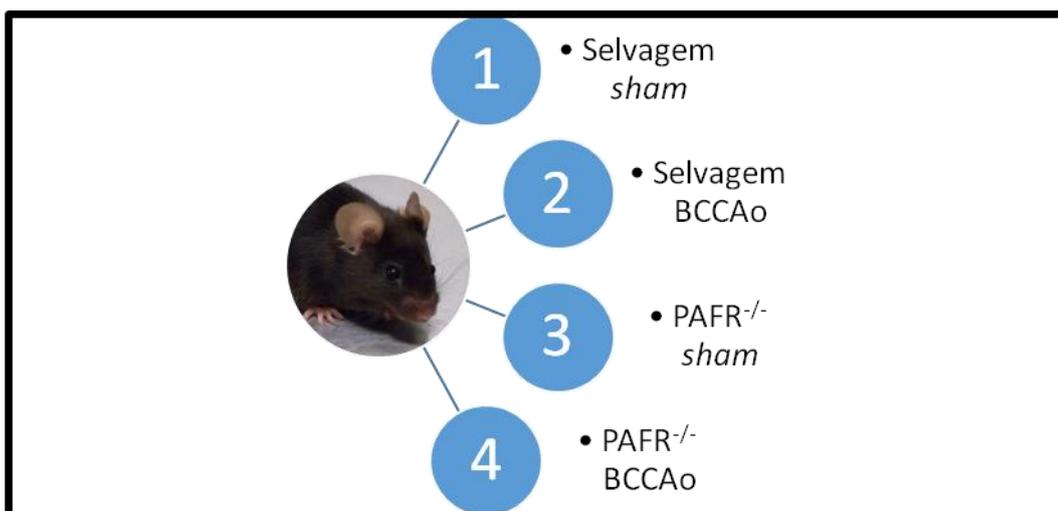


Figura 3. Delineamento experimental. Subdivisão dos animais selvagens em *sham* (1) e submetidos à oclusão bilateral das carótidas comuns (BCCAO) (2); subdivisão dos animais PAFR^{-/-} em *sham* (3) e BCCAO (4).

4.2. Indução da isquemia e reperfusão

Para indução da I/R, os camundongos foram previamente anestesiados, via intraperitoneal, com uma mistura de 100 mg/kg de cloridrato de cetamina 10% (Syntec) e 10 mg/kg de cloridrato de xilazina 2% (Syntec), sendo a dose administrada individualizada por peso, considerando a proporção de 0,1 mL de anestésico/10 g de massa do animal. Após tricotomia e antisepsia da região cervical com digluconato de clorexidina 10 mg/mL (Asseptcare, Neo

Química), foi realizada incisão cervical mediana longitudinal, seguida de dissecação subcutânea e afastamento dos músculos até o plano vascular e exposição das artérias carótidas comuns. Então, estas foram, cuidadosamente, separadas do nervo vago e ocluídas. A oclusão foi feita isolando-se e clampeando as artérias carótidas comuns, com cliques cirúrgicos não traumáticos durante 25 minutos (Figura 4 A e B). Após esse período, os cliques foram removidos e a sutura da incisão, feita com fio mononylon 5.0. A circulação foi restabelecida e mantida por 24 horas, conforme Costa *et al.* (2015), ou seja, os animais foram submetidos a uma isquemia global transitória. Procedimentos similares, com exceção do clampeamento das artérias, foram realizados nos animais WT *sham* e PAFR^{-/-} *sham*. O procedimento cirúrgico foi realizado com auxílio de uma lupa estereoscópica (Quimis, São Paulo, Brasil) com aumento de 4 vezes. Ao final da cirurgia, os animais foram alocados em gaiolas e permaneceram nas mesmas por 24 horas. Após esse período, anestésico com concentração três vezes superior à administrada para sedação foi aplicado, via intraperitoneal, a fim de garantir a morte dos animais antes da coleta dos encéfalos.

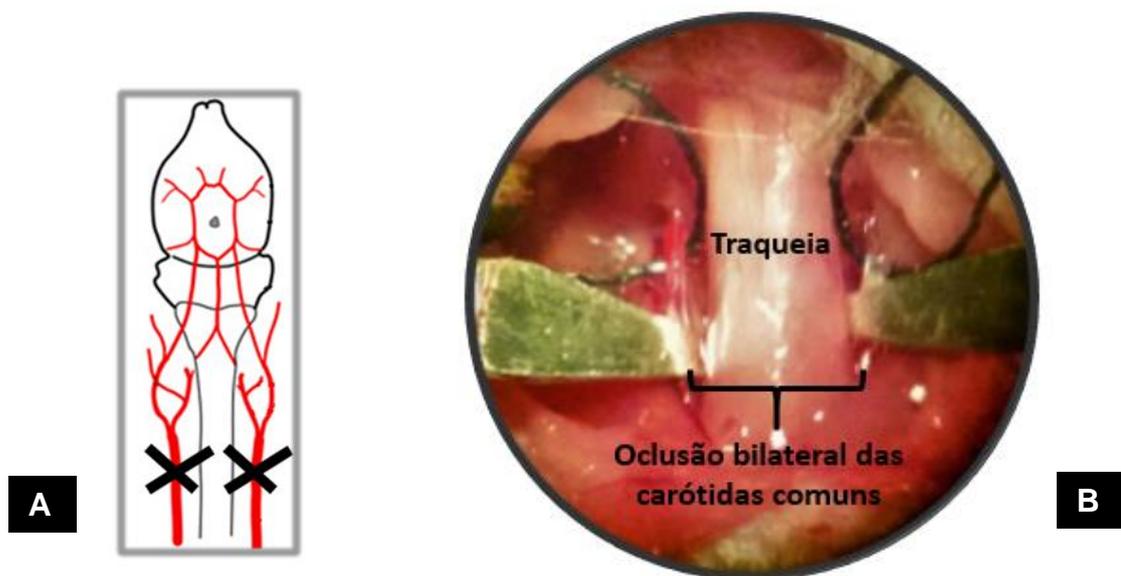


Figura 4. Anatomia vascular cerebral de camundongos (vista ventral) e representação da oclusão das carótidas comuns. Fonte: adaptado de Engel *et al.*, 2011 (A). Incisão cervical mediana, mostrando o clampeamento bilateral das artérias carótidas comuns (B).

4.3. Análise do Déficit Neurológico

O déficit neurológico dos quatro grupos foi avaliado 24 horas após início da reperfusão. Cada camundongo foi avaliado, visualmente, em relação a suas condições motoras e sinais clínicos. O método de avaliação foi adaptado de Adhami *et al.* (2006), de forma que os animais receberam escore de 0 a 5 como segue: 0: ausência de déficit neurológico; 1: ataxia e/ou ptose; 2: andar em círculos; 3: ataxia, ptose e andar em círculos; 4: imobilidade; 5: morte após recuperação da anestesia. Durante a reperfusão, os camundongos foram mantidos nas caixas, com água e ração disponíveis.

4.4. TTC e histologia

Os camundongos foram mortos após 24 horas de reperfusão e os encéfalos, retirados e colocados em salina gelada até o momento de efetuar as secções. Os encéfalos foram cortados no plano coronal com, aproximadamente, 2 mm de espessura e, em seguida, imersos em solução TTC 2%. As fatias permaneceram incubadas em temperatura de 37°C por um período de vinte minutos, técnica adaptada de Bederson *et al.* (1986). O TTC, incolor na forma oxidada, ao ser reduzido pela succinato desidrogenase mitocondrial é convertido em formazana (coloração avermelhada). Assim, as células mortas (com enzimas inativas), permanecem esbranquiçadas, correspondendo à área de infarto (Tu *et al.*, 2009).

Em seguida, os cortes permaneceram em formol tamponado a 10% (p/v), durante 24 horas. Após esse período, as secções foram fotografadas com câmera digital da marca Samsung com resolução de 12.2 Megapixels, utilizando o aumento de quatro vezes da lupa estereoscópica. Por meio das fotografias obtidas, mensurou-se a razão entre a área de infarto e a área total da secção, em porcentagem. Como a lesão isquêmica é detectada pela coloração negativa, após imersão em TTC, a mensuração da área de infarto foi realizada por meio da contagem de “pixels” brancos, binarizando-se a imagem, utilizando o *software ImageJ* (Figura 5). Os dados obtidos foram expressos como porcentagem da área de infarto em relação à área total.

Posteriormente, as amostras foram processadas para a obtenção de lâminas histológicas e coradas em H&E, para posterior análise descritiva e morfométrica. Para tanto, as secções foram desidratadas em soluções alcoólicas de concentração crescente, diafanizadas em xilol e

incluídas em parafina. Os blocos foram cortados e processados em micrótomo para obter-se secções de 5 µm de espessura em intervalos de 10 µm.

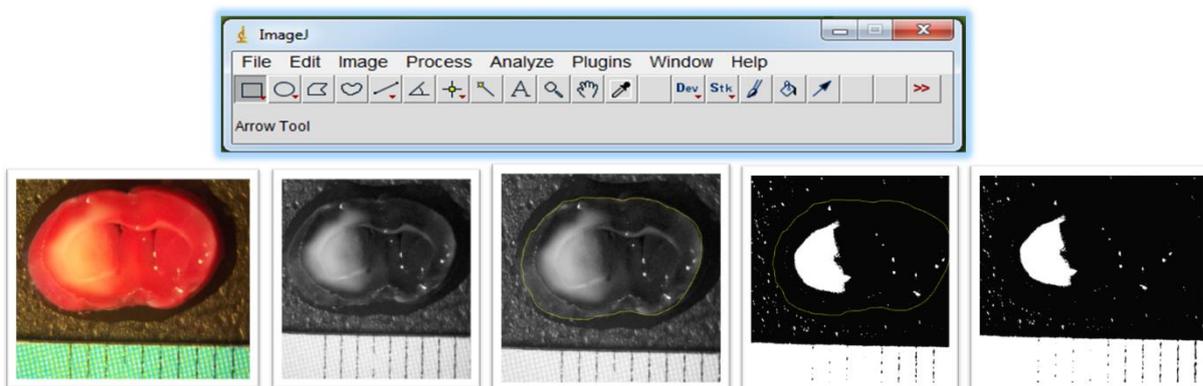


Figura 5. Análise morfométrica da macroscopia. Etapas para mensuração da área de infarto em relação à área total, utilizando o software *ImageJ*.

Fonte: SILVA, 2014.

Para análise histomorfométrica, foram selecionadas duas secções por animal, incluindo áreas das regiões próximas aos bregmas -0.82 mm e -1.64 mm do encéfalo (*Mouse Brain Atlas*), abrangendo córtex cerebral próximo ao diencéfalo e hipocampo. Utilizando o sistema de captura com microcâmera SPOT Basic® 3.4.5 adaptada em um microscópio Olympus (BX-40) na ocular de 20 vezes, capturou-se, aleatoriamente, 20 imagens de cada secção, totalizando 40 imagens por animal. A área tecidual total e de cavitações necróticas foram mensuradas por meio do *software ImageJ*, a fim de se calcular a razão entre área de cavitação necrótica e área tecidual total (Figura 6 A). Esse procedimento foi realizado para cada imagem e, ao final, os resultados foram expressos em porcentagem de área de lesão por animal. Além disso, quantificou-se a frequência de neurônios isquêmicos e espongiöse nas 40 imagens histológicas, com identificação de 25 pontos equidistantes por imagem, segundo Pereira *et al.*, 2013. A contagem de pontos foi feita, separadamente, para cada um dos parâmetros. Ao final da análise, considerou-se os mil pontos analisados (40 imagens com 25 pontos cada uma) como 100% para calcular a frequência de áreas de neurônios isquêmicos e espongiöse, em porcentagem, por animal. As imagens foram analisadas com utilização do *software Corel Draw®* versão 7.468 (Figura 6 B).

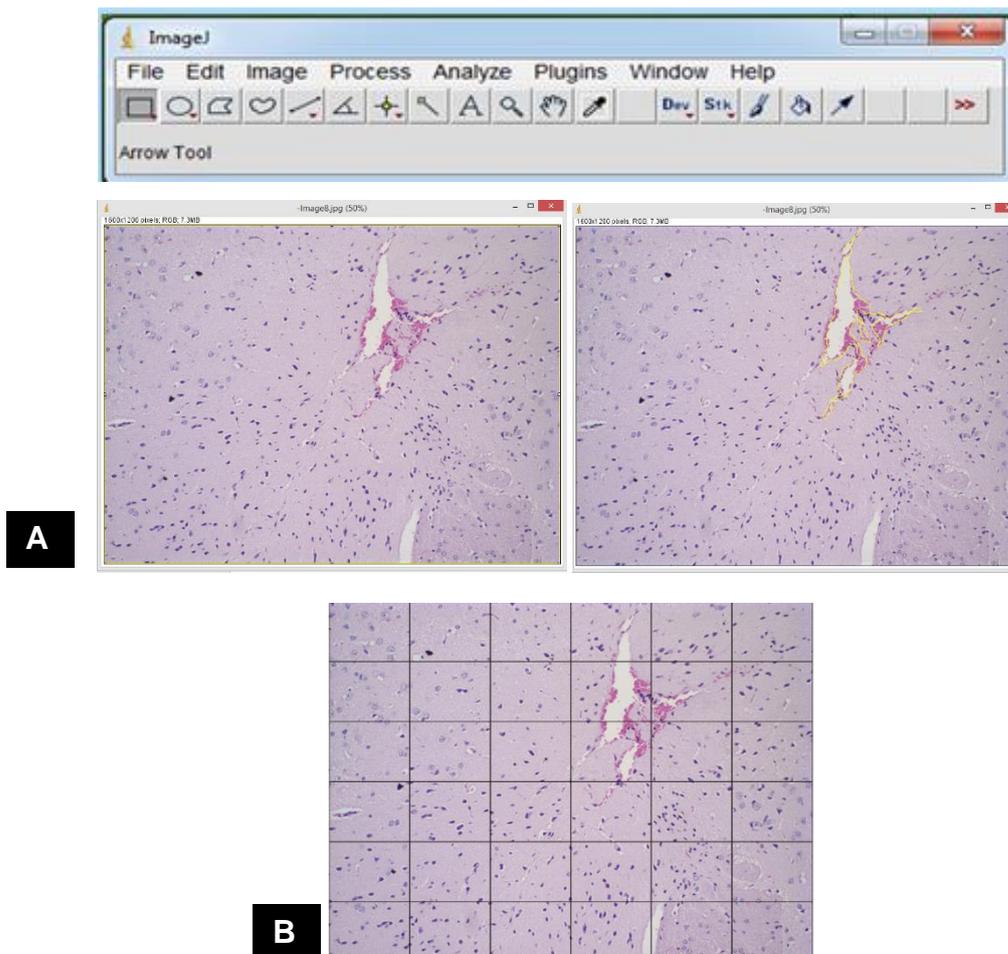


Figura 6. Análise histomorfométrica. Etapas para mensuração das áreas de cavitação necrótica em relação à área tecidual total, pelo software ImageJ (A). Sobreposição da graticula de 25 pontos equidistantes à imagem histológica, a fim de estimar a frequência de áreas de neurônios isquêmicos e/ou espongiose (B).

4.5. Determinação das concentrações de citocinas/quimiocinas (ensaio imunoenzimático - ELISA)

Concentrações das citocinas TNF e IL1- β e da quimiocina CXCL1 foram mensuradas no hemisfério esquerdo do cérebro por ensaio imunoenzimático ELISA, utilizando-se anticorpos *R&D Systems* (Minneapolis, EUA) de acordo com protocolo recomendado pelo fabricante. Os hemisférios cerebrais esquerdos dos camundongos foram coletados e armazenados em *freezer* a -80°C até o processamento. Para esta etapa, as amostras foram pesadas (padronizando um intervalo entre 99,6 e 100,4 mg de tecido cerebral) e submersas em 1mL de solução inibidora de proteases (NaCl 0,4M; Tween 20 0,05%, albumina sérica bovina (BSA) 0,5%; fluoreto de fenilmetilsufonila (PMSF) 0,1 mM; cloreto de benzetônio 0,1 mM; EDTA 10 mM; 20 UI de aprotinina), a qual foi previamente diluída em solução tampão fosfato-salino (PBS) 1x. As amostras foram maceradas por um homogeneizador de tecidos (*Power Gen 125*,

Fisher Scientific) a uma velocidade média e a solução resultante, centrifugada a 4 °C e 10.000 RPM, durante 10 minutos. O sobrenadante do homogenato cerebral foi recolhido, alíquotado e estocado em congelador a -20°C até utilização para o ensaio imunoenzimático. Resumidamente, anticorpos de captura específicos (diluído em solução de PBS 1x e BSA 0,1%) foram adicionados às placas de 96 poços (Maxisorb) e incubados por 18 horas a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo 0,05% Tween-20 e bloqueadas por 2 horas com solução de PBS 1x e BSA 1% à temperatura ambiente. As amostras e o padrão para citocinas foram diluídos (em PBS 1x e BSA 0,1%) e incubados por 18 horas a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas três vezes (com PBS contendo Tween-20). Então, a placa foi incubada com anticorpos biotinilados (de detecção) durante duas horas. Adicionou-se uma solução contendo streptavidina ligada à peroxidase (*Pharmingen*), mantendo o sistema em repouso por 20 minutos. Feito isso, as placas foram novamente lavadas e adicionou-se tampão contendo ortofenildiamina (OPD, Sigma) e peróxido de hidrogênio (Merck). A reação foi interrompida adicionando-se ácido sulfúrico 1N (Merck). A densidade óptica foi quantificada com o uso do espectrofotômetro (*Status - labystems, Multiskan RC, Uniscience* do Brasil) no comprimento de onda de 490 nm. Todos os passos de incubação (exceto *overnight*) foram feitos à temperatura ambiente.

4.6. Avaliação da expressão de caspase-3 clivada no cérebro por Western Blotting

4.6.1. Obtenção dos extratos proteicos

Após coleta, o hemisfério direito do cérebro foi lisado pela adição de 700 µL de solução de lise (0,5% p/v de NP-40, 100 mM de Tris/HCl pH 8,0, 10% de glicerol, 0,2 mM de EDTA, 1 mM de NaVO₃, 1 mM de DTT, 1 mM de PMSF, 200 mM de NaCl, 25 mM de NaF, leupeptina e aprotinina) e deixado em banho de gelo por 15 minutos. Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 10.000 RPM por 15 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante alíquotado e mantido a -20 °C até o momento de uso.

4.6.2. Quantificação de proteínas dos extratos proteicos

Foi utilizado o kit *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories) baseado no método do corante Bradford para dosagem das proteínas totais obtidas das células do experimento *in*

vivo. Estes ensaios foram feitos em placas de 96 poços específicas para testes colorimétricos. Para tal, foram adicionados 2 µL de cada amostra à 200 µL do corante (diluído cinco vezes em água destilada), em duplicata. Paralelamente, foram construídas curvas padrão por meio da diluição de uma solução padrão de BSA. Após 5 minutos de incubação, a leitura foi feita em espectrofotômetro (*Spectra Max 190, Molecular Devices*) no comprimento de onda de 595 nm. Os valores das absorbâncias das amostras foram interceptados na curva padrão para o cálculo da concentração proteica, expressa em mg/mL.

4.6.3. Western Blot para análise da expressão de caspase-3 clivada

Após a quantificação das amostras, os extratos proteicos totais (60 µg para caspase-3 clivada) foram desnaturados em banho seco (LGC *biotechnology*), após a mistura da amostra com tampão LB 5x (10% SDS, 10% 2-mercaptanol, 40% glicerol, 0,05% azul de bromofenol, 0,250M Tris/HCL pH 6.8) a 100°C por 5 minutos. Em seguida, os extratos foram fracionados em gel de 15% de poliacrilamida/SDS e submetidos à eletroforese a uma tensão de 100 V. Ao final da corrida, os extratos proteicos foram transferidos para membrana de nitrocelulose (*Hybond ECL, GE healthcare*) previamente equilibrada em tampão de transferência. Posteriormente à transferência, as membranas foram bloqueadas com PBS-Tween 0,1% contendo 5% de leite em pó desnatado, lavadas com PBS-Tween, e incubadas com o anticorpo de interesse a 4°C por uma noite. Os anticorpos utilizados foram anti caspase-3 clivada (1:1000) (*Cell Signaling Technology*) e anti β-actina (1:5000) (Sigma - Aldrich) e anticorpos secundários conjugados à peroxidase (1:3000) (*Santa Cruz Biotechnology*). Após nova lavagem com PBS/Tween e incubação durante 1 hora à temperatura ambiente com o respectivo anticorpo secundário ligado à peroxidase, as membranas foram incubadas em solução reveladora “ECL-Plus” (*GE Healthcare*), expostas contra filme de raio X (*Hyperfilm ECL*) e reveladas utilizando-se revelador e fixador (Kodak), seguindo as recomendações do fabricante.

4.6.4. Avaliação da permeabilidade da BHE pelo método de Azul de Evans

Para a avaliação da permeabilidade da BHE, o corante azul de Evans foi utilizado como um marcador do extravasamento de albumina para o parênquima cerebral, como descrito previamente por Belayev *et al.* (1996). Esse corante, quando não conjugado a proteínas

plasmáticas, é uma molécula relativamente pequena e de baixo peso molecular. Entretanto, *in vivo*, liga-se à albumina, formando um complexo de alta massa molecular, que só é capaz de permear a BHE quando a integridade da mesma estiver comprometida. Assim, a técnica é uma forma indireta de quantificar o extravasamento de albumina sérica (Nagaraja *et al.*, 2008). Animais controle e BCCAO foram anestesiados, com uma mistura de 100 mg/kg de cloridrato de cetamina 10% (Syntec) e 10 mg/kg de cloridrato de xilazina 2% (Syntec), sendo a dose administrada individualizada por peso, considerando a proporção de 0,1 mL de anestésico/10 g de massa do animal e, em seguida, foram canulados na veia caudal. Assim, 0,2 mL de Azul de Evans a 1% foi administrado intravenosamente e ao final de uma hora, os animais foram eutanasiados e perfundidos com salina fisiológica. O encéfalo foi coletado, pesado e 1 ml de formamida, acrescentado ao tecido. O tecido permaneceu na formamida por 24 horas para extração do corante. O azul de Evans extraído pela formamida foi quantificado em leitor de ELISA em 650 nm (Molecular Devices, USA) e sua concentração, determinada, por meio de uma curva padrão com concentração inicial de 20 pg/mL de Azul de Evans. O resultado da leitura espectrofotométrica foi normalizado e expresso em pg de Azul de Evans por 100 mg de tecido encefálico.

4.7. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de *outliers* e de normalidade D'Agostino-Pearson e Shapiro-Wilk. Quando paramétricos, foram analisados estatisticamente por análise de variância (*One-way ANOVA*), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey e nas avaliações entre dois grupos, o teste *t de Student* foi utilizado. Para dados não paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas Dunn's ou o teste Mann-Whitney (nas avaliações de apenas dois grupos). O teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar variáveis independentes que só admitissem como resposta "sim" ou "não". As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se $p \leq 0,05$ e os resultados, apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas e os gráficos foram elaborados utilizando-se o *software GraphPad Prism 5.0* (GraphPad software Inc San Diego, CA, EUA).

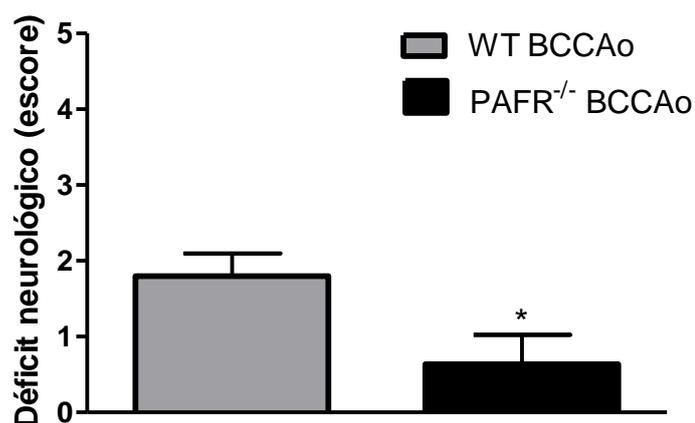


Figura 8. Efeito do PAF sobre o déficit neurológico em um escore de 0 a 5. O grupo PAFR^{-/-} BCCAo apresentou redução significativa na intensidade de déficit neurológico comparado ao grupo WT BCCAo ($p < 0,05$). Os resultados representam a média \pm EPM, em uma análise não pareada, utilizando o teste Mann Whitney *versus* WT BCCAo.

5.2. Avaliação da isquemia pela coloração com TTC

Para avaliar a área de infarto, utilizou-se o reagente TTC que, após ser reduzido por enzimas de células viáveis, corou as áreas normais de vermelho e as áreas de tecido morto permaneceram esbranquiçadas, não coradas. Os grupos *sham* apresentaram toda a extensão das secções coronais coradas em vermelho. Já os grupos BCCAo (WT e PAFR^{-/-}), apresentaram áreas de infarto (esbranquiçadas) nos hemisférios direito e esquerdo. Os camundongos do grupo PAFR^{-/-} BCCAo apresentaram lesões mais focais no córtex cerebral, enquanto os do grupo WT BCCAo, lesões atingindo o córtex e estriado (Figura 9). Observou-se redução significativa ($p < 0,01$) da área de infarto no grupo PAFR^{-/-} BCCAo em relação ao grupo WT BCCAo (Figura 10).

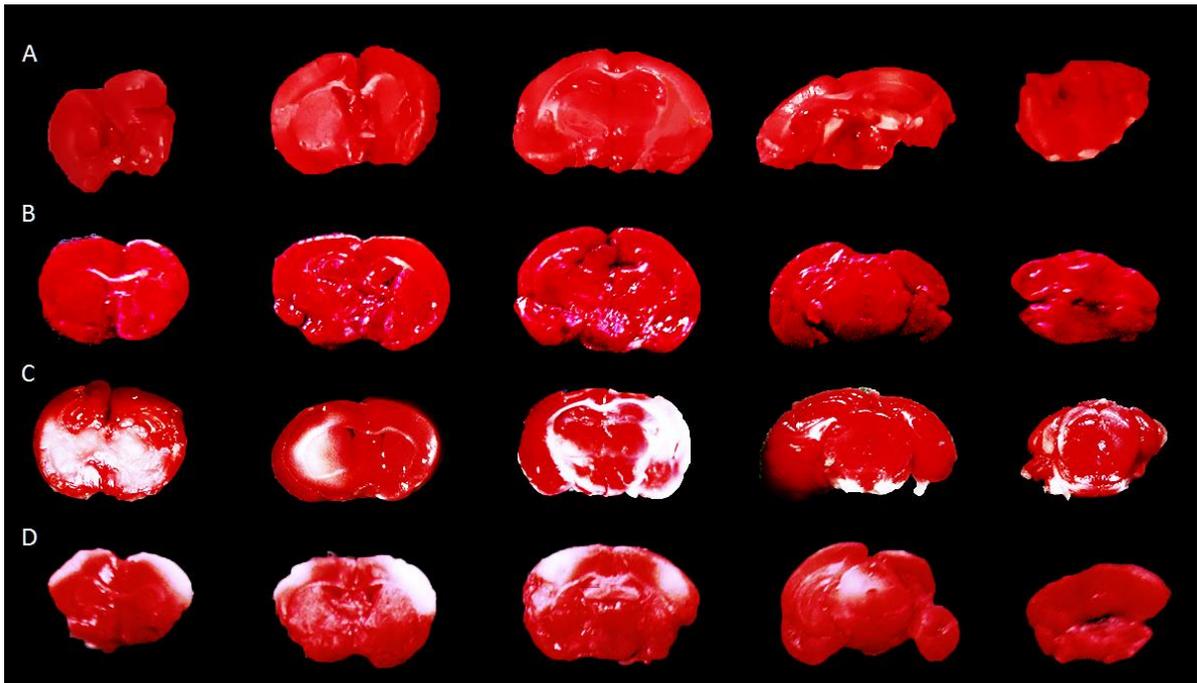


Figura 9. Efeito do PAF sobre a área de infarto cerebral após I/R. As secções representativas coradas com TTC apresentam os grupos WT *Sham* (A), PAFR^{-/-} *Sham* (B), WT BCCAo (C) e PAFR^{-/-} BCCAo (D) (n=6 por grupo) após 24 horas de reperusão. As áreas pálidas representam a área de infarto e as regiões em vermelho mostram o tecido sadio. Coloração com cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) 2%.

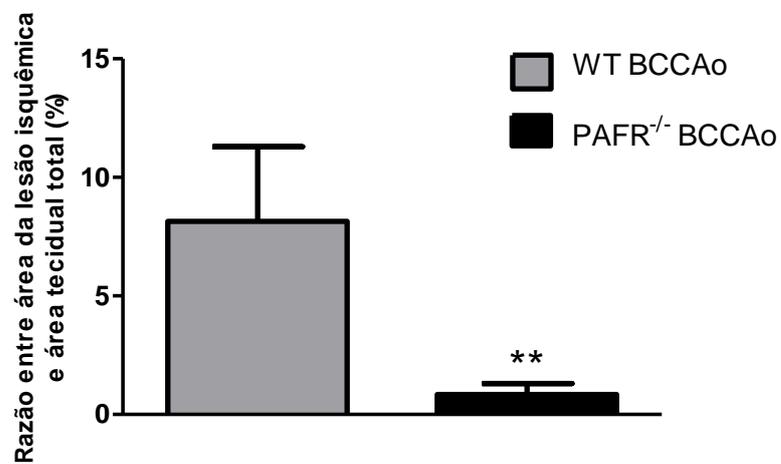


Figura 10. Efeito do PAF sobre a área de infarto cerebral. O grupo PAFR^{-/-} BCCAo apresentou porcentagem de área de infarto significativamente menor que o grupo WT BCCAo. Os resultados representam a média \pm EPM (n = 6, por grupo) em uma análise não pareada, utilizando o teste t de *Student* ** versus WT BCCAo (p<0,01).

5.3. Avaliação Histopatológica

5.3.1. Avaliação descritiva

Os animais WT *sham* e PAFR^{-/-} *sham* não apresentaram alterações histopatológicas nos encéfalos analisados. Já os animais dos grupos BCCAo (WT e PAFR^{-/-}), mostraram alterações teciduais na região do córtex cerebral, tronco encefálico e hipocampo, caracterizadas por áreas de necrose, com formação de cavitações parcialmente preenchidas por sangue; neurônios hipercromáticos e retraídos (isquêmicos); e, em alguns animais, espongirose. Com relação às áreas necróticas, vários neurônios isquêmicos foram visualizados circundando-as. Os animais do grupo PAFR^{-/-} BCCAo apresentaram focos de necrose menos extensos que os do WT BCCAo (Figura 11). Observou-se também perda neuronal em toda a extensão do estrato piramidal do hipocampo (região CA1 a CA4) e espongirose no neurópilo. Em uma análise qualitativa, essa perda de neurônios hipocampais foi mais intensa nos animais do grupo WT BCCAo que a apresentaram e mais leve nos PAFR^{-/-} BCCAo, nos quais foram visualizados grupamentos predominantemente focais de neurônios isquêmicos, sobretudo na região CA1 e pouca ou ausente vacuolização hipocampal.

5.3.2. Avaliação morfométrica

Ao mensurar a área de cavitações necróticas presentes na microscopia e necessariamente circundadas por neurônios isquêmicos, observou-se que os animais PAFR^{-/-} BCCAo apresentaram menor porcentagem da razão entre a área de cavitação e a área tecidual normal, quando comparados aos animais WT BCCAo ($p < 0,05$), conforme ilustrado pela figura 12. Esse resultado comprova o achado previamente apontado pela análise histológica descritiva e pela macroscopia. Além disso, a frequência de neurônios isquêmicos foi reduzida nos camundongos PAFR^{-/-} BCCAo. Entretanto, não foi observada diferença estatística para espongirose entre os grupos submetidos à isquemia e reperfusão (Figura 13).

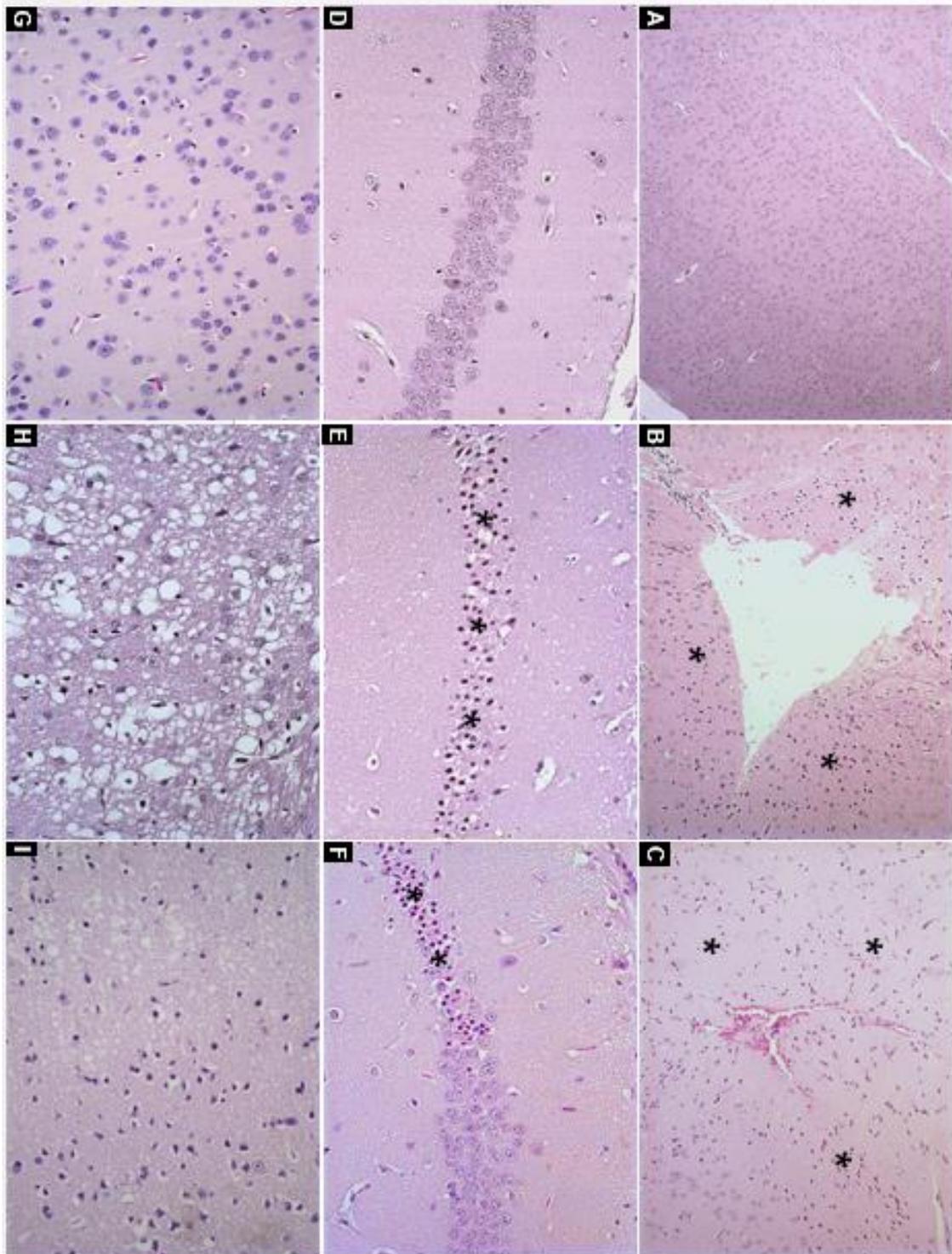


Figura 11. Fotomicroscopia do cérebro de camundongos: *sham* WT (A), *sham* PAFR^{-/-} (D, G), WT BCCAO (B, E, H) e PAFR^{-/-} BCCAO (C, F, I), corados por H&E. Córtex cerebral com aspecto histológico normal (A). Córtex cerebral apresentando extensa lesão cavitária (necrose) e vários neurônios isquêmicos ao redor (asteriscos) (B). Córtex cerebral com foco necrótico menor, preenchido por sangue e circundado por neurônios isquêmicos (asteriscos) (C). Região CA do hipocampo com aspecto histológico normal, mostrando neurônios saudáveis (D). Hipocampo apresentando vários neurônios isquêmicos (asteriscos) ao longo de todo o estrato piramidal (E). Hipocampo contendo neurônios hiper cromáticos e condensados (asteriscos) concentrados na região CA1 (F). Neurópilo da região cerebral com aspecto histológico normal (G). Cérebro mostrando área de espongiose intensa (H). Parênquima cerebral mostrando espongiose moderada (I). Aumento da objetiva: A-C: 20x; D-I: 40x.

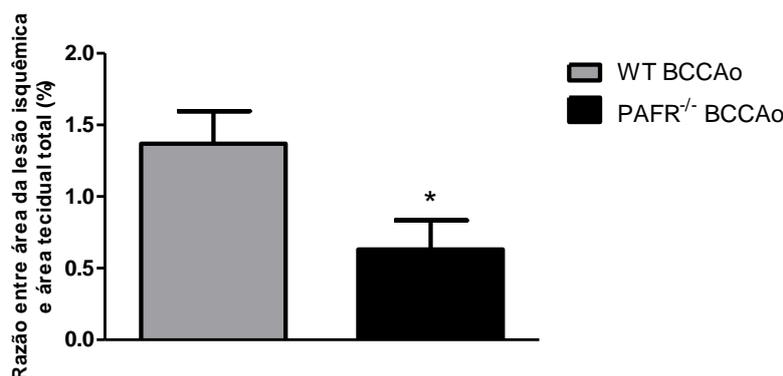


Figura 12. Efeito do PAF sobre a porcentagem da área de cavitações necróticas cerebrais. O grupo PAFR^{-/-} BCCAO (n=7) apresentou porcentagem da área de infarto significativamente menor que o grupo WT BCCAO (n=7) (p < 0,05). Os resultados representam a média ± EPM em uma análise não pareada, utilizando o teste t de Student. *versus WT BCCAO.

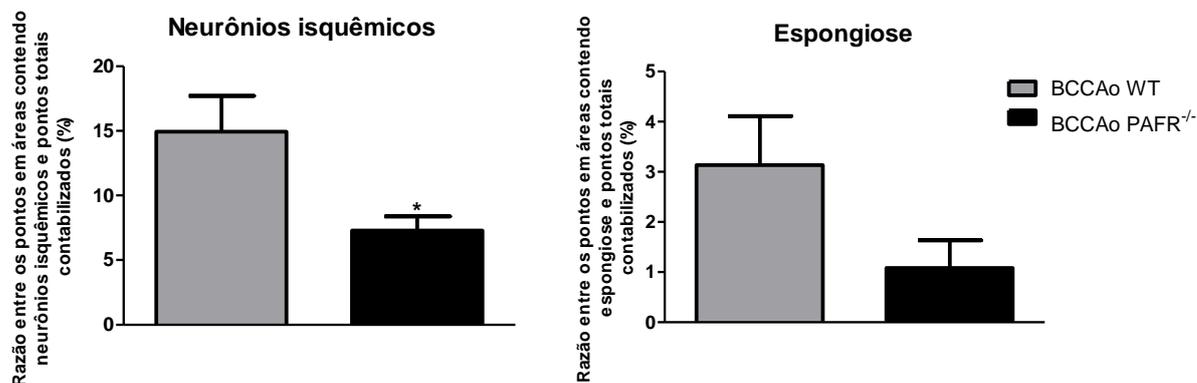


Figura 13. Avaliação morfométrica da frequência de neurônios isquêmicos e espongiose em camundongos submetidos à BCCAO. Para o parâmetro de neurônios isquêmicos, foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos WT BCCAO (n=7) e PAFR^{-/-} BCCAO (n=7) (p<0,05). Para espongiose, a diferença não foi significativa (p>0,05). Os resultados representam a média ± EPM em uma análise não pareada, utilizando o teste t de Student. *versus WT BCCAO.

5.4. Análise da expressão das citocinas e quimiocina por ELISA

Os níveis dos mediadores inflamatórios (TNF, IL1- β e CXCL1) foram avaliados no encéfalo, após 24 horas de reperfusão (Figura 14). As concentrações das citocinas e da quimiocina estudadas foram similares entre os grupos WT *sham* e PAFR^{-/-} *sham*. Níveis significativamente superiores desses mediadores inflamatórios foram detectados no grupo WT BCCAO, quando comparados ao grupo WT *sham*. Já no grupo PAFR^{-/-} BCCAO, o doseamento de TNF, IL1- β e CXCL1 não apresentou diferença estatística significativa em relação ao do grupo PAFR^{-/-} *sham*. A deficiência do receptor de PAF promoveu redução significativa dos

níveis de TNF, IL1- β e CXCL1 ($p < 0,05$) nos animais PAFR^{-/-} submetidos à BCCAo, comparado aos animais WT BCCAo.

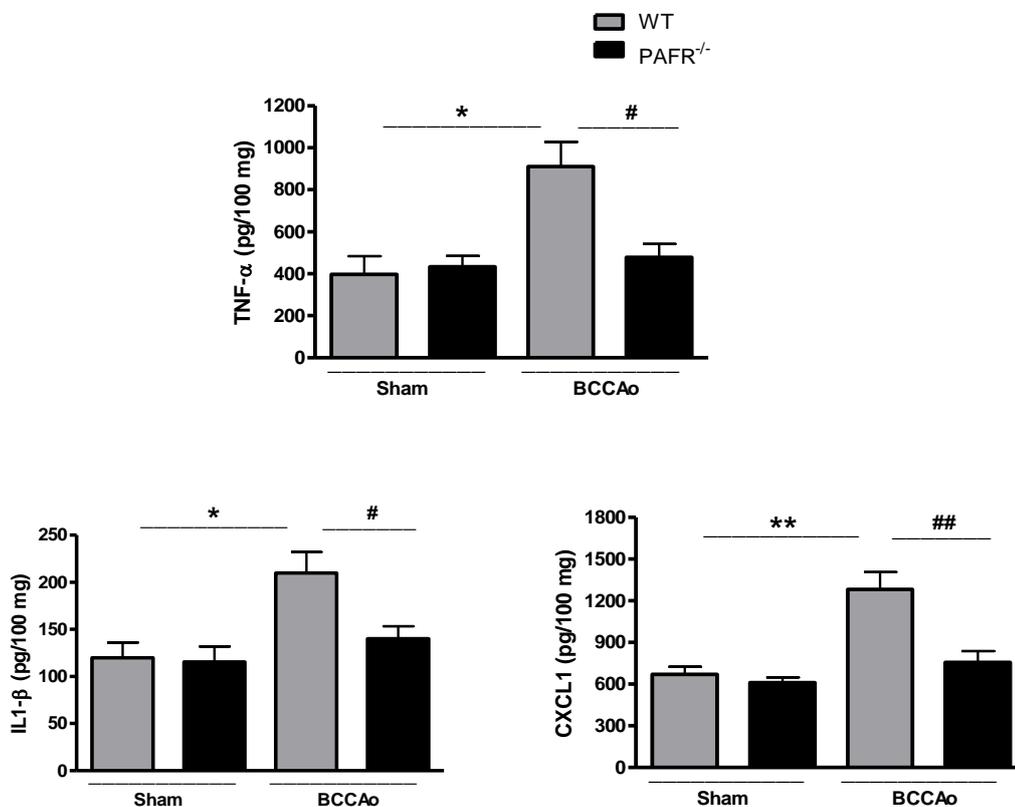


Figura 14. Avaliação de citocinas e quimioquina por ELISA no cérebro dos camundongos submetidos à isquemia por 25 minutos e reperfusão por 24 horas. Os resultados representam a média \pm EPM ($n = 8$, por grupo) em uma análise não pareada, utilizando o teste ANOVA e análise de comparações múltiplas de Tukey. *WT BCCAo versus WT sham ($p < 0,05$); ** WT BCCAo versus WT sham ($p < 0,01$); # PAFR^{-/-} BCCAo versus WT BCCAo ($p < 0,05$); ## PAFR^{-/-} BCCAo versus WT BCCAo ($p < 0,01$).

5.5. Análise da expressão de caspase 3-clivada no cérebro por *western blotting*

A fim de se avaliar a apoptose no córtex cerebral, região na qual as lesões cavitárias circundadas por penumbra isquêmica (contendo neurônios necróticos e apoptóticos) são mais frequentes, após 24 de reperfusão, a expressão da proteína caspase 3-clivada (massa molar de 17/19 kDa) foi quantificada por *Western Blotting*. A normalização por β -actina (massa molar de 42 kDa) permitiu o controle de carregamento das amostras aplicadas (Figura 15 A). Ao analisar a exposição das amostras após revelação, observou-se aumento da expressão de caspase 3-clivada no grupo WT BCCAo, comparado ao WT sham. Além disso, a redução da intensidade de marcação dessa proteína nos animais PAFR^{-/-} BCCAo foi nítida quando

comparada a dos camundongos WT BCCAo. Por meio da densitometria, quantificou-se e comprovou-se a diferença acentuada entre esses grupos, além de se constatar que não houve diferença estatística entre os grupos WT *sham* e PAFR^{-/-} *sham* e nem entre este último e o PAFR^{-/-} BCCAo (Figura 15 B).

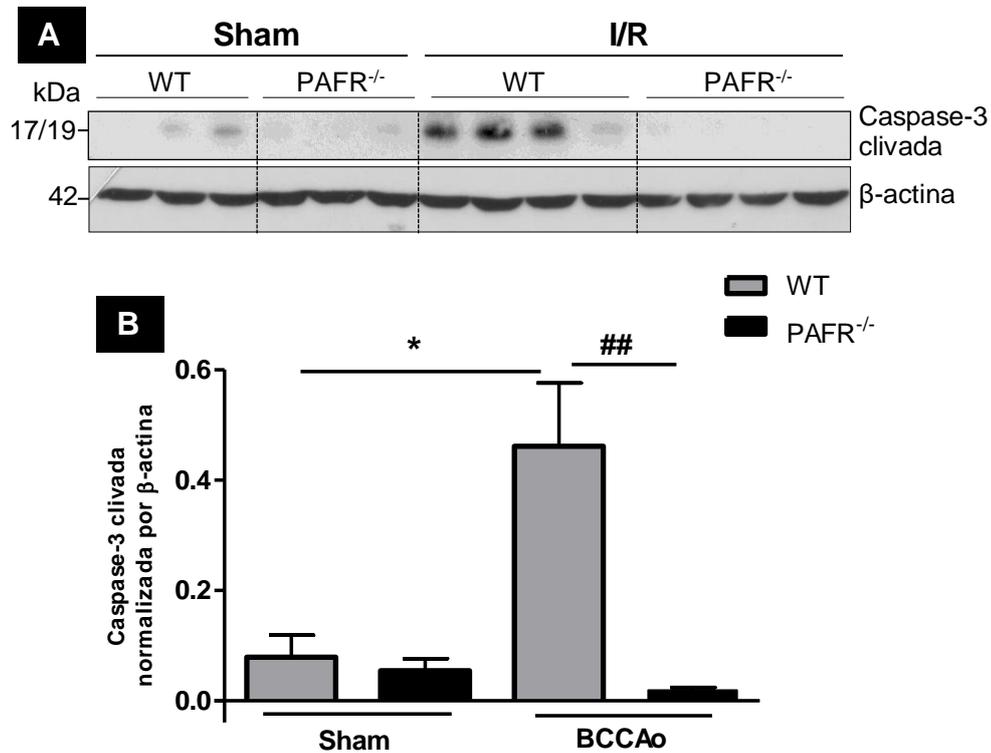


Figura 15. Redução da expressão de caspase-3 clivada em cérebro de camundongos selvagens e deficientes para receptor de PAF após isquemia seguida de 24 horas de reperfusão, avaliada por *Western blotting*. Exposição da expressão da proteína caspase – 3 clivada após transferência para membrana de nitrocelulose e revelação em filme de raio X. O anticorpo anti β -actina foi utilizado, a fim de marcar a proteína constitutiva β -actina, que funcionou como um normalizador do *western blotting* (A). A análise densitométrica das membranas de transferência, pelo software *ImageJ*, permitiu comparação estatística entre os grupos. Os dados estão apresentados em unidades arbitrárias de medida (B). Os resultados foram expressos como média \pm EPM (n = 4, por grupo) em uma análise não pareada, utilizando o teste ANOVA e análise de comparações múltiplas de Tukey. *WT BCCAo versus WT *sham* (p < 0,05); ## PAFR^{-/-} BCCAo versus WT BCCAo (p < 0,01).

5.6. Avaliação da permeabilidade a BHE por Azul de Evans

Como o PAF está associado ao aumento da permeabilidade vascular e consequente exacerbação da neuroinflamação, a integridade da BHE foi avaliada pela capacidade de extravasamento do corante Azul de Evans para o parênquima encefálico. Após extração desse corante pela formamida, foi possível quantificar, por espectrofotometria, a concentração que permeou a BHE em cada grupo. Observou-se, então, um aumento do extravasamento do Azul de Evans nos encéfalos dos camundongos WT BCCAo quando comparados aos WT *sham*. Já

o grupo PAFR^{-/-} BCCAO não apresentou diferença estatística em relação ao PAFR^{-/-} sham. Constatou-se, ainda, que a deficiência do receptor de PAF promoveu inibição da quebra da BHE em camundongos submetidos à BCCAO transitória, já que a concentração do Azul de Evans foi significativamente mais elevada no parênquima encefálico dos animais WT também submetidos à BCCAO (Figura 16).

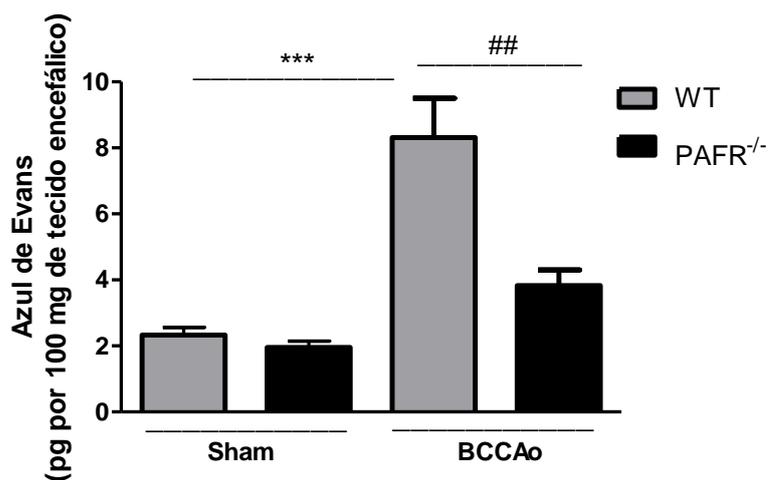


Figura 16. Avaliação da permeabilidade da BHE, por meio de análise espectrofotométrica da concentração do corante Azul de Evans no encéfalo dos camundongos submetidos à isquemia por 25 minutos e reperusão por 24 horas. Os resultados representam a média \pm EPM em uma análise não pareada (grupos sham com n=3 e grupos BCCAO com n=4), utilizando o teste ANOVA e análise de comparações múltiplas de Tukey. ***WT BCCAO versus WT sham ($p < 0,001$); ## PAFR^{-/-} versus WT BCCAO ($p < 0,01$).

6. DISCUSSÃO

Dentro da complexa fisiopatologia da isquemia e reperfusão e da consequente cascata isquêmica, a inflamação é um importante gatilho para expansão da lesão cerebral (Harukuni e Bhardwaj, 2006). Nesse sentido, a biossíntese do PAF, um fosfolípídeo com pronunciado caráter pró-inflamatório quando produzido em excesso, é facilitada pela isquemia e reperfusão cerebral, ativando PAFR e contribuindo para o agravamento dos danos neuronais e suas consequências (Umemura *et al.*, 2007; Belayev *et al.* 2012). Este trabalho mostrou a influência da deficiência do receptor de PAF na extensão da lesão cerebral, neuroinflamação, integridade da BHE e morte celular pós AVEi, como um fator de neuroproteção.

Ao avaliar parâmetros clínicos, observou-se que os animais do grupo PAFR^{-/-} BCCAO apresentaram uma menor frequência de déficit neurológico (27,3%) quando comparados aos do grupo WT BCCAO (86,7%). Além disso, foi constatado que a deficiência de PAFR promoveu redução da intensidade do escore de déficit neurológico. Esse achado aponta para a contribuição desse receptor nas sequelas neurológicas pós AVEi agudo. Estudos anteriores mostraram a redução de déficit em animais submetidos à I/R cerebral e bloqueio farmacológico do receptor de PAF (Belayev *et al.*, 2012) e em animais transgênicos que superexpressavam a enzima PAF-acetilhidrolase (Umemura *et al.*, 2007) e tratados com PAF-AH recombinante (Wu *et al.*, 2014). Embora o modelo adotado tenha sido a oclusão bilateral das carótidas comuns, os sinais clínicos pós isquemia e reperfusão observados foram semelhantes aos relatados por Berdenson *et al.* (1986) e Tolvanen *et al.* (2013) em modelo de oclusão da artéria cerebral média e por Adhami *et al.* (2006) em oclusão unilateral da carótida comum direita.

Com relação às lesões cerebrais, a análise macroscópica, por meio do corante TTC, revelou uma redução da área de infarto nos animais do grupo PAFR^{-/-} BCCAO em relação aos do grupo WT BCCAO. Outra observação interessante foi que, nos animais PAFR^{-/-} BCCAO as lesões foram mais focais, concentrando-se nas extremidades do córtex. O método colorimétrico TTC permitiu a visualização e quantificação das regiões de infarto (com enzimas inativas), pois permaneceram esbranquiçadas, enquanto que as saudáveis foram coradas em vermelho. Esses achados no modelo adotado (isquemia global transitória em

camundongos selvagens e deficientes para receptor de PAF) concordam com os de estudos prévios que utilizaram modelo de isquemia focal associados a um antagonista de PAFR (Yang *et al.*, 2011) e ao tratamento com PAF-AH (Wu *et al.*, 2014).

As alterações macroscópicas detectadas pelo TTC foram confirmadas e detalhadas pela histopatologia. Na região cortical dos animais submetidos à BCCAO transitória, foram observadas diversas cavitações necróticas parcialmente preenchidas por hemácias. Ao entorno dessas cavitações, foi encontrada uma ampla faixa de neurônios isquêmicos. Tais alterações são típicas dos denominados neurônios isquêmicos, que constituem a região de penumbra. Em muitos casos, quando o fluxo sanguíneo está reduzido, mas permanece entre, no mínimo, 12 a 20 ml / 100 g x min⁻¹ (20 a 30% do fluxo normal), a necrose não ocorre diretamente, surgindo antes a penumbra isquêmica, que pode ser revertida se o fluxo sanguíneo for recuperado nas primeiras horas pós AVEi, ou seja, a penumbra é uma condição prévia à morte celular e está diretamente ligada aos distúrbios metabólicos decorrentes da condição isquêmica (del Zoppo *et al.*, 2011; Østergaard *et al.*, 2013).

No presente estudo, foi detectada, por histomorfometria, uma redução da porcentagem da área de cavitações necróticas circundadas por neurônios isquêmicos nos camundongos do grupo PAFR^{-/-} BCCAO, confirmando o achado da morfometria macroscópica. Além disso, observou-se diminuição na frequência de neurônios isquêmicos que circundam essas cavitações, ou seja, da penumbra isquêmica (em comparação ao grupo WT BCCAO). Logo, o resultado encontrado indica a participação da ativação de PAFR na morte celular (por necrose e apoptose) pós I/R encefálica e, conseqüentemente, na maior frequência e intensidade dos sinais de déficit neurológico observados nos camundongos WT BCCAO. Outra alteração presente nos animais submetidos à I/R foi a presença de espongiose, que corresponde à vacuolização no neurópilo e expansão de espaço perivascular, sendo um indicativo de edema cerebral (Jayakumar *et al.*, 2011; Craggs *et al.*, 2014). Na histomorfometria, não foi encontrada diferença estatística da frequência de regiões de vacuolização comparando os grupos WT BCCAO e PAFR^{-/-} BCCAO, talvez pelo fato dessa alteração não ter apresentado uniformidade entre os animais.

Sabe-se que o modelo de BCCAO seguido de reperusão é marcado pela apoptose neuronal intensa na região CA1 do hipocampo (Mehrjerdi *et al.*, 2013), assim, a perda de neurônios

hipocampais em toda a extensão do estrato piramidal foi um achado relevante. Em uma análise qualitativa, essa perda apresentou-se menos intensa nos PAFR^{-/-} BCCAO. Umemura e colaboradores (2007) obtiveram resultados semelhantes em análise histopatológica do hipocampo de camundongos modificados para superexpressar PAF-AH. Esse resultado também pode ser relacionado à redução da intensidade e frequência dos déficits neurológicos observados nos camundongos deficientes em PAFR.

O tecido cerebral é muito sensível à isquemia e algumas regiões são mais vulneráveis que outras, como é o caso do hipocampo (Woodruff *et al.*, 2011). Os próprios neurônios hipocampais apresentam diferente sensibilidade a curtos períodos de isquemia, dependendo de sua localização no estrato piramidal. Já é bem relatado na literatura que os neurônios da região CA1 são mais susceptíveis e os do giro denteado, mais resistentes à morte celular (Schmidt-Kastner e Freund, 1991). Wang e colaboradores (2015), relataram que, dentro da própria região CA1, há uma vulnerabilidade seletiva entre os neurônios piramidais. As causas ainda não foram determinadas, mas acredita-se que diferenças na biossíntese ou dobramento de proteínas pode ser a razão dessa seletividade. Outra explicação é que os neurônios podem, individualmente, ativar diferentes vias de estresse, levando a uma resposta mais ou menos intensa e, conseqüentemente, a diferentes níveis de danos neuronais. Li *et al.* (2010) observaram que a BCCAO em ratos promove alterações leves na região CA1 do hipocampo seis horas após isquemia e um pico de perda de neurônios piramidais 24 horas pós isquemia, ou seja, o presente estudo contemplou o período de pico dessa morte neuronal. Vale ressaltar que os achados histopatológicos observados são semelhantes aos encontrados em casos de AVEi agudo em humanos, apesar de, nestes, as alterações aparecem mais tardiamente (Mărgăritescu *et al.*, 2009).

A importância do PAF na plasticidade sináptica hipocampal e formação de memória foi demonstrada quando em concentrações fisiológicas (Chen e Bazan, 2005). Entretanto, após isquemia cerebral, a biossíntese desse fosfolípídeo aumenta e seu acúmulo promove a liberação de glutamato no hipocampo e rápida ativação da via da COX-2 (Cui *et al.*, 2007; He e Bazan, 2006). Assim, a redução de perda neuronal do estrato piramidal do hipocampo encontrada nos animais PAFR^{-/-} submetidos à BCCAO e reperfusão, quando comparados aos selvagens, demonstra esse papel deletério do PAF ao ativar seu receptor, enquanto mediador inflamatório pós AVEi.

A resposta inflamatória está intimamente ligada a todos os danos neuronais discutidos anteriormente. A maior concentração tecidual de IL-1 β , TNF e CXCL-1 no grupo WT BCCAo comparado ao WT *sham*, que foi encontrada neste trabalho, evidencia a importância das citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias na etiopatogênese das lesões cerebrais decorrentes do AVEi agudo, após 24 horas de reperfusão. Como as células residentes do cérebro produzem TNF rapidamente após dano local, há um aumento na concentração dessa citocina logo nas primeiras horas após início da isquemia, ou seja, ela é um mediador determinante no desenvolvimento das lesões cerebrais (Liu *et al.*, 1993; Yamasaki *et al.*, 1995; Clausen *et al.*, 2008). Recentemente, Wu *et al.* (2014), por meio de estudos cinéticos, mostraram que essa produção rápida e intensa de TNF é o gatilho mais importante para a iniciação da inflamação, processo que, logo em seguida, parece ser desenvolvido e exacerbado pela IL-1 β . Inclusive, já foi relatada correlação positiva entre as concentrações dessas citocinas. Além disso, TNF induz a produção de CXCL1, quimiocina importante na quimiotaxia de neutrófilos (Pan *et al.*, 2009).

A IL-1 β tem sua produção induzida pelo TNF (Summers *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2014). A elevação da concentração dessa interleucina promove aumento da permeabilidade da BHE, propiciando a migração de leucócitos periféricos para o parênquima encefálico. Estudos mostraram que a inoculação de IL1- β no estriado de ratos promoveu o aumento da liberação de CXCL1 (Anthony *et al.*, 1997; Easton, 2013). Segundo Sousa *et al.* (2013), o bloqueio dos receptores CXCR1 e CXCR2 reduz os níveis de IL1- β e o recrutamento de neutrófilos, diminuindo também os danos neuronais. Apesar do papel controverso do neutrófilo na cinética do AVEi agudo (Hayward *et al.*, 1996; Emerich *et al.*, 2002; Easton, 2013), sabe-se que ele é o primeiro leucócito periférico a chegar ao encéfalo e que contribui para a expansão da lesão (Weston *et al.*, 2007), por meio do fenômeno de *no-reflow* (obstruindo vasos) (Schmid-Schönbein, 1986), aumento do edema (Kenne *et al.*, 2012) e exacerbção da produção de mediadores inflamatórios, inclusive do PAF, que, por sua vez, aumenta a quimiotaxia de neutrófilos intensificando a cascata isquêmica. Considerando que as citocinas e quimiocina supracitadas e o próprio PAF têm produção interligada e precoce, a escolha de um período de 24 horas de reperfusão foi interessante para avaliação desses mediadores inflamatórios.

A reperfusão, apesar de necessária à recuperação dos danos promovidos pela hipóxia, restaurando os níveis de oxigênio e removendo metabólitos tóxicos, é um processo que contribui para o aumento da lesão cerebral, principalmente pela geração de EROs e promoção da infiltração de células inflamatórias (Sugawara *et al.*, 2003; Kalogeris *et al.*, 2012). Nesse ambiente oxidativo e com pH reduzido, a biossíntese de liso-PAF e conversão desse fosfolípídeo em PAF, que é uma reação química de esterificação, torna-se favorável. Em altas concentrações no encéfalo, o PAF induz a ativação da via COX-2, com consequente produção de TNF (Boetkjaer *et al.*, 2007), ou seja, atua como um potente mediador pró-inflamatório, aumentando a permeabilidade da BHE (Deng *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2011), a quimiotaxia de leucócitos e, conseqüentemente, a liberação de mais EROs. Portanto, o PAF, bem como a ativação de PAFR, contribui para a intensificação da cascata isquêmica que, por sua vez, facilita a biossíntese de PAF (Bazan, 2005). Nesse contexto, o modelo de isquemia e reperfusão que foi utilizado é bastante interessante, pois, além de propiciar um aumento pontual da produção de PAF pela isquemia, o ambiente da reperfusão favorece a manutenção de concentrações elevadas durante algumas horas. Por meio deste trabalho, observou-se que os animais do grupo PAFR^{-/-} BCCAO, comparados aos do grupo WT BCCAO, apresentaram uma redução na concentração de TNF, IL1-β e CXCL1 após 24 horas de reperfusão, além disso, não houve diferença estatística significativa entre PAFR^{-/-} BCCAO e os níveis basais dos camundongos PAFR^{-/-} sham.

O comprometimento da integridade da BHE encontrado no grupo WT BCCAO, quando comparado ao grupo WT sham, intensifica a neuroinflamação e expansão da lesão tecidual no AVEi agudo. Como o aumento da permeabilidade vascular está associado à produção aguda de mediadores inflamatórios pela micróglia ativada, como a IL-1β e o TNF (Rosenberg *et al.*, 1998; Britschgi e Wyss-Coray, 2007), esse resultado corrobora com o aumento dessas citocinas detectado por ELISA. Pan *et al.* (2009) mostraram que o TNF induz rápida alteração na regulação de IL-15 e seus receptores da BHE, bem como a produção das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1, levando aumento da permeabilidade da microvasculatura cerebral. Além disso, a perda da integridade da BHE, por si só, já é um fator facilitador do aumento da secreção de quimicinas e citocinas pró-inflamatórias e da transmigração de células inflamatórias periféricas para o parênquima cerebral, sendo o neutrófilo uma célula recrutada em grandes quantidades no processo agudo de isquemia e reperfusão (Woodruff *et al.*, 2011). Assim, o aumento dos níveis de CXCL1 detectado por ELISA também está

relacionado ao aumento da permeabilidade vascular observada nos camundongos WT BCCAO. Segundo Strbian *et al.* (2008), o aumento da permeabilidade da barreira já pode ser detectado 25 minutos após reperfusão e se mantém superior o dos controles por até cinco semanas. Além disso, em modelo de isquemia focal transitória, Wu *et al.* (2014) mostraram que o pico da ruptura da barreira ocorre após 24 horas de reperfusão, tempo adotado também pelo presente trabalho. Em pacientes submetidos à terapia trombolítica pós AVE isquêmico, observou-se que a ruptura da barreira está associada a complicações neurológicas, como a ocorrência de AVE hemorrágico e aumento da mortalidade (Zlokovic, 2008; Desilles *et al.*, 2013).

Com relação ao grupo PAFR^{-/-} BCCAO, foi observada manutenção da integridade da BHE, uma vez que a concentração do corante Azul de Evans não apresentou diferença significativa da concentração quantificada no encéfalo dos camundongos PAFR^{-/-} sham, a qual, por sua vez, foi similar à do grupo WT sham (p>0,05). Dessa forma, pode-se concluir que a deficiência de PAFR promoveu a manutenção da integridade da BHE após I/R cerebral murina, o que pode ser relacionado à redução da produção de IL-1 β e TNF anteriormente relatada e à ausência do efeito de indução do aumento da permeabilidade endotelial exercida diretamente pelo PAF, por aumento da ativação de MMP-2, por exemplo (Kumar, 1988; Axelrad *et al.*, 2004). Tal processo, ao inibir a quimiotaxia de neutrófilos, relaciona-se à redução da produção de CXCL1 encontrada no grupo PAFR^{-/-} BCCAO, comparado ao WT BCCAO.

Já foi relatado que a incubação de células endoteliais da microvasculatura cerebral com PAF promove aumento da expressão de ICAM-1, o qual pode ser revertido pelo XQ-1H, um antagonista do PAFR derivado do ginkgolídeo (Deng *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2011). A indução das vias de TNF e COX-2, que levam ao aumento da permeabilidade vascular, foi observada após exposição de células neurais primárias ao PAF, efeito que foi revertido por antagonistas do receptor desse fosfolípídeo (Boetkjaer *et al.*, 2007). Além disso, Wu *et al.* (2014) mostraram redução da expressão de MMP-2 e MMP-9 e aumento de VEGF em camundongos pré-tratados com PAF-AH 15 minutos antes da oclusão da artéria cerebral média. Ou seja, o bloqueio do PAFR inibiu o seguinte ciclo: aumento da biossíntese de PAF – ativação de PAFR - intensificação da cascata isquêmica – manutenção de altos níveis de PAF após isquemia e reperfusão cerebral. Por conseguinte, a BHE foi preservada,

o que reduziu a quimiotaxia de leucócitos e geração de radicais livres, bem como a expansão da área central de lesão isquêmica.

Semelhantemente ao encontrado para as citocinas e quimiocina estudadas, a expressão de caspase-3 clivada no córtex foi reduzida com a deficiência de PAFR e não foi encontrada diferença entre a expressão dessa proteína nos camundongos PAFR^{-/-} BCCAO e o nível basal dos PAFR^{-/-} sham. Como a produção de TNF está ligada à apoptose após isquemia cerebral (Robertson *et al.*, 2001) e os níveis dessa citocina foram reduzidos no grupo PAFR^{-/-} BCCAO comparado ao WT BCCAO, a diminuição da expressão de caspase 3-clivada complementa os resultados obtidos pelo ELISA. Lu *et al.* (2004) observaram que o PAF induz ativação de caspase-3 em células epiteliais intestinais. Posteriormente, Claud *et al.* (2008) mostraram que essa ativação é facilitada em meio ácido após isquemia intestinal. Sabe-se que a cascata isquêmica consequente da I/R cerebral produz acidose, devido à geração de lactato pela respiração anaeróbia, o que, considerando os achados supracitados, poderia aumentar a indução de apoptose pelo PAF. Em modelo de isquemia focal por oclusão da artéria cerebral média, foi observada expressão de caspase-3 clivada ao longo do hemisfério cerebral afetado (Wagner *et al.*, 2011). Além disso, há estudos que mostram a relação entre o antagonismo de PAFR e a redução de apoptose neuronal em ratos neonatos submetidos à oclusão da carótida comum direita (Bozlu *et al.*, 2007) e em camundongos geneticamente modificados para superexpressar PAF-AH submetidos à oclusão da artéria cerebral média (Umemura *et al.*, 2007). Pulliam *et al.* (1998) observaram envolvimento do TNF e PAF com apoptose de neurônios, astrócitos e oligodendrócitos em cultura de células do SNC. Em seres humanos, já foi encontrada correlação positiva entre caspase-3 em plasma sanguíneo e expansão da lesão cerebral detectada por ressonância magnética (Rosell *et al.*, 2008). Dessa forma, com a diminuição de morte celular tanto por necrose (comprovada pela redução da área de cavitações necróticas na microscopia e áreas de infarto na macroscopia) quanto por apoptose (apontada pela redução de caspase-3 clivada no córtex cerebral), fica clara a neuroproteção promovida pela deficiência de PAFR em modelo murino de I/R cerebral aguda.

Atualmente, apenas fármacos cujo mecanismo de ação é voltado para o tratamento dos distúrbios da coagulação são aprovados e utilizados efetivamente na clínica para pacientes que sofreram AVEi. Assim, é de suma importância estudar outros potenciais alvos

terapêuticos. Nesse contexto, a neuroproteção, sem dúvida, representa uma perspectiva eficaz para minimização das sequelas decorrentes dessa doença, que corresponde a um problema mundial de saúde pública.

7. CONCLUSÃO

A deficiência do receptor de PAF promoveu redução da frequência e intensidade do déficit neurológico associada à redução das alterações histopatológicas, do processo inflamatório e da apoptose no encéfalo de camundongos submetidos à BCCAO transitória. Portanto, a deficiência do PAFR é um fator de neuroproteção na isquemia e reperfusão cerebral aguda. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar o efeito da deficiência desse receptor em um processo crônico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott, N. J. Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 25, n. 1, p. 5-23, 2005.

Adhami, F. *et al.* Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy. **The American Journal of Pathology**, v. 169, n. 2, p. 566-83, 2006.

Akiba, S. *et al.* Inhibitory effect of the leaf extract of Ginkgo biloba L. on oxidative stress-induced platelet aggregation. **IUBMB Life**, v. 46, n. 6, p. 1243-1248, 1998.

Allan, S. M.; Rothwell, N. J. Cytokines and acute neurodegeneration. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 10, p. 734-744, 2001.

Allan, S. M.; Tyrrell, P. J.; Rothwell, N. J. Interleukin-1 and neuronal injury. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 8, p. 629-640, 2005.

Amantea, D. *et al.* Early reperfusion injury is associated to MMP2 and IL-1 β elevation in cortical neurons of rats subjected to middle cerebral artery occlusion. **Neuroscience**, v. 277, p. 755-763, 2014.

Amantea, D. *et al.* Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators. **The FEBS Journal**, v. 276, n. 1, p. 13-26, 2009.

André, C. *et al.* Progressive decline in stroke mortality in Brazil from 1980 to 1982, 1990 to 1992, and 2000 to 2002. **Stroke**, v. 37, n. 11, p. 2784-2789, 2006.

Anthony, D. *et al.* Age-related effects of interleukin-1 beta on polymorphonuclear neutrophil-dependent increases in blood-brain barrier permeability in rats. **Brain**, v. 120, n. 3, p. 435-444, 1997.

Arai, H. *et al.* Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH). **Journal of biochemistry**, v. 131, n. 5, p. 635-640, 2002.

Armstead, W. M. *et al.* Signaling, delivery and age as emerging issues in the benefit/risk ratio outcome of tPA for treatment of CNS ischemic disorders. **Journal of neurochemistry**, v. 113, n. 2, p. 303-312, 2010.

Aspey, B. *et al.* Do leukocytes have a role in the cerebral no-reflow phenomenon? **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 52, n. 4, p. 526-528, 1989.

Aspey, B. S. *et al.* Effects of combined glutamate and platelet-activating factor inhibition on the outcome of focal cerebral ischaemia-an initial screening study. **Metabolic brain disease**, v. 12, n. 3, p. 237-249, 1997.

Axelrad, T. W. *et al.* Platelet-activating factor (PAF) induces activation of matrix metalloproteinase 2 activity and vascular endothelial cell invasion and migration. **The FASEB journal**, v. 18, n. 3, p. 568-570, 2004.

Balestrieri, M. L. *et al.* Endothelial progenitor cells express PAF receptor and respond to PAF via Ca²⁺-dependent signaling. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1801, n. 10, p. 1123-1132, 2010.

Banisor, I.; Leist, T. P.; Kalman, B. Involvement of beta-chemokines in the development of inflammatory demyelination. **Journal of Neuroinflammation**, v. 2, n. 7, 2005.

Barone, F. C.; Feuerstein, G. Z. Inflammatory Mediators and Stroke: New Opportunities for Novel Therapeutics. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 19, n. 8, p. 819-834, 1999.

Bazan, N. G. Lipid signaling in neural plasticity, brain repair, and neuroprotection. **Molecular neurobiology**, v. 32, n. 1, p. 89-103, 2005.

Bederson, J. B. *et al.* Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. **Stroke**, v. 17, n. 3, p. 472-476, 1986.

Belayev, L. *et al.* LAU-0901, a novel platelet-activating factor antagonist, is highly neuroprotective in cerebral ischemia. **Experimental Neurology**, v. 214, n. 2, p. 253-8, 2008.

Belayev, L. *et al.* Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. **Brain research**, v. 739, n. 1, p. 88-96, 1996.

Belayev, L. *et al.* Superior Neuroprotective Efficacy of LAU-0901, a Novel Platelet-Activating Factor Antagonist, in Experimental Stroke. **Translational Stroke Research**, v. 3, n. 1, p. 154-63, 2012.

Bennett, M. *et al.* The GluR2 hypothesis: Ca⁺⁺ permeable AMPA receptors in delayed neurodegeneration. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, p.373-384, 1996.

Beray-Berthet, V. *et al.* Polymorphonuclear neutrophils contribute to infarction and oxidative stress in the cortex but not in the striatum after ischemia–reperfusion in rats. **Brain Research**, v. 987, n. 1, p. 32-38, 2003.

Bielenberg, G. W.; Wagener, G.; Beck, T. Infarct reduction by the platelet activating factor antagonist apafant in rats. **Stroke**, v. 23, n. 1, p. 98-103, 1992.

Boatright, K. M.; Salvesen, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Current opinion in cell biology**, v. 15, n. 6, p. 725-731, 2003.

Boetkjaer, A. *et al.* Synergism in the repression of COX-2-and TNF α -induction in platelet activating factor-stressed human neural cells. **Neuroscience letters**, v. 426, n. 1, p. 59-63, 2007.

Bozlu, G. *et al.* Platelet-activating factor antagonist (ABT-491) decreases neuronal apoptosis in neonatal rat model of hypoxic ischemic brain injury. **Brain Research**, v. 1143, p. 193-8, 2007.

- Brait, V. H. *et al.* Chemokine-related gene expression in the brain following ischemic stroke: no role for CXCR2 in outcome. **Brain research**, v. 1372, p. 169-179, 2011.
- Braquet, P. *et al.* Perspectives in platelet-activating factor research. **Pharmacological Reviews**, v. 39, n. 2, p. 97-145, 1987.
- Britschgi, M.; Wyss-Coray, T. Immune cells may fend off Alzheimer disease. **Nature medicine**, v. 13, n. 4, p. 408-409, 2007.
- Broughton, B. R.; Reutens, D. C.; Sobey, C. G. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. **Stroke**, v. 40, n. 5, p. 331-339, 2009.
- Casals, J. B. *et al.* The use of animal models for stroke research: a review. **Comparative medicine**, v. 61, n. 4, p. 305, 2011.
- Cassatella, M. A. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. **Advances in immunology**, n. 73, p. 369-509, 1999.
- Chen, C.; Bazan, N. G. Lipid signaling: sleep, synaptic plasticity, and neuroprotection. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 77, n. 1, p. 65-76, 2005.
- Chen, H. *et al.* Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. **Antioxidants & redox signaling**, v. 14, n. 8, p. 1505-1517, 2011.
- Chen, Y.; Swanson, R. A. Astrocytes and brain injury. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 23, n. 2, p. 137-149, 2003.
- Chao, W.; Olson, M. S. Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. **Biochemistry Journal**, v. 292, p. 617-629, 1993.
- Chui, R.; Dorovini-Zis, K. Regulation of CCL2 and CCL3 expression in human brain endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, n. 1, 2010.
- Claud, E. C. *et al.* Platelet-activating factor-induced chloride channel activation is associated with intracellular acidosis and apoptosis of intestinal epithelial cells. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 294, n. 5, p. 1191-1200, 2008.
- Clausen, B. H. *et al.* Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha are expressed by different subsets of microglia and macrophages after ischemic stroke in mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, n. 1, p. 46, 2008.
- Costa Silva, B. *et al.* The 5-lipoxygenase (5-LOX) Inhibitor Zileuton Reduces Inflammation and Infarct Size with Improvement in Neurological Outcome Following Cerebral Ischemia. **Current neurovascular research**, v. 12, n. 4, p. 398-403, 2015.

Craggs, L. J. L. *et al.* Microvascular pathology and morphometrics of sporadic and hereditary small vessel diseases of the brain. **Brain Pathology**, v. 24, n. 5, p. 495-509, 2014.

Cui, J. G. *et al.* Expression of inflammatory genes in the primary visual cortex of late-stage Alzheimer's disease. **Neuroreport**, v. 18, n. 2, p. 115-119, 2007.

DataSUS, Ministério da saúde, portal da saúde (SUS). Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=02>>. Acesso em 10 de dezembro de 2015.

Del Zoppo, G. J. *et al.* Heterogeneity in the penumbra. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 31, n. 9, p. 1836-1851, 2011.

Denault, J.B.; Salvesen, G. S. Caspases: keys in the ignition of cell death. **Chemical reviews**, v. 102, n. 12, p. 4489-4500, 2002.

Denes, A. *et al.* Interleukin-1 and stroke: biomarker, harbinger of damage, and therapeutic target. **Cerebrovascular Diseases**, v. 32, n. 6, p. 517-527, 2011.

Deng, Y. *et al.* Blood-brain barrier breakdown by PAF and protection by XQ-1H due to antagonism of PAF effects. **European Journal of Pharmacology**, v. 616, n. 1-3, p. 43-7, 2009.

Desilles, J.P. *et al.* Blood-brain barrier disruption is associated with increased mortality after endovascular therapy. **Neurology**, v. 80, n. 9, p. 844-851, 2013.

Dohmen, C. *et al.* Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence. **Annals of neurology**, v. 63, n. 6, p. 720-728, 2008.

Donnan, G. A. *et al.* Stroke. **The Lancet**, v. 371, n. 9624, p. 1612-1623, 2008.

Doyle, K. P.; Simon, R. P.; Stenzel-Poore, M. P. Mechanisms of ischemic brain damage. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 310-318, 2008.

Duz, B. *et al.* The effect of moderate hypothermia in acute ischemic stroke on pericyte migration: an ultrastructural study. **Cryobiology**, v. 55, n. 3, p. 279-284, 2007.

Easton, A. S. Neutrophils and stroke - can neutrophils mitigate disease in the central nervous system? **International Immunopharmacology**, v. 17, n. 4, p. 1218-25, 2013.

Emerich, D. F.; Dean, R. L.; Bartus, R. T. The role of leukocytes following cerebral ischemia: pathogenic variable or bystander reaction to emerging infarct? **Experimental Neurology**, v. 173, n. 1, p. 168-81, 2002.

Endoh, M.; Pulsinelli, W. A.; Wagner, J. A. Transient global ischemia induces dynamic changes in the expression of bFGF and the FGF receptor. **Molecular brain research**, v. 22, n. 1, p. 76-88, 1994.

Engel O., Kolodziej S., Dirnagl U., Prinz V. (2011). Modeling Stroke in Mice - Middle Cerebral Artery Occlusion with the Filament Model. JoVE. Disponível em: <<http://www.jove.com/details.php?id=2423>, doi: 10.3791/2423>. Acesso em 17 e novembro de 2015.

Fann, D. Y. *et al.* Pathogenesis of acute stroke and the role of inflammasomes. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 4, p. 941-66, 2013.

Fan, T.J. *et al.* Caspase family proteases and apoptosis. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 37, n. 11, p. 719-727, 2005.

Fang, W. *et al.* Platelet activating factor induces blood brain barrier permeability alteration in vitro. **Journal of Neuroimmunology**, v. 230, n. 1-2, p. 42-7, 2011.

Fang, W. *et al.* Platelet activating factor induces transient blood-brain barrier opening to facilitate edaravone penetration into the brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 128, n. 5, p. 662-71, 2014.

Feuerstein, G. Z.; Wang, X. Animal models of stroke. **Molecular medicine today**, v. 6, n. 3, p. 133-135, 2000.

Flynn, R.; Macwalter, R.; Doney, A. The cost of cerebral ischaemia. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 250-256, 2008.

Fluri, F.; Schuhmann, M. K.; Kleinschnitz, C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. **Drug design, development and therapy**, v. 9, p. 3445, 2015.

Fonarow, G. C. *et al.* Timeliness of tissue-type plasminogen activator therapy in acute ischemic stroke patient characteristics, hospital factors, and outcomes associated with door-to-needle times within 60 minutes. **Circulation**, v. 123, n. 7, p. 750-758, 2011.

Fox, R.; Aubert, M. Flow cytometric detection of activated caspase-3. **Apoptosis and Cancer: Springer**, p.47-56, 2008.

Fu, Y. *et al.* Immune interventions in stroke. **Nature Reviews Neurology**, 2015.

Garcia, J. *et al.* Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). **The American journal of pathology**, v. 144, n. 1, p. 188, 1994.

Gilgun-Sherki, Y. *et al.* Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. **Pharmacological reviews**, v. 54, n. 2, p. 271-284, 2002.

Ginsberg, M. D. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 363-389, 2008.

Goodman & Gilman. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12 Ed. São Paulo: McGrawHill, 2012.

- Guo, Y. J. *et al.* S-methylisothiourea induces apoptosis of herpes simplex virus-1-infected microglial cells. **Inflammation**, v. 34, n. 5, p. 388-401, 2011.
- Hachinski, V. *et al.* Stroke: working toward a prioritized world agenda. **International Journal of Stroke**, v. 5, n. 4, p. 238-256, 2010.
- Han, H.; Yenari, M. Cellular targets of brain inflammation in stroke. **Current opinion in investigational drugs**, v. 4, n. 5, p. 522-529, 2003.
- Harukuni, I.; Bhardwaj, A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. **Neurologic clinics**, v. 24, n. 1, p. 1-21, 2006.
- Hayashi, K. *et al.* Effects of hypoxia on endothelial/pericytic co-culture model of the blood-brain barrier. **Regulatory peptides**, v. 123, n. 1, p. 77-83, 2004.
- Hayashi, T. *et al.* Damage to the endoplasmic reticulum and activation of apoptotic machinery by oxidative stress in ischemic neurons. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 25, n. 1, p. 41-53, 2005.
- Hayward, N. J. *et al.* Lack of evidence for neutrophil participation during infarct formation following focal cerebral ischemia in the rat. **Experimental neurology**, v. 139, n. 2, p. 188-202, 1996.
- He, J.; Bazan, H. E. Synergistic effect of platelet-activating factor and tumor necrosis factor on corneal myofibroblast apoptosis. **Investigative Ophthalmology Visual Science**, v. 47, p. 883-891, 2006.
- Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.
- Irving, E. A. *et al.* Differential activation of MAPK/ERK and p38/SAPK in neurones and glia following focal cerebral ischaemia in the rat. **Molecular brain research**, v. 77, n. 1, p. 65-75, 2000.
- Ishii, S.; Shimizu, T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. **Progress in lipid research**, v. 39, n. 1, p. 41-82, 2000.
- Jayakumar, A. R. *et al.* NF-kappa β in the mechanism of brain edema in acute liver failure: studies in transgenic mice. **Neurobiology of Disease**, v. 41, n. 2, p. 498-507, 2011.
- Jiang, Z. *et al.* The effects of methylene blue on autophagy and apoptosis in MRI-defined normal tissue, ischemic penumbra and ischemic core. **PloS one**, v. 10, n. 6, 2015.
- Jickling, G. C. *et al.* Ischemic transient neurological events identified by immune response to cerebral ischemia. **Stroke**, v. 43, n. 4, p. 1006-12, 2012.
- Kalogeris, T. *et al.* Cell biology of ischemia/reperfusion injury. **International review of cell and molecular biology**, v. 298, p. 229-317, 2012.

- Karasawa, K. *et al.* Plasma platelet activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH). **Progress in lipid research**, v. 42, n. 2, p. 93-114, 2003.
- Kassner, A.; Merali, Z. Assessment of Blood–Brain Barrier Disruption in Stroke. **Stroke**, v. 46, n. 11, p. 3310-3315, 2015.
- Kenne, E. *et al.* Neutrophil depletion reduces edema formation and tissue loss following traumatic brain injury in mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, p. 17, 2012.
- Kennedy, R. E. *et al.* Association between family risk of stroke and myocardial infarction with prevalent risk factors and coexisting diseases. **Stroke**, v. 43, n. 4, p. 974-979, 2012.
- Kilic, E. *et al.* Melatonin reduces disseminate neuronal death after mild focal ischemia in mice via inhibition of caspase-3 and is suitable as an add-on treatment to tissue-plasminogen activator. **Journal of pineal research**, v. 36, n. 3, p. 171-176, 2004.
- Lacerda-Queiroz, N. *et al.* Platelet-activating factor receptor is essential for the development of experimental cerebral malaria. **American Journal of Pathology**, v. 180, n. 1, p. 246-55, 2012.
- Kleinig, T. J.; Vink, R. Suppression of inflammation in ischemic and hemorrhagic stroke: therapeutic options. **Current Opinion in Neurology**, v. 22, n. 3, p. 294-301, 2009.
- Kumar, R. *et al.* Production and effects of platelet-activating factor in the rat brain. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, v. 963, n. 2, p. 375-383, 1988.
- Le, D. A. *et al.* Caspase activation and neuroprotection in caspase-3-deficient mice after in vivo cerebral ischemia and in vitro oxygen glucose deprivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 23, p. 15188-15193, 2002
- Li, J. *et al.* The effects of propofol on hippocampal caspase-3 and Bcl-2 expression following forebrain ischemia–reperfusion in rats. **Brain research**, v. 1356, p. 11-23, 2010.
- Liu, T. *et al.* Interleukin-1 beta mRNA expression in ischemic rat cortex. **Stroke**, v. 24, n. 11, p. 1746-1750, 1993.
- Loddick, S. A.; Turnbull, A. V.; Rothwell, N. J. Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 18, n. 2, p. 176-179, 1998.
- Lu, J. *et al.* Platelet-activating factor-induced apoptosis is blocked by Bcl-2 in rat intestinal epithelial cells. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 286, n. 2, p. 340-350, 2004.
- MacLennan, K. M.; Smith, P. F.; Darlington, C. L. Platelet-activating factor in the CNS. **Progress in neurobiology**, v. 50, n. 5, p. 585-596, 1996.

Majno, G.; Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **The American journal of pathology**, v. 146, n. 1, p. 3, 1995.

Malhotra, J. D.; Kaufman, R. J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? **Antioxidants & redox signaling**, v. 9, n. 12, p. 2277-2294, 2007.

Mărgăritescu, O. *et al.* Histopathological changes in acute ischemic stroke. **Romanian journal of morphology and embryology**, v. 50, n. 3, p. 327-339, 2009.

Matsuo, Y. *et al.* Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion. **Stroke**, v. 25, n. 7, p. 1469-1475, 1994.

Mehrjerdi, F. Z. *et al.* Increased phosphorylation of mTOR is involved in remote ischemic preconditioning of hippocampus in mice. **Brain research**, v. 1526, p. 94-101, 2013.

Meldrum, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 4, p. 1007S-1015S, 2000.

Mergenthaler, P.; Dirnagl, U.; Meisel, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. **Metabolic brain disease**, v. 19, n. 3-4, p. 151-167, 2004.

Mouse Brain Atlas: C57BL/6J Coronal. Disponível em <http://www.mbl.org/atlas170/atlas170_frame.html>. Acesso em 05 de dezembro de 2015.

Mori, M. *et al.* Predominant expression of platelet-activating factor receptor in the rat brain microglia. **The Journal of neuroscience**, v. 16, n. 11, p. 3590-3600, 1996.

Murkin, J. M. Etiology and incidence of brain dysfunction after cardiac surgery. **Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia**, v. 13, n. 4, p. 12-37, 1999.

Nagaraja, T. N. *et al.* Acute Leakage Patterns of Fluorescent Plasma Flow Markers after Transient Focal Cerebral Ischemia Suggest Large Openings in Blood-Brain Barrier. **Microcirculation**, v. 15, n. 1, p. 1-14, 2008.

Namura, S. *et al.* Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. **The Journal of neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 3659-3668, 1998.

Nasser, M. W. *et al.* Differential activation and regulation of CXCR1 and CXCR2 by CXCL8 monomer and dimer. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 5, p. 3425-3432, 2009.

Oldendorf, W. H.; Cornford, M. E.; Brown, W. J. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: A study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. **Annals of neurology**, v. 1, n. 5, p. 409-417, 1977.

Ostergaard, L. *et al.* The role of the cerebral capillaries in acute ischemic stroke: the extended penumbra model. **Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism**, v. 33, n. 5, p. 635-48, 2013.

- Ovbiagele, B.; Nguyen-Huynh, M. N. Stroke epidemiology: advancing our understanding of disease mechanism and therapy. **Neurotherapeutics**, v. 8, n. 3, p. 319-329, 2011.
- Ozawa, S.; Kamiya, H.; Tsuzuki, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in neurobiology**, v. 54, n. 5, p. 581-618, 1998.
- Pan, W. *et al.* Cerebral microvascular IL15 is a novel mediator of TNF action. **Journal of Neurochemistry**, v. 111, n. 3, p. 819-27, 2009.
- Panetta, T. *et al.* Arachidonic Acid Metabolism and Cerebral Blood Flow in the Normal, Ischemic, and Reperfused Gerbil Brain: Inhibition of Ischemia-Reperfusion-Induced Cerebral Injury by a Platelet-Activating Factor Antagonist (BN 52021). **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 559, n. 1, p. 340-351, 1989.
- Pantoni, L.; Sarti, C.; Inzitari, D. Cytokines and cell adhesion molecules in cerebral ischemia experimental bases and therapeutic perspectives. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 18, n. 4, p. 503-513, 1998.
- Pereira, B. G. *et al.* Evaluation of the effects of thalidomide-loaded biodegradable devices in solid Ehrlich tumor. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 67, n. 2, p. 129-32, 2013.
- Piao, C. S. *et al.* Administration of the p38 MAPK inhibitor SB203580 affords brain protection with a wide therapeutic window against focal ischemic insult. **Journal of neuroscience research**, v. 73, n. 4, p. 537-544, 2003.
- Pulliam, L. *et al.* Differential modulation of cell death proteins in human brain cells by tumor necrosis factor alpha and platelet activating factor. **Journal of neuroscience research**, v. 54, n. 4, p. 530-538, 1998.
- Pun, P. B.; Lu, J.; Moolchala, S. Involvement of ROS in BBB dysfunction. **Free radical research**, v. 43, n. 4, p. 348-364, 2009.
- Ren, C. *et al.* Different expression of ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 and alphaII-spectrin in ischemic and hemorrhagic stroke: Potential biomarkers in diagnosis. **Brain Research**, v. 1540, p. 84-91, 2013.
- Richardson, R. M. *et al.* Role of the cytoplasmic tails of CXCR1 and CXCR2 in mediating leukocyte migration, activation, and regulation. **The journal of immunology**, v. 170, n. 6, p. 2904-2911, 2003.
- Ritzel, R. M. *et al.* Functional differences between microglia and monocytes after ischemic stroke. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p. 106, 2015.
- Robertson, J. *et al.* Apoptotic death of neurons exhibiting peripherin aggregates is mediated by the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- α . **The Journal of cell biology**, v. 155, n. 2, p. 217-226, 2001.

Ronaldson, P. T.; Davis, T. P. Blood-brain barrier integrity and glial support: mechanisms that can be targeted for novel therapeutic approaches in stroke. **Current pharmaceutical design**, v. 18, n. 25, p. 3624, 2012.

Rosell, A. *et al.* Caspase-3 is related to infarct growth after human ischemic stroke. **Neuroscience Letters**, v. 430, n. 1, p. 1-6, 2008.

Rosenberg, G. A.; Estrada, E. Y.; Dencoff, J. E. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. **Stroke**, v. 29, n. 10, p. 2189-2195, 1998.

Sairanen, T. *et al.* Evolution of cerebral tumor necrosis factor- α production during human ischemic stroke. **Stroke**, v. 32, n. 8, p. 1750-1758, 2001.

Sato, A.; Ebina, K. Common mechanism in endothelin-3 and PAF receptor function for anti-inflammatory responses. **European journal of pharmacology**, v. 718, n. 1, p. 30-33, 2013.

Schmid-Schönbein, G. W. Leukocyte kinetics in the microcirculation. **Biorheology**, v. 24, n. 2, p. 139-151, 1986.

Schmidt-Kastner, R.; Freund, T. F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. **Neuroscience**, v. 40, n. 3, p. 599-636, 1991.

Sharma, S. *et al.* IL-10 directly protects cortical neurons by activating PI-3 kinase and STAT-3 pathways. **Brain research**, v. 1373, p. 189-194, 2011.

Shimizu, T. Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 49, p. 123-150, 2009.

Silva, B. C. Efeito do inibidor da 5-lipoxigenase (zileuton) na isquemia e reperfusão cerebral murina, 2014. 123 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

Simon, R. P. Acidotoxicity trumps excitotoxicity in ischemic brain. **Archives of neurology**, v. 63, n. 10, p. 1368-1371, 2006.

Smeltzer, S. C; Bare, B. G. **Tratado de Enfermagem Médico-Cirúrgica**. 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

Smith, P. F.; MacLennan, K.; Darlington, C. L. The neuroprotective properties of the Ginkgo biloba leaf: a review of the possible relationship to platelet-activating factor (PAF). **Journal of ethnopharmacology**, v. 50, n. 3, p. 131-139, 1996.

Sousa, L. F. *et al.* Blockade of CXCR1/2 chemokine receptors protects against brain damage in ischemic stroke in mice: Ischemia and Reparixin. **Clinics**, v. 68, n. 3, p. 391-394, 2013.

Stanimirovic, D.; Satoh, K. Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role in ischemic brain inflammation. **Brain Pathology**, v. 10, n. 1, p. 113-126, 2000.

- Strbian, D. *et al.* The blood-brain barrier is continuously open for several weeks following transient focal cerebral ischemia. **Neuroscience**, v. 153, n. 1, p. 175-81, 2008.
- Strong, K.; Mathers, C.; Bonita, R. Preventing stroke: saving lives around the world. **The Lancet Neurology**, v. 6, n. 2, p. 182-187, 2007.
- Sugawara, T.; Chan, P. H. Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia. **Antioxidants and Redox signaling**, v. 5, n. 5, p. 597-607, 2003.
- Summers, L.; Kielty, C.; Pinteaux, E. Adhesion to fibronectin regulates interleukin-1 beta expression in microglial cells. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 41, n. 2, p. 148-155, 2009.
- Tajiri, N. *et al.* In vivo animal stroke models: a rationale for rodent and non-human primate models. **Translational Stroke Research**, v. 4, n. 3, p. 308-21, 2013.
- Thomas, W. S. *et al.* Tissue factor contributes to microvascular defects after focal cerebral ischemia. **Stroke**, v. 24, n. 6, p. 847-853, 1993.
- Tolvanen, A. D. *et al.* Stanniocalcin 1 is important for poststroke functionality, but dispensable for ischemic tolerance. **Neuroscience**, v. 229, p. 49-54, 2013.
- Tu, X. K. *et al.* Neuroprotective effect of baicalin in a rat model of permanent focal cerebral ischemia. **Neurochemical Research**, v. 34, n. 9, p. 1626-34, 2009.
- Tuttolomondo, A. *et al.* Inflammation as a therapeutic target in acute ischemic stroke treatment. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 9, n. 14, p. 1240-1260, 2009.
- Uhl, E. *et al.* Influence of Platelet-Activating Factor on Cerebral Microcirculation in Rats: Part 1. Systemic Application. **Stroke**, v. 30, n. 4, p. 873-879, 1999.
- Umemura, K. *et al.* Neuroprotective role of transgenic PAF-acetylhydrolase II in mouse models of focal cerebral ischemia. **Stroke**, v. 38, n. 3, p. 1063-8, 2007.
- Van Exel, E. *et al.* Inflammation and Stroke The Leiden 85-Plus Study. **Stroke**, v. 33, n. 4, p. 1135-1138, 2002.
- Wagner, D. C. *et al.* Cleaved caspase-3 expression after experimental stroke exhibits different phenotypes and is predominantly non-apoptotic. **Brain Research**, v. 1381, p. 237-42, 2011.
- Wang, J. *et al.* Comparison of different quantification methods to determine hippocampal damage after cerebral ischemia. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 240, p. 67-76, 2015.
- Wang, X. *et al.* Transforming growth factor- β 1 exhibits delayed gene expression following focal cerebral ischemia. **Brain research bulletin**, v. 36, n. 6, p. 607-609, 1995.

- Weston, R. M. *et al.* Inflammatory cell infiltration after endothelin-1-induced cerebral ischemia: histochemical and myeloperoxidase correlation with temporal changes in brain injury. **Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism**, v. 27, n. 1, p. 100-114, 2007.
- Witko-Sarsat, V. *et al.* Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Laboratory investigation**, v. 80, n. 5, p. 617-653, 2000.
- Woodruff, T. M. *et al.* Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. **Molecular Neurodegeneration**, v. 6, n. 1, p. 11, 2011.
- Wright, I. C. *et al.* Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. **American Journal of Psychiatry**, 2014.
- Wu, Y. *et al.* Neuroprotection by platelet-activating factor acetylhydrolase in a mouse model of transient cerebral ischemia. **Neuroscience Letters**, v. 558, p. 26-30, 2014.
- Yamasaki, Y. *et al.* Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. **Stroke**, v. 26, n. 4, p. 676-681, 1995.
- Yamashita, T. *et al.* Blockade of interleukin-6 signaling aggravates ischemic cerebral damage in mice: possible involvement of Stat3 activation in the protection of neurons. **Journal of neurochemistry**, v. 94, n. 2, p. 459-468, 2005.
- Yasuda, Y. *et al.* Relationship between S100 β and GFAP expression in astrocytes during infarction and glial scar formation after mild transient ischemia. **Brain research**, v. 1021, n. 1, p. 20-31, 2004.
- Yang, Z. Z. *et al.* Effect of ginkgolide B on striatal extracellular amino acids in middle cerebral artery occluded rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 1, p. 117-22, 2011.
- Yenari, M. A. *et al.* Microglia Potentiate Damage to Blood–Brain Barrier Constituents Improvement by Minocycline In Vivo and In Vitro. **Stroke**, v. 37, n. 4, p. 1087-1093, 2006.
- Yokomizo, T. *et al.* A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. **Nature**, v. 387, n. 6633, p. 620-624, 1997.
- Yrjänheikki, J. *et al.* A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 23, p. 13496-13500, 1999.
- Yuan, J. Neuroprotective strategies targeting apoptotic and necrotic cell death for stroke. **Apoptosis**, v. 14, n. 4, p. 469-477, 2009.
- Zhang, X. *et al.* Down-regulation of platelet-activating factor receptor gene expression during focal reversible cerebral ischemia in rats. **Neurochemical Research**, v. 32, n. 3, p. 451-6, 2007.
- Zlokovic, B. V. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. **Neuron**, v. 57, n. 2, p. 178-201, 2008

ANEXOS