



ASPECTOS CLÍNICOS, PATOLÓGICOS E INFLAMATÓRIOS DURANTE A  
ISQUEMIA E REPERFUSÃO ENCEFÁLICA EM CAMUNDONGOS

Tese de Doutorado

Edna Constanza Gómez Victoria  
Belo Horizonte/MG  
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

EDNA CONSTANZA GÓMEZ VICTORIA

ASPECTOS CLÍNICOS, PATOLÓGICOS E INFLAMATÓRIOS DURANTE A ISQUEMIA E  
REPERFUSÃO ENCEFÁLICA EM CAMUNDONGOS

Belo Horizonte/MG

2018

EDNA CONSTANZA GÓMEZ VICTORIA

ASPECTOS CLÍNICOS, PATOLÓGICOS E INFLAMATÓRIOS DURANTE A ISQUEMIA E  
REPERFUSÃO ENCEFÁLICA EM CAMUNDONGOS

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Patologia Investigativa

Orientadora: Profa. Dra. Milene Alvarenga Rachid

Co-orientadores: Prof. Dr. Antônio Lúcio Teixeira

Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliari

Belo Horizonte/MG

2018

V644a Victoria, Edna Constanza Gomez.  
Aspectos clínicos, patológicos e inflamatórios durante a isquemia e  
reperfusão encefálica em camundongos [manuscrito]. / Edna Constanza  
Gomez Victoria. - - Belo Horizonte: 2017.  
78f. : il.  
Orientador: Milene Alvarenga Rachid.  
Coorientador: Antônio Lúcio Teixeira, Marcelo Vidigal Caliari.  
Área de concentração: Patologia Investigativa.  
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de  
Medicina.

1. Acidente Vascular Cerebral. 2. Isquemia. 3. Receptores CCR5. 4.  
Cérebro. 5. Camundongos. 6. Citocinas. 7. Dissertações Acadêmicas. I.  
Rachid, Milene Alvarenga. II. Teixeira, Antônio Lúcio. III. Caliari,  
Marcelo Vidigal. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de  
Medicina. V. Título.

NLM: QZ 170

Bibliotecária Responsável: Cibele de Lourdes Buldrini Filogônio Silva CRB-6/999





UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG


## FOLHA DE APROVAÇÃO

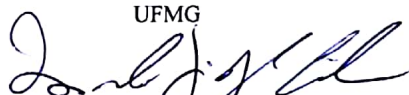
**ASPECTOS CLÍNICOS, PATOLÓGICOS E INFLAMATÓRIOS DURANTE A ISQUEMIA E REPERFUSÃO ENCEFÁLICA EM CAMUNDONGOS**

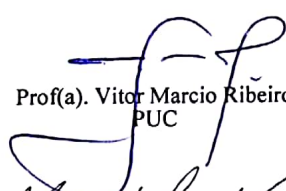
**EDNA CONSTANZA GOMEZ VICTORIA**

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

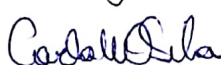
Aprovada em 17 de novembro de 2017, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof(a). Milene Alvarenga Rachid - Orientador  
UFMG

  
Prof(a). Marcelo Vidigal Caliari  
UFMG

  
Prof(a). Vitor Marcio Ribeiro  
PUC

  
Prof(a). Dr. Leonardo Cruz de Souza  
UFMG

  
Prof(a). Carla Maria Osorio Silva  
UFMG

  
Prof(a). Patricia Martins Parreiras  
Fiocruz

Belo Horizonte, 17 de novembro de 2017.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

## ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA EDNA CONSTANZA GOMEZ VICTORIA

Realizou-se, no dia 17 de novembro de 2017, às 09:00 horas, Sala reuniões pós-graduação da Patologia, ICB-UFMG, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *ASPECTOS CLÍNICOS, PATOLÓGICOS E INFLAMATÓRIOS DURANTE A ISQUEMIA E REPERFUSÃO ENCEFÁLICA EM CAMUNDONGOS*, apresentada por EDNA CONSTANZA GOMEZ VICTORIA, número de registro 2014667963, graduada no curso de MEDICINA VETERINARIA E ZOOTECNIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Milene Alvarenga Rachid - Orientador (UFMG), Prof(a). Marcelo Vidigal Caliari (UFMG), Prof(a). Antonio Lucio Teixeira Junior (Coorientador) (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Vitor Marcio Ribeiro (PUC), Prof(a). Dr. Leonardo Cruz de Souza (UFMG), Prof(a). Carla Maria Osorio Silva (UFMG), Prof(a). Patricia Martins Parreiras (Fiocruz).

A Comissão considerou a tese:

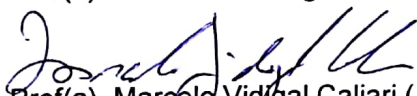
Aprovada

Reprovada

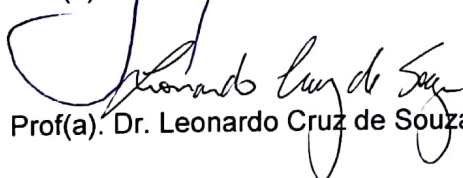
Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 17 de novembro de 2017.

  
Prof(a). Milene Alvarenga Rachid ( Doutora )

  
Prof(a). Marcelo Vidigal Caliari ( Doutor )

  
Prof(a). Vitor Marcio Ribeiro ( Doutor )

  
Prof(a). Dr. Leonardo Cruz de Souza ( Doutor )

  
Prof(a). Carla Maria Osorio Silva ( Doutor )

  
Prof(a). Patricia Martins Parreiras ( Doutora )

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia Celular e Molecular do Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, tendo a colaboração dos Laboratórios de Apoptose, Protozooses, Angiogênese, Neurofarmacologia, Interdisciplinar de Investigação Médica e Imunofarmacologia, todos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*“La vida te hace hacer planes que no te imaginas, pero que si necesitas para  
diseñar tu destino”*

*Edna Gómez*

## **Agradecimentos**

À Deus por todas as bênçãos e por ter me dado outra oportunidade de vida para concluir este trabalho e continuar com meu caminho para conseguir meus sonhos.

À minha família, especialmente a meus pais Astrid e Jesus, por todo seu amor incondicional, incentivo, apoio e cuidado sempre, igualmente a meu amor e companheiro de vida Jaime Alejandro por ir juntos da mão em cada momento.

À professora Milene Alvarenga Rachid, pela confiança em me receber como sua primeira aluna de doutorado, por toda sua ajuda nesse projeto. Por todo carinho, apoio, conselhos e aprendizado nestes quatro anos, sou imensamente grata.

Ao professor Marcelo Vidigal, por ter me ajudado no seu laboratório, por todo apoio e dedicação.

Ao professor Antônio Teixeira, pela disponibilidade e importante contribuição no desenvolvimento do projeto.

À todas as companheiras de laboratório de Patologia Celular e Molecular que me ajudaram em cada processo, pela troca de conhecimentos e incentivo; especialmente agradeço Eliana, a menina amiga de alegrias e tristezas.

À toda equipe da Pós-graduação em Patologia: Ao colegiado, à todos os professores por todo apoio e toda colaboração, as técnicas pela ajuda rápida no processamento das amostras, secretarias especialmente a Danielle e colegas alunos de mestrado e doutorado, por toda ajuda e dedicação. Todos todos contribuíram com um grão de areia para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos membros da banca: Patrícia Martins Parreiras, Carla Maria Osorio Silva, Leonardo Cruz de Souza e o Vitor Marcio Ribeiro pela disponibilidade e valiosas contribuições.

Os amigos Colombianos, pelo apoio e amizade!

E meus amores de quatro patas a Blair e o Itachi, que são os meus anjos de amor.

**GRACIAS A TODOS!**

## RESUMO

No presente estudo foi utilizado o modelo de oclusão bilateral da carótida comum (BCCAO) durante 25 minutos em camundongos machos C57BL/6 selvagens com objetivo de investigarmos as alterações neurológicas e os aspectos patológicos e inflamatórios durante a fase aguda da isquemia global transitória no encéfalo. Observamos déficits neurológicos associados à alterações morfológicas e processos inflamatórios no sistema nervoso central (SNC) após 72 horas de reperfusão. Nossos resultados demonstraram que os níveis de TNF, IL-1 $\beta$ , CXCL1 e CCL5 aumentaram após isquemia/reperfusão no grupo BCCAO em comparação com o grupo sham. A atividade das metaloproteinases MMP-1 e MMP-2 foi analisada na área de lesão por imunistoquímica. Os dois marcadores aumentaram no grupo BCCAO, em comparação com o grupo Sham. Com o mesmo modelo de BCCAO em camundongos machos C57BL/6 selvagens e deficientes para o receptor CCR5 (CCR5<sup>-/-</sup>), investigamos a participação do CCR5 após isquemia e reperfusão por 24 horas. Na deficiência de CCR5, observamos uma melhora significativa nos déficits neurológicos associados à diminuição da área infartada e das áreas necróticas e de neurônios isquêmicos. Os camundongos CCR5<sup>-/-</sup> BCCAO apresentaram níveis mais baixos de CXCL1 e níveis mais altos de BDNF, em comparação com camundongos C57BL/6 BCCAO. O presente estudo demonstrou a associação dos déficits neurológicos com alterações histopatológicas e a expressão de fatores pró-inflamatórios após isquemia cerebral e reperfusão. Além disso, nossos resultados sugerem uma neuroproteção potencial na ausência do receptor CCR5 durante a lesão por isquemia/reperfusão global.

## ABSTRACT

In the present study, we used the BCCAO model for 25 minutes in wild C57BL/6 male mice to investigate neurological, pathological and inflammatory patterns during the acute phase from transient global ischemia in the brain. We observed neurological changes associated with morphological changes and inflammatory processes in the CNS, 72 hours after a reperfusion. Our results demonstrate brain levels of TNF, IL-1 $\beta$ , CXCL1, and CCL5 were increased post-ischemia compared with sham-operated group. The activity of MPP-1 and MMP-2 was analyzed in the injury area by immunohistochemistry. The two markers increased in the BCCA group compared to the sham group. With the same BCCAO model in wild C57BL/6 and CCR5 receptor deficient (CCR5<sup>-/-</sup>) C57BL/6 male mice, we investigate the involvement effects of CCR5 after ischemia. In CCR5 deficiency, we observed a significant improvement in the neurological deficits associated with the decrease of the infarcted area. In addition, a decrease in necrotic areas and ischemic neurons has been reported. C57BL/6 (CCR5<sup>-/-</sup>) ischemic mice showed lower levels of CXCL1 and higher levels of BDNF compared to C57BL/6 ischemic mice. Together, our results suggest potential neuroprotection in the absence of the CCR5 receptor in global ischemia/reperfusion injury. With the same BCCAO model. The present study demonstrated the association of neurological deficits with histopathological changes and expression of proinflammatory factors after cerebral ischemia and subacute reperfusion. Moreover, our data suggest a potential neuroprotection in the absence of the CCR5 receptor during global ischemia/reperfusion injury.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** ACA (artéria cerebral anterior), MCA (artéria cerebral média), PCA (artéria cerebral posterior). Cortes do encéfalo humano, mostrando a “watershed area” entre ACA-MCA e a “watershed area” entre MCA-PCA. (A) Corte coronal e (B) Corte transversal (Blumenfeld, 2002). ..... 26

**Figura 2.** Modelos experimentais de isquemia global e focal. Diagrama da anatomia cerebrovascular do rato, ilustrando a eletrocauterização permanente das artérias vertebrais (1) e a posição dos cliques cirúrgicos nas artérias carótidas comuns (2) no modelo 4-VO (à esquerda) e a sutura intraluminal durante oclusão no modelo de isquemia focal temporária (à direita). AA, arco da aorta; ACA, artéria cerebral anterior; BA, artéria basilar; CCA, artéria carótida comum; ECA, artéria carótida externa; ICA, artéria carótida interna; MCA, artéria cerebral média; PCA, artéria cerebral posterior; SA, artéria subclávia; VA, artéria vertebral. .... 29

**Figura 3.** Representação da dissecação feita para realização da técnica de BCCAo, afastando as glândulas e o músculo esterno-hióideo. Localização anatômica da traqueia, artérias carótidas comuns e nervo vago (Fonte própria). ..... 45

**Figura 4.** Design experimental da tese ..... 50



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>2-VO</b>	Oclusão de dois vasos
<b>3-VO</b>	Oclusão de três vasos
<b>4-VO</b>	Oclusão de quatro vasos
<b>AA</b>	Artéria aorta
<b>ABAVE</b>	Associação brasileira do acidente vascular encefálico
<b>ACA</b>	Artéria cerebral anterior
<b>AGL</b>	Ácidos graxos livres
<b>AMPA</b>	Acido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
<b>AMPc</b>	Monofosfato cíclico de adenosina
<b>AS</b>	Artéria subclávia
<b>AVE</b>	Acidente vascular encefálico
<b>BA</b>	Artéria basilar
<b>BBB</b>	Barreira hematoencefálica
<b>BCCAo</b>	Oclusão das artérias carótidas comuns
<b>BDNF</b>	Fator neurotrófico derivado do cérebro
<b>CA1</b>	Área 1 do corno de amonis
<b>CADASIL</b>	Arteriopatia cerebral autossômica dominante com infartos subcorticais e leucoencefalopatia
<b>CCA</b>	Artérias carótidas comuns
<b>CCL11</b>	Eotaxina-1
<b>CCL14 <math>\alpha</math> /HCC-1</b>	Quimiocina-1 humana
<b>CCL16/HCC-4</b>	Quimiocina-4 humana
<b>CCL3/MIP1 <math>\alpha</math></b>	Proteína quimioatraente de monócitos 1 alfa
<b>CCL4/MIP1 <math>\beta</math></b>	Proteína quimioatraente de monócitos 1 beta
<b>CCL5</b>	RANTES
<b>CCL8/MCP-2</b>	Proteína quimioatraente de monócitos 2
<b>CCR5</b>	C-C receptor quimiocina tipo 5
<b>CD4</b>	Cluster de diferenciação 4

<b>CX3CL1</b>	Fractalquina
<b>CXC/-CC</b>	CC-estrutura molecular das quimiocinas
<b>DAMPs</b>	Padrões moleculares associados ao dano
<b>DPOC</b>	Doença pulmonar obstrutiva crônica
<b>ECA</b>	Artéria carótidas externas
<b>FHS</b>	Framingham heart study
<b>GPCR</b>	Receptores G acoplados à proteína
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidade
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adesão intracelular 1
<b>IL- <math>\alpha</math></b>	Interleucina 1 alfa
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-1 <math>\beta</math></b>	Interleucina 1 beta
<b>IL-4</b>	Interleucina 4
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-8/CXCL8</b>	Interleucina 8
<b>INF- <math>\gamma</math></b>	Interferon-gama
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase
<b>JNK</b>	C-Jun N-terminal quinase
<b>KC/CXCL1</b>	Quimiocinas derivada de queratinócitos/quimiocina
<b>kD</b>	kiloDalton
<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquidiano
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade
<b>MAP</b>	Proteínas-quinases ativadas por mitógenos
<b>MCA</b>	Artéria cerebral média
<b>MCA</b>	Artéria cerebral media
<b>MCAo</b>	Oclusão da artéria cerebral média
<b>MIP-1</b>	Proteína inflamatória de macrófaga 1
<b>MLKL</b>	Kinase domain-like protein
<b>MMP-1</b>	Colagenase intersticial fibroblástica
<b>MMP-12</b>	Metaloproteinase de matriz 12

<b>MMP-13</b>	Pro-colagenase 3
<b>MMP-14</b>	Metaloproteinase de matriz 14
<b>MMP-16</b>	Metaloproteinase de matriz 16
<b>MMP-2</b>	Gelatinase A
<b>MMP-23</b>	Metaloproteinase de matriz 23
<b>MMP-3</b>	Estromelisina 1
<b>MMP-7</b>	Matrilisina
<b>MMP-8</b>	Colagenase 2
<b>MMP-9</b>	Gelatinase B
<b>MMP</b>	Metalloproteinase de matriz
<b>MMPs</b>	Metaloproteinases de matriz
<b>MT-MMPs</b>	MMPs de tipo membrana
<b>MT3-MMP</b>	Metaloproteinase de matriz de tipo membrana 3
<b>NF- <math>\kappa</math> <math>\beta</math></b>	Fator nuclear potenciador das cadeias leves kappa de células B ativadas
<b>NGF</b>	Fator de crescimento nervoso
<b>NINDS</b>	<i>National Institute of Neurological Disorders and Stroke</i>
<b>NK</b>	Natural killer cell
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>NT-3</b>	Neurotrofina-3
<b>NT-4</b>	Neurotrofina-4
<b>PCA</b>	<i>Artéria cerebral posterior</i>
<b>PET</b>	Tomografia por emissão de pósitrons
<b>pH</b>	Potencial de hidrogênio
<b>PNNs</b>	Redes perineuronais
<b>PNS</b>	Pesquisa nacional de saúde
<b>RIP1</b>	Receptor-interacting protein 1
<b>RIP3</b>	Receptor-interacting protein 3
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>SI</b>	Sistema imune

<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>TGF</b>	Fator de crescimento transformador
<b>TGF- <math>\beta</math></b>	Fator de crescimento transformador beta
<b>Th</b>	Linfocito T helper
<b>Th1</b>	Linfocito T helper 1
<b>Th2</b>	Linfocito T helper 2
<b>TIA</b>	Ataque isquêmico transitório
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TNFR1</b>	Receptor 1 do fator de necrose tumoral
<b>Treg</b>	Linfocito T regulador
<b>TrKA</b>	Tropomiosina receptor kinasase A
<b>TrKB</b>	Tropomiosina receptor kinasase B
<b>TrKC</b>	Tropomiosina receptor kinasase C
<b>VA</b>	Artérias vertebrais

## SUMARIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	2
2.1 Acidente Vascular Cerebral (AVC) .....	2
2.2 Fatores de risco .....	5
2.3 Patogenia do AVC Isquemia/Reperusão.....	8
2.4 O encéfalo “imune privilegiado” .....	11
2.5 Citocinas.....	13
2.6 Quimiocinas .....	15
2.6.1 C-C receptor de quimiocina tipo 5 (CCR5).....	17
2.7 Metaloproteinase de matriz (MMP).....	19
2.8 Neurotrofinas .....	22
2.9 Core e Penumbra no AVC isquêmico .....	23
2.9.1 Alterações morfológicas .....	24
2.10 Tratamento do AVC isquêmico.....	26
2.11 Modelos experimentais para isquemia e reperusão encefálica .....	27
3. BIBLIOGRAFIA .....	32
4. OBJETIVO GERAL .....	43
5. MATERIAL E MÉTODO .....	43
Animais.....	43
Indução à isquemia global transitória: Oclusão bilateral da artéria carótida comum (BCCAO) .....	44
Avaliação neurológica .....	46
Análise macroscópica da área de infarto .....	46
Coleta de amostras.....	47
Avaliação microscópica da área de lesão .....	47
Determinação de citocinas, quimiocinas e fator neurotrófico por ELISA sandwich .....	48
Expressão imunohistoquímica de MMP-1 e MMP-2.....	49

Analises estatísticos .....	49
<b>5. CAPITULO I.....</b>	<b>51</b>
<b>5.1 Objetivos Específicos .....</b>	<b>51</b>
<b>INCREASED EXPRESSION OF METALLOPROTEINASE 1 DURING TRANSIENT GLOBAL BRAIN ISCHEMIA         IN MICE .....</b>	<b>52</b>
<b>6. CAPITULO II .....</b>	<b>75</b>
<b>6.1 Objetivos Específicos.....</b>	<b>75</b>
<b>7. CONCLUSÃO FINAL .....</b>	<b>76</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>77</b>
<b>7.1 Aspectos Éticos .....</b>	<b>77</b>
<b>7.2 Comprovante de submissão do artigo .....</b>	<b>78</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A incidência do acidente vascular cerebral (AVC) tem aumentado ao longo das duas últimas décadas com mais de 16 milhões de novos casos relatados em todo o mundo (Dietrich, 2017) e atualmente é a quinta causa de morte mundial. Os dados do *Heart Disease and Stroke Statistics* reportam que o AVC é a principal causa de incapacidade e que a taxa de incidência é maior em mulheres quem em homens (>20 anos) e que a tendência se associa à raça, estrato social e ao envelhecimento. A estes fatores de risco não modificáveis se associam a comorbidades (fatores modificáveis) como as doenças cardiovasculares, diabetes, sedentarismo, tabagismo, alcoolismo, obesidade e consumo de drogas e anticoncepcionais orais (Benjamin *et al.*, 2017). Na atualidade com a pesquisa genética se encontraram também fatores não modificáveis, como por exemplo, se achou um aumento no risco de AVC em pacientes com polimorfismos do gene CCR5 ( $\Delta 32$ ) (Sorace *et al.*, 2011).

As causas do AVC são isquêmicas ou hemorrágicas e suas consequências dependem do tamanho e localização da lesão (Auer, 2016). O AVC isquêmico ocorre em 85% dos casos, causando a maior mortalidade entre os dois tipos desta doença e pode acontecer de duas formas: global ou focal (Benjamin *et al.*, 2017). Na fisiopatologia do AVC atuam diferentes vias inflamatórias e de morte celular ocasionada pela diminuição do fluxo sanguíneo no encéfalo (Powers, 2016).

As intervenções terapêuticas agudas incluem agentes trombolíticos ou remoção mecânica de coágulos trombóticos, que são usadas para restaurar o fluxo sanguíneo e preservar os tecidos isquêmicos (Dietrich, 2017). Os tratamentos atuais têm efeitos na morbidade e mortalidade consequente à isquemia, mas não existem tratamentos clínicos eficazes para reduzir os efeitos secundários, porque a terapia atual do AVC só protege o tecido cerebral antes do desenvolvimento de lesões irreversíveis (Hernández *et al.*, 2013).

Modelos animais têm sido utilizados para entender e melhorar a terapêutica do AVC isquêmico (Zhang *et al.*, 2016). Os modelos experimentais podem ser realizados em animais pequenos e de grandes porte (por exemplo, camundongos, ratos, gerbils, coelhos, gatos, cachorros, porcos, ovelhas e macacos), mas geralmente são feitos em ratos e camundongos (Traystman, 2003).

Estes modelos se caracterizam por induzir a isquemia encefálica de duas formas: isquemia global por oclusão de 2 vasos, que podem ser as artérias vertebrais ou as artérias carótidas comuns e por oclusão de 4 vasos que são os dois pares de artérias mencionadas anteriormente; a indução de isquemia focal e feita pela oclusão de um ramo contínuo de vasos (Zhang *et al.*, 2016). Estes modelos permitem uma dissecação cuidadosa dos mecanismos de lesão e neuroproteção, levando em consideração a duração dos eventos em segundos, minutos, horas e dias após o processo isquêmico. Todos esses aspectos são difíceis de determinar e estudar durante a isquemia nos seres humanos devido à diversidade de fatores que influenciam o curso clínico da doença (Traystman, 2003). Apesar de muitas décadas de trabalho com modelos de AVC focal e globais, apenas poucas informações sobre neuroproteção foram traduzidas para seres humanos (Traystman, 2003).

Nosso grupo de pesquisa utiliza o modelo de isquemia/reperfusão global transitória induzida pela oclusão das artérias carótidas comuns para analisar as alterações neurológicas, aspectos patológicos e parâmetros imunes na fase aguda e subaguda após lesão. Os trabalhos desenvolvidos anteriormente em nosso grupo de pesquisa (Costa Silva *et al.*, 2015; De Brito Toscano *et al.*, 2016) são a base que permitiram o desenvolvimento deste estudo dando lugar à análise de etapas mais tardias depois da reperfusão sanguínea na lesão induzida por BCCAO. Esta investigação pretende ajudar no entendimento de vias no processo inflamatório e danos neurológicos após lesão isquêmica encefálica que sirvam no desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### ***2.1 Acidente Vascular Cerebral (AVC)***

O acidente vascular encefálico é popularmente conhecido como derrame. O AVC é uma das principais causas de incapacidade e, representa 11,8% do total de mortes no mundo (Martins *et al.*, 2013; Mozaffarian *et al.*, 2015). Atualmente, quando avaliado separadamente das outras doenças cerebrovasculares é a quinta causa de morte, atrás de doenças cardiovasculares, câncer, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e lesões/acidentes (Benjamin *et al.*, 2017).

Aproximadamente 10% de todos os AVC ocorrem em pessoas de 18 a 50 anos de idade (Avezum *et al.*, 2015), embora em neonatos prematuros com menos de 37 semanas



de gestação frequentemente apresentam um tipo AVC que causa morbidade e mortalidade neonatal na maioria dos casos (Manuck *et al.*, 2016).

Entre 1995 e 2008, os dados da pesquisa do *National Health* revelaram que as hospitalizações por acidente vascular encefálico isquêmico aumentaram entre adolescentes e jovens adultos (com idade entre 15-44 anos), enquanto que as hospitalizações por hemorragia subaracnóide diminuíram durante o mesmo período. As taxas de mortalidade do AVC diminuíram mais entre as pessoas com  $\geq 65$  anos de idade que entre aquelas com 18 a 64 anos. As projeções mostram que para o ano de 2030, um adicional de 3,4 milhões pessoas com idade  $\geq 18$  anos terão um acidente vascular cerebral, com 20,5% aumento da prevalência a partir de 2012. O maior aumento (29%) é projetado para homens hispânicos. Com o aumento do envelhecimento da população, a prevalência de sobreviventes de AVC elevará especialmente entre mulheres (Avezum *et al.*, 2015).

No Brasil, a cada 5 minutos uma pessoa morre por AVC, sendo a segunda causa de morte e a primeira causa de incapacidade no país, de acordo com a Associação Brasileira do AVC (ABAVC). A Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) avaliou a prevalência de AVC no Brasil e calculou o número absoluto estimado de pessoas com AVC e com incapacidade por AVC e suas respectivas prevalências. Estima-se 2.231.000 pessoas com AVC e 568.000 com incapacidade grave. A prevalência foi de 1,6% em homens e 1,4% em mulheres, e a de incapacidade 29,5% em homens e de 21,5% em mulheres (Bensenor *et al.*, 2015).

Existem duas principais causas subjacentes do AVC: isquemia ou hemorragia. A natureza súbita de oclusão ou rompimento de vasos é a característica que originalmente determinou o termo acidente vascular encefálico (Auer, 2016). Os **AVC Isquêmicos** são a forma mais comum, acometendo cerca de 85% de todos os casos. Estes ocorrem como resultado da obstrução ou estreitamento das artérias no encéfalo (Association e Association, 2016; Mcintosh, 2016). A falta do sangue pode afetar todo o encéfalo (isquemia global) ou apenas uma parte dela (isquemia focal). A isquemia também pode ser permanente ou transitória se ocorrer reperfusão. Isso dá origem a uma substituição natural de quatro tipos gerais de isquemia cerebral (Auer, 2016).

Existem três subtipos de AVC isquêmico: **a) acidente vascular encefálico lacunar:** representa 20% dos AVC e é ocasionado por infartos muito pequenos com menos de 1cm cúbico de tamanho, que ocorrem em arteríolas que se ramificam diretamente de grandes vasos. É comum o déficit motor ou sensitivo. As artérias que podem ser afetadas são:

artéria cerebral anterior, artéria cerebral média, artéria cerebral posterior, artéria carótida interna, artéria basilar, artéria vertebrobasilar (Association e Association, 2016; Mcintosh, 2016); **b) acidente vascular encefálico trombótico:** mais comum e representa 40% dos AVC; são geralmente causados por trombo no interior das artérias cerebrais ou dos seus ramos. A condição subjacente para este tipo de obstrução é o desenvolvimento de aterosclerose (Association e Association, 2016; Mcintosh, 2016); **c) acidente vascular encefálico embólico:** ocorre em 30% dos casos AVC e é criado por êmbolos cerebrais, geralmente são formados no coração e grandes artérias da parte superior do peito e no pescoço. Uma segunda causa importante de embolia é um batimento cardíaco irregular, conhecida como fibrilação atrial (Association e Association, 2016; Mcintosh, 2016). Em neonatos se apresenta uma complicação ao nascimento prematuro chamado de encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI) que é uma complicação comumente induzida pela asfixia intrauterina causando uma diminuição do fluxo sanguíneo no cérebro e se desenvolvendo um AVC isquêmico (Doman *et al.*, 2018).

Os **AVC Hemorrágicos** são responsáveis por cerca de 13% dos casos e são causados pelo rompimento de vasos enfraquecidos. Existem dois tipos de hemorragia: intracerebral e subaracnóide. As rupturas podem ser causadas por doenças como: hipertensão, trauma, uso de anticoagulantes e aneurismas (Association e Association, 2016; Mcintosh, 2016).

O **Ataque Isquêmico Transitório (TIA)** é um "mini-acidente vascular cerebral". É diferente dos tipos mencionados acima, porque o fluxo de sangue para o cérebro só é interrompido temporariamente por um curto período de tempo (Doyle *et al.*, 2008). Eles são semelhantes aos acidentes vasculares cerebrais isquêmicos em que muitas vezes são causados por trombos. O TIA deve ser considerado como sinal de aviso para acidentes vasculares encefálicos futuros e indicam que há uma obstrução parcial nos vasos. Os sintomas do TIA ocorrem de forma relativamente rápida e de curta duração. A diferença do AVC é que mesmo quando o TIA é longo, não há danos permanentes ao cérebro. De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), mais de um terço das pessoas que tem TIA passam a ter um AVC dentro de um ano, caso não tenham recebido qualquer tratamento. Entre 10-15% terá um grande AVC dentro de três meses (Association e Association, 2016; Mcintosh, 2016).

Uma evolução clínica mais lenta é incomum e é vista principalmente na entidade denominada **AVC hemodinâmico**, onde a progressão pode ocorrer ao longo de horas a

dias. O AVC hemodinâmico é resultado de uma causa cardíaca que diminui a pressão arterial de tal forma que os níveis de sangue no encéfalo estão criticamente baixos e ocorrem em uma artéria que é apenas parcialmente ocluída, ou na "*watershed area*" entre duas ou três principais artérias cerebrais, levando ao infarto. O AVC hemodinâmico, portanto, tem sua origem no coração, não em um vaso sanguíneo do encéfalo, e compreende a principal exceção aos princípios acima de um vaso "bloqueado ou rompido" como causa da patologia do AVC (Auer, 2016).

O sintoma mais comum de um acidente vascular encefálico é a fraqueza súbita ou dormência da face, braço ou perna, mais frequentemente de um lado do corpo. Outros sintomas incluem: confusão, dificuldade em falar ou entender a fala; dificuldade de ver em um ou ambos os olhos; dificuldade para caminhar, tontura, perda de equilíbrio ou coordenação; dor de cabeça intensa sem causa conhecida; desmaio ou inconsciência. Os efeitos do AVC dependem da área do cérebro comprometida e da intensidade da lesão (Morrison, 2014).

## **2.2 Fatores de risco**

A identificação e o controle de fatores de risco no AVC visam à prevenção primária de AVC na população. Nas últimas décadas, estudos de métodos mais acurados têm identificado riscos não modificáveis bem como modificáveis para o AVC isquêmico e hemorrágico. A identificação e o controle de fatores de risco visam à prevenção primária de AVC na população (Chaves, 2000; Mackay *et al.*, 2004; Ozark e Ovbiagele, 2016).

O AVC afeta mais intensamente as mulheres que os homens em grande parte do mundo desenvolvido, sendo a terceira principal causa de morte para as mulheres. Isso se deve ao fato de que as mulheres vivem mais que os homens e tem frequentemente mais idade no momento em que se apresenta esta doença, por esta razão exibem sintomas não clássicos de AVC que podem alterar o reconhecimento precoce e tendem a ter um AVC mais grave e uma incapacidade persistente (Sohrabji e Hurn, 2017). Dentro do *Framingham Heart Study* (FHS), o risco do AVC que está entre 55 e 75 anos de idade é de 1 em cada 5 para as mulheres (20-21%) e de 1 em cada 6 para os homens (14 -17%) (Mozaffarian *et al.*, 2015).

Pessoas de raça negra exibem maior tendência ao desenvolvimento de AVC (Mozaffarian *et al.*, 2015). Esta proporção é atribuída a um risco três vezes maior que as pessoas de raça branca, ao mesmo tempo os hispânicos tem uma apresentação menor na mortalidade de AVC em comparação com os de raça branca (Howard e Howard, 2016).

O AVC pode surgir em qualquer idade. A chance de ele ocorrer cresce à medida que avança a idade (Mozaffarian *et al.*, 2015). O envelhecimento é o principal fator de risco não modificável para as doenças cerebrovasculares. Duas das doenças que causam mais prejuízos relacionados à disfunção cerebrovascular no envelhecimento são o AVC e a demência vascular. O envelhecimento está associado a mudanças no sistema imunológico, redes neurais e regulação vascular. A complicação vascular é prejudicada pelo envelhecimento, o que pode contribuir para a demência vascular. O envelhecimento pode produzir inúmeros resultados prejudiciais para múltiplos órgãos, podendo liberar uma série de fatores inflamatórios que comprometem a vasculatura encefálica. As comorbidades associadas à disfunção de órgãos periféricos aumentam a resposta inflamatória ao dano cerebral (Logsdon *et al.*, 2017).

Algumas doenças afetam as arteríolas cerebrais de uma maneira que pode produzir hemorragia e oclusão, como por exemplo aterosclerose hipertensiva, angiopatia amiloide e arteriopatia cerebral autossômica dominante com infartos subcorticais e leucoencefalopatia (CADASIL)(Auer, 2016).

A hipertensão pode levar ao rompimento ou ao bloqueio das arteríolas, muitas vezes simultaneamente; um exemplo se aplica na retina, onde as manchas de algodão representam infartos da camada nervosa, enquanto as hemorragias oftalmoscopicamente visíveis representam vazamento de arteríolas retinianas (Auer, 2016). A aterosclerose causa AVC de duas maneiras principais, a primeira a aterosclerose coronária com consequente doença cardíaca, a outra é a aterosclerose da bifurcação da artéria carótida que geralmente resulta em um evento súbito que viola a integridade endotelial. As duas formas de aterosclerose conduzem a infartos no encéfalo. As consequências de parada cardíaca ou trombose carotídea são bastante diferentes do AVC usual. Se o próprio coração pára, a resposta cerebral é a de encefalopatia de parada cardíaca, que pode assumir várias formas (neocortical, hipocampo, gânglios basais ou comprometimento cerebelar em várias combinações). Se a artéria carótida se oclui, isso geralmente resulta em edema no hemisférico isquêmico e morte (Auer, 2016).

Na doença cardíaca isquêmica, os segmentos miocárdicos com pouca motilidade contrátil acumulam trombo mural que pode enviar um êmbolo para o encéfalo. A doença cardíaca não precisa ser isquêmica para originar infartos encefálicos embólicos. Muitas formas de doença valvular também podem fazer isso, incluindo, por exemplo, endocardite reumática, endocardite trombótica não bacteriana e endocardite bacteriana (Auer, 2016). As arritmias geram uma corrente sanguínea irregular e também facilitam a formação de trombos sanguíneos dentro do coração, que podem chegar pela circulação até o encéfalo, diminuindo o fluxo sanguíneo e causando AVC. Outros exemplos de doenças do coração que aumentam o risco de AVC são as miocardiopatias como a cardiopatia chagásica (Doença de Chagas) (Chaves, 2000; Mackay *et al.*, 2004; Ozark e Ovbiagele, 2016). Quem já apresentou alguma doença vascular prévia, AVC transitório “ameaça de derrame” ou outra doença vascular como o infarto no miocárdio ou doença vascular obstrutiva periférica, tem maior probabilidade de ter um AVC (Chaves, 2000; Mackay *et al.*, 2004; Ozark e Ovbiagele, 2016).

A diabetes causa problemas circulatórios e aumento da pressão arterial (Chaves, 2000; Mackay *et al.*, 2004; Ozark e Ovbiagele, 2016). Os problemas circulatórios são causados por mudanças ultraestruturais como o alargamento da membrana basal, devido à deposição de colágeno e a formação de nódulos amorfos descritos como “rolos de algodão”. Como os pericitos e os pés dos astrócitos se encontram na membrana basal servindo como ponte funcional entre a vasculatura e as células nervosas, estas mudanças alteram a interação neurovascular (Ergul e Fagan, 2017).

Os níveis de lipídeos no sangue como o incremento de colesterol, LDL e triglicerídeos, levam à formação de placas nas paredes das artérias. Isto as torna mais estreitas e reduz o fluxo sanguíneo, aumentando a chance de a pessoa ter um AVC (Chaves, 2000; Mackay *et al.*, 2004; Ozark e Ovbiagele, 2016; Seshadri e Wolf, 2016). A pessoa obesa tem o nível de pressão arterial elevado, glicemia e lipídeos séricos aterogênicos, aumentando o risco de AVC. A síndrome de apneia obstrutiva do sono, frequentemente observada em pacientes obesos, foi associada com uma duplicação do risco ao AVC (Howard e Howard, 2016; Seshadri e Wolf, 2016).

No tabagismo as substâncias químicas presentes na fumaça do cigarro passam dos pulmões para a corrente sanguínea e circulam pelo corpo, causando disfunção endotelial e provocando diversas alterações no sistema circulatório favorecendo ocorrência de trombose

(Chaves, 2000; Mackay *et al.*, 2004; Ozark e Ovbiagele, 2016). O tabagismo incrementa o risco de AVC por dois mecanismos, induz um estado pró-coagulante e acelera a aterosclerose. O estado pró-coagulante ativa a agregação plaquetária, a concentração de fibrinogênio, diminuição da fibrinólise, policitemia e aumenta a viscosidade no sangue. O tabagismo acelera a aterosclerose através de várias vias, incluindo a disfunção endotelial (pela diminuição do óxido nítrico), inflamação aumentada (através de aumento de leucócitos periféricos e marcadores inflamatórios) e modificação lipídica (aumento de colesterol, triglicerídeos e lipoproteínas de baixa densidade com diminuição de lipoproteína de alta densidade e oxidação de lipoproteína de baixa densidade) (Seshadri e Wolf, 2016; Epstein *et al.*, 2017).

O impacto no consumo de álcool no risco de AVC está relacionado à quantidade de álcool consumido. O consumo leve ou moderado de álcool tende a elevar o nível de colesterol HDL, enquanto um consumo excessivo de álcool está ligado à hipertensão e hiperglicemia (Chaves, 2000; Mackay *et al.*, 2004; Ozark e Ovbiagele, 2016; Seshadri e Wolf, 2016). O uso de drogas como cocaína ou crack é capaz de gerar lesão arterial e picos hipertensivos, sendo associado ao desenvolvimento de AVC (Chaves, 2000; Mackay *et al.*, 2004; Ozark e Ovbiagele, 2016).

O uso de anticoncepcionais orais pode favorecer o surgimento de AVC, principalmente em mulheres fumantes, ou com hipertensão arterial, ou com enxaqueca (Chaves, 2000; Mackay *et al.*, 2004; Ozark e Ovbiagele, 2016). Os anticoncepcionais orais reforçam a coagulação pelo aumento a agregação plaquetaria e a alteração dos fatores de coagulação favorecendo a trombogênese (Seshadri e Wolf, 2016).

O sedentarismo leva ao aumento de peso, predispondo à hipertensão, diabetes, níveis inadequados de colesterol no sangue, todos fatores de risco para AVC já comentados anteriormente (Chaves, 2000; Mackay *et al.*, 2004; Ozark e Ovbiagele, 2016).

### **2.3 Patogenia do AVC Isquemia/Reperusão**

A isquemia é determinada por parâmetros fisiológicos básicos, como o grau de redução no sangue, temperatura do encéfalo e os níveis de glicose. Quando a pressão de perfusão cerebral e o fluxo sanguíneo cerebral diminuem de tal forma que o aumento na fração de extração de oxigênio não é mais o adequado para suprir as necessidades de

oxigênio no cérebro, ocorre uma série de mudanças funcionais bioquímicas. O primeiro é uma redução progressiva na síntese proteica quando o fluxo sanguíneo cerebral cai abaixo de 50%, depois as funções celular e molecular são interrompidas e a atividade neuronal é prejudicada (Powers, 2016).

O cérebro requer uma grande quantidade de oxigênio para gerar ATP pela fosforilação oxidativa suficiente para manter e restaurar gradientes iônicos. Durante a fase de isquemia, ocorre diminuição do aporte de oxigênio para o parênquima cerebral, levando a inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial e a queda da produção energética celular. Uma das consequências é a despolarização de membrana, que é a degradação dos fosfolipídeos da membrana celular, por ação das fosfolipases A e C, liberando grande quantidade de ácidos graxos livres (AGL) (Tardini *et al.*, 2003; Mirza e Goldberg, 2017), aumentando os níveis de potássio no espaço extracelular e entrando o sódio na célula. A falha de energia impede que a  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase da membrana plasmática mantenha as concentrações de cálcio intracelular baixas, pelo que seu aumento na célula causa uma ativação de todas as proteases, lipases e DNAses dependentes de cálcio e faz com que muitas células morram de catabolismo simples. Como nenhum ATP está disponível para a síntese de constituintes celulares, as enzimas catabólicas causam danos das estruturas celulares essenciais (Hazell, 2007; Mirza e Goldberg, 2017).

A despolarização de membrana leva ao aumento de neurotransmissores excitatórios como o glutamato que possui um papel importante neste processo. Esta "reação excessiva" de determinados neurotransmissores desencadeada pela depleção dos estoques de energia celular é chamada de "excitotoxicidade". O glutamato é normalmente armazenado no interior dos terminais sinápticos, em baixas concentrações controla muitas ações no encéfalo e em altas concentrações contribui para a lesão neuronal no cérebro isquêmico pela catalisação excessiva e ativação dos receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) e AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico). Estes receptores são cálcio permeáveis e ou abertura dos canais conduz a um maior influxo de cálcio, exacerbando a sobrecarga de cálcio intracelular (Castillo *et al.*, 1997; Doyle *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016; Mirza e Goldberg, 2017).

A mudança para o metabolismo anaeróbio resulta em acúmulo de ácido láctico e redução potencialmente tóxica nos níveis de pH extracelular causando acidose (Mirza e Goldberg, 2017). A acidose é conhecida por causar necrose. No encéfalo, dois ácidos são

especialmente relevantes para a resposta à acidose: o ácido lático o ácido carbônico (Auer, 2016).

A morte celular como resultado da cascata isquêmica sugere que há uma combinação de ambos os processos, apoptose e necrose (Doyle *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2016). Ambas as vias apoptóticas intrínsecas e extrínsecas são usadas para causar a morte celular após isquemia. A via intrínseca é ativada quando os neurônios são incapazes de manter o equilíbrio de íons causado pela perda de potencial de membrana, que por sua vez conduz a um influxo de cálcio, provocando uma interrupção do equilíbrio redox e liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estes fenômenos causarão rompimento da mitocôndria, com liberação do citocromo-C, perda da integridade da membrana e ativação do apoptosomo através das caspases 9 e 3 (Downes e Crack, 2010; Zhang *et al.*, 2016). A via extrínseca é ativada pelo receptor de morte, Fas. Isto por sua vez provoca a dimerização, a clivagem e a ativação da caspase 8, que conduz à apoptose. O ROS produzido durante o estresse isquêmico pode também causar necrose, causando perfurações na membrana celular e ocasionando perda do potencial. Esta membrana, por sua vez abre os canais de cálcio que causam aumento indiscriminado do cálcio intracelular e morte celular (Doyle *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2016).

Recentemente estudos demonstraram que a isquemia global pode induzir também morte neuronal por necroptose, o que é uma via de morte celular necrótica independente da caspase (Auer, 2016; Zhang *et al.*, 2016). Esta morte celular necrótica programada pode ser induzida pelo fator de necrose tumoral (TNF) e o interferon-gama (INF-  $\gamma$ ), as proteínas *receptor-interacting protein 1* (RIP1), *receptor-interacting protein 3* RIP3 e *kinase domain-like protein* MLKL são essenciais para a ativação da necroptose. É sugerido que a necroptose esta envolvida no processo de lesão isquêmica crônica. A lesão tecidual tem uma estreita ligação com a inflamação e esses dois fatores são causalidades recíprocas (Zhang *et al.*, 2016; Jorgensen *et al.*, 2017).

A morte induzida pela isquemia das células adjacentes produz inflamação local, incluindo o recrutamento de leucócitos, macrófagos e a produção de mediadores inflamatórios (Dirnagl *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2017). O início dos eventos inflamatórios inclui a produção de espécies reativas de oxigênio (óxido nítrico, superóxido), expressão de enzimas proteolíticas (MMP-9, MMP-2), substâncias vasoativas (prostaglandinas e ciclooxigenases) e moléculas de adesão (ICAM-1, P-selectina, L-selectina), levando à



ativação e infiltração de células imunes periféricas (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, pericitos, células NK e células T) e plaquetas no parênquima cerebral após isquemia (Denes *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2017). Além disso, várias citocinas pró e anti-inflamatórias, quimiocinas e seus receptores e fatores neurotróficos são expressos e sintetizados no encéfalo, tais como: interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF) ou interleucina 10 (IL-10), fator de crescimento transformante beta (TGF), proteína inflamatória de macrófagos 1 (MIP-1), quimiocina derivada de queratinócitos/quimiocina (motivo CXC) ligante 1 (KC/CXCL1) e fractalquina (CX3CL1) (Denes *et al.*, 2010). Os mediadores inflamatórios como, por exemplo: a interleucina 1 (IL-1,) interleucina 8 (IL-8/CXCL8) e principalmente o TNF, são os que vão ativar a cascata inflamatória no tecido isquêmico e levar a eventos secundários como apoptose (Janardhan e Qureshi, 2004; Yu *et al.*, 2017).

#### **2.4 O encéfalo “imune privilegiado”**

A interação do sistema nervoso central (SNC) e o sistema imune (SI), considerados por tanto tempo como funcionamentos separados, levanta uma questão fundamental: por que eles estão tão intimamente relacionados, cada um com a capacidade de afetar o outro? A resposta é encontrada ao examinar o desenvolvimento evolutivo destes sistemas (Kipnis, 2016). A evolução da imunidade adaptativa proporciona no SNC uma defesa reforçada contra patógenos específicos, bem como a manutenção homeostática de todo o tecido após lesão. Sabe-se que o sistema imunológico afeta o encéfalo e o comportamento durante uma lesão. Mas recentemente foi demonstrada que a vigilância imunológica do SNC é crucial para a função cerebral correta e a sua recuperação após a lesão, mantendo a função cerebral cognitiva e social (Filiano *et al.*, 2017).

Embora o próprio encéfalo seja considerado imune privilegiado, as células imunes patrulham as bordas (espaços meníngeos) do SNC se adaptando constantemente e permitindo o diálogo neuroimune. As comunicações neuroimunes são essenciais para decifrar a ligação complexa entre o SNC e o SI e assim ampliar a o entendimento dos distúrbios neurológicos (Filiano *et al.*, 2017).

A isquemia no encéfalo induz lesão aguda e a morte celular. A falta de energia suficiente para manter o potencial de membrana das células causa necrose. A necrose, em

contraste com a apoptose ou outras formas de morte celular (necroptose), promove uma forte resposta inflamatória após o extravasamento do conteúdo intracelular no ambiente extracelular. O AVC gera uma resposta inflamatória local e sistêmica estéril com a liberação de sinais de perigo ou padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) do tecido lesado, o que poderia, por sua vez, estimular uma cascata pró-trombótica, além de ativar os sistemas imunológicos inato e adaptativo (Urta *et al.*, 2014).

A inflamação é necessária para remoção das células mortas e dos detritos celulares, mas precisa ser rigorosamente regulada para evitar a liberação excessiva de mediadores neurotóxicos, danos à barreira hematoencefálica (BBB) e causar ativação descontrolada do sistema imunológico (Urta *et al.*, 2014). A resposta inflamatória imediata é coordenada principalmente pela micróglia residente, que é capaz de responder ao estresse celular adjacente gerando um fenótipo ativado. A ativação da micróglia conduz à liberação de citocinas e quimiocinas inflamatórias (Downes e Crack, 2010), que acompanhadas de moléculas de adesão participam do recrutamento de leucócitos periféricos atraídos para o local da lesão (Urta *et al.*, 2014). As enzimas proteolíticas extracelulares são rapidamente ativadas, degradando a matriz extracelular. Esses processos proteolíticos podem expor epítomos ocultos de outra forma que podem atuar como sinais de perigo, liberar mediadores pró-inflamatórios e danificar o BBB (Urta *et al.*, 2014).

Nas primeiras 24 horas ocorre a infiltração de neutrófilos e macrófagos, com o papel principal de remover debris celulares e liberar citocinas para atrair ainda mais células imunes para o local (Downes e Crack, 2010). As próximas células que são atraídas para o local da lesão são as células dendríticas e estas são detectadas no local da lesão 24 horas após a oclusão. Estas células utilizam o interferon gama (IFN- $\gamma$ ) para atrair as células T para a lesão. A presença de linfócitos T foi demonstrada até três dias depois da isquemia (Downes e Crack, 2010). Todos estes eventos exacerbam a lesão inicial e podem levar a lesão cerebral permanente. A quantidade de dano permanente depende de vários fatores como: o grau e a duração da isquemia e a capacidade do encéfalo para se recuperar (Lakhan *et al.*, 2009).

## 2.5 Citocinas

As citocinas são biologicamente ativas em concentrações de nano a picomolar e agem sobre um número limitado de receptores por células que amplificam sua ação através da ativação de um grande número de genes. As citocinas sempre atuam de uma forma sucessiva, constituindo uma rede de citocinas. Uma citocina nunca age sozinha, porém no contexto outras citocinas potenciam ou opõem à sua atividade. Tais interações complementares entre citocinas pró-inflamatórias podem ser abordadas mais facilmente quando uma citocina está faltando na rede de citocinas ou porque o gene dessa citocina ou seu receptor foi excluído pela técnica de recombinação homóloga (Dantzer, 2009).

As alterações da homeostasia do tecido encefálico ativam os mecanismos de resposta imune, incluindo a estimulação de células imunes inatas, a ativação dos linfócitos e um aumento das citocinas pró-inflamatórias tais como IL-6, TNF e IL-1 $\beta$ , causando no organismo respostas comportamentais como letargia, abstinência social, aumento do sono e diminuição do apetite que são projetados para diminuir o gasto energético e assim promover a sobrevivência (Filiano *et al.*, 2017). O TNF, a IL-6 e a IL-1, são considerados como biomarcadores da gravidade do AVC. Eles são considerados como possíveis alvos terapêuticos porque afetam fortemente o desenvolvimento do dano cerebral em modelos animais e apresentam níveis aumentados no líquido cefalorraquidiano (LCR) em seres humanos com AVC. Em contraste outras citocinas como a interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10) e o fator de crescimento transformador -  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) exercem efeitos imunoregulatórios e anti-inflamatórios e promovem a polarização de monócitos/macrófagos a fenótipo tipo M2 (Ballesteros *et al.*, 2017).

Os mecanismos que medeiam os efeitos das citocinas liberadas periféricamente foram elucidados ao longo dos últimos 15 anos. As citocinas pró-inflamatórias atuam no encéfalo através de duas vias de comunicação principais: (1) a via neural representada pelos neurônios aferentes primários que inervam o local onde ocorre a lesão e (2) a via humoral que envolve a produção de citocinas pró-inflamatórias por células fagocíticas nos órgãos circumventriculares e plexo coróide em resposta a PAMPs circulantes ou citocinas, seguido pela propagação desses sinais imunes no parênquima encefálico (Dantzer, 2009).

Citocinas pró-inflamatórias aumentam a expressão de moléculas de adesão, selectinas, integrinas, células endoteliais, leucócitos e plaquetas. As citocinas IL-1 e o TNF ativam a sinalização de vias intracelulares que medeiam a resposta ao estresse e por tanto

podem funcionar em interações ligando-receptor que induzem ao estado tolerante (Anrather *et al.*, 2016). A liberação de TNF e IL-1 $\beta$  também aumenta a produção de IL-6 (Ballesteros *et al.*, 2017).

A IL-1 é uma citocina muito importante envolvida no dano encefálico (Ballesteros *et al.*, 2017). Esta citocina é capaz de induzir a sua própria síntese e a síntese de outras citocinas que potencializam sua ação (TNF e IL-6) ou antagonizam (as chamadas "citocinas anti-inflamatórias", como a IL-10 e o antagonista específico dos receptores IL-1, IL-1Ra (Dantzer, 2009) (Anrather *et al.*, 2016). Os níveis de ambos os tipos de IL-1 (IL-1 $\beta$  e IL- $\alpha$ ) incrementam após a isquemia encefálica; a IL-1 $\alpha$  é principalmente induzida pela micróglia e a IL-1 $\beta$  pode ser aumentada por todos os elementos da unidade neurovascular (Ballesteros *et al.*, 2017). A IL-1 $\beta$  é uma citocina importante para a indução do comportamento da doença (Dantzer, 2009), porque é um dos mais potentes ativadores para o NF- $\kappa$ B o que consequentemente leva a amplificação da resposta inflamatória regulada pela ativação da transcrição de genes incluindo ela mesma IL-1 $\beta$  (Aronowski *et al.*, 2016). A IL-1 $\beta$  também induz inibição da potenciação ao longo prazo nas sinapses de células granulares e a elevação nos níveis intracelulares de cálcio nos sinaptossomas corticais em ratos (Dantzer, 2009).

Em contraste, a IL-6 induz apenas pirógenos e atividades corticotrópicas, potencializando os efeitos comportamentais deprimidos da IL-1 $\beta$  (Dantzer, 2009). Essa citocina pleiotrópica é liberada por todos os componentes da unidade neurovascular e de macrófagos periféricos. Altos níveis plasmáticos de IL-6 correlacionam-se com a gravidade do AVC e um prognóstico reservado. As ações deletérias da IL-6 na isquemia cerebral são a produção de gliose, ativação de células endoteliais, aumento do dano da barreira hematoencefálica e a síntese e liberação de diferentes quimiocinas que induzem a infiltração de células imunes no parênquima cerebral. Em contraste, a IL-6 também parece desempenhar um papel neuroprotetor, estimulando a recuperação da barreira hematoencefálica, angiogênese e neurogênese (Ballesteros *et al.*, 2017).

O TNF é uma citocina fortemente envolvida no dano inflamatório após AVC. Um aumento rápido desta citocina ocorre no AVC clínico e experimental. Sua expressão é elevada em neurônios durante as primeiras 4 horas após a isquemia, enquanto é aumentado mais tardiamente na glia e nas células imunes (Ballesteros *et al.*, 2017). O TNF e seu receptor TNFR1 medeiam as vias para a sinalização da necroptose (Zhang *et al.*, 2016). No

entanto o papel do TNF no AVC é controverso devido a sua capacidade de ativar também vias neuroprotetoras, já que esta envolvido no fenômeno da tolerância isquêmica porque reduz o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, promove defesas antioxidantes e aumenta a depuração do glutamato no espaço extracelular (Ballesteros *et al.*, 2017).

Entre as citocinas imunoregulatórias com propriedades anti-inflamatórias associadas ao reparo do tecido estão a IL-10, cujos níveis estão associados com melhor resultado nos pacientes. Após a isquemia cerebral, a IL-10 é produzida principalmente por células imunes, como linfócitos Treg (reguladores), monócitos/macrófagos e micróglia. Esta citocina tem efeitos supressivos notáveis na produção de citocinas pró-inflamatórias e também modula a vulnerabilidade neurológica ao dano isquêmico excitotóxico. O TGF- $\beta$  é outra citocina imunorreguladora pleiotrópica com um papel crucial no desenvolvimento de um meio anti-inflamatório. O TGF- $\beta$  é elevado no sangue dos pacientes um dia após o AVC e no cérebro isquêmico de roedores durante pelo menos uma semana, principalmente em micróglia/macrófagos. O TGF- $\beta$  tem sido associado à inibição da produção de CCL2 e proteína inflamatória macrófágica (MIP). Também induz a formação da cicatriz glial, inibe as respostas Th1 e Th2 e promove o desenvolvimento de células Treg. IL-4 é outra citocina anti-inflamatória clássica. Após a isquemia cerebral, é produzida por células Th CD4 e também por astrócitos e neurônios, enquanto os receptores IL-4 são encontrados principalmente em micróglia/macrófagos. Entre as suas ações, esta citocina regula a ativação de astrócitos, exerce efeitos neurotróficos ao induzir a secreção de NGF e tem papéis importantes na resolução da inflamação promovendo a ativação microglial de monócitos/macrófagos em um perfil M2 (Ballesteros *et al.*, 2017).

## **2.6 Quimiocinas**

As quimiocinas são uma grande família de proteínas quimiotáticas de 8- 12 kD, que regulam a ativação dos leucócitos e o recrutamento para locais de insulto ou lesão através da interação com uma família de receptores de quimiocinas (Mueller e Strange, 2004; Williamson e Bilbo, 2013). Algumas quimiocinas são consideradas pró-inflamatórias e são induzidas durante uma resposta imune para recrutar células imunológicas, enquanto outras estão envolvidas no controle da migração das células durante os processos normais de desenvolvimento de tecido ou de manutenção (Tokami *et al.*, 2013).

A família de quimiocinas é grande, com mais de 40 ligantes e uma série de receptores (Williamson e Bilbo, 2013). Estes mediadores exercem os seus efeitos biológicos através de receptores G acoplados à proteína (GPCR) que são expressos seletivamente nas superfícies das células alvo (Tokami *et al.*, 2013) com sete domínios transmembranas. A semelhança entre os receptores desta família de proteínas resulta em ligação promíscua dos ligantes de quimiocinas e falta de especificidade entre vários ligantes e seus receptores potenciais. No entanto, essa amplitude de possibilidades de ligação também sugere um elevado grau de flexibilidade, diversidade, e precisão na comunicação entre múltiplos tipos celulares (Williamson e Bilbo, 2013). No sistema nervoso, as quimiocinas são segregadas por vários tipos de células, incluindo neurônios e células da glia e são importantes para diferentes funções no SNC, tanto em cascatas inflamatórias, como a função cognitiva normal, embora esta última permaneça menos bem definida. Vários estudos mostram a importância de muitas citocinas pró-inflamatórias em funções do SNC, mas estudos sobre o papel das quimiocinas no SNC são mais escassos. As quimiocinas foram recentemente sugeridas como a "terceira maior forma de comunicação neuromoduladora no SNC" (Williamson e Bilbo, 2013). Sabe-se que quimiocinas estão envolvidas no desenvolvimento do sistema nervoso central, sinalização neuronal e transmissão sináptica (Sorce *et al.*, 2011).

A isquemia cerebral está associada com a indução das quimiocinas: CXC e CC, resultando em extensa infiltração de leucócitos no cérebro isquêmico. A infiltração de neutrófilos pode aumentar a lesão e induzir edema cerebral na área isquêmica. Vias de inibição de quimiocinas CXC atenuam significativamente o edema cerebral e o volume de infarto em modelos experimentais de isquemia e reperfusão cerebral. A sinalização de quimiocinas CC e da Fractalquina podem também aumentar a lesão pós-isquêmica no cérebro (Frangogiannis, 2007).

A expressão e ativação de receptores de quimiocinas estão principalmente relacionadas com o controle da migração de leucócitos. No entanto, os receptores de quimiocinas também participam na regulação de muitos outros processos fisiológicos e patológicos, tais como a formação da angiogênese ou metástase (Sorce *et al.*, 2011).

### 2.6.1 C-C receptor de quimiocina tipo 5 (CCR5)

Em 1996, um gene do receptor de quimiocina C-C humana foi clonado e posteriormente chamado CCR5. Foi demonstrado que o CCR5 é um receptor acoplado a proteína G (GPCR) e a ativação do CCR5 conduz a várias respostas celulares, como por exemplo inibição da produção do AMPc, estimulação da liberação de  $Ca^{+2}$ , ativação de proteínas-quinases ativadas por mitógenos (MAP) e c-Jun N-terminal quinase (JNK). O CCR5 é membro da família de receptores das  $\beta$ -quimiocinas (Mueller e Strange, 2004). Uma forte homologia tem sido descrita entre o CCR5 humano, do camundongo e do rato, sugerindo regiões reguladoras semelhantemente conservadas. No que diz respeito à sequência de codificação, o CCR5 humano tem 82% de homologia com o rato e 98% com o macaco rhesus (Sorce *et al.*, 2011).

O CCR5 é expresso no epitélio, endotélio, músculo liso vascular, fibroblastos, micróglia, astrócitos, neurônios e, principalmente em linfócitos T de memória e efetores, implicados na ativação de células Th1 ajudantes, células NK, monócitos, macrófagos e células dendríticas imaturas (Mueller e Strange, 2004; Sorce *et al.*, 2011). Nestes tipos celulares é regulada a quimiotaxia e a ativação celular, através da interação com as seguintes  $\beta$ -quimiocinas: proteína quimioatraente de monócitos 1 alfa (CCL3/MIP1 $\alpha$ ), proteína quimioatraente de monócitos 1 beta (CCL4/MIP1 $\beta$ ), RANTES (CCL5), proteína quimioatraente de monócitos 2 (CCL8/MCP-2), eotaxina-1 (CCL11), quimiocina-1 humana (CCL14 $\alpha$ /HCC-1) e quimiocina-4 humana (CCL16/HCC-4). Apesar das diferentes homologias do CCR5 entre espécies, as  $\beta$ -quimiocinas humanas CCL3, CCL4 e CCL5 mostram valores IC muito semelhantes para o receptor CCR5 em seres humanos, macacos e roedores. A produção de  $\beta$ -quimiocinas no SNC é realizada principalmente pela micróglia e pelos astrócitos, e em menor grau pelos neurônios (Sorce *et al.*, 2011).

A expressão do CCR5 foi detectada em todo o sistema nervoso central, em particular, tem sido sugerido que pode desempenhar um papel durante o desenvolvimento do cérebro ou em processos de transmissão neuronais. Estudos “in vitro” e imunoistoquímicos revelaram expressão constitutiva do CCR5 no SNC. Esta expressão parece aumentar de modo significativo, desde a fase embrionária até neonatal e esta localizada nas regiões neurogênicas do cérebro (giro denteado e zona subventricular do ventrículo lateral) até na idade adulta. Por este motivo foi sugerido que o CCR5 está envolvido no processo de ontogenia do cérebro. O CCR5 é achado não apenas na micróglia, mas também nos

astrócitos e os neurônios do cérebro de seres humanos, babuínos, macacos, ratos e camundongos. No entanto, parece que nem todos os neurônios de determinada região do cérebro expressam o CCR5, mas sim apenas subpopulações de células neuronais (Sorce *et al.*, 2011). Estes dados indicam que o CCR5 poderia exercer um efeito sobre os mecanismos que regulam a formação de estruturas cerebrais e ligações neuronais. No entanto, até agora, não foram descritas alterações morfológicas no cérebro de camundongos CCR5-deficientes ou seres humanos com deleções no CCR5, sugerindo que a ausência do CCR5 pode não resultar em alterações anatômicas do cérebro (Sorce *et al.*, 2011).

Dentro das funções do CCR5 no cérebro se encontra as fisiológicas como: ativação e quimiotaxia da micróglia, quimiotaxia de monócitos/macrófagos e linfócitos e transmissão neuronal; assim como as funções em doenças, principalmente em doenças infecciosas como causada pelo HIV. Embora a expressão do CCR5 seja aumentada em situações em que a micróglia é ativada, apenas um estudo “in vitro”, comparando o efeito de LPS na micróglia, em camundongos selvagens e em camundongos CCR5-deficientes, sugere que a produção de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-1 $\beta$  ou TNF), bem como os níveis de expressão de iNOS são regulados por CCR5. O efeito do CCR5 na quimiotaxia da micróglia foi observado em cultivo celular. No entanto, em resposta a diferentes lesões do SNC, não foram detectadas alterações no recrutamento da micróglia para o local do dano em camundongos CCR5-deficientes (Sorce *et al.*, 2011).

O recrutamento de monócitos/macrófagos, linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e células NK que expressam o receptor CCR5 se encontra sob o controle da ativação do CCR5. Estes dados são extrapolados a partir de estudos em situações patológicas, e de fato, dependendo do agente patogênico, o recrutamento de leucócitos impulsionado por CCR5 pode inibir ou, em algumas situações, favorecer a progressão de infecções do SNC. É, portanto, difícil de entender o papel exato do CCR5 em situações fisiológicas (Sorce *et al.*, 2011).

Há poucas indicações sobre um possível papel do CCR5 como um modulador da transmissão neuronal. Tem sido observado que a ativação do CCR5 pode diminuir os efeitos antinociceptivos dos opióides e melhorar a percepção de dor em locais inflamatórios. Por esta razão, é pensado que uma dessensibilização heteróloga entre o CCR5 e os receptores opióides pode modular a sinalização neuronal fisiológica envolvida na produção da sensação de dor. Em outro estudo, relatou-se que CCL5/RANTES pode diferencialmente modular a liberação de glutamato por neurônios após interação com os



subtipos de receptores CCR distintos, incluindo o CCR5. A modulação da neurotransmissão por CCR5 também poderia explicar por que os camundongos deficientes para o receptor CCR5 exibem déficits de aprendizagem e memória quando são desafiados em diferentes tarefas, como os testes de esquiwa passiva e o labirinto aquático de Morris. Esta hipótese está de acordo com a ideia geral de que quimiocinas, agindo em seus receptores específicos, constituem um sistema de comunicação importante no SNC, em conjunto com neurotransmissores e neuropeptídeos. No entanto, mesmo se a expressão de CCR5 pareça influenciar os processos de aprendizagem em camundongos, esse efeito ainda não foi descrito em seres humanos com supressão do receptor CCR5 (Sorce *et al.*, 2011).

Enquanto o conhecimento da função fisiológica de CCR5 no cérebro ainda não é bem conhecida, vários estudos mostram o seu papel em doenças no SNC, indicando que a expressão de CCR5 aumenta no cérebro em estados de disfunção. Na maioria dos casos, o envolvimento de CCR5 tem sido implicado em infecções virais, bacterianas, fúngicas e infecções parasitárias. No entanto, alguns trabalhos mostraram o papel do CCR5 em doenças neurodegenerativas (Sorce *et al.*, 2011). Os estudos avaliando o papel do CCR5 na isquemia e reperfusão cerebral são controversos. Além disso, não existem estudos avaliando o efeito da deficiência do CCR5 durante a isquemia e reperfusão global transitória em camundongos.

## ***2.7 Metaloproteinase de matriz (MMP)***

De acordo com os papéis essenciais desempenhados pelas proteases em todos os organismos vivos, as alterações nas suas atividades proteolíticas podem levar a doenças importantes como artrite, alterações cardiovasculares, distúrbios neurodegenerativos, síndromes progeroides e câncer (Behrendt, 2012). As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família de proteínas que são principalmente secretadas como zimogênios inativados que depois são ativados e se especializam principalmente no rompimento da barreira hematoencefálica mediante a degradação da lamina base de proteínas de união (*tight junction*), promovem a inflamação e a citotoxicidade. As concentrações no encéfalo são normalmente muito baixas, mas aumentam em resposta a injúria ou isquemia. As MMPs são conhecidas também por apresentarem funções reparadoras na fase pós-aguda após dano no SNC (Behrendt, 2012; Hu *et al.*, 2017; Rosenberg, 2017). As MMPs têm um

papel muito importante na fisiopatologia da isquemia cerebral e frequentemente são multifuncionais (Fingleton, 2017).

As MMPs são produzidas por múltiplos tecidos e células, como as células do tecido conjuntivo, incluindo fibroblastos, osteoblastos, células endoteliais, músculo liso vascular, macrófagos, neutrófilos, linfócitos e citotrofoblastos. Os fibroblastos dérmicos e os leucócitos são fontes principais de MMPs, especialmente MMP-2 (metaloproteinase de matriz tipo 2) e MMP-16 (metaloproteinase de matriz tipo 16) e as plaquetas são fontes importantes de MMP-1 (metaloproteinase de matriz tipo 1), MMP-2, MMP-3 (metaloproteinase de matriz tipo 3) e MMP-14 (metaloproteinase de matriz tipo 2). Em geral, as MMPs são segregadas das células ou ancoradas a membrana plasmática por proteoglicanos, tais como glicosaminoglicanos de heparan sulfato. As MMPs de tipo membrana (MT-MMPs) e MMP-23 (metaloproteinase de matriz tipo 23) são ancoradas à membrana celular por domínios transmembranares especiais (Cui *et al.*, 2017).

Como as MMPs desempenham um papel importante na remodelação da matriz extracelular, elas são altamente distribuídas na maioria dos tecidos conjuntivos. As MMPs também foram localizadas em vários tipos de células, sugerindo outros papéis biológicos para MMPs. Por exemplo, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7 (metaloproteinase de matriz tipo 7), MMP-8 (metaloproteinase de matriz tipo 8), MMP-9 (metaloproteinase de matriz tipo 9), MMP-12 (metaloproteinase de matriz tipo 12), MMP-13 e MT1-MMP (metaloproteinase de matriz de tipo membrana 1) e MT3-MMP (metaloproteinase de matriz de tipo membrana 3), são expressas em vários tecidos vasculares e células. Na veia cava inferior do rato as MMP-2 e MMP-9 estão localizadas em diferentes camadas da parede venosa, incluindo a íntima, média e adventícia, sugerindo interação com vias de sinalização em células endoteliais, o músculo liso vascular e a matriz extracelular, respectivamente. Outros estudos mostraram distribuição específica de MMP-1, MMP-2, MMP-3 e MMP-7 em células endoteliais e células de músculo liso vascular, MMP-2 na adventícia, MMP-9 em células endoteliais, células de músculo liso vascular e microvasos adventíciais e MMP-12 em células de músculo liso vascular e fibroblastos de veia safena humana. Outros estudos mostraram localização intracelular de MMP-2 em miócitos cardíacos e colocalização da MMP-2 com troponina-1 nos miofilamentos cardíacos. A atividade da MMP-2 também foi detectada em extratos nucleares do coração humano e do fígado de rato (Cui *et al.*, 2017).

As células cerebrais são cercadas por matriz extracelular composta por moléculas de proteínas grandes. O fluido intersticial se move entre as células e ao longo dos espaços perivasculares, misturando-se com o líquido cefalorraquidiano (LCR) para atuar como linfa no cérebro. Estudos revelaram que a matriz extracelular é um componente essencial do SNC, estima-se que compreende entre o 15 e o 20% do tecido cerebral e seu papel é complexo quanto no desenvolvimento do cérebro como na lesão. A matriz extracelular no SNC do adulto é localizada em três compartimentos principais: as redes perineuronais (PNNs), a matriz intersticial neural no parênquima e a lâmina basal (Rosenberg, 2017).

As redes perineuronais são uma camada de matriz semelhante a uma rede que envolve a superfície do soma e os dendritos; eles são principalmente compostos de hialuronano, proteoglicanos de sulfato de condroitina, proteínas de ligação e tenascina R e, desempenham um papel direto no controle da plasticidade do SNC. A matriz intersticial é constituída por uma rede densa de proteoglicanos, hialuronanos, tenascinas e proteínas de ligação (Rosenberg, 2017). O terceiro componente da matriz extracelular é a lâmina basal, que no SNC é uma estrutura contínua de matriz extracelular que alinha o lado parenquimatoso de microvasos cerebrais, conectando o compartimento das células endoteliais com os pés dos astrócitos; é constituída por complexos de colágeno, entactina, fibronectina, distroglicano e perlecano. O colágeno tipo IV na lâmina basal é um importante local de ação das MMPs, as principais enzimas envolvidas na manutenção da integridade da barreira hematoencefálica (Rosenberg, 2017).

A funcionalidade e estabilidade do SNC são mantidas pela matriz extracelular e, seu dano interrompe a transmissão sináptica com o consequente desequilíbrio dos neurotransmissores, invasão de células reativas, astrocitose, deposição de nova matriz e digestão previa desta estrutura e plasticidade inadaptada com perda da viabilidade neuronal (De Luca e Papa, 2017).

A MMP2 e MMP9 são particularmente interessantes porque estão fortemente implicadas na interrupção da barreira hematoencefálica após a lesão isquêmica em modelos murinos e pacientes com AVC (Dittmar *et al.*, 2004). Estas podem ser liberadas de uma variedade de células, incluindo células endoteliais, gliais e imunitárias recrutadas. (Hu *et al.*, 2017). Na isquemia cerebral, MMP-2 e MMP-9 são superexpressas, causando a interrupção da barreira hematoencefálica com vazamento de líquidos do sangue para o cérebro. O vazamento resultante da barreira hematoencefálica contribui para o dano

cerebral, provocando hemorragia e edema vasogênico, ou prevenindo uma reperfusão suficiente (Rosenberg, 2017).

## **2.8 Neurotrofinas**

As neurotrofinas são uma família essencial de proteínas segregadas para o desenvolvimento neuronal. A família de neurotrofinas é composta por NGF, BDNF, neurotrofina-3 (NT-3) e neurotrofina-4 (NT-4) que evoluíram a partir de um gene comum ancestral. Suas ações são dependentes da ligação aos sistemas de receptores transmembranares: o receptor de tropomiosina da família de tirosina quinase e o receptor de neurotrofinas p75. As neurotrofinas se ligam a receptores específicos: NGF liga-se a TrkA, BDNF e NT-4 a TrkB e NT-3 a TrkC. Todas as quatro neurotrofinas podem se ligar ao receptor p75 e a associação de p75 com os receptores Trk pode regular a afinidade dos receptores Trk para cada neurotrofina respectiva, permitindo maior controle das interações ligando-receptor dentro deste sistema. As neurotrofinas são sintetizadas como proteínas precursoras ou pró-neurotrofinas que sofrem clivagem da porção N- terminal (pro-domínio) para produzir as proteínas maduras. As pró-neurotrofinas são liberadas e possuem atividade biológica que envolve a regulação da sobrevivência celular e da dinâmica do crescimento (Lee *et al.*, 1998).

O fator de crescimento do nervoso (NGF) foi descoberto há mais de 60 anos como um elemento necessário para a sobrevivência e desenvolvimento do sistema nervoso periférico. A descoberta do NGF estabeleceu as bases para a identificação de fatores neurotróficos adicionais. O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) foi estabelecido como o principal fator trófico no sistema nervoso central, onde é abundantemente expresso e influencia muitos aspectos da função neuronal, como crescimento neuronal, morfologia, sináptica e plasticidade estrutural (Mitre *et al.*, 2017). A falta do BDNF no SNC tem efeitos generalizados, como a morfologia neuronal aberrante e a disfunção sináptica, reforçando a noção de que o BDNF integra diferentes circuitos e vias de sinalização (Mitre *et al.*, 2017; Potey e Wang, 2017). O BDNF tem um papel importante no reparo do tecido pós-AVC, mostrando ser um neuroprotetor *in vitro* e *in vivo*. Fisiologicamente, sua produção é desenvolvida após o AVC através de uma via dependente de NMDA (Stanne *et al.*, 2016). A superexpressão do BDNF no hipocampo pode influenciar a neurogênese, mas também

esta associada ao conseqüente desenvolvimento da epilepsia, o que sugere um mecanismo subjacente às alterações no processamento neural (Lippert *et al.*, 2017).

## ***2.9 Core e Penumbra no AVC isquêmico***

Nas primeiras horas após a oclusão arterial no encéfalo, a área comprometida consiste em uma mistura de células que já estão irreversivelmente danificadas e destinadas a morte, juntamente com algumas que exibem mudanças bioquímicas anormais e continuarão morrendo mais tarde, mas que podem se recuperar se os processos bioquímicos que conduzem a morte forem interrompidos por tratamentos farmacológicos ou reestabelecimento do fluxo sanguíneo (Auer, 2016; Powers, 2016).

Nas primeiras horas depois da agressão, existe um núcleo de infarto (*core*), que se refere à necrose onde as células mais próximas à lesão morrem (Garcia *et al.*, 1993; Kaufmann *et al.*, 1999; Lipton, 1999; Bandera *et al.*, 2006). O infarto pode ser definido como pan-necrose isquêmica que é a morte de todos os elementos celulares no cérebro, incluindo neurônios, glia e células vasculares deixando um cisto cheio de líquido intersticial, mostrando uma lesão de forma estrutural (Auer, 2016). Este processo é cercado por uma borda de tecido isquêmico moderado que está funcionalmente comprometido com uma deficiência da atividade elétrica, mas que preservou o metabolismo celular e a viabilidade, esta zona é chamada de *penumbra*. Esta área apresenta um período crítico chamado de "janela de oportunidade", onde a integridade e as funções celulares criadas pela isquemia podem ser parcialmente ou completamente revertidas pela reperfusão do tecido cerebral ainda viável. A penumbra é caracterizada por uma determinada conservação do metabolismo de energia, porque o fluxo cerebral sanguíneo nesta área é de 25% a 50% do normal. A fisiopatologia da penumbra está intimamente ligada a morte celular gerada pelas ondas espontâneas de despolarização de membrana. Estas ondas podem ser provenientes de múltiplos focos; alguns a partir do *core* e outros dentro da mesma zona de penumbra (Garcia *et al.*, 1993; Kaufmann *et al.*, 1999; Lipton, 1999; Bandera *et al.*, 2006; Powers, 2016).

Na isquemia encefálica se apresenta um conceito denominado vulnerabilidade seletiva (Auer, 2016) que se refere à diferença da sensibilidade das populações neuronais no SNC frente a diferentes processos que causam dano ou morte celular e que leva a

neurodegeneração (Naudí *et al.*, 2013). A sensibilidade celular se apresenta como uma necrose seletiva de neurônios e células da glia (oligodendrócitos e astrócitos), deixando a arquitetura do tecido intacta, o que significa que todas as células restantes ao redor incluindo os processos neuronais (axônios e dendritos) ainda podem funcionar. A necrose neuronal seletiva mostra uma tumefação dendrítica precoce, devido à localização dos receptores NMDA e outros receptores excitatórios de aminoácidos. O infarto e a necrose neuronal seletiva podem ocorrer em qualquer região do cérebro (Auer, 2016).

Dados experimentais demonstraram uma progressão gradual de um nível reversível de isquemia em relação ao infarto. A penumbra tem um desenlace variável e o resgate do tecido pode ser reestabelecido dentro de um período de 6 a 8 horas. Estudos com tomografia por emissão de pósitron (PET) demonstram uma redução gradual da atividade metabólica cerebral em regiões de isquemia focal aguda, manifestando áreas isquêmicas severas que subsequentemente evoluem para o *core*. No entanto, essa atividade celular não indica necessariamente viabilidade funcional. De fato, lesões graves no tecido isquêmico podem progredir para o *core* dentro de 1 a 2 horas (Kaufmann *et al.*, 1999).

### **2.9.1 Alterações morfológicas**

As características neuropatológicas comuns do infarto isquêmico incluem uma área bem demarcada de necrose celular, incluindo neurônios, glia e células endoteliais (pan-necrose). Esta patologia geralmente está associada a um território vascular definido (Dietrich, 2017).

Diferentes estágios celulares são observados microscopicamente na área lesionada. Inicialmente a célula se dilata, em seguida encolhe e sofre picnose (condensação da cromatina nuclear). Este processo se desenvolve ao longo de 6 a 12 horas. Por volta das 24 horas há extensa cromatólise e ocorre como resultado a necrose. Os astrócitos se dilatam e fragmentam, as bainhas de mielina se degeneram e a lesão celular é irreversível (Kajstura *et al.*, 1996).

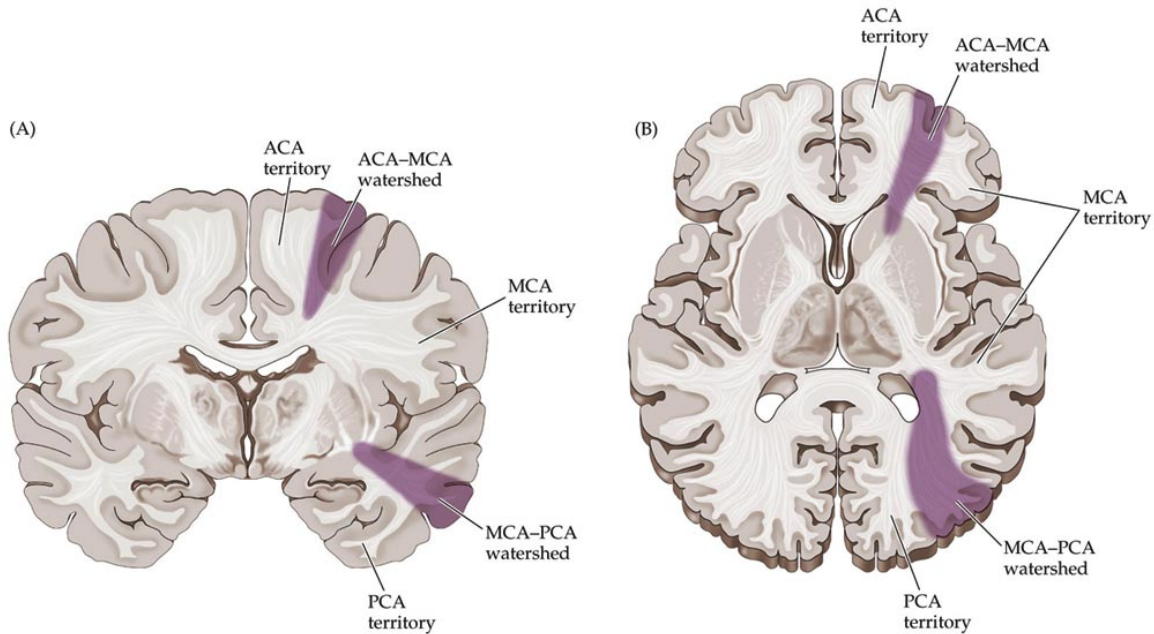
Em um infarto totalmente desenvolvido, o citoplasma do neurônio da substância cinzenta mancha intensamente com corantes acidófilos (neurônios eosinofílicos ou vermelhos) ou não consegue manchar, dando a aparência de neurônios fantasmas. Em contraste com as mudanças citoplasmáticas, o núcleo celular parece denso e picnótico. O

neuropilo circundante adota uma aparência esponjosa, enquanto outros tipos celulares como os astrócitos, oligodendrócitos e células endoteliais podem mostrar evidências de inchaço precoce e coloração pálida devido à formação de edema (Dietrich, 2017).

Os neurônios isquêmicos apresentam um grande escurecimento e retração do núcleo e do citoplasma. A membrana citoplasmática e na membrana nuclear são ambas muito irregulares e a célula frequentemente assume uma forma triangular (em 2 dimensões). O citoplasma contém geralmente muitos vacúolos grandes, principalmente pelo rompimento das mitocôndrias e outras organelas; podendo ser também vacúolos autofágicos. A organização normal do retículo endoplasmático rugoso e o aparelho de Golgi é interrompida. Tem poucos, polissomos, mas existe uma infinidade de ribossomos. Pelo menos alguns dos microtúbulos estão presentes (Lipton, 1999).

O efeito da isquemia na substância branca causa mais danos à mielina do que nos axônios, devido ao fluxo axoplasmático que transporta continuamente axoplasma para áreas isquêmicas de zonas não isquêmicas. A desmielinização seletiva representa, portanto, a lesão isquêmica inicial, mas é o prenúncio da perda axonal que se segue com isquemia contínua ou mais graves. A lesão desmielinizante precoce pode ser pensada como a substância branca análoga de infarto incompleto da matéria cinzenta. Quando finalmente dá lugar à quebra total de tecido envolvendo axônios também, a desmielinização isquêmica pode dar origem a uma aparência radiológica denominada leucoaraiose e doença de Binswanger (Auer, 2016).

A isquemia global causa morte neuronal seletiva e retardada que leva a sério déficit cognitivo. Os neurônios da zona CA1 do hipocampo são particularmente vulneráveis. Outros neurônios que podem ser danificados incluem neurônios espinhosos médios do estriado, neurônios piramidais nas camadas corticais II, V e VI e neurônios de Purkinje no cerebelo (Zhang *et al.*, 2016). A substância cinzenta cerebral também é particularmente vulnerável à isquemia global. A abundância de glutamato nestes neurônios os torna mais susceptíveis. A isquemia global faz um maior dano nas áreas entre as grandes artérias cerebrais e cerebelares conhecidas como "*watershed area*" (Fig. 1), este termo corresponde ao triângulo parietal-temporal-occipital na junção com as artérias cerebrais: anterior, média e posterior (Garcia e Anderson, 1991).



**Figura 1.** ACA (artéria cerebral anterior), MCA (artéria cerebral média), PCA (artéria cerebral posterior). Cortes do encéfalo humano, mostrando a “watershed area” entre ACA-MCA e a “watershed area” entre MCA-PCA. (A) Corte coronal e (B) Corte transversal (Blumenfeld, 2002).

## 2.10 Tratamento do AVC isquêmico

A doença cerebrovascular ou acidente vascular cerebral é uma das razões mais frequentes para a assistência neurológica urgente, representa uma das principais causas de morte e incapacidade em adultos e implica um enorme custo humano e econômico. Os avanços no tratamento do AVC têm como eixos fundamentais a atenção neurológica precoce, a admissão nas unidades de AVC, a aplicação do tratamento fibrinolítico e o tratamento reabilitador (Murie-Fernández *et al.*, 2010).

Na década dos 1990, os investigadores do *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* (NINDS) foram os pioneiros na terapia intravenosa com o ativador do plasminogênio tecidual (tPA), um agente trombolítico, que se tornou padrão de cuidado no tratamento de AVC agudo após a publicação do ensaio clínico *Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke* em 1995. A combinação de antitrombóticos junto com trombolíticos foi desenvolvido para estabelecer um tratamento seguro na recanalização de oclusões em grandes artérias (Reis *et al.*, 2017). A trombólise com o tPA demonstrou produzir melhora neurológica e funcional em pacientes com AVC, só até 3 horas após o



início do AVC isquêmico, mas o tratamento com o tPA tem limitações porque precisa de terapias alternativas para diminuir os problemas de deficiência física (Peña *et al.*, 2017).

Em 2015, na conferência internacional do *Stroke*, quatro ensaios clínicos aleatórios controlados (*New breakthrough in acute therapy*) demonstraram o benefício da remoção do coágulo com cateter (trombectomia) para restabelecer o fluxo sanguíneo nas artérias cerebrais em pacientes, em combinação da imagenologia que permitiu a identificação rápida e fácil do bloqueio das artérias (Mott *et al.*, 2016). A intervenção endovascular foi associada a um grau substancialmente menor de incapacidade dos pacientes, mas o grau de benefício da trombectomia varia, segundo o intervalo de tempo em que é feita após a apresentação do AVC isquêmico (Saver *et al.*, 2016).

Os problemas que surgem na função motora após a apresentação do AVC isquêmico são amplos dada a grande variedade de déficits e incapacidades que causa. Os tratamentos com fisioterapia são dirigidos como medidas destinadas a subtrair os sintomas que constituem uma limitação para o mesmo, assim como os problemas psicológicos que sofre o paciente. Assim, o tratamento da espasticidade e suas complicações, como a rigidez, são controlados por meio de posturas preventivas, cinesioterapia, uso de drogas antiespásticas sistêmicas ou locais e com órteses ou placas. para que sua repercussão negativa na ambulação seja minimizada (Cuadrado, 2009). Entretanto, é indispensável, um planejamento para que os pacientes que sofreram um AVC, além de receberem os melhores cuidados na fase aguda, possam se beneficiar de um tratamento específico de neuroreabilitação que começa precoce para ter uma melhora evidente e reduzir as sequelas (Murie-Fernández *et al.*, 2010).

### ***2.11 Modelos experimentais para isquemia e reperfusão encefálica***

A lesão isquêmica global consequente de parada circulatória foi reconhecida por muito tempo por causar alterações no encéfalo humano. No entanto, uma melhor compreensão da doença exigiu o desenvolvimento de modelos apropriados (Tajiri *et al.*, 2013). A utilização de modelos animais nos últimos anos tem proporcionado uma melhor compreensão dos mecanismos patofisiológicos de AVC. Camundongos e ratos são as espécies mais utilizadas, com um uso crescente de espécies maiores, como coelhos e até

mesmo primatas não-humanos, para melhor estudo da doença e seus tratamentos (Casals *et al.*, 2011).

Pequenos animais, especialmente camundongos são geneticamente homogêneos e as modificações genéticas podem ser feitas de forma relativamente fácil. Com as tecnologias transgênicas é frequente superexpressar determinados genes e proteínas em certas espécies, ou inativar os genes específicos (*knockout*). Esta tecnologia proporciona uma excelente abordagem para ajudar a determinar os potenciais mecanismos de lesão e neuroproteção (Traystman, 2003).

Há diferenças morfológicas e funcionais entre o encéfalo de seres humanos e animais. Embora a biologia básica da isquemia cerebral seja comparável entre as diferentes espécies, existem importantes diferenças entre as espécies na estrutura cerebral, função e anatomia vascular. O metabolismo da energia cerebral e o fluxo sanguíneo em mamíferos é inversamente proporcional ao seu peso corporal. As densidades neuronais e gliais são quantitativamente diferentes em vários mamíferos. Além disso, no cérebro humano, o giro denteado é maior. Por conseguinte, o tamanho, a distribuição anatômica e a evolução temporal do infarto diferem entre espécies. A zona de penumbra, embora esteja bem estabelecida em roedores, é bem menos caracterizada em seres humanos e pode ser consideravelmente menor. O efeito dos tratamentos neuroprotetores também depende das espécies. Os roedores parecem ser mais susceptíveis à neuroproteção que os mamíferos superiores (Dirnagl *et al.*, 1999).

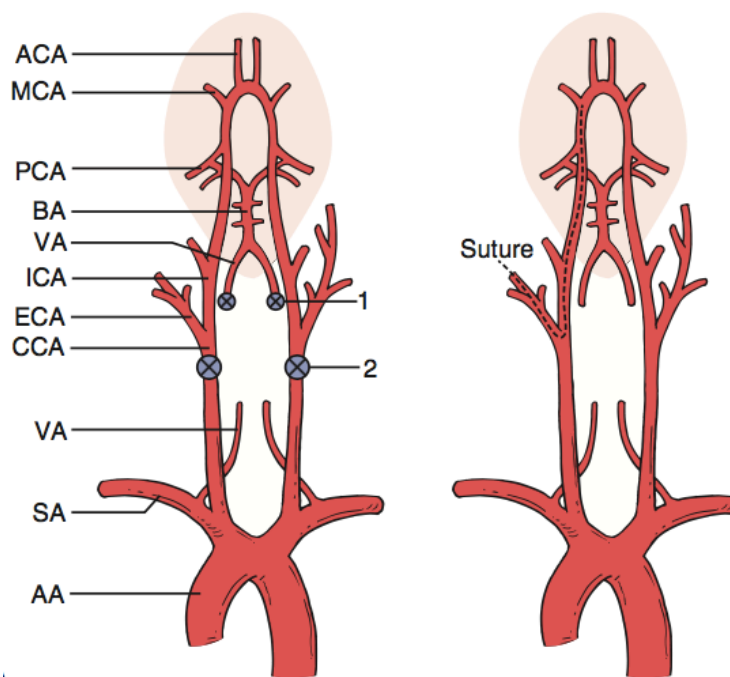
Estudos com modelos de AVC em roedores fornecem informações úteis para elucidar múltiplas vias de lesão celular. A maioria dos estudos de AVC pré-clínicos utilizam ratos como modelos experimentais devido à sua semelhança com humanos em anatomia e fisiologia cerebrovascular. Além disso, seu tamanho moderado permite facilidade relativa na realização da cirurgia, monitoramento de parâmetros fisiológicos e exame do encéfalo (Park *et al.*, 2014).

Os modelos experimentais de isquemia encefálica são caracterizados como global e focal. A isquemia global ocorre quando o fluxo sanguíneo cerebral é reduzido durante a maior parte ou a totalidade do cérebro, enquanto a isquemia focal é representada por uma diminuição do fluxo sanguíneo em uma região específica do cérebro (Traystman, 2003).

A isquemia global pode ser induzida por oclusão permanente de artérias vertebrais (em ratos) ou por oclusão transiente das artérias carótidas comuns (em camundongos e

gerbos), seguido pela reperfusão. Também pode ser induzida em modelos com mamíferos maiores como monos, cabras e porcos. A duração da isquemia global é tipicamente curto de 5 a 20 minutos. Durante o episódio isquêmico, o fluxo sanguíneo encefálico é imediatamente reduzido a <1% e permanece bloqueado até a reperfusão (Zhang *et al.*, 2016).

Atualmente são três os modelos usados para produzir isquemia global: (1) a oclusão de 2 vasos - artérias carótidas comuns (CCA) (2-VO) em gerbils e camundongos, (2) a oclusão de 2 vasos - artérias vertebrais (VA) (2-VO) em combinação com hipotensão em ratos e por último a combinação de ambos (3) a oclusão de 4 vasos (4-VO) em ratos (Fluri *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016) (Fig. 2), este último modelo se realiza durante 5 a 15 minutos, para assemelhar a condição de parada cardíaca ou oclusão coronária em seres humanos. Os investigadores utilizam este modelo para concentrar-se nos danos do hipocampo e reforçar sua relevância no AVC (Tajiri *et al.*, 2013).



**Figura 2.** Modelos experimentais de isquemia global e focal. Diagrama da anatomia cerebrovascular do rato, ilustrando a eletrocauterização permanente das artérias vertebrais (1) e a posição dos cliques cirúrgicos nas artérias carótidas comuns (2) no modelo 4-VO (à esquerda) e a sutura intraluminal durante a oclusão no modelo de isquemia focal temporária (à direita). AA, arco da aorta; ACA, artéria cerebral anterior; BA, artéria basilar; CCA, artéria carótida comum; ECA, artéria carótida externa; ICA, artéria carótida interna; MCA, artéria cerebral média; PCA, artéria cerebral posterior; SA, artéria subclávia; VA, artéria vertebral.

O modelo de oclusão 4-VO é um modelo bem estabelecido e amplamente utilizado, onde a morte neuronal é restrita a os neurônios piramidais do CA1 no hipocampo e não se manifesta até 3 dias após o insulto. O processo se inicia com uma incisão na pele para a exposição e eletrocauterização permanente das artérias vertebrais, brevemente as CCA são expostas e isoladas com sutura de seda 3-0 e o animal é suturado em seguida. 24h após a incisão é aberta e as CCA são submetidas a oclusão temporária com “clamps” cirúrgicos (4 minutos para isquemia sub letal e 10 min para isquemia global). Quando as carótidas são ocluídas o sangue é reduzido a menos de 3% do normal no hipocampo, estriado e neocórtex (Zhang *et al.*, 2016). Este método é bem-sucedido no 50-75% dos animais, provavelmente devido à variabilidade no fornecimento de sangue colateral. A grande vantagem deste modelo é a capacidade de hiperemia sustentada em cima da reperfusão, que serve como um paradigma eficaz para estudos metabólicos (Tajiri *et al.*, 2013).

O método de oclusão de dois vasos (2-VO) tem maior implicação na produção de isquemia do prosencéfalo em ratos e gerbilos (Tajiri *et al.*, 2013). A oclusão das artérias carótidas comuns (BCCAO) é acoplado com hipotensão para produzir isquemia na região do cérebro anterior (Tajiri *et al.*, 2013). O processo para a BCCAO inicia com a incisão na pele para expor as CCA, isola-las e depois são submetidas a oclusão temporária com clamps cirúrgicos (ate aproximadamente 20 min), logo o animal é suturado e inicia a reperfusão. O modelo de BCCAO produz um volume de infarto relativamente grande e regiões mais localizadas de dano, sendo alguns neurônios mais suscetíveis que outros (Costa Silva *et al.*, 2015; De Brito Toscano *et al.*, 2016; Victoria *et al.*, 2017). Estes incluem a camada de neurônios piramidais CA1 do hipocampo, núcleo caudado e putâmen e neocórtex e a camada de células de Purkinje do córtex cerebelar (Garcia e Anderson, 1991). Modelos de roedores imaturos da EHI, nos quais a ligadura da artéria carótida é seguida por um período de hipóxia, produzem uma distribuição da lesão cerebral que se assemelha à lesão observada em crianças asfixadas em termos humanos (Doman *et al.*, 2018).

Estudos recentes demonstraram uma nova técnica de realizar a isquemia global em ratos por oclusão reversível dos três vasos principais que se ramificam da aorta e fornecem o fluxo sanguíneo ao cérebro (tronco braquiocefálico, artéria subclávia esquerda e artéria carótida esquerda). As vantagens deste modelo de oclusão de três vasos (3-VO) consistem na possibilidade de realizar uma operação de um passo e ausência de fluxo sanguíneo

colateral residual. No entanto, ao mesmo tempo, é um procedimento traumático porque o acesso através do tórax resulta em danos, como o pneumotórax. A gravidade da intervenção cirúrgica é confirmada pela mortalidade no grupo de animais operados por simulador (Atochin *et al.*, 2017).

Por outro lado, os modelos focais são amplamente aceitos para sua replicação, já que são o modelo animal que mais aproxima ao AVC em seres humanos. As consequências patológicas são caracterizadas por um insulto primário para um conjunto específico de células dentro de uma região alvo do cérebro, envolvendo morte celular secundária ao tecido vizinho. O córtex e o estriado são normalmente as regiões alvo do cérebro para estes modelos de AVC focal. Normalmente é realizado em ratos e camundongos e é produzido experimentalmente por oclusão da artéria cerebral média (MCAo). A oclusão arterial pode ser permanente ou temporária (a oclusão é de até 3 horas, seguida de reperfusão) e é proximal ou distal, utilizando suturas/filamentos, abordagens fototrombóticos ou colocação de agentes coagulantes, arterial ou intracerebral (Tajiri *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016)

O MCAo proximal é mais comumente induzido pela ligação das CCA e carótidas externas (ECA), seguido pela inserção de uma sutura na artéria carótida interna. A parte final da sutura deve passar a origem da artéria comunicante posterior e a origem da artéria cerebral média (MCA) (Zhang *et al.*, 2016). O *core no* MCAo proximal, engloba a porção lateral do putamen caudado e do córtex parietal onde o sangue é reduzido para menos de 15%. A penumbra, engloba o restante do neocórtex, o córtex entorrinal e o putamen caudado medial e o sangue se reduz a menos de 40% (Zhang *et al.*, 2016).

No MCAo distal, o sangue para os gânglios basais não é interrompido e os danos são restritos ao neocórtex. Esse tipo de oclusão pode ser induzido cirurgicamente com um clamp ou coágulos trombóticos em combinação com oclusão unilateral transitória das CCA. A redução do sangue no núcleo e na penumbra é semelhante à do modelo proximal (Zhang *et al.*, 2016).

Outro modelo focal é usado para reproduzir a encefalopatia hipóxica-isquêmica que se apresenta em neonatos, na qual envolve a oclusão unilateral transitória da CCA, geralmente a esquerda de ratos com 7 dias de idade, em associação com hipóxia sistêmica, onde os filhotes são expostos a uma redução de 8% de oxigênio no cérebro entre 15 minutos a 1,5 hora, induzindo o aparecimento de uma área isquêmica no córtex, estriado e

no hipocampo do hemisfério cerebral ipsilateral de forma viável e reprodutível (Fernández-López *et al.*, 2005)

### 3. BIBLIOGRAFIA

ANRATHER, J.; IADECOLA, C.; HALLENBECK, J. 10 - Inflammation and Immune Response A2 - Grotta, James C. In: ALBERS, G. W.; BRODERICK, J. P., *et al* (Ed.). **Stroke (Sixth Edition)**. London: Elsevier, 2016. p.129-140.e5. ISBN 978-0-323-29544-4.

ARONOWSKI, J. et al. 8 - Mechanisms of Cerebral Hemorrhage A2 - Grotta, James C. In: ALBERS, G. W.; BRODERICK, J. P., *et al* (Ed.). **Stroke (Sixth Edition)**. London: Elsevier, 2016. p.102-112.e6. ISBN 978-0-323-29544-4.

ASSOCIATION, A. H.; ASSOCIATION, A. S. Types of Stroke **Together to end Stroke**, 2016. Disponível em: <  
[http://www.strokeassociation.org/STROKEORG/AboutStroke/TypesofStroke/Types-of-Stroke\\_UCM\\_308531\\_SubHomePage.jsp](http://www.strokeassociation.org/STROKEORG/AboutStroke/TypesofStroke/Types-of-Stroke_UCM_308531_SubHomePage.jsp)>. Acesso em: 24/02/2016.

ATOCHIN, D. N. et al. An improved three-vessel occlusion model of global cerebral ischemia in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 132, n. Supplement C, p. 213-221, 2017/06/01/ 2017. ISSN 0361-9230. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0361923017301508>>.

AUER, R. N. 4 - Histopathology of Brain Tissue Response to Stroke and Injury A2 - Grotta, James C. In: ALBERS, G. W.; BRODERICK, J. P., *et al* (Ed.). **Stroke (Sixth Edition)**. London: Elsevier, 2016. p.47-59. ISBN 978-0-323-29544-4.

AVEZUM, Á. et al. Stroke in Latin America: Burden of Disease and Opportunities for Prevention. **Global Heart**, Feb 7 2015. ISSN 2211-8179 (Electronic). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26014650>>.

BALLESTEROS, I. et al. Chapter 58 - Cytokines and Chemokines in Stroke. In: (Ed.). **Primer on Cerebrovascular Diseases (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2017. p.280-284. ISBN 978-0-12-803058-5.

BANDERA, E. et al. Cerebral blood flow threshold of ischemic penumbra and infarct core in acute ischemic stroke. **Stroke**, v. 37, n. 5, p. 1334-1339, 2006. ISSN 0039-2499.

BEHRENDT, N. **Matrix proteases in health and disease**. John Wiley & Sons, 2012. ISBN 3527649344.

BENJAMIN, E. J. et al. Heart disease and stroke statistics—2017 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 135, n. 10, p. e146-e603, 2017. ISSN 0009-7322.

BENSENOR, I. M. et al. Prevalence of stroke and associated disability in Brazil: National Health Survey-2013. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 73, n. 9, p. 746-750, 2015. ISSN 0004-282X.

BLUMENFELD, H. Neuroanatomy through clinical cases. Sinauer Associates. **Inc., Sunderland, MA**, 2002.

CASALS, J. B. et al. The use of animal models for stroke research: a review. **Comparative Medicine**, v. 61, n. 4, p. 305-313, 2011. ISSN 1532-0820.

CASTILLO, J.; DÁVALOS, A.; NOYA, M. Progression of ischaemic stroke and excitotoxic aminoacids. **The Lancet**, v. 349, n. 9045, p. 79-82, 1997. ISSN 0140-6736.

CHAVES, M. L. Acidente vascular encefálico: conceituação e fatores de risco. **Rev Bras Hipertens**, v. 7, n. 4, p. 372-82, 2000.

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. ISSN 1567-2026.

CUADRADO, Á. A. Rehabilitación del ACV: evaluación, pronóstico y tratamiento. **Galicia Clínica**, v. 70, n. 3, p. 25-40, 2009. ISSN 1989-3922.

CUI, N.; HU, M.; KHALIL, R. A. Chapter One - Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. In: KHALIL, R. A. (Ed.). **Progress in Molecular Biology and Translational Science**: Academic Press, v.147, 2017. p.1-73. ISBN 1877-1173.

DANTZER, R. Cytokine, sickness behavior, and depression. **Immunology and allergy clinics of North America**, v. 29, n. 2, p. 247-264, 2009. ISSN 0889-8561.

DE BRITO TOSCANO, E. C. et al. Platelet-activating factor receptor (PAFR) plays a crucial role in experimental global cerebral ischemia and reperfusion. **Brain Research Bulletin**, v. 124, p. 55-61, Mar 31 2016. ISSN 1873-2747 (Electronic) 0361-9230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27040712> >.

DE LUCA, C.; PAPA, M. Chapter Five - Matrix Metalloproteinases, Neural Extracellular Matrix, and Central Nervous System Pathology. In: KHALIL, R. A. (Ed.). **Progress in Molecular Biology and Translational Science**: Academic Press, v.148, 2017. p.167-202. ISBN 1877-1173.

DENES, A. et al. Inflammation and brain injury: acute cerebral ischaemia, peripheral and central inflammation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 5, p. 708-723, 2010. ISSN 0889-1591. Disponível em: < [http://ac.els-cdn.com/S0889159109004334/1-s2.0-S0889159109004334-main.pdf?\\_tid=66847416-83e3-11e5-acb3-00000aacb35e&acdnat=1446745020\\_9ea26fe9e45dca98543fce92ad7c14d2](http://ac.els-cdn.com/S0889159109004334/1-s2.0-S0889159109004334-main.pdf?_tid=66847416-83e3-11e5-acb3-00000aacb35e&acdnat=1446745020_9ea26fe9e45dca98543fce92ad7c14d2) >.

DIETRICH, W. D. Chapter 22 - Histopathology of Cerebral Ischemia and Stroke A2 - Caplan, Louis R. In: BILLER, J.; LEARY, M. C., et al (Ed.). **Primer on Cerebrovascular**



**Diseases (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2017. p.113-116. ISBN 978-0-12-803058-5.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends in Neurosciences**, v. 22, n. 9, p. 391-397, 1999. ISSN 0166-2236. Disponível em: < [http://ac.els-cdn.com/S0166223699014010/1-s2.0-S0166223699014010-main.pdf?\\_tid=4f066f06-83e3-11e5-bd24-00000aab0f01&acdnat=1446744981\\_4325dd6aa400a8559d46c39ef0865336](http://ac.els-cdn.com/S0166223699014010/1-s2.0-S0166223699014010-main.pdf?_tid=4f066f06-83e3-11e5-bd24-00000aab0f01&acdnat=1446744981_4325dd6aa400a8559d46c39ef0865336) >.

DITTMAR, M. et al. Cerebral ischemia, matrix metalloproteinases, and TNF- $\alpha$ : MMP inhibitors may act not exclusively by reducing MMP activity. **Stroke**, v. 35, n. 7, p. e338-e340, 2004. ISSN 0039-2499.

DOMAN, S. E. et al. early Detection of hypothermic neuroprotection Using T2-Weighted Magnetic resonance imaging in a Mouse Model of hypoxic ischemic encephalopathy. **Frontiers in neurology**, v. 9, 2018.

DOWNES, C. E.; CRACK, P. J. Neural injury following stroke: are Toll-like receptors the link between the immune system and the CNS? **British journal of pharmacology**, v. 160, n. 8, p. 1872-1888, 2010. ISSN 1476-5381.

DOYLE, K. P.; SIMON, R. P.; STENZEL-POORE, M. P. Mechanisms of ischemic brain damage. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 310-318, 2008. ISSN 0028-3908.

EPSTEIN, K. A. et al. Smoking cessation and outcome after ischemic stroke or TIA. **Neurology**, p. 10.1212/WNL.0000000000004524, 2017. ISSN 0028-3878.

ERGUL, A.; FAGAN, S. C. Chapter 32 - Risk Factors: Diabetes A2 - Caplan, Louis R. In: BILLER, J.; LEARY, M. C., et al (Ed.). **Primer on Cerebrovascular Diseases (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2017. p.158-162. ISBN 978-0-12-803058-5.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, D. et al. Immature rat brain slices exposed to oxygen–glucose deprivation as an in vitro model of neonatal hypoxic–ischemic encephalopathy. **Journal of neuroscience methods**, v. 145, n. 1-2, p. 205-212, 2005. ISSN 0165-0270.

FILIANO, A. J.; GADANI, S. P.; KIPNIS, J. How and why do T cells and their derived cytokines affect the injured and healthy brain? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 6, p. 375-384, 2017. ISSN 1471-003X.

FINGLETON, B. **Matrix metalloproteinases as regulators of inflammatory processes**: Elsevier 2017.

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. 3445-54, 2015. ISSN 1177-8881 (Electronic)  
1177-8881 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26170628> >.

FRANGOIANNIS, N. G. Chemokines in ischemia and reperfusion. **THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS-STUTTGART-**, v. 97, n. 5, p. 738, 2007. ISSN 0340-6245.

FU, Y. et al. Immune interventions in stroke. **Nature Reviews Neurology**, v. 11, n. 9, p. 524-35, Sep 2015. ISSN 1759-4766 (Electronic)  
1759-4758 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26303850> >.

GARCIA, J.; ANDERSON, M. Circulatory disorders and their effects on the brain. **Textbook of Neuropathology**. Baltimore, Williams & Wilkins, p. 621-718, 1991.

GARCIA, J. H. et al. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. **The American Journal of Pathology**, v. 142, n. 2, p. 623, 1993.

HAZELL, A. S. Excitotoxic mechanisms in stroke: an update of concepts and treatment strategies. **Neurochemistry International**, v. 50, n. 7, p. 941-953, 2007. ISSN 0197-0186.

HERNÁNDEZ, M.; TRUJILLO, L. M.; CÉSPEDES, Á. E. La asociación atorvastatina-meloxicam reduce el daño cerebral, atenuando la gliosis reactiva consecuente a embolismo arterial. **Iatreia**, v. 26, n. 4, p. 397-407, 2013. ISSN 0121-0793.

HOWARD, G.; HOWARD, V. J. 14 - Stroke Disparities A2 - Grotta, James C. In: ALBERS, G. W.; BRODERICK, J. P., *et al* (Ed.). **Stroke (Sixth Edition)**. London: Elsevier, 2016. p.207-216. ISBN 978-0-323-29544-4.

HU, X. *et al*. Cerebral vascular disease and neurovascular injury in ischemic stroke. **Circulation research**, v. 120, n. 3, p. 449-471, 2017. ISSN 0009-7330.

JANARDHAN, V.; QURESHI, A. I. Mechanisms of Ischemic Brain Injury. **Current Cardiology Reports**, v. 6, p. 117 - 123, 2004.

JORGENSEN, I.; RAYAMAJHI, M.; MIAO, E. A. Programmed cell death as a defence against infection. **Nature Reviews Immunology**, 2017. ISSN 1474-1733.

KAUFMANN, A. M. *et al*. Ischemic core and penumbra in human stroke. **Stroke**, v. 30, n. 1, p. 93-99, 1999. ISSN 0039-2499.

KIPNIS, J. Multifaceted interactions between adaptive immunity and the central nervous system. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 766-771, 2016. ISSN 0036-8075.

LAKHAN, S. E.; KIRCHGESSNER, A.; HOFER, M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. **Journal of Translational Medicine** v. 7, p. 1-11, 2009.

LEE, T.-H. *et al*. Expression of nerve growth factor and trkA after transient focal cerebral ischemia in rats. **Stroke**, v. 29, n. 8, p. 1687-1697, 1998. ISSN 0039-2499.

LIPPERT, T. et al. Chapter 59 - Growth Factors and Cerebrovascular Diseases. In: (Ed.). **Primer on Cerebrovascular Diseases (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2017. p.284-287. ISBN 978-0-12-803058-5.

LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 4, p. 1431-1568, 1999. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://physrev.physiology.org/content/physrev/79/4/1431.full.pdf> >.

LOGSDON, A. F. et al. Chapter 33 - Risk Factors: Aging. In: (Ed.). **Primer on Cerebrovascular Diseases (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2017. p.162-167. ISBN 978-0-12-803058-5.

MACKAY, J. et al. **The atlas of heart disease and stroke**. World Health Organization, 2004. ISBN 9241562765.

MANUCK, T. A. et al. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 215, n. 1, p. 103.e1-103.e14, 2016. ISSN 0002-9378. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.01.004> >. Acesso em: 2018/11/18.

MARTINS, S. C. O. et al. Past, present, and future of stroke in middle-income countries: the Brazilian experience. **International Journal of Stroke**, v. 8, n. A100, p. 106-111, 2013. ISSN 1747-4949.

MCINTOSH, J. Stroke: Causes, Symptoms, Diagnosis and Treatment. **Medical News Today**, January 19 2016. Disponível em: < <http://www.medicalnewstoday.com/articles/7624.php> >.

MIRZA, S.; GOLDBERG, M. P. Chapter 26 - Pathophysiology of Ischemic White Matter Injury A2 - Caplan, Louis R. In: BILLER, J.;LEARY, M. C., *et al* (Ed.). **Primer on Cerebrovascular Diseases (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2017. p.131-134. ISBN 978-0-12-803058-5.

MITRE, M.; MARIGA, A.; CHAO, M. V. Neurotrophin signalling: novel insights into mechanisms and pathophysiology. **Clinical Science**, v. 131, n. 1, p. 13-23, 2017. ISSN 0143-5221.

MORRISON, K. J. **Fast Facts for Stroke Care Nursing: An Expert Guide in a Nutshell**. Springer Publishing Company, 2014. ISBN 0826127185.

MOTT, M.; JANIS, S.; KOROSHETZ, W. J. StrokeNet Takes Off National Institute of Neurological Disorders and Stroke Organizational Update. **Stroke**, v. 47, n. 3, p. e51-e52, 2016. ISSN 0039-2499.

MOZAFFARIAN, D. et al. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 131, n. 4, p. e29-322, Jan 27 2015. ISSN 1524-4539 (Electronic) 0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25520374> >.

MUELLER, A.; STRANGE, P. G. The chemokine receptor, CCR5. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 1, p. 35-38, 2004. ISSN 13572725.

MURIE-FERNÁNDEZ, M. et al. Neurorrehabilitación tras el ictus. **Neurología**, v. 25, n. 3, p. 189-196, 2010. ISSN 0213-4853.

NAUDÍ, A. et al. Estudio de la vulnerabilidad neuronal selectiva en el sistema nervioso central humano. **Revista Española de Geriatria y Gerontología**, v. 48, n. 5, p. 216-223, 2013. ISSN 0211-139X.

OZARK, S.; OVBIAGELE, B. Traditional Stroke Risk Factor Treatment. In: (Ed.). **Ischemic Stroke Therapeutics**: Springer, 2016. p.93-98. ISBN 3319177494.

PARK, S.-Y. et al. A Method for Generate a Mouse Model of Stroke: Evaluation of Parameters for Blood Flow, Behavior, and Survival. **Experimental Neurobiology**, v. 23, n.

1, p. 104-114 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3984953/pdf/en-23-104.pdf> >.

PEÑA, I. D. et al. Strategies to Extend Thrombolytic Time Window for Ischemic Stroke Treatment: An Unmet Clinical Need. **Journal of stroke**, v. 19, n. 1, p. 50-60, 2017. ISSN 2287-6391 2287-6405. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28178410> >. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC5307939/> >.

POTÉY, C.; WANG, Y. T. Chapter 36 - N-Methyl-d-Aspartate Receptors Remain Viable Therapeutic Targets for Stroke A2 - Caplan, Louis R. In: BILLER, J.; LEARY, M. C., *et al* (Ed.). **Primer on Cerebrovascular Diseases (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2017. p.177-182. ISBN 978-0-12-803058-5.

POWERS, W. J. 3 - Cerebral Blood Flow and Metabolism: Regulation and Pathophysiology in Cerebrovascular Disease A2 - Grotta, James C. In: ALBERS, G. W.; BRODERICK, J. P., *et al* (Ed.). **Stroke (Sixth Edition)**. London: Elsevier, 2016. p.28-46.e7. ISBN 978-0-323-29544-4.

REIS, C. et al. Phase I and phase II therapies for acute ischemic stroke: an update on currently studied drugs in clinical research. **BioMed research international**, v. 2017, 2017. ISSN 2314-6133.

ROSENBERG, G. A. Chapter 61 - Matrix Metalloproteinases and Extracellular Matrix in the Central Nervous System A2 - Caplan, Louis R. In: BILLER, J.; LEARY, M. C., *et al* (Ed.). **Primer on Cerebrovascular Diseases (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2017. p.291-295. ISBN 978-0-12-803058-5.

SAVER, J. L. et al. Time to treatment with endovascular thrombectomy and outcomes from ischemic stroke: a meta-analysis. **Jama**, v. 316, n. 12, p. 1279-1289, 2016. ISSN 0098-7484.

SESHADRI, S.; WOLF, P. A. 15 - Modifiable Risk Factors and Determinants of Stroke A2 - Grotta, James C. In: ALBERS, G. W.; BRODERICK, J. P., *et al* (Ed.). **Stroke (Sixth Edition)**. London: Elsevier, 2016. p.217-233. ISBN 978-0-323-29544-4.

SOHRABJI, F.; HURN, P. D. Chapter 34 - Risk Factors: Gender and Sex A2 - Caplan, Louis R. In: BILLER, J.; LEARY, M. C., *et al* (Ed.). **Primer on Cerebrovascular Diseases (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2017. p.167-170. ISBN 978-0-12-803058-5.

SORCE, S.; MYBURGH, R.; KRAUSE, K.-H. The chemokine receptor CCR5 in the central nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 93, n. 2, p. 297-311, Feb 2011. ISSN 1873-5118 (Electronic) 0301-0082 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21163326> >.

SORCE, S.; MYBURGH, R.; KRAUSE, K.-H. The chemokine receptor CCR5 in the central nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 93, p. 297–311, 2011.

STANNE, T. M. *et al*. Low circulating acute brain-derived neurotrophic factor levels are associated with poor long-term functional outcome after ischemic stroke. **Stroke**, v. 47, n. 7, p. 1943-1945, 2016. ISSN 0039-2499.

TAJIRI, N. *et al*. In vivo animal stroke models. **Translational stroke research**, v. 4, n. 3, p. 308-321, 2013. ISSN 1868-4483.

TARDINI, D. M. S. *et al*. Avaliação de dois modelos experimentais de isquemia e reperfusão cerebral em ratos com oclusão temporária carotídea associada ou não à oclusão vertebral. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 6, p. 502 - 508, 2003.

TOKAMI, H. *et al*. RANTES has a potential to play a neuroprotective role in an autocrine/paracrine manner after ischemic stroke. **Brain Research**, v. 1517, p. 122-132, 2013.

TRAYSTMAN, R. J. Animal Models of Focal and Global Cerebral Ischemia. **ILAR Journal**, v. 44, n. 2, p. 85-95, 2003. ISSN 1084-2020.

URRA, X. et al. Antigen-specific immune reactions to ischemic stroke. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 8, 2014.

VICTORIA, E. et al. Knockdown of CC chemokine receptor 5 (CCR5) is protective against cerebral ischemia and reperfusion injury. **Current neurovascular research**, 2017. ISSN 1875-5739.

WILLIAMSON, L. L.; BILBO, S. D. Chemokines and the hippocampus: a new perspective on hippocampal plasticity and vulnerability. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 30, p. 186-94, May 2013. ISSN 1090-2139 (Electronic) 0889-1591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23376170> >.

YU, Z.; LIN, L.; WANG, X. Chapter 24 - Pathophysiology of Ischemia-Reperfusion Injury and Hemorrhagic Transformation in the Brain A2 - Caplan, Louis R. In: BILLER, J.; LEARY, M. C., et al (Ed.). **Primer on Cerebrovascular Diseases (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2017. p.121-124. ISBN 978-0-12-803058-5.

ZHANG, H. et al. 5 - Molecular and Cellular Mechanisms of Ischemia-Induced Neuronal Death A2 - Grotta, James C. In: ALBERS, G. W.; BRODERICK, J. P., et al (Ed.). **Stroke (Sixth Edition)**. London: Elsevier, 2016. p.60-79.e5. ISBN 978-0-323-29544-4.



#### 4. OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações neurológicas, patológicas e inflamatórias durante 24 e 72 horas após isquemia encefálica global transitória causada pela oclusão bilateral da artéria carótida comum (BCCAo). Para isto, este trabalho foi dividido em dois capítulos. No capítulo 1 avaliamos estes parâmetros em camundongos C57B/6 selvagens submetidos à isquemia e reperfusão de 72 horas. No capítulo 2 investigamos a participação do CCR5 durante a isquemia e reperfusão por 24 horas.

#### 5. MATERIAL E MÉTODO

##### *Animais*

Foram usados camundongos machos entre 9 a 11 semanas, linhagem C57BL/6, selvagens (WT) e CCR5-deficientes (CCR5<sup>-/-</sup>), retrocruzados com uma reserva genética de C57BL/6 durante 10 gerações. Todos os camundongos foram obtidos do Biotério Central e do Bioterio do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) UFMG, Belo Horizonte-MG-Brasil, e mantidos nas instalações animais do laboratório de Imunofarmacologia, no Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB da UFMG. Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética animal da Universidade Federal de Minas Gerais (UMFG) (numero de protocolo: 232/2014 e 29/2016). Os camundongos foram mantidos em gaiolas com maravalha, expostos a um ciclo de luz de 12/12 horas, claro/escuro, com água filtrada e ração *ad libitum* em um ambiente controlado de temperatura e umidade estável.

Os camundongos foram divididos em quatro grupos da seguinte forma:

1. Grupo controle selvagem (WT): foram submetidos a cirurgias simuladas.
2. Grupo selvagem isquêmico (WT): foram submetidos a oclusão bilateral da artéria carótida comum (BCCAo).
3. Grupo controle CCR5-deficiente (CCR5<sup>-/-</sup>): foram submetidos a cirurgias simuladas.
4. Grupo isquêmico CCR5-deficiente (CCR5<sup>-/-</sup>): foram submetidos a oclusão bilateral da artéria carótida comum (BCCAo).

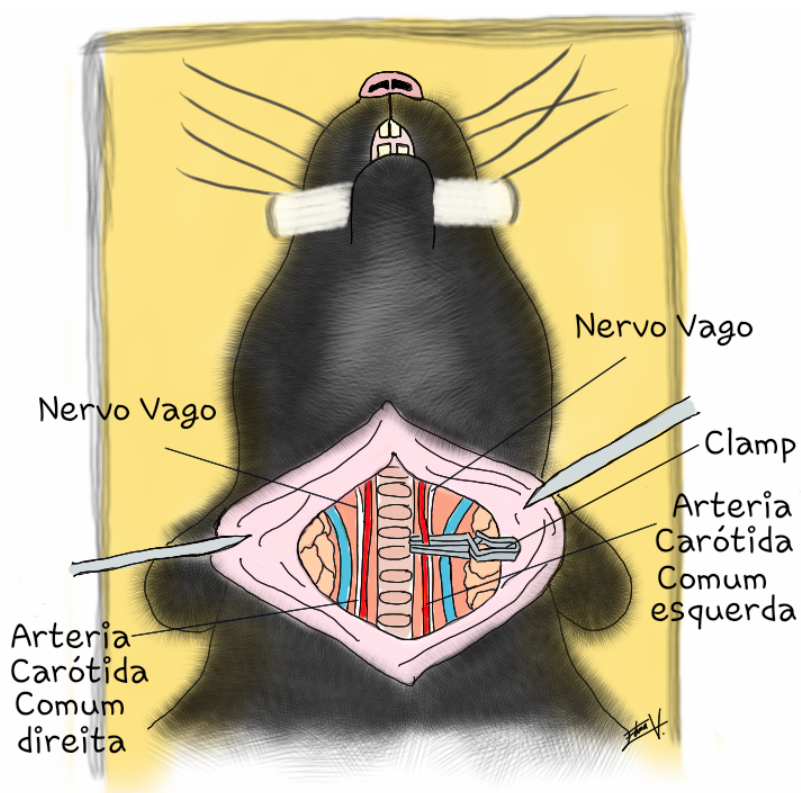
A quantidade de camundongos usados por grupo foi: 11 camundongos (WT controle), 16 camundongos (WT BCCAO), 9 camundongos (WT CCR5<sup>-/-</sup>) e 11 camundongos (CCR5<sup>-/-</sup> BCCAO). Todos os camundongos WT e CCR5<sup>-/-</sup>, foram pesados em uma balança digital (Acculab) antes e 24 horas depois da intervenção cirúrgica e eutanasiados com sobre dose de anestésico injetável (ketamina/Zilazina) por via intraperitoneal (IP). Os cérebros foram rapidamente removidos após avaliação do déficit neurológico.

### ***Indução à isquemia global transitória: Oclusão bilateral da artéria carótida comum (BCCAO)***

Para o preparo do animal, foi administrado via intraperitoneal (IP) uma mistura de Cetamina e Xilazina de acordo com o peso do animal. Anestesiado o animal, foi colocado em decúbito dorsal na maca especial para camundongos e se aplicou uma gota de solução salina nos olhos para evitar o ressecamento durante o procedimento cirúrgico; se passou álcool 70% na região anterior do pescoço, onde se fez a tricotomia com uma navalha gillette em toda a área a ser incidida, em uma dimensão de 1x1cm e depois se aplicou clorexidina na área em que foi feita a tricotomia. (NOTA: A maca especial para camundongos coloca o animal em decúbito dorsal e a cabeça posicionada em uma inclinação de 45°; é utilizada para ter uma melhor exposição das artérias carótidas comuns e para garantir uma imobilização adequada do animal).

Para iniciar com o procedimento cirúrgico, o animal na maca foi posicionado sob o microscópio estereoscópio binocular (Quimis-Serie Gally), com um aumento de 1-4X e se continuou com a cervicotomia longitudinal mediana posterior, na qual se levantou levemente a pele para um melhor corte e evitar perfurar traqueia, com o bisturi se fez uma incisão paralela ao borde anterior do musculo esterno-hioideo, iniciando extensão de caudal a cranial, com um diâmetro de 3mm. Esta abordagem ofereceu uma direita visualização das artérias carótidas comuns. Se iniciou a dissecação com as micropinças, afastando as glândulas e o musculo esterno-hioideo até achar a traqueia, após, foram identificadas as carótidas de cada lado que se acham na parte posteroinferior da traqueia (Fig.3). Foi preciso individualizar cada artéria carótida comum para uma melhor manipulação e evitar lesão do nervo vago, mediante a dissecação e separação do vaso; que foi feita com uma sutura monofilamento de 5-0, esterilizada e úmida (para evitar o dano no endotélio vascular) e se

passou com muito cuidado embaixo da artéria de lado a lado que no mesmo tempo se estava elevando com a outra micropinça fazendo uma ponte para o passo da sutura. Após separação previa de cada artéria carótida comum, estas ficaram expostas e cuidadosamente foi colocado um clamp de aneurisma reto (5mm) em cada vaso com uma pinça atraumática, se verificou a oclusão de cada vaso sem compressão do nervo vago e se deixaram ocluídas durante 25 minutos. Depois da oclusão se aplicou uma gota de solução salina na incisão do animal para evitar o ressecamento dos tecidos durante o procedimento cirúrgico. Durante os 25 minutos o animal é deixado em uma plataforma de aquecimento (Kent Scientific), para evitar que o frio cause neuroproteção na lesão. Após os 25 minutos de isquemia foi retirado suavemente os clamps de cada carótida evitando o rompimento do vaso e finalmente realizada a síntese e sutura do animal e cuidando do que o animal fique estável em observação por uma hora e depois foram colocados nas suas respectivas gaiolas com água e comida branda.



**Figura 3.** Representação da dissecção feita para realização da técnica de BCCAO, afastando as glândulas e o músculo esterno-hióideo. Localização anatômica da traqueia, artérias carótidas comuns e nervo vago (Fonte própria).

### ***Avaliação neurológica***

O déficit neurológico de cada grupo foi avaliado 24 horas após a isquemia global transitória. Os animais foram colocados em uma caixa de fundo branco (26x11x40) e filmados (câmera Samsung, 8 megapixels, auto focus com smart stabilization) durante 5 minutos cada um. O escore do déficit neurológico usado, foi adaptado para o BCCAO de acordo com a escala Neurological Severity Score de Park (2014). Foi usada uma escala de 0–5, onde os animais eram classificados assim:

- 0 – Animais com movimentos normais espontâneos.
- 1 – Animais com ptose: em um olho ou em ambos.
- 2 – Animais com ataxia e/ou ptose.
- 3 – Animais com tremores e/ou ptose, ataxia.
- 4 – Animais com andar em círculos: com direção direita ou esquerda e/ou ptose, ataxia ou tremores.
- 5 – Animais que apresentavam diminuição dos níveis de consciência, no respondiam aos estímulos externos ou mortos.

Todas as avaliações neurológicas foram realizadas por um investigador que desconhecia os diferentes grupos.

### ***Análise macroscópica da área de infarto***

Após 24 horas de reperfusão da BCCAO, os cérebros foram cuidadosamente removidos e colocados em uma matriz de cérebro de camundongo (insight LTDA, Ribeirão Preto, SP, Brasil), o cérebro foi seccionado coronalmente em intervalos de 2 mm, aproximadamente 4 a 5 partes por cérebro. As secções foram imersas em uma mistura de TTC (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio) 2% em tampão fosfato salino (PBS) a 37°C durante 10 minutos. Após a coloração de TTC, a área de isquemia foi mostrada como um tecido branco (sem coloração) e o tecido adjacente apresentou uma cor vermelho (viável). Cortes seriados foram fotografados usando uma câmera digital (câmera 8 megapixels, auto focus com smart stabilization).

A área de isquemia foi mensurada com o programa Image Pro Plus. O total do infarto cerebral foi calculado como a percentagem da área isquêmica entre a área total do cérebro, mensurados por cada lado das 5 secções do cérebro obtidas de cada animal usando

programas estatísticos (Microsoft Excel e GraphPad Prism). Após a fixação, as secções foram montadas para coloração de H&E (De Brito Toscano *et al.*, 2016; Victoria *et al.*, 2017).

### ***Coleta de amostras***

As amostras foram processadas em técnicas histopatológicas de rotina, armazenadas em formol neutro tamponado (10%) para fixação, desidratadas em soluções alcoólicas de concentrações crescentes (80%, 90% e absoluto), e incorporadas em blocos de parafina que foram cortadas em secções de 4 mm, para ser coradas com hematoxilina-eosina (H&E) e usadas em imunohistoquímica. Também outros cérebros foram congelados a 80°C e usados para fazer ELISA, na detecção de citocinas, quimiocinas e BDNF.

### ***Avaliação microscópica da área de lesão***

Na avaliação morfológica foram cortados os cérebros em fatias coronais de 2 mm de espessura usando uma matriz (Insight LTDA, Ribeirão Preto, SP) e fixadas em formol tamponado. Secções de 4 µm foram obtidas após o processamento dos tecidos em incrustação de parafina e coloração com hematoxilina e eosina. Para análise morfológica, foram usados 20 campos de imagem em uma ampliação de X200 para cada camundongo e foram capturadas em uma câmera digital (JVC TK-1270/JCB) no microscópio (Nikon) usando um software específico para captura e processamento de imagem (Image Pro Plus), que também foi utilizado para quantificar as áreas representativas de necrose e a frequência dos neurônios isquêmicos. A porcentagem de áreas necróticas foi obtida pela proporção de área necrótica versus área total. A porcentagem da frequência de neurônios isquêmicos em torno de cavidades necróticas foi calculada com a aplicação de uma graticula de 25 acessos como descrito (De Brito Toscano *et al.*, 2016; Victoria *et al.*, 2017). Os valores foram representados como a porcentagem da proporção de pontos de interseção que coincidem com regiões de neurônios isquêmicos versus pontos de interseção totais para um animal. O hipocampo de cada animal foi analisado qualitativamente através de imagens de cada área (CA1, CA2, CA3, CA4 e o Giro dentado) em uma ampliação final de X200 e foram capturados em uma câmera digital (JVC TK-1270 / JCB) sob o microscópio (Nikon)

usando uma análise de programa específica e processamento de imagem Image Pro-Plus software, Media Cybernetics, EUA.

### ***Determinação de citocinas, quimiocinas e fator neurotrófico por ELISA sandwich***

Extratos de tecido cerebral (hemisfério esquerdo) foram obtidas de todos os grupos 24 horas após a isquemia e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, o tecido cerebral foi homogeneizado em uma solução de extração (100 mg de tecido por 1 ml de solução de extração) contendo 0,4 mol/L de NaCl, 0,05% de Tween<sup>TM</sup>20, 0,5% de albumina de soro bovino (BSA), 0,1 mmol/L de fluoreto fenilmetilsulfonilo, 0,1 mmol/L de cloreto de benzetônio, 10 mmol/L de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), e 20 KI aprotinina, utilizando o homogeneizador Ultra-Turrax (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA). O cérebro homogeneizado foi centrifugado a  $10.000\times g$  durante 1 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , o sobrenadante foi recolhido e rapidamente armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . As concentrações das quimiocinas: CXCL1, CCL3 e CCL5 foram determinados para o teste imunoenzimático Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA Sandwich). O ELISA foi realizado em placas de microtitulação (Nalge Nunc International, Roskilde, Dinamarca) onde primeiro se fez uma captura de anticorpos monoclonais específicos diluídos (anti-CCLI, CCL3 e CCL5) em  $27,5\mu\text{l}$  Ac/5ml de PBS, depois as placas foram seladas para evitar evaporação e incubadas durante a noite a  $4^{\circ}\text{C}$ . No dia seguinte, as placas foram lavadas três vezes e bloqueadas com  $10\mu\text{l}$  de solução de bloqueio (BSA/PBS) e em seguida cobertas e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente, lavadas três vezes novamente. Padrões e amostras foram adicionadas ( $50\mu\text{L}/\text{poço}$ ), após as placas foram bloqueadas, seladas e incubadas durante a noite a  $4^{\circ}\text{C}$ . Anticorpos específicos biotinizados foram adicionados a todos os poços ( $27,5\mu\text{l}$  Ab/5ml PBS), depois as placas foram lavadas três vezes, cobertas e incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes, cobertas e incubadas durante 20 minutos a temperatura ambiente com estreptavidina conjugada com peroxidase de rábano ( $25\mu$  estreptavidina-HRP/5 ml de PBS) e após, o conjugado não ligado foi removido por lavagem, três vezes. Finalmente a solução reagente do substrato O-fenilenodiamina (OPD), foi dissolvida em tampão de citrato-fosfato com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e adicionada nos poços até o desenvolvimento da cor, mantendo as placas fora da luz direta. A capacidade de absorção de todos os testes ELISA foi lida a 450nm com um

espectrofotômetro leitor de microplacas. As curvas padrão para quimiocinas que variam de 500 a 2000 pg/ml foram construídos por uma regressão de quatro parâmetros formulados e representada como uma curva linear (log-log). As concentrações de quimiocinas das amostras foram calculados com o programa SoftMax® Pro, (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, EUA). O BDNF foi detectado em de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA).

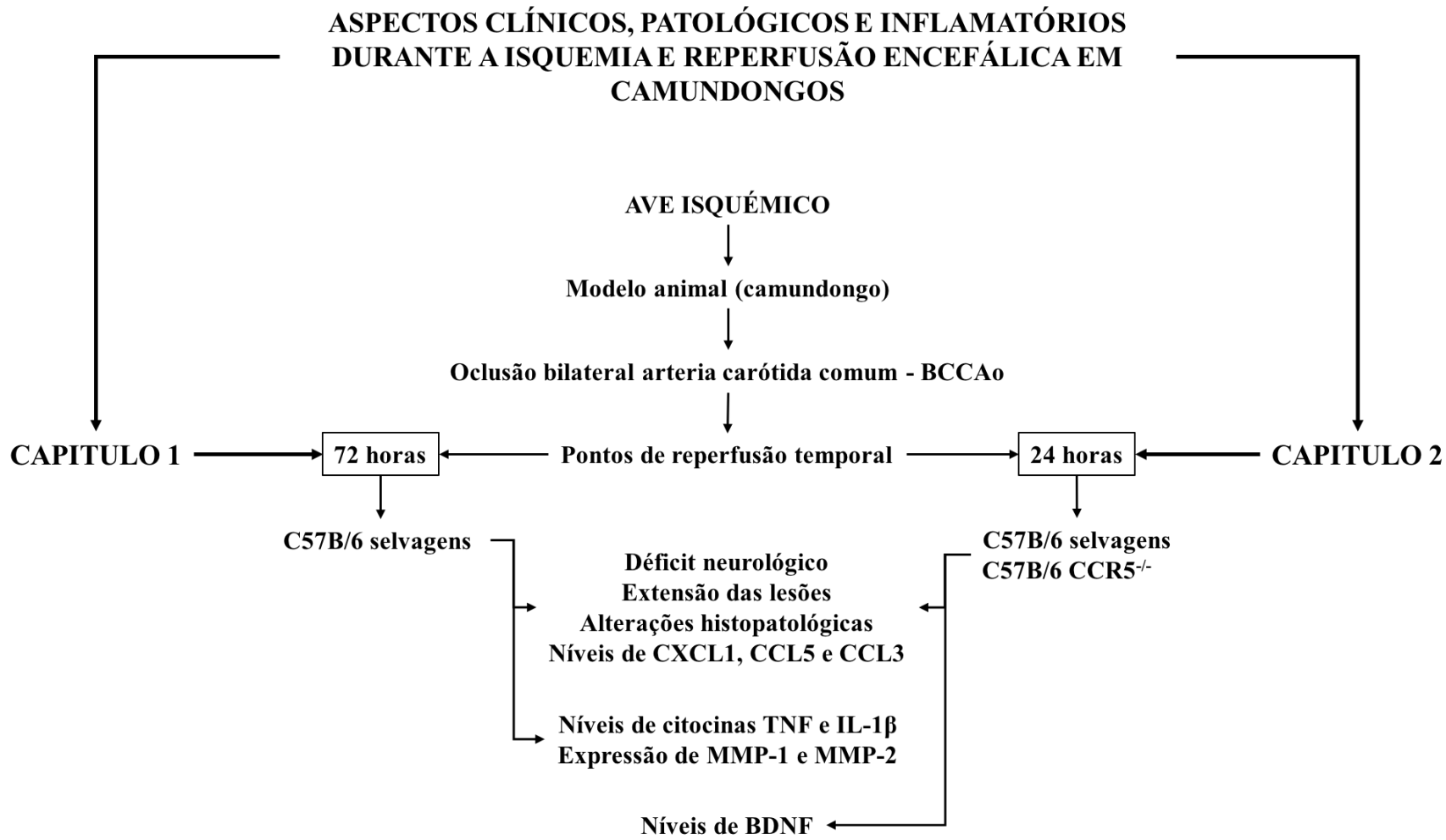
### ***Expressão imunohistoquímica de MMP-1 e MMP-2***

A expressão imuno-histoquímica de MMP-1 e MMP-2 foi quantificada através de morfometria digital (Prata et. al., 2016). Os cortes histológicos submetidos à reação imunohistoquímica anti MMP-1 e MMP-2 foram visualizados pela objetiva de 20X do microscópio Axiolab-Carl Zeiss (Oberkochen, Germany) e digitalizadas 40 imagens aleatórias (nas áreas de lesão isquêmica e seu perímetro) de cada camundongo, através da microcâmera Samsung SDC-415 (Seul, Coreia do Sul), perfazendo uma área total de  $1,73 \times 10^6 \mu\text{m}^2$  de parênquima encefálico analisado. As áreas de marcação MMP-1<sup>+</sup> e MMP-2<sup>+</sup> foram calculadas através de algoritmos construídos no programa KS300 (Carl Zeiss). Em cada imagem foram selecionados todos os pixels com tons de marrom (marcação imunohistoquímica positiva) para a criação de uma imagem binária, processamento digital e cálculo da área em  $\mu\text{m}^2$ .

### ***Análises estatísticas***

Todos os dados foram testados para a normalidade realizando o teste de Kolmorov-Smirnov. O teste t de Student ou a análise de variância (ANOVA) foram utilizados para dados normalmente distribuídos.

O teste de Mann-Whitney ou o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi realizado para variáveis não paramétricas. O teste pós-teste de Tukey foi usado para comparações múltiplas. Todas as análises foram realizadas usando o software GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, San Diego, CA, EUA). Os dados são apresentados como erro médio e padrão da média (SEM). Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.



**Figura 4.** Design experimental da tese



## 5. CAPITULO I

Os tratamentos atuais (trombectomia e anticoagulante) presentes no AVC são usados com frequência até 24 horas após a isquemia, porém quando é diagnosticada a tempo ajudam a diminuir as sequelas neurológicas na população tratada. Contudo, quando uma pessoa não é diagnosticada a tempo, o uso dos tratamentos não é efetivo e a mortalidade continua aumentando, precisando assim desenvolver tratamentos alternativos. Por este motivo é necessário estudar mais as consequências do AVC depois de 24 horas de reperfusão sanguínea, investigando novos alvos terapêuticos que possam ajudar como tratamentos.

O modelo murino escolhido para avaliar as consequências do AVC, é da isquemia e reperfusão cerebral global transitória, o qual tem sido amplamente utilizado na literatura para refletir como a maior fidelidade possível as lesões morfológicas e condições clínicas que causa o AVC em humanos, porém, nosso grupo de pesquisa tem adquirido e padronizado este modelo onde propõe avaliar a reperfusão de 72 horas do AVC, alterações neurológicas, aspectos patológicos, parâmetros imunes e alterações comportamentais após BCCAo transitória, ajudando na pesquisa de novos alvos neuroprotetores.

### *5.1 Objetivos Específicos*

- ✓ Déficit neurológico;
- ✓ Alterações histopatológicas presentes no cérebro;
- ✓ Extensão das lesões e frequência das alterações patológicas;
- ✓ Níveis cerebrais de citocinas TNF-alfa e IL-1 beta e de quimiocinas CXCL1, CCL5 e CCL3;
- ✓ Expressão “*in situ*” de metaloproteinases de matriz MMP1 e MMP2.

**INCREASED EXPRESSION OF METALLOPROTEINASE 1 DURING  
TRANSIENT GLOBAL BRAIN ISCHEMIA IN MICE**

Edna Constanza Gómez Victoria<sup>a</sup>, Fabrício Marcus Silva Oliveira<sup>c</sup>, Bárbara Andrade de Carvalho<sup>a</sup>, Eliana Cristina de Brito Toscano<sup>a</sup>, Marcelo Vidigal Caliari<sup>a</sup>, Antônio Lúcio Teixeira<sup>d</sup>, Aline Silva de Miranda<sup>b</sup>, Milene Alvarenga Rachid<sup>a,#</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Patologia Geral, <sup>b</sup>Departamento de Morfologia, <sup>c</sup>Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil, <sup>d</sup>Neuropsychiatry Program, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, School of Medicine, University of Texas Health Science Center at Houston, TX.

**Corresponding author:**

#Milene Alvarenga Rachid

Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Patologia Geral. Laboratório de Patologia Celular e Molecular.

Campus Pampulha, Av. Antônio Carlos 6.627 - Belo Horizonte, Minas Gerais.

Brazil. 31270-901

Tel/Fax: +55-31-34092878

E-mail address: milenerachid@gmail.com

## ***ABSTRACT***

The present study aimed to investigate the activation of metalloproteinase 1 after induction of global cerebral ischemia and reperfusion. Moreover, we evaluated the neurological deficits, pathological and inflammatory profiles. Post-ischemic neurological deficits following 25 min BCCA<sub>o</sub> were recorded 72 hours after reperfusion. After evaluation of neurological score, brains from sham and ischemic mice were removed and processed to evaluate pathological changes, immunoexpression of MMPs 1 and 2, and inflammatory mediators by ELISA. BCCA<sub>o</sub> promoted neurological deficits associated with hippocampal neuronal loss and formation of small cerebral cavities of necrosis surrounded by ischemic neurons. At the same time, brain levels of TNF, IL-1 $\beta$ , CXCL1 and CCL5 were increased in BCCA<sub>o</sub> group compared with the sham-operated group. The activity of MMP-1 and MMP-2 was analyzed in the injured area. Both metalloproteinases increased in the BCCA<sub>o</sub> group, compared with sham animals. Our results demonstrated the association of MMP-1 activation with neurological deficits, pathological changes and up-regulation of pro-inflammatory cytokines/chemokines following acute brain ischemia and reperfusion.

## ***INTRODUCTION***

Stroke is a frequent cause of long-term disability and death worldwide promoting substantial personal costs and reduced social participation. Patients with transient global ischemia usually had cardiac arrest or hypotension during surgeries and can lead to anxiety, serious cognitive impairment, and social deficits (Benjamin *et al.*, 2017; Klarić *et al.*, 2017).

Ischemic stroke is the most frequent type of stroke and can be caused by arterial occlusion by thrombus or embolus (Kim *et al.*, 2014; Sacco *et al.*, 2013). Brain tissue is sensitive to ischemia and after that can promote a complex sequence of events such as excitotoxicity, oxidative stress, inflammation and apoptosis (Woodruff *et al.*, 2011; Sanganalmath *et al.*, 2017). The subsequent inflammatory response is characterized by the production and release of pro-inflammatory chemokines and cytokines by activated cells including neurons, astrocytes, microglia, and endothelial cells, resulting in more neuronal and glial cell death during cerebral ischemia (Craft e Devries, 2006; Siniscalchi *et al.*, 2014). During the acute cerebral ischemia occurs activation of matrix metalloproteinases 2 and 9 leading to breakdown of the BBB, cerebral edema and inflammation (Sanganalmath *et al.*,

2017; Shadrina *et al.*, 2017). Recently, some authors described that MMP-1 polymorphisms may contribute to different subtypes of ischemic stroke susceptibility (Huang *et al.*, 2017). To the best of our knowledge, there are no studies about the participation of MMP-1 during acute phase of cerebral ischemia. Based on these findings, we aimed to evaluate the expression of metalloproteinases 1 and 2 associated with inflammatory and pathological changes after transient global cerebral ischemia.

## ***EXPERIMENTAL PROCEDURES***

### ***Experimental design***

Nine-to-eleven-week-old male wild-type (WT) C57BL/6 mice were used in these experiments. All mice were obtained from Animal Care Facilities of the Biological Science Institute ICB-UFMG, Belo Horizonte, Brazil. This work was approved by Animal Ethics Committee of Federal University of Minas Gerais (UFMG) (protocol number 209/2016). Mice were separated into two groups as follows: (1) WT sham-operated group, which underwent the sham operation (n=9); (2) WT ischemic group, which was subjected to transient bilateral common carotid artery occlusion (BCCA<sub>o</sub>) and reperfusion by 72 hours (n=11). All animals were weighed on a digital balance (Acculab) before surgery and 72 hours after reperfusion. They were euthanized with overdose injectable of anesthetic (Ketamine/Xylazine) intraperitoneally (IP). The brains were rapidly removed after evaluation of neurological deficit.

### ***Bilateral Common Carotid Artery Occlusion (BCCA<sub>o</sub>)***

Transient global cerebral ischemia was induced to WT ischemic group by BCCA<sub>o</sub> as previously described (Costa Silva *et al.*, 2015; De Brito Toscano *et al.*, 2016; Victoria *et al.*, 2017). Brain ischemia was induced by bilateral occlusion of the common carotid arteries, as briefly explained, a median posterior longitudinal cervicotomy was started for direct exposure of the common carotid arteries and individualized for occlusion with a straight aneurysm clamp (5 mm) without compression of the vagus nerve and allowed to remain occluded for 25 minutes. The surgical procedure was performed on a heating mantle with all animals spontaneously breathing. After each clamp is gently removed avoiding the rupture of the vessel and checking for reperfusion, finally the synthesis and suture are performed.

Mice were placed in a warm environment for approximately 1 h, and then returned to their home cages and accommodated individually with free access to water and soft food.

### ***Neurological score***

The neurological deficit scores were assigned 72 hours after transient BCCAO for each group as a means of assessing the adequacy of occlusion. Deficit scores were evaluated according to the scale modified Neurological Severity Score (Victoria *et al.*, 2017): 0, no deficit; 1, ptosis; 2, ptosis and/or ataxia; 3, ptosis, ataxia and/or body swing; 4, mouse persistently walks in circles; 5, mouse dies after recovery from the anesthesia. All mice were filmed for 5 minutes to subsequent analysis were performed by a researcher blinded to the group status.

### ***Sample processing***

After euthanasia of all mice, each brain was removed. The brains from BCCAO (n=6) and sham (n=5) groups were fixed in 10% neutral buffered formalin for TTC analysis. After that samples were embedded in paraffin for infarct area analysis, for hematoxylin and eosin stain and for immunohistochemistry. In the other mice from the BCCAO group (n=5) and sham-operated group (n=4), the brains were frozen and stored at -80°C for detection of cytokines by sandwich ELISA.

### ***TTC***

The brain from each mouse was then cut into 2-mm-thick slices and stained with 2% solution of TTC (2,3,5- triphenyltetrazoliumchloride, Sigma, St. Louis, MO, USA) in saline solution (pH 7.4) for 20 minutes at 37°C until visualization of ischemic infarction. Subsequent, the slices were immersed in 4% formalin to enhance the contrast of the stain for 24 hours. Photographs of slices were taken on two sides of each slice and after using a software analysis and image processing (Image-Pro plus 7, Media Cybernetics, USA) the cerebral infarction was calculated by the ratio of infarct area versus total area for each slice and then added all the slices of each mouse to find the total area of infarction (De Brito Toscano *et al.*, 2016; Victoria *et al.*, 2017).

### ***Assessment of histopathology and morphometry***

Brain coronal slices of 2 mm in thickness were cut using a mouse brain slicer matrix (Insight LTDA, Ribeirão Preto, SP, Brazil) and fixed in buffered formalin. Sections of 4 $\mu$ m were obtained after tissue processing by paraffin embedding and staining with hematoxylin and eosin. For morphometric analysis, 20 image fields for each animal at a final magnification of x200 were captured on a digital camera (JVC TK-1270/JCB) under the microscope (Nikon) using a specific program analysis. Image processing Image Pro Plus software version 7.1 was used to quantify the representative areas of necrosis and the volume ratio ischemic neurons. The percentage of necrotic areas was obtained by the ratio of necrotic area versus total area. The percentage of ischemic neurons around necrotic cavities was calculated with the application of a graticule of 25 hits as described (De Brito Toscano *et al.*, 2016; Victoria *et al.*, 2017). The values were represented as the percentage of the ratio of intersection points coinciding ischemic neurons regions versus total intersection points for an animal. The hippocampus of each animal was analyzed qualitatively through images of each area (CA1, CA2, CA3, CA4 and dentate gyrus) at a final magnification of x200 and were captured on a digital camera (JVC TK-1270 / JCB) under the microscope (Nikon) using a specific program analysis and image processing Image Pro-Plus software version 7.1, Media Cybernetics, USA.

### ***Immunohistochemistry for MMP-1 and MPP-2***

Immunohistochemical staining was made with the histological sections obtained from collected brains. These were cuts and dewaxed in xylol, dehydrated in alcoholic solutions of decreasing concentrations and washed in PBS pH 7.2. Subsequently, antigenic re-uptake was performed with a Dako Retrieval solution (Dako, California, USA) at 100°C for 20 minutes. Endogenous peroxidase activity was eliminated by incubating in 40 ml of PBS with 0.2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution for 20 minutes and the non-specific binding sites blocked by incubating the sections with the Ultra V-Block reagent (Thermo Scientific®, Massachusetts, USA) for 40 minutes. Then, the composites are incubated with anti-MMP-1, anti-MMP-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) monoclonal antibody diluted 1:50 for 18 hours. Subsequently the cuts were washed with PBS and incubate for 1 hour with biotinylated goat anti-mouse IgG, diluted 1:50 (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA) Then cuts were incubated with streptavidin conjugated with peroxidase (Zymed Laboratories Inc., San

Francisco, USA) diluted 1:50 for 1 hour. A labeling was detected in 0.05% diaminobenzidine solution in 40% v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As a negative control, antibody 1 was replaced by PBS in some of these cuts. All composites counterstained with Harris hematoxylin for 2 seconds, hydrated and diaphanized for entelan assembly.

The immunohistochemical expression of MMP-1 and MMP-2 was quantified by digital morphometry (Prata *et al.*, 2017). The histological sections submitted to the anti-MMP-1 and MMP-2, immunohistochemical reaction were visualized by the 20X objective of the Axiolab-Carl Zeiss microscope (Oberkochen, Germany) and scanned 40 random images (in the areas of ischemic lesion and its perimeter) of each mouse, through the Samsung SDC-415 micro-camera (Seoul, South Korea), making a total area of 1.73 x 10<sup>6</sup> μm<sup>2</sup> of analyzed brain parenchyma. The marking areas MMP-1<sup>+</sup> and MMP-2<sup>+</sup> were calculated using algorithms constructed in the KS300 program (Carl Zeiss). In each image, all pixels with brown tones (positive immunohistochemical marking) were selected for the creation of a binary image, digital processing and area calculation in μm<sup>2</sup>.

### ***Enzyme-linked immunosorbent assay of chemokines and cytokines***

For ELISA analysis after 72h of reperfusion in group BCCAO and group which underwent the sham operation, the brains were stored at -80°C. Then brain homogenates were obtained using in an extraction solution (100 mg of tissue per 1 mL of extraction solution) containing 0.4 mol/L NaCl, 0.05% Tween™ 20, 0.5% bovine serum albumin (BSA), 0.1 mmol/L phenylmethyl sulfonyl fluoride, 0.1 mmol/L benzethonium chloride, 10 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and 20 UI aprotinin, using Ultra-Turrax (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). After, samples were centrifuged at 3000×g for 10 min at 4°C, and the supernatant was collected and stored at -20°C. Concentrations of cytokines: tumor necrosis factor alpha (TNF), interleukin 1 beta (IL-1β) and chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1), chemokine (CC motif) ligand 3 (CCL3), chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5) were measured using an ELISA test. The samples were assayed in an ELISA setup using commercially available antibodies, according to the manufacturer's procedures (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) (De Brito Toscano *et al.*, 2016; Victoria *et al.*, 2017).

## ***Statistics***

All values were expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical significance was assumed for all values of  $p < 0.05$ . Means were compared using the t-test. All analyses were performed using GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, San Diego, CA, USA).

## ***RESULTS***

### ***Neurological deficits and Infarct size***

The sham-operated group did not present any neurological deficit. The ischemic animals exhibited ptosis and ataxia (Fig.1). No gross morphological changes were visualized from brains of sham group (Fig.2A). The ischemia induced by BCCAO was confirmed by TTC and showed specific lesions in the cerebral cortex, hippocampus and striatum (Fig. 2B).

### ***Histopathological changes***

No histopathological changes were visualized in the sham group. The ischemic animals showed small focal cavities (core) surrounded by ischemic neurons (penumbra), which had shrunken and triangulated cell bodies, eosinophilic cytoplasm, and pyknotic nuclei. Those changes were mainly observed in the gray matter of the cortex, striatum, and hippocampus. Moreover, ischemic neurons were also present in CA1 and CA3 regions of the hippocampus (Fig.3).

### ***Expression of pro-inflammatory cytokines and chemokines***

To evaluate the expression of pro-inflammatory molecules after 72h of reperfusion in cerebral ischemia, we measured the levels of cytokines TNF, IL-1 $\beta$  and chemokines CXCL1, CCL5, CCL3. The brain expression of TNF, IL-1 $\beta$ , CXCL1 and CCL5 was significantly increased in BCCAO group compared with WT sham-operated animals. Similar levels of CCL3 were observed in both sham-operated and BCCAO groups (Fig.4).



### ***MMP-1 and MMP-2 expressions***

The expression of MMP-2 was used as a control of MMP-1 activation, since its expression has been studied during acute cerebral ischemia. MMP-1 and MMP-2 immunopositive vessels were detected throughout the brain tissue, mainly around cerebral lesions (Fig.5A-D). Secreted MMP-1 and MMP-2 measured by digital morphometry showed higher levels in the ischemic mice compared to the control group (Fig.6).

## **DISCUSSION**

The neurological deficits were associated with pathological alterations found in the brain tissue as the infarct area and morphological changes characteristic of ischemia. It was also shown that the increase of expression of inflammatory factors as TNF, IL-1 $\beta$  cytokines, CCL5, CXCL1 chemokines and MMP-1, MMP-2 metalloproteinases are working together in the process of ischemic injury after 72 hours of reperfusion.

Modified neurological tests evaluate the functional deficits after the induction of ischemia and aid in confirming the ischemic injury in rodent models (Schaar et al., 2010; Park et al., 2014). In the present study, we found ptosis and ataxia after 72 hours of ischemic brain. We previously showed neurological deficits such as ptosis and ataxia as the first signs of neurological damage after 24 hours of global brain ischemia (De Brito Toscano *et al.*, 2016; Victoria *et al.*, 2017). In humans, acute stroke is typically characterized by the sudden onset of a focal neurologic deficit, include ataxia (Van Der Worp e Van Gijn, 2007) and ptosis that occurred after midbrain infarct, as characteristic clinical sign (Kim et al., 2013).

In animal models of stroke, weight loss is rapid and deep in rodents lose 20% of body weight within a few days after transient occlusion of the middle cerebral artery. Patients with stroke lose weight principally in muscle (sarcopenia) due to paresis and reduced physical activity (Dirnagl, 2012). The weight loss observed in BCCAO animals has been reported to be the first indication of extent and severity of ischemic injury just after induction of stroke (Park et al., 2014). This finding may be observed as clinical effect for a number of factors (dysregulation of appetite, inactivity, fever and paralysis) and pathophysiological mechanisms (neuroendocrine sympathetic activation, pro-inflammatory cytokines and oxygen-free radical accumulation) that may be abnormally activated or impaired after stroke

(Scherbakov et al., 2011). As pathophysiological mechanisms after stroke are the pro-inflammatory cytokines are necessary in the progression of brain injury, IL-1 $\beta$ , IL-8, CCL2 and TNF appear to exacerbate cerebral injury because peripheral immune cells are stimulated, and subsequently, the inflammatory cascade is triggered (Jin et al., 2010; An et al., 2014; Siniscalchi et al., 2014). TNF and IL-1 $\beta$  pro-inflammatory cytokines often work synergistically (Kim et al., 2014) to suppress food intake (Buchanan e Johnson, 2007). IL-1 $\beta$  is the predominant pro-inflammatory cytokine in the brain and plays an important role in ischemic brain injury, that might promote the development of uncontrolled inflammation or tissue remodeling (Dinarello, 2009; An et al., 2014; Kim et al., 2014; Wu et al., 2014). IL-1 $\beta$ -deficient mice presented smaller infarcts in comparison with wild-type mice (Siniscalchi et al., 2014) and the administration of anti-IL-1 $\beta$  antibody has been effective in treating some neurodegenerative diseases (Ito et al., 2015). TNF might be a major initiator of inflammation, is a pleiotropic cytokine that is rapidly upregulated in the brain after injury and maybe the first cytokine to induce the downstream expression of IL-1 $\beta$  (Wu et al., 2014).

Chemokine production stimulates chemotaxis of inflammatory cells into the ischemic lesion (Kim et al., 2014). We observed an increase in the expression of chemokines CXCL1 and CCL5 in BCCAO group. In response to cerebral ischemic injury, damaged CNS cells secrete a variety of chemokines, such as CCL3 and CCL5 (An et al., 2014). CCL3 is associated with monocyte recruitment and microglial activation, exacerbating cerebral ischemic injury. Intracerebroventricular injection of CCL3 increased infarct volume following transient focal ischemia in rats. Moreover, CCL3 aggravates cerebral ischemic injury (An et al., 2014). CCL5 is a potent pro-inflammatory chemokine involved in brain injury after stroke and is associated with leukocyte infiltration. In a rat model of focal ischemia reveals numerous T cells infiltrated the border zone around the infarct by day 3, and the number of infiltrating T cells increased further between days 3 and 7 (Jin et al., 2010). We previously demonstrated that deficient mice for the CCL5 receptor (CCR5<sup>-/-</sup>) had lower infarct area after 24h of BCCAO (Victoria *et al.*, 2017). Moreover, CCL5 knockout mice promoted reduction in infarct lesion and improvement of BBB function following focal cerebral ischemia (An et al., 2014).

CXCL1 is one of the chemokines that released after ischemic injury and act on neutrophils to initiate recruitment and activation (Jickling et al., 2015). Astrocytes, microglia, and neutrophils can respond to cytokines such TNF and IL-1 $\beta$  and these cells could be

potential sources of CXCL1 local production in stroke, because CXCL1 also have the ability of interact with cytokines and adhesion molecules expressed after stroke and suggest that may potentially act (Losy et al., 2005). The presence of certain cytokines such as TNF and IL-1 $\beta$  stimulates MMPs production (Sanganalmath et al., 2017). MMPs have many roles in the CNS from the remodeling of tissues during development to a critical role in multiple phases of neuroinflammation. Glial cells and neurons produce MMPs, but the types of MMPs and the stimuli that induce the MMPs are different for the various cell types (Rosenberg e Mun-Bryce, 2004, Chen *et al.*, 2017). Supportive in this study, we found an increase in the production of MMP-1 and MMP-2 in the brain tissue of mice after BCCAO. Currently, have not studies about MMP-1 activity in brain damage after global ischemia in mice. Low MMP-1 expression occurs mostly during development in humans and under physiological conditions. Otherwise, its expression is upregulated in inflammatory conditions and autoimmune diseases (Cui et al., 2017). In murine/rat model systems of human disease has been shown to be expressed under conditions of inflammation and cancer (Brinckerhoff, 2017). The MMP-1 expression is amplified by inflammatory cytokines such as TNF and IL-1 (Cui et al., 2017). Astrocytes released MMP-1 when stimulated by IL-1 $\beta$  (Rosenberg e Mun-Bryce, 2004). Pathological studies demonstrated that MMP-2 levels are higher in patients with lacunar strokes (Chang et al., 2016). Some researchers demonstrated that the activity of MMP-2 increased in the late phase of ischemic stroke suggesting that it plays a neuroprotective role within the ischemic core (Chang et al., 2016).

In conclusion, the acute transient brain ischemia promoted increased activity of MMP-1 and MMP-2 associated with up-regulation of pro-inflammatory cytokines as TNF and IL-1 $\beta$  and chemokines CCL5 and CXCL1 leading to pathological changes and neurological alterations. Further studies are needed to better understand the participation of MMP-1 during pathophysiologic mechanisms of reperfusion injury.

### **Acknowledgments**

We are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for their financial support.

## References

AN, C. et al. Molecular dialogs between the ischemic brain and the peripheral immune system: dualistic roles in injury and repair. **Progress in Neurobiology**, v. 115, p. 6-24, Apr 2014. ISSN 1873-5118 (Electronic) 0301-0082 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24374228> >.

BENJAMIN, E. J. et al. Heart disease and stroke statistics—2017 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 135, n. 10, p. e146-e603, 2017. ISSN 0009-7322.

BRINCKERHOFF, C. E. 9. Matrix Metalloproteinases (MMPs) as Therapeutic Targets. In: (Ed.). **Matrix Metalloproteinases in Health and Disease: Sculpting the Human Body**: World Scientific, 2017. p.227-251.

BUCHANAN, J. B.; JOHNSON, R. W. Regulation of food intake by inflammatory cytokines in the brain. **Neuroendocrinology**, v. 86, n. 3, p. 183-190, 2007. ISSN 1423-0194.

CHANG, J. J.; STANFILL, A.; POURMOTABBED, T. The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in ischemic stroke. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 8, p. 1323, 2016.

CHEN, S. et al. Gelatinase activity imaged by activatable cell-penetrating peptides in cell-based and in vivo models of stroke. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 37, n. 1, p. 188-200, 2017. ISSN 0271-678X.

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. ISSN 1567-2026.

CRAFT, T. K. S.; DEVRIES, A. C. Role of IL-1 in Poststroke Depressive-like Behavior in Mice. **Biological Psychiatry**, v. 60, n. 8, p. 812-818, 2006/10/15/ 2006. ISSN 0006-3223. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006322306003763> >.

CUI, N.; HU, M.; KHALIL, R. A. Chapter One - Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. In: KHALIL, R. A. (Ed.). **Progress in Molecular Biology and Translational Science**: Academic Press, v.147, 2017. p.1-73. ISBN 1877-1173.

DE BRITO TOSCANO, E. C. et al. Platelet-activating factor receptor (PAFR) plays a crucial role in experimental global cerebral ischemia and reperfusion. **Brain Research Bulletin**, v. 124, p. 55-61, Mar 31 2016. ISSN 1873-2747 (Electronic) 0361-9230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27040712> >.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 $\beta$  and the autoinflammatory diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 23, p. 2467-2470, 2009. ISSN 0028-4793.

DIRNAGL, U. Pathobiology of injury after stroke: the neurovascular unit and beyond. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1268, p. 21-5, Sep 2012. ISSN 1749-6632 (Electronic) 0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22994217> >.

HUANG, X.-Y. et al. Association of Matrix Metalloproteinase-1 and Matrix Metalloproteinase-3 Gene Variants with Ischemic Stroke and Its Subtype. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 26, n. 2, p. 368-375, 2017  
ISSN 1052-3057. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.09.034> >. Acesso em: 2017/10/29.

ITO, M. et al. Bruton's tyrosine kinase is essential for NLRP3 inflammasome activation and contributes to ischaemic brain injury. **Nature communications**, v. 6, 2015.

JICKLING, G. C. et al. Targeting neutrophils in ischemic stroke: translational insights from experimental studies. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 35, n. 6, p. 888-901, 2015. ISSN 0271-678X.

JIN, R.; YANG, G.; LI, G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 87, n. 5, p. 779-89, May 2010. ISSN 1938-3673 (Electronic) 0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20130219> >.

KIM, J. Y.; KAWABORI, M.; YENARI, M. A. Innate inflammatory responses in stroke: mechanisms and potential therapeutic targets. **Current medicinal chemistry**, v. 21, n. 18, p. 2076-2097, 2014. ISSN 0929-8673.

KIM, S. Y. et al. Management of severe bilateral ptosis in a patient with midbrain infarction: a case report. **Annals of rehabilitation medicine**, v. 37, n. 6, p. 891-895, 2013. ISSN 2234-0645.

KLARIĆ, T. S. et al. Alterations in anxiety and social behaviour in Npas4 deficient mice following photochemically-induced focal cortical stroke. **Behavioural Brain Research**, v. 316, n. Supplement C, p. 29-37, 2017/01/01/ 2017. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016643281630568X> >.

LOSY, J.; ZAREMBA, J.; SKROBANSKI, P. CXCL1 (GRO-alpha) chemokine in acute ischaemic stroke patients. **Folia Neuropathologica**, v. 43, n. 2, p. 97, 2005. ISSN 1641-4640.

PARK, S.-Y. et al. A Method for Generate a Mouse Model of Stroke: Evaluation of Parameters for Blood Flow, Behavior, and Survival. **Experimental neurobiology**, v. 23, n. 1, p. 104-114, 2014. ISSN 1226-2560.

PRATA, L. O. et al. ACE2 activator associated with physical exercise potentiates the reduction of pulmonary fibrosis. **Experimental Biology and Medicine**, v. 242, n. 1, p. 8-21, 2017. ISSN 1535-3702.

ROSENBERG, G.; MUN-BRYCE, S. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. In: (Ed.). **Neuroinflammation in Stroke**: Springer, 2004. p.1-16.

SACCO, R. L. et al. An updated definition of stroke for the 21st century a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke**, v. 44, n. 7, p. 2064-2089, 2013. ISSN 0039-2499.

SANGANALMATH, S. K. et al. Global cerebral ischemia due to circulatory arrest: insights into cellular pathophysiology and diagnostic modalities. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 426, n. 1, p. 111-127, February 01 2017. ISSN 1573-4919. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2885-9> >.

SCHAAR, K. L.; BRENNEMAN, M. M.; SAVITZ, S. I. Functional assessments in the rodent stroke model. **Experimental & Translational Stroke Medicine**, v. 2, n. 1, p. 13, 2010. ISSN 2040-7378 (Electronic)  
2040-7378 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20642841> >.

SCHERBAKOV, N.; DIRNAGL, U.; DOEHNER, W. Body weight after stroke: lessons from the obesity paradox. **Stroke**, v. 42, n. 12, p. 3646-50, Dec 2011. ISSN 1524-4628 (Electronic)  
0039-2499 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21960580> >.

SHADRINA, A. et al. Polymorphism of Matrix Metalloproteinases Genes MMP1, MMP2, MMP3, and MMP7 and the Risk of Varicose Veins of Lower Extremities. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, p. 1-5, 2017. ISSN 0007-4888.

SINISCALCHI, A. et al. Cerebral stroke injury: the role of cytokines and brain inflammation. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 25, n. 2, p. 131-137, May 1 2014. ISSN 2191-0286 (Electronic) 0792-6855 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24515999> >.

VAN DER WORP, H. B.; VAN GIJN, J. Acute ischemic stroke. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 6, p. 572-579, 2007. ISSN 0028-4793.

VICTORIA, E. et al. Knockdown of CC chemokine receptor 5 (CCR5) is protective against cerebral ischemia and reperfusion injury. **Current neurovascular research**, 2017. ISSN 1875-5739.

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.

WU, L. et al. Inflammatory response and neuronal necrosis in rats with cerebral ischemia. **Neural Regeneration research**, v. 9, n. 19, p. 1753-1762, Oct 1 2014. ISSN 1673-5374 (Print) 1673-5374 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25422636> >.



## Legends:

**Figure 1.** (A) Percentage of weight loss in grams for groups ( $p < 0.009$ ) and (B) Neurological deficit score presented at 72 hours after reperfusion. Values are the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Animals per group: BCCAO ( $n=11$ ) and Sham ( $n=9$ ).

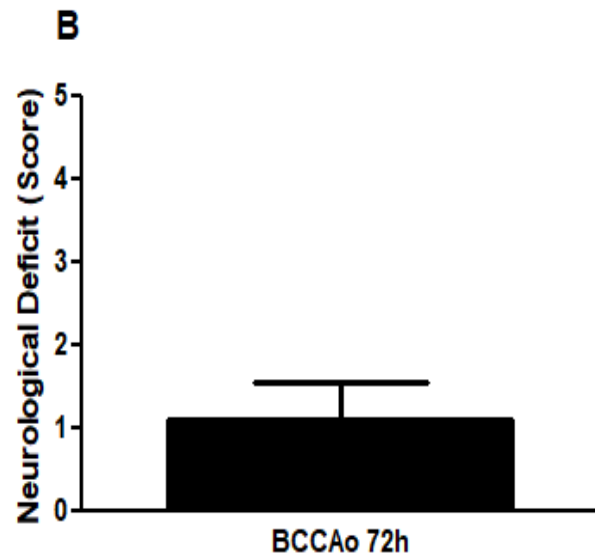
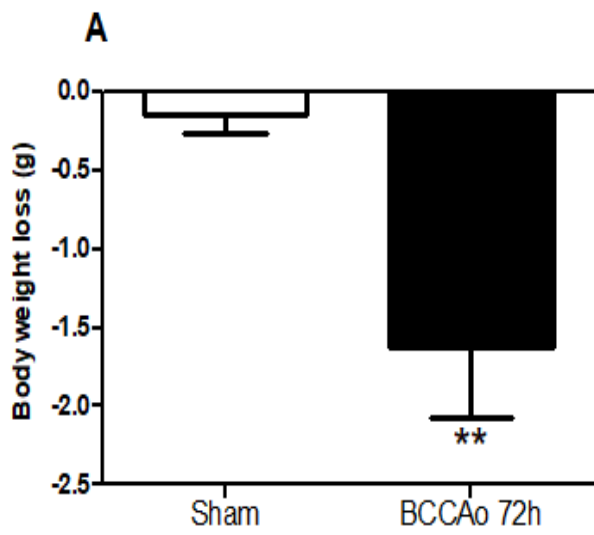
**Figure 2.** 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining to delineate mouse brain infarcts of bilateral carotid common artery occlusion-induced global cerebral ischemia. Representative images of each group. Sham group (A) and cerebral ischemia-reperfusion group (B) at 72 hours after reperfusion. (C) Percentage of infarct area in BCCAO group. Values are the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Animals per group: BCCAO ( $n=6$ ) and Sham ( $n=5$ ).

**Figure 3.** Histopathological changes presented in subacute brain stroke. Representative images of each group. A-B. Sham-operated animal showing normal histological cerebral cortex. C-D. BCCAO induced mice exhibiting necrotic cavities. E-F. Sham-operated mouse: hippocampus with normal neurons in CA region. G-H. BCCAO animal showing round and shrunken cells in CA region of hippocampus. Magnification: A, C, E, G:  $\times 200$ ; B, D, F, H:  $\times 400$ . Animals per group BCCAO ( $n=6$ ) and Sham ( $n=5$ ).

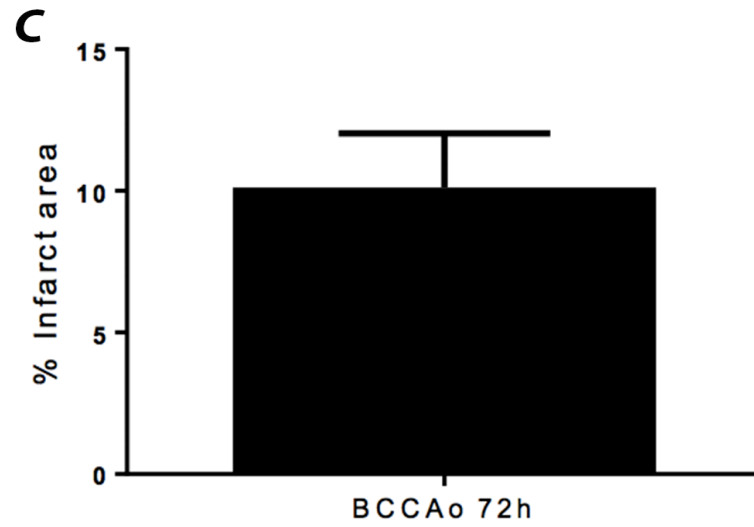
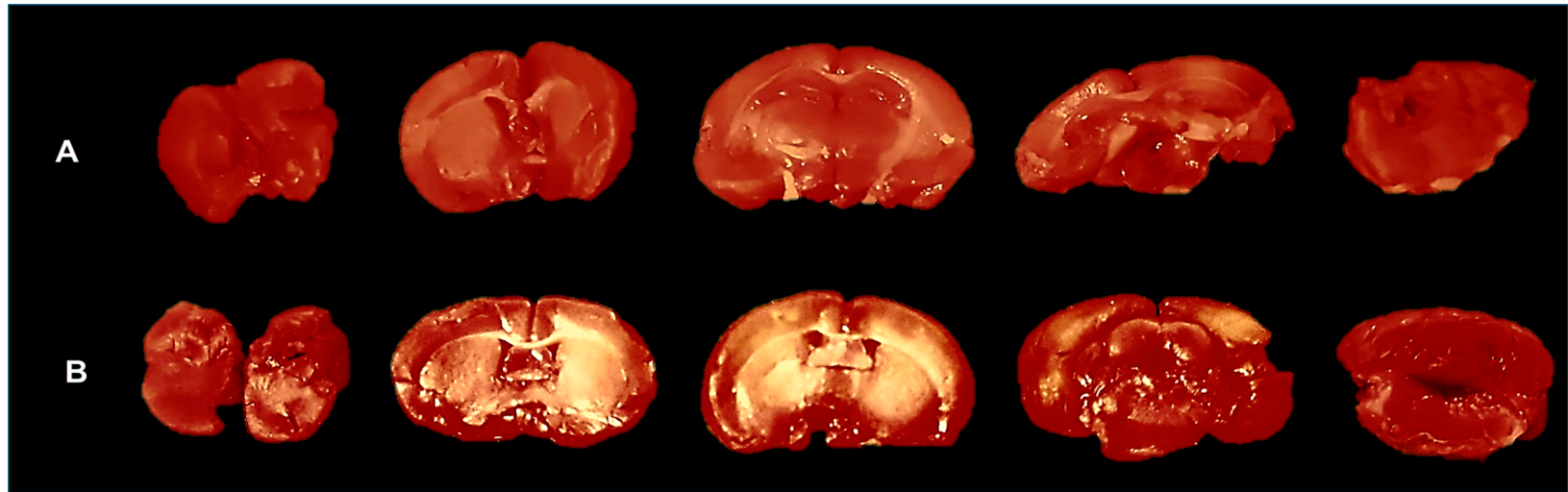
**Figure 4.** Brain expression of cytokines and chemokines during subacute brain stroke A. TNF and B. IL-1 $\beta$ ; C. CXCL1, D. CCL5, E. CCL3. Asterisk indicate statistical differences where  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.001$ , BCCAO versus Sham. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. Animals per group BCCAO ( $n=6$ ) and Sham ( $n=5$ ).

**Figure 5.** Immunohistochemical analysis of MMP-1 (A-B) and MMP-2 (C-D) expression in BCCAO animals. Representative images show the immunohistochemistry results for immunoreactivity in the brain. Brown staining indicated a positive reaction with the respective antibody. Original magnification  $\times 200$  (A-C),  $\times 400$  (B-D). Immunohistochemical morphometry of MMP-1 and MMP-2 expression in BCCAO and Sham groups.

**Figure 6.** Brain expression of of MMP-1 and MMP-2. Asterisk indicate statistical differences where \* $p < 0.03$ , \*\* $p < 0.001$ . Values are the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Animals per group  $n=6$  (BCCAO),  $n=5$  (Sham).

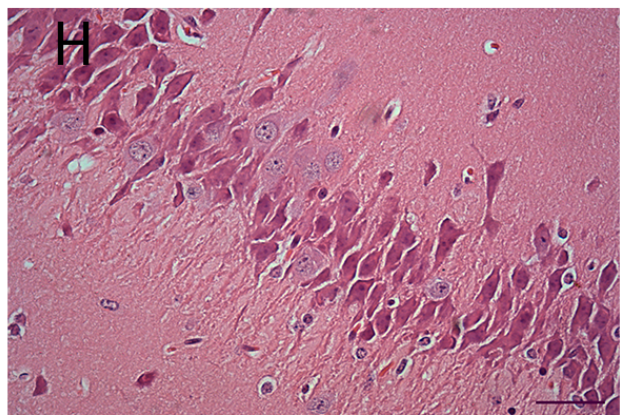
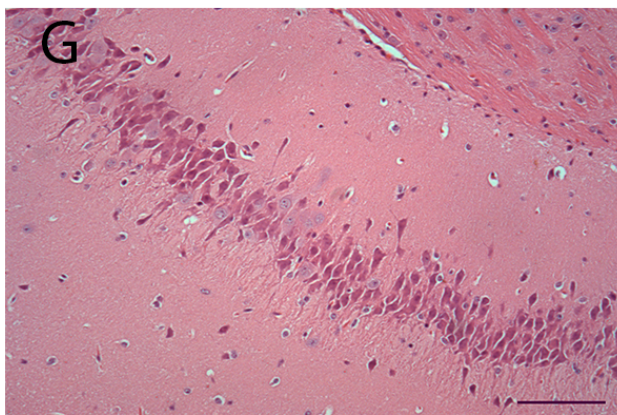
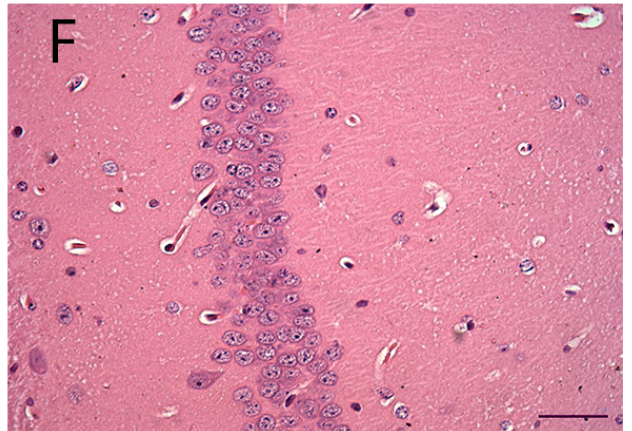
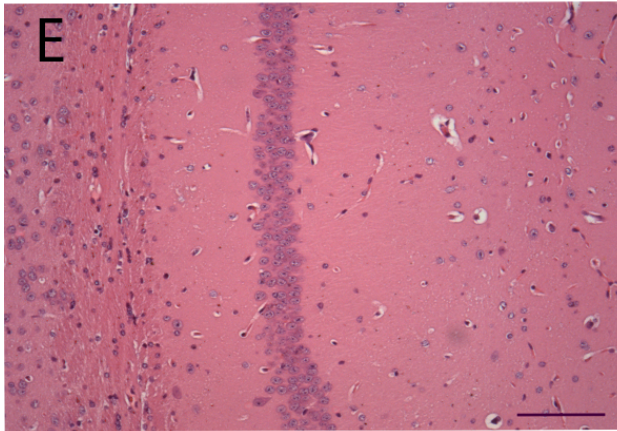
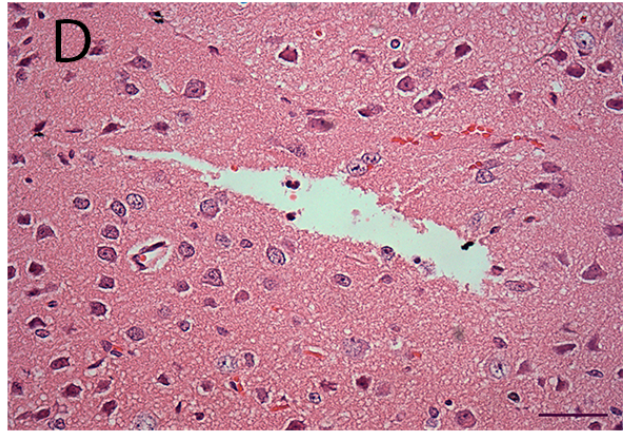
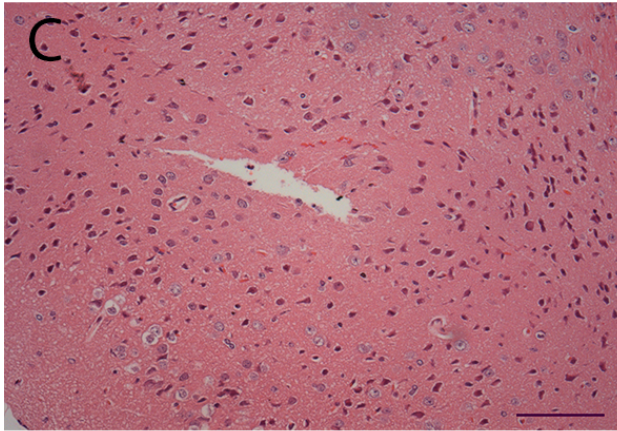
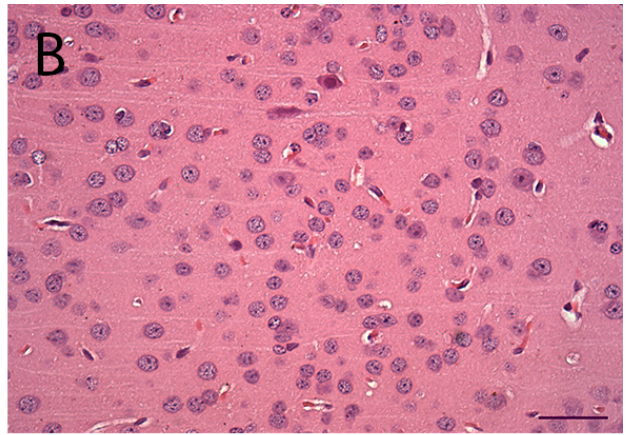
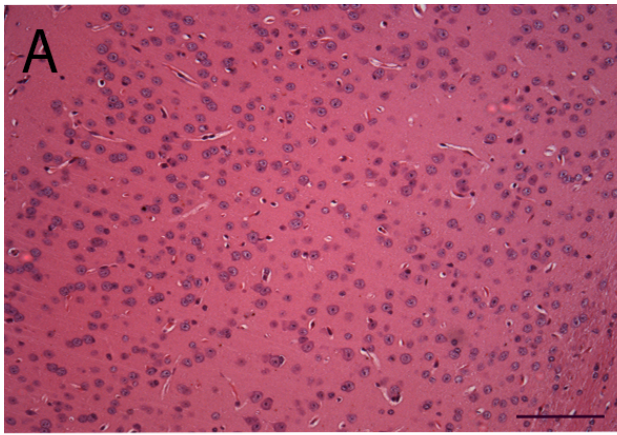


1

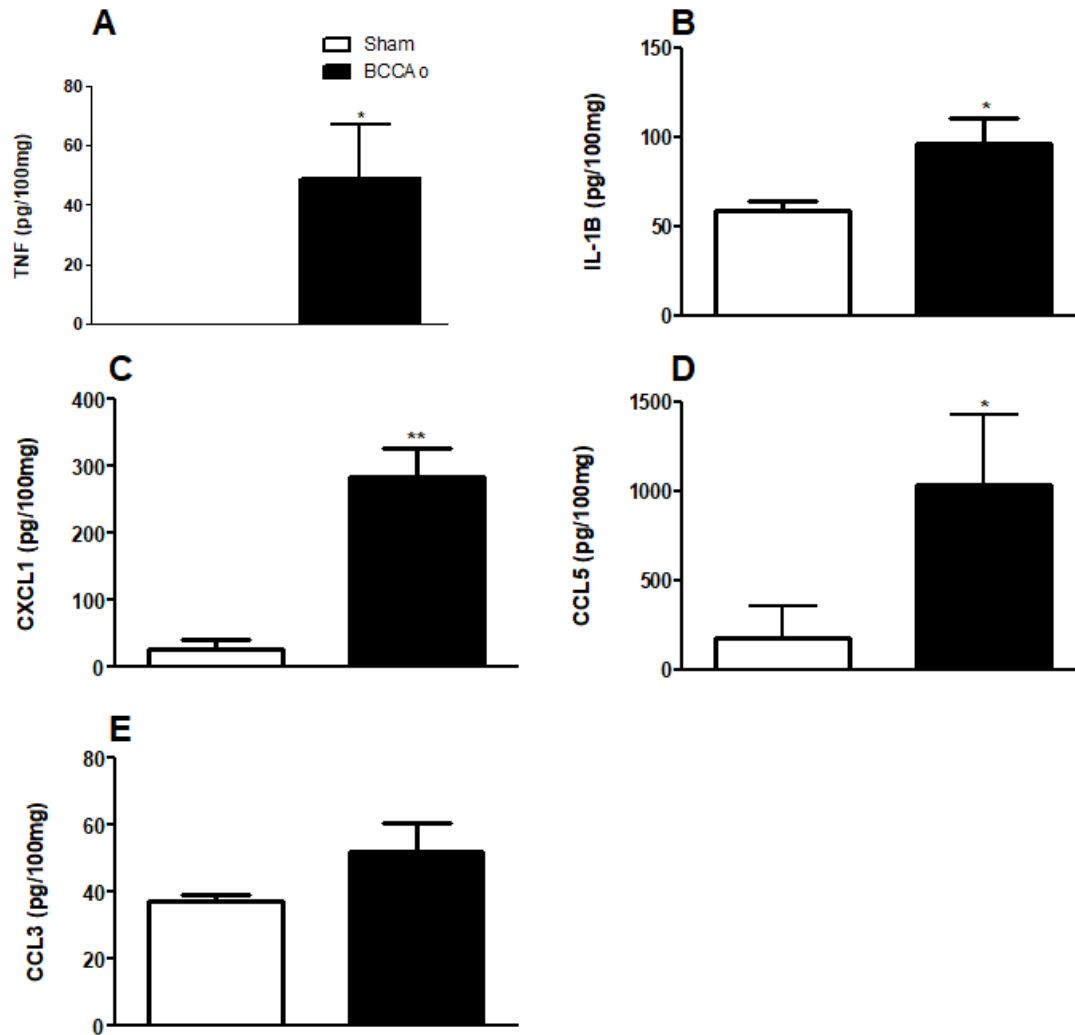


2

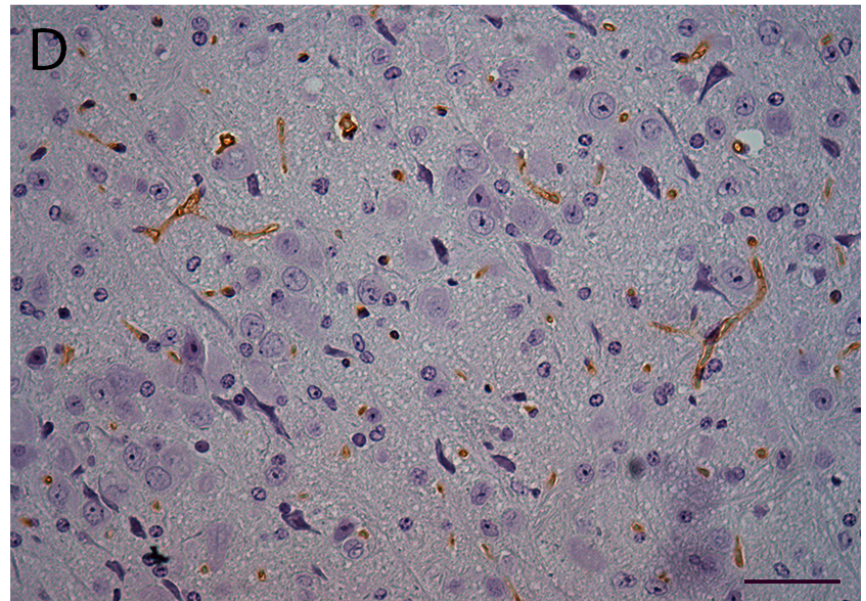
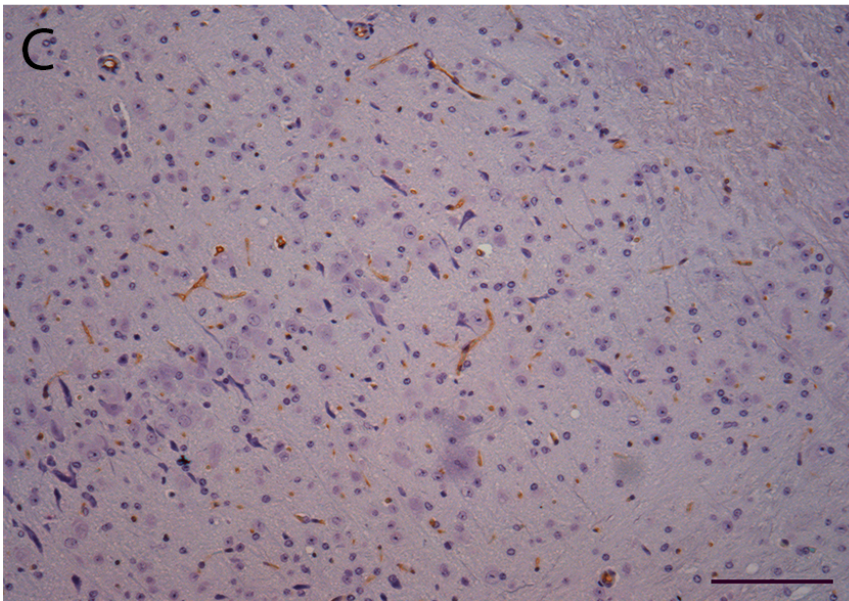
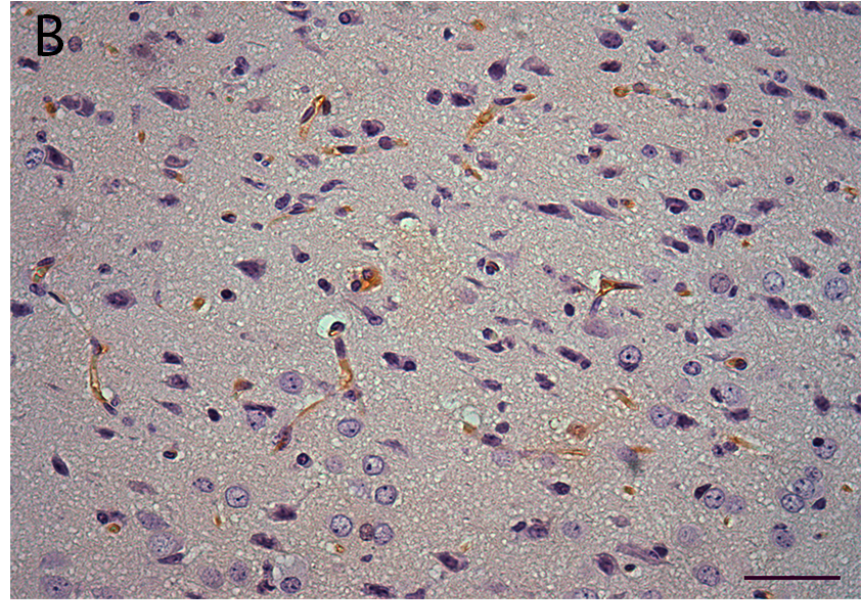
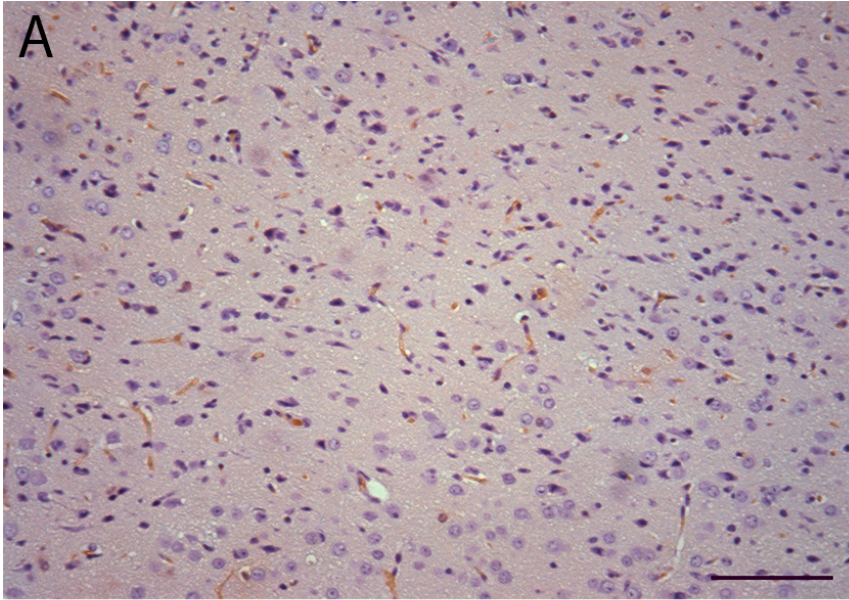


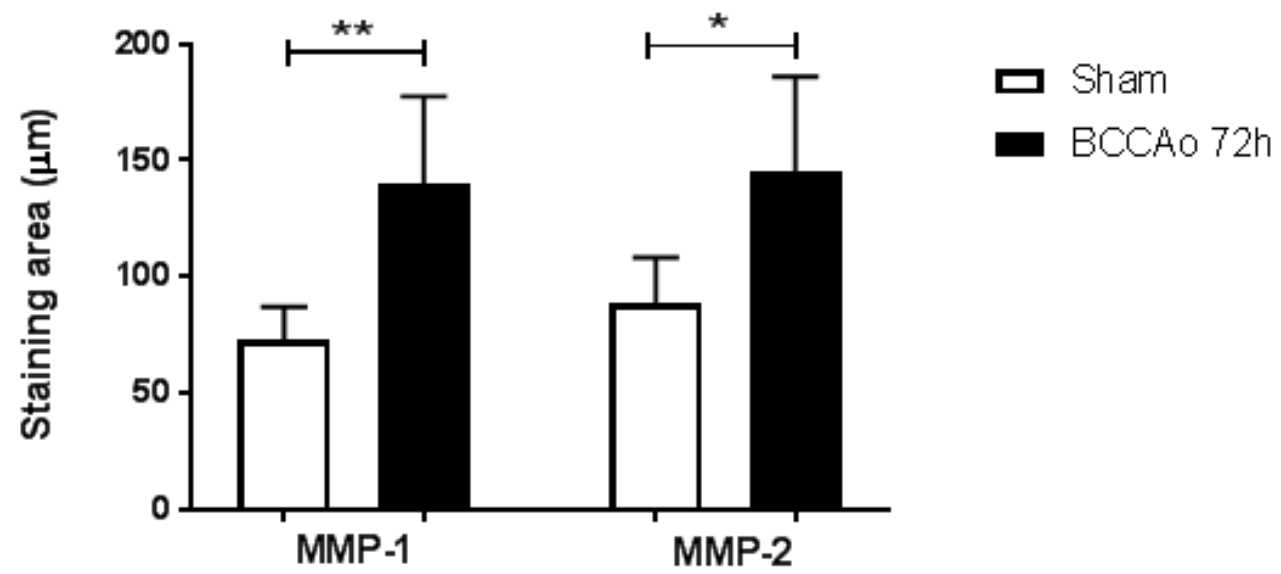














## 6. CAPITULO II

A variedade genética observada nos humanos é responsável por uma susceptibilidade ou resistência a diferentes tipos de doenças. Atualmente no mundo o aumento do risco de AVC em pacientes com polimorfismos do CCR5 ( $\Delta 32$ ), justifica a pesquisa dos mecanismos patogênicos. No AVC é necessário desenvolver alternativas aos tratamentos atuais pesquisando novos alvos envolvidos no processo de lesão isquêmica e ajudando no entendimento maior da doença. Nosso modelo murino propõe explorar o papel da inibição do CCR5 nas alterações neurológicas, aspectos patológicos e parâmetros imunes após BCCAO transitória, ajudando na pesquisa de novos alvos neuroprotetores.

### 6.1 *Objetivos Específicos*

- ✓ Déficit neurológico;
- ✓ Áreas acometidas e a frequência de alterações patológicas, bem como a extensão das lesões;
- ✓ Níveis cerebrais de quimiocinas CXCL1, CCL5 e CCL3;
- ✓ Níveis cerebrais do BDNF.

O capítulo dois, contempla o artigo nomeado: KNOCKDOWN OF C-C CHEMOKINE RECEPTOR 5 (CCR5) IS PROTECTIVE AGAINST CEREBRAL ISCHEMIA AND REPERFUSION INJURY, publicado no *Current Neurovascular Research*.

7. VICTORIA, E. et al. Knockdown of CC chemokine receptor 5 (CCR5) is protective against cerebral ischemia and reperfusion injury. **Current neurovascular research**, 2017. ISSN 1875-5739.

## 7. CONCLUSÃO FINAL

Em nosso modelo foi demonstrado que a isquemia cerebral transitória aguda promoveu aumento da expressão de fatores pró-inflamatórios como as citocinas TNF, IL-1 $\beta$ , quimiocinas CCL5 e CXCL1 e as MMP-1 e MMP-2. Juntas agem no processo de lesão isquêmica após 72 horas de reperfusão e os déficits neurológicos encontrados foram associados a alterações patológicas localizadas no tecido cerebral, como área de infarto e modificações morfológicas características de isquemia. Nossos resultados sugerem que mais estudos são necessários para compreender melhor a participação da MMP-1 durante os mecanismos fisiopatológicos da lesão de reperfusão.

Ao mesmo tempo nosso estudo mostrou que há uma neuroproteção potencial na ausência do CCR5 durante a isquemia e reperfusão cerebral, melhorou os déficits neurológicos associados à redução do dano cerebral pela diminuição da área infartada e da porcentagem de cavidades necróticas e da penumbra. A ausência de CCR5 após isquemia cerebral global transitória, mostrou a elevação dos níveis de BDNF, indicando que o CCR5 desempenha um papel importante no reparo do dano cerebral isquêmico por supra regulação do BDNF. O papel do BDNF na recuperação funcional pós-AVC já é estudado, mas outros estudos, com eixo de quimiocinas CCR5, seriam alvos terapêuticos úteis no AVC isquêmico.

## 8. ANEXOS

### 7.1 Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pela comissão de ética em experimentação animal da universidade federal de minas gerais (CETEA/UFMG) sob o protocolo nº 209/16.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

#### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 209 / 2016, relativo ao projeto intitulado "ESTUDOS DOS MECANISMOS ASSOCIADOS À DISFUNÇÃO COGNITIVA, PARÂMETROS IMUNES E PATOLÓGICOS NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL EXPERIMENTAL", que tem como responsável MILENE ALVARENGA RACHID, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 05/07/2016. Este certificado expira-se em 05/07/2021.

#### CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 209 / 2016, related to the Project entitled "STUDIES OF MECHANISMS ASSOCIATED WITH COGNITIVE DYSFUNCTION, IMMUNE AND PATHOLOGICAL PARAMETERS IN CEREBRAL ISCHEMIA AND REPERFUSION", under the supervision of MILENE ALVARENGA RACHID, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 05/07/2016. This certificate expires in 05/07/2021.

Cleuza Maria de Faria Rezende  
Coordenador(a) da CEUA/UFMG  
Belo Horizonte, 05/07/2016.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG  
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

## 7.2 Comprovante de submissão do artigo

### Manuscript Details

<b>Manuscript number</b>	YMCNE_2017_256
<b>Title</b>	Increased expression of metalloproteinase 1 during transient global brain ischemia in mice
<b>Article type</b>	Research Paper

#### Abstract

The present study aimed to investigate the activation of metalloproteinase 1 after induction of global cerebral ischemia and reperfusion. Moreover, we evaluated the neurological deficits, pathological and inflammatory profiles. Post-ischemic neurological deficits following 25 min BCCAO were recorded 72 hours after reperfusion. After evaluation of neurological score, brains from sham and ischemic mice were removed and processed to evaluate pathological changes, immunoexpression of MMPs 1 and 2, and inflammatory mediators by ELISA. BCCAO promoted neurological deficits associated with hippocampal neuronal loss and formation of small cerebral cavities of necrosis surrounded by ischemic neurons. At the same time, brain levels of TNF, IL-1 $\beta$ , CXCL1 and CCL5 were increased in BCCAO group compared with the sham-operated group. The activity of MMP-1 and MMP-2 was analyzed in the injured area. Both metalloproteinases increased in the BCCAO group, compared with sham animals. Our results demonstrated the association of MMP-1 activation with neurological deficits, pathological changes and up-regulation of pro-inflammatory cytokines/chemokines following acute brain ischemia and reperfusion.

**Keywords** Brain, ischemia, reperfusion, acute, pathology, TNF, IL-1 $\beta$ , CXCL1, CCL5, MMP-1 and MMP-2

**Corresponding Author** MA Rachid

**Order of Authors** Edna Constanza Gómez Victoria, Fabrício Marcus Silva Oliveira, Bárbara Andrade Carvalho, Eliana Cristina de Brito Toscano, Marcelo Vidigal Caliari, Antonio Teixeira, Aline Miranda, MA Rachid

### Submission Files Included in this PDF

#### File Name [File Type]

Cover Letter.doc [Cover Letter]

Highlights.doc [Highlights]

ABSTRACT.doc [Abstract]

ManuscriptVictoriaetal..doc [Manuscript File]

Fig 1.tif [Figure]

Fig 2.tif [Figure]

Fig 3.tif [Figure]

Fig 4.tif [Figure]

Figure5.jpg [Figure]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

### Research Data Related to this Submission

There are no linked research data sets for this submission. The following reason is given:  
Data will be made available on request