



Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Neurociências

EFEITO DO PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO SOBRE ASPECTOS
FUNCIONAIS, MORFOLÓGICOS E CELULARES NO
MODELO DE HEMORRAGIA INTRACEREBRAL FOCAL EM RATOS
Wistar ADULTOS

LÍGIA SIMÕES BRAGA BOISSERAND

PORTO ALEGRE
2013



Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Neurociências

EFEITO DO PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO ASPECTOS
FUNCIONAIS, MORFOLÓGICOS E CELULARES NO MODELO DE
HEMORRAGIA INTRACEREBRAL FOCAL EM RATOS *Wistar* ADULTOS

LÍGIA SIMÕES BRAGA BOISSERAND
Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Dissertação de mestrado acadêmico apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito
parcial para a obtenção do título de mestre

PORTO ALEGRE

2013

Agradecimentos

Aos meus pais, Galileu da Luz Braga e Selma M^a da Silva Simões Braga, pelo apoio e amor incondicional e pelo incentivo e suporte em todos os aspectos para que eu pudesse me dedicar aos estudos, e aos meus queridos irmãos Jordana Juliano e Tiago por todo carinho.

Ao magnífico Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto, pela oportunidade de realizar este trabalho sob sua orientação, por todos os ensinamentos e conselhos e principalmente por acreditar em mim.

Ao colega e amigo Ms. Eduardo Sanches por ter participado intensamente de todas as etapas do trabalho, por ter me ensinado tantas coisas, por ter sido incansável em me ajudar mesmo nos final de semana, no natal ou à noite sem nunca perder o bom humor, e a Vanessa por permitir a ausência dele.

Ao Prof Dr Régis Mestriner, por toda ajuda, pelos ensinamentos e pela oportunidade de ter trabalhado com ele durante a iniciação científica onde pude ter certeza que era esse o caminho que eu queria trilhar.

Ao Dr Paulo Worm, por sua imprescindível ajuda com as cirurgias e por sua disponibilidade em ajudar mesmo após noites de plantão.

À Prof^a Dr^a Letícia Pettenuzzo, pela sua disponibilidade, por toda ajuda em diversas etapas do projeto e pelos ótimos momentos de convívio.

Aos queridos colegas do laboratório 35, pelos ótimos momentos de partilha, convívio, aprendizado e crescimento. Em especial ao Fabrício pelas avaliações morfológicas, por sempre ter solução para os problemas e pela disponibilidade em ajudar. A Dr^a Simone Weis pelos conselhos e bons momentos de convívio e pela ideia de trabalhar com o pré-condicionamento. Aos demais colegas que se juntaram a nós depois, mas que já fazem parte da família.

As minhas queridas amigas que conquistei durante esse período, Suelen Willborn e Thamiris Delgado por toda a dedicação e apoio incondicional, pelos dias e dias dedicados a me ajudar e também pelos maravilhosos momentos de convívio. As amigas Franciele Pereira e Assunta Gasparin que também foram muito importantes nesse processo.

A querida colega do PPG Neurociências Fabiana Santana por me ensinar a cirurgia com canulação e pelos ótimos momentos de convívio, e ao Prof Dr. Jorge Quillfeldt por abrir as portas de seu laboratório.

Ao meu amado esposo Alexis Boisserand pelo carinho e apoio em todos os aspectos e por acreditar em mim mais do que eu mesma.

À UFRGS, ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e a Capes pela oportunidade e pela bolsa concedida.

Sumário

Lista de Figuras.....	IV
Lista de Abreviaturas.....	V
Resumo.....	VI
1. Introdução	1
1.1 Hemorragia Intracerebral: Aspectos Fisiopatológicos	2
1.2 Aspectos sobre o estriado e a função motora.....	6
1.3 Tolerância induzida pelo pré-condicionamento isquêmico	9
1.4 Cerebroproteção e as células gliais.....	14
2. Objetivos	19
2.1 Objetivo geral:	19
2.2 Objetivos específicos:.....	19
3. Hipótese	18
4. Materiais e Métodos	20
3.1 Desenho experimental.....	20
3.2 Modelo de pré-condicionamento isquêmico global	22
3.3 Modelo de hemorragia cerebral induzida por colagenase.....	23
3.4 Avaliação comportamental	25
3.4.1 Teste da escada horizontal.....	25
3.4.2 Teste do cilindro	28
3.4.3 Perfusão	29
3.4.4 Volume da lesão.....	30
3.4.5 Imunofluorescência	31
3.4.6 Quantificação da imunofluorescência	32
3.5 Análise estatística	34
5. Resultados	35
4.1 Volume da lesão.....	35
4.2 Teste do Cilindro	37
4.3 Teste da escada horizontal.....	38
4.4.1 Densidade de astrócitos GFAP+.....	40
4.4.2 Densidade células CD11b+	42
6. Discussão	44
7. Conclusões:.....	54
8. Perspectivas:.....	55
9. Referências	56

Lista de Figuras

Figura 1: Eventos decorrentes da HIC	4
Figura 2: Fisiopatologia da lesão cerebral após HIC	5
Figura 3: Representação das conexões dos núcleos da base.....	8
Figura 4: Desenho experimental.....	21
Figura 5: Imagem ilustrativa do círculo de Willis.	22
Figura 6: Teste da escada horizontal.....	27
Figura 7: Teste do cilindro.	29
Figura 8: Imagem representativa das regiões de onde foram obtidas as imagens para a avaliação das marcações da imunofluorescência..	32
Figura 9: Volume da lesão	36
Figura 10: Resultados teste do cilindro.....	37
Figura 11: Número de erros totais na escada horizontal.	39
Figura 12: Densidade óptica regional de células GFAP+s.....	40
Figura 13: Imagem representativa da imunofluorescência GFAP+.....	41
Figura 14: Densidade óptica regional de células CD11b+	42
Figura 15: Imagem ilustrativa da marcação de CD11b+	43

Lista de abreviaturas

AMS: Área Motora Suplementar

ANOVA: Análise de Variância

APM: Área Pré-Motora

AVE- acidente vascular encefálico

BHE- Barreira Hemato-encefálica

CPu: Núcleos Caudado e Putâmen (Estriado)

GFAP: Proteína Glial Fibrilar Ácida

HIC- Hemorragia intracerebral

IL-1 β : Interleucina 1 beta

MAC: Complexos de ataque a membrana;

MAD: Membro anterior direito

MAE: Membro anterior esquerdo

MMP: Metaloproteinasas da matriz

MPD: Membro posterior direito

MPE: Membro posterior esquerdo

NFk β : Fator nuclear Kappa B;

NMDA: N-metil-D-ácido aspartico;

PC- Pré-condicionamento

PMN: Polimorfonuclear.

SNC: Sistema Nervoso Central

SNC: Substância *Nigra Pars Compacta*

TNF α : Fator de Necrose Tumoral α

VEGF: Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

VH: Volume de um Hemisfério

VL: Núcleo Ventro-lateral do Tálamo

VM: Núcleo Ventro-medial do Tálamo

Resumo

O pré-condicionamento (PC) é um fenômeno biológico decorrente da exposição de um tecido ou órgão a um estímulo sub-letal capaz de promover adaptações teciduais que levam a uma proteção a um evento subsequente similar. Alguns estímulos, no entanto podem levar a uma proteção mesmo quando a lesão subsequente é de natureza distinta, isto é chamado de tolerância cruzada. Estudos experimentais vêm utilizando esta estratégia para reduzir o dano provocado pelo acidente vascular encefálico.

Com o objetivo de testar a possível tolerância cruzada que o evento isquêmico produziria sobre a lesão causada pela hemorragia, testamos um modelo de pré-condicionamento cruzado induzido por 10 ou 20 minutos de oclusão bilateral das artérias carótidas comuns sobre a hemorragia intracerebral (HIC) induzida por colagenase tipo IV-S no estriado dorsolateral. Para tanto, utilizamos 60 ratos *Wistar* machos adultos que foram divididos em 6 grupos: *sham*, PC10, PC20, HIC, PC10+HIC e PC20+HIC. De acordo com o grupo, os animais receberam 10 ou 20 minutos de pré-condicionamento isquêmico (exceto os grupos *sham* e HIC) e 24 horas após foram submetidos à hemorragia intracerebral ou a cirurgia *sham*, onde os animais receberam apenas salina. Os animais foram avaliados quanto ao seu desempenho motor através do teste do cilindro e teste da escada horizontal durante o período do experimento. Vinte dias após a indução da HIC, os animais foram perfundidos e foram obtidas amostras do tecido encefálico para a avaliação do volume da lesão e densidade óptica regional de astrócitos (GFAP+) e microglia (CD11b). Em nossos resultados detectamos que 10 ou 20 minutos de PC foram capazes de proteger o tecido da lesão promovida pela HIC ($p < 0,05$) e de reduzir a densidade de GFAP+ ($p < 0,05$). No entanto, não houve diferenças quanto ao desempenho funcional avaliado por nossos testes, tampouco sobre a ativação microglial no período estudado.

Conjuntamente nossos resultados evidenciam que a tolerância tecidual induzida pelo pré-condicionamento isquêmico foi capaz de promover algum grau de proteção no modelo de hemorragia intracerebral induzido por colagenase do tipo IV-S, mesmo que isso não tenha sido evidenciado no desfecho funcional avaliado por nossos testes comportamentais. Além disso, os diferentes tempos de PC estudados não mostraram diferentes graus de proteção.

1.Introdução

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é uma das principais causas de morte no Brasil e apresenta a maior taxa de fatalidade na América Latina comparado aos demais continentes (Rodriguez *et al.*, 2006; Lotufo, 2005). A incidência anual de AVE no país é de 108 por 100 mil indivíduos, com uma taxa de letalidade de 31% dos casos AVE ao ano (Minelli *et al.*, 2007). A Hemorragia intracerebral (HIC), associada a um pior prognóstico quando comparada à isquemia, representa cerca de 14% de todos os casos no país (Minelli *et al.*, 2007).

Na presença de potenciais ameaças à homeostase celular como infecção, isquemia ou traumatismo, muitos organismos conseguem desenvolver mecanismos para a auto-proteção do tecido ao dano (Iadecola, 2011). Neste contexto, o termo "pré-condicionamento" descreve um processo pelo qual um estímulo potencialmente danoso promove alterações teciduais que melhoram a resposta de defesa a um estímulo subsequente. Por exemplo, um curto período de isquemia cerebral não letal para as células é capaz de reduzir o dano cerebral produzido por um insulto isquêmico letal subsequente (Gidday, 2006). Esse fenômeno, chamado de tolerância isquêmica, foi relatado pela primeira vez *in vivo* em 1964 (Dahl e Balfour, 1964) e é apropriadamente descrito pela citação do filósofo alemão Friedrich Nietzsche: "O que não me destrói me faz mais forte" (Iadecola *et al.*, 2011).

Diversas vias patológicas convergem em vias comuns de lesão, morte celular e reparo. Como exemplo disso, temos o fato de diferentes causas de neurodegeneração como, o AVE e a doença de Parkinson, possuírem alguns mecanismos de lesão comuns como inflamação, excitotoxicidade e apoptose. Desta forma, os mecanismos de defesa tecidual induzidos pelo pré-condicionamento

isquêmico, como a redução da excitotoxicidade, do estresse oxidativo, da inflamação e da apoptose (Durukan e Tatlisumak, 2010), podem atuar de maneira relevante sobre a hemorragia intracerebral.

Com o objetivo de melhor compreender os efeitos do pré-condicionamento isquêmico sobre a tolerância tecidual, e pesquisar se tais efeitos poderiam ser benéficos em um estímulo diferente do que induziu a tolerância, testamos um modelo de pré-condicionamento cruzado sobre a HIC induzido por collagenase.

1.1 Hemorragia Intracerebral: Aspectos Fisiopatológicos

A Hemorragia Intracerebral (HIC) não traumática resulta da ruptura de vasos sanguíneos no parênquima cerebral, com subsequente formação de hematoma levando a uma série de respostas e adaptações teciduais (Xi *et al.*, 2006). Esta lesão é um dos principais problemas de saúde pública mundial com uma incidência anual de 10-30 por 100 mil habitantes, e corresponde a dois milhões (10-15%) de um total de 15 milhões de AVEs no mundo a cada ano (Qureshi *et al.*, 2009). A prevalência da HIC é maior em determinadas populações, como negros e asiáticos (Qureshi *et al.*, 2009). As regiões do cérebro mais acometidas pela HIC são os núcleos da base, o cerebelo, e o tronco encefálico (Wang *et al.*, 2010).

Os principais fatores que levam a HIC são os processos degenerativos decorrentes da hipertensão e a angiopatia amilóide congênita (Mayer e Rincon, 2005). Os fatores secundários que levam a HIC geralmente resultam de uma malformação vascular, neoplasia, coagulopatia, e o uso de anticoagulantes (Mayer e Rincon, 2005; Wang *et al.*, 2005).

A HIC pode levar a danos cerebrais primários e secundários. Os efeitos imediatos da HIC como a expansão do hematoma e o aumento da pressão

intracraniana levam a lesão primária, enquanto que os efeitos posteriores, como o processo inflamatório, contribuem para a lesão secundária (Wang *et al.*, 2010) .

A lesão secundária é desencadeada por uma série de eventos iniciados pela lesão primária, como por exemplo, o efeito de massa, a ativação do sistema do complemento e de moléculas da coagulação. A massa de hematoma pode aumentar a pressão intracraniana (efeito de massa), comprimindo regiões adjacentes e, portanto, potencialmente afetando o fluxo sanguíneo e levando a herniação cerebral (Keep *et al.*, 2012). O grau de isquemia peri-hematoma após hemorragia intracerebral ainda é controverso. A maior parte dos estudos que avaliam o fluxo sanguíneo da região peri-hematoma sugerem que a alteração do fluxo sanguíneo local não é suficiente para promover um dano isquêmico (Mayer *et al.*, 1998; Qureshi *et al.*, 1999; Tanaka., 1996)

O sistema de complemento está envolvido em reações imunes incluindo a lise celular e resposta inflamatória, os componentes proteicos do plasma que participam do sistema do complemento normalmente não penetram no cérebro, porém após a HIC eles conseguem atravessar o vaso rompido ou através da subsequente disfunção da barreira hemato-encefálica (BHE) (Keep *et al.*, 2012). Quando ativado o sistema do complemento forma complexos de ataque à membrana (Hua *et al.*, 2000; Xi *et al.*, 2001), que são responsáveis pela lise de eritrócitos promovendo a liberação da hemoglobina e do ferro resultando em dano tecidual ilustrado na figura 1. Uma das respostas iniciais é a ativação de mecanismos hemostáticos para reduzir o sangramento, onde a trombina tem um papel central. A ativação da trombina pode afetar muitos tipos de células, incluindo células endoteliais cerebrais levando à disfunção da barreira hemato-encefálica e formação de edema cerebral, (Liu *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 1997) neurônios, astrócitos (Vaughan *et al.*, 1995; Jiang *et al.*,

2002) e células microglias. Estes fatores desencadeiam uma pronunciada resposta inflamatória (figura 2), com ativação da microglia residente, astrócitos, macrófagos, influxo de leucócitos para o encéfalo e produção de mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, proteases, ferro e outras moléculas imunotivas (Aronowski *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007).

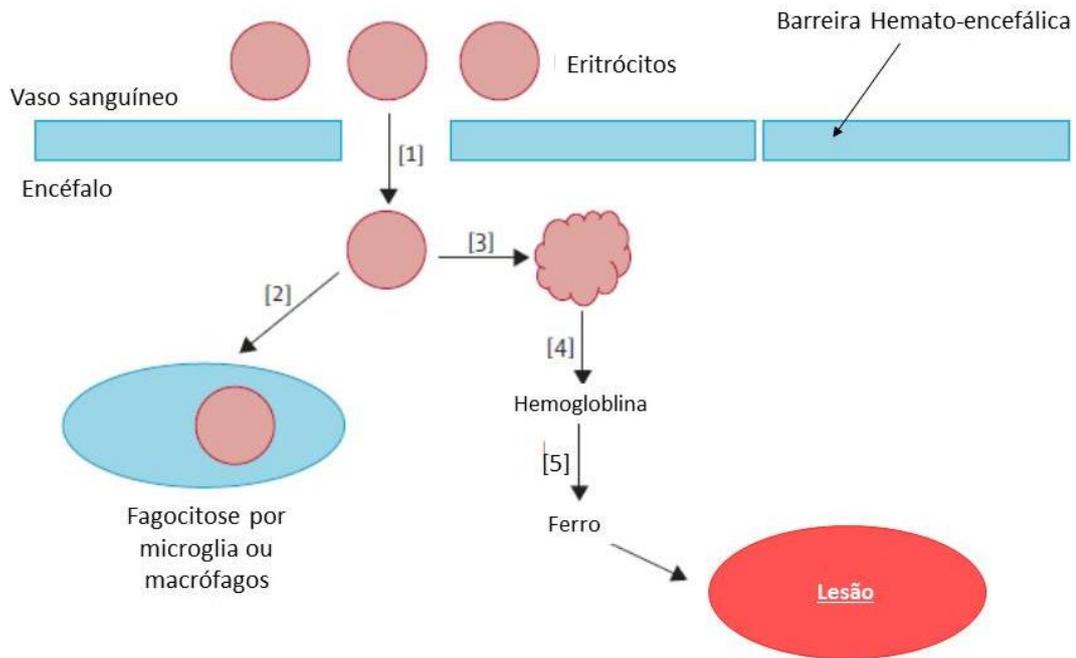


Figura 1: Eventos decorrentes da HIC [1]Eritrócitos [2] Fagocitose por micróglia e macrófagos [3] Em decorrência da ativação do sistema do complemento e/ou da depleção de energia a lise dos eritrócitos pode resultar em liberação da hemoglobina [4] o grupamento heme da hemoglobina é degradado pela hemo-oxigenase liberando o ferro [5] Indução da lesão cerebral na HIC (Adaptado de Keep; Hua; Xi 2012)

Recentemente foi demonstrado em humanos um significativo aumento da regulação tanto de genes pró-inflamatórias quanto de anti-inflamatórios no tecido cerebral na região adjacente à HIC (Carmichael *et al.*, 2008). No tecido adjacente ao hematoma, o volume do edema pode aumentar cerca de 75% nas primeiras 24h após o evento hemorrágico (Gebel, Jauch *et al.*, 2002), alcançando um pico por volta do 5° ou 6° dia, perdurando por aproximadamente 14 dias (Inaji *et al.*, 2003; Butcher,

et al., 2004). Ainda em relação à perfusão encefálica, há evidências de que o fenômeno de normalização do fluxo ou de reperfusão se estabeleça entre o 2º e o 14º dia, seguido de uma fase normalização, em todas as regiões encefálicas viáveis após esse período (Qureshi, *et al.*, 2009).

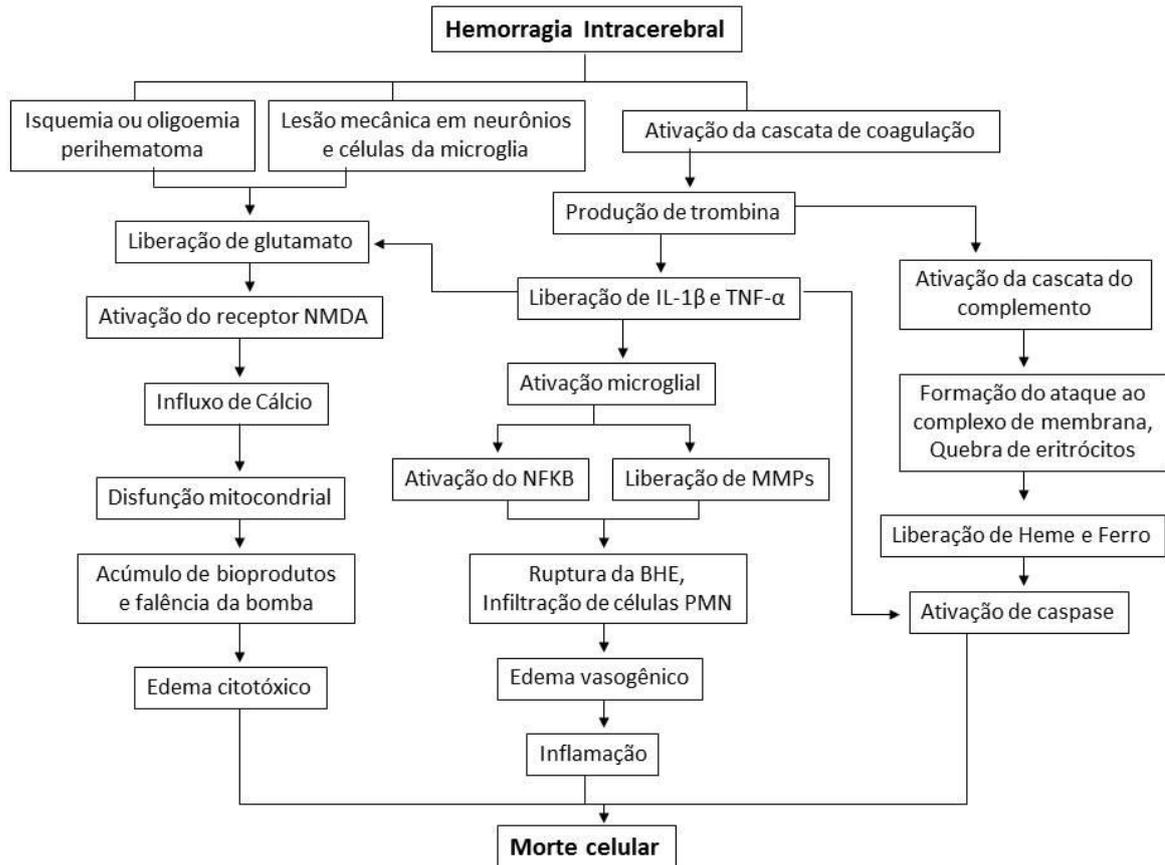


Figura 2: Fisiopatologia da lesão cerebral após hemorragia intracerebral, TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; IL-1 β (interleucina 1 beta; NFK β , fator nuclear Kappa B; MMP, metaloproteínas da matriz; NMDA, N-metil-D-ácido aspártico; MAC complexos de ataque a membrana; BHE, barreira hemato-encefálica; PMN, polimorfonuclear. (Adaptada de Brunswick *et al.*, 2012)

A HIC é uma das formas mais fatais de AVE. Quando não leva à morte, ela pode trazer uma série de incapacidades como déficits motores, sensitivos e cognitivos, entre outros, aos indivíduos sobreviventes (Broderick *et al.*, 1999). Em 40% dos casos a HIC é acompanhada de hemorragia intraventricular, o que pode resultar em hidrocefalia aguda, aumento da pressão intracraniana e em menor

chance de recuperação funcional àqueles que sobrevivem a esta lesão (Mayer e Rincon, 2005). Apesar de todos os mecanismos fisiopatológicos atualmente descritos, ainda muito pouco é conhecido sobre a HIC, fazendo-se necessário a busca de estratégias para o estudo desta importante doença.

1.2 Aspectos sobre o estriado e a função motora

Os déficits funcionais mais frequentes após o AVE incluem a hemiparesia, incoordenação, hipertonia espástica do membro superior e inferior contralaterais à lesão e fraqueza ipsilateral e contralateral ao hemisfério lesado independentemente da etiologia do AVE, mas sim das regiões acometidas (Andrews e Bohannon, 2000; Schaechter, 2004).

Os núcleos da base mantêm conexões com importantes regiões encefálicas (figura 3) como o córtex sensório-motor e o cerebelo, participando do controle do movimento por meio da regulação de impulsos neurais que auxiliam no planejamento e na execução de movimentos sequenciados. De forma simplificada, as informações originadas no córtex são transmitidas por meio do estriado, globo pálido e tálamo, de onde retornam ao córtex cerebral (Handley *et al.*, 2009). Durante o aprendizado dos movimentos e mesmo em movimentos aprendidos, os núcleos da base exercem importante função relacionada à formulação do comportamento motor adaptativo (Graybiel *et al.*, 1994; Jueptner e Weiller, 1998).

Dentre os núcleos da base, o estriado (formado pelos núcleos caudado e putâmen) atua como a porção receptora da maioria das projeções provenientes de diversas regiões corticais, tendo uma grande importância na integração de informações necessárias à realização do movimento voluntário normal e, talvez, para o aprendizado sensório-motor (Brown e Sharp, 1995).

Várias linhas de investigação sugerem que o estriado apresenta uma efetiva contribuição para a execução das tarefas motoras (Vanvleet *et al.*, 2002; Karnath *et al.*, 2002), da orientação espacial (Brown *et al.*, 1989), da percepção sensório-motora (Jeyasingham *et al.*, 2001), da motivação (Cardinal *et al.*, 2002) e da seleção dos movimentos que compõem o gesto motor (Redgrave *et al.*, 1999). Outra função estriatal importante é a finalização de programas motores relacionados a metas, tais como alcançar e segurar um objeto.

Nos roedores as projeções corticais sensório-motoras chegam até o estriado dorsolateral e, nessa região, um mapa somatotópico que inclui os membros anteriores (ventrolateralmente), os membros posteriores (dorsomedialmente) e as vibrissas (medialmente), parece estar organizado (Brown e Sharp, 1995). Esses mesmos autores demonstraram também que a estimulação cortical unilateral é capaz de induzir um aumento na atividade estriatal de modo bilateral, o que é esperado, tendo em vista que as projeções oriundas do córtex sensório-motor projetam-se bilateralmente ao estriado de roedores (Canteras *et al.*, 1988; McGeorge *et al.*, 1989). Sendo assim, as alças de retroalimentação corticais e subcorticais apresentam grande importância para o controle dos movimentos, enviando informações sobre o gesto motor pretendido até os sítios de controle onde ocorrem a correção, a adequação e o aperfeiçoamento do mesmo, para posteriormente reenviar essas informações às estruturas corticais.

Os principais modelos utilizados para estudar a hemorragia Intracerebral são a injeção autóloga de sangue ou o induzido por colagenase em diferentes áreas do encéfalo de roedores ou de espécies maiores como porcos. (MacLellan *et al.*, 2010; Kirkman *et al.*, 2011)

Como mencionado anteriormente, o estriado é uma das regiões mais suscetíveis a eventos hemorrágicos (Wang *et al.*, 2010) chegando a representar 50% dos AVE hemorrágicos (Xi *et al.*, 2006), e por esse motivo, utilizamos em nosso estudo o modelo de HIC induzido por collagenase no estriado dorsolateral.

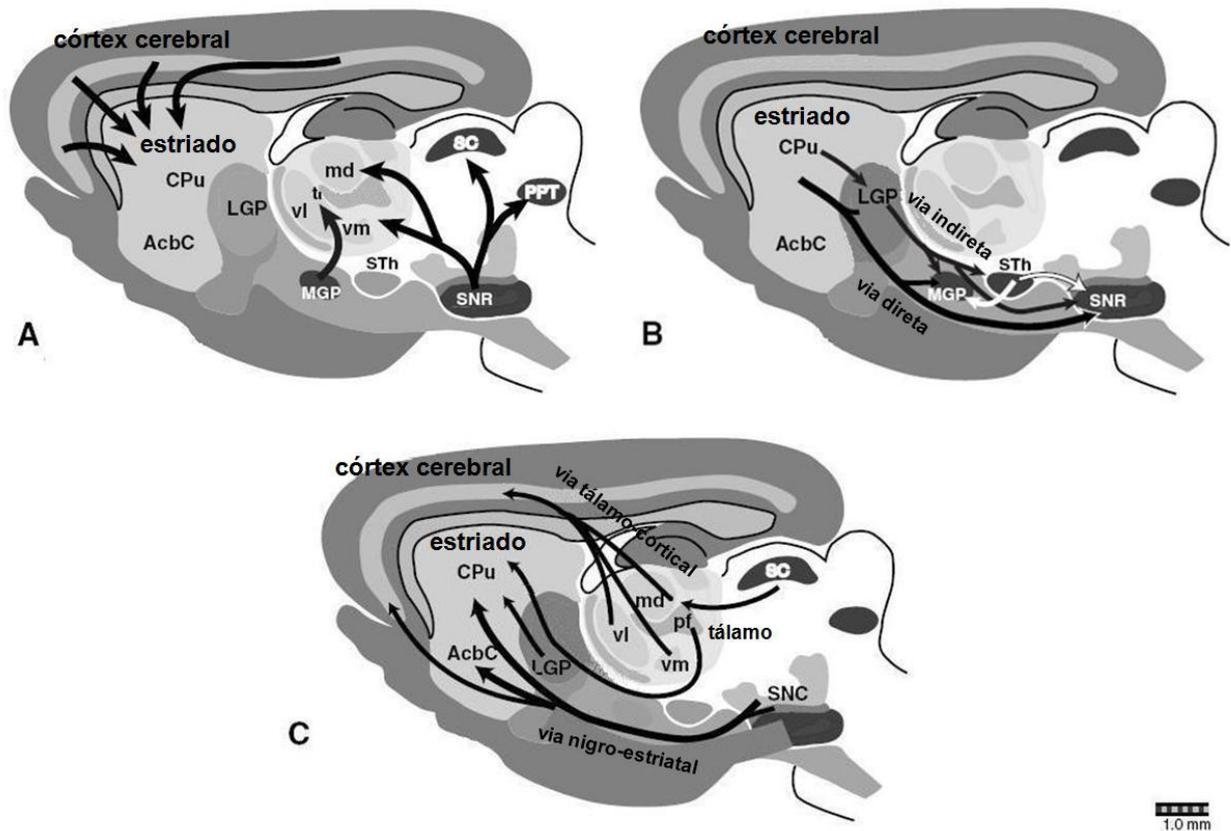


Figura 3: Representação simplificada das principais conexões dos núcleos da base. (A) aferências e eferências dos núcleos da base; (B) vias estriatais direta e indireta; (C) alças de retroalimentação. CPu: estriado; AcbC: núcleo accumbens; LGP: globo pálido lateral; MGP: globo pálido medial; vl, vm, md e pf: núcleos ventro-lateral, ventro-medial, médio-dorsal e parafascicular do tálamo, respectivamente; SC: colículo superior; SNC: substância nigra compacta, SNr: substância nigra reticulada (adaptado de Gerfen, 2004).

O modelo de HIC induzido por collagenase é interessante, pois resulta em um sangramento ativo (Rosenberg *et al.*, 1990; Tang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2003), onde o hematoma se desenvolve gradualmente durante quatro a cinco horas (Wang e Doré, 2007a) produzindo uma lesão cerebrovascular aguda, resultando em um

sangramento espontâneo e reprodutível em localização e tamanho (Tejima *et al.*, 2007; Wagner, 2007; Wang and Doré, 2007b), permitindo inclusive o estudo da expansão do hematoma. A indução da HIC será melhor explanada na seção de materiais e métodos.

1.3 Tolerância induzida pelo pré-condicionamento isquêmico

Quando exposto a um estímulo subletal, suficientemente capaz de promover alterações ambientais, muitos organismos vivos adquirem uma tolerância transitória (contrária às mudanças promovidas por um estímulo letal). Tal resposta celular é observada em uma ampla variedade de espécies, desde bactérias até organismos mais complexos como mamíferos, indicando que é uma função essencial para as células que necessitam sobreviver a inúmeras situações adversas ao longo da vida (Kirino, 2002).

Para células e organismos que vivem em condições aeróbicas, um longo período de privação de oxigênio e glicose como o que ocorre no AVE pode ser fatal, o tecido encefálico é particularmente vulnerável a períodos isquemia. Assim como outras células, os neurônios podem adquirir uma tolerância transitória induzida por um estresse precedente (Dahl e Balfour, 1964). Murry e colegas demonstraram que quatro períodos de 4 minutos de oclusão coronariana, cada período separado por 5 minutos de reperfusão, foi capaz de promover resistência do miocárdio a uma isquemia subsequente de 40 minutos, reduzindo significativamente a lesão do miocárdio (Murry, 1986). Eles chamaram este método de melhorar a tolerância à isquemia no tecido cardíaco de pré-condicionamento.

Sendo assim, o termo pré-condicionamento (PC) refere-se à exposição de um tecido ou órgão a uma situação sub-letal como uma isquemia breve seguida por

reperfusão, que promove alterações nas respostas do microambiente exposto, e quando este mesmo tecido ou órgão é novamente exposto a uma situação similar potencialmente letal ele apresenta uma tolerância a este estímulo. O pré-condicionamento isquêmico e a tolerância por ele induzida vem sendo amplamente estudados experimentalmente no encéfalo e foram demonstrados resultados positivos em relação ao aumento da sobrevivência em 90% dos neurônios da CA1 no hipocampo (Deutsch *et al.*, 1990), redução do volume do infarto em 20-60% (Nakai *et al.*, 2001), redução da permeabilidade da barreira hemato-encefálica (Massada *et al.*, 2001), redução do estresse oxidativo (Omata *et al.*, 2002), entre outros.

O pré-condicionamento pode gerar duas fases de tolerância com diferentes perfis temporais apresentando distintos mecanismos de proteção. A tolerância precoce é uma proteção de curta duração, que ocorre rapidamente após o estímulo usado para promover o pré-condicionamento e dura por aproximadamente 1 hora (Obrenovitch, 2008). Neste processo ocorrem mudanças na atividade e modificações pós-translacionais em proteínas já sintetizadas.

Já a tolerância tardia, que desempenha papel principal na cerebroproteção, requer indução gênica e síntese de novas proteínas, que representam respostas de longa duração através de modificações genéticas (Nagahori *et al.*, 1994). Esta corresponde a um estado de tolerância que pode ser detectada em até 24 horas após a indução do pré-condicionamento, tem seu pico em 72 horas e permanece por dias a semanas (Gidday, 2006; Stowe *et al.*, 2011).

A tolerância conferida após o PC não protege necessariamente apenas de um estímulo subsequente de mesma origem que o anterior. Estudos revelam que estressores físicos ou metabólicos não isquêmicos podem induzir a uma tolerância

isquêmica, este tipo de tolerância é chamado de tolerância-cruzada. Barbe e colegas (1988) demonstraram que fotorreceptores da retina apresentam uma resistência a exposição a um forte feixe de luz após uma breve exposição a altas temperaturas. Isto provavelmente se deve ao fato de que diversas vias patológicas convergem em vias comuns de lesão, morte celular e reparo. Como exemplo disso, temos o fato de diferentes causas de neurodegeneração como o AVE, doença de Parkinson possuírem mecanismos de lesão comuns como tais como inflamação, excitotoxicidade, e apoptose. Sendo assim, o estudo dos efeitos do PC isquêmico sobre a HIC pode ser classificado como um modelo cruzado de indução de tolerância. Além disso, estudos confirmam que o PC isquêmico promove tolerância na região de “penumbra” em modelos focais (Ulrich, 2009).

A aquisição da tolerância contra estímulos nocivos parece requerer pelo menos dois componentes, o primeiro componente é o responsável pela detecção de condições estressoras e de converter esta informação em sinais intracelulares, o segundo componente é o efetor da tolerância induzida. Diferentes estímulos são detectados por um pequeno grupo de sensores e os sinais são gradualmente convertidos em uma via final comum estereotipada (Kirino, 2002). Dados da literatura sugerem que os mecanismos potenciais de proteção podem ser divididos em duas categorias principais: (1) a defesa celular contra a isquemia parece ser melhorada por mecanismos inerentes a células nervosas, que são induzidos por modificações pós-translacionais de proteínas já sintetizadas ou pela expressão de novas proteínas. Essa sequência de eventos pode ser fortemente influenciada por fatores de sobrevivência ou ser inibida por fatores apoptóticos. (2) A resposta celular ao estresse e a síntese de proteínas de estresse leva a um aumento da capacidade de manutenção da viabilidade celular. Essas proteínas são conhecidas como

chaperonas, e são responsáveis por auxiliar no enovelamento proteico, e encaminham as proteínas para destruição, caso não seja possível atingir a configuração correta, este processo pode contribuir para a sobrevivência ou morte celular. (Ciechanover, 2000 ; Kopito, 2000)

Acredita-se que os principais efeitos relacionados à tolerância envolvem diversos mecanismos de redução do dano celular por diminuir os efeitos deletérios da excitotoxicidade já demonstrado *in vitro* (Tauskela, *et al* 2001) e *in vivo* (Bond *et al* 1999 , Wang *et al.*, 2006), do estresse oxidativo, da disfunção metabólica, da inflamação e apoptose.

Os eventos iniciais da tolerância podem envolver canais de K⁺ sensíveis ao ATP via a ativação de receptores A1 de adenosina (Heurteaux, 1995). Esta hipótese pode ser apoiada pelo fato de que antagonistas de receptores A1 bloqueiam o efeito de tolerância à isquemia (Hiraide, 2001). Adicionalmente, já foi demonstrado que o PC pode conferir proteção aos neurônios hipocâmpais da CA1 por reduzir a lesão por excitotoxicidade, por prevenir a redução do número de receptores GluR2 nesta região (Tanaka, 2002) e por melhorar a recaptção de glutamato da fenda sináptica pelo transportador glial GLT-1 (Liu, 2011).

Mudanças no fluxo sanguíneo cerebral podem contribuir para a indução tolerância (Dawson, 1999). A preservação do fluxo sanguíneo cerebral observado na isquemia após PC isquêmico é acompanhado pela indução de vários genes envolvidos na vaso regulação e angiogênese como o VEGF (Dirnagl, 2009), bem como um aumento da densidade vascular 24 horas após o pré-condicionamento hipóxico em encéfalos imaturos (Gustavsson, 2007).

A regulação de citocinas inflamatórias também parece estar envolvida no fenômeno da tolerância. Citocinas inflamatórias como Interleucina 1 (IL-1) e o Fator

de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) são importantes mediadores inflamatórios e são expressos em situações de lesão como a hemorragia cerebral. Um estudo que investigou o papel da IL-1 na indução da tolerância na isquemia global, demonstrou que os níveis arteriais de IL-1 α e IL-1 β começam a elevar-se entre 1 a 3 dias após o PC, os possíveis mecanismos de ação da IL-1 incluem liberação de ácido araquidônico, aprimoramento da ativação dos receptores NMDA e estimulação da oxido nítrico sintase (Huang, 2006).

O TNF- α é liberado tanto por células neuronais como gliais na presença de lesões, apresentando propriedades dose-dependentes de acordo com a sua expressão, podendo promover dano tecidual ou ser neuroprotetor (Hanisch, 2002; Romera *et al.*, 2004). Trata-se de uma molécula pleiotrópica, que ativa tanto vias de morte celular quanto de vias de sobrevivência (Lian *et al.*, 2004). O TNF- α desempenha um papel crucial na tolerância promovida pela isquemia, uma evidência de seu importante papel é que a ablação genética do TNF- α no tecido cardíaco foi capaz de anular os efeitos do PC (Smith *et al.*, 2002).

Em outro estudo, que demonstrou a importância do componente inflamatório na tolerância adquirida após o PC, através da ativação dos receptores toll-like 4 (TLR-4), foi observado que em camundongos *knock-out* para o gene (TLR-4) apresentavam uma menor expressão de TNF- α 18 e 24 horas após o PC e, acompanhada dessa diminuição, apresentavam também menor cerebroproteção evidenciada por uma diferença significativa em relação ao volume da lesão e escore funcional (Pradillo *et al.*, 2009).

Outro mecanismo de cerebroproteção relacionado ao PC é o seu efeito sobre o estresse oxidativo. Os astrócitos provêm uma das principais defesas antioxidante do encéfalo, fornecendo aos neurônios substratos antioxidantes como a glutatona

(Hertz *et al.*, 2001, Anderson *et al.*, 2003) que é uma das mais importantes enzimas antioxidantes no tecido nervoso (Drigen 2000). Neste sentido, a ativação astrocitária observada após o PC isquêmico pode estar relacionada com a proteção contra o estresse oxidativo (Trendelenburg e Dirnagl, 2005).

O PC também parece promover uma redução da apoptose (Gidday, 2006; Ostrowski *et al.*, 2007). Os mecanismos anti-apoptóticos parecem envolver a liberação da proteína Bcl-2 (anti-apoptótica) (Shimizu *et al.*, 2001), a redução da síntese de caspase-3 (pró-apoptótica), a ativação de p-53 e a redução da liberação mitocondrial do Citocromo c (Kirino, 2002; Pong, 2004).

Os mecanismos envolvidos na tolerância induzida pela isquemia ainda não foram completamente investigados. Além disso, diferentes mecanismos podem estar mais ativados em diferentes modelos de pré-condicionamento (Durukan e Tatlisumak, 2010).

1.4 Cerebroproteção e as células gliais

Com uma melhor compreensão do conceito de unidade neurovascular, onde a participação das células gliais bem como o endotélio vascular e suas interações com os neurônios tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (Arai *et al.*, 2009), os pesquisadores tem adotado uma visão menos neuronocêntrica e ampliada para outros tipos celulares. Sabemos que a tolerância celular que ocorre após o pré-condicionamento se reflete em todas as células e não apenas nos neurônios (Durukan e Tatlisumak, 2010). Portanto, a investigação da participação de células que participam diretamente na cerebroproteção mediada pelo PC, como astrócitos e microglia, se faz necessária.

Os astrócitos são células complexas, altamente diferenciadas e que contribuem de forma essencial em inúmeras funções do sistema nervoso central (SNC) (Penky *et al.*, 2005) incluindo: na recaptação de neurotransmissores (Sattler *et al.*, 2006), tamponamento de íons e manutenção da homeostase (Seifert *et al.*, 2006; Simard *et al.*, 2004), participam na regulação do fluxo sanguíneo cerebral (Gordon *et al.*, 2007), controle do metabolismo energético (Brown *et al.*, 2004, 2007; Pellerin *et al.*, 2007) na manutenção da barreira hemato-encefálica (BHE) (Abbot *et al.*, 2006; Ballabh *et al.*, 2004) na defesa antioxidante através da glutatona (Drigen *et al.*, 2000; Drigen *et al.*, 2002), e participam na transmissão sináptica (Halassa *et al.*, 2007, Nedergaard *et al.*, 2003; Perea *et al.*, 2009).

Além de desempenhar todas essas funções, em situações patológicas como o AVE, os astrócitos respondem a tal lesão, por um processo conhecido como astrogliose reativa. As funções e mecanismos da astrogliose reativa e a formação da cicatriz glial estão sendo gradualmente elucidadas ao longo dos anos (Sofroniew *et al.*, 2009). Com base em um amplo conjunto de dados experimentais, uma definição de astrogliose foi recentemente proposta e abrange 4 fatores chave: (I) a astrogliose reativa consiste em um espectro de alterações moleculares, celulares e funcionais nos astrócitos, que ocorrem em resposta a todas as formas de lesões e doenças do SNC, incluindo perturbações sutis; (II) as mudanças sofridas pelos astrócitos reativos variam de acordo com a natureza e a gravidade da lesão por meio de alterações progressivas e graduais na expressão molecular, hipertrofia celular progressiva e em casos graves, proliferação e formação da cicatriz glial; (III) as mudanças da astrogliose reativa são reguladas em um contexto específico via sinalização inter e intracelular; (IV) as mudanças ocorridas durante a astrogliose reativa têm o potencial de alterar a atividade astrocitária, tanto via ganho quanto

perda de funções que podem impactar de forma positiva ou negativa sobre as células neurais e não neurais (Sofroniew *et al.*, 2009).

De acordo com esta definição, a astrogliose reativa não pode ser caracterizada como uma resposta “tudo ou nada”, tampouco como um processo único e uniforme. Sendo assim, a astrogliose reativa não deve ser encarada como um sinônimo de cicatriz glial. Trata-se de um processo finamente graduado, que envolve alterações progressivas na expressão gênica e modificações celulares que são sutilmente reguladas por mecanismos complexos de sinalização celular (Sofroniew *et al.*, 2009). Assim, se sugere que os astrócitos reativos poderiam participar da recuperação após o AVE, possivelmente atuando no processo de remodelamento neurovascular pós-lesão (Hayakawa *et al.*, 2009; Mestriner *et al.*, 2011).

Outro tipo celular envolvido na tolerância celular promovida pelo PC é a microglia. As células microgliais são macrófagos do sistema nervoso e como células do sistema imune, podem detectar e reagir a infecções, traumas, isquemia, degeneração ou qualquer alteração na homeostasia do tecido nervoso (Béchade *et al.*, 2013), podendo mudar seu estado de atividade dependendo das condições envolvidas. Em condições normais a microglia é caracterizada por um pequeno corpo celular com processos finos e ramificados e baixa expressão de antígenos de superfície (Kreutzberg, 1996). Nestas condições ela é referida por alguns autores como em “repouso”. No entanto estudos de imagem *in vivo* demonstraram que os processos celulares microgliais estão constantemente em movimento, monitorando o ambiente (Davalos, 2005; Nimmerjahn *et al.*, 2005).

Na presença de lesões encefálicas como o AVE, a microglia sofre uma modificação, também chamada de ativação, onde a sua morfologia é alterada,

ocorre proliferação, liberação de moléculas pró-inflamatórias e aumento da expressão antígenos de superfície (Hanisch *et al.*, 2007; Melchior *et al.*, 2006). Em sua conformação ativada, a microglia pode ter um papel dual, podendo desempenhar um papel neuroprotetor ou neurotóxico. Acredita-se que ela possa promover a regeneração, através da liberação de fatores de crescimento e da modulação da resposta imune (Melchior *et al.*, 2006; Streit *et al.*, 2002). Por outro lado evidências sugerem que a microglia ativada juntamente com leucócitos/macrófagos e astrócitos são os maiores mediadores de dano secundário após a HIC baseado no local de liberação das citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, proteinases, e outras moléculas imunológicas (Aronowski *et al.*, 2005). O efeito global, porém, depende das condições patológicas e da severidade da lesão cerebral (Wang, 2010).

2. Hipótese

Nossa hipótese de trabalho é que o pré-condicionamento isquêmico induzido pela oclusão bilateral das artérias carótidas comuns durante 10 ou 20 minutos exerça efeitos cerebroprotetores, morfológicos e funcionais no modelo de hemorragia intracerebral induzida por colagenase do tipo IV-S.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral:

Avaliar o efeito do pré-condicionamento isquêmico induzido pela oclusão bilateral das artérias carótidas comuns durante 10 ou 20 minutos sobre os déficits motores, morfologia da lesão, expressão de proteínas relacionadas com a cerebroproteção e com o dano celular em ratos *Wistar* adultos submetidos à HIC induzida por colagenase do tipo IV-S.

3.2 Objetivos específicos:

- a) Verificar morfologicamente os efeitos de 10 ou 20 minutos de pré-condicionamento isquêmico sobre o volume da lesão pós-HIC.

- b) Avaliar os efeitos de 10 ou 20 minutos de pré-condicionamento isquêmico sobre os déficits motores induzidos pela HIC por meio do teste da escada horizontal e do teste do cilindro;

- c) Avaliar o efeito de 10 ou 20 minutos de pré-condicionamento isquêmico e da HIC sobre a marcação de CD11b para microglia ativada e de GFAP para astrócitos;

- d) Comparar os possíveis efeitos cerebroprotetores nos diferentes tempos do pré-condicionamento.

4. Materiais e Métodos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta universidade sob o número 22.248.

4.1 Desenho experimental

Foram utilizados 60 ratos *Wistar*, adultos provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com 90 dias de vida ao início dos experimentos. Os animais permaneceram em grupos de no máximo cinco, em caixas de *Plexiglass* sob condições padrão (ciclo de 12 h claro/escuro) e controle da temperatura ($21 \pm 2^\circ \text{C}$). Água e comida foram fornecidas à vontade.

Os animais foram divididos em 6 grupos experimentais:

- 10 minutos PC isquêmico e a hemorragia intracerebral PC10' + HIC (n=10),
- 20 minutos PC isquêmico e a hemorragia intracerebral PC20' +HIC (n=10),
- 10 minutos PC isquêmico e veículo PC10' (n=10),
- 20 minutos PC isquêmico e veículo PC20' (n=10),
- Hemorragia intracerebral HIC (n=10),
- Sham (n=10).

Os procedimentos cirúrgicos que incluem o PC isquêmico e a indução da HIC foram realizados em três etapas:

- 1) No primeiro dia foi realizada a dissecação e o isolamento das carótidas com um fio de sutura (sem obstrução do fluxo sanguíneo) com o objetivo de facilitar a exposição das carótidas no momento do pré-condicionamento isquêmico;
- 2) No segundo dia foi realizado o PC, onde as carótidas foram reexpostas e ocluídas

com clip cirúrgico durante 20 minutos nos animais dos grupos PC20' + HIC e PC20' e por 10 minutos nos animais dos grupos PC10 + HIC e PC10',

3) Decorridas 24 horas da indução do pré-condicionamento isquêmico, foi realizada a indução da HIC nos grupos HIC, PC10' + HIC e PC20' + HIC e administração de veículo nos demais grupos.

Previamente à cirurgia os animais foram treinados por três dias no teste da escada horizontal, e posteriormente passaram por uma avaliação pré-operatória (cilindro e escada horizontal), no 3º dia pós operatório (PO) foram submetidos à avaliação pós-operatória e posteriormente 3 reavaliações foram realizadas a cada 5 dias, e no 20º dia as amostras foram retiradas após perfusão transcardíaca para posterior análise.

O teste do cilindro foi realizado apenas no pré-operatório, no 3º PO e na reavaliação 3 para evitar repetidas exposições do animal ao teste resultando em redução da exploração.

Desta forma temos um desenho experimental delineado abaixo:

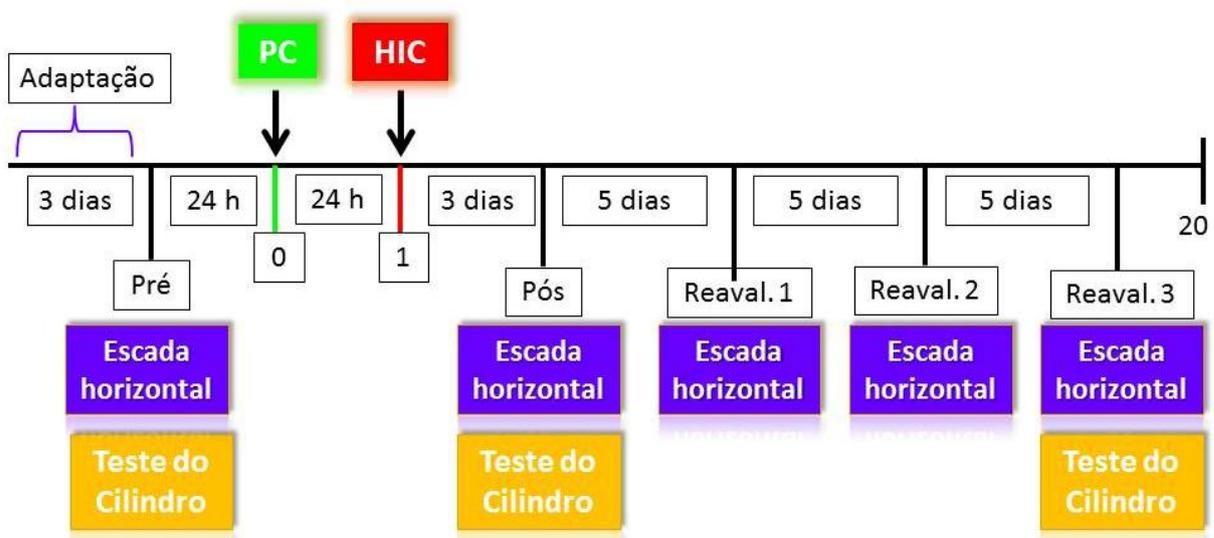


Figura 4: Desenho experimental

4.2 Modelo de pré-condicionamento isquêmico global

O modelo de pré-condicionamento utilizado no presente trabalho é um modelo de isquemia global transitória por oclusão de dois vasos (Cechetti *et al*, 2010). As artérias carótidas originam-se de uma ramificação da artéria aorta em um tronco comum que se divide novamente em uma porção interna e externa, onde a primeira da origem às artérias cerebral média e cerebral anterior (Figura 5), que são responsáveis pela irrigação da porção anterolateral do encéfalo e se comunicam com outras regiões através de artérias comunicantes formando o círculo de Willis (Grey H., 2000).

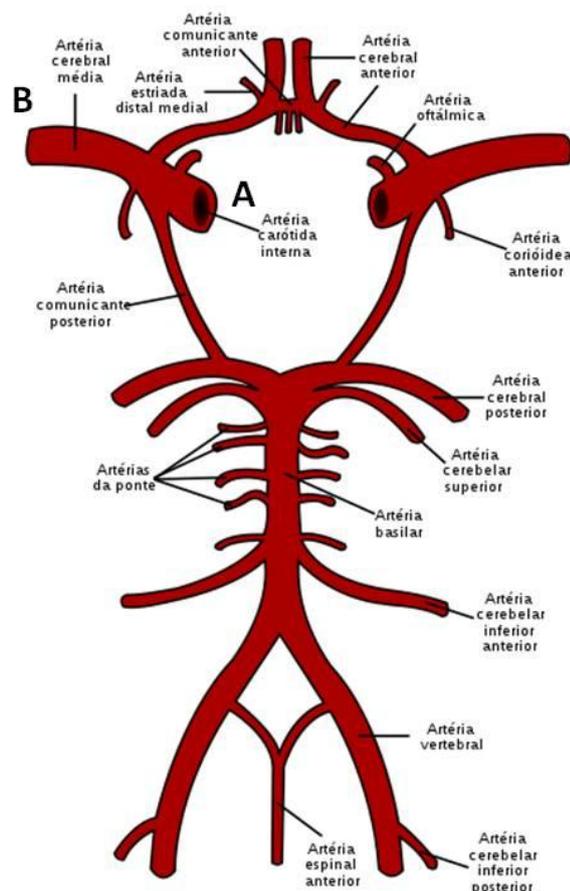


Figura 5: Imagem ilustrativa do círculo de Willis. A) Artéria carótida interna B) Artéria cerebral média (Adaptado de Grey H., 2000)

A oclusão das artérias carótidas leva a uma redução significativa do fluxo sanguíneo em regiões irrigadas pela artéria cerebral média, como o estriado (Smith *et al.*, 1984) e o hipocampo (Dowden, 1999). Tal redução é capaz de promover a ativação de mecanismos celulares de proteção como a ativação da microglia residente (A'brahám, 2000), porém sem levar a danos histológicos detectáveis (Nagahori *et al.*, 1994). Mostrando-se uma opção eficaz de modelo de pré-condicionamento isquêmico.

A indução do PC foi dividida em dois momentos, no dia anterior ao PC os animais foram anestesiados com isoflurano (4%) e mantidos com halotano (1,5% a 2%) utilizando-se um aparato de anestesia inalatória (Narcosul). Após profundamente anestesiados, foram colocados em posição dorsal para um melhor acesso a região do pescoço e após a região ter sido devidamente tricotomizada e limpa com álcool iodado, os animais sofreram uma incisão na linha média do pescoço, as artérias carótidas foram então localizadas, expostas e isoladas com um fio de sutura que foi colocado de forma a não interromper o fluxo sanguíneo das mesmas. Após o procedimento, a incisão foi fechada com um ponto. No dia seguinte, os animais foram submetidos à clipagem (Clipe para Aneurisma Intracraniano em liga de Cobalto Vicca) das carótidas por 10 ou 20 minutos de acordo com o desenho experimental. Os animais não submetidos ao PC sofreram os mesmos procedimentos dos demais, exceto a clipagem das carótidas.

4.3 Modelo de hemorragia cerebral induzida por collagenase

A injeção de collagenase derivada de *Clostridium histolyticum* no parênquima cerebral é um método bastante empregado atualmente com a finalidade de reproduzir a HIC, em especial nos núcleos da base. Introduzido no início dos anos 1990,

acredita-se que este modelo possa reproduzir experimentalmente, de modo satisfatório, os efeitos da HIC espontânea em humanos (Rosenberg *et al.*, 1990).

As colagenases são uma família de enzimas proteolíticas que catalisam a hidrólise do colágeno, sendo este um componente fundamental presente na membrana basal da barreira hemato-encefálica. A injeção de colagenase promove a dissolução da matriz extracelular ao redor dos capilares cerebrais, resultando em uma “hemorragia espontânea” no local da aplicação. As vantagens deste modelo incluem a simplicidade, a reprodutibilidade dos resultados, extensão hemorrágica dose-dependente e fácil adaptação do modelo para aplicação em várias espécies animais, incluindo ratos, camundongos e suínos. Desta forma, este modelo apresenta relevância clínica por promover a ruptura de pequenos vasos com baixa variabilidade técnica, obtendo-se uma hemorragia de extensão controlada (James *et al.*, 2007; MacLellan *et al.*, 2006 e 2008).

Os animais foram anestesiados com halotano (indução 4%, manutenção de 1,5% a 2%, em 70% de N₂O e 30% de O₂) utilizando-se um aparato de anestesia inalatória (Narcosul) e, após profundamente anestesiados, foram colocados em posição ventral no aparelho estereotáxico. Assim, realizou-se a tricotomia da região central da calvária do animal, a assepsia com álcool etílico e, com o auxílio de um bisturi cirúrgico, uma incisão na linha média de aproximadamente 0,5cm sobre a pele para exposição óssea do crânio. Após, utilizou-se uma broca odontológica especial (Beltec LB100) para realizar uma pequena trepanação que permitiu a passagem da seringa de injeção estereotáxica (Hamilton[®], n.º 26, USA). A HIC foi induzida no estriado esquerdo em todos os animais. Isto foi realizado por meio da micro-injeção de 0,2 U de colagenase tipo IV, derivada de *Clostridium histolyticum*, diluídas em 1µl de salina estéril, de acordo com as seguintes coordenadas

estereotáxicas: 0.0 mm anterior ao Bregma, +3.6 mm lateral ao Bregma e -6.0 mm ventral a partir do crânio (Paxinos e Watson, 2004). O volume foi injetado ao longo de 5 minutos e, antes da retirada da seringa, esperou-se adicionais 2 minutos a fim de minimizar possível refluxo (Szymanska *et al.*, 2006). Nos animais dos grupos Sham, PC 10 e PC 20 foi injetado o mesmo volume do veículo. A HIC foi realizada mediante controle de temperatura retal através de um termômetro (Letica, Espanha), de modo a não ultrapassar os limites de 36.5 a 37.5°C. Imediatamente após a sutura com fio de nylon cirúrgico, os animais receberam uma aplicação tópica de lidocaína 10% (Xilocaína[®]) e tiveram o comportamento monitorado.

Após a cirurgia, os animais foram examinados quanto ao sucesso do procedimento cirúrgico e ao consequente prejuízo motor. Todos os animais injetados com colagenase deveriam exibir déficit motor à direita contralateralmente ao hemisfério lesado (DeBow, 1993; MacLellan *et al.*, 2006), além de apresentar rotação espontânea na direção contralateral ao hemisfério lesado quando fossem suspensos pela cauda (Whishaw *et al.*, 1986). Caso o comportamento acima descrito não fosse evidenciado, o animal seria excluído do estudo.

A localização topográfica da hemorragia, a qual tipicamente inclui região lateral do estriado, bem como a extensão da lesão, foi evidenciada pela avaliação histológica utilizando-se a técnica de coloração por hematoxilina-eosina, como será descrito posteriormente.

4.4 Avaliação comportamental

4.4.1 Teste da escada horizontal

O teste da escada horizontal tem sido empregado para avaliar a coordenação e a habilidade na execução da marcha, principalmente em estudos que envolvem danos

ao SNC, como por exemplo, na HIC e nas alterações do envelhecimento, possibilitando a avaliação dos erros de colocação dos membros que ocorrem durante a marcha de roedores (Metz e Whishaw, 2002). O aparato para a realização do referido teste consiste em duas paredes de acrílico transparente (1 m de comprimento por 20 cm de altura) e traves de metal (3 mm de diâmetro cada) que são inseridas inferiormente, entre as paredes, com uma distância mínima de 1cm entre elas, caracterizando, assim, a forma que confere o nome de escada horizontal ao teste (Figura 6). A escada permanece elevada 30 cm do solo, existindo um refúgio escuro para o animal ao final da sua extensão. A largura do aparato é ajustada ao tamanho do animal, permanecendo cerca de 1cm mais larga que o mesmo, de modo a evitar que o animal caminhe em torno de si ou vire-se no sentido contrário ao teste (Metz e Whishaw, 2002).

A dificuldade do teste pode ser modificada pela variação na posição das traves de metal. Um padrão regular das traves permite que o animal aprenda a posição das mesmas ao longo de várias sessões de treino, e dessa forma, antecipe a colocação dos membros. Modificando-se esse padrão regular para um padrão irregular, entre as diferentes tentativas, prevenimos o aprendizado do animal quanto à pré-localização da distribuição das traves. Na forma de arranjo regular (utilizada nas sessões de aclimatação), as traves eram espaçadas em intervalos de dois centímetros. Para o padrão irregular (utilizado nas avaliações), as traves eram espaçadas em intervalos de um a cinco centímetros. Ao total, foram utilizadas cinco distribuições irregulares diferentes, porém as mesmas distribuições foram empregadas para todos os animais com a finalidade de padronizar a dificuldade do teste e aumentar a comparabilidade dos resultados. Todas as sessões de avaliação (3 *trials* por animal em cada avaliação) foram filmadas e a mensuração do desempenho foi realizada por meio da

análise do número de erros, expressa em percentual de erros (MacLellan *et al.*, 2006). A padronização dos movimentos que configuram erros ou acertos foi realizada conforme escala previamente descrita, a qual, resumidamente, apresenta 7 tipos de situações (6 formas de erros e 1 acerto) (Metz e Whishaw, 2002; MacLellan *et al.*, 2006)

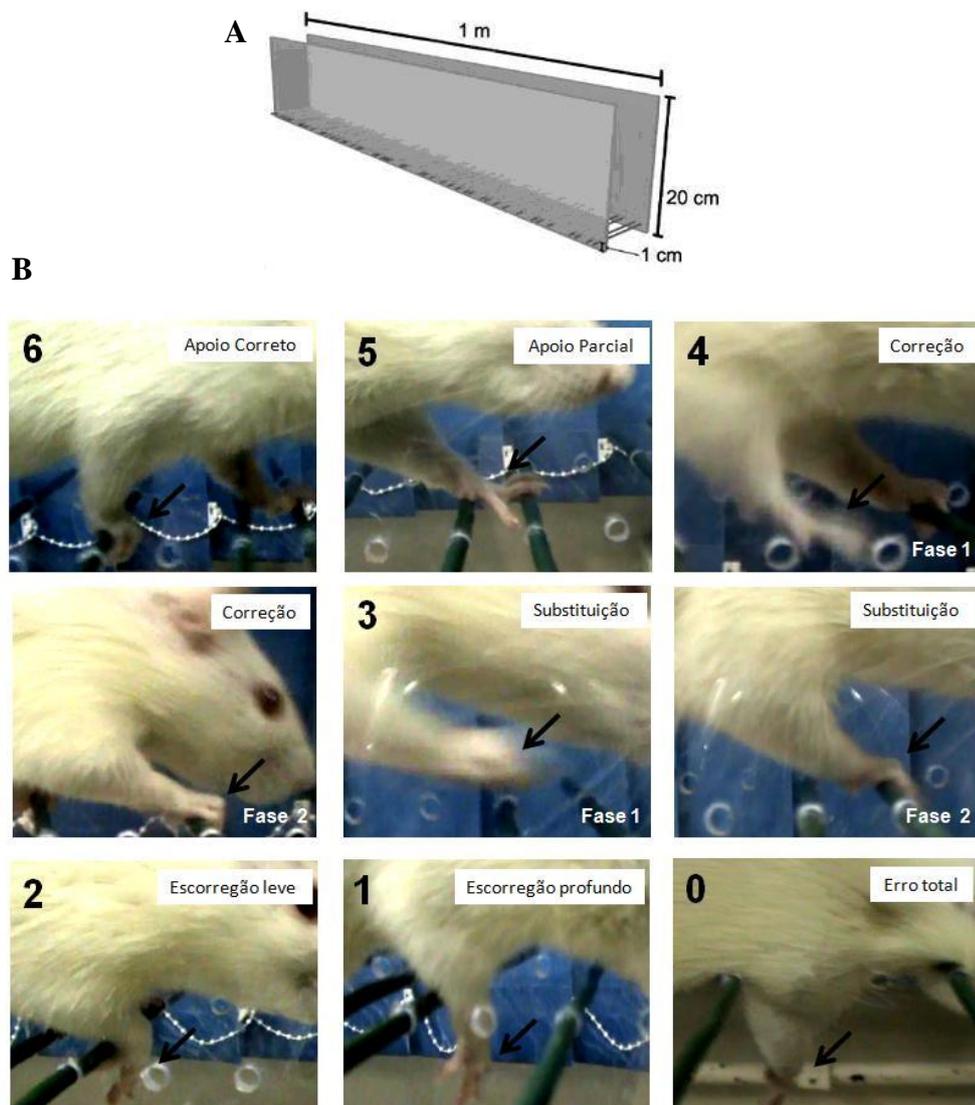


Figura 6: Teste da escada horizontal. (A) ilustração do aparato utilizado para a realização do teste da escada horizontal (adaptado de Metz e Whishaw, 2002). (B) escore de contagem de erros: 0- erro total; 1- escorregão profundo; 2- escorregão leve; 3- substituição; 4- correção; 5- colocação parcial; 6- colocação correta (acerto). (Mestriner, 2010)

4.4.2 Teste do cilindro

O teste do cilindro visa avaliar o uso assimétrico dos membros anteriores durante a realização de uma tarefa de exploração e suporte corporal (Schallert *et al.*, 2006; Woodley *et al.*, 2005; MacLellan *et al.*, 2006). Para tanto, os animais foram colocados no interior de um cilindro acrílico de 20 cm de diâmetro e 40 cm de altura, situado sobre um tampo de mesa de vidro (Figura 7). Após, foi realizada a filmagem de cada animal, individualmente (durante 5 minutos), através de um espelho angulado (vista inferior do animal) de modo a possibilitar a observação dos movimentos exploratórios espontâneos dos mesmos. O número de contatos dos membros anteriores com as paredes do cilindro, utilizadas para o suporte corporal durante a exploração, foi computado e os animais que não realizassem pelo menos 12 contatos exploratórios independentes eram excluídos da análise. Para a realização deste teste os animais não foram aclimatados, visto que uma maior exploração por parte do animal pode tornar o mesmo mais fidedigno quanto aos resultados.

A quantificação do uso assimétrico dos membros anteriores foi realizada com base na análise das imagens filmadas em câmera lenta e quadro por quadro (feita por avaliador cego quanto aos grupos experimentais), sendo, posteriormente calculado por meio da fórmula: $\left(\frac{\text{contatos realizados com o membro anterior ipsilateral}}{\text{número total dos contatos realizados com ambos os membros anteriores}} \times 100 \right)$ (Sanches *et al.*, 2013).

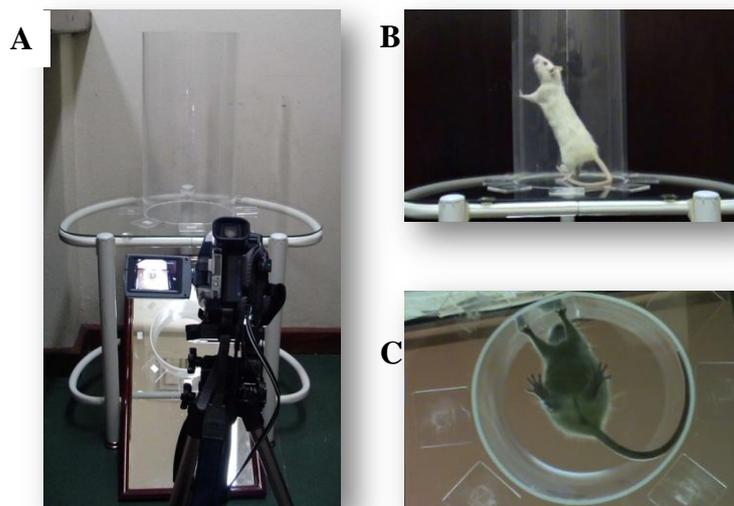


Figura 7: Teste do cilindro. (A) aparato para a realização do teste; (B) vista lateral de animal realizando a exploração; (C) vista inferior do mesmo, utilizada para a análise das imagens (Mestriner *et al.*; 2011).

4.4.3 Perfusão

Depois de finalizados os testes comportamentais, os animais foram submetidos aos protocolos histológicos e imunoistoquímicos, como rotineiramente realizado por uma série de estudos relacionados (Gharbawie *et al.*, 2005; MacLellan *et al.*, 2006; Derksen *et al.*, 2007). Para tanto, os animais foram profundamente anestesiados com hidrato de cloral (30%, 10mL/Kg) pela via intra-peritonial, sendo realizado, posteriormente, a toracotomia com exposição do coração. A seguir, foram injetadas 1000 UI de heparina sódica (Cristália) no ventrículo esquerdo, e por meio de uma incisão neste mesmo ventrículo se inseriu uma cânula ligada a uma bomba de perfusão (Insight). Após uma segunda incisão, desta vez, no átrio direito, foi perfundida, inicialmente, uma solução salina (150 ml), para lavagem da árvore vascular e, posteriormente, uma solução fixadora (200 ml) composta de paraformaldeído (PFA) 4% diluído em tampão fosfato (TF) 0,1 M pH 7,4. Após esse procedimento, os encéfalos foram retirados por meio da abertura da calota craniana sendo pós-fixados na mesma solução fixadora utilizada para a perfusão, por mais 4

horas à temperatura ambiente. Posteriormente, eles foram crioprotégidos pela imersão em sacarose 30% diluída em TF a 4°C, onde permaneceram até submergirem. Depois de realizar a crioproteção, os encéfalos foram congelados em isopentano resfriado em nitrogênio líquido e armazenados à -80°C até a realização das secções (20 µm) em criostato (Leitz).

4.4.4 Volume da lesão

Para a avaliação histológica do volume da lesão, foram selecionadas secções a cada 20 µm, iniciando em Bregma +1,7 mm e terminando em Bregma -4,8 mm (Paxinos e Watson, 2004; MacLellan *et al*, 2006). Os cortes foram corados com a técnica de hematoxilina-eosina. Para tanto, os mesmos passaram pelo seguinte protocolo: Hidratação em H₂O destilada (3 minutos), hematoxilina de Mayer por (5 minutos), H₂O destilada (3 minutos) eosina 0,5% (3 minutos), diferenciada em álcool 70% com 1% de HCL, e foi posteriormente desidratado com concentrações crescentes de álcool até 100%, por fim uma imersão em xilol. Em seguida, as lâminas foram montadas e cobertas por bálsamo do Canadá e lamínulas.

Ao final do referido processamento histológico, as lâminas foram escaneadas (escâner HP scanjet 2400) na resolução de 2400 e o volume do hemisfério foi mensurado utilizando o software *Scion Image J 4.6* (Scion Corporation, Frederick, MD, USA) e o princípio de Cavalieri foi utilizado para calcular o volume, como previamente descrito (Gundersen *et al.*, 1988; Sanches *et al* 2013).

$$VH = M \times IS \times NS, \text{ onde:}$$

VH = volume de um hemisfério;

M = (área total da secção coronal do hemisfério – área do ventrículo – área do dano);

IS = intervalo entre secções;

NS = número de secções.

4.4.5 Imunofluorescência

A técnica de imunofluorescência foi realizada utilizando-se secções que continham áreas de representação do estriado dorsolateral. Resumidamente, as mesmas foram lavadas em PBS e, após, bloqueadas por 30 min em uma solução contendo 5% de soro normal de cabra (NGS) (Sigma-Aldrich) diluídos em PBS Triton-X à 0,4% (PBS-Tx) em temperatura ambiente. Em seguida, as secções foram incubadas por 48 horas com os anticorpos primários (anti-GFAP 1:200, Sigma-Aldrich) e (CD11b 1:100, Milipore) diluído em PBS-Tx e NGS e mantidas em câmara fria (4°C). Posteriormente, as secções foram lavadas em PBS e incubadas com o anticorpo secundário fluorescente (1:500, *anti-rabbit* IgG Alexa 555 para GFAP e, 1:500, *anti-mouse* IgG Alexa 555 para CD11b) diluído em PBS-Tx e NGS por 2 horas em uma sala escura (temperatura ambiente), seguida de lavagem em PBS. Depois disso, os cortes foram montados em lâminas, cobertos com meio de montagem Fluoroshild (Sigma-Aldrich) e lamínulas. Todas as amostras foram processadas concomitantemente e incubadas durante o mesmo tempo médio. Decorrido o procedimento acima descrito, utilizou-se um microscópio (Nikon) para a visualização das marcações fluorescentes (excitação no comprimento de onda 555 nm).

4.4.6 Quantificação da imunofluorescência

Para comparar quantitativamente a marcação de imunofluorescência para as marcações de GFAP e CD11b, foram utilizadas 6 imagens capturadas de cada animal, obtidas de 3 fatias escolhidas ao acaso na borda medial da lesão (mas excluindo a lesão propriamente dita, para não alterar os resultados) para os animais submetidos a HIC ou na região correspondente nos animais que receberam apenas veículo (Figura 8). Uma área de interesse foi estipulada ($3800 \mu\text{m}^2$), de 5 a 6 animais foram analisados para cada grupo.

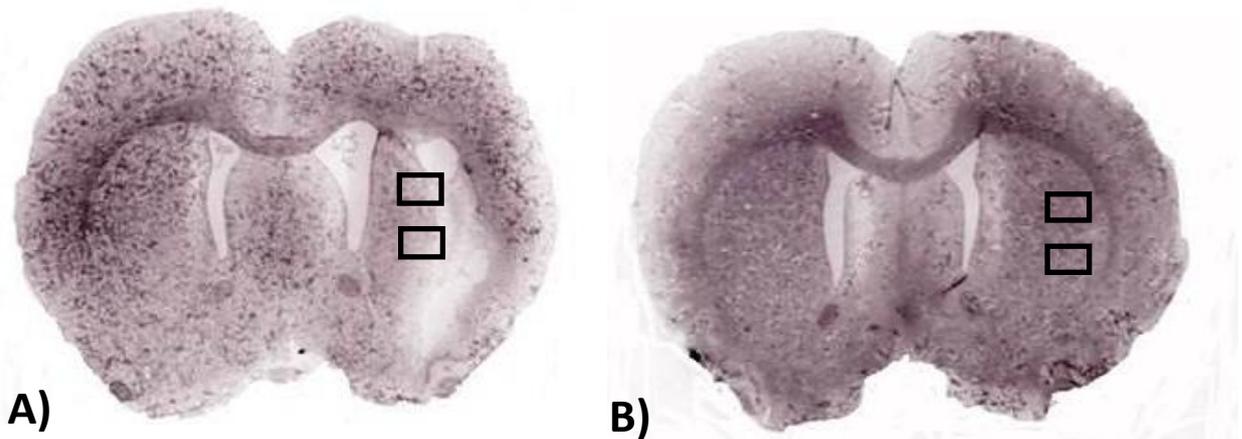


Figura 8: Imagem representativa das regiões de onde foram obtidas as imagens para a avaliação das marcações da imunofluorescência. A) Borda medial da lesão hemorrágica no estriado esquerdo; B) Região correspondente no estriado esquerdo dos animais que receberam apenas veículo.

Após a captura, as imagens foram analisadas com o programa Image J *software* v.1.46 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), onde o valor da densidade integrada por unidade de área ou (densidade óptica regional) foi obtida. Os valores das áreas de interesse de cada imagem foram utilizadas para obter a intensidade de coloração média de GFAP e CD11b para cada secção, se utilizando da densidade integrada (dado gerado pelo programa) / área de interesse ($3800 \mu\text{m}^2$), se obteve a intensidade de fluorescência. Assim, se fez a média de cada secção e de cada animal, para posterior análise estatística (Jeong *et al.*, 2012).

4.5 Análise estatística

Inicialmente, a normalidade dos dados foi testada através do teste de Levene, de modo que todas as variáveis estudadas apresentaram distribuição normal ($p \geq 0,05$). Após os dados morfológicos e o teste do cilindro foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, e no teste da escada horizontal os dados foram analisados por uma (ANOVA) de duas vias de medidas repetidas. Sempre que apropriado, o teste de comparações múltiplas de Duncan foi empregado em todas as análises realizadas. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão.

O software IBM SPSS Statistics versão 19 foi utilizado para a análise dos dados.

5 Resultados

No presente estudo, as avaliações morfológicas e comportamentais foram realizadas por experimentadores alheios aos grupos experimentais. Quanto ao “n”, 2 animais morreram após a indução da HIC, todos os animais incluídos no estudo foram utilizados para as análises comportamentais (n=58) estando os mesmos divididos entre os grupos experimentais conforme descrito anteriormente. Para a análise histológica, foram utilizados 36 encéfalos, provenientes dos mesmos animais empregados na análise comportamental.

5.1 Volume da lesão

A verificação da normalidade dos dados foi realizada pelo teste Levene ($p=0,281$). A ANOVA de duas vias demonstrou efeitos quanto ao fator “cirurgia” (que inclui os níveis HIC e veículo) ($F_{(1,34)} = 116,75$; $p<0,001$) e também quanto ao fator tratamento (pré-condicionamento PC10, PC20 e sem PC) ($F_{(2,34)} = 2,94$; $p<0,01$). Para observar as diferenças entre os grupos, foi realizada uma ANOVA de uma via seguida do *post hoc* de Duncan que evidenciou diferenças significativas entre os grupos HIC e os demais grupos, assim como os grupos HIC+PC10 e HIC+PC20 foram diferentes do grupo HIC e dos grupos que receberam *Sham*, PC10 e PC20 ($F_{(5,34)} = 30,42$; $p<0,01$) (Figura 9A, 9B).

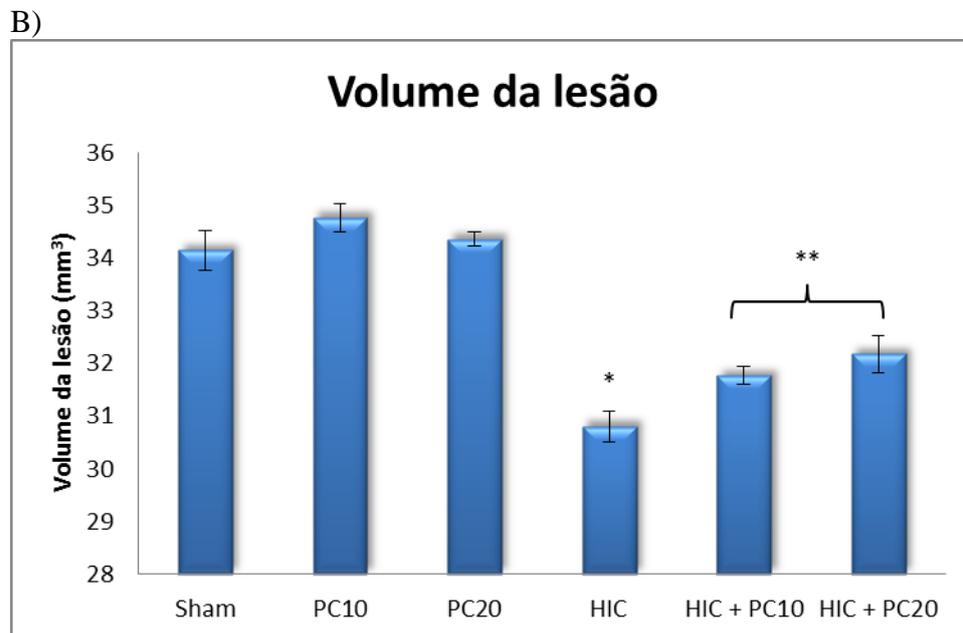
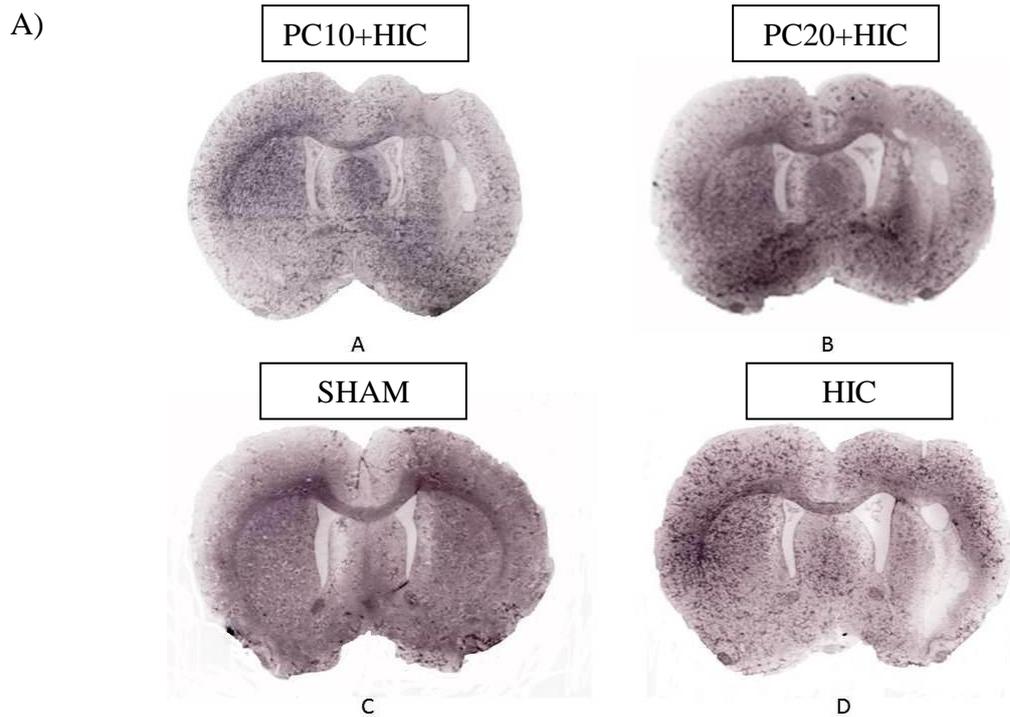


Figura 9: A) Imagem ilustrativa da lesão nos diferentes grupos (Os que receberam veículo foram representados pela figura do grupo sham visto que os mesmos não apresentam lesão).

B) Volume da lesão 20 dias após a cirurgia. Gráfico demonstrando o volume tecidual perdido 20 dias após a cirurgia em animais que receberam veículo e HIC. * Diferença entre o grupo HIC e os demais ($p < 0,001$), ** diferença entre os grupos HIC+PC10 e HIC+PC20 e os demais ($p < 0,01$) expresso pela média \pm erro padrão.

5.2 Teste do Cilindro

No tempo pré-cirúrgico (dia -3) a ANOVA de duas vias (lesão e tratamento) evidenciou não haver diferenças entre os grupos experimentais, possuindo os animais médias de 50% de toques com os membros anteriores. Na primeira avaliação pós-operatória (dia +4) a ANOVA de duas vias mostrou efeito da lesão sobre o uso dos membros ($F_{(1,57)} = 20,31, p < 0,001$), onde os animais submetidos a HIC mostraram um uso assimétrico dos membros anteriores. A análise estatística não demonstrou diferenças significativas entre os grupos no dia da reavaliação 3 (dia +19) (Figura 10).

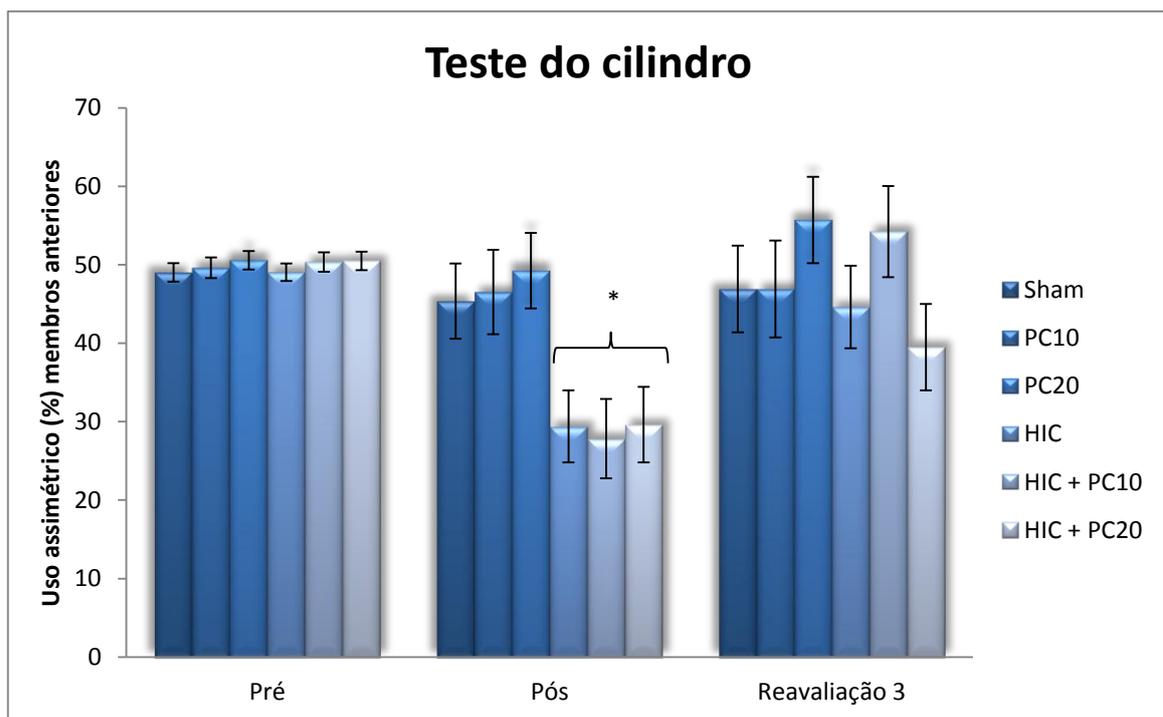


Figura 10: Uso assimétrico dos membros anteriores no teste do cilindro. * Diferença entre os grupos submetidos a HIC em comparação aos grupos sham, PC10 e PC20 ($p < 0,001$) apenas na avaliação pós-operatória expresso pela média \pm erro padrão.

5.3 Teste da escada horizontal

A ANOVA de medidas repetidas para o membro anterior direito (MAD) (contralateral à injeção estereotáxica) revelou efeitos significantes do fator “tempo” ($F_{(4,57)} = 69,47$ $p < 0,001$), do fator “cirurgia” ($F_{(4,57)} = 51,54$ $p < 0,001$) além da interação entre os fatores “tempo” x “cirurgia” ($F_{(4,57)} = 16,04$ $p < 0,001$), não havendo efeito do PC ($F_{(2,57)} = 1,49$ $p = 0,23$). Para o membro posterior direito (MPD) a (contralateral à injeção estereotáxica) a análise revelou efeitos significantes do fator “tempo” ($F_{(4,57)} = 13,16$ $p < 0,001$), do fator “cirurgia” ($F_{(4,57)} = 27,21$ $p < 0,001$) além da interação entre os fatores “tempo” x “cirurgia” ($F_{(4,57)} = 5,13$ $p < 0,001$), não havendo efeito do PC ($F_{(2,57)} = 0,95$ $p = 0,39$). Em relação aos membros ipsilaterais ao hemisfério lesado a ANOVA de medidas repetidas evidenciou efeito do fator “tempo” ($F_{(4,57)} = 18,53$ $p < 0,001$), do fator “cirurgia” ($F_{(4,57)} = 10,87$ $p < 0,01$) além da interação entre os fatores “tempo” x “cirurgia” ($F_{(4,57)} = 3,92$ $p < 0,01$), não havendo efeito do PC ($F_{(2,57)} = 0,86$ $p = 0,42$) para o membro anterior esquerdo (MAE), em relação ao membro posterior esquerdo (MPE) não houve efeitos de nenhum dos fatores avaliados. O teste de comparações múltiplas demonstrou que os grupos HIC tiveram mais erros na colocação do referido membro quando comparado com os grupos *sham*, PC10 e PC20 ($p < 0,05$), não apresentando efeitos em relação ao pré-condicionamento. Nenhuma diferença foi evidenciada em relação aos grupos que receberam veículo (*Sham*, PC10 e PC20) (Figura 11).

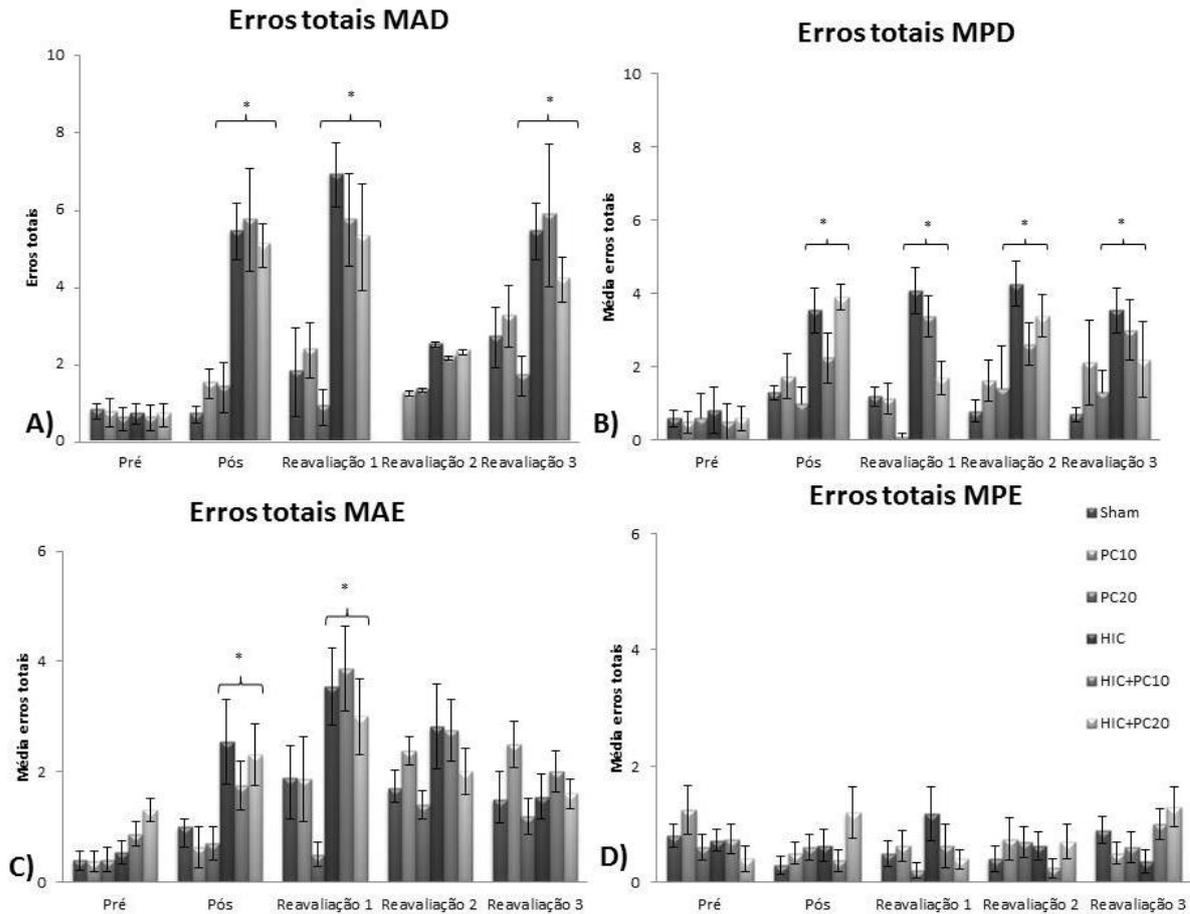


Figura 11: Número de erros totais dos membros anteriores e posteriores na escada horizontal. A) Avaliação do membro anterior direito (MAD) (contralateral ao hemisfério lesado) nos diferentes tempos avaliados; B) Avaliação do membro posterior direito (MPD) (contralateral ao hemisfério lesado) nos diferentes tempos avaliados; C) Avaliação do membro anterior esquerdo (MAE) (ipsilateral ao hemisfério lesado) nos diferentes tempos avaliados; D) Avaliação do membro posterior esquerdo (MPE) (ipsilateral ao hemisfério lesado) nos diferentes tempos avaliados. * Diferença entre os grupos submetidos a HIC em comparação aos grupos *sham*, PC10 e PC20 ($p < 0,05$).

5.4.1 Densidade de astrócitos GFAP+

A ANOVA de duas vias mostrou um efeito da lesão ($F_{(1,30)} = 25,06$ $p < 0,001$), assim como uma interação entre os fatores lesão e tratamento ($F_{(2,30)} = 3,39$ $p \leq 0,05$). Como demonstrado abaixo (Figura 12). Após, realizamos uma ANOVA de uma via para observar a diferença entre os grupos onde foi constada diferença entre o grupo HIC e os demais grupos e entre os grupos HIC+PC10 e HIC+PC20 e os demais ($F_{(5,30)} = 11,17$ $p < 0,001$). Os grupos submetidos à HIC tiveram uma maior intensidade astrócitos GFAP+ por volume tecidual do que os grupos que receberam apenas veículo ($p < 0,001$), e os grupos HIC+PC10 e HIC+PC20 foram diferentes dos demais grupos ($p < 0,001$).

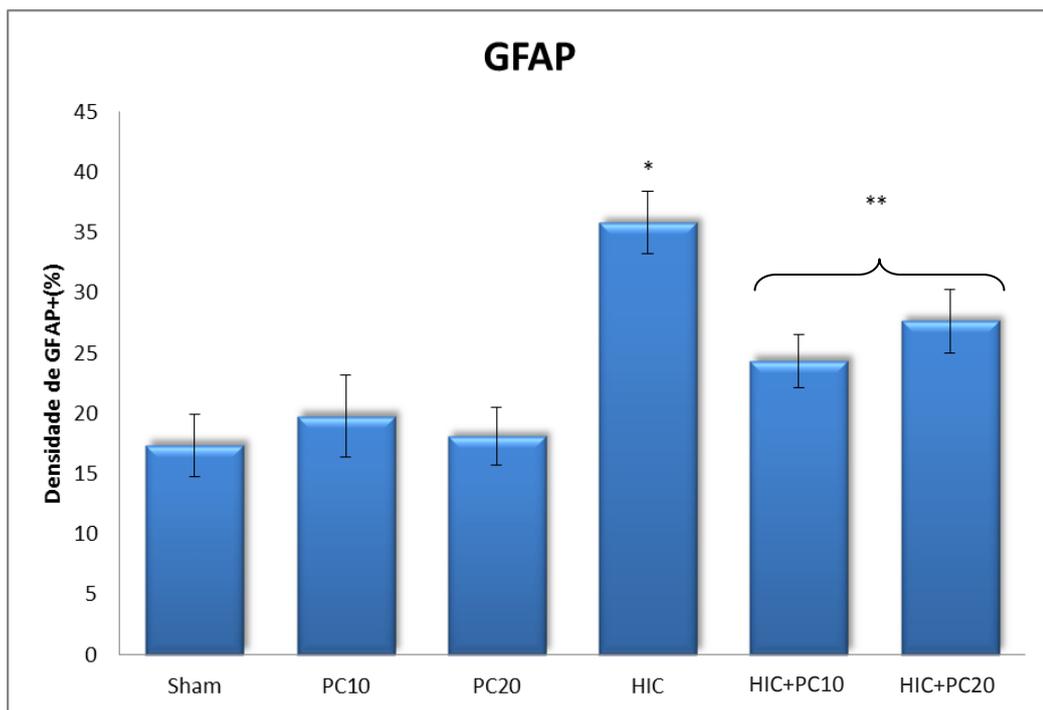


Figura 12: Densidade óptica regional de células GFAP+ no estriado dorsolateral esquerdo nos diferentes grupos experimentais. * Diferença entre os grupos submetidos a HIC e os que receberam veículo. ** Diferença entre os grupos HIC+PC10 e HIC+PC20 e os demais grupos.

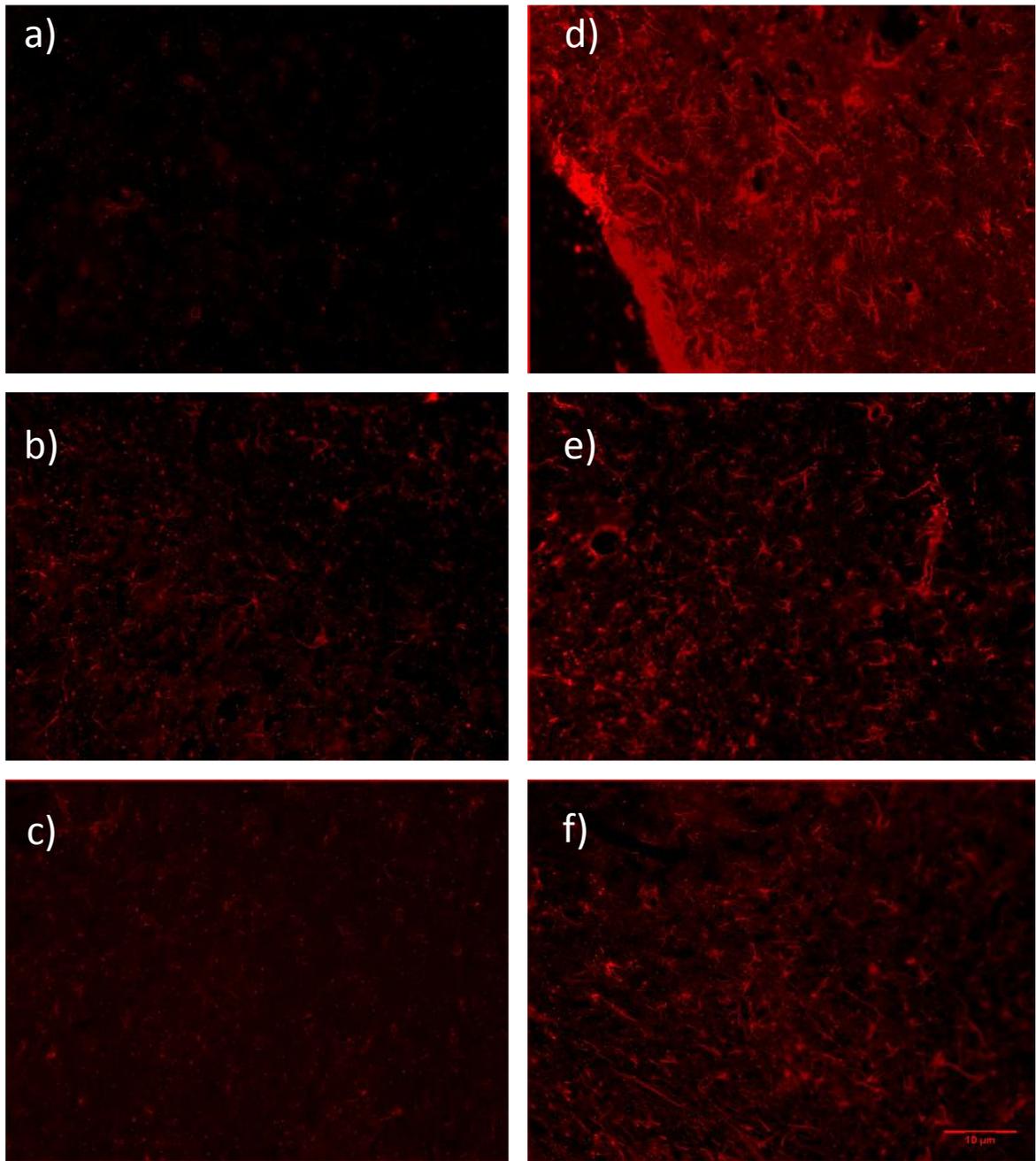


Figura 13: Imagem representativa da imunofluorescência para astrócitos GFAP+ dos grupos: a) sham, b) PC10, c) PC20, d) HIC, e) HIC+PC10 e f) HIC+PC20

5.4.2 Densidade células CD11b+

A análise da densidade óptica regional de células microgliais CD11b+ apresentou resultados significativos quanto ao fator lesão no estriado dorsolateral adjacente à injeção estereotáxica por meio da ANOVA de duas vias ($F_{(5,30)} = 2,76$ $p=0,005$). Não apresentando resultados significativos quanto ao fator tratamento nos testes de comparações múltiplas. Como demonstrado abaixo (Figura 13), os grupos submetidos à HIC tiveram mais células CD11b+ por volume tecidual do que os grupos *sham*, PC10 e PC20 ($p=0,002$).

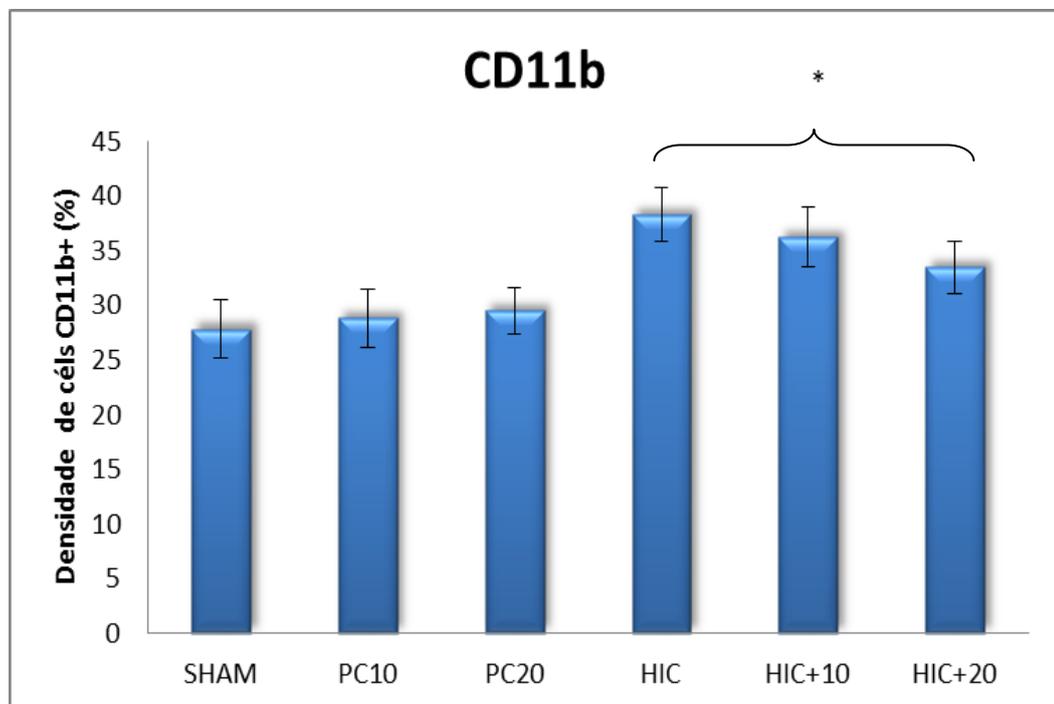


Figura 14: Densidade óptica regional de células CD11b+ no estriado dorsolateral esquerdo nos diferentes grupos experimentais. * Diferença entre os grupos submetidos a HIC e os que receberam veículo, expresso pela média \pm erro padrão.

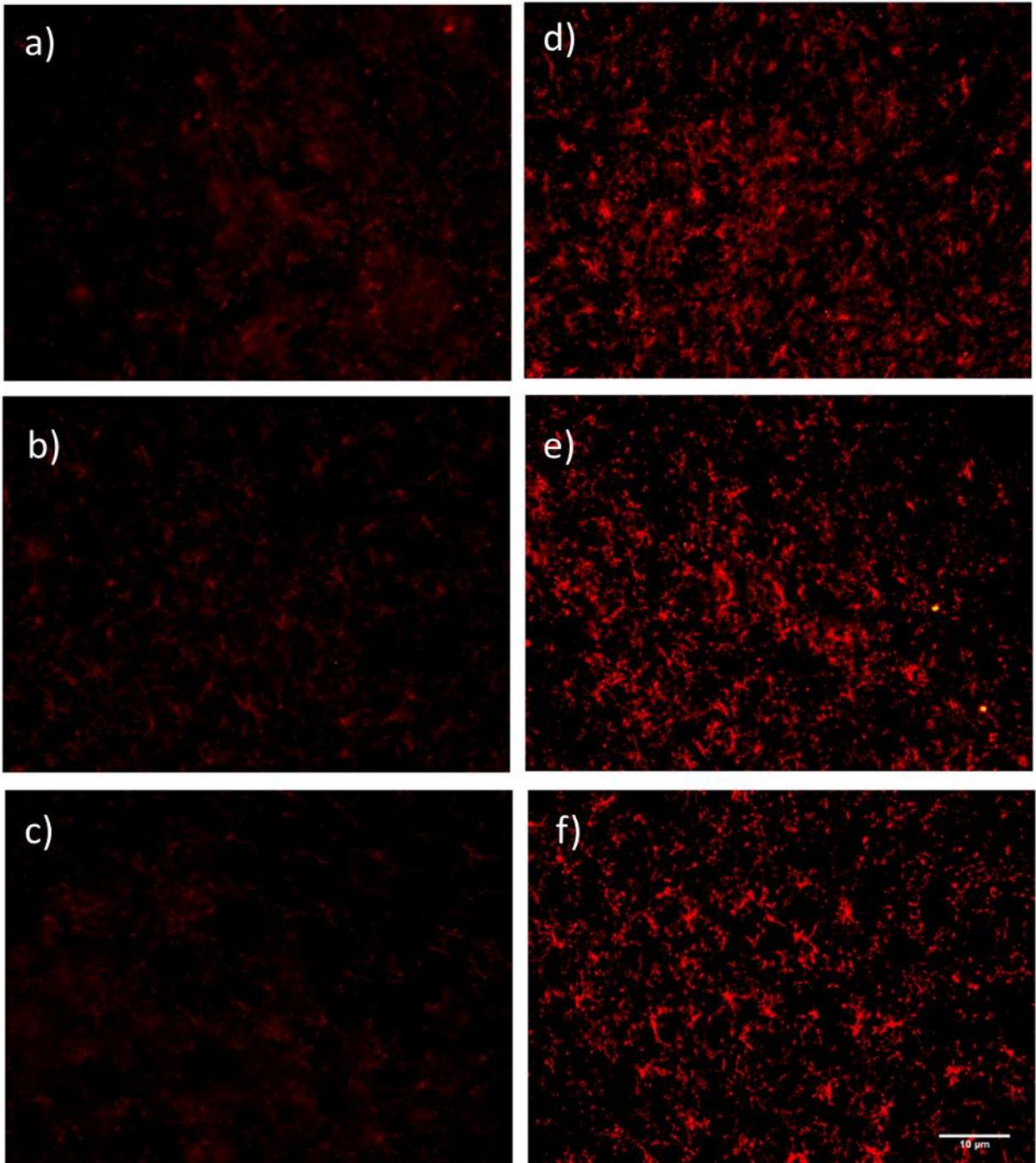


Figura 15: Imagem ilustrativa da marcação de células microgliais CD11b+ por imunofluorescência dos grupos: a) sham, b) PC10, c)PC20, d)HIC, e)HIC+PC10 e f) HIC+PC20

6. Discussão

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do pré-condicionamento isquêmico induzido pela oclusão bilateral das artérias carótidas comuns durante 10 ou 20 minutos sobre os déficits motores, morfologia da lesão, expressão de proteínas relacionadas com a cerebroproteção em ratos submetidos à HIC induzida por colagenase do tipo IV-S.

Os principais achados do presente trabalho demonstram que o pré-condicionamento isquêmico promoveu uma cerebroproteção capaz de reverter parcialmente o volume da lesão provocada pela micro injeção de colagenase e de reduzir a densidade óptica regional a GFAP+ em astrócitos localizados na periferia da lesão hemorrágica, no entanto ele não foi capaz de promover neuroproteção em nível funcional detectável pelos testes realizados.

Diversos estudos experimentais vêm demonstrando que um breve período de isquemia promove uma considerável proteção contra um subsequente e prolongado período de isquemia. Esse fenômeno é conhecido como pré-condicionamento isquêmico, ocorrendo em várias espécies e em diversos órgãos incluindo o encéfalo (Murry *et al.*, 1986; Yadav *et al.*, 1999; Durukan e Tatlisumak, 2010).

O PC isquêmico em modelos animais de isquemia induz a uma evidente cerebroproteção a uma isquemia grave subsequente (Stenzel-Poore *et al.*, 2003). Há também evidências de que a ocorrência de ataques isquêmicos transitórios (AITs) possa atenuar a gravidade de um AVE posterior em humanos (Weih *et al.*, 1999; Wegener *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2008).

Um importante achado do presente estudo é que o PC foi capaz de reduzir parcialmente o volume da lesão hemorrágica promovida pela injeção de colagenase IV-S. Este dado corrobora com o fato de que o PC isquêmico é capaz de reduzir o

volume da lesão, em um estudo que utilizou um modelo de PC isquêmico por oclusão da artéria cerebral média durante 20 minutos (Longa *et al.*, 1989), vinte quatro horas antes da oclusão permanente onde foi observado uma significativa redução do volume da lesão (57,5 %) quando comparado aos animais que não receberam PC (Zhao *et al.*, 2006). Assim como em nosso estudo, eles demonstraram também que o PC sozinho não produziu lesão detectável.

Outro estudo avaliou os efeitos do PC sobre o volume da lesão, mediada pelo PC isquêmico induzido por 3 minutos de oclusão da artéria cerebral média em ratos *Wistar* seguida por uma hora de oclusão, e foi observada uma redução do volume da lesão tanto no córtex como no estriado quando a janela de tempo entre o PC e a isquemia focal foi de 24 e 48 horas, mas tal proteção não ocorreu quando a isquemia focal foi provocada 30 minutos ou 168 horas após o pré-condicionamento (Puisieux *et al.*, 2004)

Apesar da hemorragia e da isquemia possuírem diferenças fisiopatológicas, os mecanismos de proteção promovidos pelo PC isquêmico podem trazer benefícios tanto para eventos isquêmicos quanto para hemorrágicos (He *et al.*, 2012). Isso possivelmente ocorre, pois os mecanismos de proteção induzidos pelo PC isquêmico interferem em vias comuns de lesão, como a ativação de moléculas inflamatórias, na excitotoxicidade e na liberação de espécies reativas e oxigênio (Liu *et al.*, 2009). A tolerância-cruzada ocorre quando um estímulo de uma natureza leva a proteção tecidual mesmo quando este tecido é exposto a um estímulo diferente, podendo ser desencadeada por uma série de estímulos como hipóxia (Rauca *et al.*, 2000), anestesia (Kitano *et al.*, 2007), administração de antibiótico (eritromicina) (Koerner *et al.*, 2007), pela realização de exercícios (Dornbos *et al.*, 2013), substâncias pró-inflamatórias como o lipopolissacarídeo (LPS) (Vartanian *et al.*, 2011), entre outros.

Tais estímulos diferem em sua natureza, no entanto, devido a um motivo comum (provavelmente através da indução de modificações genéticas), todos promovem tolerância tecidual (Durukan e Tatlisumak, 2010). Tais evidências corroboram com o referido efeito citoprotetor observado em nosso trabalho.

Outro achado do presente estudo é que o PC promoveu uma redução parcial da densidade óptica regional de astrócitos GFAP+. Os astrócitos estão estrategicamente localizados entre os vasos sanguíneos e os neurônios. Eles agem como sensores para alterações no ambiente encefálico e reagem a tais mudanças imediatamente por respostas genômicas (por exemplo através da produção de fatores tróficos) ou não genômicas (por exemplo pela captação de íons) (Trendelenburg e Dirnagl, 2005). Os astrócitos apresentam um papel dual na presença de lesões do sistema nervoso central, podendo exercer funções benéficas como a recaptação de neurotransmissores prevenindo a excitotoxicidade, mas também podem ser prejudiciais à regeneração tecidual pela formação da cicatriz glial (Sofroniew *et al.*, 2009).

Os astrócitos parecem ter um papel chave na resposta inflamatória encefálica pós-AVE, por iniciar e regular tal resposta através da liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Ridet *et al.*, 1997). A astrogliose pode ser classificada segundo a sua intensidade em leve, moderada e grave. Na primeira não ocorre mudança na arquitetura tecidual, há apenas o aumento da expressão dos filamentos intermediários, de modo especial, a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), a vimentina e a re-expressão de nestina pelos astrócitos reativos (Hernandez *et al.*, 2002). Em casos moderados pode ocorrer a hipertrofia do corpo celular, mas os domínios astrocitários são mantidos e ocorre pouca ou nenhuma proliferação celular (Wilhelmsson *et al.*, 2006). Já na astrogliose reativa grave, ocorre um aumento da

expressão dos filamentos indermediários, hipertrofia do corpo celular ainda mais pronunciada, proliferação celular e perda dos domínios celulares resultando em uma reorganização da arquitetura tecidual, o que resulta na formação da cicatriz (Sofroniew *et al.*, 2009).

Zhan e colegas recentemente demonstraram que o PC induzido por 30 minutos de hipóxia 24 horas antes de uma isquemia global transitória, foi capaz de promover a redução da expressão de GFAP e aumento da sobrevivência neuronal no hipocampo (Zhan *et al.*, 2013) indo de encontro com os resultados encontrados em nosso trabalho. Apesar de haver diferenças quanto às regiões estudadas e quanto à natureza do PC, acreditamos que este resultado reforce os achados de nosso estudo. Outro estudo clássico demonstrou a mesma redução da reatividade astrocitária em animais submetidos ao PC isquêmico por um modelo de isquemia global transitória por 2 minutos em gerbilos (Kato *et al.*, 1994).

Consideramos como positivo o nosso achado de que o PC no presente estudo, foi capaz de amenizar a ativação glial extrema. Adicionalmente, sua ativação após a HIC encontrada nos grupos que receberam PC pode ser uma tentativa endógena de reparo tecidual.

Outro tipo celular importante na mediação da resposta ao dano no SNC é a microglia, que também foi investigada em nosso trabalho. No entanto, vinte dias após a indução da HIC não houve diferença significativa avaliada pela densidade óptica regional da marcação de CD11b dos grupos que foram submetido ao PC e HIC comparados ao grupo que recebeu apenas HIC.

Ábrahám e Lázár demonstraram que 20 minutos de oclusão bilateral das artérias carótidas comuns é capaz de promover uma importante ativação microglial, (Ábrahám e Lázár, 2000) que pode levar a uma cerebroproteção. No entanto, essa

ativação é reduzida com o passar das horas até ser praticamente revertida 72 horas após. Tal achado está de acordo com estudos que apontam para uma janela de proteção do PC (Kirino, 2002; Durukan e Tatlisumak, 2010). A ativação microglial promovida pelo PC é importante indutor de tolerância tecidual por ativar mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-1 β (Wang *et al.*, 2006). A redução da ativação microglial com o passar do tempo sugere que tal ativação é reversível, durante um breve período de isquemia leve provavelmente não ocorra formação de radicais livres e o reestabelecimento do fluxo sanguíneo resulta em recuperação funcional (Ábrahám e Lázár, 2000).

Na presença de lesões graves como a HIC onde ocorre morte neuronal, as células microgliais são ativadas, participam da ativação da resposta inflamatória e realizam sua função de fagocitar os restos celulares (Ábrahám e Lázár, 2000). Como em outros tecidos, a inflamação no encéfalo pode apresentar duas faces. Enquanto os efeitos deletérios da inflamação após o AVE são amplamente conhecidos, uma visão mais recente indica que pode ocorrer proteção e regeneração na isquemia mediada pela inflamação (Dirnagl, 2004). Um exemplo disso é que baixas doses de Lipopolisacarídeo (LPS), que estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias, pode promover proteção à isquemia subsequente (Vartanian *et al.*, 2011). Evidências indiretas indicam que certos tipos de reações inflamatórias podem ser tanto neuroprotetoras quanto neurodegenerativas de acordo com a fase da lesão e com a intensidade da reação (Trendelenburg e Dirnagl, 2005). Tal resposta tem início cerca de 1 hora após a lesão, seu pico ocorre entre o 3^o e o 7^o dia após e persiste por 3 a 4 semanas (Keep *et al.*, 2012).

Recentemente foi demonstrado em um estudo que o PC hipóxico leva a uma redução da ativação microglial, quando avaliado 7 dias após a isquemia global

transitória (Zhan *et al.*, 2013). Acreditamos que tal resultado diverge do encontrado no presente trabalho provavelmente pelo tempo de avaliação, visto que avaliamos a resposta microglial 20 dias após a HIC. Ainda em relação à ativação microglial, em nosso estudo não houve efeito do PC entre os grupos que receberam apenas veículo. Hua e colegas demonstraram que o PC induzido por 15 minutos de oclusão da artéria cerebral média sozinho, promoveu uma ativação microglial no estriado de ratos adultos, detectável após 14 dias (Hua *et al.*, 2005).

Outro fator é a natureza da lesão hemorrágica, onde ocorre a infiltração de células imunes como macrófagos, linfócitos e outras células pela ruptura do vaso sanguíneo e não apenas pela disfunção da BHE (Wang *et al.*, 2007), de maneira diferente da que ocorre em modelos de isquemia.

No presente estudo, não conseguimos detectar uma proteção promovida pelo PC isquêmico em relação à função motora avaliada através do teste do cilindro e do teste da escada horizontal. Entre os grupos que receberam veículo não encontramos diferenças significativas sobre a função motora detectada através dos testes empregados. Este dado sugere que em nosso modelo, o PC sozinho não foi capaz de alterar a função motora. Hua e colaboradores (2005) demonstraram que 15 minutos de oclusão da artéria cerebral média, utilizado como PC em alguns estudos (Longa *et al.*, 1989; He *et al.*, 2012) é capaz de prejudicar a função motora por si só. Tal modelo de PC é diferente do empregado neste estudo, pois a oclusão das carótidas, mesmo que bilateralmente, não leva a uma redução total do fluxo sanguíneo em regiões como o estriado e hipocampo (Ábrahám e Lázár, 2000). Isto ocorre pela redistribuição do fluxo sanguíneo encefálico através das artérias comunicantes que formam o polígono de Willis (Bonnin *et al.*, 2011).

No teste do cilindro observamos efeito apenas do fator cirurgia na avaliação pós-operatória, não havendo efeito do PC. E na avaliação final após 20 dias, os animais apresentaram recuperação espontânea. Tal resposta pode ter ocorrido, pelo grau de lesão, pois a lesão utilizada foi moderada e os animais costumam apresentar certo grau de recuperação espontânea neste modelo após algumas semanas, em função da reabsorção do hematoma (Mestriner *et al.*, 2011). Além disso, o teste do cilindro parece não ser suficientemente sensível para detectar sutis diferenças no grau de lesão no estriado induzida pela HIC (MacLellan *et al.*, 2006).

Não encontramos na literatura um estudo comparável ao nosso em relação ao modelo de PC e modelo de lesão final (HIC) que tenha avaliado o desfecho comportamental através do teste do cilindro. No entanto, Gustavsson e colegas (2005) realizaram um PC hipóxico em ratos jovens 24 horas antes da indução da Hipóxia-isquemia e demonstraram cerebroproteção detectada 8 semanas após a lesão através do referido teste. Sugerindo que em lesões maiores, tal resultado pode ser melhor evidenciado.

A recuperação funcional é o desfecho clínico nos estudos envolvendo o AVE (DeBow *et al.*, 2003). No entanto, nem sempre a preservação tecidual ou redução do número de células mortas é acompanhada por tal desfecho. Possivelmente isso ocorra, pelo fato do tecido permanecer viável, mas com uma função anormal (Squire e Zola, 1996). Além disso, danos a regiões distais à lesão que resultam em degeneração axonal e atrofia podem ser indetectáveis, mas contribuir para os prejuízos funcionais (Corbett e Nurse, 1998).

No teste da escada horizontal, igualmente não detectamos proteção promovida pelo PC. Os déficits motores evidenciados pelo número de erros de colocação das patas cometido durante a marcha se mantiveram ao longo das

avaliações, evidenciando uma interação entre a lesão e o tempo para os membros contralaterais ao hemisfério lesado. Em relação aos membros ipsilaterais à lesão, observamos um aumento significativo do número de erros no membro anterior nas duas primeiras avaliações após a cirurgia. Tal achado está de acordo com um estudo onde os animais foram submetidos a um modelo de isquemia cerebral e reabilitação motora, e o comportamento foi avaliado pelo teste da escada horizontal, onde o autor relata que a alteração do desempenho motor do membro contralateral afetou o desempenho do membro ipsilateral (Keiner *et al.*, 2005).

Novamente não encontramos na literatura um estudo comparável ao nosso em relação ao modelo de PC e modelo de lesão final que tenha avaliado o desfecho comportamental através do teste da escada horizontal. Porém outros estudos que avaliaram os quatro membros do animal apresentaram resultados contrário aos encontrados nesta dissertação. Barone e colegas (1998) demonstraram que o PC induzido por 10 minutos de oclusão da artéria cerebral média foi capaz de reduzir os déficits neurológicos promovidos pela oclusão permanente da mesma, quando avaliado 24 horas após a isquemia tanto nos membros anteriores, quanto nos membros posteriores. Os membros anteriores foram avaliados através de um escore neurológico baseado na observação de respostas motoras e os membros posteriores foram avaliados através do teste de colocação do membro posterior que avalia a assimetria da resposta motora (Barone *et al.*, 1993).

Um estudo que utilizou o mesmo modelo de PC empregado neste trabalho porém, em camundongos (3 x 1 minuto com intervalo de 1 minuto de reperfusão 24 horas da isquemia final), demonstrou uma proteção em relação à função motora avaliada através do teste do rota-rod (Rehni *et al.*, 2010).

Nossos resultados talvez possam ser explicados pela natureza da lesão. Estudos demonstram que as diferenças entre a isquemia e a hemorragia vão além da fisiopatologia (Xi *et al.*, 2006), resultando em diferenças na ativação celular (como por exemplo, ativação de mecanismos hemostáticos na hemorragia intracerebral que não ocorrem na isquemia) e no desfecho motor, mesmo quando comparáveis em tamanho e localização (Mestriner *et al.*, 2013). A hemorragia intracerebral e a isquemia poderiam ser semelhantes, a ponto do pré-condicionamento isquêmico promover uma proteção tecidual evidenciada pela redução do volume da lesão, no entanto, talvez não seja o suficiente para promover uma proteção funcional.

No presente estudo utilizamos o modelo de hemorragia intracerebral induzido pela colagenase do tipo IV-S, que é um dos principais modelos empregado no estudo dessa patologia em modelos animais. Tal modelo pode ser induzido em diversas espécies, mas os roedores são os mais comumente usados. Sabe-se que os roedores são fundamentalmente diferentes dos humanos, possuindo uma escassa substância branca e uma menor taxa de células gliais por neurônio, (Wang *et al.*, 2010). Tais diferenças limitam a relevância clínica de nossos achados.

O modelo de pré-condicionamento isquêmico por oclusão bilateral das artérias carótidas comuns escolhido para a realização do presente estudo mostrou-se eficaz em reduzir o volume da lesão e a reatividade astrocitária, revelando-se uma interessante ferramenta no estudo de modelos cruzados de pré-condicionamento, pois o seu efeito de redução global temporária do fluxo sanguíneo foi capaz de proteger contra uma lesão focal. Adicionalmente, este modelo não promoveu efeitos deletérios por si só, pois não encontramos diferença entre os grupos que receberam apenas veículo em nenhum dos parâmetros analisados.

Em relação aos diferentes tempos de pré-condicionamento isquêmico empregados neste estudo, (10 e 20 minutos de oclusão bilateral das artérias carótidas), não foi possível detectar diferença entre eles em nenhum dos parâmetros analisados, seja nos animais submetidos à hemorragia intracerebral, seja nos que receberam veículo. Este é um importante achado, que nos traz a possibilidade de em estudos futuros utilizarmos apenas o menor tempo, a fim de causar desconforto aos animais pelo menor tempo necessário.

Os mecanismos exatos da cerebroproteção mediada pelo pré-condicionamento isquêmico ainda não estão completamente elucidados apesar das diversas evidências encontradas ao longo das últimas décadas tais como: regulação da resposta inflamatória (Durukan e Tatlisumak, 2010), redução da excitotoxicidade (Bond *et al* 1999 , Wang *et al.*, 2006), aumento da defesa antioxidante (Omata *et al.*, 2002), regulação positiva da hemoglobina (He *et al.*, 2009), indução de mecanismos anti-apoptóticos (Ostrowsi *et al.*, 2007), entre outros.

É importante ressaltar que existem escassos estudos que utilizam o modelo de tolerância-cruzada isquemia/hemorragia (He *et al.*, 2012), sendo assim, os resultados do presente trabalho apresentam grande relevância no que diz respeito às diferenças e semelhanças entre o acidente vascular encefálico do tipo isquêmico e hemorrágico.

Conjuntamente, nossos resultados evidenciam que a tolerância tecidual induzida pelo pré-condicionamento isquêmico foi capaz de promover algum grau de proteção no modelo de hemorragia intracerebral induzido por colagenase do tipo IV-S, mesmo que isso não tenha sido evidenciado no desfecho funcional avaliado por nossos testes comportamentais.

7. Conclusões:

Os resultados obtidos nesta dissertação permitem concluir que:

- O pré-condicionamento isquêmico induzido por dez ou vinte minutos de oclusão das artérias carótidas comuns foi capaz de promover uma proteção tecidual no estriado dorso lateral de ratos submetidos a um modelo de hemorragia intracerebral evidenciada pela redução do volume da lesão;
- O pré-condicionamento isquêmico induzido por dez ou vinte minutos de oclusão das artérias carótidas comuns foi capaz de promover uma redução da densidade óptica regional de astrócitos GFAP+ na região adjacente a lesão hemorrágica, no entanto não foi capaz de promover alterações na densidade microglial;
- O pré-condicionamento isquêmico induzido por dez ou vinte minutos de oclusão das artérias carótidas comuns não foi capaz de promover uma recuperação funcional em ratos submetidos a um modelo de hemorragia intracerebral detectável pelos testes comportamentais empregados;
- Não houve diferença entre a cerebroproteção conferida pelos diferentes tempos de pré-condicionamento isquêmico em ratos submetidos à hemorragia intracerebral experimental.

8. Perspectivas:

- Investigar os efeitos do PC isquêmico sobre aspectos cognitivos de ratos submetidos à HIC.
- Investigar os possíveis mecanismos envolvidos na cerebroproteção mediada pelo modelo de tolerância-cruzada promovido pelo PC isquêmico na HIC;
- Avaliar o número de neurônios NeuN+ sobreviventes no estriado dorsolateral de ratos submetidos ao PC isquêmico e ao modelo de HIC experimental;

9. Referências

- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience* 7:41-53.
- Abrahám H, Lázár G. 2000. Early microglial reaction following mild forebrain ischemia induced by common carotid artery occlusion in rats. *Brain Res* 862:63-73.
- Andrews AW, Bohannon RW. 2000. Distribution of muscle strength impairments following stroke. *Clin Rehabil* 14:79-87.
- Arai K, Jin G, Navaratna D, Lo EH. 2009. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: neurovascular injury and angiogenic recovery after stroke. *FEBS J* 276:4644-52.
- Aronowski J, Hall CE. 2005. New horizons for primary intracerebral hemorrhage treatment: experience from preclinical studies. *Neurol Res* 27:268-79.
- Barbe MF, Tytell M, Gower DJ, Welch WJ. 1988. Hyperthermia protects against light damage in the rat retina. *Science* 241:1817-20.
- Barone FC, Clark RK, Price WJ, White RF, Feuerstein GZ, Storer BL, Ohlstein EH. 1993. Neuron-specific enolase increases in cerebral and systemic circulation following focal ischemia. *Brain Res* 623:77-82.
- Barone FC, White RF, Spera PA, Ellison J, Currie RW, Wang X, Feuerstein GZ. 1998. Ischemic preconditioning and brain tolerance: temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement, and interleukin-1 receptor antagonist and early gene expression. *Stroke* 29:1937-50; discussion 1950-1.
- Bond A, Lodge D, Hicks CA, Ward MA, O'Neill MJ. 1999. NMDA receptor antagonism, but not AMPA receptor antagonism attenuates induced ischaemic tolerance in the gerbil hippocampus. *Eur J Pharmacol* 380:91-9.
- Broderick JP, Adams HP, Barsan W, Feinberg W, Feldmann E, Grotta J, Kase C, Krieger D, Mayberg M, Tilley B and others. 1999. Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage: A statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association. *Stroke* 30:905-15.
- Brown AM, Ransom BR. 2007. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* 55:1263-1271.
- Brown AM, Tekkok SB, Ransom BR. 2004a. Energy transfer from astrocytes to axons: the role of CNS glycogen. *Neurochemistry International* 45:529-536.
- Brown LL, Sharp FR. 1995. Metabolic mapping of rat striatum: somatotopic organization of sensorimotor activity. *Brain Res* 686:207-22.
- Brown RC, Mark KS, Egleton RD, Davis TP. 2004b. Protection against hypoxia-induced blood-brain barrier disruption: changes in intracellular calcium. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C1045-52.
- Brown VJ, Robbins TW. 1989. Deficits in response space following unilateral striatal dopamine depletion in the rat. *J Neurosci* 9:983-9.
- Brunswick AS, Hwang BY, Appelboom G, Hwang RY, Piazza MA, Connolly ES. 2012. Serum biomarkers of spontaneous intracerebral hemorrhage induced secondary brain injury. *J Neurol Sci* 321:1-10.
- Butcher KS, Baird T, MacGregor L, Desmond P, Tress B, Davis S. 2004. Perihematomal edema in primary intracerebral hemorrhage is plasma derived. *Stroke* 35:1879-85.
- Béchade C, Cantaut-Belarif Y, Bessis A. 2013. Microglial control of neuronal activity. *Front Cell Neurosci* 7:32.
- Canteras NS, Shammah-Lagnado SJ, Silva BA, Ricardo JA. 1988. Somatosensory inputs to

- the subthalamic nucleus: a combined retrograde and anterograde horseradish peroxidase study in the rat. *Brain Res* 458:53-64.
- Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J, Everitt BJ. 2002. Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neurosci Biobehav Rev* 26:321-52.
- Carmichael ST, Vespa PM, Saver JL, Coppola G, Geschwind DH, Starkman S, Miller CM, Kidwell CS, Liebeskind DS, Martin NA. 2008. Genomic profiles of damage and protection in human intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:1860-75.
- Cechetti F, Worm PV, Pereira LO, Siqueira IR, A Netto C. 2010. The modified 2VO ischemia protocol causes cognitive impairment similar to that induced by the standard method, but with a better survival rate. *Braz J Med Biol Res* 43:1178-83.
- Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. 2000a. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical implications. *J Cell Biochem Suppl* 34:40-51.
- Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. 2000b. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays* 22:442-51.
- Corbett D, Nurse S. 1998. The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. *Prog Neurobiol* 54:531-48.
- DAHL NA, BALFOUR WM. 1964. PROLONGED ANOXIC SURVIVAL DUE TO ANOXIA PRE-EXPOSURE: BRAIN ATP, LACTATE, AND PYRUVATE. *Am J Physiol* 207:452-6.
- Dawson DA, Furuya K, Gotoh J, Nakao Y, Hallenbeck JM. 1999. Cerebrovascular hemodynamics and ischemic tolerance: lipopolysaccharide-induced resistance to focal cerebral ischemia is not due to changes in severity of the initial ischemic insult, but is associated with preservation of microvascular perfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:616-23.
- DeBow SB, Davies ML, Clarke HL, Colbourne F. 2003. Constraint-induced movement therapy and rehabilitation exercises lessen motor deficits and volume of brain injury after striatal hemorrhagic stroke in rats. *Stroke* 34:1021-6.
- Deutsch E, Berger M, Kussmaul WG, Hirshfeld JW, Herrmann HC, Laskey WK. 1990. Adaptation to ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty. Clinical, hemodynamic, and metabolic features. *Circulation* 82:2044-51.
- Dirnagl U. 2004. Inflammation in stroke: the good, the bad, and the unknown. *Ernst Schering Res Found Workshop*:87-99.
- Dirnagl U, Becker K, Meisel A. 2009. Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use. *Lancet Neurol* 8:398-412.
- Dornbos D, Zwagerman N, Guo M, Ding JY, Peng C, Esmail F, Sikharam C, Geng X, Guthikonda M, Ding Y. 2013. Preischemic exercise reduces brain damage by ameliorating metabolic disorder in ischemia/reperfusion injury. *J Neurosci Res* 91:818-27.
- Dringen R, Gutterer JM. 2002. Glutathione reductase from bovine brain. *Methods Enzymol* 348:281-8.
- Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. 2000. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* 267:4912-6.
- Durukan A, Tatlisumak T. 2010. Preconditioning-induced ischemic tolerance: a window into endogenous gearing for cerebroprotection. *Exp Transl Stroke Med* 2:2.
- Dávalos A. 2005. Thrombolysis in acute ischemic stroke: successes, failures, and new hopes. *Cerebrovasc Dis* 20 Suppl 2:135-9.
- Fu Y, Sun JL, Ma JF, Geng X, Sun J, Liu JR, Song YJ, Chen SD. 2008. The neuroprotection of prodromal transient ischaemic attack on cerebral infarction. *Eur J Neurol* 15:797-

- 801.
- Gebel JM, Jauch EC, Brott TG, Khoury J, Sauerbeck L, Salisbury S, Spilker J, Tomsick TA, Duldner J, Broderick JP. 2002. Relative edema volume is a predictor of outcome in patients with hyperacute spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 33:2636-41.
- GERFEN, C.R. Basal Ganglia. In: Paxinos, G. The rat nervous system. 3.ed. Elsevier, 455-508, 2004.
- Gesuele R, Orsini F, Zanier ER, Albani D, Deli MA, Bazzoni G, De Simoni MG. 2011. Glial cells drive preconditioning-induced blood-brain barrier protection. *Stroke* 42:1445-53.
- Gidday JM. 2006. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat Rev Neurosci* 7:437-48.
- Gordon GR, Mulligan SJ, MacVicar BA. 2007. Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia* 55:1214-21.
- Gray, Henry. *Anatomy of the Human Body*. Philadelphia: Lea e Febiger, 1918; Bartleby.com, 2000. www.bartleby.com/107/2013/04/25
- Graybiel AM, Aosaki T, Flaherty AW, Kimura M. 1994. The basal ganglia and adaptive motor control. *Science* 265:1826-31.
- Gustavsson M, Anderson MF, Mallard C, Hagberg H. 2005. Hypoxic preconditioning confers long-term reduction of brain injury and improvement of neurological ability in immature rats. *Pediatr Res* 57:305-9.
- Gustavsson M, Wilson MA, Mallard C, Rousset C, Johnston MV, Hagberg H. 2007. Global gene expression in the developing rat brain after hypoxic preconditioning: involvement of apoptotic mechanisms? *Pediatr Res* 61:444-50.
- Handley A, Medcalf P, Hellier K, Dutta D. 2009. Movement disorders after stroke. *Age Ageing* 38:260-6.
- Hanisch UK. 2002. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40:140-55.
- Hanisch UK, Kettenmann H. 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10:1387-94.
- Hayakawa K, Nakano T, Irie K, Higuchi S, Fujioka M, Orito K, Iwasaki K, Jin G, Lo EH, Mishima K and others. 2010. Inhibition of reactive astrocytes with fluorocitrate retards neurovascular remodeling and recovery after focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:871-82.
- He Y, Karabiyikoglu M, Hua Y, Keep RF, Xi G. 2012. Ischemic Preconditioning Attenuates Brain Edema After Experimental Intracerebral Hemorrhage. *Transl Stroke Res* 3:180-187.
- Hernandez MR, Agapova OA, Yang P, Salvador-Silva M, Ricard CS, Aoi S. 2002. Differential gene expression in astrocytes from human normal and glaucomatous optic nerve head analyzed by cDNA microarray. *Glia* 38:45-64.
- Hertz L, Hansson E, Rönnbäck L. 2001. Signaling and gene expression in the neuron-glia unit during brain function and dysfunction: Holger Hydén in memoriam. *Neurochem Int* 39:227-52.
- Heurteaux C, Lauritzen I, Widmann C, Lazdunski M. 1995. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K⁺ channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4666-70.
- Hiraide T, Katsura K, Muramatsu H, Asano G, Katayama Y. 2001. Adenosine receptor antagonists cancelled the ischemic tolerance phenomenon in gerbil. *Brain Res* 910:94-8.
- Hua Y, Keep RF, Gu Y, Xi G. 2009. Thrombin and brain recovery after intracerebral hemorrhage. *Stroke* 40:S88-9.
- Hua Y, Wu J, Pecina S, Yang S, Schallert T, Keep RF, Xi G. 2005. Ischemic preconditioning procedure induces behavioral deficits in the absence of brain injury? *Neurol Res*

- 27:261-7.
- Hua Y, Xi G, Keep RF, Hoff JT. 2000. Complement activation in the brain after experimental intracerebral hemorrhage. *J Neurosurg* 92:1016-22.
- Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ. 2006. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol* 66:232-45.
- Huang MJ, Regunathan S, Botta M, Lee K, McClendon E, Yi GB, Pedersen ML, Berkowitz DB, Wang G, Travagli M and others. 2003. Structure-activity analysis of guanidine group in agmatine for brain agmatinase. *Ann N Y Acad Sci* 1009:52-63.
- Iadecola C, Kahles T, Gallo EF, Anrather J. 2011. Neurovascular protection by ischaemic tolerance: role of nitric oxide. *J Physiol* 589:4137-45.
- Inaji M, Tomita H, Tone O, Tamaki M, Suzuki R, Ohno K. 2003. Chronological changes of perihematomal edema of human intracerebral hematoma. *Acta Neurochir Suppl* 86:445-8.
- Jeong SR, Kwon MJ, Lee HG, Joe EH, Lee JH, Kim SS, Suh-Kim H, Kim BG. 2012. Hepatocyte growth factor reduces astrocytic scar formation and promotes axonal growth beyond glial scars after spinal cord injury. *Exp Neurol* 233:312-22.
- Jeyasingham RA, Baird AL, Meldrum A, Dunnett SB. 2001. Differential effects of unilateral striatal and nigrostriatal lesions on grip strength, skilled paw reaching and drug-induced rotation in the rat. *Brain Res Bull* 55:541-8.
- Jiang Y, Wu J, Hua Y, Keep RF, Xiang J, Hoff JT, Xi G. 2002. Thrombin-receptor activation and thrombin-induced brain tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:404-10.
- Jueptner M, Weiller C. 1998. A review of differences between basal ganglia and cerebellar control of movements as revealed by functional imaging studies. *Brain* 121 (Pt 8):1437-49.
- Karnath HO, Himmelbach M, Rorden C. 2002. The subcortical anatomy of human spatial neglect: putamen, caudate nucleus and pulvinar. *Brain* 125:350-60.
- Kato H, Kogure K, Araki T, Itoyama Y. 1994. Astroglial and microglial reactions in the gerbil hippocampus with induced ischemic tolerance. *Brain Res* 664:69-76.
- Keep RF, Hua Y, Xi G. 2012. Intracerebral haemorrhage: mechanisms of injury and therapeutic targets. *Lancet Neurol* 11:720-31.
- Keiner S, Wurm F, Kunze A, Witte OW, Redecker C. 2008. Rehabilitative therapies differentially alter proliferation and survival of glial cell populations in the perilesional zone of cortical infarcts. *Glia* 56:516-27.
- Kirino T. 2002. Ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:1283-96.
- Kirkman MA, Allan SM, Parry-Jones AR. 2011. Experimental intracerebral hemorrhage: avoiding pitfalls in translational research. *J Cereb Blood Flow Metab* 31:2135-51.
- Kitano H, Kirsch JR, Hurn PD, Murphy SJ. 2007. Inhalational anesthetics as neuroprotectants or chemical preconditioning agents in ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1108-28.
- Koerner IP, Gattling M, Noppens R, Kempinski O, Brambrink AM. 2007. Induction of cerebral ischemic tolerance by erythromycin preconditioning reprograms the transcriptional response to ischemia and suppresses inflammation. *Anesthesiology* 106:538-47.
- Kopito RR. 2000. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* 10:524-30.
- Kreutzberg GW. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-8.
- Lian J, Shuai J, Durand DM. 2004. Control of phase synchronization of neuronal activity in the rat hippocampus. *J Neural Eng* 1:46-54.
- Liu XQ, Sheng R, Qin ZH. 2009. The neuroprotective mechanism of brain ischemic preconditioning. *Acta Pharmacol Sin* 30:1071-80.

- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20:84-91.
- Lotufo PA. 2005. Stroke in Brazil: a neglected disease. *Sao Paulo Med J* 123:3-4.
- MacLellan CL, Auriat AM, McGie SC, Yan RH, Huynh HD, De Butte MF, Colbourne F. 2006a. Gauging recovery after hemorrhagic stroke in rats: implications for cytoprotection studies. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:1031-42.
- MacLellan CL, Gyawali S, Colbourne F. 2006b. Skilled reaching impairments follow intrastriatal hemorrhagic stroke in rats. *Behav Brain Res* 175:82-9.
- MacLellan CL, Silasi G, Poon CC, Edmundson CL, Buist R, Peeling J, Colbourne F. 2008. Intracerebral hemorrhage models in rat: comparing collagenase to blood infusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:516-25.
- Masada T, Hua Y, Xi G, Ennis SR, Keep RF. 2001. Attenuation of ischemic brain edema and cerebrovascular injury after ischemic preconditioning in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:22-33.
- Mayer SA, Lignelli A, Fink ME, Kessler DB, Thomas CE, Swarup R, Van Heertum RL. 1998. Perilesional blood flow and edema formation in acute intracerebral hemorrhage: a SPECT study. *Stroke* 29:1791-8.
- Mayer SA, Rincon F. 2005. Treatment of intracerebral haemorrhage. *Lancet Neurol* 4:662-72.
- McGeorge AJ, Faull RL. 1989. The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience* 29:503-37.
- Melchior B, Puntambekar SS, Carson MJ. 2006. Microglia and the control of autoreactive T cell responses. *Neurochem Int* 49:145-53.
- Mestriner RG, Miguel PM, Bagatini PB, Saur L, Boisserand LS, Baptista PP, Xavier LL, Netto CA. 2013a. Behavior outcome after ischemic and hemorrhagic stroke, with similar brain damage, in rats. *Behav Brain Res* 244:82-9.
- Mestriner RG, Pagnussat AS, Boisserand LS, Valentim L, Netto CA. 2011a. Skilled reaching training promotes astroglial changes and facilitated sensorimotor recovery after collagenase-induced intracerebral hemorrhage. *Exp Neurol* 227:53-61.
- Mestriner RG, Pagnussat AS, Boisserand LS, Valentim L, Netto CA. 2011b. Skilled reaching training promotes astroglial changes and facilitated sensorimotor recovery after collagenase-induced intracerebral hemorrhage. *Exp Neurol* 227:53-61.
- Metz GA, Whishaw IQ. 2002. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination. *J Neurosci Methods* 115:169-79.
- Minelli C, Fen LF, Minelli DP. 2007. Stroke incidence, prognosis, 30-day, and 1-year case fatality rates in Matão, Brazil: a population-based prospective study. *Stroke* 38:2906-11.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. 1986a. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74:1124-36.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. 1986b. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74:1124-36.
- Nagahori T, Nishijima M, Endo S, Takaku A, Iwasaki Y. 1994. Ischemic brain damage induced by repeated brief occlusions of bilateral common carotid artery in rats. *Tohoku J Exp Med* 172:253-62.
- Nakai A, Taniuchi Y, Asakura H, Oya A, Yokota A, Koshino T, Araki T. 2001. Developmental changes in tolerance to transient intrauterine ischemia in rat cerebral mitochondria. *Am J Obstet Gynecol* 184:731-5.
- Nakajima T, Iwabuchi S, Miyazaki H, Okuma Y, Kuwabara M, Nomura Y, Kawahara K. 2004. Preconditioning prevents ischemia-induced neuronal death through persistent Akt activation in the penumbra region of the rat brain. *J Vet Med Sci* 66:521-7.

- Nakamura T, Xi G, Park JW, Hua Y, Hoff JT, Keep RF. 2005. Holo-transferrin and thrombin can interact to cause brain damage. *Stroke* 36:348-52.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314-8.
- Omata N, Murata T, Takamatsu S, Maruoka N, Wada Y, Yonekura Y, Fujibayashi Y. 2002. Hypoxic tolerance induction in rat brain slices following hypoxic preconditioning due to expression of neuroprotective proteins as revealed by dynamic changes in glucose metabolism. *Neurosci Lett* 329:205-8.
- Ostrowski RP, Graupner G, Titova E, Zhang J, Chiu J, Dach N, Corleone D, Tang J, Zhang JH. 2008. The hyperbaric oxygen preconditioning-induced brain protection is mediated by a reduction of early apoptosis after transient global cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 29:1-13.
- Pekny M, Nilsson M. 2005. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50:427-34.
- Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, Serres S, Merle M, Costalat R, Magistretti PJ. 2007. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* 55:1251-62.
- Perea G, Navarrete M, Araque A. 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32:421-31.
- Pong K. 2004. Ischaemic preconditioning: therapeutic implications for stroke? *Expert Opin Ther Targets* 8:125-39.
- Pradillo JM, Fernández-López D, García-Yébenes I, Sobrado M, Hurtado O, Moro MA, Lizasoain I. 2009. Toll-like receptor 4 is involved in neuroprotection afforded by ischemic preconditioning. *J Neurochem* 109:287-94.
- Puisieux F, Deplanque D, Bulckaen H, Maboudou P, Gelé P, Lhermitte M, Lebuffe G, Bordet R. 2004. Brain ischemic preconditioning is abolished by antioxidant drugs but does not up-regulate superoxide dismutase and glutathion peroxidase. *Brain Res* 1027:30-7.
- Qureshi AI, Mendelow AD, Hanley DF. 2009. Intracerebral haemorrhage. *Lancet* 373:1632-44.
- Qureshi AI, Tuhim S, Broderick JP, Batjer HH, Hondo H, Hanley DF. 2001. Spontaneous intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med* 344:1450-60.
- Qureshi AI, Wilson DA, Hanley DF, Traystman RJ. 1999. No evidence for an ischemic penumbra in massive experimental intracerebral hemorrhage. *Neurology* 52:266-72.
- Rauca C, Zerbe R, Jantze H, Krug M. 2000. The importance of free hydroxyl radicals to hypoxia preconditioning. *Brain Res* 868:147-9.
- Redgrave P, Prescott TJ, Gurney K. 1999. The basal ganglia: a vertebrate solution to the selection problem? *Neuroscience* 89:1009-23.
- Rehni AK, Singh TG, Behl N, Arora S. 2010. Possible involvement of ubiquitin proteasome system and other proteases in acute and delayed aspects of ischemic preconditioning of brain in mice. *Biol Pharm Bull* 33:1953-7.
- Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. 1997. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 20:570-7.
- Rodríguez T, Malvezzi M, Chatenoud L, Bosetti C, Levi F, Negri E, La Vecchia C. 2006. Trends in mortality from coronary heart and cerebrovascular diseases in the Americas: 1970-2000. *Heart* 92:453-60.
- Romera C, Hurtado O, Botella SH, Lizasoain I, Cárdenas A, Fernández-Tomé P, Leza JC, Lorenzo P, Moro MA. 2004. In vitro ischemic tolerance involves upregulation of glutamate transport partly mediated by the TACE/ADAM17-tumor necrosis factor-alpha pathway. *J Neurosci* 24:1350-7.
- Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfeld M. 1990. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke* 21:801-7.

- Sanches EF, Arteni NS, Nicola F, Boisserand L, Willborn S, Netto CA. 2013. Early hypoxia-ischemia causes hemisphere and sex-dependent cognitive impairment and histological damage. *Neuroscience* 237:208-15.
- Sayah S, Ischenko AM, Zhakhov A, Bonnard AS, Fontaine M. 1999. Expression of cytokines by human astrocytomas following stimulation by C3a and C5a anaphylatoxins: specific increase in interleukin-6 mRNA expression. *J Neurochem* 72:2426-36.
- Schaechter JD. 2004. Motor rehabilitation and brain plasticity after hemiparetic stroke. *Prog Neurobiol* 73:61-72.
- Seifert G, Schilling K, Steinhäuser C. 2006. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci* 7:194-206.
- Shimizu S, Nagayama T, Jin KL, Zhu L, Loeffert JE, Watkins SC, Graham SH, Simon RP. 2001. bcl-2 Antisense treatment prevents induction of tolerance to focal ischemia in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:233-43.
- Simard M, Nedergaard M. 2004. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* 129:877-96.
- Smith RM, Lecour S, Sack MN. 2002. Innate immunity and cardiac preconditioning: a putative intrinsic cardioprotective program. *Cardiovasc Res* 55:474-82.
- Sofroniew MV. 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32:638-47.
- Squire LR, Zola SM. 1996. Ischemic brain damage and memory impairment: a commentary. *Hippocampus* 6:546-52.
- Stenzel-Poore MP, Stevens SL, Xiong Z, Lessov NS, Harrington CA, Mori M, Meller R, Rosenzweig HL, Tobar E, Shaw TE and others. 2003. Effect of ischaemic preconditioning on genomic response to cerebral ischaemia: similarity to neuroprotective strategies in hibernation and hypoxia-tolerant states. *Lancet* 362:1028-37.
- Stowe AM, Altay T, Freie AB, Gidday JM. 2011. Repetitive hypoxia extends endogenous neurovascular protection for stroke. *Ann Neurol* 69:975-85.
- Streit WJ. 2002. Microglia and the response to brain injury. *Ernst Schering Res Found Workshop*:11-24.
- Tanaka A, Yoshinaga S, Nakayama Y, Kimura M, Tomonaga M. 1996. Cerebral blood flow and clinical outcome in patients with thalamic hemorrhages: a comparison with putaminal hemorrhages. *J Neurol Sci* 144:191-7.
- Tanaka H, Calderone A, Jover T, Grooms SY, Yokota H, Zukin RS, Bennett MV. 2002. Ischemic preconditioning acts upstream of GluR2 down-regulation to afford neuroprotection in the hippocampal CA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2362-7.
- Tang T, Li XQ, Wu H, Luo JK, Zhang HX, Luo TL. 2004. Activation of endogenous neural stem cells in experimental intracerebral hemorrhagic rat brains. *Chin Med J (Engl)* 117:1342-7.
- Tauskela JS, Comas T, Hewitt K, Monette R, Paris J, Hogan M, Morley P. 2001. Cross-tolerance to otherwise lethal N-methyl-D-aspartate and oxygen-glucose deprivation in preconditioned cortical cultures. *Neuroscience* 107:571-84.
- Tejima E, Zhao BQ, Tsuji K, Rosell A, van Leyen K, Gonzalez RG, Montaner J, Wang X, Lo EH. 2007. Astrocytic induction of matrix metalloproteinase-9 and edema in brain hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:460-8.
- Trendelenburg G, Dirnagl U. 2005a. Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning. *Glia* 50:307-20.
- Trendelenburg G, Dirnagl U. 2005b. Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning. *Glia* 50:307-20.
- van Rossum D, Hanisch UK. 2004. Microglia. *Metab Brain Dis* 19:393-411.

- VanVleet TM, Heldt SA, Guerrettaz KR, Corwin JV, Reep RL. 2002. Unilateral destruction of the dorsocentral striatum in rats produces neglect but not extinction to bilateral simultaneous stimulation. *Behav Brain Res* 136:375-87.
- Vartanian KB, Stevens SL, Marsh BJ, Williams-Karnesky R, Lessov NS, Stenzel-Poore MP. 2011. LPS preconditioning redirects TLR signaling following stroke: TRIF-IRF3 plays a seminal role in mediating tolerance to ischemic injury. *J Neuroinflammation* 8:140.
- Vaughan PJ, Pike CJ, Cotman CW, Cunningham DD. 1995. Thrombin receptor activation protects neurons and astrocytes from cell death produced by environmental insults. *J Neurosci* 15:5389-401.
- Wagner KR. 2007. Modeling intracerebral hemorrhage: glutamate, nuclear factor-kappa B signaling and cytokines. *Stroke* 38:753-8.
- Wagner KR, Sharp FR, Ardizzone TD, Lu A, Clark JF. 2003. Heme and iron metabolism: role in cerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:629-52.
- Wang J. 2010. Preclinical and clinical research on inflammation after intracerebral hemorrhage. *Prog Neurobiol* 92:463-77.
- Wang J, Doré S. 2007a. Heme oxygenase-1 exacerbates early brain injury after intracerebral haemorrhage. *Brain* 130:1643-52.
- Wang J, Doré S. 2007b. Inflammation after intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:894-908.
- Wang J, Rogove AD, Tsirka AE, Tsirka SE. 2003. Protective role of tuftsin fragment 1-3 in an animal model of intracerebral hemorrhage. *Ann Neurol* 54:655-64.
- Wang RM, Yang F, Zhang YX. 2006. Preconditioning-induced activation of ERK5 is dependent on moderate Ca²⁺ influx via NMDA receptors and contributes to ischemic tolerance in the hippocampal CA1 region of rats. *Life Sci* 79:1839-46.
- Wang Y, Jiang YF, Huang QF, Ge GL, Cui W. 2010. Neuroprotective effects of salvianolic acid B against oxygen-glucose deprivation/reperfusion damage in primary rat cortical neurons. *Chin Med J (Engl)* 123:3612-9.
- Wang Y, Kilic E, Kilic U, Weber B, Bassetti CL, Marti HH, Hermann DM. 2005. VEGF overexpression induces post-ischaemic neuroprotection, but facilitates haemodynamic steal phenomena. *Brain* 128:52-63.
- Wegener S, Gottschalk B, Jovanovic V, Knab R, Fiebach JB, Schellinger PD, Kucinski T, Jungehülsing GJ, Brunecker P, Müller B and others. 2004. Transient ischemic attacks before ischemic stroke: preconditioning the human brain? A multicenter magnetic resonance imaging study. *Stroke* 35:616-21.
- Weih M, Kallenberg K, Bergk A, Dirnagl U, Harms L, Wernecke KD, Einhüpl KM. 1999. Attenuated stroke severity after prodromal TIA: a role for ischemic tolerance in the brain? *Stroke* 30:1851-4.
- Wick A, Wick W, Waltenberger J, Weller M, Dichgans J, Schulz JB. 2002. Neuroprotection by hypoxic preconditioning requires sequential activation of vascular endothelial growth factor receptor and Akt. *J Neurosci* 22:6401-7.
- Wilhelmsson U, Bushong EA, Price DL, Smarr BL, Phung V, Terada M, Ellisman MH, Pekny M. 2006. Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17513-8.
- World Health Organization (WHO). Project Investigators: The World Health Organization - MONICA Project (Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease). *J Clin Epidemiol*, 41: 105-114, 1988.
- Xi G, Hua Y, Keep RF, Younger JG, Hoff JT. 2001. Systemic complement depletion diminishes perihematomal brain edema in rats. *Stroke* 32:162-7.

- Xi G, Keep RF, Hoff JT. 2006. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage. *Lancet Neurol* 5:53-63.
- Yadav SS, Sindram D, Perry DK, Clavien PA. 1999. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. *Hepatology* 30:1223-31.
- Zhan L, Yan H, Zhou H, Sun W, Hou Q, Xu E. 2013. Hypoxic Preconditioning Attenuates Neuronal Cell Death by Preventing MEK/ERK Signaling Pathway Activation after Transient Global Cerebral Ischemia in Adult Rats. *Mol Neurobiol*.
- Zhang J, Yang ZJ, Klaus JA, Koehler RC, Huang J. 2008. Delayed tolerance with repetitive transient focal ischemic preconditioning in the mouse. *Stroke* 39:967-74.
- Zhao J, Sun S, Chen X. 2006. Protective effects of focal ischemic preconditioning and HSP70 expression on middle cerebral artery occlusion in rats. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 26:436-9.