



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE – ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

EFEITO CEREBROPROTETOR DO PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO SOBRE ASPECTOS
CELULARES E FUNCIONAIS NO MODELO DE HEMORRAGIA INTRACEREBRAL FOCAL EM
RATOS *WISTAR* ADULTOS

THAMIRIS FENALTI DELGADO

PORTO ALEGRE
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE – ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

EFEITO CEREBROPROTETOR DO PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO SOBRE ASPECTOS
CELULARES E FUNCIONAIS NO MODELO DE HEMORRAGIA INTRACEREBRAL FOCAL EM
RATOS *WISTAR* ADULTOS

THAMIRIS FENALTI DELGADO

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 à obtenção
do título de Mestre em Neurociências.

PORTO ALEGRE
2017

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Maria Beatriz Delgado, por nunca poupar esforços para que eu pudesse estudar e realizar meus sonhos. E à minha irmã, Mônica Delgado Pasetto, por estar sempre presente e confiante no meu potencial, por me ajudar a traçar objetivos e clarear meu caminho.

Ao magnífico Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto, por sua paciência, pelas inúmeras oportunidades, pelos ensinamentos e conselhos e principalmente por acreditar na minha capacidade.

Ao Prof. Dr. Régis Mestriner, que me levou ao laboratório e me apresentou a pesquisa, pela sua disponibilidade e conselhos. Aos colegas e amigos Dr. Eduardo Sanches e Ms. Fabrício Nicola e por toda a ajuda, ensinamentos e por terem participado com muita atenção e carinho.

Aos queridos colegas do laboratório 35, pelos ótimos momentos de convívio e crescimento. Em especial à Dr^a Juliana Neves, por dividir comigo os *staircase* e ao Dirceu Aristimunha e ao Ms. Felipe Odorcyk, por sempre estarem atentos aos colegas do laboratório. À Ms. Luz Elena Durand que me ajudou e explicou, incansavelmente, as análises estatísticas. E aos demais colegas que se juntaram a nós ao longo do caminho e fizeram grande diferença no ambiente de trabalho.

Às minhas queridas amigas Dr^a Lígia Boisserand e Ms Sonia Katami, que sempre estiveram do meu lado e acreditaram no meu potencial quando nem eu mesma acreditei, que me ajudaram em todas as etapas, mesmo longe, me incentivaram e motivaram.

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

SUMÁRIO:

| | |
|--|-----|
| Lista de Figuras | III |
| Lista de Abreviaturas | IV |
| Resumo | V |
| Abstract | VI |
| 1. Introdução..... | 1 |
| 1.1. Hemorragia Intracerebral..... | 2 |
| 1.2. As Células Gliais | 7 |
| 1.3. Pré-condicionamento Isquêmico..... | 10 |
| 2. Hipótese de Trabalho. | 15 |
| 3. Objetivos | 16 |
| 3.1. Objetivo Geral..... | 16 |
| 3.2. Objetivos Específicos | 16 |
| 4. Materiais e Métodos | 17 |
| 4.1. Desenho experimental | 17 |
| 4.2. Procedimentos Cirúrgicos..... | 18 |
| 4.2.1. Pré-condicionamento Isquêmico Global | 19 |
| 4.2.2. Hemorragia Cerebral Induzida por Colagenase | 20 |
| 4.3. Avaliação comportamental..... | 23 |
| 4.3.1. Teste do <i>staircase</i> | 23 |
| 4.3.2. Teste do cilindro..... | 25 |
| 4.4. Perfusão e Avaliação Morfológica..... | 26 |
| 4.4.1. Avaliação Histológica..... | 27 |
| 4.4.2. Imunofluorescência | 28 |
| 4.4.3. Quantificação da Imunofluorescência | 29 |
| 4.5. Análise Estatística..... | 30 |
| 5. Resultados..... | 31 |
| 5.1. Teste do <i>staircase</i> | 31 |
| 5.2. Teste do cilindro..... | 33 |
| 5.3. Perda tecidual | 35 |
| 5.4. Imunofluorescência | 36 |
| 6. Discussão..... | 41 |
| 7. Conclusão. | 48 |
| 8. Referências. | 49 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Cascata de eventos celulares e moleculares iniciados pela hemorragia intracerebral . | 4 |
| Figura 2: Representação da interação entre astrócitos (verde) e neurônios (amarelo) | 8 |
| Figura 3: Esquema de mecanismos mediados pelos astrócitos na tolerância isquêmica .. | 12 |
| Figura 4: Desenho experimental..... | 17 |
| Figura 5: Ilustração do Polígono de Willis..... | 19 |
| Figura 6: Teste do Staircase. | 24 |
| Figura 7: Teste do cilindro. | 26 |
| Figura 8: Imagem representativa das regiões de onde foram obtidas as imagens para a avaliação das marcações da imunofluorescência..... | 29 |
| Figura 9: Desempenho no Teste do Staircase..... | 32 |
| Figura 10: Desempenho no Teste do Cilindro | 34 |
| Figura 11: Volume da lesão | 35 |
| Figura 12: Correlação entre (A) perda tecidual com o teste do Staircase pós operatório e (B) perda tecidual com o teste do cilindro no 3º PO..... | 36 |
| Figura 13: Intensidade da fluorescência para GFAP | 37 |
| Figura 14: Intensidade da fluorescência para OX-42..... | 38 |
| Figura 15: Imagens representativas da intensidade da imunofluorescência GFAP nos grupos experimentais..... | 39 |
| Figura 16: Imagem representativa da intensidade da fluorescência de OX-42 nos grupos experimentais. | 40 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de variância AOI:
área de interesse
AVE: Acidente Vascular Encefálico COX-
2: Ciclo-oxigenase-2
dpi: pontos por polegada (*dots per inch*)
GFAP: proteína glial fibrilar ácida
HIC: Hemorragia Intracerebral IL-1 β :
Interleucina β IS: intervalo
entre secções; MMP-9:
Metaloproteinase-9
NF- κ B: Fator de transcrição nuclear kappa B NS:
número de secções.
PBS: Tampão fosfato salino
PBS-TX: Tampão fosfato salino com Triton-X PC:
Pré-condicionamento
PFA: Paraformaldeído PO:
Pós-operatório
ROS: espécies reativas de oxigênio SNC:
Sistema Nervoso Central
SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences*
TNF- α : Fator de Necrose Tumoral α VH:
volume de um hemisfério

RESUMO

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) Hemorrágico representa mais de 10% de todos os casos de AVE e possui altas taxas de morbidade e de mortalidade. Os pacientes que sobrevivem a este evento permanecem com alguma disfunção motora, que algumas vezes é incapacitante. O extravasamento de sangue em um AVE hemorrágico ocorre, geralmente, em regiões onde há bifurcação de pequenas arteríolas penetrantes, como na região dos núcleos da base. O estriado, importante componente dessa região, está relacionado a funções motoras superiores, como o planejamento e a execução do movimento. Alguns estudos demonstram que o pré-condicionamento (PC) isquêmico pode gerar a tolerância a outros eventos que acometem o sistema nervoso. O PC é definido como fenômeno decorrente da exposição de um tecido ou órgão a um insulto sub-letal capaz de resultar em adaptações determinantes para a tolerância tecidual. Isso ocorre mesmo quando esses dois estímulos são de origens diferentes; neste caso diz-se que o PC desenvolveu tolerância cruzada. Desta forma, o presente estudo dedicou-se ao estudo de efeitos celulares e funcionais do pré-condicionamento isquêmico, por oclusão bilateral das artérias carótidas durante 10 minutos, sobre o modelo de hemorragia intracerebral (HIC), por administração intraestriatal de colagenase do tipo IV - Sem ratos. A hipótese de trabalho era de que o PC causaria tolerância cruzada para a HIC, e conseqüente neuroproteção avaliada por testes motores, volume de lesão, com envolvimento de astrocitose e de micróglia reativa. Foram usados 67 ratos machos *Wistar* adultos, divididos em 4 grupos: Sham (controle cirúrgico), PC, HIC, PC+HIC. Assim, os animais dos grupos PC e PC+HIC foram submetidos ao pré-condicionamento e 24 horas depois os animais HIC e PC+HIC receberam a injeção de colagenase, enquanto os animais Sham e PC receberam uma injeção de salina. A avaliação motora dos animais foi realizada a partir dos testes do cilindro e do *Staircase*. Trinta e quatro dias após a HIC os animais foram perfundidos e o estriado ipsilateral à injeção foi dissecado para obtenção de amostras teciduais necessárias à avaliação da perda tecidual e quantificação de intensidade de fluorescência de GFAP (proteína glial fibrilar ácida) e OX-42, importantes marcadores de astrócitos e microglia, respectivamente. Os resultados demonstram que: a) a HIC causa déficits motores em ambos os testes realizados, e que o PC reverte este efeito; b) a HIC causa lesão estriatal que não é revertido pelo pré-condicionamento; c) a HIC causa aumento da intensidade de fluorescência para GFAP e para OX-42, e o PC reverte apenas a reatividade da micróglia. Em conjunto, sugere-se que o pré-condicionamento isquêmico causa tolerância cruzada com a hemorragia intracerebral experimental, resultando em proteção funcional, mas não morfológica, possivelmente associada a uma diminuição da reatividade da microglia após o evento hemorrágico.

Palavras-chave: Pré-condicionamento; Hemorragia intracerebral; Tolerância cruzada; Astrócito; Micróglia; Rato

ABSTRACT

Hemorrhagic Vascular Stroke (EVA) represents more than 10% of all stroke cases with high rates of morbidity and mortality. Patients who survive this event, remain with some motor dysfunction, which is sometimes disabling. The extravasation of blood in a hemorrhagic stroke occurs, generally, in regions where there is bifurcation of small vessels, as in the region of striatum. The striatum is related to the higher motor functions, such as the planning and execution of the movement. Some studies have shown that preconditioning (PC) can generate a tolerance to other events that accompany the nervous system. The PC is presented as the source of the exposure of a sub-lethal, resulting in an adaptation of determinants to a tissue tolerance. Thus, the present study aimed shows the ischemic preconditioning effects, by bilateral occlusion of the carotid arteries for 10 minutes, on the intracerebral hemorrhage (ICH) model, by intra- striatum administration of type IV S collagenase in rats. The working hypothesis was tolerance to HIC, and consequent neuroprotection by motor function, lesion volume, astrocytosis and reactive microglia. A total of 84 male Wistar adult rats were divided into 4 groups: Sham (surgical control), PC, HIC, PC + HIC. Thus, the animals of the PC and PC + HIC groups were introduced to the preconditioning and 24 hours later, the HIC and PC + HIC animals received a collagenase injection, while the Sham and PC animals received a saline injection. The evaluation of the animal function was performed from cylinder and Staircase tests. Thirty-four days after the surgery, the striatum was dissected and prepared to lesion volume analysis and fluorescence intensity of GFAP quantification (acid glial fibrillary protein) and OX-42, important astrocyte and microglia markers respectively. The results demonstrate that: a) an HIC causes motor deficits in both tests performed, and that the PC reverses this effect; b) an ICH causes a striatal lesion that is not reversed by preconditioning; c) an HIC promoted high fluorescence intensity for GFAP and OX-42, and PC reverses the microglia reactivity. Taken together, we suggest that ischemic preconditioning combined with experimental intracerebral hemorrhage, promotes functional but not morphological protection, being associated with the microglial reactivity decrease after the hemorrhagic event.

Palavras-chave: Preconditioning; intracerebral hemorrhage; cross- tolerance ; Astrocyte; Microglia Rat

1. INTRODUÇÃO

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é uma das principais causas de morte no Brasil, com incidência de cerca de 150 mil novos caso/ano. O AVE pode se apresentar de duas formas: isquêmica ou hemorrágica (Donnan *et al.*, 2008).

Na forma isquêmica ocorre a interrupção do aporte sanguíneo, gerando sofrimento ao tecido neural e morte celular, entre outras consequências (Lloyd, 2010). Já na forma hemorrágica acontece o extravasamento de sangue para o parênquima, seguido de eventos complexos e dinâmicos que envolvem diversos fatores (Mayer e Rincon, 2005). Esse tipo de AVE é conhecido como Hemorragia Intracerebral (HIC), que será o foco do presente estudo.

A HIC é um dos principais problemas de saúde pública mundial com incidência anual de 10-30 por 100 mil habitantes, e corresponde a dois milhões (10-15%) de um total de quinze milhões de AVE no mundo a cada ano (Qureshi *et al.*, 2009). Esta acomete os lobos frontais, os núcleos da base (cerca de 50% dos casos), tálamo, tronco encefálico (principalmente a ponte) e o cerebelo (Qureshi *et al.*, 2001; Qureshi *et al.*, 2007).

A HIC está entre os tipos mais graves de AVE, sendo um dos que mais leva à morte do paciente. Ademais, quando não letal, causa diversos problemas de funcionalidade e déficits motores, sensitivos e até mesmo cognitivos (Broderic *et al.*, 2007). Entre os déficits funcionais encontramos a hemiparesia, incoordenação

motora, hipertonia espástica dos membros contralaterais ao hemisfério lesado, bem com o fraqueza dos membros ipsilaterais.

Considerando que os núcleos da base têm importantes conexões com regiões encefálicas responsáveis pelo controle do movimento, desde o planejamento até sua execução, podemos compreender a relação da lesão com os déficits motores resultantes (Brown e Sharp, 1995; Handley *et al*, 2009). Sendo assim, é necessário o estudo dessas regiões onde há grande interação de informações essenciais para a execução dos movimentos voluntários, como o estriado.

Alguns estudos (Jeyasinhham *et al*, 2001; Cardinal *et al*, 2002; e Karnath *et al*, 2002) indicam que o estriado pode estar relacionado com a orientação espacial, motivação, seleção dos movimentos, execução de tarefas motoras, entre outras e efetivas contribuições para o comportamento. Além disso, é sabido que o estriado tem importante ligação com a execução de metas funcionais, como por exemplo a captura de um objeto.

1.1. Hemorragia Intracerebral

A ruptura dos vasos sanguíneos ocorre principalmente nas bifurcações de pequenas arteríolas penetrantes que se originam da artéria basilar ou das artérias cerebrais anterior, média e posterior. Dentre diversos fatores para essa ruptura, destacam-se os processos degenerativos decorrentes da hipertensão,

angiopatia amiloide, o uso de anticoagulantes orais ou de origem congênita (Takebayashi e Kaneko, 1983).

Os pacientes portadores de vasculopatias e que fazem uso de anticoagulantes são os mais afetados, porque os anticoagulantes podem contribuir para a exacerbação de alguns fatores associados à doença de base, facilitando a ocorrência da HIC (Hart, 2000), que pode causar danos cerebrais primários e secundários. Alguns efeitos iniciais como a expansão do hematoma e o aumento da pressão intracraniana levam à lesão primária, enquanto que os efeitos posteriores, como o processo inflamatório, contribuem para a lesão secundária (Wang *et al*, 2010).

É possível constatar, no local da lesão e adjacentes ao hematoma, a presença de edema, células em apoptose/necrose e células pró-inflamatórias (Qureshi *et al*, 2009). Desta forma, o hematoma pode induzir danos morfofisiológicos devido a deformação tecidual mecânica, resultando no afastamento espacial das células, despolarização da membrana, liberação de neurotransmissores e disfunção mitocondrial (Qureshi *et al*, 2001).

Adicionalmente, uma cascata secundária é iniciada pelos produtos da coagulação e do metabolismo da hemoglobina, principalmente trombina, a qual é capaz de ativar as células microgliais cerca de 4 (quatro) horas após o início do evento hemorrágico. Assim, a microglia ativada libera mediadores que levam à disfunção da barreira hematoencefálica, ao surgimento do edema vasogênico e à apoptose neuronal e glial (Nakamura *et al*, 2005).

A partir da ativação local de cascatas de coagulação e pelo tamponamento mecânico é iniciada a hemostase (Broderick *et al.*, 2007). Em sessenta e três por cento dos pacientes nas primeiras três horas após o início dos sintomas podemos encontrar alguma evidência de crescimento do hematoma, que é um sinal do processo inflamatório (James *et al.*, 2008). Atualmente, sabemos que este fenômeno pode ocorrer até mesmo em períodos superiores a doze horas após o início da HIC (Davis *et al.*, 2006), conforme ilustrado na Figura 1.

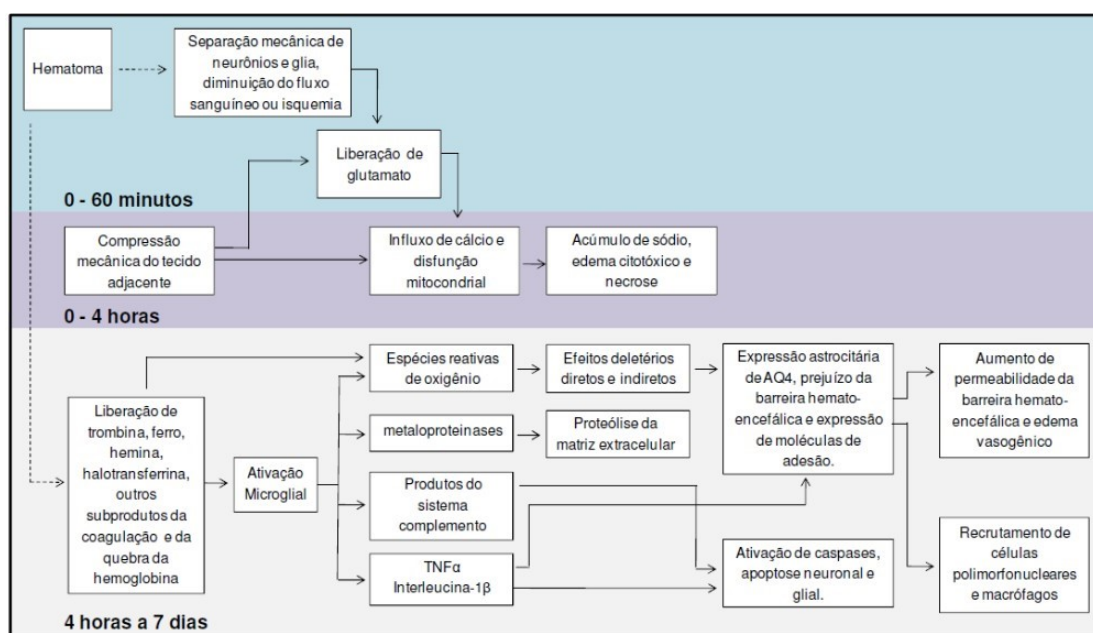


Figura 1: Cascata de eventos celulares e moleculares iniciados pela hemorragia intracerebral. Adaptada de Qureshi *et al.*, 2009.

No tecido adjacente ao hematoma, o volume do edema pode aumentar setenta e cinco por cento nas primeiras vinte e quatro horas após o evento hemorrágico (Gebel *et al.*, 2002), alcançando o pico por volta do quinto ou sexto dia, podendo durar por cerca de quatorze dias (Inaji *et al.*, 2003; Butcher *et al.*, 2004). Nessas regiões, parece haver uma fase hipometabólica e de baixa perfusão tecidual com disfunção mitocondrial e falha energética.

É interessante observar que essa hipoperfusão regional, tanto em estudos clínicos quanto em estudos experimentais, nem sempre atinge níveis suficientes para ocasionar um fenômeno isquêmico e pode ser secundária ao hipometabolismo (Zazulia *et al.*, 2001; Schellinger *et al.*, 2003; Orakcioglu *et al.*, 2005). Entretanto, na presença de pressão intracraniana elevada e baixa perfusão cerebral, o risco da ocorrência de uma isquemia global é bastante alto.

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

Vê-se, então, que o controle da perfusão geral do cérebro é uma medida de preservação inicial para combater o extravasamento de sangue, *i.e.* hematoma. As consequências dessa lesão na região afetada pelo hematoma se manifestam em diferentes formas e tempos.

A primeira consequência ocorre entre minutos e horas seguintes ao início do extravasamento e refere-se diretamente a massa de sangue depositada que causa deformação tecidual local e compressão das áreas adjacentes do encéfalo e vasos. Durante este estágio, ocorre o depósito precoce de células mortas e de restos celulares (Wisniewski, 1961; Jenkins *et al.*, 1989; Morgenstern *et al.*, 1998).

A segunda consequência ocorre ainda na fase aguda e corresponde a resposta celular e inflamatória. Essa resposta, está relacionada à absorção de eritrócitos e de outros detritos celulares pós-HIC, o que também contribui para a lesão secundária do encéfalo. Nesse processo, ocorre a infiltração de leucócitos polimorfonucleares, monócitos/macrófagos, assim como a ativação microglial e astrogliose reativa, além da liberação de vários mediadores inflamatórios que causam dano na barreira e edema encefálico (Kane *et al.*,1992; Tomita *et al.*, 1994).

Os principais mediadores na expressão da resposta inflamatória do Sistema Nervoso Central (SNC) são as citocinas (incluindo o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e Interleucina um beta (IL-1 β)), quimiocinas, moléculas de adesão, antígenos de classe I e II, genes responsivos ao estresse, reguladores de apoptose, fatores de transcrição e enzimas inflamatórias como: Ciclo-oxigenase - 2 (COX-2), lipoxigenase, fosfolipase A₂ II e metaloproteinase-9 (MMP-9), que são em parte regulados pelo fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) (Nolan e Baltimore,1992;Perry *et al.*,1993; Keane *et al.*,1997).

É importante observar que a ativação do NF- κ B parece ser ampliada pelos produtos de sua ativação, como o IL-1 β e o TNF- α . Portanto, um aumento na produção de citocinas poderia gerar mais citocinas e assim ampliar a produção de outros mediadores pró-inflamatórios que são regulados pelo NF- κ B (Thanos e Maniatis, 1995; Newton *et al.*,1997; Barnes e Karin, 1997). Este também pode ser co-ativada por espécies reativas de oxigênio (ROS)(Karin,1999).

Há diversos modelos experimentais de hemorragia intracerebral. Nosso laboratório utiliza o modelo de indução por administração de colagenase IV-S no estriado lateral, que demonstra eficácia em produzir sangramento que resulta em um hematoma que cresce gradualmente entre quatro e cinco horas (Boisserand, 2013), bem como pode gerar uma lesão aguda e reproduzível, mimetizando o que ocorre no Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico (MacLellan *et al*, 2006).

1.2. As Células Gliais

Há duas categorias celulares distintas no sistema nervoso: os neurônios e as células gliais. Os neurônios são as células mais importantes para funções exclusivas do sistema nervoso, i.e., transmissão e processamento de informação, apesar de estarem em menor número. Estima-se que haja dez vezes mais células gliais do que neurônios. (Bear, 2007; Colon-Ramos, 2009). Neste trabalho investigaremos a participação de células gliais nos eventos relacionados a hemorragia intracerebral

Existem diferentes tipos de células gliais que se diferenciam por sua morfologia e função. Estão incluídas: a microglia, que funciona como um macrófago residente no sistema nervoso central; as células de Schwann e oligodendrócitos, responsáveis pela mielinização dos neurônios no sistema nervoso periférico e central, respectivamente; e os astrócitos, que entre outras

funções, é o responsável por manter a homeostase do SNC (Di Castro *et al*, 2011; Henneberger *et al*, 2010).

Devido a sua íntima ligação com os neurônios, os **astrócitos** “percebem” sua atividade elétrica e metabólica, podendo ser ativados por neurotransmissores que extravasaram da fenda sináptica. Mais recentemente, foi sugerido que os astrócitos também podem enviar informações através de “gliotransmissores” (Araque, 2008; Santello *et al*, 2012). A interação entre neurônios e astrócitos está representada na Figura 2.

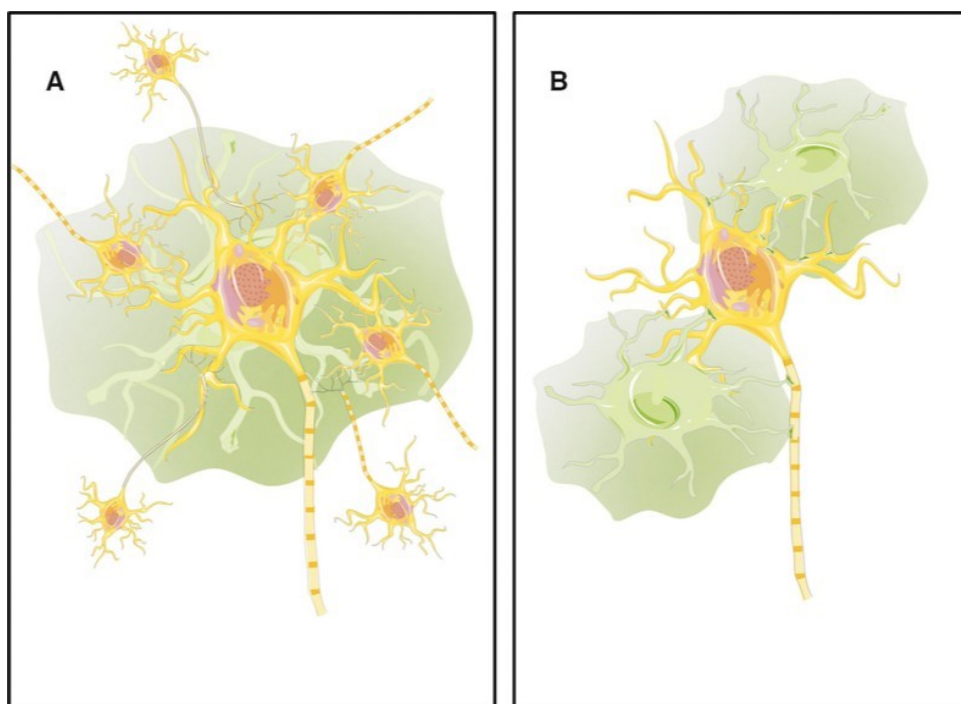


Figura 2: Representação da interação entre astrócitos (verde) e neurônios (amarelo). (A) Demonstra que um astrócito pode fazer conexão com diversos neurônios. (B) Representa que um neurônio pode ter ligação com vários astrócitos. Adaptada de Rossi, 2015

Na ocorrência de dano ao sistema nervoso central os astrócitos reagem, iniciando a chamada astrogliose reativa, um complexo e dinâmico processo dinâmico que envolve diferentes formas e depende do contexto, da natureza e da

severidade da lesão. Esta é caracterizada por algumas alterações moleculares e morfológicas em determinados astrócitos (Burda *et al.*, 2003 e Sofroniew, 2009).

Os astrócitos reativos têm como característica o aumento da expressão de filamentos intermediários, o que pode ser evidenciado pela GFAP, vimentina e nestina (Pekny e Nilsson, 2005). Essas proteínas são integrantes dos filamentos intermediários dos astrócitos e constituem seu citoesqueleto, juntamente com os microtúbulos e filamentos de actina (Li *et al.*, 2008).

Outro tipo de célula glial estudada neste trabalho é a **microglia**, que em condições normais permanece quiescente, porém, a ocorrência de dano encefálico pode ativá-la. A resposta inflamatória gerada pela HIC experimental pode ser demonstrada logo após o insulto (Gong *et al.*, 2000). A micróglia possui um papel importante no recrutamento precoce de leucócitos e ativação da astrogliose (Xue e Del Bigio, 2000). Alguns estudos baseados em tempo de ativação da micróglia e liberação de citocinas após uma HIC, demonstram que é provável que a micróglia possa, na verdade, representar um componente inicial na inflamação (Koeppen *et al.*, 1995).

A primeira ação da micróglia após a HIC está relacionada com sua participação na retirada dos detritos celulares depositados durante a hemorragia. Entretanto, como um produto da sua robusta ativação, as células microgлияis liberam uma variedade de citocinas, quimiocinas, radicais livres, óxido nítrico e eicosanoides, os quais quando associados à síntese e ativação do complemento e proteases de matriz causam danos ao endotélio, aos neurônios e

oligodendrócitos e outras células (Boje, Arora, 1992; Colton, Gilbert, 1993; Giulian, Vaca, 1993; Giulian *et al.*, 1993; Van Beek *et al.*, 2000; Hanisch, 2002;).

Finalmente, a fase mais tardia envolve a produção de vários fatores tróficos e outras moléculas pró- sobrevivência. Nessa terceira fase verifica-se a produção da cicatriz glial, refletindo o reparo tecidual e adaptação do tecido (Garcia *et al.*, 1994).

1.3. Pré – Condicionamento Isquêmico

O pré-condicionamento é definido como a exposição de um determinado tecido a um estímulo sub-letal, e posteriormente ao estímulo originalmente letal; as alterações e respostas celulares derivadas da primeira exposição resultam em tolerância tecidual ao estímulo letal (Kirino, 2002). Presente em diversos organismos e em diferentes tecidos, incluindo o sistema nervoso, o estudo do pré-condicionamento permite definir eventos endógenos associados a vias de salvação/proteção celular (Kirino, 2002; Meller e Simon, 2013).

É sabido que o tecido nervoso possui estratégias de neuroproteção endógena, ou seja, tem capacidade de disparar um conjunto de eventos moleculares e celulares em resposta a diferentes danos teciduais (Huber *et al.*, 1999), inclusive aqueles relacionados a isquemia cerebral (Riepe *et al.*, 1999). A resposta das vias de neuroproteção endógena para combater a lesão celular e a morte depende da intensidade do estímulo e apresenta limitações, uma vez que a

morte celular por necrose, que ocorre precocemente, não pode ser revertida (Bernaudin et al., 1999).

Estudos indicam que esses neurônios que passaram por um período de isquemia intermitente antes de um longo período de isquemia apresentam super-regulação do transporte ativo de glicose e aumento da viabilidade celular, quando comparados a neurônios que passaram por um período prévio de isquemia contínua (Stevens *et al*, 2008; Trendelenburget *al*, 2005).

O pré-condicionamento pode gerar dois tipos de tolerância segundo o perfil temporal e os mecanismos envolvidos, chamadas de precoce e tardia. A tolerância precoce é uma proteção de curta duração, que ocorre imediatamente após o insulto usado para promover o PC e tem duração de até uma hora. Esta resulta em modificações pós-translacionais em proteínas já sintetizadas e na atividade dessas proteínas (Obrenovitch, 2008). Essa sequência de eventos pode ser fortemente influenciada por fatores de sobrevivência ou inibida por fatores apoptóticos (Ciechanover, 2000; Kopito, 2000).

Por outro lado, a tolerância tardia requer indução gênica e síntese de novas proteínas, que representam respostas de longa duração e ativação de genes (Nagahori *et al*, 1994). Esta, por sua vez, tem 24 horas após a indução do PC, possui um pico de atividade 72 horas após o estímulo, e pode perdurar por algumas semanas (Gidday, 2006; Stowe *et al*, 2011). A síntese de novas proteínas leva ao aumento da capacidade de manutenção da viabilidade celular e envolve uma classe conhecida como chaperonas, proteínas responsáveis por

auxiliar no enovelamento proteico e que encaminham as proteínas para a destruição caso não seja possível atingir a configuração desejada (Ciechanover, 2000; Kopito, 2000). Recentemente tem sido demonstrado que os astrócitos podem ter importante participação no fenômeno de pré-condicionamento isquêmico (Hirayama *et al*, 2015). Alguns dos fenômenos estão representados na Figura 3.

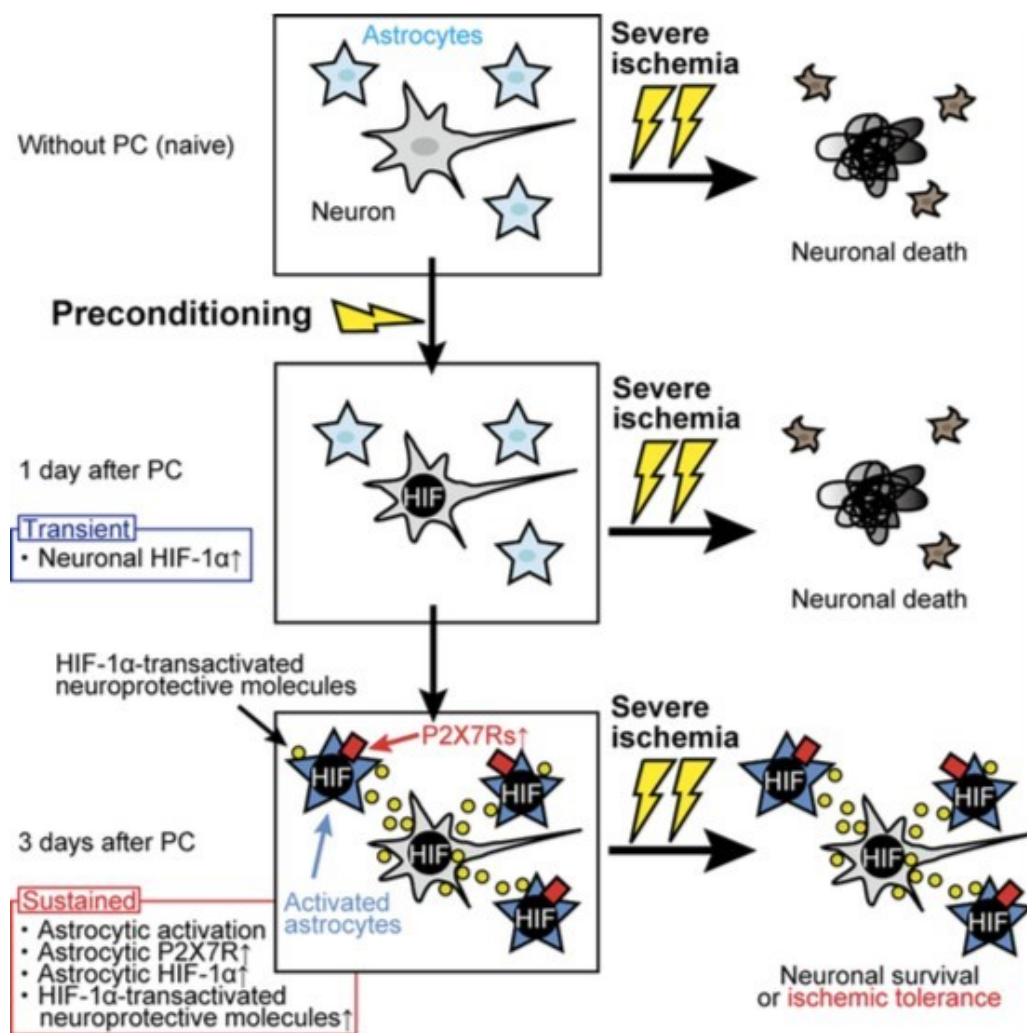


Figura 3: Esquema de mecanismos mediados pelos astrócitos na tolerância isquêmica. Adaptado de Hirayama et al, 2015. Legenda: *Preconditioning* - pré-condicionamento; *severe ischemia* - isquemia grave; *astrocyte* - astrócito; *neuron* - neurônio; *neuronal death* - morte neuronal; *neuronal survival* - sobrevivência neuronal; *ischemic tolerance* - tolerância isquêmica; *HIF* - fator induzido pela hipóxia.

Considerando os princípios da neurociência translacional, é de grande relevância a investigação de estratégias de intervenção eficazes para minimizar os efeitos do Acidente Vascular Encefálico (Hahn *et al.*, 2011). Medidas que possam ser adotadas antes, durante ou até mesmo após a interrupção do fluxo sanguíneo para o cérebro podem não apenas diminuir os custos de tratamento, como também diminuir a morbidade e a mortalidade de pacientes em todo o mundo. Além disso, estas pesquisas podem resultar na criação de novos fármacos que possam melhorar a “autodefesa” cerebral contra a isquemia, o que beneficiaria pacientes com risco de acidente vascular cerebral e distúrbios neurodegenerativos relacionados (Massada *et al.*, 2001; Omata *et al.*, 2002; Obrenovitch, 2008).

O pré-condicionamento e a tolerância isquêmica têm sido objeto de estudos clínicos. Resultados sugerem que pacientes pós-AVE que passaram por eventos transitórios prévios têm melhor recuperação do que os outros pacientes, indicando que há correlação entre a tolerância isquêmica espontânea com a experimental (Moncayo *et al.*, 2000; Wegener *et al.*, 2004). Contudo, explicar esses mecanismos de pré-condicionamento ainda é um desafio, já que alguns estudos recentes integraram a esses mecanismos conhecidos, rotas imunes inatas como o dos receptores Toll (TRLs) e Interferon Tipo I (IFN) (Pradillo *et al.*, 2009).

Contudo, é importante ressaltar que o pré-condicionamento não é capaz de evitar o AVE, mas atenuar seus efeitos fisiopatológicos e resulta em um menor

volume de lesão, além de beneficiar a recuperação após o evento (Dirnagl *et al*,2009; Stenzel-Poore *et al*, 2007).

Alguns estudos revelam que a tolerância resultante do PC protege até mesmo de estímulos subsequentes de outra origem. Esses estudos relatam que estressores físicos e metabólicos não isquêmicos podem resultar em tolerância isquêmica (Durukan e Tatlisumak, 2010). Quando o PC gera uma tolerância a um evento de origem distinta acontece a tolerância cruzada. Este tipo de tolerância pode ser explicado pelo fato de que diversas vias patológicas convergem em vias comuns de lesão, morte celular e reparo. Como exemplo desse fato, diferentes causas de neurodegeneração possuem mecanismos comuns, tais como: inflamação, excitotoxicidade e apoptose.

Neste trabalho utilizamos o modelo de indução do pré-condicionamento isquêmico pela oclusão bilateral simultânea das artérias carótidas comuns. Este se mostrou um método eficaz em estudos recentes do laboratório (Boisserand, 2013), bem como é um modelo usado em diversos outros estudos (Lehotsky *et al*, 2009; Koch e Perez-Pinzon, 2013;). Desta forma, o modelo de pré- condicionamento isquêmico associado a um evento hemorrágico intracerebral pode ser entendido como uma forma de tolerância cruzada.

2. HIPÓTESE DE TRABALHO

Nossa hipótese de trabalho é que o pré-condicionamento isquêmico irá produzir tolerância cruzada com o evento hemorrágico, e consequente neuroproteção. Partindo dessa premissa, estudamos os efeitos do pré- condicionamento isquêmico sobre aspectos funcionais e morfológicos em ratos *Wistar* submetidos a hemorragia intracerebral experimental.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do pré-condicionamento isquêmico induzido pela oclusão bilateral das artérias carótidas comuns por 10 minutos sobre os déficits motores relacionados ao estriado, bem como sobre a morfologia da lesão em ratos *Wistar* adultos submetidos à hemorragia intracerebral induzida pela administração de colagenase do tipo IV-S.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar os déficits motores de ratos *Wistar* adultos submetidos à HIC e ao pré-condicionamento por meio dos testes do cilindro e do *Staircase*;
- b) Verificar os efeitos do pré-condicionamento isquêmico sobre o volume da lesão pós-HIC no encéfalo;
- c) Avaliar o efeito protetor do pré-condicionamento isquêmico sobre a expressão de OX-42 (marcador de micróglia ativada) e GFAP (marcador de astrócitos) no estriado.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Desenho Experimental

O projeto de pesquisa do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal, CEUA, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob o número 27638. Foram utilizados 84 ratos *Wistar* provenientes do Biotério setorial do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com 60 dias de vida ao início do experimento. Os animais permaneceram em grupo de no máximo cinco, em caixas de Plexiglass, em condições padrão de moradia (ciclo de claro/escuro de 12 horas), controle de temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) e com água e comida controlada durante o período do teste comportamental. A Figura 4 apresenta um resumo do desenho experimental.

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais:

- 1) Sham (n = 18)
- 2) PC – Pré-condicionamento isquêmico (n = 20)
- 3) HIC – Hemorragia Intracerebral (n = 21)
- 4) PC + HIC – Pré-condicionamento isquêmico de 10 min e Hemorragia Intracerebral (n = 25)

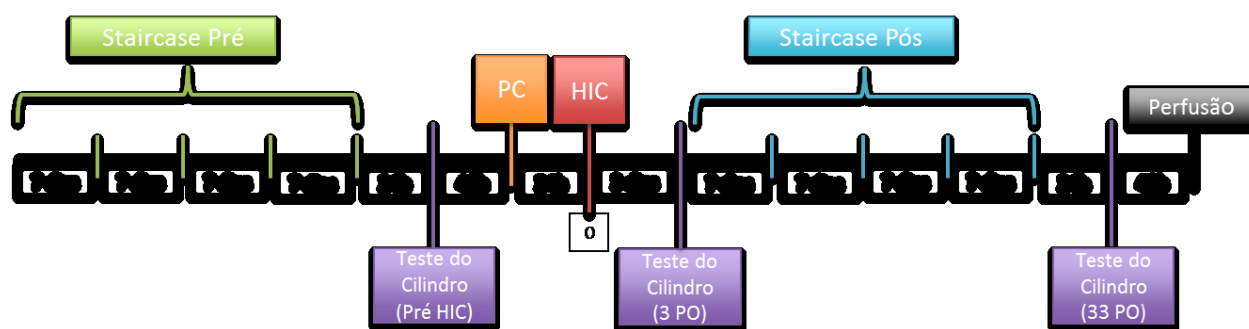


Figura 4: Desenho experimental. O dia da cirurgia para indução da HIC é considerada dia "0".

Os animais foram treinados no pré-operatório por quatro semanas na caixa do teste comportamental chamado *Staircase*, uma vez pela manhã e outra à tarde. No final de cada uma das quatro semanas pré-operatórias, os animais eram avaliados no mesmo teste, como melhor descrito na seção 4.3.1; o mesmo aconteceu durante as quatro semanas de pós-operatório. O teste do cilindro foi realizado com os animais no pré-operatório, no 3PO e depois mais uma vez na última semana do teste do *Staircase*, para que o animal não tivesse uma adaptação e redução da exploração influenciando no resultado.

4.2. Procedimentos Cirúrgicos

Os procedimentos cirúrgicos para a indução do pré-condicionamento isquêmico e da hemorragia intracerebral foram realizados em duas etapas:

- a) No primeiro dia foi realizada a dissecação e o isolamento das carótidas com um fio de sutura (sem obstrução do fluxo sanguíneo), como objetivo de expor as carótidas para o procedimento de oclusão com clip cirúrgico durante 10 minutos nos grupos 2 e 4.
- b) Após 24 horas da indução do pré-condicionamento isquêmico, foi realizada a indução da Hemorragia Intracerebral nos grupos 3 e 4. No mesmo momento, foi realizada a administração de veículo nos demais grupos (1 e 2).

4.2.1. Pré-Condicionamento Isquêmico Global

O modelo usado para indução do pré-condicionamento isquêmico a isquemia transitória por oclusão de dois vasos. Para explicar esse modelo, é importante rever a anatomia da circulação sanguínea cerebral. As Artérias Carótidas se originam da Artéria Aorta em um tronco comum, após serem ramificadas, a porção interna da Artéria Carótida origina as Artérias Cerebral Média e Cerebral Anterior, que são responsáveis pela irrigação da porção antero-lateral do encéfalo e distribuem seu suprimento sanguíneo a outras regiões através de artérias comunicantes formando o Círculo de Willis, como representado na Figura 5.

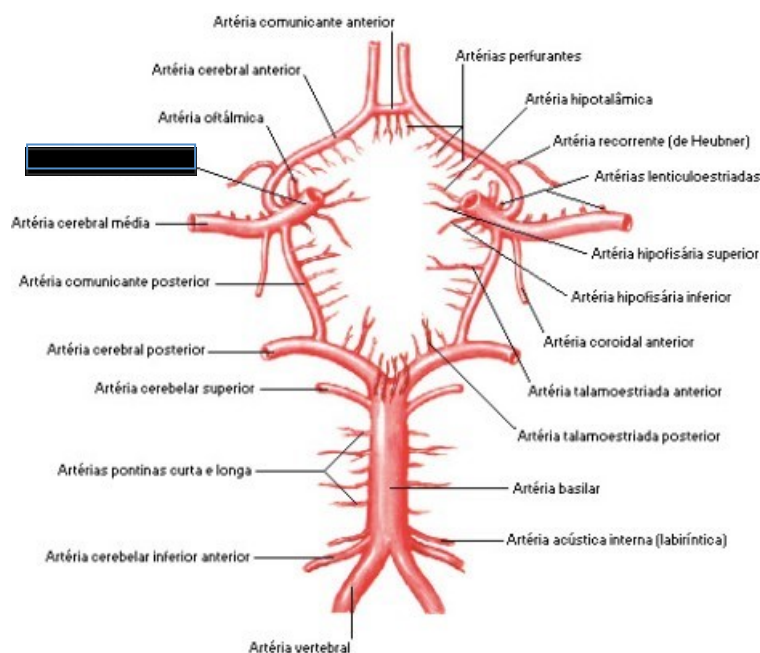


Figura 5: Ilustração do Polígono de Willis, c. Com destaque para Artéria Carótida Interna e Artéria Cerebral Média. (Adaptado de Netter F, 2000)

A oclusão das Artérias Carótidas leva a uma redução significativa do fluxo sanguíneo em regiões irrigadas pela Artéria Cerebral Média como o Estriado e o hipocampo (Smith *et al*, 1984; Dowden, 1999). Essa redução é capaz de

promover ativação de mecanismos celulares de proteção como a ativação da micróglia residente, porém sem levar a danos histológicos detectáveis (Nagahori *et al*, 1994). Assim, este é um modelo eficaz de pré-condicionamento isquêmico.

No dia anterior à Hemorragia Intracerebral, os animais foram anestesiados com Isoflurano (4%) e mantidos anestesiados com Halotano (1,5 a 2%) utilizando aparelho de anestesia inalatória (Narcosul). Quando profundamente anestesiados os mesmos foram colocados em posição dorsal para um melhor acesso a região do pescoço, que foi devidamente tricotomizada e limpa com álcool iodado. Então, os animais sofreram uma incisão na linha média do pescoço para a localização, exposição e isolamento das Artérias Carótidas. Que a seguir foram submetidas à clipagem (Clipe para Aneurisma Intracraniano em liga de Cobalto Vicca®) por 10 minutos, de acordo com o desenho experimental já mencionado. Os animais que não estavam nos grupos 2 ou 4, passaram pelos mesmos procedimentos exceto pela clipagem das Artérias Carótidas.

4.2.2. Hemorragia Cerebral Induzida por Colagenase

Para reproduzir a Hemorragia Intracerebral nos animais foi utilizada a injeção de colagenase derivada de *Clostridium histolyticum* no parênquima cerebral. A injeção de colagenase promove a dissolução da matriz extracelular ao redor dos capilares cerebrais, pois a substância é de uma família de enzimas proteolíticas que catalisam a hidrólise do colágeno, resultando em hemorragia

espontânea no local de aplicação pela ruptura de pequenos vasos. (MacLellan *et al*, 2008; James *et al*, 2007)

Este método é amplamente empregado como modelo de HIC atualmente, em especial nos núcleos da base. Criado na década de 90 esse modelo é usado para reproduzir experimentalmente os efeitos da HIC espontânea em humanos e tem como vantagens a simplicidade, a reprodutibilidade dos resultados, a extensão hemorrágica dose-dependente e a fácil adaptação do modelo para aplicação em várias espécies de animais. Assim, é um modelo experimental que apresenta baixa variabilidade técnica (MacLellan *et al*, 2006).

Os animais foram anestesiados do mesmo modo que no procedimento descrito anteriormente de pré-condicionamento, com isoflurano (4% para indução) e halotano (1,5 a 2% para manutenção) utilizando um aparelho de anestesia inalatória (Narcosul). Quando profundamente anestesiados foram colocados em posição ventral no aparelho estereotáxico. Desta forma, realizada a tricotomia e a limpeza da área, como auxílio de um bisturi cirúrgico foi feita uma incisão na linha média de aproximadamente 0,5 cm sobre a pele para a exposição óssea do crânio. A seguir foi usada a broca odontológica especial (Beltec® LB100) para realizar um pequeno orifício que permitiu a entrada da seringa da injeção estereotáxica (Hamilton®, nº 26 USA).

Foi utilizada uma micro-injeção com 0,2U de colagenase tipo IV diluída em 1µL de salina estéril e posicionada nas seguintes coordenadas estereotáxicas: 0,0mm anterior ao Bregma, 3,6mm lateral ao Bregma e -0,6mm ventral a partir

do crânio (Paxinos e Watson, 2004). Essa substancia foi injetada ao longo de cinco minutos e esperado mais cinco minutos para a retirada da seringa para evitar o refluxo (Szymanska *et al*,2006). Nos animais dos grupos 1 e 2 foi injetado o mesmo volume de diluente, sob as mesmas condições. Os animais receberam água e comida à vontade até o 2º dia pós-operatório.

Imediatamente após a sutura com nylon cirúrgico, os animais receberam uma aplicação tópica de lidocaína 10% (Xilocaína®) e tiveram o comportamento monitorado, caso necessário, os animais recebiam uma aplicação extra, respeitando os limites posológicos do medicamento. Respeitado

o tempo de recuperação dos animais, os mesmo foram avaliados sobre os resultados imediatos da cirurgia e consequente prejuízo motor. Os animais que receberam a colagenase deveriam exibir rotação corporal espontânea e déficit motor do membro anterior contralateral ao hemisfério lesado (DeBow, 1993). Aqueles animais que não apresentaram esse quadro foram excluídos do estudo.

Com a avaliação histológica por meio da técnica de coloração por Hematoxilina-eosina, descrita na seção 4.4.1, foi possível definir a exata localização topográfica da lesão (que normalmente inclui a região lateral do estriado), bem como sua extensão.

4.3. Avaliação Comportamental

4.3.1. Teste do *Staircase*

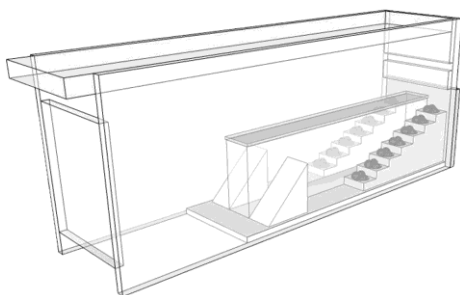
Com o Teste do *Staircase* avaliamos quantitativamente a habilidade funcional do animal, pois este exige que o mesmo exerça controle motor preciso da pata anterior a fim de apanhar as esferas comestíveis (Montoya *et al*, 1991). Este teste é usado para estabelecer correlações entre o déficit funcional e a área de lesão, tanto isquêmica quanto hemorrágica (Windle *et al*, 2006), bem como para avaliar o desempenho motor.

Para a realização do teste, em uma sala com condições controladas de iluminação, som e temperatura, foram utilizados aparatos compostos por caixas transparentes de acrílico, com uma plataforma baseada no eixo longitudinal que divide a caixa em dois lados (direita e esquerda) (Pagnassut *et al*, 2012 e Boisserand, 2013), conforme demonstrado na Figura 6. Cada um dos lados, ao final da caixa, possuía sete degraus, nos quais foi possível colocar três esferas comestíveis (Glóbulos Inertes n° 7 - 4,6mm; 65 mg \pm 10%; Farmacopéia Brasileira Homeopática - Brasil).

Durante o tempo do teste os animais deveriam subir na plataforma e realizar apenas o movimento unilateral do membro anterior, isto é não poderia cruzar a linha média com o membro, e pegar quantas esferas conseguisse. O número de esferas apanhadas é usado como indicador da habilidade de preensão do membro anterior (Montoya *et al*, 1991).

Os animais foram adaptados para a realização do teste durante quatro semanas antes das cirurgias, em dois horários do dia, um pela manhã e um à tarde. No final da semana os animais eram testados. Os indivíduos recebiam alimentação proporcional à média de peso da caixa. Porém, durante o período de recuperação da cirurgia esses receberam alimentação e água *ad libitum*. No período pós-operatório, os animais foram testados da mesma forma, i.e., treinados durante a semana, duas vezes ao dia, com a realização do teste final da semana (Mestriner, 2013).

Os testes pré-operatórios serviram de base para a divisão dos grupos experimentais, pois foram divididos conforme suas médias e depois randomicamente alocados para cada grupo.



B

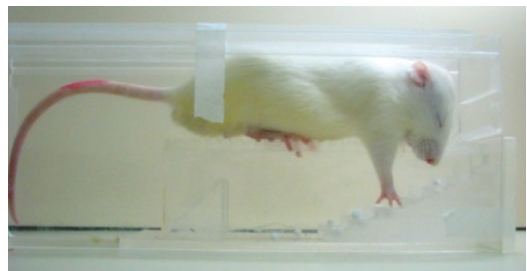


Figura 6: Teste do *Staircase*. A) Ilustração do aparato utilizado para o teste; B) Representação da posição do animal na caixa para o teste do *Staircase*.

4.3.2. Teste do Cilindro

O objetivo do teste do cilindro é avaliar o uso assimétrico dos membros anteriores durante a realização de uma tarefa de exploração e suporte corporal (Woodlee, Asseo-Garcia *et al.*, 2005; Maclellan, Auriat *et al.*, 2006; Schallert, 2006). Para a realização do teste os animais foram colocados no interior de um cilindro transparente de acrílico de 20 cm de diâmetro e 40 cm de altura, situado sobre um tampo de mesa de vidro, também transparente, conforme demonstrado na Figura 7, em uma sala com iluminação, temperatura e som controlados.

Durante o tempo de 5 a 6 minutos os animais permaneceram no cilindro, e foram filmados por uma câmera digital com vista inferior do animal para que seus movimentos exploratórios espontâneos pudessem ser observados. Foi computado o número de contatos com o cilindro pelos membros anteriores utilizados para suporte corporal durante a exploração. Aqueles animais que realizassem menos de 12 toques seriam desconsiderados e excluídos (Boisserand, 2013).

Para este teste os animais não passaram por um período de adaptação uma vez que, para a obtenção de resultados mais fidedignos, era necessária a exploração do animal e por isso o ambiente não poderia ser familiar. Na avaliação foi quantificado o uso assimétrico dos membros anteriores em câmera lenta e quadro a quadro (realizada por um avaliador cego quanto a qual animal pertencia a qual grupo experimental), calculado por meio da fórmula:
[contatos

realizados com o membro anterior contralateral + $\frac{1}{2}$ dos contatos bilaterais] / [número total dos contatos realizados com ambos os membros anteriores x 100] (Maclellan, Auriat *et al.*, 2006).

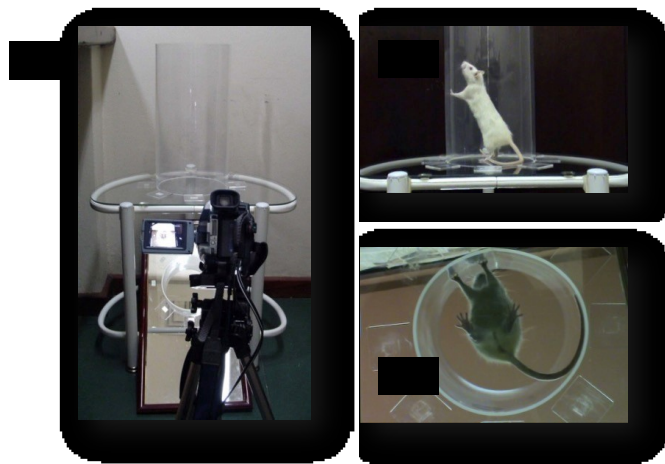


Figura 7: Teste do cilindro. (A) aparato para a realização do teste; (B) vista lateral de animal realizando a exploração; (C) vista inferior do mesmo, utilizada para a análise das imagens (adaptado de PAGNUSSAT, 2009).

4.4. Perfusão e Avaliação Morfológica

Para a realização dos protocolos de histologia e imunoistoquímica os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital 65 ± 5 mg/kg via intraperitoneal. Posteriormente, para a exposição do coração foi feita por toracotomia. A seguir injetou-se 1000UL de heparina sódica (Cristália) no ventrículo esquerdo e foi inserida uma cânula ligada à bomba de perfusão (Control Company). Através de outra incisão, essa no átrio direito, foi perfundida inicialmente, uma solução salina (150 mL), para a lavagem da árvore vascular e, posteriormente, uma solução fixadora (200mL) composta de paraformaldeído (PFA) 4% diluído em tampão fostato (TF) 0,1M com pH de 7,4.

Os encéfalos foram retirados por meio de abertura da calota craniana e pós-fixados na mesma solução fixadora utilizada na perfusão, por mais 4 horas à

temperatura ambiente, e seguir crioprotégidos por imersão em sacarose 30% diluída em TF a 4°C, onde permaneceram até submergirem. Depois da crioproteção, os encéfalos foram congelados em isopentano resfriado em nitrogênio líquido até a realização das seções (40 µm) em criostato (Leitz)

4.4.1 Avaliação Histológica

Foram selecionadas seções a cada 200 µm, iniciando em Bregma +1,7 mm e terminando em Bregma -4,8 mm (Paxinos e Watson, 2004). Os cortes foram coletados em lâminas histológicas previamente tratadas com gelatina cromo-alumina. A seguir, esses cortes foram corados com a técnica de hematoxilina-eosina. Nessa técnica histológica os cortes foram hidratados e levados à solução de hematoxilina de Mayer por 3 minutos, sendo, posteriormente, lavados em água corrente por pelo menos 20 minutos. Logo após, os cortes foram levados à solução de eosina a 0,5% no período de 15 segundos a 1 minuto, com retirada do excesso de Eosina em diversas imersões em álcool 95%. Posteriormente, foi iniciado o processo de desidratação (duas imersões em álcool absoluto, uma imersão em carboxilol e, por fim uma imersão em xilol). Em seguida, as lâminas foram montadas e cobertas por bálsamo do Canadá e lamínulas. Ao final deste processo, as lâminas foram escaneadas em resolução 2400, para que com o auxílio do software *Scion Image J 4.6* (Scion Corporation, Frederick MD, USA) para mensurar o volume da lesão foi usado o princípio de Cavalieri (Gundersen *et al.*, 1988; Sanches *et al.* 2013), por meio da aplicação da fórmula:

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

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.

4.4.2. Imunofluorescência

A técnica de imunofluorescência foi realizada nas lâminas com secções de 20µm do estriado dorsolateral adjacente e contralateral à lesão (Mestriner et al., 2011).

As mesmas foram fixadas em PFA 4%, lavadas em PBS e, após, bloqueadas por 30 min em uma solução contendo 3% de soro normal de cabra (NGS) (Sigma- Aldrich) diluídos em PBS Triton-X à 0,3% (PBS-Tx) em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas overnight com os anticorpos primários diluídos em PBS-Tx e NGS e mantidas a (4°C). No dia seguinte, as lâminas contendo as secções foram lavadas em PBS e incubadas com os anticorpos secundários fluorescentes compatíveis (Alexa-Flúor, Molecular Probes) diluídos em PBS-Tx e NGS por 2 horas em uma sala escura (temperatura ambiente), seguida de lavagem em PBS. Foram feitas as seguintes marcações: anti-GFAP (1:200, Sigma-Aldrich) e anti-OX42 (1:500, Millipore) e os anticorpos secundários Alexa-Flúor, 488 anti-mouse e 647 anti-rabbit (Molecular Probes).

A seguir, os cortes foram cobertos com meio de montagem PVA-DABCO (Fluka Analytical, Suíça) e lamínulas. Para o controle negativo, alguns cortes tiveram a exposição ao anticorpo primário omitida, sendo o mesmo substituído por PBS-Tx durante a realização do protocolo descrito. 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) (Boisserand, 2013; Mestriner, 2011).

4.4.3. Quantificação da Imunofluorescência

Para comparar quantitativamente a marcação da imunofluorescência foram capturadas 6 imagens 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 (Sham e PC), conforme representado na Figura 8. Uma área de interesse foi estipulada ($3800 \mu\text{m}^2$); 5 a 6 animais foram analisados para cada grupo.

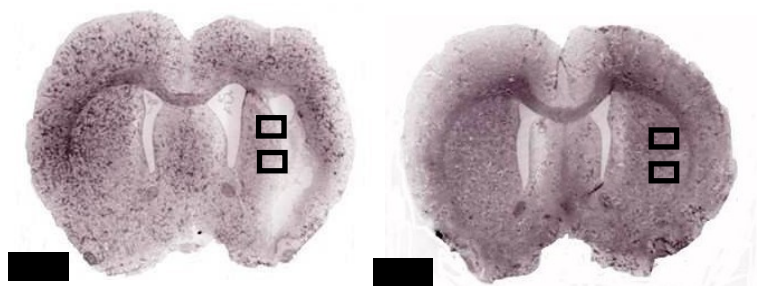


Figura 8: Imagem representativa das regiões de onde foram obtidas as imagens para a avaliação das marcações da imunofluorescência. A) Borda medial da lesão hemorrágica no estriado esquerdo; B) Região correspondente no estriado esquerdo dos animais que receberam apenas veículo.

Após a captura, as imagens foram analisadas com o programa Image J *software* versão 4.6 (<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 utilizados para obter a intensidade de coloração média para cada secção, utilizada na fórmula densidade integrada (dado gerado pelo programa) / área de interesse (3800 μm^2) para obtenção da intensidade de fluorescência. Assim, fez-se a média de cada secção e de cada animal, para posterior análise estatística (Jeon *et al.*, 2012).

4.5. Análise Estatística

Ao final do experimento o N era de 67 animais. Um animal morreu durante o período do *Staircase* antes da cirurgia, sete animais morreram durante a cirurgia do pré-condicionamento, nove animais morreram após a cirurgia da hemorragia. Apenas três animais foram excluídos do teste do cilindro por não realizarem o número de toques requeridos. Todos os animais foram usados no Teste do *Staircase*. Para o volume da lesão, foram utilizados os encéfalos de todos os animais submetidos a análise comportamental, estando os mesmos divididos entre os grupos experimentais conforme descrito anteriormente. Para a imunofluorescência, foram escolhidos aleatoriamente de 5 a 6 animais de cada grupo. O software IBM SPSS Statistics versão 21 foi utilizado para a análise dos dados.

Inicialmente, a normalidade dos dados foi testada através do teste de Shapiro-Wilks e a homogeneidade da variância por meio do teste de Levene. As variáveis estudadas apresentaram distribuição normal e variância homogênea. ($P \geq 0,05$). A diferença pré e pós HIC por cada grupo foi avaliada pelo teste t de Student para amostras pareadas no teste do *Staircase*. Os dados do teste do cilindro foram analisados por ANOVA de medidas repetidas e para estabelecer diferenças entre os grupos experimentais foi realizada ANOVA de duas vias usando o fator lesão (HIC e Sham) e o fator tratamento (com ou sem PC). 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.

5. RESULTADOS

5.1 Teste do *Staircase*

O teste t de Student para amostras pareadas demonstrou que há diferença entre o desempenho pré e pós-HIC no grupo controle Sham ($t_{(17)} = 5,301$, $P < 0,001$); a melhoria no desempenho revela que o teste é adequado para aferir a função motora. A ANOVA de duas vias mostrou que não houve diferenças entre os grupos na sessão pré-HIC ($F_{(3,64)} = 0,461$, $P > 0,1$). Na avaliação pós-HIC houve uma interação entre o fator lesão e o fator tratamento, mostrando uma diferença entre os grupos ($F_{(1,64)} = 9,244$, $P < 0,001$). O teste de comparações múltiplas revelou que o grupo HIC teve diferença significativa quando comparado aos demais grupos experimentais, indicando que houve uma redução do uso do membro contralateral a lesão, como apresentado na Figura 9. Este déficit foi revertido no o grupo PC+HIC, que não apresentou diferenças em relação aos grupos Sham e PC. Assim, sugere-se que o PC foi capaz de assegurar a funcionalidade do membro contralateral após lesão hemorrágica.

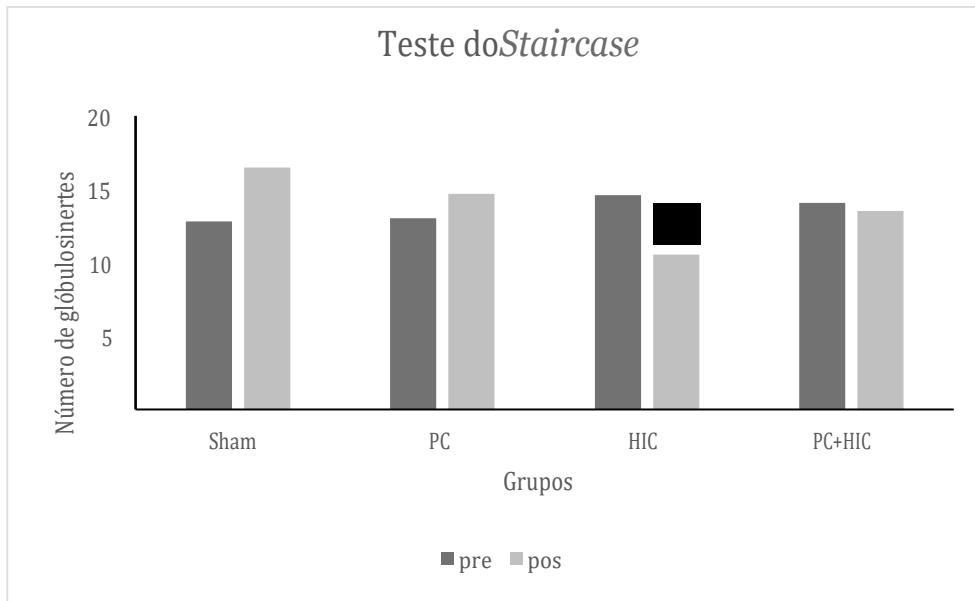


Figura 9: Desempenho no Teste do Staircase, comparando os períodos dados pré- e pós- hemorragia intracerebral, expressos em média de glóbulos inertes consumidos \pm erro padrão. (*) representa diferença significativa entre o grupo HIC e os demais grupos no pós-operatório. Dados analisados por ANOVA de vias. ($P < 0,05$).

5.2 Teste do Cilindro

A ANOVA de duas vias demonstrou que há diferença entre os grupos ($F_{(1,63)}=6,834$, $P=0,001$). O teste de comparações múltiplas revelou que o grupo HIC teve diferença significativa quando comparado aos demais grupos, indicando assim uma assimetria do uso da pata contralateral a lesão. No entanto, não houve diferença entre o grupo PC+HIC e os grupos PC e Sham. Na Figura 10 podemos ver que houve interação entre o fator tempo e o fator grupo ($F=4,352$, $P<0,001$), segundo indicado no teste de ANOVA de medidas repetidas. Na comparação por pares, observou-se que os animais que sofreram HIC têm desempenho distinto ao dos grupos que receberam veículo, na avaliação no terceiro dia pós-HIC ($P<0,01$). Já na reavaliação, no 33º dia pós-operatório, os grupos que sofreram lesão tiveram uma recuperação espontânea, porém apenas o grupo PC+HIC não apresentou diferença para os grupos Sham e PC ($P<0,05$); entretanto o grupo HIC, apesar de ter uma recuperação do número de toques entre as avaliações dos dias 3 e 33 ($p<0,05$), manteve a diferença em relação aos demais grupos ($p<0,05$). Os dados apresentados revelam um efeito da lesão no 3º dia pós-HIC e que o pré-condicionamento favorece a recuperação funcional a longo prazo.

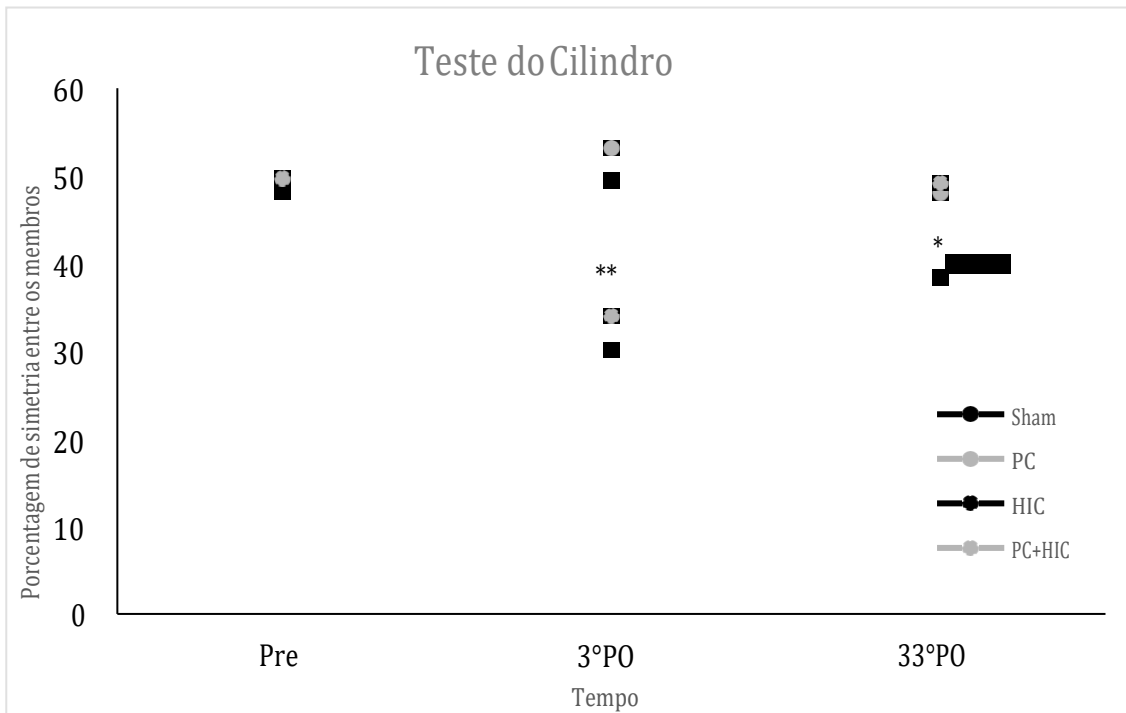


Figura 10: Desempenho no Teste do Cilindro em três momentos: pré-HIC, 3° dia pós-operatório, PO, e 33° dia PO. Dados expressos em média do percentual de simetria do toque \pm erro padrão. (**) ambos os grupos HIC e PC+HIC são diferentes dos grupos Sham e PC. (*) indica que o grupo HIC é diferente dos demais grupos experimentais.

5.3 Volume de Lesão

A ANOVA de duas vias demonstrou uma interação entre o fator lesão e o fator tratamento ($F(1,42) = 12,563, P=0,001$). O teste de comparações múltiplas revelou que os animais submetidos a HIC apresentaram uma redução significativa no volume do córtex encefálico quando comparados aos grupos veículo, sem diferença entre eles. Além disso, o grupo PC apresentou uma redução significativa no volume encefálico quando comparado com o grupo Sham. Os dados da Figura 11 indicam que o pré-condicionamento não foi capaz de prevenir a perda tecidual nos animais submetidos a hemorragia intracerebral.

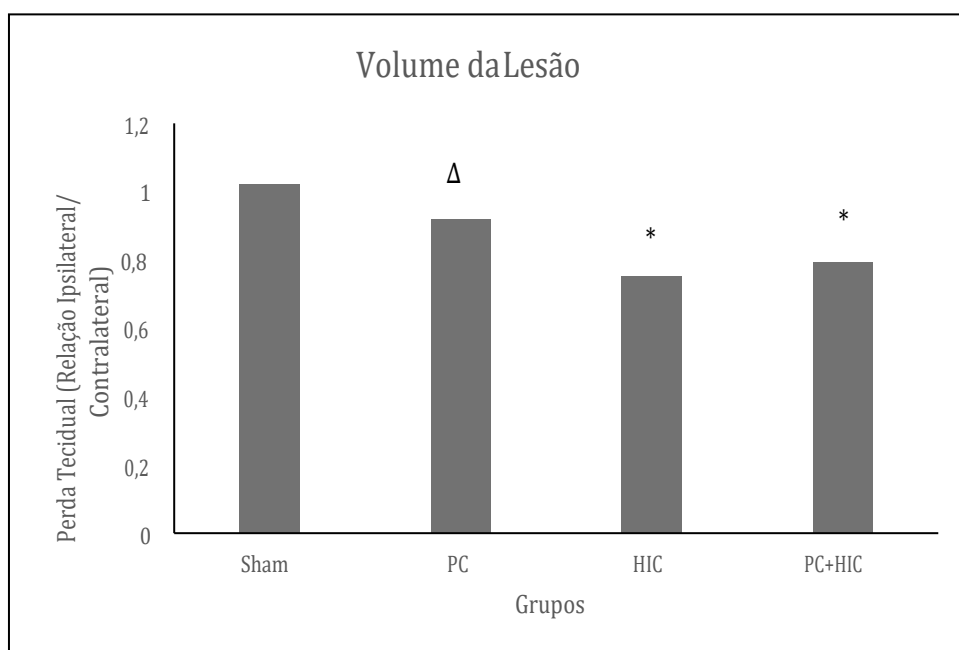


Figura 11: Volume da lesão estimado pela técnica de Cavalieri; dados expressos como média \pm erro padrão da relação do volume encefálico ipsi/contralateral. (*) demonstra que houve diferença entre os grupos dos animais que sofreram lesão comparados aos grupos que receberam veículo. (Δ) revela que o grupo PC apresentou diferenças significativas em relação ao grupo Sham.

Testes de Análise de Regressão com os dados até então apresentados revelam uma correlação entre o volume da lesão e o desempenho no teste do cilindro no 3ºPO ($R^2=0,449$, $P<0,001$), bem como no teste do *Staircase* pós-HIC ($R^2=0,408$, $P<0,001$). Entretanto, apesar dessa correlação e do PC assegurar a funcionalidade motora, este não foi capaz de resultar em prevenção de perda tecidual (Figura 12).

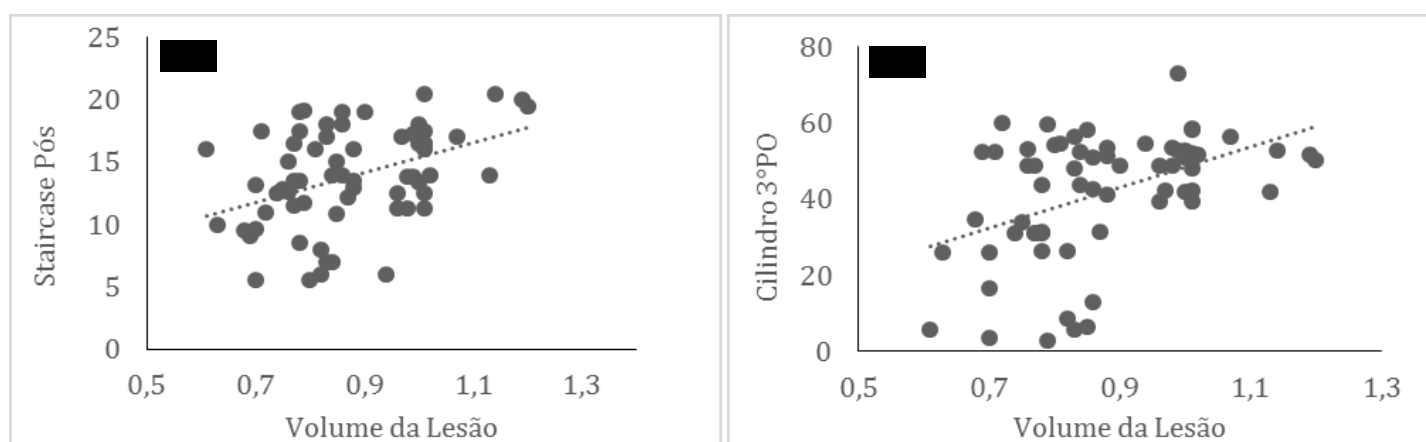


Figura 12: Correlação entre (A) volume da lesão com o teste do *Staircase* pós operatório e (B) volume da lesão com o teste do cilindro no 3ºPO.

5.4. Imunofluorescência

A ANOVA de duas vias demonstrou uma interação entre o fator lesão e o fator tratamento ($F(1,25) = 10,769$, $P < 0,001$). O teste de comparações múltiplas revelou que os animais HIC apresentaram um aumento na intensidade da fluorescência do GFAP no estriado ipsilateral a lesão, incluindo o grupo PC + HIC. Ainda, os animais do grupo PC não foram diferentes dos animais Sham (Figura 13).

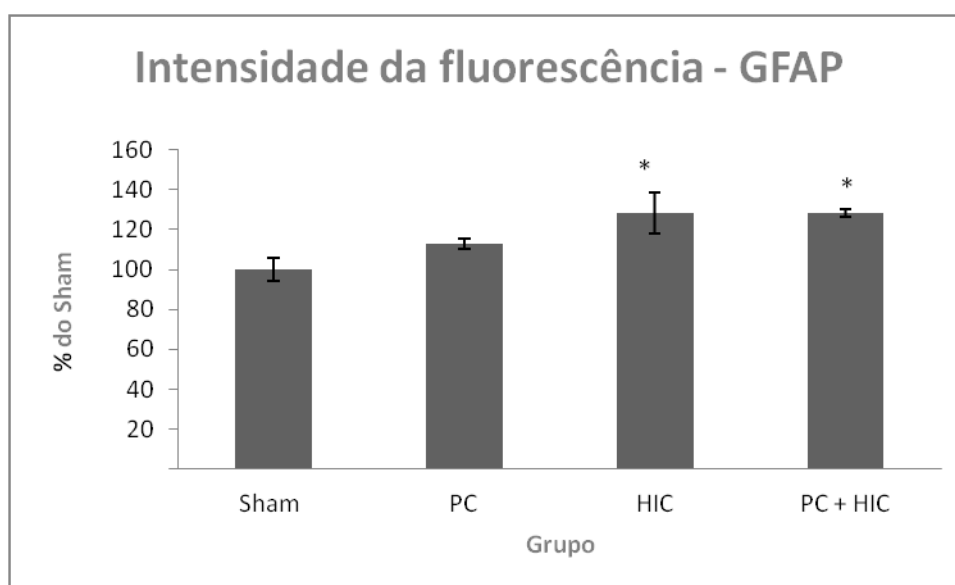


Figura 13: Intensidade da fluorescência para GFAP. Dados avaliados no estriado ipsilateral a lesão e expressos como média \pm erro padrão em porcentagem de controle, grupo Sham. (*) Diferença significativa do grupo HIC e PC+HIC quando comparado aos outros grupos experimentais, após ANOVA de duas.

Já no estudo da micróglia, a ANOVA de duas vias demonstrou uma interação entre o fator lesão e o fator tratamento ($F(1,23) = 9,740$ $P < 0,001$). O teste de comparações múltiplas revelou que os animais submetidos a HIC apresentaram um aumento significativo na intensidade da fluorescência de OX-42 no estriado ipsilateral a lesão, quando comparado com os demais grupos experimentais. No entanto, os animais do grupo PC+HIC não mostraram diferença significativa com os animais controles, grupo Sham (Figura 14).

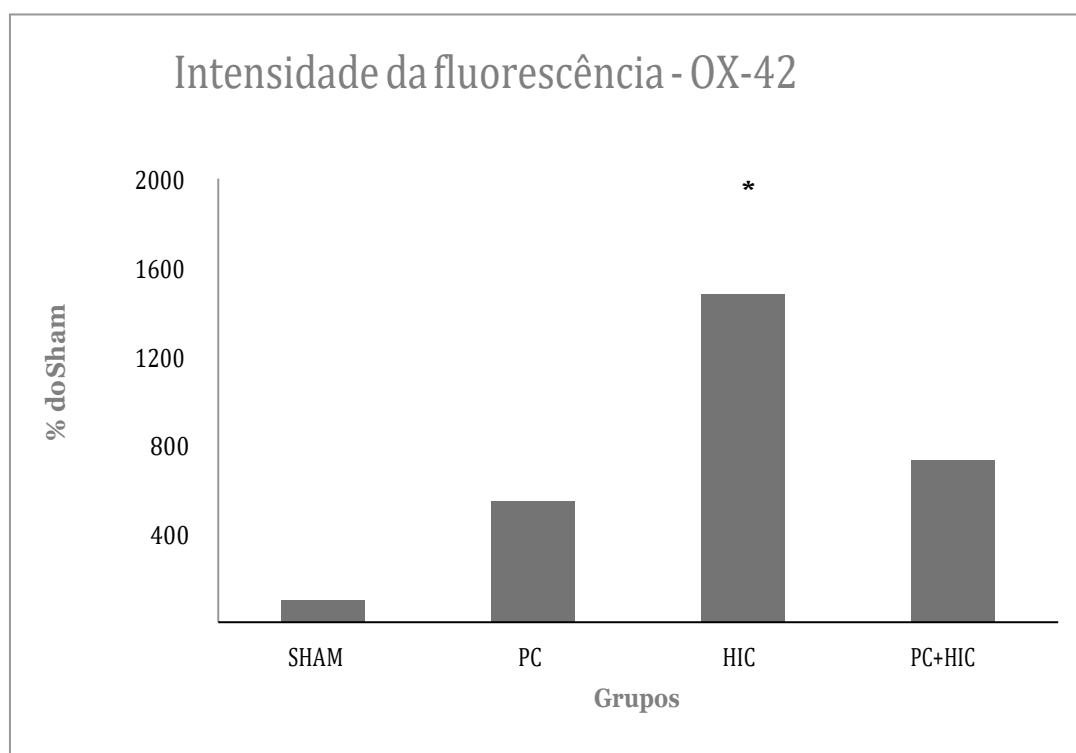


Figura 14: Intensidade da fluorescência para OX-42. Dados avaliados no estriado ipsilateral a lesão e expressos como média \pm erro padrão em porcentagem de controle, grupo Sham. (*) Diferença significativa do grupo HIC quando comparado aos outros grupos experimentais, após ANOVA de duas vias.

As Figuras 15 e 16 apresentam imagens representativas da imunofluorescência para GFAP e para OX-42, nos grupos experimentais estudados.

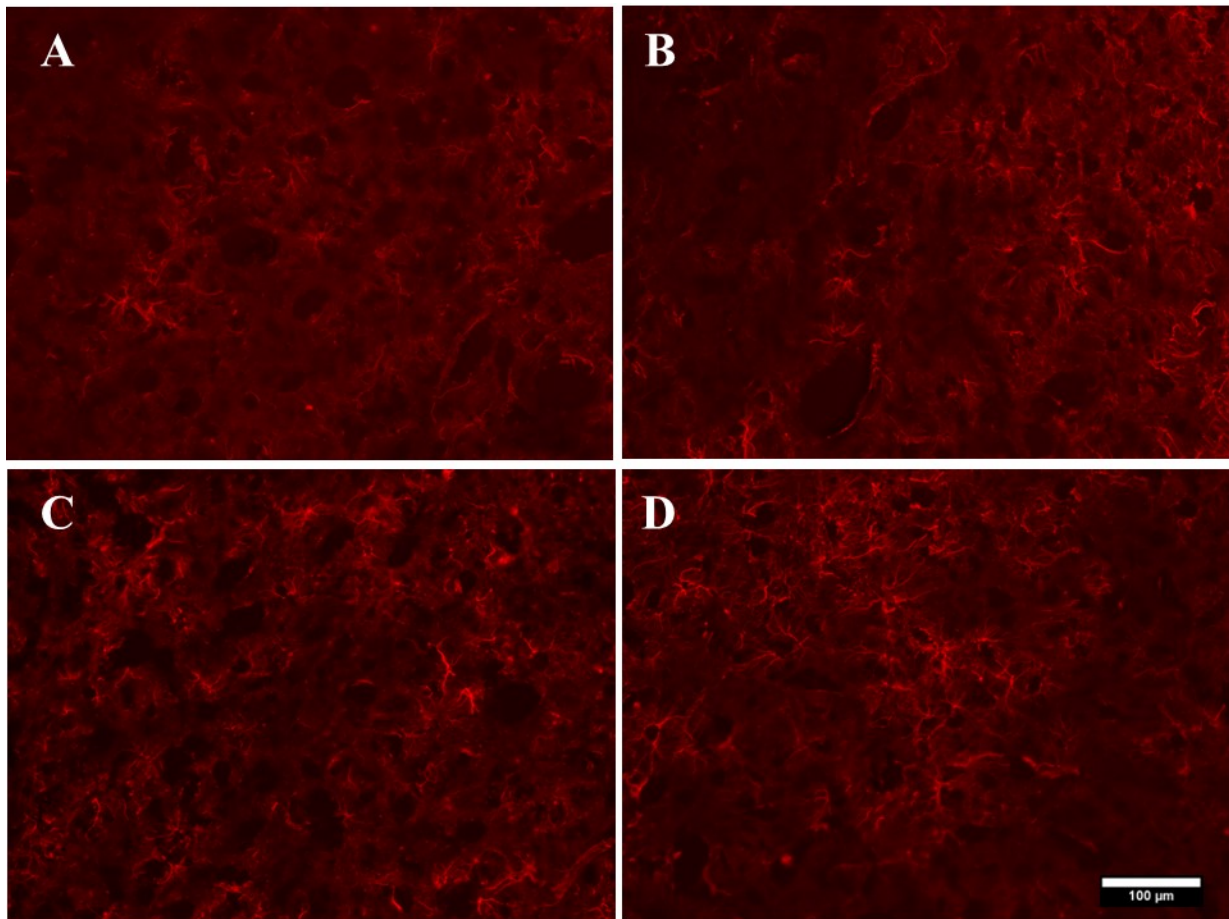


Figura 15: Imagens representativas da intensidade da imunofluorescência GFAP nos grupos experimentais. A) Sham, B) PC, C) HIC, D) PC+HIC.

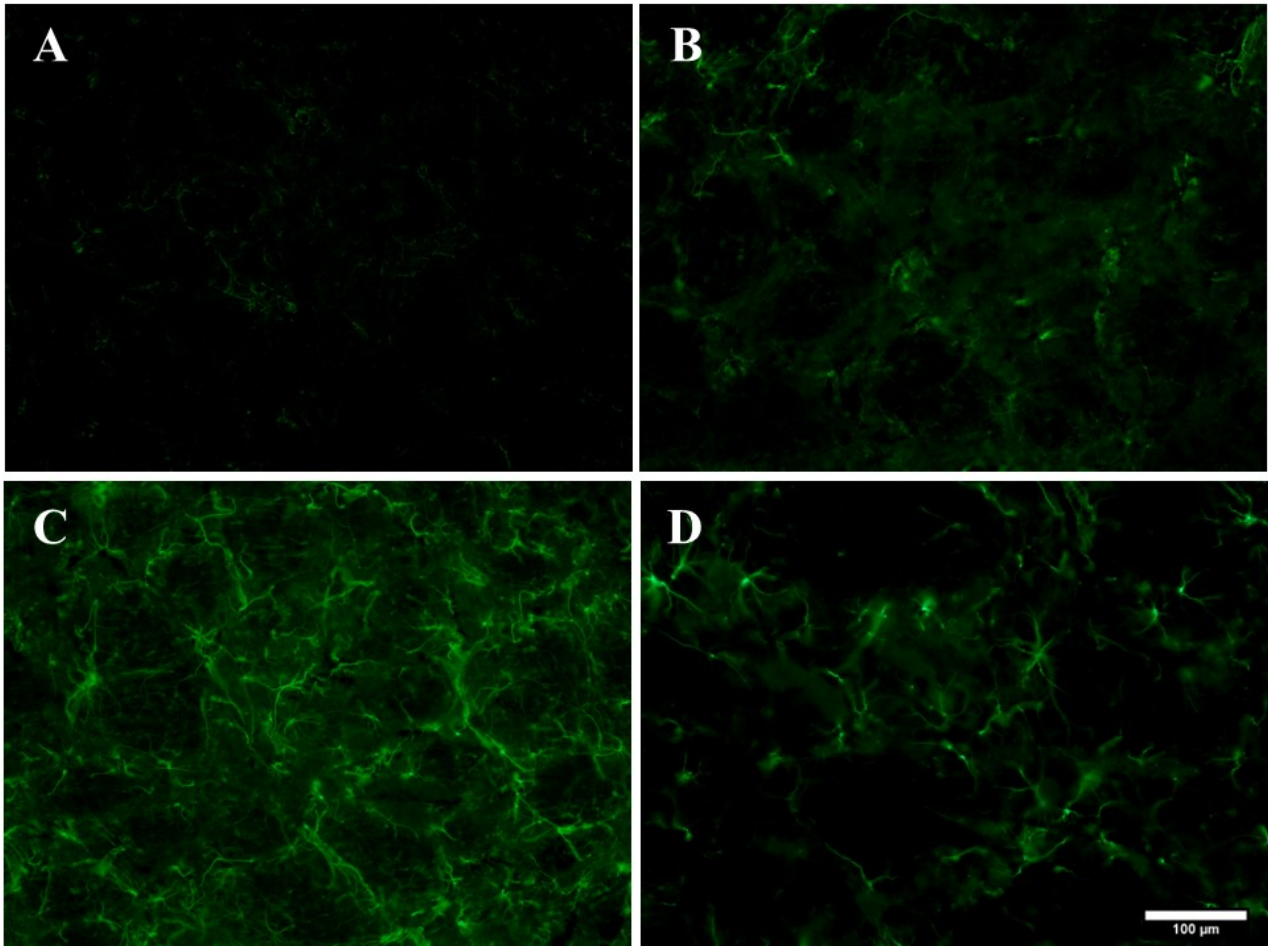


Figura 16: Imagem representativa da intensidade da fluorescência de OX-42 nos grupos experimentais. A) Sham, B) PC, C) HIC, D) PC+HIC.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo central avaliar os efeitos do pré-condicionamento isquêmico, induzido pela oclusão bilateral das artérias carótidas comuns durante 10 minutos, sobre os déficits motores, a morfologia da lesão e a marcação de astrócitos e microglia em ratos *Wistar* submetidos à hemorragia intracerebral produzida pela administração intraestriatal de Colagenase do tipo IV-S. Os principais achados do estudo foram: a) o pré- condicionamento reverte os déficits motores causados pela hemorragia, avaliados nos testes do cilindro e do *staircase*; b) o volume da lesão no estriado ipsilateral à hemorragia intracerebral não é afetado pelo pré-condicionamento; c) a hemorragia intracerebral causa aumento da intensidade de fluorescência para GFAP e para OX-42 no estriado, e o pré-condicionamento reverte apenas a reatividade da microglia.

No **teste do *staircase*** encontramos diminuição do desempenho no grupo HIC no teste realizado após a indução do evento hemorrágico, efeito que foi revertido no pré-condicionado. Isto sugere que o pré-condicionamento é capaz de prevenir os déficits motores causados pela hemorragia intracerebral.

Em diversos estudos (Handley *et al*, 2009; DeBow *et al*, 2003; Qureshi *et al*, 2001) o mesmo modelo de HIC que usamos em nosso trabalho se mostrou um importante método para reproduzir os déficits de funcionalidade gerados pela hemorragia intracerebral. Apesar disso, o pré-condicionamento que realizamos mostrou-se eficaz em assegurar essa capacidade motor no teste do *staircase*.

O teste do *staircase* é um importante teste comportamental experimental, pois a partir dele conseguimos quantificar a habilidade do animal de se alimentar, i.e., se o animal consegue fazer o movimento completo de alcançar o alimento, segurá-lo e colocá-lo na boca. Durante o experimento alguns animais conseguiam alcançar o alimento mas pareciam ter dificuldade de manter o glóbulo na pata.

Com o *staircase* conseguimos avaliar a funcionalidade do membro anterior do animal de forma unilateral, desta forma, sabemos se o animal está usando a pata ipsilateral a lesão, sendo este um dado preciso; em outros testes o animal pode usar o membro contralateral cruzando a linha média (Mestriner, 2011).

Como citado por Rattka e colaboradores (2016) para que o teste tenha sucesso é necessário que os animais estejam motivados durante a fase de treino e adaptação. No protocolo que utilizamos os animais passaram por uma restrição alimentar durante todo o período do teste, o que segundo alguns estudos pode ser considerado uma importante motivação para que os animais busquem os glóbulos inertes (Kloth *et al*, 2006; Montoya *et al*, 1991).

Os animais foram avaliados no **teste do cilindro** em três momentos diferentes, conforme descrito nos resultados. Entre o tempo pré e as duas outras avaliações podemos perceber uma diferença entre os animais, principalmente na segunda avaliação, a primeira pós-operatória (3 dias), na qual todos os animais que sofreram lesão (grupos HIC e PC+HIC) tiveram uma queda no uso simétrico dos membros. Porém, conforme esperado, houve uma melhora espontânea dos

animais desses grupos. Entretanto, apenas os animais do grupo HIC apresentaram diferença dos demais grupos, na última avaliação (33 dias), demonstrando que não foram capazes de reverter totalmente o déficit funcional. Já os animais PC+HIC conseguiram assegurar a funcionalidade, pois na avaliação 33^oPO os animais não mais apresentavam diferença em relação aos grupos Sham e PC. Assim, podemos considerar que os dados encontrados no teste do cilindro reafirmam que o pré-condicionamento é capaz de prevenir a perda de funcionalidade.

O teste do cilindro é considerado um teste comportamental de fácil execução. Entretanto, há alguma dificuldade na modulação do comportamento exploratório que pode influenciar os resultados, o que ocorre pela falta de estímulos que leva aos animais se tornarem inativos e pouco exploradores (Schallet *et al*, 2006).

Desta forma, para diminuir o efeito da acomodação dos animais, mas também não estressá-los, consideramos o estudo de Rattka e colaboradores (2016) que indica que os animais se tornam mais inclinados ao *grasping* quando em ambientes escuros, contrariando protocolos que indicam o uso de luz vermelha. E assim realizamos o teste sobre essas circunstâncias favoráveis de exploração, isto é, em um ambiente climatizado e com luz regulada de forma a deixar a sala mais escura. No entanto, nem os cuidados sobre o ambiente nem a melhora espontânea foram capazes de prevenir a perda da função do membro anterior dos animais do grupo HIC, quando comparados aos demais grupos experimentais.

Apesar de MacLellan e colaboradores (2006) considerarem que o teste do cilindro pode não ser suficientemente sensível para demonstrar pequenas diferenças funcionais em lesões no estriado, o nosso trabalho foi capaz de revelar maior simetria entre os animais do grupo PC+HIC quando comparados com os animais do grupo que sofreu apenas a hemorragia.

Sobre o volume da lesão, avaliado com técnicas histológicas, os animais dos grupos HIC e PC+HIC apresentaram diminuição significativa quando comparados aos animais que receberam veículo (Sham), demonstrando que houve um efeito da lesão nos animais. Tais resultados sugerem que, apesar do pré-condicionamento gerar neuroproteção funcional, ele não foi capaz de prevenir a perda tecidual dos animais submetidos a hemorragia intracerebral.

O pré-condicionamento não teve efeito sobre o volume da lesão nos animais dos grupos que sofreram a lesão, os efeitos da lesão no volume encefálico era um resultado esperado (MacLellan *et al*, 2006). Esse resultado pode ser explicado pela natureza da lesão e do pré-condicionamento. No seu experimento, Xi e colaboradores (2012) demonstraram que as diferenças entre a isquemia e a hemorragia vão além da fisiopatologia e resultam em diferenças na ativação celular.

Apesar de o tema receber boa atenção de pesquisadores e de haver resultados diferentes dos aqui relatados, os fenômenos celulares e moleculares associados ao pré-condicionamento isquêmico ainda não são conhecidos. Alguns

relacionam o efeito neuroprotetor do pré-condicionamento a regulação da resposta inflamatória, a redução da excitotoxicidade e ao aumento da defesa antioxidante (Bond *et al*,1999; Omata *et al*, 2002; Durukan e Tatlisumak, 2002; Wang *et al*,2010)

Sobre **fluorescência da GFAP**, proteína marcadora de astrócitos, houve aumento da intensidade nos grupos lesionados, HIC e PC+HIC, quando comparados aos outros grupos experimentais.

Segundo Mestriner e colaboradores (2013), em seu estudo realizado no laboratório, era esperado o efeito da lesão da hemorragia sobre a morfologia dos astrócitos e, possivelmente, sobre sua função. Principalmente porque são essas células gliais que proporcionam uma ligação entre os neurônios e os capilares, além de regularem moléculas como os neurotransmissores, água e alguns íons (Huges *et al*, 2004; Alvarez-Díaz, 2007).

Pan e colaboradores (2014) demonstraram que o pré-condicionamento é capaz de proteger os astrócitos contra um estímulo isquêmico e que alguns mecanismos específicos de sinalização dos astrócitos estariam ligados à essa proteção. Porém, em nosso trabalho não houve diferença entre os animais lesados e os pré-condicionados.

Um fator que pode ter influenciado no resultado na intensidade da fluorescência GFAP em nosso estudo é que os animais foram sacrificados e perfundidos trinta e quatro dias pós hemorragia intracerebral, o que, como

demonstrado em outros trabalhos (Pekny e Nilsson, 2005; Van Beek *et al.*, 2000), pode ser considerado tardio para revelar ativação astrocitária.

Segundo Li e colaboradores (2008) os filamentos intermediários, tanto GFAP quanto vimentina, podem ter características neuroprotetoras. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Hayakawa e colaboradores (2010), que demonstraram que a inibição da atividade metabólica dos astrócitos reativos, em um modelo de isquemia, está relacionada com um pior desempenho funcional dos roedores. Sendo assim, os autores mostram que os astrócitos participam do remodelamento neurovascular e na recuperação funcional.

O estudo da intensidade da **fluorescência OX-42**, marcador da micróglia reativa, revelou que os animais submetidos à hemorragia apresentaram um aumento significativo da fluorescência, quando comparados aos demais grupos. Já os animais do grupo PC+HIC não apresentaram diferença aos animais do grupo ShamePC. Esses resultados indicam que o pré-condicionamento é capaz de reverter a reatividade da microglia.

Segundo Abraham e Lazar (2000), na presença de lesões como a hemorragia intracerebral ocorre a morte celular e são as células microgлияis ativadas que participam da resposta inflamatória e realizam sua função de fagocitar os restos celulares. Em sua conformação ativada, a microglia pode tanto desempenhar um papel neuroprotector, como um papel neurotóxico (Streit *et al.*, 2002).

Os estudos de Melchior e colaboradores (2006) e Aronowski e colaboradores (2005), trazem evidências de que a microglia ativada quando associada aos leucócitos e astrócitos são os maiores mediadores de danos secundários na hemorragia intracerebral. O efeito global, protetivo ou danoso da ativação da microglia, depende das condições patológicas e da severidade da lesão (Wang,2010).

Considerando os dados apresentados, podemos sugerir que o pré-condicionamento isquêmico promove neuroproteção e tolerância cruzada no modelo de hemorragia intracerebral pela administração intra-estriatal de colagenase. O PC foi capaz de assegurar a função motora após a hemorragia, possivelmente por diminuir a reatividade microglial no estriado.

O pré-condicionamento isquêmico não foi capaz de prevenir a perda tecidual após a hemorragia intracerebral, possivelmente pela severidade moderada da lesão.

Novos estudos serão necessários para esclarecer as vias moleculares responsáveis pelas ações aqui descritas do pré-condicionamento isquêmico.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nessa Dissertação permitem concluir que:

- a) A hemorragia intracerebral causa déficits motores em ratos *Wistar*, medidos pelos testes do cilindro e do *Staircase*, e o pré-condicionamento isquêmico reverte este efeito;
- b) A indução da HIC causa perda tecidual no estriado lateral dos animais, efeito que não é revertido pelo pré-condicionamento;
- c) A indução da HIC aumenta a expressão de GFAP (marcador de astrócitos) e de OX-42 (marcador de micróglia ativada) no estriado, e o pré- condicionamento reverte apenas a ativação da micróglia;
- d) Sugere-se que o efeito neuroprotetor funcional do pré-condicionamento esteja associado diminuição da ativação microglial após o evento de hemorragia intracerebral.

8. REFERÊNCIAS:

1. 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.
2. Araque A., Astrocytes process synaptic information. *Neuron Glia Biology* 2008; 4(1): 3-10.
3. Aronowski J, Hall Ce. New Horizons For Primary Intracerebral Hemorrhage Treatment: Experience From Preclinical Studies. *Neurol Res* 2005; 27:268-79.
4. Barnes Pj, Karin M. Nuclear Factor- κ B: A Pivotal Transcription Factor In Chronic Inflammatory Diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066-1071
5. Bear M. *et al.* Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso. 2007. 3ªed. Artmed.
6. Bernaudin, M. *et al.* A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1999. 19, 643-651.
7. Boisserand L., Efeito do pré-condicionamento isquêmico sobre os aspectos funcionais, morfológicos e celulares no modelo de hemorragia intracerebral focal em ratos *Wistar* adultos. Dissertação de mestrado, PPG Neurociências UFRGS -2013.
8. Boje Km, Arora Pk. Microglial-Produced Nitric Oxide And Reactive Nitrogen Oxides Mediate Neuronal Cell Death. *Brain Res* 1992; 587: 250-256
9. Bond A *et al.* Nmda Receptor Antagonism, But Not Ampa Receptor Antagonism Attenuates Induced Ischaemic Tolerance In The Gerbil Hippocampus. *Eur J Pharmacol* 1999 380:91-9.
10. Broderick Jp *et al.* Determinants Of Intracerebral Hemorrhage Growth - An Exploratory Analysis. *Stroke* 2007; 38(3):1072-1075
11. Brown LL, Sharp FR. 1995. Metabolic mapping of rat striatum: somatotopic organization of sensorimotor activity. *Brain Res* 686:207-22.
12. Burda J *et al.* Role of protein synthesis in the ischemic tolerance acquisition induced by transient forebrain ischemia in the rat. *Neurochem. 2003 Res.* 28, 1213-1219.
13. Butcher Ks *et al.* Perihematomal Edema In Primary Intracerebral Hemorrhage Is Plasma Derived. *Stroke* 2004;35:1879-85.
14. 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.
15. Ciechanover A *et al.* The Ubiquitin-Mediated Proteolytic Pathway: Mode Of Action And Clinical Implications. *J Cell Biochem Suppl* 2000. 34:40-51.
16. Colon-Ramos D. A., Synapse formation in developing neural circuits.

- Development of Neural Circuitry 2009; 87:53-59
17. Colton Ca, Gilbert DL. Microglia, An In Vivo Source Of Reactive Oxygen Species In The Brain. *Adv Neurol* 1993; 59: 321-326 90
 18. Dahl Na, Balfour Wm. 1964. Prolonged Anoxic Survival Due To Anoxia Pre-Exposure: Brain Atp, Lactate, And Pyruvate. *Am J Physiol* 207:452-6.
 19. Davis Sm *et al.* Hematoma Growth Is A Determinant Of Mortality And Poor Outcome After Intracerebral Hemorrhage. *Neurology* 2006;66(8):1175-1181
 20. DeBow SB *et al.* Constraint-induced movement therapy and rehabilitation exercises lessen motor deficits and volume of brain injury after striatal hemorrhagic stroke in rats. *Stroke* 2003.34:1021-6.
 21. Di Castro, M.A. *et al.*. Local Ca²⁺ detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nat. Neurosci.* 2011. 14, 1276-1284.
 22. Dirnagl U *et al.* Preconditioning And Tolerance Against Cerebral Ischaemia: From Experimental Strategies To Clinical Use. *Lancet Neurol* 2009.8:398-412.
 23. Donnan G. A., *et al.* *Stroke*. *Lancet* 2008; 371:1612-1623
 24. Durukan A, Tatlisumak T. Preconditioning-Induced Ischemic Tolerance: A Window Into Endogenous Gearing For Cerebroprotection. *Exp Transl Stroke Med* 2010; 2:2.
 25. Garcia Jh *et al.* Influx Of Leukocytes And Platelets In An Evolving Brain Infarct (Wistar Rat). *Am J Pathol* 1994; 144: 188-199
 26. Gebel Jm *et al.* Relative Edema Volume Is A Predictor Of Outcome In Patients With Hyperacute Spontaneous Intracerebral Hemorrhage. *Stroke* 2002; 33:2636-41.
 27. Gidday Jm. 2006. Cerebral Preconditioning And Ischaemic Tolerance. *Nat Rev Neurosci* 7:437-48.
 28. Giulian D *et al.* Brain Glia Release Factors With Opposing Actions Upon Neuronal Survival. *J Neurosci* 1993; 13:29-37
 29. Giulian D, Vaca K. Inflammatory Glia Mediate Delayed Neuronal Damage After Ischemia In The Central Nervous System. *Stroke* 1993; 24: 184-190 91
 30. Gong C *et al.* Acute Inflammatory Reaction Following Experimental Intracerebral Hemorrhage In Rat. *Brain Res* 2000; 871: 57-65
 31. Hahn, C.D. *et al.* Remote ischemic pre-conditioning: a novel therapy for acute stroke? *Stroke J. Cereb. Circ.* 2011.42, 2960-2962.
 32. Han Q., The promotion of neurological recovery in an intracerebral hemorrhage model using fibrin-binding brain derived neurotrophic factor. *Biomaterials* 2011; 32: 3244-52.
 33. Handley A *et al.* Movement disorders after stroke. *Age Ageing* 2009. 38:260-6.
 34. Hanisch Uk. Microglia As A Source And Target Of Cytokines. *Glia* 2002. 40:140-55.
 35. Hart Rg. What Causes Intracerebral Hemorrhage During Warfarin Therapy? *Neurology* 2000; 55:907-908
 36. Hayakawa K *et al.* Inhibition of reactive astrocytes with fluorocitrate retards

- neurovascular remodeling and recovery after focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010. 30:871-82.
37. Henneberger, C. *et al.*. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 2010. 463, 232-236.
 38. Hirayama Y *et al.* Astrocyte-mediated ischemic tolerance. *Neurobiology of disease* 2015; 35(9): 3794-3805.
 39. Huber, R *et al.* Increase of cellular hypoxic tolerance by erythromycin and other antibiotics. *Neuroreport* 1999. 10, 1543-1546.
 40. Inaji M *et al.* Chronological Changes Of Perihematomal Edema Of Human Intracerebral Hematoma. *Acta Neurochir Suppl* 2003;86:445-8.
 41. James M *et al.* Preclinical Models Of Intracerebral Hemorrhage: A Translational Perspective. *Neurocritical Care* 2008; 9(1):139-152
 42. Jenkins A *et al.* Experimental Intracerebral Haematoma In The Rat: Sequential Light Microscopical Changes. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1989; 15: 477-486
 43. Jeong SR *et al.* Hepatocyte growth factor reduces astrocytic scar formation and promotes axonal growth beyond glial scars after spinal cord injury. *Exp Neurol* 2012.233:312-22.
 44. Jeyasingham RA *et al.* Differential effects of unilateral striatal and nigrostriatal lesions on grip strength, skilled paw reaching and drug-induced rotation in the rat. *Brain Res Bull* 2001.55:541-8.
 45. Kane Pj *et al.* The Effect Of Immunosup- Pression On The Development Of Cerebral Oedema In An Experimental Model Of Intracerebral Haemorrhage: Whole Body And Regional Irradiation. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 1992; 55: 781-786
 46. Karin M. How Nf-Kappab Is Activated: The Role Of The Ikappab Kinase (Ikk) Complex. *Oncogene* 1999; 18: 6867-6874
 47. Karnath HO *et al.* 2002. The subcortical anatomy of human spatial neglect: putamen, caudate nucleus and pulvinar. *Brain* 125:350-60.
 48. Keane R, Hickey W. *Immunology Of The Nervous System*, New York: Oxford University Press, 1997
 49. Kirino T. Ischemic Tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:1283-96.
 50. Kloth, V *et al.* Colour-coded pellets increase the sensitivity of the staircase test to differentiate skilled forelimb performances of control and 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain research bulletin*. 70, 68-80 (2006).
 51. Koch, S., Perez-Pinzon, M.A., 2013. Proceedings of the 2nd translational preconditioning meeting Miami. *Transl. Stroke Res.* 4, 1-2.
 52. Koeppe Ah *et al.* The Cellular Reactions To Experimental Intracerebral Hemorrhage. *J Neurol Sci* 1995; 134 (Suppl.): 102-112
 53. Kopito R. 2000. Aggresomes, Inclusion Bodies And Protein Aggregation. *Trends Cell Biol* 10:524-30.
 54. Lehotsky J *et al.* 2009. Ischemic tolerance: the mechanisms of neuroprotective strategy. *Anat. Rec.* 292,

55. Li L, *et al.* Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metabolism* 2008; 468-81
56. Lloyd J, Heart Disease and Stroke Statistics. *Circulation* 2010; 122(1):E1-E11.
57. 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.
58. MacLellan CL *et al.* 2006b. Skilled reaching impairments follow intrastriatal hemorrhagic stroke in rats. *Behav Brain Res* 175:82-9.
59. MacLellan CL *et al.* 2008. Intracerebral hemorrhage models in rat: comparing collagenase to blood infusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:516-25.
60. Massada T *et al.* 2001. Attenuation Of Ischemic Brain Edema And Cerebrovascular Injury After Ischemic Preconditioning In The Rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:22-33.
61. Mayer, S. A.; Rincon, F. Treatment Of Intracerebral Haemorrhage. *Lancet Neurol* 2005; 4(10):662-72
62. Melchior B *et al.* 2006. Microglia and the control of autoreactive T cell responses. *Neurochem Int* 49:145-53.
63. Meller, R., Simon, R.P., 2013. Tolerance to ischemia – an increasingly complex biology. *Transl. Stroke Res.* 4, 40-50.
64. Mestriner RG *et al.* Behavior outcome after ischemic and hemorrhagic stroke, with similar brain damage, in rats. *Behav Brain Res* 2013; 244:82-9.
65. Mestriner RG *et al.* Skilled reaching training promotes astroglial changes and facilitated sensorimotor recovery after collagenase-induced intracerebral hemorrhage. *Exp Neurol* 2011; 227:53-61.
66. Mestriner RG *et al.* Skilled reaching training promotes astroglial changes and facilitated sensorimotor recovery after collagenase-induced intracerebral hemorrhage. *Exp Neurol* 2011; 227:53-61.
67. Moncayo, J *et al.* 2000. Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect? *Neurology* 54, 2089-2094.
68. Montoya, C. P. *et al.* The 'staircase test': a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *Journal of neuroscience methods.* 36, 219-228 (1991).
69. Morgenstern L *et al.* Surgical Treatment For Intracerebral Hemorrhage (Stich): A Single-Center, Randomized Clinical Trial. *Neurology* 1998; 51: 1359-1363
70. Nagahori T *et al.* 1994. Ischemic Brain Damage Induced By Repeated Brief Occlusions Of Bilateral Common Carotid Artery In Rats. *Tohoku J Exp Med* 172:253-62.
71. Nakamura T *et al.* Holo-Transferrin And Thrombin Can Interact To Cause Brain Damage. *Stroke* 2005;36(2):348-352
72. Newton R *et al.* Evidence For Involvement Of Nf-Kappab In The

- Transcriptional Control Of Cox-2 Gene Expression By Il-1beta. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 237: 28-32
73. Nolan Gp, Baltimore D. The Inhibitory Ankyrin And Activator Rel Proteins. *Curr Opin Genet Dev* 1992; 2: 211-220
 74. Obrenovitch, T.P., 2008. Molecular physiology of preconditioning-induced brain tolerance to ischemia. *Physiol. Rev.* 88, 211-247.
 75. Omata N *et al.* 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.
 76. Orakcioglu B *et al.* Evolution Of Early Perihemorrhagic Changes - Ischemia Vs. Edema: An Mri Study In Rats. *Experimental Neurology* 2005;193 (2): 369-376
 77. Pagnussat A. S., *et al.* Effects of skilled and unskilled training on functional recovery and brain plasticity after focal ischemia in adult rats. *Brain Res* 2012; 1486: 53-61.
 78. Pagnussat A.D., *et al.* Skilled forelimb reaching in Wistar rats: Evaluation by means of Montoya staircase test. *Journal of Neuroscience Methods* 2009; 177 (1): 115-121.
 79. Pan L *et al.* Astrocytic Toll-Like Receptor 3 is associated with oschemic preconditioning - induced protection against brain ischemia in rodents. *Plos one* 2014; 9(6): e9952.
 80. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* San Diego: 2004.
 81. Pekny M, Nilsson M. 2005. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50:427-34.
 82. Perry Vh *et al.* Macrophages And Inflammation In The Central Nervous System. *Trends Neurosci* 1993; 16: 268-273
 83. Pradillo Jm *et al.* 2009. Toll-Like Receptor 4 Is Involved In Neuroprotection Afforded By Ischemic Preconditioning. *J Neurochem* 109:287-94.
 84. Qureshi Ai *et al.* Spontaneous Intracerebral Hemorrhage. *N Engl J Med* 2001; 344:1450-60
 85. Qureshi Ia *et al.* Intracerebral Haemorrhage. *Lancet* 2009; 373 (9675);1632-1644
 86. Qureshi, Ai *et al.* Changes In Cost And Outcome Among Us Patients With Stroke Hospitalized In 1990 To 1991 And Those Hospitalized In 2000 To 2001. *Stroke* 2007; 38(7): 2180- 2184
 87. Qureshi, A. I *et al.* Intracerebral Haemorrhage. *Lancet* 2009; 373:1632-44
 88. Rattka M *et al.* A novel approach to assess motor overcome of deep brain stimulation effects in the hemiparkinsonian rat: staircase and cylinder test. *Jove* 2016;111: e53951, pg 1-13.

89. Rossi, D. Astrocyte physiopathology: At the crossroads of intercellular networking, inflammation and cell death. *Progress in Neurobiology* 2015; 130: 86-120.
90. Riepe, M.W *et al.* 1997. Acetylsalicylic acid increases tolerance against hypoxic and chemical hypoxia. *Stroke J. Cereb. Circ.* 28, 2006-2011.
91. Sanches EF *et al.* 2013. Early hypoxia-ischemia causes hemisphere and sex-dependent cognitive impairment and histological damage. *Neuroscience* 237:208-15.
92. Santello, M. *et al.*. Gliotransmission and the tripartite synapse. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012. 970, 307-331.
93. Schallert T. Behavioral test for preclinical intervention assessment. *NeuroRx*, 2006: 3 (4): 497-504.
94. Schellinger, P. D *et al.* Stroke Mri In Intracerebral Hemorrhage: Is There A Perihemorrhagic Penumbra? *Stroke* 2003; 34(7): 1674-1679
95. Smith, L. K., & Metz, G. A. Dietary restriction alters fine motor function in rats. *Physiology & behavior.* 85, 581-592 (2005).
96. Sofroniew MV. 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32:638-47.
97. Stenzel-Poore, M.P *et al.* 2007. Preconditioning reprograms the response to ischemic injury and primes the emergence of unique endogenous neuroprotective phenotypes: a speculative synthesis. *Stroke J. Cereb. Circ.* 38,680-685.
98. Stevens, S.L *et al.* Toll-like receptor 9: a new target of ischemic preconditioning in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008. 28(5): p. 1040-7.
99. Stowe Am *et al.* 2011. Repetitive Hypoxia Extends Endogenous Neurovascular Protection For Stroke. *Ann Neurol* 69:975-85.study.
100. Szymanska A, *et al.* Minocycline and intracerebral hemorrhage: Influence of injury severity and delay to treatment. *Experimental Neurology*, 2006. 197 (1): 189-196.
101. Streit WJ. 2002. Microglia and the response to brain injury. *Ernst Schering Res Found Workshop*:11-24.
102. Takebayashi S, Kaneko M. Electron-Microscopic Studies Of Ruptured Arteries In Hypertensive Intracerebral Hemorrhage. *Stroke* 1983;14(1):28-36
103. Thanos D, Maniatis T. Nf-Kappa B: A Lesson In Family Values. *Cell* 1995; 80: 529-532
104. Tomita H, *et al.* Chronological Changes In Brain Edema Induced By Experimental Intracerebral Hematoma In Cats. *Acta Neurochir Suppl* 1994; 60: 558-560
105. Trendelenburg G, Dirnagl U. 2005a. Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning. *Glia* 50:307-20.
106. Trendelenburg G, Dirnagl U. 2005b. Neuroprotective role of astrocytes in

- cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning. *Glia* 50:307-20.
107. Van Beek J *et al.* Glial Responses, Clusterin, And Complement In Permanent Focal Cerebral Ischemia In The Mouse. *Glia* 2000; 31: 39-50
 108. Wang Y *et al.* Neuroprotective Effects Of Salvianolic Acid B Against Oxygen-Glucose Deprivation/Reperfusion Damage In Primary Rat Cortical Neurons. *Chin Med J (Engl)* 2010;123:3612
 109. Wegener, S *et al.* Transient ischemic attacks before ischemic stroke: preconditioning the human brain? A multicenter magnetic resonance imaging. *Stroke*, 2004.
 110. Windle V, *et al.* An analysis of four different methods of producing focal cerebral ischemia with endothelin-1 in the rat. *Exp Neurol*, 2006; v. 201, n. 2, p. 324-34
 111. Wisniewski H. The Pathogenesis Of Some Cases Of Cerebral Hemorrhage (A Morphological Study Of Brain Distant From The Hemorrhage). *Acta Med Polona* 1961; 2: 379-390
 112. Xi G, *et al.* Intracerebral Haemorrhage: Mechanisms Of Injury And Therapeutic Targets. *Lancet Neurol* 2012;11:720-31.
 113. Xue M, Del Bigio Mr. Intracerebral Injection Of Autologous Whole Blood In Rats: Time Course Of Inflammation And Cell Death. *Neurosci Lett* 2000; 283: 230-232
 114. Zazulia Ar, *et al.* Hypoperfusion Without Ischemia Surrounding Acute Intracerebral Hemorrhage. *Journal Of Cerebral Blood Flow And Metabolism* 2001; 21(7): 804-810