



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA

ANÁLISE DO DESEMPENHO SENSORIO-MOTOR E DA REATIVIDADE
ASTROGLIAL EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE ACIDENTE VASCULAR
ENCEFÁLICO ISQUÊMICO E HEMORRÁGICO

RÉGIS GEMERASCA MESTRINER

Porto Alegre

2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA**

**ANÁLISE DO DESEMPENHO SENSORIO-MOTOR E DA REATIVIDADE
ASTROGLIAL EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE ACIDENTE VASCULAR
ENCEFÁLICO ISQUÊMICO E HEMORRÁGICO**

RÉGIS GEMERASCA MESTRINER

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor em Fisiologia.

Porto Alegre

2013

Dedicatória

Dedico este momento aos meus pais e avós. Esses são sábios que, com humildade, bravura e honestidade, doaram-se integralmente em prol do benefício futuro de sua descendência. Nenhuma palavra ou gesto de gratidão seria plausível para expressar esse sentimento que está impresso nas intrincadas redes neurais de minha mente. É algo que ficará para a transcendência...

Amo vocês!

“Tão importante quanto crer também é saber duvidar. A construção da fé (e eu acredito que da ciência também) passa o tempo todo pelo caminho da dúvida”.

Pe. Fábio de Melo

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelos dons da vida e do amor.

Aos meus pais, Paulo Roberto Mestriner e Maria Lúcia Gemerasca Mestriner por todo o amor dedicado a minha pessoa e por nunca terem poupado esforços para que eu pudesse estudar e alcançar os meus sonhos.

Ao magnífico Professor Carlos Alexandre Netto, meu orientador desde os tempos de mestrado, por ser um exemplo de pesquisador, orientador e entusiasta da ciência básica. Jamais alguém ouvirá o Professor Alex desencorajando algum aluno frente à proposição de uma nova empreitada científica e/ou um “mirabolante” desenho experimental. Sabiamente, ele apenas o questionará: “Tudo bem, mas... qual é a tua hipótese?”. Muito obrigado pelos sólidos ensinamentos e por acreditar sempre na potencialidade de seus orientados.

Ao Professor, colega, colaborador e amigo Léder Leal Xavier. És um dos maiores “culpados” por eu ter escolhido trilhar os caminhos da carreira acadêmica. Pelas linhas tortas do destino acabaste sendo, na prática, o meu co-orientador. Sempre disposto a ajudar, não mediu esforços para que este trabalho se tornasse realidade. Espero um dia poder retribuir, ao menos em parte, tudo o que fizeste por mim.

À minha família, que com amor, soube compreender todos os meus momentos de ausência física ou mental durante todos os anos que se sucedem desde os tempos da graduação.

Aos meus padrinhos, Renato Sperling e Maria Tereza Gemerasca Sperling, por todo o amor e apoio que sempre me deram - em especial quando abriram as portas de sua casa, em Porto Alegre, para que eu pudesse conciliar os horários de estudo, laboratório e trabalho com uma melhor qualidade de sono.

À minha noiva e, agora quase esposa, Raquel Jeanty de Seixas, por todo o amor, carinho, paciência, compreensão e apoio nesta empreitada da vida. Agradeço a Deus, todos os dias, por nossos caminhos terem se cruzado.

A todos os integrantes da minha “nova” família: Paulo, Louise e Ana Seixas, pelo carinho, amizade e apoio ao longo de todos esses anos.

À Professora Matilde Achaval, por ter plantando a semente “gliófila” em meus “devaneios fisiológicos”.

A todos os colegas e colaboradores do laboratório 35 do departamento de bioquímica: Aline, Patrícia, Lígia, Eduardo, Fernanda, Lauren, Simone, Lenir, Letícia, Cibele, Luciano, Fabrício Simão, Leonardo, Cláudia, Débora, Fabrício Nicola, Gisele, Janine, Joseane, Juliana, Natália, Nice, Paulo, Suélen, Thamiris e Verônica, pelo companheirismo, aprendizado, ensinamentos, ajuda e bons momentos vividos no laboratório.

A todos os colegas do laboratório de Biologia Celular e Tecidual da PUCRS: Raquel, Pamela, Lisiani, Pedro, Kelly, Sabrina e Mariana que sempre estiveram dispostos a me ajudar, pelas ideias, conversas e bom humor.

Aos professores do PPG Ciências Biológicas: Fisiologia pelos ensinamentos, sabedoria e zelo na formação dos novos “fisiologistas” que, como diria o Prof. Gilberto Sanvitto, “são uma espécie em extinção”.

À Professora Beatriz Ojeda e ao Professor Denizar Melo pela enorme confiança e oportunidade de crescimento profissional na PUCRS.

A todos os meus mestres e hoje colegas professores do curso de Fisioterapia da PUCRS, por sempre terem incentivado o meu viés docente e pesquisador, desde a época da graduação.

A todos que de forma direta ou indireta incentivam e apoiam a pesquisa e o desenvolvimento tecnológico do nosso país.

À UFRGS, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e ao CNPq pela oportunidade e bolsa concedida durante esses dois anos e dez meses de doutorado.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	V
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Isquemia cerebral	03
1.2 Hemorragia cerebral	04
1.3 Recuperação funcional pós-AVE isquêmico ou hemorrágico	06
1.4 Astrogliose reativa pós-AVE	08
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. ABORDAGEM METODOLÓGICA	16
3.1 Modelos de AVE experimental (isquemia e hemorragia cerebral)	18
3.2 Avaliação comportamental.....	20
3.2 Avaliação comportamental.....	20
3.2.1 <i>Teste do campo aberto</i>	20
3.2.2 <i>Teste do cilindro</i>	21
3.2.3 <i>Teste da escada horizontal</i>	22
3.3 Análise morfológica: volume e extensão das lesões	24
3.4 Imunoistoquímica para GFAP.....	25
3.5 Estimativa da densidade astrocitária	26
3.6 Análise da densidade óptica	26
3.7 Análise estatística.....	27
4. CAPÍTULO 1	28
5. CAPÍTULO 2	37
6. ENCERRAMENTO	57
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	66
8. REFERÊNCIAS	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos lesivos e protetores no período pós-isquemia focal.....	4
Figura 2. Cascata de danos neurais iniciada pela hemorragia intracerebral.....	6
Figura 3. Representação esquemática da unidade neurovascular e alguns dos eventos envolvidos no período pós-lesão.....	10
Figura 4. Desenho experimental.....	17
Figura 5. Imagens a fresco da isquemia e hemorragia 24 horas após a indução cirúrgica.....	20
Figura 6. Imagem do teste do campo aberto.....	21
Figura 7. Teste do cilindro.....	22
Figura 8. Teste da escada horizontal.....	23
Capítulo 1.	
Figura 1. Experimental design and behavioral testing (relative to surgery) schedule.....	31
Figura 2. Representative photomicrographs of ischemic stroke (A) and hemorrhagic stroke (B) of animals at 30 days post-surgery. Graphs of the lesion volume (C) and lesion length along the fronto-occipital axis (D) in the same endpoint.....	32
Figura 3. Representative illustrations of maxima, typical and minimal injury areas for each stroke subtype.....	32
Figura 4. Locomotor parameters of sham, ischemic and hemorrhagic rats evaluated in the open field test in acute (1 PS) and long-term (7 PS, 15 PS and 30 PS) days after stroke.....	33
Figure 5. Performance in the cylinder test.....	33
Figura 6. Performance in the ladder walk test.....	34
Capítulo 2.	
Figura 1. Illustrations of morphological assessment.....	53
Figura 2. Digitized images after GFAP immunohistochemistry.....	54
Figura 3. Astrocytic density (GFAP+) 30 days after surgery.....	55
Figura 4. Regional and cellular optical density of sensorimotor cortex (A and B) and dorsolateral striatum (C and D) 30 days after surgery, respectively.....	56

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Relationship between lesion characteristic and behavioral measurements at 30 days post-surgery.....	33
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AVE: Acidente vascular encefálico

ET-1: Endotelina-1

GFAP: Proteína glial fibrilar ácida

SNC: Sistema nervoso central

IS: Isquemia cerebral

HS: Hemorragia cerebral

OMS: Organização mundial da saúde

AVDs: Atividades de vida diária

HIC: Hemorragia intracerebral

COX-2: Ciclo-oxigenase 2

IL-1: Interleucina 1

IL-10: Interleucina 10

AgEs: *Advanced glycosylation end products*

BHE: Barreira hemato-encefálica

HSP: Proteína de choque térmico

TGF- β : Fator de transformação do crescimento β .

PDGF- β : Receptor do tipo β para o fator de crescimento derivado de plaquetas

FI: Filamentos intermediários

BDNF: Fator neurotrófico derivado do encéfalo

GDNF: Fator neurotrófico glial

PO: Pós-operatório

UI: Unidades internacionais

dpi: pontos por polegada (*dots per inch*)

PFA: Paraformaldeído

PBS: Tampão fosfato salino

PBS-tx: Tampão fosfato salino com Triton-X

DAB: 3,3'-diaminobenzidina

AOI: área de interesse

ANOVA: Análise de variância

ANCOVA: Análise de co-variância

SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences*

RESUMO

O acidente vascular encefálico (AVE), classificado conforme a etiologia do dano em isquêmico ou hemorrágico, apresenta-se como uma importante causa de mortalidade e redução da capacidade funcional em adultos de todo o mundo. Apesar de alguns estudos em humanos sugerirem um perfil de recuperação sensório-motora diferenciado entre os subtipos isquêmico e hemorrágico, estes dados não são conclusivos dada a heterogeneidade desses insultos. Dessa forma, o objetivo da presente tese foi estabelecer um desenho experimental comparativo entre AVE isquêmico e hemorrágico, reduzindo a heterogeneidade das lesões, para que, então, pudéssemos avaliar de forma mais objetiva o perfil comportamental de recuperação sensório-motora e a reatividade astrogliar positiva para a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) entre os mencionados subtipos etiológicos de AVE. Para tanto, 36 ratos *Wistar* adultos foram utilizados, sendo os mesmos subdivididos nos grupos Sham, Isquemia e Hemorragia cerebral. Os modelos de AVE isquêmico e hemorrágico foram induzidos por microinjeções estereotáxicas de endotelina-1 (ET-1) e colagenase do tipo IV-S, respectivamente. Essas injeções foram realizadas no córtex sensoriomotor e no estriado dorsolateral dos animais, tendo em vista que as mencionadas estruturas são comumente acometidas pelo AVE. Todos os grupos foram avaliados quanto à recuperação espontânea nos testes do campo aberto, cilindro e teste da escada horizontal, em diferentes tempos pós-cirúrgicos, ao longo de 30 dias. Avaliações histológicas e estereológicas foram utilizadas para estimar o volume e a extensão das lesões produzidas. Além disso, a técnica imunoistoquímica para a GFAP foi empregada com o intuito de avaliar a densidade astrocitária, densidade óptica regional e celular no tecido perilesional. Nossos resultados demonstram que ambos os subtipos de AVE experimental exibiram um perfil comparável de recuperação sensório-motora, de dano morfológico (volume e extensão das lesões) e de imunorreatividade à GFAP no tecido adjacente à lesão. No entanto, quanto à habilidade na marcha em longo prazo, os animais hemorrágicos demonstram uma sutil, mas significativa, melhora na recuperação quando comparados aos seus pares isquêmicos. Dessa forma, sugerimos que o proposto desenho experimental pode ser útil para reduzir a heterogeneidade do AVE, de modo a permitir um adequado estudo comparativo da neurobiologia da recuperação funcional e do remodelamento plástico pós-lesão. Além disso, os nossos resultados evidenciam pontuais diferenças no processo de recuperação funcional entre os subtipos isquêmico e hemorrágico, as quais parecem não se relacionar com a imunorreatividade à GFAP.

ABSTRACT

Stroke causes disability and mortality worldwide and is divided into ischemic and hemorrhagic subtypes. Although clinical trials suggest distinct recovery profiles for ischemic and hemorrhagic events, this is not conclusive due to stroke heterogeneity. The aim of this study was to produce similar brain damage, using experimental models of ischemic (IS) and hemorrhagic (HS) stroke and evaluate the motor spontaneous recovery profile and glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity. We used 36 Wistar rats divided into the following groups: Sham, ischemic stroke or hemorrhagic stroke. Brain ischemia or hemorrhage was induced by endothelin-1 (ET-1) and collagenase type IV-S (collagenase) microinjections, respectively. For both stroke subtypes, sensorimotor cortex and dorsolateral striatum were damaged. All groups were evaluated in the open field, cylinder and ladder walk behavioral tests at distinct time points as from baseline to 30 days post-surgery (30 PS). Histological and morphometric analyses were used to assess the volume of lost tissue and lesion length. GFAP immunoreactivity was assessed by estimation of astrocytic density plus cellular and regional optical density measures. Present results reveal that both forms of experimental stroke had a comparable long-term pattern of damage, since no differences were found in volume of tissue lost or lesion size 30 days after surgery. However, behavioral data showed that hemorrhagic rats were less impaired at skilled walking than ischemic in a long-term analysis. In addition, both forms of experimental stroke had a comparable long-term pattern of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity for analyzed structures, including astrocytic density, cellular and regional optical density. We suggest that experimentally comparable stroke design is useful because it reduces heterogeneity and facilitates the assessment of neurobiological differences related to stroke subtypes. Also, spontaneous skilled walking recovery differs between experimental ischemic and hemorrhagic insults; behavioral differences probably are not related to GFAP immunoreactivity. Thus, behavioral and neuroplastic recovery differences after stroke subtypes is a matter that may need more attention in basic and translational stroke research.

1. Introdução

O acidente vascular encefálico (AVE) é definido, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), como um quadro clínico de perturbação focal ou global da função cerebral, de rápido desenvolvimento, com sinais e sintomas que perduram 24 horas ou mais, ou que levam à morte sem outra causa aparente a não ser de origem cerebrovascular (Guilbert, 2003).

As classificações existentes para o AVE são geralmente definidas com base na etiologia do distúrbio que acomete a vascularização cerebral. Em geral, trata-se de um evento isquêmico ou hemorrágico que resulta, frequentemente, na redução no desempenho das atividades de vida diária (AVDs), em função do prejuízo no processamento sensorio-motor (Donnan, Fisher et al., 2008; Langhorne, Bernhardt et al., 2011).

Dentre todos os casos de AVE, a isquemia cerebral é a forma mais incidente na população, totalizando cerca de 87% dos casos (Go, Mozaffarian et al., 2013). Geralmente, um insulto isquêmico é causado pela interrupção do fluxo sanguíneo vascular encefálico em uma dada região (isquemia focal) ou de forma generalizada (isquemia global) (Lloyd, 2010; Go, Mozaffarian et al., 2013). Já a hemorragia intracerebral (HIC) consiste em um extravasamento sanguíneo espontâneo e agudo do leito vascular para o interior do parênquima cerebral, representando cerca de 10% dos casos (Mayer e Rincon, 2005; Manno, 2012).

A incidência do AVE no Brasil, ajustada por idade, varia entre 137 e 168 casos por 100.000 habitantes (Moro, Fábio et al., 2009), estando o mesmo entre as principais causas de óbito e dependência funcional (Radanovic, 2000). Estima-se que mais de 60% dos indivíduos que sofreram um AVE permanecem, após seis meses, com dificuldades motoras relacionadas à habilidade manual, o que acaba por afetar as AVDs e o retorno às suas vidas profissionais (Kolominski-Ribas, 2001). Além disso, esta doença também traz grandes custos para a sociedade, em função das despesas hospitalares, da necessidade crônica de cuidado com os indivíduos acometidos e da perda de funcionalidade (Lloyd, 2010; Roger, Go et al., 2012).

Sendo assim, observa-se uma necessidade socioeconômica de desenvolver e implementar estratégias de reabilitação neurobiologicamente fundamentadas e direcionadas para as particularidades de cada tipo de lesão cerebral (Nowak, 2009), o que poderia contribuir para um tratamento mais efetivo das disfunções neuromotoras correlatas aos diferentes tipos de AVE.

O conhecimento acerca da fisiopatologia do AVE tem evoluído muito nos últimos anos, especialmente em virtude do advento tecnológico e do desenvolvimento de modelos experimentais, os quais possibilitam um maior entendimento dos fenômenos neurobiológicos envolvidos (Windle, Szymanska *et al.*, 2006; Auriat e Colbourne, 2009; Murphy e Corbett, 2009; Nowak, 2009; Maclellan, Silasi *et al.*, 2010; Mestriner, R. G., Pagnussat, A. S. *et al.*, 2011). Sabe-se que o perfil fisiopatológico dos insultos isquêmicos e hemorrágicos é bastante

diferenciado, o que tem motivado estudos pré-clínicos e clínicos específicos para cada uma das referidas condições, embora, sabidamente, alguns mecanismos celulares sejam semelhantes, quanto à sua natureza, no período pós-lesão (Auriat e Colbourne, 2009; Murphy e Corbett, 2009; Maclellan, Silasi et al., 2010). No entanto, a investigação comparativa dos mecanismos neuroplásticos que sucedem a isquemia e a hemorragia cerebral ainda carece de maior atenção científica.

1.1 Isquemia cerebral

O termo isquemia é definido como uma redução suficiente do fluxo sanguíneo capaz de causar danos metabólicos e funcionais. A isquemia encefálica ocorre tipicamente pela oclusão de uma artéria que supre um território específico do encéfalo. As características do dano dependem da severidade e duração desta redução do fluxo sanguíneo (Durukan e Tatlisumak, 2007; Moskowitz, Lo et al., 2010). Em modelos animais, o fluxo sanguíneo é mais crucialmente reduzido na região central da área de infarto (core), aumentando gradualmente na região adjacente (penumbra isquêmica) – normalmente suprida pela artéria que sofreu oclusão, mas que resiste devido à perfusão residual de vasos sanguíneos colaterais. A área de penumbra isquêmica teoricamente não é funcional, entretanto, inicialmente mantém sua integridade estrutural. Evidências indicam que se o fluxo sanguíneo não é restaurado em poucas horas, a região de penumbra pode tornar-se parte da região central afetada pela isquemia (core) (Green, 2003; Fisher e Bastan, 2012; Heiss, 2012).

Os processos de morte e dano celular são consideravelmente diferentes nestas duas regiões (Smith, 2004; Del Zoppo, Sharp et al., 2011). Dentre os mecanismos característicos da morte celular por isquemia, a necrose e apoptose parecem atuar de modo importante. Enquanto a necrose é mais evidente na região do tecido isquêmico central, nas células da penumbra, tanto necrose quanto apoptose podem ocorrer, com predominância de apoptose (Smith, 2004; Del Zoppo, Sharp et al., 2011).

O conceito de unidade neurovascular enfatiza que a matriz extracelular, as células gliais e as endoteliais influenciam na sobrevivência ou morte dos neurônios (Ginsberg, 2008) (Lo e Rosenberg, 2009; Dirnagl, 2012). Em poucos minutos de oclusão vascular, uma sequência complexa de eventos fisiopatológicos espaciais e temporais (cascata isquêmica) acontece em certa ordem, mas apresentando importantes inter-relações entre si. Contudo, o dano cerebral ocorre progressivamente por várias horas ou até mesmo dias (Durukan e Tatlisumak, 2007). Os principais mecanismos patogênicos da cascata isquêmica incluem a falha energética (Huang e Mcnamara, 2004; Mergenthaler, Dirnagl et al., 2004; Dirnagl e

Lindauer, 2006), elevação dos níveis intracelulares de Ca^{++} (Fisher e Schaebitz, 2000; Mcilvoy, 2005), excitotoxicidade (Dirnagl, Iadecola et al., 1999), depressão alastrante (spreading depression) (Hartings, 2003), geração de radicais livres (Lo, Dalkara et al., 2003; Mergenthaler, Dirnagl et al., 2004), disfunção da barreira hemato-encefálica (Michalski, Grosche et al., 2010), inflamação (Danton e Dietrich, 2003) e apoptose (Mergenthaler, Dirnagl et al., 2004; Lopez-Neblina, Toledo et al., 2005).

Atualmente, sabe-se que uma série de moléculas que participam de mecanismos deletérios presentes na fase aguda da isquemia cerebral podem mostrar-se benéficas nas fases tardias de remodelamento neurovascular (Navaratna, Guo et al., 2009; Hayakawa, Qiu et al., 2010). Dessa forma, embora boa parcela dos mecanismos agudos da isquemia cerebral seja razoavelmente bem compreendida, as repercussões tardias sobre o referido remodelamento e a possível contribuição do mesmo para a recuperação funcional espontânea e mediada por reabilitação permanecem pouco compreendidas.

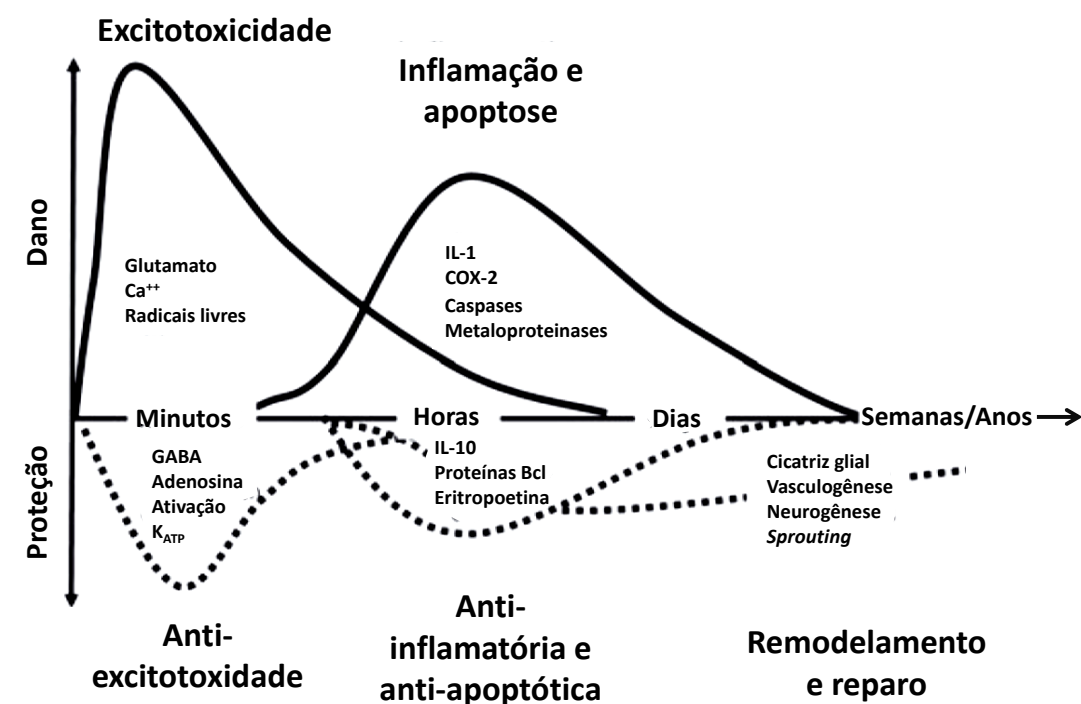


Figura 1. Mecanismos lesivos e protetores no período pós-isquemia focal. Cox-2: ciclooxigenase-2; IL-1: interleucina-1; IL-10: interleucina 10. Adaptado de (Dirnagl, 2012).

1.2 Hemorragia Cerebral

O conhecimento acerca da fisiopatologia da hemorragia cerebral tem evoluído muito nas últimas décadas, sendo agora não mais entendido como um simples extravasamento sanguíneo para o parênquima cerebral, mas como um evento complexo, dinâmico e que envolve uma série de fatores distintos (Mayer e Rincon, 2005; Caceres e Goldstein, 2012).

A hemorragia cerebral comumente acomete os lobos cerebrais, os núcleos da base (cerca de 50% dos casos), o tálamo, o tronco encefálico (principalmente a ponte) e o cerebelo (Qureshi e Hanley, 2001; Qureshi, Suri et al., 2007; Manno, 2012). A ruptura espontânea de vasos sanguíneos encefálicos normalmente está associada a diversos fatores, dentre os quais podemos destacar os processos degenerativos congênitos, os decorrentes da hipertensão e da angiopatia amiloide. Além disso, os pacientes vasculopatas são particularmente vulneráveis, já que uma das mais sérias complicações do uso de anticoagulantes é a hemorragia cerebral (Cervera, Amaro et al., 2012; Ikram, Wieberdink et al., 2012).

Em relação às regiões parenquimatosas adjacentes ao extravasamento sanguíneo, podemos constatar a presença de edema, células em apoptose e/ou necrose e células inflamatórias (Qureshi, Suri et al., 2003; Provencio, 2013). Nesse sentido, o hematoma pode induzir danos morfofisiológicos em função da deformação tecidual mecânica, o que acarreta no afastamento de neurônios e células gliais (Qureshi e Hanley, 2001), despolarização da membrana, liberação de neurotransmissores e disfunção mitocondrial (Qureshi, Ali et al., 2003; Lusardi, Wolf et al., 2004). A depender da severidade da referida disfunção, pode ocorrer tanto uma supressão metabólica temporária (fase de hibernação) quanto um aumento do volume celular e necrose (Qureshi, Mendelow *et al.*, 2009). De modo adicional, uma cascata secundária é iniciada pelos produtos da coagulação e do metabolismo da hemoglobina, em particular a trombina, que é capaz de ativar células microgлияis cerca de 4h após o início do evento hemorrágico. Por sua vez, a micróglia ativada libera mediadores que levam à disfunção da barreira hemato-encefálica, ao surgimento de edema vasogênico e à apoptose neuronal e glial (Nakamura, Xi et al., 2005; Xi, Keep et al., 2006).

Adicionalmente, tem-se reportado uma fase hipometabólica no tecido adjacente ao hematoma, marcada pela baixa perfusão tecidual. De modo interessante, essa hipoperfusão regional, tanto em humanos (Zazulia, Diringer et al., 2001; Schellinger, Fiebach et al., 2003) quanto em roedores (Orakcioglu, Fiebach *et al.*, 2005), nem sempre atinge níveis suficientes para ocasionar um fenômeno isquêmico, e talvez seja secundária ao hipometabolismo. Entretanto, na presença de elevada pressão intracraniana e baixa perfusão cerebral, o risco da ocorrência de uma isquemia global é bastante elevado. Ainda em relação à perfusão cerebral, existem 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, Mendelow *et al.*, 2009).

Além de todos estes fatores, uma série de outros mecanismos contribui para o desenvolvimento dos danos teciduais pós-hemorragia cerebral. Isto inclui: a ativação do sistema complemento – componente da resposta imunológica particularmente importante no

edema pós-hemorrágico (Sayah, Ischenko et al., 1999; Loftspring, Mcdole et al., 2009); a ativação de metaloproteinases de matriz - uma família de endopeptidases que degradam a matriz extracelular (Rosenberg, Estrada et al., 2007; Florczak-Rzepka, Grond-Ginsbach et al., 2012); e a participação de espécies reativas de oxigênio - provenientes da hemoglobínlise, capazes de aumentar os efeitos danosos do estresse oxidativo, além de participar indiretamente de diversas vias envolvidas neste processo (Wagner, Sharp et al., 2003; Heo, Han et al., 2005; Aronowski e Zhao, 2011).

Apesar de todos os mecanismos fisiopatológicos atualmente descritos, ainda muito pouco é conhecido sobre a hemorragia cerebral. Estima-se que apenas cerca de 15% dos genes que sofrem regulação nas adjacências de um evento hemorrágico já tenham sido devidamente investigados (Lu, Tang et al., 2006; Carmichael, Vespa et al., 2008), o que evidencia a potencial participação de uma diversidade de outros fatores na fisiopatologia dos eventos hemorrágicos.

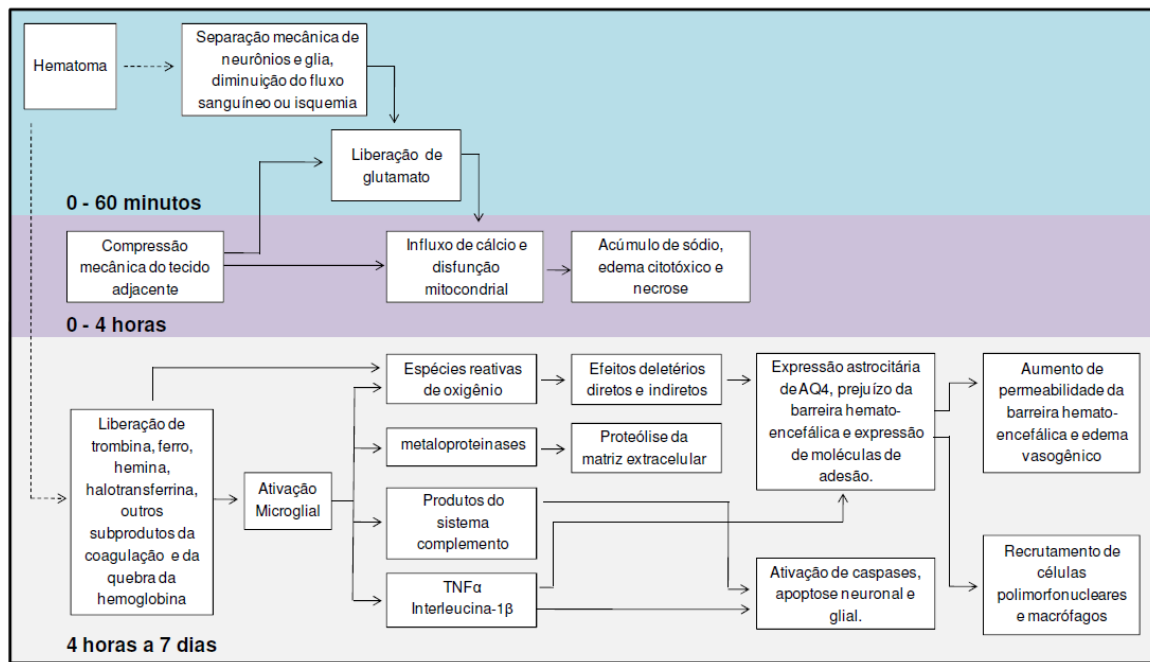


Figura 2. Cascata de danos neurais iniciada pela hemorragia intracerebral Adaptada de (Qureshi, Mendelow *et al.*, 2009).

1.3 Recuperação funcional pós-AVE isquêmico ou hemorrágico

As principais incapacidades funcionais que se observam sob o ponto de vista clínico parecem independe da etiologia do AVE, e são decorrentes da hemiparesia, da incoordenação, da hipertonia espástica e da fraqueza muscular dos membros contralaterais ao hemisfério lesado (Andrews e Bohannon, 2000; Schaechter, 2004). Entretanto, alguns estudos clínicos da área de reabilitação vêm demonstrando que a etiologia do AVE poderia ser um dos

fatores envolvidos no prognóstico e na recuperação funcional dos pacientes (Paolucci, Antonucci *et al.*, 2003; Schepers, V. P. M., Ketelaar, M. *et al.*, 2008; Lauretani, Saccavini *et al.*, 2010).

Nesse sentido, Kelly e colaboradores (2003) sugeriram, em um estudo retrospectivo, que os pacientes que sofreram hemorragia cerebral apresentam um pior desempenho funcional no momento da admissão hospitalar. Entretanto, ao longo do processo de recuperação, esses mesmos pacientes hemorrágicos alcançam níveis de funcionalidade superiores aos indivíduos que sofreram isquemia cerebral de gravidade clínica semelhante (Kelly, Furie *et al.*, 2003). Outro trabalho, um estudo caso-controle envolvendo 270 indivíduos, demonstrou que os pacientes hemorrágicos apresentaram um melhor desempenho funcional na alta hospitalar, tendo sido avaliado pelos instrumentos *Canadian Neurological Scale* e o *Rivermead Mobility Index*. Além disso, os pacientes hemorrágicos também apresentaram uma probabilidade de resposta terapêutica elevada no Índice de Barthel, 2,5 vezes maior do que a dos pacientes isquêmicos (Paolucci, Antonucci *et al.*, 2003).

Em relação ao desempenho nas AVDs, um estudo longitudinal conduzido por Schepers e colaboradores (2008) concluiu que existem diferenças no retorno às referidas atividades entre pacientes com infarto cortical e hemorragia intracerebral. O mesmo estudo demonstrou que, entre a 12^a e a 26^a semana pós-AVE, os pacientes isquêmicos apresentam uma recuperação funcional significativamente mais rápida quando comparados aos hemorrágicos. Além disso, a janela de recuperação funcional foi significativamente mais longa para os pacientes isquêmicos (até a 26^a semana), enquanto que os pacientes hemorrágicos obtiveram ganhos funcionais apenas até a 10^a semana (Schepers, V. P. M., Ketelaar, M. *et al.*, 2008).

Apesar das evidências disponíveis, diversas limitações podem ser identificadas nos estudos clínicos supracitados, o que dificulta uma resposta definitiva sobre o tema. De modo particular, sob o ponto de vista fisiológico, os sítios primários de lesão em humanos, assim como a extensão territorial e morfológica das mesmas, dificilmente podem ser pareados para que, então, possamos testar o efeito etiológico do AVE como um fator independente “puro” nas medidas de plasticidade e desfecho funcional. Dessa forma, o desenvolvimento de abordagens experimentais pré-clínicas podem ser uma estratégia interessante para uma compreensão mais detalhada do processo comparativo de recuperação pós-AVE, tanto em nível comportamental quanto em nível morfológico e neuroquímico.

1.4 Astrogliose reativa pós-AVE

O neurônio sempre foi visto como a célula mais importante do sistema nervoso central dos mamíferos, e essa qualificação deve-se especialmente a sua indispensável participação na neurotransmissão (Colon-Ramos, 2009), associada ao conceito cultural de neuroglia postulado por Rudolf Ludwig Karl Virchow em 1858 (Kettenmann e Verkhratsky, 2008). Rudolf Virchow foi um dos patologistas mais influentes do século XIX e um dos criadores da teoria celular e da patologia celular. Para ele, a neuroglia era uma espécie de material conjuntivo que mantinha as células nervosas unidas, ou seja, uma espécie de “cola nervosa” ou “neuroglia”. Apesar de Virchow ter admitido que essa “cola” também continha certo número de elementos celulares, a mencionada observação acabou sendo praticamente ignorada por longos anos na história da ciência (Kettenmann e Verkhratsky, 2008). É interessante notar que, apesar das observações feitas em 1899 por Santiago Ramón y Cajal no trabalho intitulado “Contribución al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano” que alertavam para a importância desses elementos celulares descritos por Virchow, somente com o advento tecnológico ocorrido nas últimas décadas, foi que uma série de funções gliais começaram a ser apreciadas (Araque, Carmignoto et al., 2001; Araque, 2008).

Com base nas premissas descritas acima, uma série de intervenções foram propostas, ao longo do tempo, com o intuito de evitar, especificamente, a disfunção e/ou morte neuronal, desconsiderando-se a importância da participação de outras células presentes no encéfalo no processo de remodelamento pós-lesão. Embora fortemente centrados em conceitos reducionistas, esses trabalhos contribuíram enormemente para a dissecação de uma série de mecanismos envolvidos nas lesões pós-AVE, tais como a excitotoxicidade glutamatérgica (Doble, 1999), o desequilíbrio iônico (Liu, Liu et al., 2009), o estresse oxidativo e nitrosativo (Allen e Bayraktutan, 2009), a neuroinflamação (Lakhan, Kirchgessner et al., 2009), as vias de sinalização relacionadas à morte neuronal (Jung, Kim et al., 2010), entre outros.

Apesar dos avanços significativos na compreensão das funções neuronais, a maioria dos ensaios clínicos que almejavam a proteção neuronal acabou por não alcançar os resultados esperados (Lizasoain, Cárdenas et al., 2006; Feuerstein e Chavez, 2009). As razões que visam a explicar o fracasso desses estudos são as mais diversas, incluindo a emergente ideia de que apenas salvar neurônios talvez não seja suficiente para restaurar a função do sistema nervoso lesado. Essa nova visão contribuiu muito para a origem do conceito de “unidade neurovascular”, que surgiu como um novo paradigma na compreensão das doenças do SNC (Del Zoppo, 2009).

O conceito de unidade neurovascular é definido em nível intercelular, compreendendo as relações dinâmicas entre as células do endotélio vascular, células gliais, neurônios e a matriz extracelular (Arai, Jin et al., 2009). A dissecação dos diversos sinais celulares e substratos presentes na unidade neurovascular, talvez possam revelar novas oportunidades para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas para o reparo e remodelamento do sistema nervoso lesado (Lo, Dalkara et al., 2003; Arai, Jin et al., 2009; Lo e Rosenberg, 2009; Dirnagl, 2012).

O AVE caracteriza-se por ser uma condição bastante heterogênea, o que se deve, principalmente, às marcantes diferenças fisiopatológicas entre os subtipos isquêmico e hemorrágico, aos diferentes territórios encefálicos lesados e à extensão dos mesmos (Hossmann, 2006; Moskowitz, Lo et al., 2010). No entanto, apesar da heterogeneidade, diversas respostas plásticas similares nos diferentes contextos de lesão são ativadas no período pós-AVE, dentre elas o remodelamento neurovascular (Arai, Jin et al., 2009; Lo e Rosenberg, 2009; Moskowitz, Lo et al., 2010). O referido remodelamento é compreendido como uma série de modificações funcionais na unidade neurovascular, podendo incluir respostas angiogênicas, gliogênicas, neurogênicas e da matriz extracelular, de forma interdependente (Arai, Jin et al., 2009; Moskowitz, Lo et al., 2010). Nesse contexto, a investigação das respostas neurovasculares após a lesão do SNC pode reinterpretar o papel da participação dos fenômenos celulares decorrentes, em diferentes momentos pós-AVE, tal como o papel da astrogliose reativa em cada um desses momentos (Sofroniew, 2009; Hamby e Sofroniew, 2010; Sofroniew e Vinters, 2010). Dessa forma, é possível que alguns eventos neurovasculares agudos pós-AVE, tradicionalmente vistos como deletérios, representem uma resposta encefálica endógena que visa a preparar o encéfalo para uma tentativa de reparo em longo prazo, o que pode incluir a astrogliose reativa e os fenômenos por ela desencadeados (Arai, Jin et al., 2009; Sofroniew, 2009; Sofroniew e Vinters, 2010).

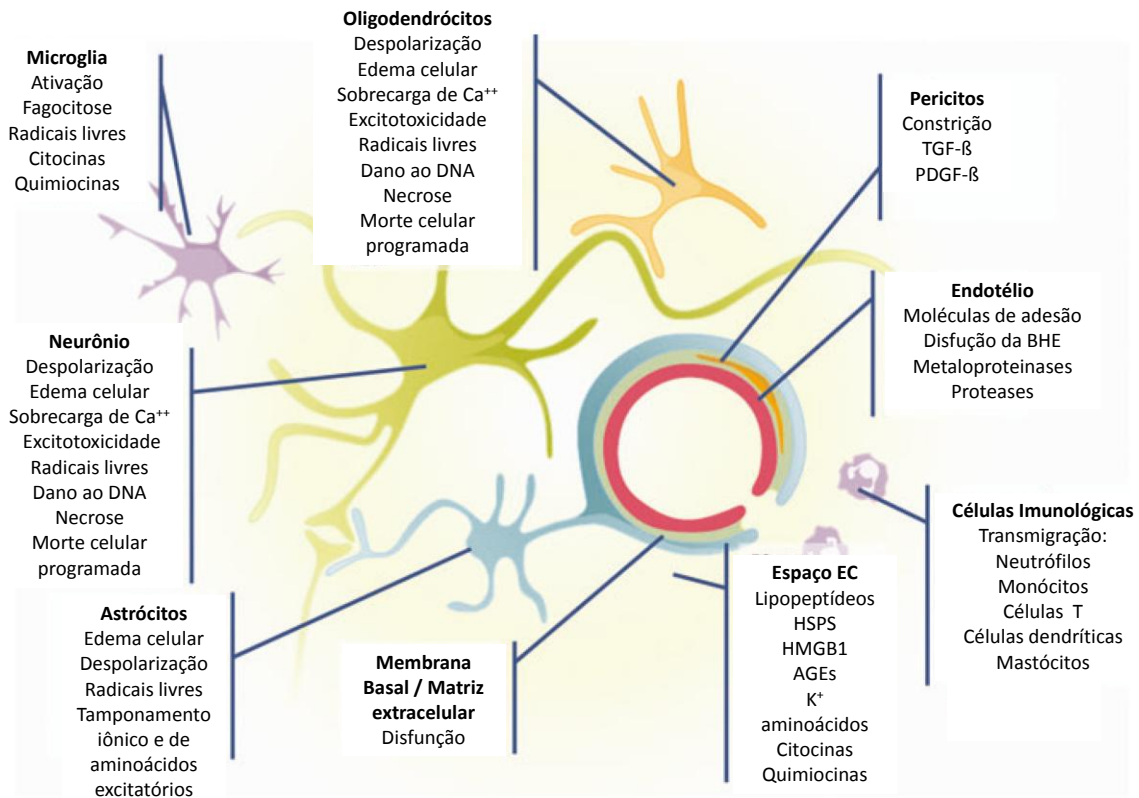


Figura 3. Representação esquemática da unidade neurovascular e alguns dos eventos envolvidos no período pós-lesão. AgEs (*advanced glycosylation end products*); BHE: barreira hemato-encefálica; HSP: proteínas de choque térmico; TGF-β: fator de transformação do crescimento *beta*; PDGF- β: receptor tipo *beta* para o fator de crescimento derivado de plaquetas. Adaptado de (Dirnagl, 2012).

A astrogliose reativa, fenômeno caracterizado por alterações moleculares e morfológicas em determinados astrócitos, é um achado clássico e conhecido de longa data na maioria, senão em todas, as doenças do sistema nervoso central (Sofroniew, 2009; Hamby e Sofroniew, 2010; Sofroniew e Vinters, 2010; Verkhratsky, Sofroniew et al., 2012). Apesar disso, faz somente cerca de 20 anos que as células gliais passaram a receber uma maior atenção da comunidade científica (Colangelo, Cirillo et al., 2012). Talvez, a razão para este desinteresse possa ser atribuída, essencialmente, a dois fatores: as fortes influências da cultura histórica de subvalorização das células gliais (“brain glue”) frente aos neurônios, como anteriormente mencionado; e as dificuldades técnicas para um estudo mais adequado e detalhado da glia, células que podem ser compreendidas mais profundamente nos dias de hoje graças ao advento tecnológico (Kettenmann e Verkhratsky, 2008). Assim, por muitos anos a astrogliose reativa foi resumida a uma espécie de fenômeno estereotipado, sinônimo de cicatriz glial, que se expressa de maneira semelhante na presença de qualquer insulto ao SNC, e que acaba por impedir a regeneração axonal (Sofroniew, 2009; Sofroniew e Vinters, 2010).

Para Sofroniew (2009), a concepção de astrogliose reativa deve ser encarada de acordo com alguns aspectos interdependentes. São eles: (1) o espectro de variações que ocorre em alguns subtipos de astrócitos decorre da resposta a todas as formas e gravidades de lesões e/ou doenças do SNC, mesmo que sutis; (2) essas alterações podem variar conforme a natureza e a gravidade da lesão, o que ocorre por meio de uma série contínua de alterações graduais e progressivas. Essas envolvem: a expressão molecular, a hipertrofia celular (especialmente dos processos astrocitários), a proliferação e, nos casos graves, a formação de cicatrizes astrogliais; (3) as modulações da astrogliose reativa são reguladas de uma forma contexto-específicas, ou seja, diferentes fatores na sinalização celular possuem o potencial de modificar a natureza e o grau dessas mudanças moleculares e morfológicas; (4) essas alterações podem alterar a atividade de astrócitos, tanto por meio do ganho quanto da perda de funções, o que pode resultar tanto em benefício quanto em prejuízo para a função dos demais tipos celulares presentes no contexto da astrogliose. Dessa forma, o autor mencionado sugere que este não é um fenômeno uniforme mas, sim, um processo refinado e modulável, de acordo com uma série de variáveis (Sofroniew, 2009; Sofroniew e Vinters, 2010).

Uma característica bem conhecida dos astrócitos reativos é o aumento da expressão de filamentos intermediários (FI), o que é evidenciado, principalmente, pela expressão aumentada de GFAP, além da vimentina e da nestina, sendo as últimas, proteínas integrantes dos FI de astrócitos imaturos (Pekny e Pekna, 2004). Todas essas proteínas atuam como verdadeiros “blocos de construção” dos filamentos intermediários dos astrócitos, que, juntamente com os microtúbulos e os filamentos de actina, constituem o citoesqueleto (Li, Lundkvist et al., 2008).

A GFAP é a uma proteína integrante do citoesqueleto astrocitário que faz parte da classe III de filamentos intermediários (FI) gliais (Rutka, Murakami et al., 1997), tipicamente expressa em algumas populações de astrócitos maduros (Zilles, Hajos et al., 1991; Taft, Vertes et al., 2005), sendo amplamente utilizada como um marcador de astrogliose reativa (Zhang, Hu et al., 2010). Sob a óptica morfofuncional, a GFAP sempre foi reconhecida pela sua importância para a manutenção estrutural dos astrócitos. No entanto, mais recentemente, esta proteína tem se revelado importante também para as funções astrocitárias, com um papel importante na plasticidade induzida por uma série de fatores, incluindo as manipulações experimentais (Middeldorp e Hol, 2011).

Existem evidências em camundongos que não expressam as proteínas GFAP e vimentina, que a natureza ou o momento da lesão podem gerar respostas plásticas diferentes. Por exemplo, ratos neonatos submetidos à hipóxia-isquemia neonatal apresentam um volume de lesão comparável aos animais que não expressavam os mencionados neurofilamentos

(Jarlestedt, Rousset et al., 2010). No entanto, ratos adultos normais, submetidos a um modelo de isquemia focal, apresentaram menor volume de lesão quando comparados aos seus pares que não expressavam GFAP e vimentina, o que sugere, nessas circunstâncias, um papel neuroprotetor da presença desses filamentos intermediários (Li, Lundkvist et al., 2008). Corroborando esses resultados, Hayakawa e colaboradores (2010) demonstraram que a inibição da atividade metabólica dos astrócitos reativos, após um modelo de isquemia focal, está relacionada com um pior desempenho funcional em roedores. Assim, esses mesmos autores sugerem que os astrócitos reativos da região perilesional participam do remodelamento neurovascular e, talvez, contribuam positivamente para a recuperação funcional (Hayakawa, Nakano et al., 2010).

Neste contexto, também já foi demonstrado que experiências comportamentais, no período pós-lesão, podem modular a morfologia e, provavelmente, a função dos astrócitos GFAP-positivos (Mestriner, R. G., Pagnussat, A. S. et al., 2011). Este mesmo estudo revelou que o treinamento de habilidade do alcance e preensão em roedores submetidos à hemorragia intracerebral foi capaz de aumentar o comprimento dos processos primários desses astrócitos reativos no tecido adjacente à lesão, fenômeno esse correlato ao melhor desempenho funcional nos testes comportamentais. Outrossim, em animais intactos, já foi demonstrado que intervenções ambientais, tais como o ambiente enriquecido (Viola, Rodrigues et al., 2009) e o exercício físico (Saur, Baptista et al., 2013), são capazes de modular a expressão de GFAP e a morfologia de astrócitos no hipocampo, como um resultado adaptativo às referidas experiências.

Além disso, um crescente corpo de evidências demonstra a importância da GFAP em diversas outras circunstâncias. Por exemplo, tem-se associado a diminuição da expressão de GFAP em diferentes regiões encefálicas com a depressão (Johnston-Wilson, Sims et al., 2000; Miguel-Hidalgo, Baucom et al., 2000). Adicionalmente, acredita-se que modificações na expressão de GFAP também estejam associadas ao crescimento de gliomas (Rutka, Hubbard et al., 1994). Por outro lado, o aumento da referida proteína está presente no autismo (Laurence e Fatemi, 2005), incluindo também a presença de auto-anticorpos para GFAP no plasma (Singh, Warren et al., 1997) e níveis elevados de GFAP no líquido (Rosengren, Ahlsen et al., 1992) desses pacientes. Esse último achado geralmente está presente no contexto de diversas lesões do SNC, como demonstrado após a isquemia cerebral (Aurell, Rosengren et al., 1991) e o trauma crânio-encefálico (Hausmann, Riess et al., 2000).

Dessa forma, é provável que as alterações na morfologia astrocitária e, conseqüentemente, na expressão de seus filamentos intermediários GFAP-positivos, sejam adaptações correlatas às modificações neuroquímicas (Ohira, Funatsu et al., 2007; Middeldorp

e Hol, 2011) e/ou metabólicas (Eddleston e Mucke, 1993) envolvidas em diferentes contextos do SNC, sejam esses fisiológicos ou patológicos. Apesar desta presunção, a relação específica entre a expressão de GFAP e suas consequências funcionais é um tema que ainda precisa ser compreendido de forma mais clara.

Ante o exposto, é possível que uma análise mais atenta e específica frente à participação dos astrócitos GFAP-positivos possa nos fornecer valiosas informações sobre o papel dos mesmos na recuperação funcional em diferentes circunstâncias da astrogliose reativa, tal como ocorre após insultos etiologicamente diferentes, como, por exemplo, no AVE isquêmico e hemorrágico.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Comparar a recuperação sensório-motora espontânea, o volume e a extensão das lesões e a astrogliose reativa perilesional em ratos Wistar adultos submetidos aos modelos de isquemia ou hemorragia cerebral.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) avaliar o perfil da recuperação sensório-motora espontânea, por meio dos testes do campo aberto, cilindro e escada horizontal, comparativamente, em ratos Wistar adultos submetidos aos modelos de isquemia ou hemorragia cerebral;
- 2) verificar se o volume e a extensão das lesões induzidas pelos modelos de isquemia e hemorragia cerebral são estereologicamente comparáveis;
- 3) correlacionar o volume e a extensão das lesões isquêmica e hemorrágica com os desfechos comportamentais avaliados e a possível interferência dessas variáveis morfológicas sobre o desempenho comportamental nos diferentes grupos experimentais;
- 4) estimar a densidade celular e a densidade óptica regional e celular dos astrócitos positivos para a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) nas regiões perilesionais do córtex sensório-motor e estriado dorsolateral, comparativamente, nos diferentes grupos experimentais.

3. Abordagem Metodológica

Inicialmente, o projeto de pesquisa que originou o presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob o número 20644. Após a aprovação, foram utilizados 36 ratos machos *Wistar* adultos, provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com aproximadamente 3 meses de idade ao início dos experimentos. Os animais permaneceram em grupos de 4 ou 5 em caixas de Plexiglass, sob condições padrão (ciclo de 12 h claro/escuro), controle da temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), água e comida fornecidas à vontade. Deste número, quatro ratos evoluíram para o óbito em função de complicações cirúrgicas (02 animais em cada um dos grupos lesados). Além disso, cinco animais foram utilizados na padronização das condições experimentais e, por esta razão, foram excluídos da amostra.

Nos três dias que antecederam a avaliação pré-cirúrgica, os animais foram aclimatados ao teste da escada horizontal. As avaliações comportamentais ocorreram no dia anterior à indução do AVE experimental e, após, nos 1.º, 7.º, 15.º e 30.º dias pós-operatórios (PO), a depender do teste comportamental, conforme será detalhado abaixo. Assim, os animais incluídos foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

- (a) Sham [S] (n=7)
- (b) Isquemia cerebral [IC] (n=10)
- (c) Hemorragia cerebral [HC] (n=10)

Todas as análises, sejam comportamentais ou morfológicas, foram realizadas por avaliadores alheios aos grupos experimentais.

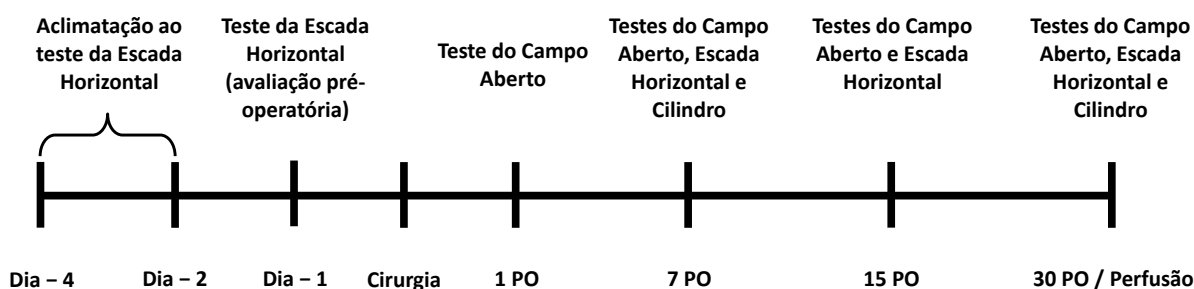


Figura 4. Desenho experimental. Notar que a cirurgia é considerada o dia “0”. PO: dia pós-operatório.

3.1 Modelos de AVE experimental (isquemia e hemorragia cerebral)

As injeções estereotáxicas de endotelina-1 e de colagenase derivada de *Clostridium histolyticum* no parênquima cerebral são métodos bastante empregados atualmente com a finalidade de reproduzir a isquemia cerebral focal e a hemorragia cerebral, respectivamente.

A endotelina-1 (ET-1) é um potente vasoconstritor (Yanagisawa, Kurihara et al., 1988), capaz de reduzir o fluxo sanguíneo local em níveis isquêmicos, quando injetada diretamente no tecido cerebral (Fuxe, Bjelke *et al.*, 1997; Windle, Szymanska *et al.*, 2006). A aplicação intraparenquimatosa de ET-1 causa uma redução do fluxo sanguíneo local, o que perdura por pelo menos 1 hora após a injeção, e resulta em uma lesão encefálica bem definida (Fuxe, Bjelke *et al.*, 1997; Windle, Szymanska *et al.*, 2006).

Em relação aos danos sensório-motores, já foi demonstrado que a administração intracortical de ET-1 na região do córtex sensório-motor é capaz de produzir disfunções motoras de longo prazo, caracterizadas por um grau de recuperação espontânea similar a outros modelos de dano cerebral, tais como a aspiração cortical mecânica e a administração de ácido quinolínico (Gilmour, Iverson et al., 2004). Além disso, Windle e colaboradores (2006) demonstraram que a injeção combinada de ET-1 nas regiões do córtex sensório-motor e estriado, ipsilateralmente, é capaz de promover os danos comportamentais esperados, com boa reprodutibilidade dos resultados. Adicionalmente, nesse modelo de injeção combinada, a mensuração do fluxo sanguíneo cerebral e o coeficiente de difusão aparente (medido por ressonância magnética) puderam predizer as áreas teciduais que sofreriam lesão cerebral permanente. Sob o ponto de vista comportamental, estes mesmos autores puderam concluir que a injeção cortical e estriatal combinada de ET-1 apresenta uma série de vantagens para o estudo de recuperação funcional pós-AVE, quando comparada aos modelos de injeção cortical seletiva (Windle, Szymanska *et al.*, 2006).

Por sua vez, a injeção estereotáxica de colagenase foi introduzida no início dos anos 1990, e acredita-se que esse modelo de dano encefálico possa reproduzir, experimentalmente, os efeitos de uma hemorragia cerebral espontânea (Rosenberg, Munbryce et al., 1990). Particularmente, os danos sensoriais e motores decorrentes da hemorragia causada pela injeção de colagenase são úteis para o estudo da recuperação da função e da plasticidade cerebral pós-AVE hemorrágico (Auriat, Wowk *et al.*, 2010; Mestriner, R.G., Pagnussat, A.S. *et al.*, 2011).

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, simulando uma “hemorragia espontânea” no local da aplicação.

As vantagens desse modelo incluem a simplicidade, 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 se apresenta como uma estratégia interessante para mimetizar os eventos hemorrágicos que ocorrem na hemorragia cerebral, em especial a HIC (Maclellan, Auriat et al., 2006; James, Warner et al., 2008; Maclellan, Silasi et al., 2008).

Neste estudo, os animais foram anestesiados com halotano (4%, em 70% de N₂O e 30% de O₂), utilizando-se um aparato de anestesia inalatória (Narcosul) e, após profundamente anestesiados, os mesmos foram colocados em posição ventral no aparelho estereotáxico. Assim, realizou-se a tricotomia da região central da calvária do animal, assepsia com álcool etílico e, com o auxílio de um bisturi cirúrgico, uma incisão na linha média de aproximadamente 0,5 cm sobre a pele para exposição óssea do crânio. Após, utilizou-se uma broca odontológica especial (Beltec LB100) para realizar uma pequena trepanação, permitindo, assim, a passagem da seringa de injeção estereotáxica (Hamilton®, n.º 26, USA). As injeções (em número de duas), contendo ET-1 ou colagenase do tipo IV-S, foram realizadas no córtex sensório-motor (1 injeção) e no estriado (1 injeção), ambas do lado cerebral esquerdo. Cada microinjeção continha 800pmol de ET-1 (Chemicon) ou 0,2 U de colagenase tipo IV (Sigma) diluídas em 2µl de salina estéril, de acordo com as seguintes coordenadas estereotáxicas ajustadas a partir de trabalhos prévios (Paxinos e Watson, 2004; Windle, Szymanska *et al.*, 2006; Mestriner, R. G., Pagnussat, A. S. *et al.*, 2011; Pagnussat, Simao *et al.*, 2012):

- injeção Cortical: Bregma 0.0 mm; +2.3 mm lateral ao Bregma e -2.4 mm ventral a partir do crânio;
- injeção Estriatal: Bregma 0.0 mm; +3.6 mm lateral ao Bregma e -6 mm ventral a partir do crânio.

As doses de ET-1 e colagenase tipo IV foram estabelecidas de modo a promover lesões de localização e extensão semelhantes, o que foi possível com a comparação das informações contidas na literatura (Maclellan, Auriat *et al.*, 2006; Windle, Szymanska *et al.*, 2006) e nas experiências experimentais prévias do nosso grupo de pesquisa com estes modelos (Mestriner, R. G., Pagnussat, A. S. *et al.*, 2011; Pagnussat, Simao *et al.*, 2012). O volume de cada microinjeção foi administrado ao longo de 5 minutos e, antes da retirada da seringa, esperou-se 5 minutos adicionais a fim de minimizar possível refluxo (Szymanska, Biernaskie *et al.*, 2006; Mestriner, R. G., Pagnussat, A. S. *et al.*, 2011). Nos animais do grupo S foi injetado o mesmo volume do diluente (salina). Após o procedimento cirúrgico, os animais permaneceram com água e comida *ad libitum*. Todas as cirurgias foram realizadas

mediante controle de temperatura retal (Letica, Espanha), de modo a não ultrapassar os limites de 36.5°C a 37.5°C. Ao término das injeções estereotáxicas, foi realizada a sutura com fio de nylon cirúrgico seguida da aplicação tópica de lidocaína 10%.

Após a cirurgia, os animais foram examinados quanto ao aparente prejuízo motor, de modo que todos os animais injetados com ET-1 ou collagenase exibiram déficit motor no hemicorpo contralateral ao hemisfério lesado (Debow, Davies *et al.*, 2003; Maclellan, Auriat *et al.*, 2006; Windle, Szymanska *et al.*, 2006), além de apresentarem rotação espontânea na direção contralateral ao hemisfério lesado quando suspensos pela cauda, o que está de acordo com a literatura (Whishaw, Oconnor *et al.*, 1986).

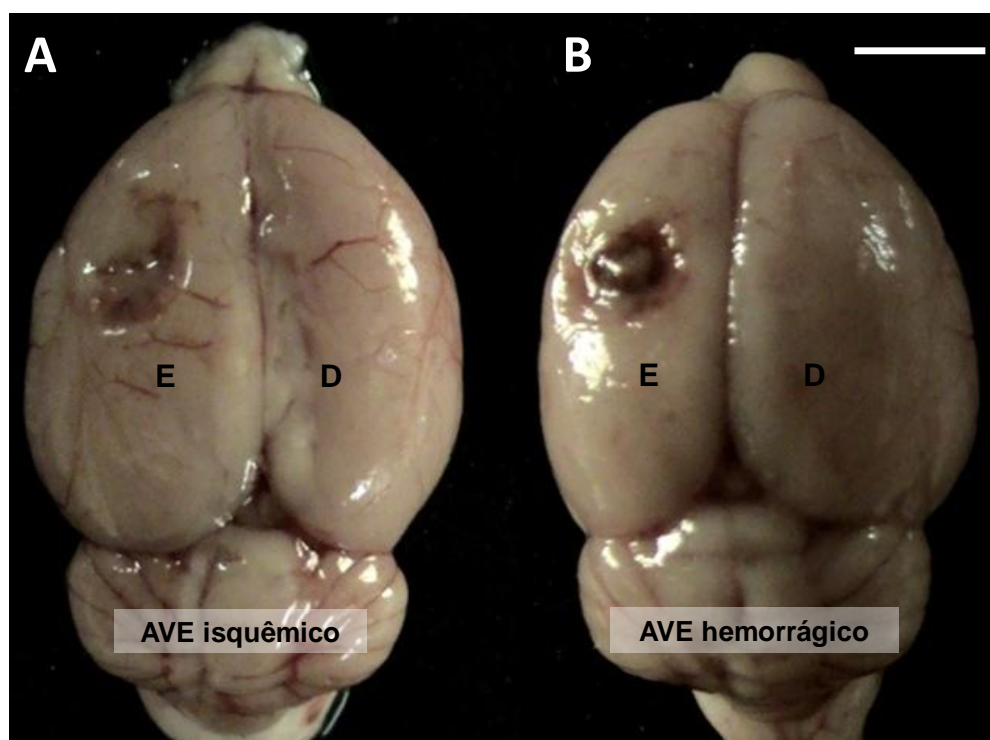


Figura 5. Imagens a fresco, obtidas durante o período de padronização das lesões experimentais, demonstrando a vista superior dos encéfalos de animais submetidos aos modelos de isquemia (A) e hemorragia (B) cerebral 24 horas após a cirurgia. Barra: 0,5cm; D: lado direito; E: lado esquerdo. Fonte: O autor.

3.2 Avaliação comportamental

Para a avaliação comportamental, foram utilizados os testes do campo aberto, cilindro e escada horizontal, conforme será, respectivamente, abaixo descrito.

3.2.1 Teste do campo aberto

As avaliações dos níveis gerais de atividade locomotora e dos padrões globais de movimento pré e pós-lesão foram realizadas pelo teste do campo aberto (Hartman, Lekic *et*

al., 2009; Babu e Ramanathan, 2011) nos seguintes momentos do período pós-operatório (PO): 1PO, 7PO, 15PO e 30PO. Esse teste foi realizado em uma sala especialmente adaptada para a avaliação comportamental com um nível de iluminação padronizado. Para tanto, os animais foram colocados, individualmente, em uma arena circular, que constituiu um campo para a livre exploração. O referido aparato é formado por uma caixa circular de madeira, na cor preta, medindo 60 cm de diâmetro x 45 cm de altura. A arena do campo aberto foi dividida em 28 quadrantes virtuais, e os animais sempre foram colocados no quadrante central da mesma, voltados sempre para o mesmo lado ao início do teste. Após, os animais permaneceram nesse aparato pelo tempo de 5 minutos realizando a exploração. Todos os animais foram filmados durante o teste, e as mensurações referentes a cada variável de interesse foram realizadas por meio do programa Any-Maze Video Traking System 4.73 (Stoelting Co., USA).

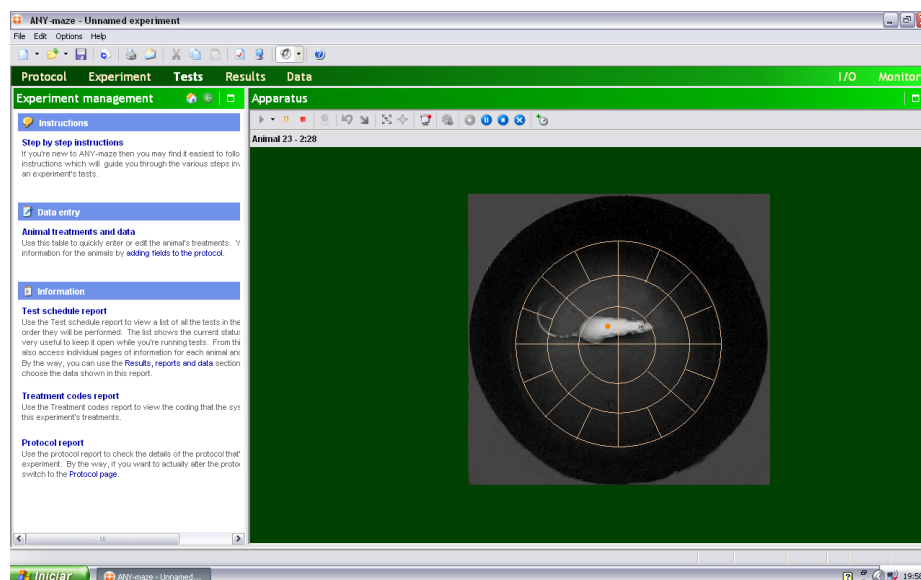


Figura 6. Imagem do teste do campo aberto sendo realizado com o auxílio do programa Any-Maze (Fonte: O Autor).

3.2.2 Teste do cilindro

O teste do cilindro visa a 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, T. , 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. Após, realizou-se a filmagem de cada animal, individualmente (durante 5-6 minutos), através de um espelho angulado (vista inferior do animal) de modo a possibilitar a observação dos movimentos exploratórios espontâneos dos mesmos. Foi registrado o número de contatos dos membros anteriores com as paredes do

cilindro, utilizadas para o suporte corporal durante a exploração. Como critério de exclusão, estabeleceu-se que os animais que não realizassem pelo menos 12 contatos exploratórios independentes ficariam fora da análise dos dados. Para a realização deste teste, os animais não foram aclimatados, visto que uma maior exploração por parte do animal pode tornar o teste 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, sendo, posteriormente, calculado por meio da fórmula (MacLellan, Auriat et al., 2006):

$$\frac{[(\text{contatos realizados com o membro anterior contralateral} + \frac{1}{2} \text{ dos contatos bilaterais})]}{(\text{contatos ipsilaterais} + \text{contatos contralaterais} + \text{ambos}) \times 100}.$$

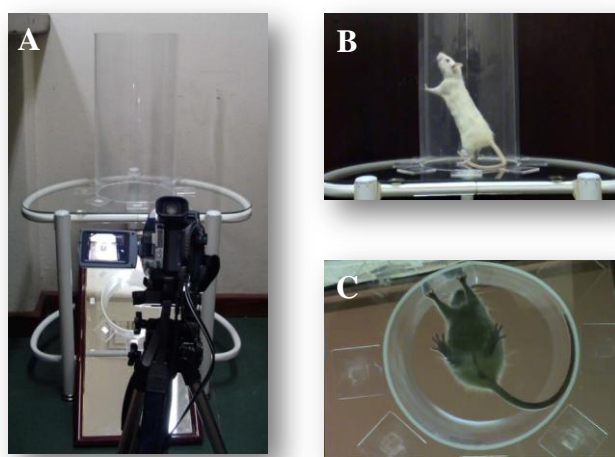


Figura 7. Teste do cilindro. (A) aparato para a realização do teste; (B) vista lateral de animal realizando a exploração; (C) vista inferior do mesmo, utilizada para a filmagem e análise das imagens. Adaptado de (Pagnussat, Michaelsen *et al.*, 2009).

3.2.3 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 e nas alterações do envelhecimento, possibilitando a avaliação dos erros de colocação dos membros anteriores e posteriores que ocorrem durante a marcha de roedores (Metz e Whishaw, 2002; Mestriner, R.G., Pagnussat, A.S. *et al.*, 2011). O aparato para a realização do referido teste consistiu em duas paredes de acrílico transparente (1 m de largura por 20 cm de altura) e traves de metal (3mm de diâmetro cada) que foram inseridas inferiormente, entre as paredes, com uma distância mínima de 1 cm entre elas, caracterizando, assim, a forma que confere o nome de escada horizontal ao aparato. A escada permaneceu 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 um centímetro mais larga que o mesmo, de modo a dificultar que o animal caminhe em torno de si ou vire-se no sentido contrário durante o percurso (Metz & Whishaw, 2002).

A dificuldade deste 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 aclimação), 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 aleatórias, 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 (Maclellan, Auriat et al., 2006b). A padronização dos movimentos que configuram erros ou acertos será realizada conforme escala previamente descrita, que, resumidamente, apresenta 7 tipos de situações (6 formas de erros e 1 acerto) (Metz e Whishaw, 2002; Maclellan, Auriat *et al.*, 2006; Mestriner, R.G., Pagnussat, A.S. *et al.*, 2011).

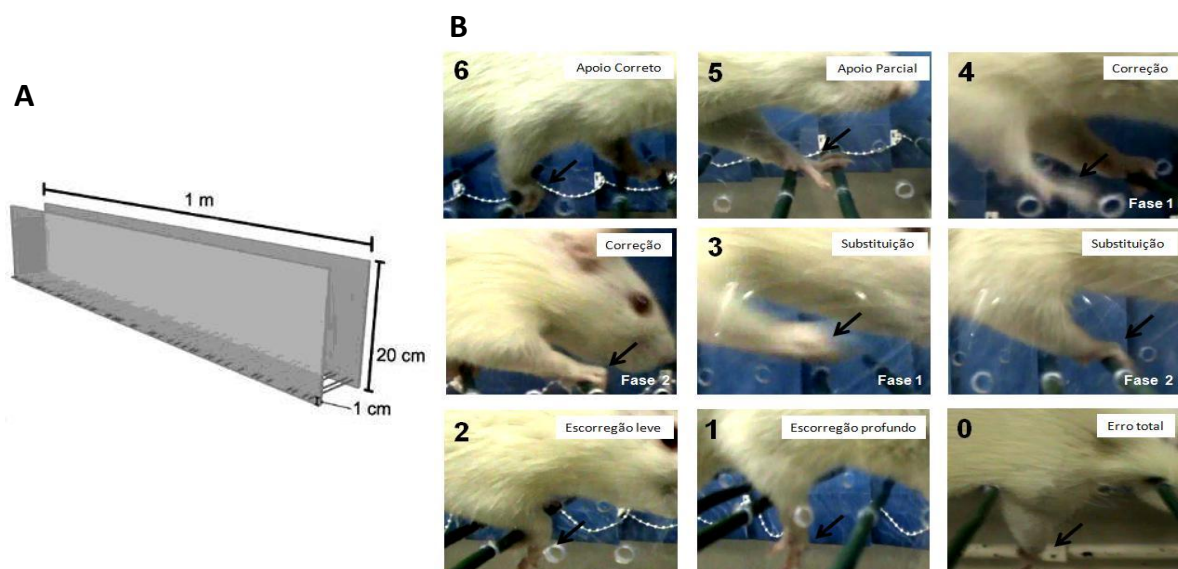


Figura 8. Teste da escada horizontal. (A) ilustração do aparato utilizado para a realização do teste da escada horizontal (adaptado de Metz & Whishaw, 2002). (B) escore de contagem de erros: 0- erro total; 1- escorregão profundo; 2- escorregão leve; 3- substituição; 4- correção; 5- colocação parcial; 6- colocação correta (acerto). Fonte: O autor.

3.3 Análise morfológica: volume e extensão das lesões

Ao término das avaliações comportamentais, os animais foram submetidos aos protocolos histológicos, como rotineiramente realizado por uma série de estudos relacionados (Gharbawie, Gonzalez et al., 2005; Maclellan, Auriat et al., 2006; Keiner, Wurm et al., 2008). Para tanto, os animais receberam uma injeção de hidrato de cloral (30%, 10mL/Kg) pela via intra-peritoneal, realizando-se, após a verificação de ausência de pulso pré-cordial, a toracotomia com exposição do coração. A seguir, foram injetados 1000 UI de heparina sódica no ventrículo esquerdo, e, por meio de uma incisão neste mesmo ventrículo, foi inserida uma cânula ligada a uma bomba de perfusão (Control Company). Após uma segunda incisão, desta vez no átrio direito, foi perfundida, inicialmente, uma solução salina (100 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 em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram crioprotegidas pela imersão em sacarose 30% diluída em TF a 4°C, onde permaneceram durante três dias (tempo médio para que os encéfalos submerjam). Depois disso, os encéfalos foram congelados em isopentano resfriado em nitrogênio líquido até a realização das secções (50 µm) em criostato (Leitz).

Para a avaliação histológica do volume da lesão, foram selecionadas secções equidistantes (com intervalos de 200 µm), iniciando em Bregma +5.10 mm e terminado em Bregma -5.00 mm (Paxinos e Watson, 2004). Depois disso, esses cortes foram corados com a técnica de hematoxilina-eosina. Para tanto, os mesmos foram hidratados e levados à solução de hematoxilina de Mayer por 3 minutos, sendo, posteriormente, lavados em água corrente por pelo menos 20 minutos. Em seguida, os cortes foram levados à solução de eosina a 0,5%, por um período de 30 segundos a 1 minuto, com retirada do excesso de Eosina por meio de imersões em álcool 95%. Transcorridos estes procedimentos, teve início 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 até sua completa secagem.

Ao final do referido processamento histológico, as lâminas foram escaneadas em resolução de 1200 dpi, sendo o volume da lesão (incluindo a atrofia tecidual) calculado pelo método de Cavalieri. Resumidamente, a área de cada secção avaliada é estimada e, em seguida, multiplica-se este valor pela distância entre os cortes avaliados (Buchan, Xue *et al.*, 1992; Windle, Szymanska *et al.*, 2006). A mensuração da área de lesão foi realizada com o auxílio do software Scion Image J 4.0 (Scion Corporation, Frederick, MD, USA), conforme

previamente descrito (Debow, Davies et al., 2003; Maclellan, Auriat et al., 2006). A análise da extensão das lesões isquêmica e hemorrágica ao longo do eixo fronto-occipital foi estimada por meio da multiplicação do número de secções consecutivas que apresentavam lesões detectáveis pela espessura dessas secções (50 µm), conforme previamente descrito (Marret, Mukendi et al., 1995).

3.4 Imunoistoquímica para GFAP

A técnica imunoistoquímica para GFAP foi realizada utilizando-se secções contendo as áreas de interesse, ou seja, o córtex sensorio-motor e o estriado dorsolateral, ambos adjacentes à lesão. Para tanto, algumas secções obtidas nos intervalos entre as secções coletadas para a estimativa do volume de lesão foram utilizadas. Essas secções foram coletadas aproximadamente entre o Bregma +1.80 (rostralmente) e Bregma -0.70 (caudalmente). Inicialmente, as mesmas foram pós-fixadas em uma solução contendo PFA por 15 minutos. Após, essas secções foram lavadas com um tampão salino gelado (PBS, pH 7,4) e, em seguida, as referidas fatias foram bloqueadas para as peroxidases endógenas em uma solução que continha peróxido de hidrogênio (3%) diluído em PBS, por adicionais 30 minutos. Finalizada esta etapa, realizou-se uma lavagem com PBS acrescido de Triton X-100 (0,4%) (PBS-Tx) seguida pelo procedimento de bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação, realizado com uso de albumina sérica bovina (BSA) à 2%, diluída em PBS-Tx, por adicionais 30 minutos. Em seguida, as secções foram incubadas por 48h à 4°C com o anticorpo policlonal anti-GFAP produzido em coelhos (Z033401-2 – Dako) na diluição de 1:500 em PBS-Tx. Decorrido o tempo de incubação, realizou-se duas lavagens em PBS-Tx e, após, as secções foram incubadas pelo período de 2h, em temperatura ambiente (≈ 22°C) com o anticorpo secundário IgG conjugado à peroxidase (A0545 - Sigma-Aldrich) na diluição de 1:200 em PBS-Tx. Ao término de mais esta etapa, as secções foram lavadas duas vezes em PBS, e a revelação foi realizada através da incubação das mesmas em um meio contendo 0,06% de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich) dissolvido em PBS por 10 minutos. Após, os cortes foram expostos à mesma solução mencionada, entretanto, com o acréscimo de 1 µL de H₂O₂ por mL de DAB, por adicionais 10 minutos. Após a revelação, as secções foram lavadas em PBS, desidratadas em séries crescentes de etanol (70, 90 e 100%), limpas com xileno e cobertas com Entellan (Merck) e lamínulas. Para controlar a marcação inespecífica, algumas secções foram submetidas a todas as etapas do procedimento imunoistoquímico com exceção do anticorpo primário, que foi substituído por PBS-Tx.

Adicionalmente, visando a minimizar as diferenças inespecíficas de marcação entre astrócitos e a coloração de fundo (*background staining*), os encéfalos foram fixados,

crioprotégidos e pós-fixados em soluções idênticas pelo mesmo período, processadas ao mesmo tempo e incubadas nas mesmas soluções utilizadas para a revelação por período de tempo semelhante.

3.5 Estimativa da densidade astrocitária

O número de astrócitos GFAP-positivos por mm^2 no córtex sensoriomotor e estriado dorsolateral perilesionais foi estimado utilizando um microscópio óptico Olympus BX 50 acoplado a uma câmera digital especial (Motic Images Plus 2.0) e ao software Image Pro-Plus 6.1 (Media Cybernetics). Para esta análise, quatro imagens (20X), em um total de três secções por animal, foram capturadas para cada uma das secções analisadas, sendo 2 imagens corticais e 2 estriatais. Assim, 12 imagens foram analisadas em cada animal (seis corticais e seis estriatais). Para a estimativa da densidade celular, duas áreas de interesse (AOIs), medindo $5.828 \mu\text{m}^2$ cada, foram sobrepostas em cada imagem. Os astrócitos localizados no interior de cada AOI ou aqueles localizados na intersecção das linhas superior e/ou direita de cada AOI foram contados (Viola, Rodrigues et al., 2009; Saur, Baptista et al., 2013).

Com o intuito de evitar a complexa sobreposição de corpos celulares, processos astrocitários e vasos sanguíneos na região justaposta à área de perda tecidual (borda da lesão), estabeleceu-se uma distância de aproximadamente $50\mu\text{m}$ distais à mesma para a realização da estimativa proposta. Este procedimento foi necessário, pois, em contrário, a estimativa da densidade astroglial seria pouco precisa e teria uma validade morfométrica questionável.

3.6 Análise da densidade óptica

A intensidade da imunorreatividade foi mensurada, semi-quantitativamente, por meio da análise densitométrica (Ferraz, Xavier et al., 2003; Xavier, Viola et al., 2005; Martinez, Hermel et al., 2006; Saur, Baptista et al., 2013). Para a análise da densidade óptica regional, foram empregadas as mesmas AOIs utilizadas para a estimativa da densidade celular, como descrito no item anterior. Resumidamente, as imagens de interesse foram convertidas em uma escala de cinza (256 tons de cinza / 8-bit), e as referidas AOIs foram sobrepostas em cada imagem para a análise.

Já para a estimativa da densidade óptica celular, dois astrócitos GFAP-positivos, localizados nas AOIs descritas em cada uma das imagens, foram aleatoriamente selecionados, totalizando 12 astrócitos por animal, em cada uma das estruturas de interesse. Em seguida, uma nova área de interesse (AOI) medindo $10,37 \mu\text{m}^2$ foi sobreposta ao soma dos mencionados astrócitos, e, nesta, foi realizada a medida de densidade óptica celular.

Durante o processo de captura das imagens, os níveis de iluminação e a magnificação foram padronizados e mantidos constantes. Durante a realização das análises densitométricas, evitou-se regiões onde as células estivessem sobrepostas à marcação de vasos sanguíneos e de outros artefatos óbvios. A correção para a marcação de fundo (background) foi realizada conforme previamente descrito (Xavier, Viola et al., 2005).

3.7 Análise estatística

Para a análise estatística, inicialmente, foi empregado o teste de Kolmogorov-Smirnov, com o intuito de verificar a normalidade da distribuição dos dados obtidos. Após, a análise de variância (ANOVA), co-variância (ANCOVA) e correlações de Pearson foram utilizadas, conforme será descrito nos capítulos que seguem. Os testes de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls (para dados comportamentais) e Bonferroni (para dados morfológicos) também foram utilizados, quando apropriado. As variáveis foram expressas como média \pm erro padrão da média. Os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$. O software SPSS 16.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Inc., Chicago, USA) foi utilizado para a análise dos dados.

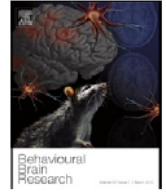
4. Capítulo 1

Artigo: Behavior outcome after ischemic and hemorrhagic stroke, with similar brain damage, in rats. Artigo publicado no *Behavioural Brain Research*.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr

Research report

Behavior outcome after ischemic and hemorrhagic stroke, with similar brain damage, in rats



Régis Gemerasca Mestriner^{a,b,c,d,*}, Patrícia Maidana Miguel^b,
 Pamela Brambilla Bagatini^d, Lisiani Saur^d, Lígia Simões Braga Boisserand^b,
 Pedro Porto Alegre Baptista^d, Léder Leal Xavier^d, Carlos Alexandre Netto^{a,b}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

^c Faculdade de Enfermagem, Nutrição e Fisioterapia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

^d Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

HIGHLIGHTS

- ▶ ET-1 and collagenase could produce comparable ischemic and hemorrhagic injuries.
- ▶ Ischemic and hemorrhagic rats showed similar spontaneous locomotor activity.
- ▶ Ischemic and hemorrhagic rats showed similar forelimb asymmetry profile.
- ▶ Hemorrhagic stroke showed better performance in skilled walking than ischemic form.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 December 2012

Received in revised form 29 January 2013

Accepted 1 February 2013

Available online xxx

Key words:

Stroke

Endothelin-1

Collagenase type VI-S

Recovery

Stereology

Anymaze

ABSTRACT

Stroke causes disability and mortality worldwide and is divided into ischemic and hemorrhagic subtypes. Although clinical trials suggest distinct recovery profiles for ischemic and hemorrhagic events, this is not conclusive due to stroke heterogeneity. The aim of this study was to produce similar brain damage, using experimental models of ischemic (IS) and hemorrhagic (HS) stroke and evaluate the motor spontaneous recovery profile. We used 31 Wistar rats divided into the following groups: Sham ($n=7$), ischemic (IS) ($n=12$) or hemorrhagic (HS) ($n=12$). Brain ischemia or hemorrhage was induced by endothelin-1 (ET-1) and collagenase type IV-S (collagenase) microinjections, respectively. All groups were evaluated in the open field, cylinder and ladder walk behavioral tests at distinct time points as from baseline to 30 days post-surgery (30 PS). Histological and morphometric analyses were used to assess the volume of lost tissue and lesion length. Present results reveal that both forms of experimental stroke had a comparable long-term pattern of damage, since no differences were found in volume of tissue lost or lesion size 30 days after surgery. However, behavioral data showed that hemorrhagic rats were less impaired at skilled walking than ischemic ones at 15 and 30 days post-surgery. We suggest that experimentally comparable stroke design is useful because it reduces heterogeneity and facilitates the assessment of neurobiological differences related to stroke subtypes; and that spontaneous skilled walking recovery differs between experimental ischemic and hemorrhagic insults.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Stroke is an important public health problem and is broadly subdivided into ischemic and hemorrhagic subtypes [1]. Although considerable development has been made in acute stroke care, current data on functional recovery according to stroke subtypes are not conclusive [2]. Clinical observations have shown that the hemorrhagic form presents greater functional impairment than ischemic stroke at hospital admission, but shows greater functional improvement at discharge [3]. On the other hand, ischemic

* Corresponding author at: Faculdade de Enfermagem, Nutrição e Fisioterapia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Prédio 12/8, (andar), Porto Alegre, RS, CEP: 90619-900, Brazil. Tel.: +55 51 33203646.

E-mail addresses: regis.mestriner@pucrs.br, regis.mestriner@gmail.com (R.G. Mestriner).

stroke patients show a longer functional recovery window than those with the hemorrhagic form [4]. Likewise, the hemorrhagic subtype results in greater medical complications and ambulatory impairments [5]. These findings indicate that stroke recovery is a heterogeneous process by nature and many factors may influence the functional outcome [2]. For example, site and size of the stroke damage [6,7], the extent of subsequent recovery [2–4], age [8], gender [9] and rehabilitation [9–11] as well as stroke subtypes [3,4,12] could influence plasticity and recovery [3,4,13,14].

Given its clinical heterogeneity and the differences in stroke physiopathology, animal models of experimental stroke have been developed [15–18]. Although rodent results cannot be directly extrapolated to humans, there are many common characteristics between human stroke and animal stroke models [16,18]; the main advantage of animal models is that they reduce confounding variables and permit deep investigation of the neurobiology of recovery and brain plasticity [10,11,19].

The commonly used rodent stroke models involve intraparenchymal infusion of endothelin-1 (ET-1) [18] and bacterial collagenase [15–17] to produce ischemic and hemorrhagic injury, respectively. ET-1 is a potent vasoconstrictor, which reduces local blood flow to levels that produce ischemic injury when injected into brain tissue [18]. On the other hand, collagenase enzymatic action disrupts the basal lamina of blood vessels and causes blood to leak into the surrounding tissue [16,17]. Although several trials using ET-1 and collagenase stroke models have been conducted, to the best of our knowledge, no previous study has compared the effects of experimental ischemic and hemorrhagic stroke subtypes on functional recovery in rats. This design could be an interesting strategy to test differential effects of pharmacological and non-pharmacological interventions on stroke subtypes, including the patterns of recovery and plasticity. Based on pathophysiological differences and clinical studies, we hypothesized that the recovery profile would differ between experimental ischemic and hemorrhagic stroke models. Thus, the aim of this study was to produce similar brain damage (with a comparable lesion site, volume, extension, age and sex conditions), using etiologically different stroke models, ischemic (IS) and hemorrhagic (HS), in Wistar rats and evaluate the motor behavior at different times of spontaneous recovery.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult male Wistar rats ($n=31$) were obtained from the Central Animal House of the Department of Biochemistry of the *Universidade Federal do Rio Grande do Sul* at approximately 3 months of age (300–350 g). They were housed in groups of 4–5 in Plexiglas cages under standard laboratory conditions - 12/12 h light/dark cycle (light on at 7:00 am) under controlled temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) with free access to food and water. The experimental design and all procedures were approved by the University Ethics Committee (project number 20644) and were in accordance with the Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals adopted by the National Institute of Health (USA) and with the Federation of Brazilian Societies for Experimental Biology. Efforts were made to minimize animal suffering and reduce the number of animals needed.

2.2. Stroke surgery

Prior to stroke surgery animals were randomized and assigned to one of the following groups: sham (S) ($N=7$), ischemic (IS) ($N=12$) or hemorrhagic (HS) ($N=12$) stroke. Rats were anesthetized with 4% halothane in 30% oxygen and 70% nitrous oxide and maintained in a stereotaxic frame with 2% halothane. A midline incision was made in the scalp (between the Bregma and Lambda landmarks) and two burr holes were then drilled in the skull. Using different 26-gauge needles (Hamilton, Reno, NV, USA) the following stereotaxic injections were performed:

- **Ischemic stroke:** 02 microinjections (01 cortical and 01 striatal – see coordinates below) each containing 800 pmol of endothelin-1 (ET-1) (Human and Porcine, Calbiochem), diluted in 2 μl of sterile saline (adapted from Windle and cols.) [18];
- **Hemorrhagic stroke:** 02 microinjections (01 cortical and 01 striatal) each containing 0.2 U of bacterial collagenase type IV-S, diluted in 2 μl of sterile saline (adapted from MacLellan and cols.) [15].

- **Sham:** 02 microinjections (01 cortical and 01 striatal) each containing 2 μl of sterile saline.

The same stereotaxic coordinates were used in all groups to pair the primary site of damage (sensorimotor cortex and striatum), they were: (1) anteroposterior (AP) 0.0 mm, mediolateral (ML) +2.3 mm, and dorsoventral (DV) –2.4 mm for the cortical injection and; (2) AP 0.0 mm, ML +3.6 mm, and DV –6.0 mm for the striatal injection. All stereotaxic measurements were relative to Bregma [20], with depth determined from the skull surface [15,18]. ET-1, collagenase or sterile saline were infused for 5 min and the needle was kept in position for an additional 5 min period. Then it was slowly removed to prevent backflow [10]. Body temperature was maintained between 36.5°C and 37.5°C throughout the surgery using a self-regulating heating blanket (Letica, Spain). A local anesthetic (Lidocaine, 3 M, Brazil) was applied to the wound at the end of surgery and rats were allowed to rest until the scheduled behavioral evaluation [10]. All surgery procedures were performed with disinfected materials in a surgery room. None of the animals presented signs of wound infection. In this study 4 rats died due to surgery/stroke complications (02 animals from each stroke group).

2.3. Behavioral assessment

Stroke produces several neurologic dysfunctions and accordingly, a battery of behavioral tests is required to evaluate post-stroke impairments [11,15,18,21]. When all behavioral tests were scheduled for the same day, the order of assessment was: open field, ladder walk and cylinder. All measurements were performed during the light cycle; the interval between tests was at least 1 hour. The experimental design is shown in Fig. 1.

2.3.1. Open field test

In order to examine possible stroke subtype differences in spontaneous locomotor activity and habituation to novel environment [21,22], rats were exposed to a circular arena (60 cm in diameter \times 45 cm wall height) made of black plywood. The floor was virtually divided by drawn lines, composing 28 quadrants. Animals were individually placed in the center of the apparatus and their behavior was freely recorded for five minutes. Rats were repeatedly assessed at 1, 7, 15 and 30 days after stroke. All measurements were automatically recorded using ANY Maze software (Version 4.70, Stoelting); the following parameters were analyzed: total distance traveled, average speed, time immobile and number of total rotations.

2.3.2. Cylinder test

Forelimb asymmetry was evaluated using the cylinder test [11,15,18,23]. Briefly, animals were placed inside a plexiglas cylinder (20 cm diameter \times 40 cm high) situated on a glass tabletop and recorded from below with an angled mirror. Spontaneous ipsilateral and contralateral forelimb wall contacts were recorded for 5–6 min. Rats that made fewer than 12 independent wall touches were excluded and the asymmetrical forelimb use was estimated as previously described [10,15]. Evaluations were performed only at 7 and 30 days after stroke to increase the animal's interest in exploration.

2.3.3. Ladder walk test

The ladder walk task was used before (baseline), 7, 15 and 30 days after stroke or sham surgeries to concurrently evaluate skilled walking and forelimb and hindlimb function [10,24]. Three days prior to baseline evaluation the rats were trained (4 trials per day) to cross a 1 m long horizontal ladder situated 30 cm above a table with variably spaced rungs (3.0 mm diameter/1–3 cm apart) [24]. During the testing sessions, the rats were filmed crossing the apparatus in 3 trials; the number of forelimb and hindlimb errors was calculated as previously described [10,15,24].

2.4. Histology and stereological analysis

After the last behavioral assessment (30 days after surgery) animals from the S, IS and HS groups were deeply anesthetized with chloride hydrate (30%, 10 mL/kg, i.p.) and injected with 1000 IU heparin (Cristália, Brazil). After that, they were transcardially perfused through the left ventricle, using a peristaltic pump (Control Company, São Paulo, Brazil) with 100 mL of saline solution followed by 200 mL of fixative solution composed of 4% paraformaldehyde (PFA) (Reagen, Rio de Janeiro, Brazil) in 0.1 M phosphate buffer (PB) pH 7.4 at room temperature. Brains were postfixed in PFA at room temperature for 4 h, kept in 30% sucrose in PBS for 3 days and then frozen in isopentane and liquid nitrogen. Coronal sections (50 μm) were obtained using a cryostat (Leica, Germany). Slices were stained with hematoxylin–eosin and the volume of lesion plus atrophy was stereologically estimated using the Cavalieri procedure. All measurements were done using Scion Image J 4.0 (Scion Corporation, Frederick, MD, USA) as previously described [10,18,25]. Briefly, sections were taken every 200 μm , starting at +5.10 mm from Bregma and ending at –5.00 mm to Bregma, and injury volume was calculated by adding the estimated area from each damaged slice and multiplying that value by the distance between the measured slices [18,25]. The lesion length along the fronto-occipital axis was estimated as the number of consecutive sections with detectable lesions multiplied by 50 μm , as previously described [26].

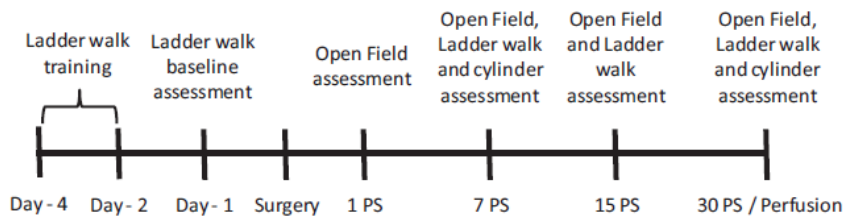


Fig. 1. Experimental design and behavioral testing (relative to surgery) schedule. PS: Days post-surgery.

2.5. Data analysis

All behavioral and morphological procedures were performed by researchers blind to group identity. Data normality distribution was tested using the Kolmogorov–Smirnov test and showed a parametric profile. Behavioral and morphological data were analyzed using repeated measures ANOVA, one-way ANOVA or ANCOVA when appropriate. The Student–Newman–Keuls test was used to determine behavioral differences and the Bonferroni post hoc test was used to evaluate morphological differences between groups when appropriate. Pearson's correlation test also was used to determine if lesion measurements (volume or length) predict functional outcome for behavioral tests at 30 days after surgery. All variables were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Results were considered significant when $P \leq 0.05$. SPSS 16.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Inc., Chicago, USA) was used for data analysis.

3. Results

Ischemic and hemorrhagic stroke animals showed behavior compatible with surgery success; including vigorous contralateral forelimb adduction, as well as spontaneous rotation toward the contralateral hemisphere when held by the tail. All surviving rats were used for behavioral and morphological analysis ($n = 27$).

3.1. Estimation of brain damage induced by IS and HS

Using both, the Cavalieri method and estimated lesion length, the lesions produced in the IS and HS models used in our study were found to produce similar patterns of damage, with similar volumes and lesion lengths. Detailed data are presented below.

3.1.1. Lesion volume

In our study, we found that the ischemic and hemorrhagic experimental stroke subtypes damaged the sensorimotor cortex and dorsolateral striatum. Additional damage was sometimes seen in the globus pallidus and corpus callosum 30 days after surgery. One-way ANOVA showed significant main effects in terms of the lesion volume ($F_{(2,26)} = 26.91$ $P < 0.001$). Bonferroni post hoc tests revealed differences between S and both stroke subtypes (IS and HS) ($P < 0.001$). This finding demonstrated that sham rats were not injured in comparison with both stroke groups. No differences between the stroke subtypes were found ($P = 0.82$) suggesting a comparable lesion volume between stroke groups (Fig. 2).

3.1.2. Lesion Length

There was significant main effects on lesion length ($F_{(2,26)} = 25.84$ $P < 0.001$). Differences between S and both stroke subtypes (IS and HS) were observed ($P < 0.001$). The variability of damage in the fronto-occipital axis (30 PS) was similar in the IS and HS groups ($P = 0.93$) (Fig. 2). Injury (relative to Bregma) approximately ranged from +2.28 mm to +1.56 mm (rostrally) and –0.80 mm to –2.98 mm (caudally) (Fig. 3).

3.2. Spontaneous Locomotor Activity (open field test)

Analysis of the open field data is shown in Fig. 4. The acute effect (first exposition – 1PS) revealed major differences for distance traveled ($F_{(2,26)} = 53.43$ $P < 0.001$), average speed ($F_{(2,26)} = 58.56$

$P < 0.001$) and time immobile ($F_{(2,26)} = 41.64$ $P < 0.001$). Post hoc analysis showed that sham group traveled greater distances ($P < 0.01$), faster ($P < 0.01$) and was less immobile than the stroke groups ($P < 0.05$); differences between stroke animals were not observed. Also, no additional differences were found for total body rotations ($F_{(2,26)} = 3.10$ $P = 0.07$). These findings demonstrate that rats from both stroke groups were, acutely, less active than sham animals.

Additionally, the long-term habituation profile (repeated trials over time) showed distance traveled ($F_{(3,26)} = 24.41$ $P < 0.001$), average speed ($F_{(3,26)} = 18.88$ $P < 0.001$), time immobile ($F_{(3,26)} = 10.65$ $P < 0.001$) and total body rotations ($F_{(3,26)} = 6.61$ $P < 0.001$) effects, which demonstrated that all animals had a similar pattern of habituation over repeated open field trials. Interestingly, “time” \times “group” interaction effects were found for distance traveled ($F_{(6,26)} = 3.61$ $P < 0.03$) and average speed ($F_{(6,26)} = 12.57$ $P < 0.001$), both with no major group effect ($F_{(2,26)} = 1.59$ $P = 0.22$ / $F_{(2,26)} = 1.43$ $P = 0.26$, respectively). Together, these data showed that sham and stroke groups had different recovery profiles over time but when all evaluated endpoints were taken in account no major group differences were found for distance traveled or average speed. No long-term ($F_{(2,26)} = 0.56$ $P = 0.57$) group effects or “time” \times “group” interaction effects ($F_{(6,26)} = 2.02$ $P = 0.10$) were found for total body rotations. These data expand our findings and show that stroke rats were less active than sham animals but moved sufficiently to avoid bias related to very low locomotor behavior.

Finally, no additional effects were found when group comparisons were analyzed in different segments of the open field test (minute to minute, 2 first minutes or 2nd and 3rd minutes analysis); no differences were found between the groups in number of defecations or in the ratio “time in center/time in periphery” (data not shown).

3.3. Cylinder Test

Analysis of cylinder test data revealed significant effects on “time” ($F_{(1,26)} = 9.61$ $P < 0.01$), “group” ($F_{(2,26)} = 77.15$ $P < 0.001$) and “time” \times “group” interaction ($F_{(2,26)} = 3.86$ $P < 0.05$). These findings showed that the recovery process over time was different between the groups. Major group differences were found between S and stroke rats (IS and HS) at 7PS ($P < 0.001$) and 30PS ($P < 0.001$). Analysis revealed that animals from the IS and HS groups presented more forelimb asymmetry resulting from the induced injury. However, no differences were observed between animals submitted to ischemic or hemorrhagic stroke subtypes ($P = 0.40$) (Fig. 5).

3.4. Ladder walk test

Baseline evaluation for all ladder walk analysis (contra and ipsilateral) showed no differences between groups (Fig. 6). Analysis of the contralateral forelimb errors in the ladder walk test revealed “time” ($F_{(3,26)} = 7.34$ $P < 0.01$), “group” ($F_{(2,26)} = 18.90$ $P < 0.001$) and “time” \times “group” interaction ($F_{(6,26)} = 4.32$ $P < 0.01$) effects. The post hoc tests showed that both IS and HS had more falls than the

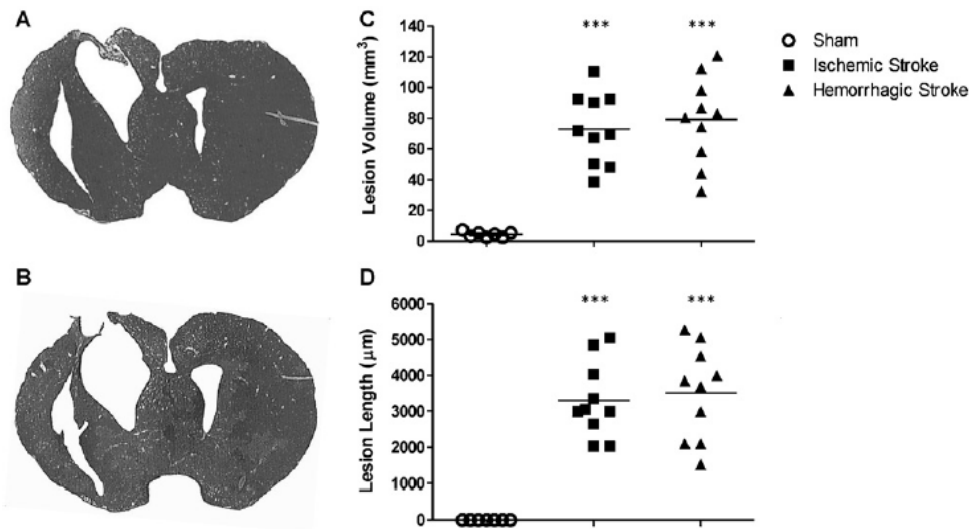


Fig. 2. Representative photomicrographs of ischemic stroke (A) and hemorrhagic stroke (B) of animals at 30 days post-surgery. Graphs of the lesion volume (C) and lesion length along the fronto-occipital axis (D) in the same endpoint. *** Difference between sham and all stroke rats ($P < 0.001$). No lesion volume ($P = 0.82$) or length ($P = 0.93$) differences were found between stroke subtypes.

S group from 07 PS to 15 PS ($P < 0.001$). However, at 30 days, S group was different from IS ($P < 0.001$) but not different from HS ($P = 0.07$). Also, the IS group was more impaired than the HS group at 30 PS ($P < 0.05$). Additionally, contralateral hindlimb performance showed “time” ($F_{(3,26)} = 7.26$ $P < 0.01$), “group” ($F_{(2,26)} = 76.66$ $P < 0.001$) and “time” \times “group” interaction ($F_{(6,26)} = 8.59$ $P < 0.001$) effects. The post hoc tests showed that both stroke groups (IS and HS) had more falls than the S group from 07 PS to 30 PS ($P < 0.001$). The comparison of stroke groups showed that IS rats had more hindlimb falls than HS only at 15 PS ($P < 0.05$). Thereafter, when these falls were analyzed together (contralateral forelimb and hindlimb errors) statistical analysis revealed “time” ($F_{(3,26)} = 17.78$ $P < 0.001$), “group” ($F_{(2,26)} = 45.51$ $P < 0.001$) and “time” \times “group” interaction ($F_{(6,26)} = 22.70$ $P < 0.001$) effects. The post hoc tests also showed that both stroke groups (IS and HS) had more falls than the S group from 07 PS to 30 PS ($P < 0.001$). Interestingly, the IS group was more impaired than the HS group at 15 PS and 30 PS ($P < 0.05$).

Thus, to test if behavioral scores in ladder walk were confounded by lesion volume or lesion length, the analysis of covariance (ANCOVA) was used. This analysis showed that there were no influences of lesion volume or lesion length in the contralateral forelimb ($F_{(1,26)} = 1.14$ $P = 0.29$ / $F_{(1,26)} = 0.44$ $P = 0.51$), hindlimb ($F_{(1,26)} = 0.67$ $P = 0.79$ / $F_{(1,26)} = 0.20$ $P = 0.66$) and combined contralateral forelimb/hindlimb (total errors) performance ($F_{(1,26)} = 0.34$ $P = 0.57$ / $F_{(1,26)} = 0.17$ $P = 0.68$) at 30 days after surgery, respectively. This endpoint (30PS) was selected to best pair morphological and behavioral data. Analyzed together, these findings showed that hemorrhagic rats were less impaired than ischemic animals and exhibits different outcome profile without influence of lesion volume or length. Thus, the etiology of stroke model was probably the cause of outcome differences between IS and HS groups.

For ipsilateral limb, no differences were found for forelimb (“time” $F_{(3,26)} = 1.16$ $P = 0.34$; “group” $F_{(2,26)} = 0.65$ $P = 0.52$ and “time” \times “group” $F_{(6,26)} = 0.42$ $P = 0.86$) effects), hindlimb

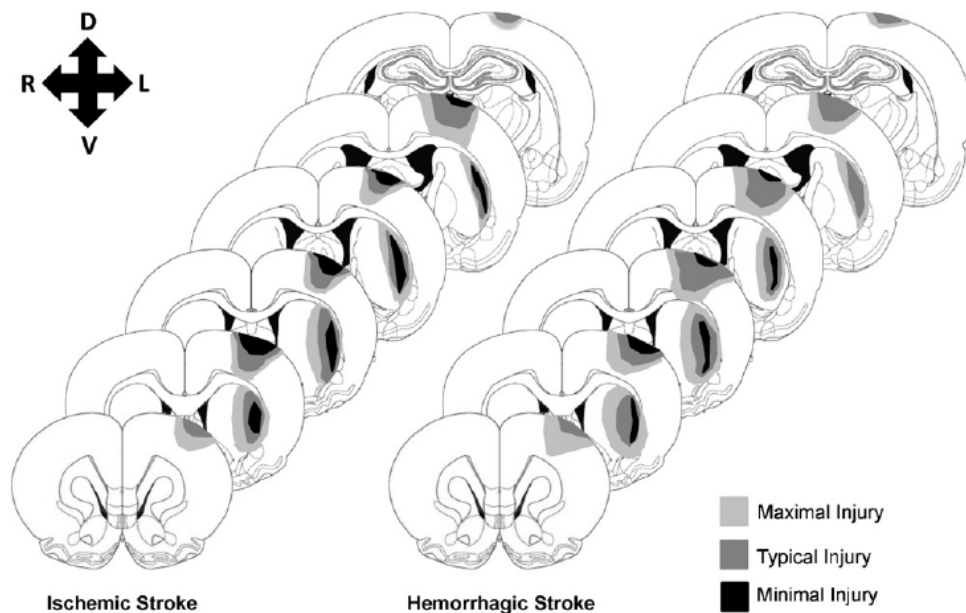


Fig. 3. Representative illustrations of maximal, typical and minimal injury areas for each stroke subtype. All animals were lesioned in the left hemisphere. (D) dorsal; (V) ventral; (R) Right; (L) Left.

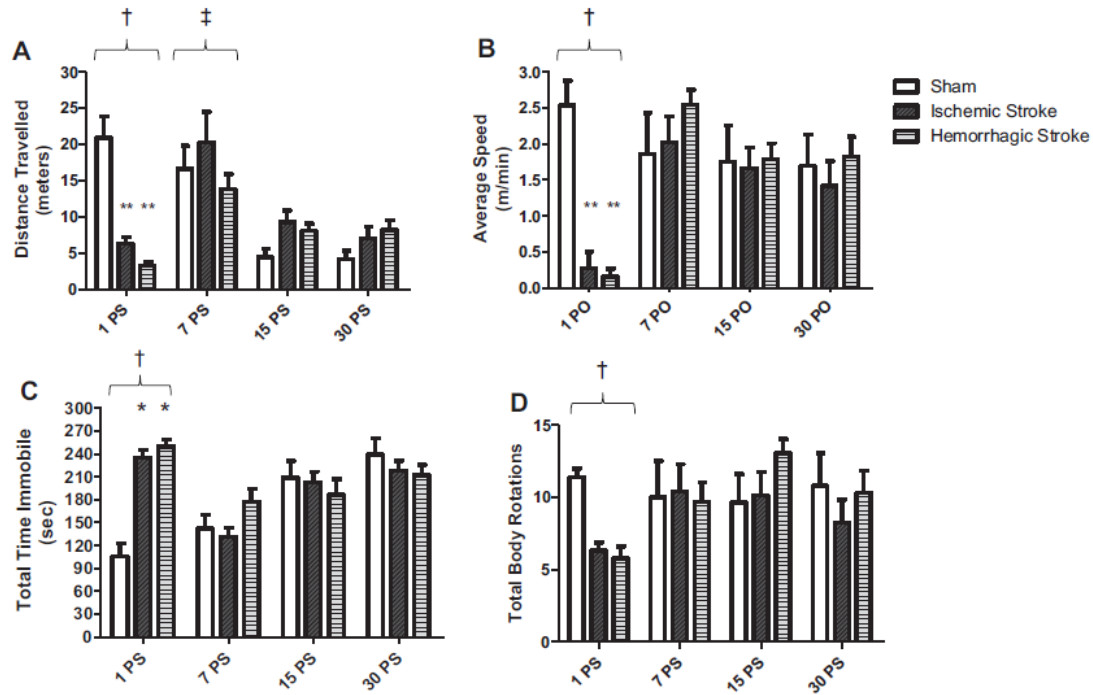


Fig. 4. Locomotor parameters of sham, ischemic and hemorrhagic rats evaluated in the open field test in acute (1 PS) and long-term (7 PS, 15 PS and 30 PS) days after stroke: (A) distance traveled, (B) average speed, (C) total time immobile and (D) total body rotations. * ($P < 0.05$) and ** ($P < 0.01$) Difference between sham and stroke (IS and HS) groups. † Difference between 1 PS and other endpoints (7 PS, 15 PS and 30 PS) ($P < 0.001$). ‡ Difference between 7 PS and other endpoints (1 PS, 15 PS and 30 PS) ($P < 0.01$). Data are shown as mean \pm standard error (SEM). PS: Days post-surgery.

("time" $F_{(3,26)} = 0.74$ $P = 0.53$; "group" $F_{(2,26)} = 3.10$ $P = 0.06$ and "time" \times "group" $F_{(6,26)} = 0.67$ $P = 0.68$ effects) and combined ipsilateral errors ("time" $F_{(3,26)} = 0.49$ $P = 0.69$; "group" $F_{(2,26)} = 2.91$ $P = 0.07$ and "time" \times "group" $F_{(6,26)} = 0.38$ $P = 0.88$ effects). These findings revealed no ipsilateral differences between groups (Fig. 6).

3.5. Behavioral and morphological correlation

Pearson's correlation between lesion volume or lesion length and performance for individual behavioral tests at 30PS (paired endpoint of injury and behavior outcome) revealed that lesion volume and length were correlated with contralateral forelimb ($r = 0.43$ $P < 0.05$ / $r = 0.39$ $P < 0.05$), hindlimb ($r = 0.74$ $P < 0.001$ / $r = 0.72$ $P < 0.001$) and total contralateral errors ($r = 0.69$ $P < 0.001$ / $r = 0.69$ $P < 0.001$), respectively. Furthermore, the cylinder test showed a weak to moderate correlation with lesion volume

Table 1

Relationship (Pearson's correlation) between lesion characteristic (volume or length) and behavioral measurements at 30 days post-surgery (30 PS). Number in parenthesis denotes P -value. Significant correlation * ($P < 0.05$), *** ($P < 0.001$).

Behavioral outcome (30 PS)	Lesion volume (mm ³)	Lesion length (μ m)
Open field		
Total distance traveled	$r = 0.25$ ($P = 0.20$)	$r = 0.26$ ($P = 0.18$)
Average speed	$r = -0.03$ ($P = 0.88$)	$r = -0.03$ ($P = 0.89$)
Time immobile	$r = -0.09$ ($P = 0.64$)	$r = 0.04$ ($P = 0.86$)
Total number of rotations	$r = -0.09$ ($P = 0.64$)	$r = -0.07$ ($P = 0.74$)
Cylinder test		
Forelimb Asymmetry	$r = 0.69$ ($P < 0.05$)*	$r = 0.40$ ($P < 0.05$)*
Ladder walk test		
Contralateral forelimb errors	$r = 0.43$ ($P < 0.05$)*	$r = 0.39$ ($P < 0.05$)*
Contralateral hindlimb errors	$r = 0.74$ ($P < 0.001$)*	$r = 0.72$ ($P < 0.001$)*
Total contralateral errors	$r = 0.69$ ($P < 0.001$)*	$r = 0.69$ ($P < 0.001$)*
Ipsilateral forelimb errors	$r = 0.30$ ($P = 0.12$)	$r = 0.24$ ($P = 0.22$)
Ipsilateral hindlimb errors	$r = 0.11$ ($P = 0.58$)	$r = 0.13$ ($P = 0.53$)
Total ipsilateral errors	$r = 0.22$ ($P = 0.27$)	$r = 0.20$ ($P = 0.32$)

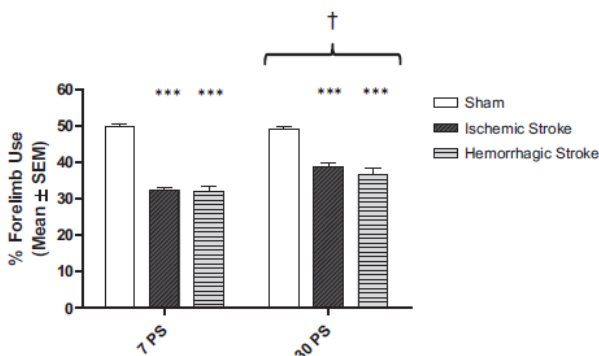


Fig. 5. Performance in the cylinder test. *** Difference between Sham and Stroke groups (IS and HS) ($P < 0.001$). † Time difference between 7 PS and 30 PS ($P < 0.01$). Data are shown as mean \pm standard error (SEM). PS: Days post-surgery.

($r = 0.69$ $P < 0.05$) and length ($r = 0.40$ $P < 0.05$). On the other hand, open field data was not able to predict lesion size (Table 1). These findings suggest that contralateral limb performance in ladder walk test moderately predict lesion volume and length while cylinder test showed weak correlation with lesion size.

4. Discussion

Clinical evidence has suggested that an appropriate comparison between ischemic and hemorrhagic stroke survivors is limited due to recovery heterogeneity [2,4,14]. Several factors, i.e. stroke origin, severity, age and hospital onset-admission are considered confounding variables in clinical trials [2,14]. In this context, animal models could be an interesting approach to reduce stroke heterogeneity and comparatively test experimental recovery

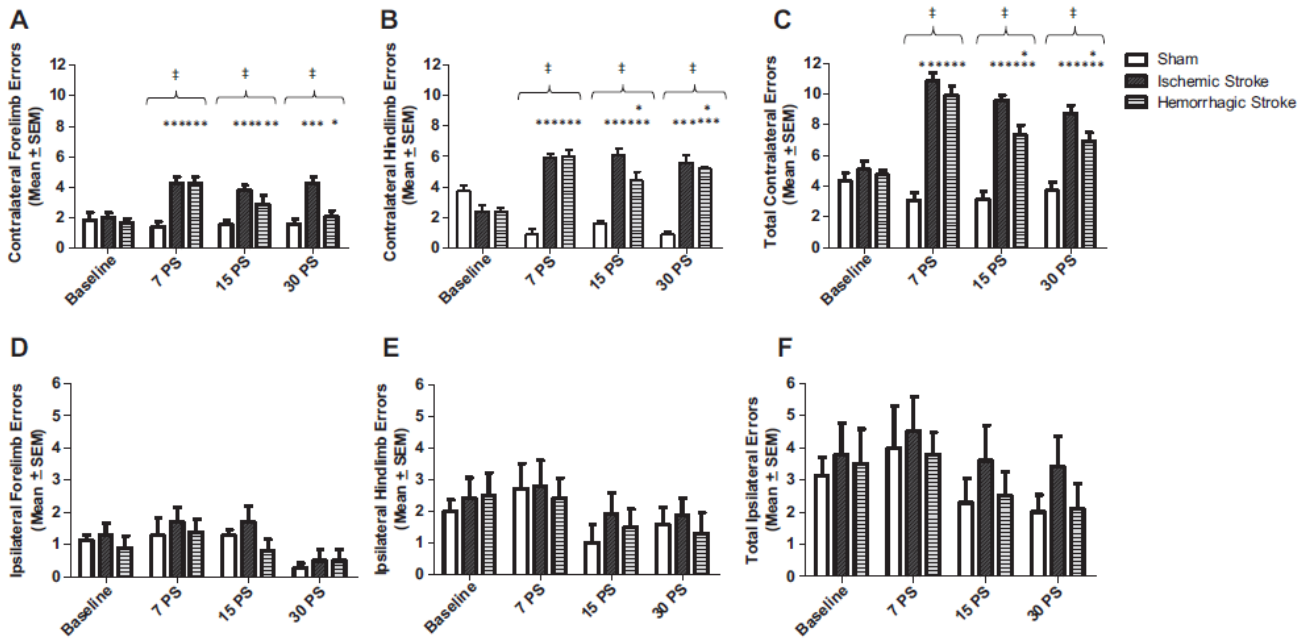


Fig. 6. Performance in the ladder walk test. Contralateral forelimb (A), hindlimb (B) and total contralateral errors (C). Ipsilateral forelimb (D), hindlimb (E) and total ipsilateral errors (F). *Difference between IS and HS groups ($P < 0.05$). ****Difference between Sham and Stroke groups (IS and HS) ($P < 0.001$). †Difference between baseline and other endpoints (7 PS, 15 PS and 30 PS) ($P < 0.05$). Data are shown as mean \pm standard error (SEM). PS: Days post-surgery.

paradigms. Thus, the main objective of the present study was to compare behavior outcome after a comparable ischemic and hemorrhagic stroke conditions.

Because cerebral cortex and striatum are commonly damaged by stroke [10,15,18,27], we designed a combined cortical and striatal injury in order to control site variable and adequately compare both experimental stroke etiologies. The effects of ET-1 and collagenase intraparenchymal infusion on brain damage are well known [10,15,16,18,27,28]. Previous studies have shown that increases in ET-1 concentrations do not necessarily represent significant increases in injury volume [18]. On the other hand, collagenase-induced intracerebral hemorrhage showed a dose-dependent injury [15]. Our ET-1 and collagenase infusions showed no long-term significant differences in volume of tissue lost or lesion extension. To the best of our knowledge, this is the first experimental study that modeled a comparison between ischemic and hemorrhagic injuries without pitfalls related to lesion site and extension. This design may be useful to comparatively evaluate new cytoprotectant strategies as well as deeply investigate the comparative stroke neurobiology.

Because true recovery and compensation effects [11] could not be appropriately separated in this study, we used the term outcome to refer to the sensorimotor performance. The main behavioral finding here is that rats submitted to hemorrhagic injury had less skilled walking errors than those seen in the ischemic group at 15 and 30 days after stroke. It suggests significantly favorable spontaneous walking recovery for hemorrhagic animals. To perform a correct placement of paw and foot in the ladder walk apparatus, the animal has to coordinate a sequence of forelimb and hindlimb movements as well as compensatory trunk adjustments [24,29]. Previous studies have shown the importance of the ladder walk test to assess skilled walking impairments after ischemic [30] and hemorrhagic [15] stroke injuries and identify some effects of different rehabilitation protocols [10,31]. Likewise, this is also the first study that found skilled locomotion differences between comparable ischemic and hemorrhagic stroke-damaged rats. The reasons for these significant behavioral differences are poorly understood and may be related to brain plasticity [16,32]. Some reports have hypothesized that brain

metabolism is more affected by the hypo-perfusion in ischemic stroke [32]. Thus, the recovery of surrounding penumbra and activation of remote brain areas contributes to functional improvement in the ischemic subtype [11,32]. Although previous studies suggest that recovery in hemorrhagic insults [3,4,14] may be related to hematoma resolution and edema reduction [4] as well as dendritic plasticity in peri-hematoma region over time [33] there are no published data directly comparing ischemic vs. hemorrhagic insults on these or other measures of plasticity, which could be matter for further investigation.

As infarct volume is not the only determinant for behavior deficits, as previously shown [34,35], brain tissue plasticity after each stroke subtype, including fine neurovascular remodeling could be involved in functional recovery [36,37].

Additionally, the first open field trial (1PS) showed reduced distance traveled and average speed combined with high elevated time immobile for both stroke rats. These acute findings are in agreement with previous studies and could be related to early post stroke status, which includes refractory loss of interest [38,39] and/or anxiogenic behavior, both evidenced by a decrease in ambulation and in increased immobility [40]. Furthermore, a decline in locomotor activity over the repeated trials schedule was observed for all rats, most likely reflecting an expected and natural habituation [41]. Likewise, long-term locomotion is not affected in either stroke subtypes. Previous studies have reported no long-term differences in locomotion after experimental stroke [42,43]. Our data confirm and expand these findings, revealing that both stroke subtypes have similar acute and long-term patterns of ambulation.

Forelimb asymmetries during cylinder exploration are common after cerebral ischemia [18] or hemorrhage [15] in rats and mice and may reflect body hemineglect [23]. It is known that forelimb asymmetry decreases and spontaneous recovery can be observed if the striatum is mildly injured; also the unilateral damage of cerebral cortex results in long-term complete forelimb recovery if the striatum is not affected, because cerebral cortex is not necessary for recovery of sensory symmetry [23]. Our findings revealed that both stroke groups exhibit a similar degree of forelimb neglect without significant recovery, which demonstrates the success of

our combined cortical and striatal design. Additionally, our data show that stroke subtype had no effect on forelimb sensorial symmetry. Although both pharmacological [44] and rehabilitation [10] interventions sometimes reduce asymmetrical forelimb use, our results revealed that lesion site is preponderant to forelimb symmetry outcome and may not be influenced by stroke etiology.

Skilled reaching tests (e.g. staircase) would have been a great addition to our work. However, the food restriction associated with the methodology of the tests arises as a limitation to our study. Food restriction has been shown to induce angiogenic [45] and neuroprotective [46,47] effects which could, ultimately, influence the plasticity and recovery in different ways to ischemic and hemorrhagic strokes. This could be a matter for further investigation. Finally, our findings demonstrate that ET-1 and collagenase type IV-S infusions could produce comparable ischemic and hemorrhagic stroke injuries. Moreover, spontaneous recovery of skilled walking may be differentially affected by experimental ischemic and hemorrhagic stroke forms, which would contribute to the better recovery seen in the hemorrhagic group.

5. Conclusion

We conclude that ET-1 and collagenase type IV-S stroke models are useful to reduce heterogeneity and compare experimental stroke injuries; hemorrhagic rats showed better performance in the skilled walking test when compared with ischemic animals.

Conflict of interest

All authors state that there is no known or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations that could inappropriately influence, or be perceived to influence, this work.

Acknowledgments

The authors thank Ms. Raquel Matos, Ms. Thamiris Fenalti Delgado and Ms. Cindy Vacchi for their technical assistance. This study was supported by the Brazilians Funding Agencies CNPq, CAPES and FAPERGS. Mestriner was a recipient of a PhD scholarship from CNPq. Léder Leal Xavier and Carlos Alexandre Netto are CNPq investigators.

References

- [1] Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Heart disease and stroke statistics-2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2012;125:e2-220.
- [2] Langhorne P, Bernhardt J, Kwakkel G. Stroke rehabilitation. *Lancet* 2011;377:1693–702.
- [3] Kelly PJ, Furie KL, Shafiqat S, Rallis N, Chang Y, Stein J. Functional recovery following rehabilitation after hemorrhagic and ischemic stroke. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 2003;84:968–72.
- [4] Schepers VP, Ketelaar M, Visser-Meily AJ, de Groot V, Twisk JW, Lindeman E. Functional recovery differs between ischaemic and haemorrhagic stroke patients. *Journal of Rehabilitation Medicine* 2008;40:487–9.
- [5] Lipson DM, Sangha H, Foley NC, Bhogal S, Pohani G, Teasell RW. Recovery from stroke: differences between subtypes. *International Journal of Rehabilitation Research* 2005;28:303–8.
- [6] Kim SY, Jones TA. Lesion size-dependent synaptic and astrocytic responses in cortex contralateral to infarcts in middle-aged rats. *Synapse* 2010;64:659–71.
- [7] Lundgren J, Flodstrom K, Sjogren K, Liljequist B, Fugl-Meyer AR. Site of brain lesion and functional capacity in rehabilitated hemiplegics. *Scandinavian Journal of Rehabilitation Medicine* 1982;14:141–3.
- [8] Knoflach M, Matosevic B, Rucker M, Furtner M, Mair A, Wille G, et al. Functional recovery after ischemic stroke—a matter of age: data from the Austrian stroke unit registry. *Neurology* 2012;78:279–85.
- [9] Roth DL, Haley WE, Clay OJ, Perkins M, Grant JS, Rhodes JD, et al. Race and gender differences in 1-year outcomes for community-dwelling stroke survivors with family caregivers. *Stroke* 2011;42:626–31.
- [10] Mestriner RG, Pagnussat AS, Boisserand LS, Valentim L, Netto CA. Skilled reaching training promotes astroglial changes and facilitated sensorimotor recovery after collagenase-induced intracerebral hemorrhage. *Experimental Neurology* 2011;227:53–61.
- [11] Murphy TH, Corbett D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nature Reviews Neuroscience* 2009;10:861–72.
- [12] Suto Y, Kowa H, Nakayasu H, Awaki E, Saito J, Irizawa Y, et al. Relationship between three-year survival and functional outcome at discharge from acute-care hospitals in each subtype of first-ever ischemic stroke patients. *Internal Medicine* 2011;50:1377–83.
- [13] Gonzalez CL, Kolb B. A comparison of different models of stroke on behaviour and brain morphology. *European Journal of Neuroscience* 2003;18:1950–62.
- [14] Paolucci S, Antonucci G, Grasso MG, Bragoni M, Coiro P, De Angelis D, et al. Functional outcome of ischemic and hemorrhagic stroke patients after inpatient rehabilitation: a matched comparison. *Stroke* 2003;34:2861–5.
- [15] MacLellan CL, Auriat AM, McGie SC, Yan RH, Huynh HD, De Butte MF, et al. Gauging recovery after hemorrhagic stroke in rats: implications for cytoprotection studies. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2006;26:1031–42.
- [16] MacLellan CL, Silasi G, Auriat AM, Colbourne F. Rodent models of intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2010;41:S95–8.
- [17] Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfeld M. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke* 1990;21:801–7.
- [18] Windle V, Szymanska A, Granter-Button S, White C, Buist R, Peeling J, et al. An analysis of four different methods of producing focal cerebral ischemia with endothelin-1 in the rat. *Experimental Neurology* 2006;201:324–34.
- [19] Cechetti F, Pagnussat AS, Worm PV, Elsner VR, Ben J, da Costa MS, et al. Chronic brain hypoperfusion causes early glial activation and neuronal death, and subsequent long-term memory impairment. *Brain Research Bulletin* 2012;87:109–16.
- [20] Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th ed. San Diego: Academic Press; 2004.
- [21] Hartman R, Lekic T, Rojas H, Tang J, Zhang JH. Assessing functional outcomes following intracerebral hemorrhage in rats. *Brain Research* 2009;1280:148–57.
- [22] Dere E, De Souza Silva MA, Topic B, Fiorillo C, Lijs, Sadile AG, et al. Aged endothelial nitric oxide synthase knockout mice exhibit higher mortality concomitant with impaired open-field habituation and alterations in forebrain neurotransmitter levels. *Genes Brain and Behavior* 2002;1:204–13.
- [23] Schallert T. Behavioral tests for preclinical intervention assessment. *NeuroRx* 2006;3:497–504.
- [24] Metz GA, Whishaw IQ. 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. *Journal of Neuroscience Methods* 2002;115:169–79.
- [25] Buchan AM, Xue D, Slivka A. A new model of temporary focal neocortical ischemia in the rat. *Stroke* 1992;23:273–9.
- [26] Marret S, Mukendi R, Gadisseux JF, Gressens P, Evrard P. Effect of ibotenate on brain development: an excitotoxic mouse model of microgyria and posthypoxic-like lesions. *Journal of Neuro pathology and Experimental Neurology* 1995;54:358–70.
- [27] Biernaskie J, Szymanska A, Windle V, Corbett D. Bi-hemispheric contribution to functional motor recovery of the affected forelimb following focal ischemic brain injury in rats. *European Journal of Neuroscience* 2005;21:989–99.
- [28] Alles YC, Greggio S, Alles RM, Azevedo PN, Xavier LL, DaCosta JC. A novel preclinical rodent model of collagenase-induced germinal matrix/intraventricular hemorrhage. *Brain Research* 2010;1356:130–8.
- [29] Metz GA, Whishaw IQ. The ladder rung walking task: a scoring system and its practical application. *Journal of Visualized Experiments* 2009.
- [30] Faraji J, Kurio K, Metz GA. Concurrent silent strokes impair motor function by limiting behavioral compensation. *Experimental Neurology* 2012;236:241–8.
- [31] Beltran EJ, Papadopoulos CM, Tsai SY, Kartje GL, Wolf WA. Long-term motor improvement after stroke is enhanced by short-term treatment with the alpha-2 antagonist, atipamezole. *Brain Research* 2010;1346:174–82.
- [32] Orakcioglu B, Fiebich JB, Steiner T, Kollmar R, Juttler E, Becker K, et al. Evolution of early perihemorrhagic changes-ischemia vs. edema: an MRI study in rats. *Experimental Neurology* 2005;193:369–76.
- [33] Auriat AM, Wowk S, Colbourne F. Rehabilitation after intracerebral hemorrhage in rats improves recovery with enhanced dendritic complexity but no effect on cell proliferation. *Behavioural Brain Research* 2010;214:42–7.
- [34] Hunter AJ, Mackay KB, Rogers DC. To what extent have functional studies of ischaemia in animals been useful in the assessment of potential neuroprotective agents. *Trends in Pharmacological Sciences* 1998;19:59–66.
- [35] van der Staay FJ, Augstein KH, Horvath E. Sensorimotor impairments in Wistar Kyoto rats with cerebral infarction, induced by unilateral occlusion of the middle cerebral artery: recovery of function. *Brain Research* 1996;715:180–8.
- [36] Arai K, Lok J, Guo S, Hayakawa K, Xing C, Lo EH. Cellular mechanisms of neurovascular damage and repair after stroke. *Journal of Child Neurology* 2011;26:1193–8.
- [37] Lo EH. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nature Medicine* 2008;14:497–500.
- [38] Turner RJ, Vink R. Combined tissue plasminogen activator and an NK1 tachykinin receptor antagonist: an effective treatment for reperfusion injury following acute ischemic stroke in rats. *Neuroscience* 2012;220:1–10.
- [39] Wang SH, Zhang ZJ, Guo YJ, Zhou H, Teng GJ, Chen BA. Anhedonia and activity deficits in rats: impact of post-stroke depression. *Journal of Psychopharmacology* 2009;23:295–304.
- [40] Babu CS, Ramanathan M. Post-ischemic administration of nimodipine following focal cerebral ischemic-reperfusion injury in rats alleviated excitotoxicity,

- neurobehavioural alterations and partially the bioenergetics. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2010;29:93–105.
- [41] Paylor R, Spencer CM, Yuva-Paylor LA, Pieke-Dahl S. The use of behavioral test batteries, II: effect of test interval. *Physiology and Behavior* 2006;87:95–102.
- [42] MacLellan CL, Langdon KD, Churchill KP, Granter-Button S, Corbett D. Assessing cognitive function after intracerebral hemorrhage in rats. *Behavioural Brain Research* 2009;198:321–8.
- [43] Wahl F, Allix M, Plotkine M, Boulu RG. Neurological and behavioral outcomes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1992;23:267–72.
- [44] Svalbe B, Zvejniece L, Vavers E, Pugovics O, Muceniece R, Liepinsh E, et al. Mildronate treatment improves functional recovery following middle cerebral artery occlusion in rats. *Behavioural Brain Research* 2011;222:26–32.
- [45] Smith LK, Metz GA. Dietary restriction alters fine motor function in rats. *Physiology and Behavior* 2005;85:581–92.
- [46] Manzanero S, Gelderblom M, Magnus T, Arumugam TV. Calorie restriction and stroke. *Experimental & Translational Stroke Medicine* 2011;12:3–8.
- [47] Plunet WT, Streijger F, Lam CK, Lee JH, Liu J, Tetzlaff W. Dietary restriction started after spinal cord injury improves functional recovery. *Experimental Neurology* 2008;213:28–35.

5. Capítulo 2

Artigo: GFAP immunoreactivity after ischemic and hemorrhagic stroke in rats: a comparative analysis. Artigo submetido ao *Brain Structure and Function*.

Brain Structure and Function
GFAP immunoreactivity after ischemic and hemorrhagic stroke in rats: a comparative analysis
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	GFAP immunoreactivity after ischemic and hemorrhagic stroke in rats: a comparative analysis
Article Type:	Original Article
Keywords:	Ischemic stroke; hemorrhagic stroke; glial fibrillary acidic protein; astrocytes; reactive astrogliosis
Corresponding Author:	Régis Gerasca Mestriner, MSc Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul Porto Alegre, Rio Grande do Sul BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Régis Gerasca Mestriner, MSc
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Régis Gerasca Mestriner, MSc Lisiani Saur, MSc Pamela Brambilla Bagatini, MSc Pedro Porto Alegre Baptista, MSc Sabrina Pereira Vaz, Undergraduate Kelly Ferreira, Undergraduate Patrícia Maidana Miguel, MSc Léder Leal Xavier, PhD Carlos Alexandre Netto, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Stroke is a serious health-care problem worldwide, broadly subdivided into ischemic and hemorrhagic subtypes. Independently of injury etiology, reactive astrogliosis is a hallmark of all CNS injuries. However, it is uncertain if intermediate filaments, such as glial fibrillary acidic protein (GFAP), could be modulated by these different stroke subtypes. The aim of this study was to compare long-term GFAP immunoreactivity using comparable models of ischemic (IS) and hemorrhagic (HS) stroke, in terms of lesion volume and length. We used coronal sections from 15 brains of Wistar rats divided into the following groups: Sham (n=5), ischemic (IS) (n=5) or hemorrhagic (HS) (n=5). Brain ischemia or hemorrhage was induced by endothelin-1 (ET-1) and collagenase type IV-S (collagenase) microinjections, respectively. Astrocytic density and optical densitometry (regional and cellular) were evaluated in perilesional sensorimotor cortex and striatum at 30 days post-surgery. Our results revealed that both forms of experimental stroke had a comparable long-term pattern of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity for analyzed structures, including astrocytic density, cellular and regional optical density. We suggest that experimentally comparable stroke approach may be useful to reduce heterogeneity and facilitate the assessment of neurobiological differences related to stroke subtypes; and that stroke subtypes showed similar long-term GFAP immunoreactivity.

Powered by Editorial Manager® and Preprint Manager® from Aries Systems Corporation

De: em.bsf.0.318a66.bda09203@editorialmanager.com em nome de Brain Structure & Function (BSF) <arjya.vasudevan@springer.com>
 Para: Regis Gerasca Mestriner
 Cc:

Enviada em: ter 5/3/2013 03:05

Assunto: A manuscript number has been assigned to GFAP immunoreactivity after ischemic and hemorrhagic stroke in rats: a comparative analysis

Dear Mr. Mestriner,

Your submission entitled "GFAP immunoreactivity after ischemic and hemorrhagic stroke in rats: a comparative analysis" has been assigned the following manuscript number: BSF-D-13-00078.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.
 The URL is <http://bsf.edmgr.com/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Ramya Vasudevan
 JEO Assistant
 Brain Structure and Function

GFAP immunoreactivity after ischemic and hemorrhagic stroke in rats: a comparative analysis

Régis Gemerasca Mestriner^{a,b,c,d*}, Lisiani Saur^d, Pamela Brambilla Bagatini^d, Pedro Porto Alegre Baptista^d, Sabrina Pereira Vaz^{c,d}, Kelly Ferreira^{c,d}, Patrícia Maidana Miguel^b, Léder Leal Xavier^d, Carlos Alexandre Netto^{a,b}

Authors

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brasil.

^bDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brasil.

^cFaculdade de Enfermagem, Nutrição e Fisioterapia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brasil.

^dLaboratório de Biologia Celular e Tecidual, Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brasil

*CORRESPONDING AUTHOR

Régis Gemerasca Mestriner, MSc.

Faculdade de Enfermagem, Nutrição e Fisioterapia
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Avenida Ipiranga, 6681
Prédio 12 / 8.º andar
Porto Alegre, RS, Brazil
CEP: 90619-900
e-mail: regis.mestriner@pucrs.br
Phone: (55) (51) 33203646

Abstract

Stroke is a serious health-care problem worldwide, broadly subdivided into ischemic and hemorrhagic subtypes. Independently of injury etiology, reactive astrogliosis is a hallmark of all CNS injuries. However, it is uncertain if intermediate filaments, such as glial fibrillary acidic protein (GFAP), could be modulated by these different stroke subtypes. The aim of this study was to compare long-term GFAP immunoreactivity using comparable models of ischemic (IS) and hemorrhagic (HS) stroke, in terms of lesion volume and length. We used coronal sections from 15 brains of Wistar rats divided into the following groups: Sham (n=5), ischemic (IS) (n=5) or hemorrhagic (HS) (n=5). Brain ischemia or hemorrhage was induced by endothelin-1 (ET-1) and collagenase type IV-S (collagenase) microinjections, respectively. Astrocytic density and optical densitometry (regional and cellular) were evaluated in perilesional sensorimotor cortex and striatum at 30 days post-surgery. Our results revealed that both forms of experimental stroke had a comparable long-term pattern of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity for analyzed structures, including astrocytic density, cellular and regional optical density. We suggest that experimentally comparable stroke approach may be useful to reduce heterogeneity and facilitate the assessment of neurobiological differences related to stroke subtypes; and that stroke subtypes showed similar long-term GFAP immunoreactivity.

Keywords: Ischemic stroke; hemorrhagic stroke, glial fibrillary acidic protein, astrocytes, reactive astrogliosis.

1. Introduction

Stroke is a serious health-care problem worldwide, commonly subdivided into ischemic and hemorrhagic subtypes (Roger, Go *et al.*, 2012). Nowadays, patients have a better chance of survival in the acute stroke phase. However, the greatest detrimental health impact is usually caused by the long-term disability (Langhorne, Bernhardt *et al.*, 2011). Clinical trials have shown that the hemorrhagic subtype presents better functional improvement when compared with ischemic form at the hospital discharge (Kelly, Furie *et al.*, 2003). Nevertheless, ischemic stroke patients show a longer functional recovery window than those with the hemorrhagic subtype (Schepers, V. P., Ketelaar, M. *et al.*, 2008). Despite researches efforts, these differences are not completely proven due to studies limitations and stroke heterogeneity (Langhorne, Bernhardt *et al.*, 2011).

Animal models are widely used to identify mechanisms of injury and to evaluate treatments (Maclellan, Silasi *et al.*, 2010). Although rodent results cannot be directly extrapolated to humans, there are many common characteristics between human stroke and animal stroke models (Windle, Szymanska *et al.*, 2006; Maclellan, Silasi *et al.*, 2010). The main advantage of animal models is that they reduce confounding variables and permit thorough investigation of the neurobiology of recovery and brain plasticity (Murphy e Corbett, 2009; Mestriner, R. G., Pagnussat, A. S. *et al.*, 2011; Cechetti, Pagnussat *et al.*, 2012).

We have recently published a study comparing experimental stroke insults induced by endothelin-1 (ET-1) of ischemic and collagenase type IV-S for hemorrhagic subtypes (Mestriner *et al.* 2013). In this study we found that sensorimotor cortex and dorsolateral striatum combined damages present similar lesion volume and length at 30 days post-stroke. This experimental approach can be an interesting method to reduce stroke heterogeneity and facilitate future comparative stroke research.

Some astrocytes react promptly to insults to the central nervous system (CNS) building up to a reactive astrogliosis - a remarkable astrocytes reaction after all types of CNS injury (Sofroniew, 2009; Zhang, Hu *et al.*, 2010; Middeldorp e Hol, 2011). The hallmark of this reaction is an expressive upregulation of intermediate filaments, such as glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Middeldorp e Hol, 2011). Reactive astrocytes might either reduce or exacerbate the damage to neurons depending on the timepoint or post-injury stage (Swanson, Ying *et al.*, 2004) as well as injury severity (Sofroniew, 2009; Sofroniew e Vinters, 2010). However, it is unclear if these two types of stroke also have comparable reactive astrogliosis in addition to the similarities between lesion volume and length in our comparative stroke subtypes approach.

Thus, the aim of this study was verify if endothelin-1 (ET-1) and collagenase type IV-S stroke models are also comparable in terms of long-term glial fibrillary acidic protein immunoreactivity.

2. Materials and methods

2.1 Animals

Brain slices from 15 male *Wistar* rats were used. These animals were randomly selected from the same samples of our recently published study (Mestriner et al., 2013). This was an effort to reduce the number of animals needed in basic science research. The rats were obtained from the Department of Biochemistry of the *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, aged approximately 3 months and weighing about 300–350 g. They were housed in groups of 4–5 in Plexiglas cages under standard laboratory conditions - 12/12h light/dark cycle (light on at 7:00 am) under controlled temperature (22 ± 2 °C) with food and water *ad libitum*. The slices were obtained from three groups: 1-Sham ($N= 5$ brains), 2-Ischemic stroke ($N= 5$ brains) and 3-Hemorrhagic stroke ($N= 5$ brains). The experimental design and all procedures were approved by the University Ethics Committee (project number 20644) and were in accordance with the Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals adopted by the National Institute of Health (USA) and with the Federation of Brazilian Societies for Experimental Biology.

2.2 Stroke surgery

Prior to stroke surgery animals were randomized and assigned to one of the following groups: sham (S), ischemic (IS) or hemorrhagic (HS) stroke. Rats were anesthetized with 4% halothane in 30% oxygen and 70% nitrous oxide and maintained in a stereotaxic frame with 2% halothane. A midline incision was made to the scalp (between the Bregma and Lambda landmarks) and two burr holes were drilled in the skull. Using different 26-gauge needles (Hamilton, Reno, NV, USA) the following stereotaxic injections were performed:

- Ischemic stroke: 02 microinjections (01 cortical and 01 striatal – see coordinates below) each containing 800 pmol of endothelin-1 (ET-1) (Human and Porcine, Calbiochem), diluted in 2µl of sterile saline (adapted from Windle and cols.) (Windle, Szymanska *et al.*, 2006);
- Hemorrhagic stroke: 02 microinjections (01 cortical and 01 striatal) each containing 0.2 U of bacterial collagenase type IV-S, diluted in 2µl of sterile saline (adapted from MacLellan and cols.) (MacLellan, Auriat *et al.*, 2006a).
- Sham: 02 microinjections (01 cortical and 01 striatal) each containing 2µl of sterile saline.

The same stereotaxic coordinates were used in all groups to pair the primary site of damage (sensorimotor cortex and striatum), they were: (1) anteroposterior (AP) 0.0mm, mediolateral (ML) +2.3 mm, and dorsoventral (DV) -2.4 mm for the cortical injection and; (2) AP 0.0mm, ML +3.6 mm, and DV -6.0 mm for the striatal injection. All stereotaxic measurements were relative to Bregma (Paxinos e Watson), with depth determined from the skull surface (Maclellan, Auriat *et al.*, 2006a; Windle, Szymanska *et al.*, 2006). ET-1, collagenase or sterile saline were infused for 5 min and the needle was kept in position for an additional 5 min period, then, it was slowly removed to prevent backflow (Mestriner, R. G., Pagnussat, A. S. *et al.*, 2011). Body temperature was maintained between 36.5 °C and 37.5 °C throughout the surgery using a self-regulating heating blanket (Letica, Spain). A local anesthetic (Lidocaine, 3M, Brazil) was applied to the wound at the end of surgery. None of the animals presented signs of wound infection.

2.3 GFAP immunohistochemistry

For immunohistochemical analysis of the reactive astroglial marker GFAP, rats were intraperitoneally anesthetized with chloride hydrate (30%, 10 mL/kg, i.p.) and injected with 1000 IU heparin (Cristália, Brazil) 30 days after surgery. The animals were transcardially perfused using a peristaltic pump (Control Company, São Paulo, Brazil) through the left ventricle with 100 mL of saline solution followed by 200 mL of fixative solution composed of 4% paraformaldehyde (PFA) (Reagen, Rio de Janeiro, Brazil) in 0.1 M phosphate buffer (PB) pH 7.4 at room temperature. Brains were postfixed in PFA at room temperature for 4 h, kept in 30% sucrose in PBS for 3 days and then frozen in isopentane and liquid nitrogen. The brains were kept in a freezer (-80°C) until histological assessment. Coronal brain sections (50µm) were obtained using a cryostat (Leica, Germany), and one in every five sections was collected for lesion size analysis (hematoxylin–eosin dye). Slices from these section intervals were collected to GFAP immunohistochemistry. They approximately ranged (relative to Bregma) from + 1.80 mm (rostrally) to – 0.70 mm (caudally). Briefly, brain sections were post-fixed in 4% PF for 15 min. After three washes in cold phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4), GFAP immunohistochemistry was performed as previously described (Saur, Baptista *et al.*, 2013). Sections were blocked for endogenous peroxidases (3% hydrogen peroxide in PBS) for 30 min, washed in PBS containing 0.4 % Triton X-100 (PBS-Tx) and blocked with 2% bovine serum albumin (BSA) in PBS-Tx for 30 min. Sections were then incubated with anti-GFAP polyclonal antibody raised in rabbit (Z033401-2 - Dako), diluted 1:500 in PBS-Tx for 48h at 4°C. After two washes in PBS-Tx, the sections were incubated in peroxidase-

conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (A0545 - Sigma-Aldrich), diluted 1:200 in PBS-Tx at room temperature for 2h.

Sections were then washed two times in PBS, and the GFAP immunostaining was performed by incubating the sections in a medium containing 0.06% 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich) dissolved in PBS for 10 min, and in the same solution containing 1 μ L of 3 % H₂O₂ per mL of DAB medium for an additional 10 min. After the DAB + H₂O₂ revelation, the sections were rinsed in PBS, dehydrated in series of increasing ethanol concentrations (70, 90 and 100%), cleared with xylene and covered with Entellan (Merck) and coverslips. As a control to rule out unspecific binding, in a few sections the primary antibody was omitted and replaced by PBS-Tx. In order to minimize differences in the staining of astrocytes and in background levels, the brains in all experimental groups were fixed, cryoprotected and post-fixed in identical solutions for the same length of time, processed at the same time and incubated in the same immunostaining medium for the same period of time.

2.4 Astrocytic density estimation

The number of GFAP-immunoreactive astrocytes per mm² in the surrounding damaged tissue was estimated using an Olympus BX 50 microscope coupled to a Motic Images Plus 2.0 camera and Image Pro Plus (Image Pro-Plus 6.1, Media Cybernetics, Silver Spring, EUA) software. Our interested regions were sensorimotor cortex and dorsolateral striatum. For this analysis, four digitized images (20X) from surrounding injured tissue (two for each cortex and striatum) were obtained from each section (Fig. 1). Altogether, three sections from each animal were analyzed. Giving a total of 12 images analyzed per animal (six from cortex and six from striatum). Two randomized squares measuring 5,828 μ m² and named areas of interest (AOIs) were overlaid on each image (Fig 1.). The astrocytes located inside this square or intersected by the upper and/or right edges of the square were counted. Astrocytes intersected by the lower and/or left edges of the square were not counted (Viola, Rodrigues *et al.*, 2009; Saur, Baptista *et al.*, 2013).

To avoid errors related to complex overlapping of astrocytes bodies and process, blood vessels and artifacts in an immediately surrounding tissue to lesion, we established an area of analysis beginning at approximately 50 μ m laterally to lesion border for all morphological analysis (Fig. 1).

2.5 GFAP immunoreactivity assessment

The intensity of GFAP immunoreactivity was measured using semi-quantitative densitometric analysis (Ferraz, Xavier *et al.*, 2003; Xavier, Viola *et al.*, 2005; Martinez, Hermel *et al.*, 2006;

Saur, Baptista *et al.*, 2013) with the same software employed to estimate the astrocytic density. The same images and AOIs ($5,828 \mu\text{m}^2$) used to estimate astrocytic density were used in the analysis of regional optical density (OD). The images were converted to an 8-bit gray scale (256 gray levels) and the AOIs were overlaid on each image.

For the analysis of cellular OD, two astrocytes GFAP-positive located inside the first AOI ($5,828 \mu\text{m}^2$) were randomly selected to cellular OD assessment. Thus, a new AOI measuring $10.37 \mu\text{m}^2$ was placed over analyzed astrocytic soma in each image (processes were not measured) (Fig 1). A number of 12 astrocytes per structure of interest were analyzed by animal. All lighting conditions and magnifications were kept constant during the process of capturing the images. Blood vessels and other artifacts were avoided and the background correction was performed according to the formula previously described (Xavier, Viola *et al.*, 2005).

2.6 Data analysis

All morphological data were obtained and analyzed by researchers blind to group identity (images capture and measurements). Data normality distribution was tested using the Kolmogorov–Smirnov test and showed a parametric profile. Data was analyzed using one-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test, when appropriate. All variables were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Results were considered significant when $P\leq 0.05$. SPSS 16.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Inc., Chicago, USA) was used for data analysis.

3 Results

In our study, GFAP-positive astrocytes surrounding damaged sensorimotor cortex and dorsolateral striatum (approximately from $50\mu\text{m}$ to $210\mu\text{m}$ laterally to border of tissue lost) were analyzed. In a descriptive analysis, it was possible to observe individual astrocyte's soma and proximal processes for all groups. As expected, a highly complex network of GFAP-positive cells was observed in the tissue adjacent to the core of damage for both stroke groups. This intricate network was less complex slightly distal to lesion border. Then, individual astrocyte morphology was distinguishable (Fig. 2). In order to confirm our qualitative morphological findings, quantitative and semi-quantitative evaluations were performed, respectively, involving an estimation of astrocytic density and measurements of regional and cellular optical density.

3.1 Astrocytic density

Analysis of astrocytic density revealed significant main effects for sensorimotor cortex ($F_{(2,14)}= 9.18 P<0.01$), dorsolateral striatum ($F_{(2,14)}= 6.95 P\leq 0.01$) and combined (cortex and striatum) analysis ($F_{(2,14)}= 8.42 P\leq 0.01$). Major group differences were found between S and stroke rats (IS and HS) in the sensorimotor cortex ($P\leq 0.01$), dorsolateral striatum ($P\leq 0.05$ for IS and $P\leq 0.01$ for HS) and combined structures ($P\leq 0.01$). No differences were found between IS and HS groups in any analysis ($P=1.0$). These findings showed that stroke induced an increased density of GFAP-positive astrocytes, as expected; both stroke subtypes have similar astrocytic density (Fig. 3).

3.2 Regional and cellular optical density

One-way ANOVA showed significant main effects in terms of the regional and cellular optical density for sensorimotor cortex ($F_{(2,14)}= 46.46 P\leq 0.001$ / $F_{(2,14)}= 29.69 P\leq 0.001$), dorsolateral striatum ($F_{(2,14)}= 27.86 P\leq 0.001$ / $F_{(2,14)}= 24.64 P\leq 0.001$) and combined (cortex and striatum) analysis ($F_{(2,14)}= 29.30 P\leq 0.001$ / $F_{(2,14)}= 55.59 P\leq 0.001$), respectively. Bonferroni post hoc tests revealed significant differences between S and both stroke subtypes (IS and HS) ($P\leq 0.001$) for all analysis. No differences between the stroke subtypes were found for sensorimotor cortex (OD regional $P=0.51$ / OD cellular $P=0.15$); dorsolateral striatum (OD regional $P=1.0$ / OD cellular $P=0.58$) and these combined structures (OD regional $P=0.78$ / OD cellular $P=1.0$) suggesting that both stroke subtypes were comparable in terms of GFAP immunoreactivity (Fig. 4).

4 Discussion

Rodent stroke models are largely used to provide *in vivo* mechanisms of neuroprotection and neural repair after stroke. However, it is well known that rodent results cannot be directly extrapolated to clinical practice because there was no available model that perfectly mimics the complexity and heterogeneity of stroke in humans (Carmichael, 2005; Murphy e Corbett, 2009; Maclellan, Silasi *et al.*, 2010; Sozmen, Hinman *et al.*, 2012). Thence, several preclinical models should be properly designed and compared to better understand plasticity mechanisms and to predict clinical efficacy (Murphy e Corbett, 2009; Maclellan, Silasi *et al.*, 2010). In this context, we have recently described a study design that compares ischemic and hemorrhagic stroke injuries using the traditional stereotaxic microinjections of endothelin-1 and collagenase type IV-S in rats (Mestriner *et al.*, 2013). This design may be useful to test

the effects of pharmacological and non-pharmacological interventions on the recovery and the brain plasticity in a comparative approach to stroke subtypes.

Although our previous study has shown that the lesion volume and length induced by ET-1 and collagenase type IV-S injections present similar results in a long-term outcome (Mestriner *et al.*, 2013), the main objective of this study is to investigate the long-term reactive astrogliosis profile, evidenced by GFAP immunoreactivity, between these stroke models. Our present results showed an increased GFAP-positive astrocytic density in perilesional sensorimotor cortex and dorsolateral striatum for both ischemic and hemorrhagic stroke forms. This finding corroborates with a previous study that has shown an increase of the density of GFAP-positive cells in surrounding tissue after striatal ET-1 injection for long-term period (Sozmen, Kolekar *et al.*, 2009; Sozmen, Hinman *et al.*, 2012). In contrast, injections of ET-1 to the white matter only change the hypertrophy of GFAP-positive processes without changes in the astrocytic density (Sozmen, Hinman *et al.*, 2012). Our results showed that a combined cortical and striatal injections of ET-1 and collagenase type IV-S may induce similar increases in astrocytic density. Additionally, no stroke subtype differences were found for perilesional GFAP immunoreactivity, including regional and cellular optical density. There is an overwhelming amount of work showing that essentially any CNS injury increases astrocyte expression of intermediate filaments, such as GFAP (Pekny e Pekna, 2004; Theodosis, Poulain *et al.*, 2008). However, few studies evaluate reactive astrogliosis after different stroke models or subtypes in a comparative approach. Thus, to the best of our knowledge, this is the first study that directly compares GFAP immunoreactivity after ischemic and hemorrhagic stroke models with comparable injury characteristics, such as volume, length and primary site. This finding is interesting because the lesion size and reactive astrogliosis are not necessarily correlated events. For instance, a previous study has shown that attenuation of reactive gliosis does not affect infarct volume in neonatal hypoxic-ischemic brain injury in mice (Jarlestedt, Rousset *et al.*, 2010). Reactive astrogliosis after stroke is complex and not completely understood. Astrocytes may contribute to damage by their role in spreading depression waves (Martins-Ferreira, Nedergaard *et al.*, 2000) or by sending apoptotic messengers or other deleterious molecules to otherwise healthy regions via gap junction channels (Lin, Weigel *et al.*, 1998; Anderson, Blomstrand *et al.*, 2003). Furthermore, they also inhibit regeneration by participating in the formation of the glial scar (Hamby e Sofroniew, 2010; Moore, Abdullah *et al.*, 2011; Kawano, Kimura-Kuroda *et al.*, 2012). On the other hand, the production of neuroprotective growth factors by astrocytes could strengthen cell proliferation, neurogenesis and neurovascular remodeling (Yoneyama, Shiba *et al.*, 2011; Lafuente, Ortuzar *et al.*, 2012).

In our study we use GFAP as astrocytic marker based on the fact that other markers present same disadvantages when compared to GFAP. For instance, antibodies for glutamine synthetase and S100 β were found to clearly stain the nuclei of astrocytes, the cytoplasm and the processes were only poorly stained (Wu, Zhang *et al.*, 2005). It has also been noted that with S100 β immunohistochemistry the astrocytic processes appear to be shorter when compared to GFAP immunostained astrocytes (Bjorklund, Dahl *et al.*, 1983). Additionally, glutamine synthetase is also detectable in oligodendrocytes (Tansey, Farooq *et al.*, 1991), and vimentin, another possible marker, is better used when identifying regions of permanent stroke injury during the early post-ischemic period (Petito, Morgello *et al.*, 1990). Other markers from glutamate transporters family (GLAST and GLT) are not good tracers for morphological analyses, because they usually produce unclear images (Coleman, Judd *et al.*, 2004; Zhang, Li *et al.*, 2011). Furthermore, it has been described that the number of astrocytes, assessed by both glutamine synthetase and S100 β immunoreactivity in the penumbra following ischemic stroke does not increase over time in comparison with GFAP expression (Petito, Morgello *et al.*, 1990). Thus, GFAP immunolabeling is still generally considered a reliable mean of identifying astrocytes in healthy and damaged neural tissue (Theodosis, Poulain *et al.*, 2008; Middeldorp e Hol, 2011).

Although stroke differs in subtypes, in the timing of pathophysiological processes, and in functional recovery, it is reasonable to consider that brain repair mechanisms are similar for all stroke forms (Maclellan, Silasi *et al.*, 2010), which is in agreement with our GFAP findings. For instance, other recovery mechanisms are also shared after ischemic or hemorrhagic insults, such as neurogenesis (Masuda, Isobe *et al.*, 2007; Shen, Xie *et al.*, 2008; Murphy e Corbett, 2009) and dendritic plasticity (Biernaskie, Chernenko *et al.*, 2004; Auriat, Wowk *et al.*, 2010a). Unfortunately, measures of repair have not been previously studied in a paired ischemic and hemorrhagic analysis.

Despite similarity, brain remodeling mechanisms may be modulated as results of behavioral feats. For example, skilled reaching training after collagenase-induced intracerebral hemorrhage increases the length of primary astrocytic GFAP-positive processes in perilesional tissue, which is correlated with functional forelimb recovery (Mestriner, R. G., Pagnussat, A. S. *et al.*, 2011). Likewise, enriched environment (Viola, Rodrigues *et al.*, 2009) and physical exercise (Saur, Baptista *et al.*, 2013) induces morphological changes in GFAP-positive astrocytes in healthy animals.

Thus, the present findings expands knowledge on this matter and suggest that GFAP-positive immunoreactivity 30 days after ischemic or hemorrhagic stroke probably is not related to better skilled walking performance observed at this same endpoint in hemorrhagic rats

(Mestriner et al., 2013). On the other hand, if rehabilitative interventions such as skilled reaching training or enriched rehabilitation differentially modulate GFAP expression after each stroke subtype is unknown and can be a matter of further investigation.

Finally, our study contributes to the discussion of the role of reactivity astroglial after different stroke subtypes, a matter that may need more attention in basic and translational stroke research.

5. Conclusion

We conclude that paired ET-1 and collagenase type IV-S stroke approach is also comparable in long-term GFAP immunoreactivity.

6. Acknowledgments

The authors thank Ms. Raquel Matos for her technical assistance. This study was supported by the Brazilians Funding Agencies CNPq, CAPES and FAPERGS. Mestriner was a recipient of a PhD scholarship from CNPq. Léder Leal Xavier and Carlos Alexandre Netto are CNPq investigators.

7. Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

8 References

Anderson MF, Blomstrand F, Blomstrand C et al (2003) Astrocytes and stroke: networking for survival? *Neurochem Res* 28:293-305.

Auriat AM, Wowk S, Colbourne F (2010) Rehabilitation after intracerebral hemorrhage in rats improves recovery with enhanced dendritic complexity but no effect on cell proliferation. *Behav Brain Res* 214(1):42-47.

Biernaskie J, Chernenko G, Corbett D (2004) Efficacy of rehabilitative experience declines with time after focal ischemic brain injury. *J Neurosci* 24(5):1245-1254.

Bjorklund H, Dahl D, Haglid K. et al (1983) Astrocytic development in fetal parietal cortex grafted to cerebral and cerebellar cortex of immature rats. *Brain Res* 285:171-180.

Carmichael ST (2005) Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx* 2:396-409.

Cechetti F, Pagnussat AS, Worm PV et al (2012) Chronic brain hypoperfusion causes early glial activation and neuronal death, and subsequent long-term memory impairment. *Brain Res Bull* 87(1):109-116.

Coleman E, Judd R, Hoe L et al (2004) Effects of diabetes mellitus on astrocyte GFAP and glutamate transporters in the CNS. *Glia* 48:166-178.

Ferraz AC, Xavier LL, Hernandez S et al (2003) Failure of estrogen to protect the substantia nigra pars compacta of female rats from lesion induced by 6-hydroxydopamine. *Brain Res* 986(1-2):200-205.

Go AS, Mozaffarian D, Roger VL et al (2012) Heart disease and stroke statistics-2013 update: a report from the american heart association. *Circulation* 127(1):e6-e245

Hamby ME, Sofroniew MV (2010) Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. *Neurotherapeutics* 7(4):494-506.

Jarlestedt K, Rousset CI, Faiz M et al (2010) Attenuation of reactive gliosis does not affect infarct volume in neonatal hypoxic-ischemic brain injury in mice. *PLoS One* 5(4):e10397.

Kawano H, Kimura-Kuroda J, Komuta Y et al (2012) Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system. *Cell Tissue Res* 349:169-180.

Kelly PJ, Furie KL, Shafqat S et al (2003) Functional recovery following rehabilitation after hemorrhagic and ischemic stroke. *Arch Phys Med Rehabil* 84:968-972.

Lafuente JV, Ortuzar N, Bengoetxea H et al (2012) Vascular endothelial growth factor and other angioglioneurins: key molecules in brain development and restoration. *Int Rev Neurobiol* 102:317-346.

Langhorne P, Bernhardt J, Kwakkel G (2011) Stroke rehabilitation. *Lancet* 377:1693-1702.

Lin JH, Weigel H, Cotrina ML et al (1998) Gap-junction-mediated propagation and amplification of cell injury. *Nat Neurosci* 1:494-500.

Maclellan CL, Auriat AM, Mcgie SC et al (2006) Gauging recovery after hemorrhagic stroke in rats: implications for cytoprotection studies. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:1031-1042.

Maclellan CL, Silasi G, Auriat AM, Colbourne F (2010) Rodent models of intracerebral hemorrhage. *Stroke* 41(10):S95-98.

Martinez FG, Hermel EE, Xavier LL et al (2006) Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the medial amygdala subnuclei across the estrous cycle and in castrated and treated female rats. *Brain Res* 1108(1):117-126.

Martins-Ferreira H, Nedergaard M, Nicholson C (2000) Perspectives on spreading depression. *Brain Res Rev* 32(1):215-234.

Masuda T, Isobe Y, Aihara N et al (2007) Increase in neurogenesis and neuroblast migration after a small intracerebral hemorrhage in rats. *Neurosci Lett* 425(2):114-119.

Mestriner RG, Pagnussat AS, Boisserand LS, Valentim L, Netto CA (2011) Skilled reaching training promotes astroglial changes and facilitated sensorimotor recovery after collagenase-induced intracerebral hemorrhage. *Exp Neurol* 227:53-61.

Mestriner RG, Miguel PM, Bagatini PB et al (2013). Behavior outcome after ischemic and hemorrhagic stroke, with similar brain damage, in rats. *Behav Brain Res*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2013.02.001>

Middeldorp J, Hol EM (2011) GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol* 93:421-443.

Moore CS, Abdullah SL, Brown A, Arulpragasam A, Crocker SJ (2011) How factors secreted from astrocytes impact myelin repair. *J Neurosci Res* 89:13-21.

Murphy TH, Corbett D (2009) Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci* 10(12):861-872.

Paxinos G, Watson C (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, San Diego.

Pekny M, Pekna M (2004) Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol* 204:428-437.

Petito CK, Morgello S, Felix JC, Lesser ML (1990) The two patterns of reactive astrocytosis in postischemic rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 10:850-859.

Saur L, Baptista PP, De Senna PN et al (2013) Physical exercise increases GFAP expression and induces morphological changes in hippocampal astrocytes. *Brain Struct Funct* doi: 10.1007/s00429-012-0500-8.

Schepers VP, Ketelaar M, Visser-Meily AJ et al (2008) Functional recovery differs between ischaemic and haemorrhagic stroke patients. *J Rehabil Med* 40:487-489.

Shen J, Xie L, Mao X et al (2008) Neurogenesis after primary intracerebral hemorrhage in adult human brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 28(8):1460-1468.

Sofroniew MV (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32:638-647.

Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:7-35.

Sozmen EG, Hindman JD, Carmichael ST (2012) Models that matter: white matter stroke models. *Neurotherapeutics* 9:349-358.

Sozmen EG, Kolekar A, Havton LA, Carmichael ST (2009) A white matter stroke model in the mouse: axonal damage, progenitor responses and MRI correlates. *J Neurosci Methods* 180(2):261-272

Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM (2004) Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med* 4:193-205.

Tansey FA, Farooq M, Cammer W (1991) Glutamine synthetase in oligodendrocytes and astrocytes: new biochemical and immunocytochemical evidence. *J Neurochem* 56:266-272.

Theodosis DT, Poulain DA, Oliet SH (2008) Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron. *Physiol Rev* 88:983-1008.

Viola GG, Rodrigues L, Americo JC et al (2009) Morphological changes in hippocampal astrocytes induced by environmental enrichment in mice. *Brain Res* 1274:47-54.

Windle V, Szymanska A, Granter-Button S et al (2006) An analysis of four different methods of producing focal cerebral ischemia with endothelin-1 in the rat. *Exp Neurol* 201:324-334.

Wu Y, Zhang AQ, Yew DT (2005) Age related changes of various markers of astrocytes in senescence-accelerated mice hippocampus. *Neurochem Int* 46(7):565-574.

Xavier LL, Viola GG, Ferraz AC et al (2005). A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase. *Brain Res Protoc* 16:58-64.

Xing C, Hayakawa K, Lok J, Arai K, LO EH (2012) Injury and repair in the neurovascular unit. *Neurol Res* 34:325-330.

Yoneyama M, Shiba T, Hasebe S, Ogita K (2011) Adult neurogenesis is regulated by endogenous factors produced during neurodegeneration. *J Pharmacol Sci* 115(4):425-432.

Zhang D, Hu X, Qian L, O'callaghan JP, Hong JS (2010) Astroglialosis in CNS pathologies: is there a role for microglia? *Mol Neurobiol* 41:232-241.

Zhang M, Li WB, Liu YX et al (2011) High expression of GLT-1 in hippocampal CA3 and dentate gyrus subfields contributes to their inherent resistance to ischemia in rats. *Neurochem Int* 59(7):1019-1028.

Figures

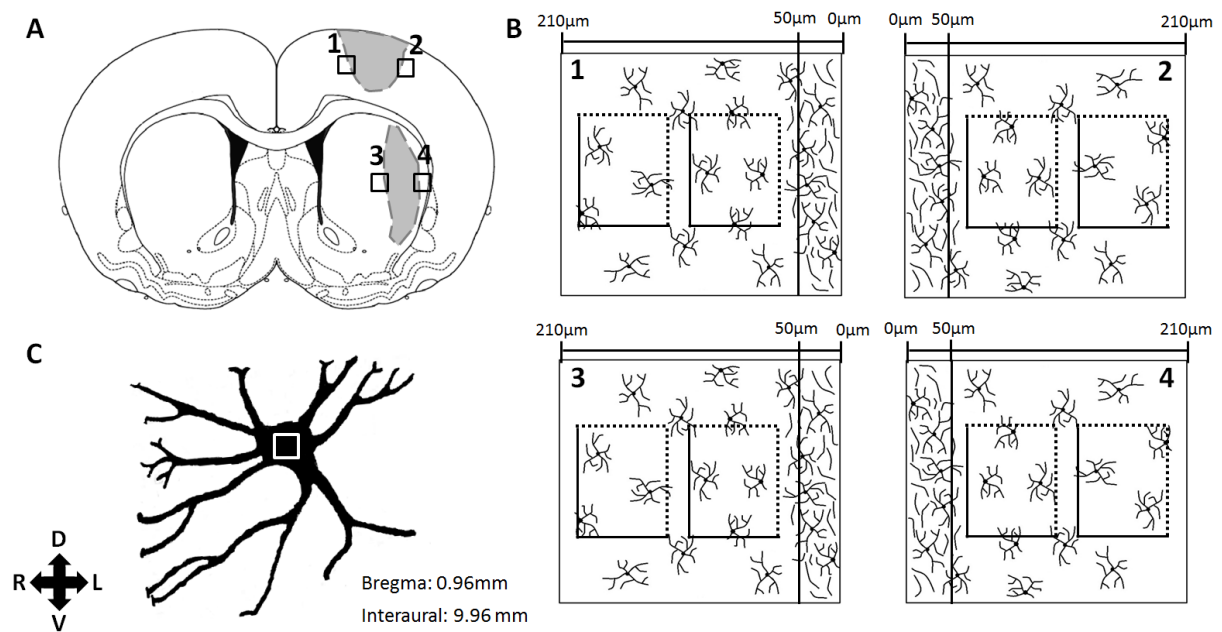


Fig. 1. Illustrations of morphological assessment. (A) Brain slice with damaged sensorimotor cortex and dorsolateral striatum (gray areas). Fields 1 to 4 represents the evaluated surrounding tissue. (B) Amplified fields with areas of interest (AOIs) used to measure astrocytic density (mm^2) and regional optical density. Dashed lines were the inclusion edges. (C) Example of astrocyte with overlaid AOI (in white) used to evaluate optical cellular density. (D) dorsal; (V) ventral; (R) Right; (L) Left.

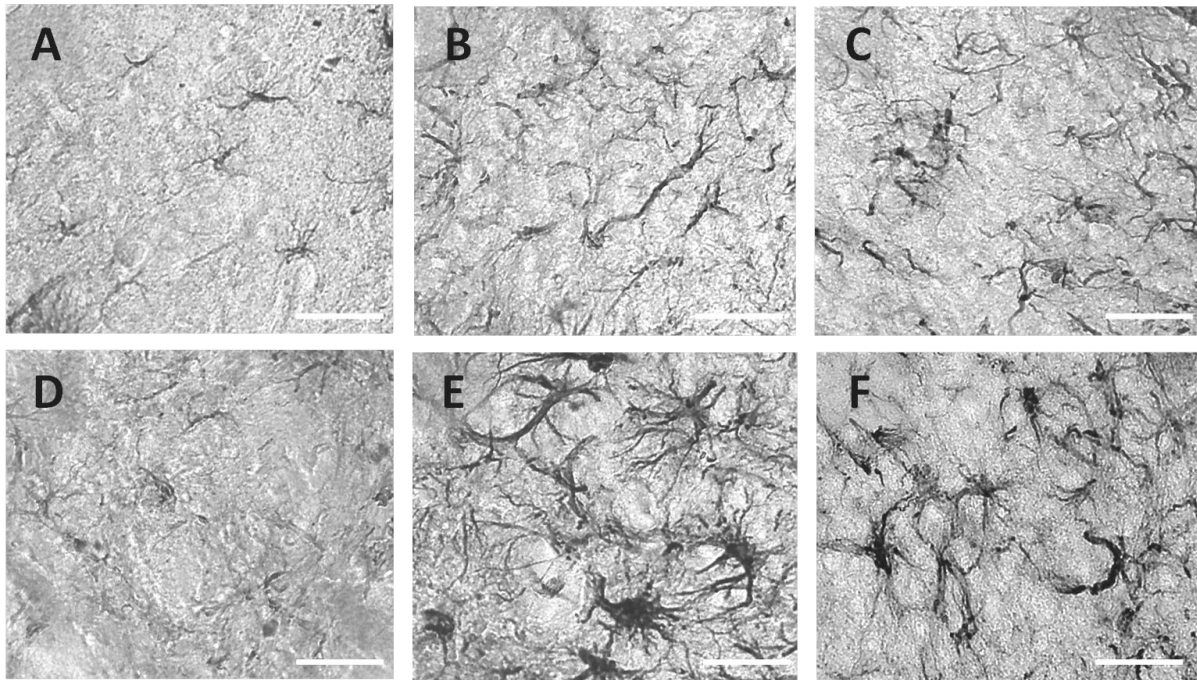


Fig. 2. Digitized images after GFAP immunohistochemistry (20X). Sensorimotor cortex of (A) sham, (B) ischemic and (C) hemorrhagic stroke; dorsolateral striatum of (D) sham, (E) ischemic and (F) hemorrhagic stroke. Scale Bar: 35 μ m. (20X).

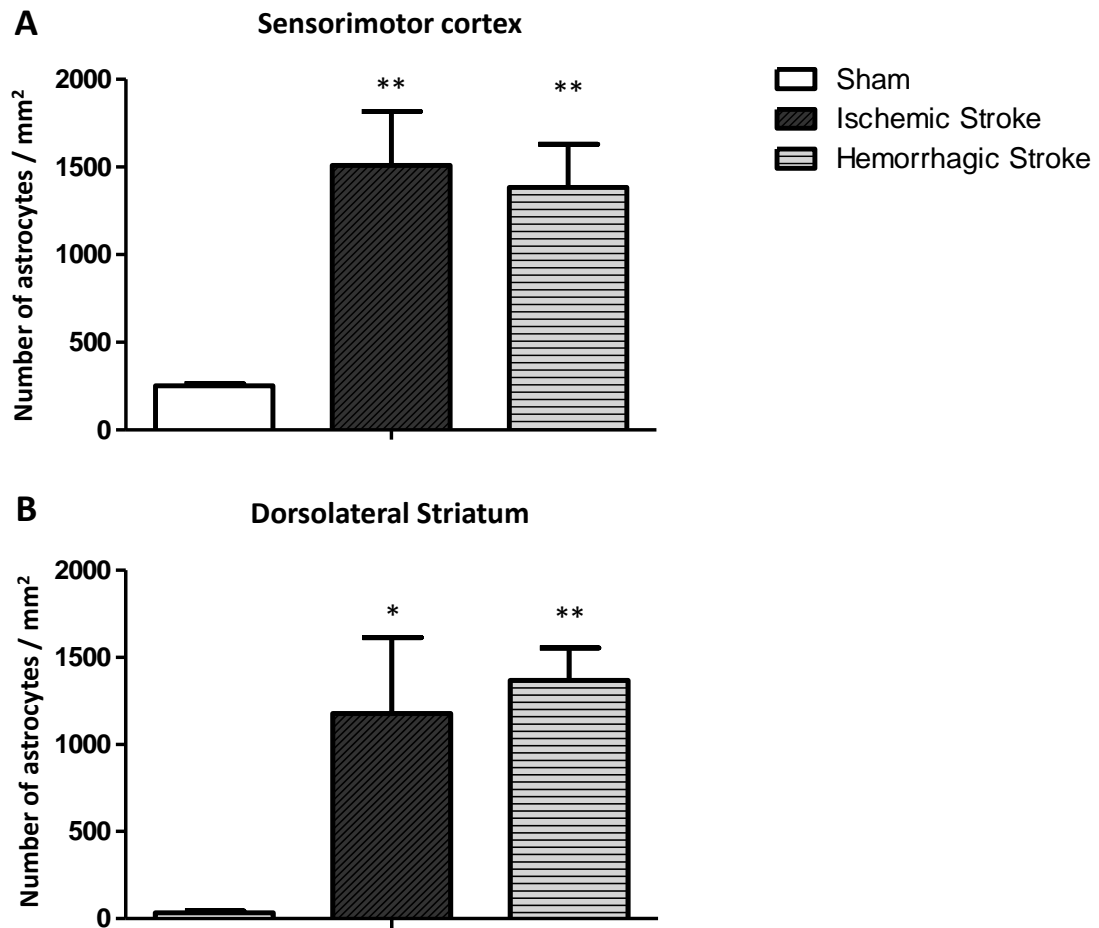


Fig. 3. Astrocytic density (GFAP+) 30 days after surgery. (A) sensorimotor cortex and (B) dorsolateral striatum. Difference between sham and both stroke groups at $*P \leq 0.05$ and $**P \leq 0.01$. No differences were found between stroke groups.

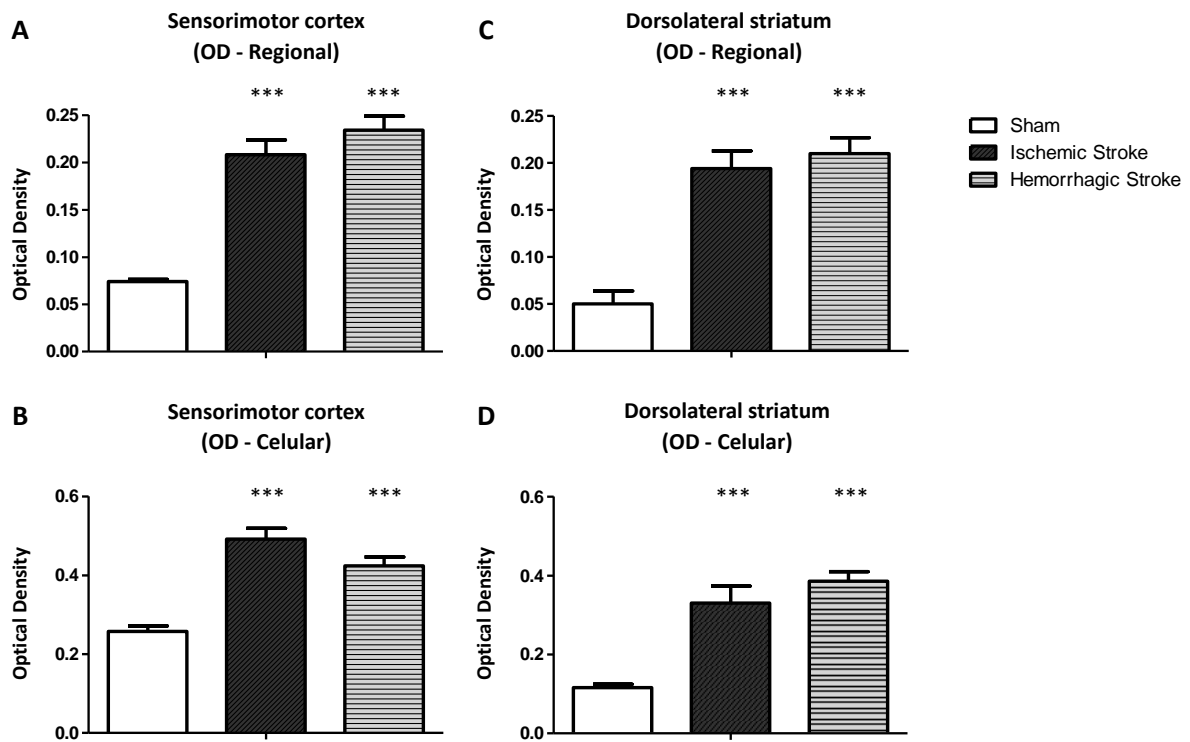


Fig. 4. Regional and cellular optical density of sensorimotor cortex (A and B) and dorsolateral striatum (C and D) 30 days after surgery, respectively. *** Difference between sham and both stroke groups $P \leq 0.001$. No differences were found between stroke groups.

6. Encerramento

A presente tese teve por objetivo estudar dois modelos de AVE experimental, isquêmico e hemorrágico, induzidos por injeções estereotáxicas de endotelina-1 e colagenase tipo IV-S, respectivamente. A principal motivação para o desenvolvimento desta tese baseia-se nos achados de alguns estudos clínicos, que demonstram que a etiologia do AVE talvez seja um dos fatores envolvidos no prognóstico e na recuperação funcional dos pacientes (Paolucci, Antonucci *et al.*, 2003; Schepers, V. P. M., Ketelaar, M. *et al.*, 2008; Lauretani, Saccavini *et al.*, 2010). No entanto, após a análise crítica dos mencionados estudos, percebe-se que alguns fatores intervenientes podem reduzir o nível de evidência desses achados da literatura. Esse fato deve-se, essencialmente, à heterogeneidade dos insultos (Langhorne, Bernhardt *et al.*, 2011), o que dificulta a apropriada comparação clínica entre os subtipos isquêmico e hemorrágico de AVE. Além disso, o tamanho amostral, a adequada seleção dos pacientes, os sítios anatômicos, a severidade e a extensão das lesões (Lundgren, Flodstrom *et al.*, 1982; Kim e Jones, 2010), a idade (Knoflach, Matosevic *et al.*, 2012), o sexo (Roth, Haley *et al.*, 2011), o tempo decorrido entre o início dos sintomas e o atendimento hospitalar (Paolucci, Antonucci *et al.*, 2003; Langhorne, Bernhardt *et al.*, 2011), as particularidades de cada programa de reabilitação (Murphy e Corbett, 2009; Roth, Haley *et al.*, 2011), dentre outras variáveis, frequentemente apresentam-se como fatores de confusão para as medidas comparativas de recuperação funcional nos estudos clínicos.

Os modelos experimentais, embora não mimetizem com fidedignidade todos os eventos fisiopatológicos que ocorrem nos seres humanos e não possam ter seus resultados extrapolados para a clínica de forma direta, mostram-se interessantes para reduzir eventuais variáveis de confusão e testar alguns paradigmas neurobiológicos interessantes. Em suma, para que o nosso pensamento experimental fosse colocado em prática, seria necessário obtermos lesões comparáveis, quanto aos sítios anatômicos, volume e extensão das mesmas. A partir desta premissa, propôs-se, então, uma abordagem metodológica original, embora os modelos experimentais escolhidos, de forma isolada, sejam bem descritos pela literatura (Fuxe, Cintra *et al.*, 1989; Fuxe, Bjelke *et al.*, 1997; Gilmour, Iverson *et al.*, 2004; Maclellan, Auriat *et al.*, 2006; Windle, Szymanska *et al.*, 2006; Maclellan, Silasi *et al.*, 2008; Clarke, Mala *et al.*, 2009; Maclellan, Langdon *et al.*, 2009; Maclellan, Silasi *et al.*, 2010; Pagnussat, Simao *et al.*, 2012).

O efeito da administração intraparenquimatosa de ET-1 e colagenase sobre o volume das lesões produzidas já foi relativamente bem estudado (Biernaskie, Szymanska *et al.*, 2005; Maclellan, Auriat *et al.*, 2006; Windle, Szymanska *et al.*, 2006; Alles, Greggio *et al.*, 2010; Maclellan, Silasi *et al.*, 2010; Mestriner, R. G., Pagnussat, A. S. *et al.*, 2011). Por exemplo, sabe-se que o aumento nas doses de ET-1 não necessariamente resulta em um maior volume

de lesão (Windle, Szymanska *et al.*, 2006), enquanto que a colagenase do tipo IV-S demonstra um efeito dose-dependente para essa variável (Maclellan, Auriat *et al.*, 2006).

Quanto aos sítios primários de lesão, o córtex sensorio-motor e o estriado foram escolhidos por serem estruturas importantes e frequentemente lesadas pelo AVE - o que resulta em danos funcionais aos sujeitos acometidos, dada as suas diversas funções relacionadas ao controle motor (Groenewegen, 2003; Penhune e Steele, 2012). De modo particular, as lesões isquêmicas típicas, oriundas da oclusão da artéria cerebral média, usualmente atingem o córtex cerebral e parte dos núcleos da base (Windle, Szymanska *et al.*, 2006; Ihle-Hansen, Thommessen *et al.*, 2012), enquanto que a maioria das hemorragias cerebrais acomete apenas nos núcleos da base (hemorragia intracerebral) (Qureshi, Mendelow *et al.*, 2009; Ikram, Wieberdink *et al.*, 2012; Krafft, Bailey *et al.*, 2012; Manno, 2012). Sendo assim, combinamos os danos corticais e estriatais para ambas as etiologias de AVE, o que possibilitou um melhor controle da variável de localização anatômica primária das lesões.

Nossos resultados demonstraram que as doses selecionadas, injetadas no córtex sensorio-motor e estriado dorsolateral, foram capazes de induzir lesões isquêmicas e hemorrágicas comparáveis quanto ao volume e a extensão das mesmas. Assim, o primeiro objetivo da tese foi cumprido, ou seja, obtivemos lesões comparáveis quanto aos sítios primários de lesão, volume e extensão das mesmas.

A partir dos mencionados resultados, encorajamo-nos a realizar a observação das medidas de recuperação sensorio-motora dos animais como “desfecho” tendo a etiologia da lesão como variável independente. Nossos resultados comportamentais sugeriram que os animais submetidos ao modelo de hemorragia cerebral tiveram um melhor desempenho no teste da escada horizontal em longo prazo quando comparados aos seus pares isquêmicos, sugerindo uma recuperação espontânea favorável ao grupo hemorrágico.

O teste da escada horizontal tem se mostrado importante para avaliar a habilidade e coordenação durante a marcha dos animais após diversas de intervenções (Mestriner, R. G., Pagnussat, A. S. *et al.*, 2011; Faraji, Kurio *et al.*, 2012). O adequado desempenho no mencionado teste depende da correta colocação e coordenação dos membros anteriores e posteriores nas traves de sustentação do aparato, o que exige movimentos de ajuste do tronco e da cabeça dos animais (Metz e Whishaw, 2002; 2009). No entanto, para confirmar os achados comportamentais neste teste, fez-se necessário o emprego da análise de co-variância (ANCOVA), dada a variabilidade do volume e extensão das lesões nos indivíduos pertencentes aos grupos lesados – o que é uma característica inerente aos modelos experimentais propostos (Maclellan, Auriat *et al.*, 2006; Windle, Szymanska *et al.*, 2006). Assim, a ANCOVA confirmou que as diferenças comportamentais evidenciadas não

dependeram do volume e extensão das lesões, o que nos levou a pensar que a etiologia do dano poderia estar influenciando a recuperação funcional espontânea.

Ao observarmos os demais testes comportamentais empregados, encontramos um padrão de recuperação sensorio-motora espontânea similar para ambos os subtipos de AVE experimental. De modo interessante, a primeira avaliação no teste do campo aberto (IPO) revelou que esses animais foram mais inativos quando comparados ao grupo sham, fenômeno atribuído ao comportamento agudo pós-AVE, que inclui uma redução pelo interesse exploratório dos animais (Wang, Zhang *et al.*, 2009; Turner e Vink, 2012). No entanto, à medida que os ratos foram novamente submetidos às sessões de teste no campo aberto, não foram evidenciadas diferenças exploratórias entre todos os grupos avaliados. Esse achado foi observado em paralelo à redução gradual da atividade exploratória ao longo do tempo, o que reflete uma esperada e natural habituação dos animais ao aparato (Paylor, Spencer *et al.*, 2006).

Em relação ao teste do cilindro, que visa a avaliar o uso assimétrico dos membros anteriores, também não foram encontradas diferenças no perfil de recuperação sensorio-motora entre os animais lesados. Embora modificações nessa variável possam ser observadas em algumas intervenções (Mestriner, R. G., Pagnussat, A. S. *et al.*, 2011), nossos dados atuais sugerem que os locais de lesão são preponderantes à etiologia dos insultos para o desempenho comportamental no teste do cilindro. Nesse sentido, acredita-se que a recuperação da simetria sensorial dependa, principalmente, da integridade estrutural do estriado – local lesado em ambos os modelos de AVE utilizados na presente tese.

Quando realizamos a correlação entre as variáveis morfométricas de dano (volume e extensão das lesões) e o desempenho nos testes comportamentais no 30.º dia pós-operatório, observou-se que as mesmas correlacionaram-se com o número de erros no teste da escada horizontal e com o teste do cilindro, embora o último apresente apenas uma correlação fraca a moderada com as variáveis morfométricas supracitadas. Esses achados são esperados e corroboram os resultados de estudos prévios (Maclellan, Auriat *et al.*, 2006; Schallert, T., 2006). Por fim, o teste do campo aberto mostrou não possuir um valor preditivo para o volume e extensão das lesões isquêmicas e hemorrágicas em longo prazo, o que também está de acordo com alguns estudos anteriores que avaliaram modelos de isquemia focal e hemorragia cerebral de forma isolada (Maclellan, Auriat *et al.*, 2006; Nedelmann, Wilhelm-Schwenkmezger *et al.*, 2007).

A partir desse momento, cumprimos três dos principais objetivos da presente tese, ou seja, obter um desenho experimental comparativo (em termos de localização, volume e extensão das lesões) entre os subtipos isquêmico e hemorrágico de AVE; avaliar a

recuperação sensório-motora desses animais; e correlacionar as estimativas morfométricas citadas com os desfechos comportamentais avaliados. No entanto, os resultados comportamentais nos levaram a uma nova questão: quais seriam as razões neurobiológicas para essas diferenças funcionais entre os animais isquêmicos e hemorrágicos? Este tema é interessante, pois, embora alguns trabalhos especulem que a melhor recuperação em longo prazo observada no subtipo hemorrágico de AVE deva-se à dinâmica de redução do hematoma e do edema tissular (Schepers, V. P., Ketelaar, M. et al., 2008), assim como a plasticidade nas regiões perilesionais (Auriat, Wowk *et al.*, 2010), não existem na literatura, que seja de nosso conhecimento, estudos que tenham avaliado essas e outras formas de plasticidade entre os subtipos de AVE de maneira comparativa. Adicionalmente, a corrente concepção de reparo do SNC pode ser resumida no pensamento de Maclellan e colaboradores (2010):

“Although differences in the type, extend, and timing of pathological process likely mean that recovery processes vary between ischemia and hemorrhage and among models, it makes sense that similar process occur”.

De fato, vários trabalhos demonstram que o reparo do sistema nervoso conta com um repertório de mecanismos que se apresentam de forma muito semelhante independentemente da etiologia do insulto e dos fatores que o desencadeiam. Por exemplo, já foi evidenciada a ocorrência de neurogênese após insultos isquêmicos (Murphy e Corbett, 2009), o que também parece ocorrer após a HIC em humanos (Shen, Xie *et al.*, 2008) e no modelo de hemorragia cerebral induzida pela administração de colagenase (Masuda, Isobe *et al.*, 2007). Além disso, modificações nos espinhos dendríticos (Biernaskie, Chernenko *et al.*, 2004; Murphy e Corbett, 2009; Auriat, Wowk *et al.*, 2010b), assim como a participação de alguns fatores neurotróficos (Ploughman, Windle *et al.*, 2009; Han, Jin *et al.*, 2011; Maclellan, Keough *et al.*, 2011; Chen, Qin *et al.*, 2012) são descritos tanto em eventos isquêmicos quanto hemorrágicos.

Neste contexto, nos questionamos se as respostas de reparo, apesar de semelhantes quanto à natureza, seriam tão estereotipadas entre os diferentes tipos de dano quanto se presume, já que essa conceituação é advinda da comparação subjetiva de estudos isolados. Ou seja, até o presente momento os mencionados resultados não haviam sido comparados por um delineamento experimental adequado. Além disso, as diferenças comportamentais em longo prazo, encontradas nos vários modelos de lesão, seriam realmente apenas o resultado das diferenças entre os métodos, sítios ou extensão das lesões, como interpretado pelos autores de

diversos estudos anteriores? (Gonzalez e Kolb, 2003; Carmichael, 2005; Maclellan, Silasi *et al.*, 2008; Maclellan, Silasi *et al.*, 2010).

Tomando por base algumas evidências experimentais disponíveis, decidimos avaliar se a astrogliose GFAP-positiva seria semelhante nos danos isquêmico e hemorrágico, em longo prazo, para que, a partir de possíveis diferenças, pudéssemos correlacionar estes resultados com os desfechos comportamentais. Ou seja, uma maior intensidade de marcação para GFAP, ou um aumento da densidade celular GFAP-positiva em algum dos grupos lesados poderia relacionar-se com as diferenças funcionais encontradas no capítulo 1. Essa hipótese baseou-se em alguns estudos prévios, que demonstraram que a expressão de GFAP, presente na astrogliose reativa, pode melhorar a recuperação funcional de roedores no período pós-lesão (Otani, Nawashiro *et al.*, 2006; Hayakawa, Nakano *et al.*, 2010; Mestriner, R. G., Pagnussat, A. S. *et al.*, 2011). Por exemplo, Otani e colaboradores (2006) utilizaram dois modelos de lesão em camundongos knockout para GFAP. Eles evidenciaram que esses animais eram mais vulneráveis do que os animais controles aos insultos provocados pelos modelos de trauma encefálico e às convulsões induzidas pela injeção de ácido caínico (Otani, Nawashiro *et al.*, 2006). Corroborando estes resultados, Hayakawa e colaboradores (2010) avaliaram os efeitos da inibição da astrogliose reativa pós-AVE, utilizando o fluorocitrato - um inibidor do ciclo de Krebs glial - em um modelo de isquemia focal em camundongos. Os autores evidenciaram que a inibição da astrogliose reativa resultava em menor expressão da proteína *high mobility group box 1* (HMGB1) nesses astrócitos, além da redução associada de alguns marcadores do remodelamento neurovascular, tais como CD31, sinaptofisina e PSD-95. Além disso, eles verificaram que os referidos roedores apresentavam uma pior recuperação funcional em comparação com os animais lesados sem a inibição astrocitária pelo fluorocitrato. Dessa forma, é possível que os astrócitos reativos do córtex perilesional também participem do remodelamento neurovascular benéfico, facilitando a recuperação sensório-motora pós-AVE (Hayakawa, Nakano *et al.*, 2010). Adicionalmente, um estudo prévio de nosso grupo de pesquisa revelou que os astrócitos GFAP-positivos alteram sua morfologia na região adjacente à hemorragia intracerebral induzida pela infusão de colagenase tipo IV-S, em longo prazo, se os animais são submetidos ao treinamento de habilidade do alcance e preensão por quatro semanas. Os mencionados astrócitos exibiam processos primários mais longos, o que foi observado, em paralelo, com uma melhor recuperação funcional desses animais (Mestriner, R. G., Pagnussat, A. S. *et al.*, 2011). Assim, estabelecemos os objetivos específicos que deram origem ao capítulo 2, ou seja, avaliar se os modelos de isquemia e hemorragia cerebral também seriam comparáveis quanto à reatividade astrocitária GFAP-positiva.

Nossos resultados demonstraram que ambos os subtipos de AVE experimental foram capazes de aumentar o número de células imunorreativas à GFAP no tecido perilesional, tanto para o córtex sensório-motor quanto para o estriado dorsolateral. Esses achados concordam com a literatura, onde se descreve um aumento no número de células positivas para GFAP no tecido perilesional em longo prazo, após danos isquêmicos e hemorrágicos (Sozmen, Kolekar *et al.*, 2009; Mestriner, R. G., Pagnussat, A. S. *et al.*, 2011; Sozmen, Hinman *et al.*, 2012). Assim, observa-se que as injeções combinadas de ET-1 e collagenase do tipo IV-S foram capazes de induzir modificações semelhantes entre os grupos lesados quanto à densidade astrocitária, densidade óptica regional e celular para GFAP nas regiões corticais e estriatais adjacentes aos diferentes subtipos de lesão avaliados.

Existe uma grande quantidade de estudos na literatura demonstrando que qualquer tipo de lesão do SNC é capaz de induzir um aumento na expressão de filamentos intermediários de astrócitos, tais como a GFAP (Pekny e Pekna, 2004; Theodosis, Poulain *et al.*, 2008). No entanto, nossos resultados também foram originais em relação à comparação da astrogliose reativa GFAP-positiva após eventos isquêmicos e hemorrágicos similares quanto ao volume, extensão e localização primária das lesões. Estes resultados são interessantes, pois demonstram que a intensidade da presença de filamentos intermediários é semelhante entre as lesões propostas. Além disso, existem evidências de que intensidade da astrogliose reativa não necessariamente se apresenta atrelada ao volume de uma lesão, tal como demonstrado por Jarlestedt e colaboradores (2010) em um modelo de hipóxia e isquemia neonatal. Assim, é provável que a presença de GFAP *per se*, 30 dias após a lesão, na região perilesional, não tenha uma relação com o melhor desempenho funcional espontâneo dos animais hemorrágicos no teste da escada horizontal. Contudo, uma série de possibilidades ainda precisam ser investigadas mais profundamente para verificarmos se existem outros fatores neurovasculares associados à presença da astrogliose reativa GFAP-positiva que estão contribuindo para explicar as diferenças comportamentais encontradas no presente estudo. Abre-se, então, uma enorme gama de possibilidades investigativas a partir dos presentes resultados.

Algumas hipóteses clínicas sugerem que a recuperação funcional é mais rápida nos casos hemorrágicos, passada a fase aguda, em função da maior preservação cortical, já que a maioria dos casos acomete os núcleos da base (Schepers, V. P., Ketelaar, M. *et al.*, 2008). Embora não possa ser diretamente comparado com dados clínicos, o nosso estudo vai em direção oposta a essa ideia, pois produzimos lesões corticais e estriatais que apresentaram volume e extensão semelhantes nas duas formas de insulto, isquêmico e hemorrágico, mantendo-se a presença das diferenças comportamentais favoráveis à recuperação sensório-motora no grupo hemorrágico.

Outro fator que poderia explicar a recuperação sensório-motora diferenciada entre os grupos é o papel específico de outros fatores envolvidos no remodelamento neurovascular. Nesse sentido, já foi demonstrado que muitas moléculas, tais como, as metaloproteinases de matriz e a proteína *high-mobility group box 1* (HMGB1) exibem uma ação de natureza bifásica, atuando de forma maléfica em curto prazo mas, possivelmente, exibindo um papel benéfico, ou seja favorável à recuperação, em longo prazo (Turner, Dodson *et al.*, 2013). A HMGB1, por exemplo, é capaz de recrutar células progenitoras endoteliais (EPC), promovendo o remodelamento neurovascular benéfico (Hayakawa, Miyamoto *et al.*, 2012). No entanto, se o perfil de participação dessas moléculas frente a diferentes insultos, tais como o AVE isquêmico e hemorrágico, pode ser modulado de forma insulto-dependente, explicando, assim, as diferenças funcionais, é um tema que ainda precisa ser elucidado.

Complementarmente, um aspecto interessante é a possível relação entre os astrócitos GFAP-positivos e a expressão de fatores neurotróficos, tais como o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e o fator neurotrófico glial (GDNF). Estudos prévios demonstram que grande parte do BDNF expresso tardiamente no processo de reparo se dá pela participação dos astrócitos (Sato, Chin *et al.*, 2009; Bejot, Prigent-Tessier *et al.*, 2011) e que o GDNF pode ser fortemente co-localizado com a proteína GFAP (Airavaara, Shen *et al.*, 2009; Shen, Li *et al.*, 2010). Porém, se os níveis dessas neurotrofinas, isoladas ou em co-localização com a proteína GFAP, poderiam ser regulados de modo diferencial entre os insultos, é algo que também carece de maior investigação.

À parte de todas estas especulações, os presentes resultados reforçam a comparabilidade da abordagem experimental proposta, o que satisfaz com bastante êxito a ideia de desenvolvimento de uma abordagem metodológica comparativa entre os subtipos de AVE experimental. Essa abordagem poderá contribuir para o estudo comparado dos efeitos de uma série de intervenções, sejam elas farmacológicas ou não farmacológicas, frente a insultos etiologicamente diferentes. Este conhecimento poderá, no futuro, proporcionar um melhor entendimento das particularidades da resposta de reparo do SNC em diferentes contextos.

6.1 Conclusões

- ET-1 e colagenase do tipo IV-S podem ser utilizadas para a proposição de um desenho experimental comparativo entre os subtipos de AVE isquêmico e hemorrágico.
- Os animais isquêmicos e hemorrágicos demonstram um perfil de recuperação sensório-motora espontânea similar entre os insultos, embora existam diferenças específicas na habilidade e coordenação da marcha em longo prazo, as quais são favoráveis ao grupo hemorrágico.

- O número de erros no teste da escada horizontal e o desempenho no teste do cilindro apresentam correlação com o volume e extensão das lesões, sendo o último apenas fraco a moderado; o teste do campo aberto não possui correlação com essas características morfométricas da lesão.
- A imunorreatividade para GFAP, incluindo a densidade astrocitária, óptica regional e celular, foi semelhante entre os subtipos de AVE isquêmico e hemorrágico.

Sendo assim, demonstrou-se, na presente tese, que as injeções estereotáxicas de ET-1 e collagenase tipo VI-S podem ser utilizadas para a proposição de um desenho experimental comparativo de AVE isquêmico e hemorrágico, tendo em vista que a referida abordagem foi capaz de induzir danos comparáveis, em termos de volume e extensão das lesões, assim como em termos de imunorreatividade à GFAP no tecido perilesional avaliado. No entanto, a relação entre a melhor recuperação sensório-motora espontânea observada dos animais hemorrágicos e as possíveis causas neurobiológicas que a expliquem ainda precisa ser investigada.

7. Perspectivas

Como perspectivas, a partir dos resultados da presente tese, pretende-se realizar diversas avaliações comparativas entre os insultos isquêmicos e hemorrágicos, o que proporcionará um maior conhecimento dos eventos neurobiológicos envolvidos. Dentre as propostas, podemos destacar:

- Avaliar características morfológicas mais refinadas dos astrócitos GFAP-positivos perilesionais e sua correlação com o desempenho sensório-motor espontâneo.
- Avaliar outros marcadores de remodelamento neurovascular e suas relações com a recuperação funcional comparativa entre os subtipos de AVE.
- Verificar o perfil da recuperação sensório-motora induzida por diferentes protocolos experimentais de reabilitação, tais como o enriquecimento ambiental, o treinamento da tarefa de habilidade do alcance e preensão, o exercício físico em esteira rolante e o fortalecimento muscular e suas possíveis relações com a plasticidade astrogliar e neurovascular.

Desta forma, a presente tese permitiu a abertura de uma nova linha de pesquisa em nosso grupo, o que será salutar para um melhor entendimento dos mecanismos neurobiológicos relacionados ao AVE experimental, que poderão auxiliar no processo de desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para esta impactante condição clínica.

8 REFERÊNCIAS

- AIRAVAARA, M. et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor reduces ischemic brain injury and promotes behavioral recovery in rats. **J Comp Neurol**, v. 515, n. 1, p. 116-24, Jul 1 2009. ISSN 1096-9861 (Electronic) 0021-9967 (Linking).
- ALLEN, C. L.; BAYRAKTUTAN, U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. **International Journal of Stroke**, v. 4, n. 6, p. 461-470, 2009. ISSN 1747-4930. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000271466900011 >.
- ALLES, Y. C. et al. A novel preclinical rodent model of collagenase-induced germinal matrix/intraventricular hemorrhage. **Brain Res**, v. 1356, p. 130-8, Oct 2010. ISSN 1872-6240. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20692236> >.
- ANDREWS, A. W.; BOHANNON, R. W. Distribution of muscle strength impairments following stroke. **Clinical Rehabilitation**, v. 14, n. 1, p. 79-87, 2000. ISSN 0269-2155. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000085125100011 >.
- ARAI, K. et al. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: neurovascular injury and angiogenic recovery after stroke. **Febs Journal**, v. 276, n. 17, p. 4644-4652, 2009. ISSN 1742-464X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000268791300004 >.
- ARAQUE, A. Astrocytes process synaptic information. **Neuron Glia Biol**, v. 4, n. 1, p. 3-10, Feb 2008. ISSN 1741-0533 (Electronic) 1740-925X (Linking).
- ARAQUE, A.; CARMIGNOTO, G.; HAYDON, P. G. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. **Annu Rev Physiol**, v. 63, p. 795-813, 2001. ISSN 0066-4278 (Print) 0066-4278 (Linking).
- ARONOWSKI, J.; ZHAO, X. Molecular pathophysiology of cerebral hemorrhage: secondary brain injury. In: (Ed.). **Stroke**. United States, v.42, 2011. p.1781-6. ISBN 1524-4628 (Electronic) 0039-2499 (Linking).
- AURELL, A. et al. Determination of S-100 and glial fibrillary acidic protein concentrations in cerebrospinal fluid after brain infarction. **Stroke**, v. 22, n. 10, p. 1254-8, Oct 1991. ISSN 0039-2499 (Print) 0039-2499 (Linking).
- AURIAT, A. M.; COLBOURNE, F. Delayed rehabilitation lessens brain injury and improves recovery after intracerebral hemorrhage in rats. **Brain Research**, v. 1251, p. 262-268, 2009.
- AURIAT, A. M.; WOWK, S.; COLBOURNE, F. Rehabilitation after intracerebral hemorrhage in rats improves recovery with enhanced dendritic complexity but no effect on cell proliferation. **Behavioural Brain Research**, v. 214, n. 1, p. 42-47, 2010. ISSN 0166-4328. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000281327000008 >.
- BABU, C. S.; RAMANATHAN, M. Post-ischemic administration of nimodipine following focal cerebral ischemic-reperfusion injury in rats alleviated excitotoxicity, neurobehavioural alterations and partially the bioenergetics. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 29, n. 1, p. 93-105, 2011.
- BEJOT, Y. et al. Time-dependent contribution of non neuronal cells to BDNF production after ischemic stroke in rats. In: (Ed.). **Neurochem Int**. England: 2010 Elsevier Ltd, v.58, 2011. p.102-11. ISBN 1872-9754 (Electronic) 0197-0186 (Linking).
- BIERNASKIE, J.; CHERNENKO, G.; CORBETT, D. Efficacy of rehabilitative experience declines with time after focal ischemic brain injury. In: (Ed.). **J Neurosci**. United States, v.24, 2004. p.1245-54. ISBN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking).

- BIERNASKIE, J. et al. Bi-hemispheric contribution to functional motor recovery of the affected forelimb following focal ischemic brain injury in rats. In: (Ed.). **Eur J Neurosci**. France, v.21, 2005. p.989-99. ISBN 0953-816X (Print)
0953-816X (Linking).
- BUCHAN, A. M.; XUE, D.; SLIVKA, A. A new model of temporary focal neocortical ischemia in the rat. **Stroke**, v. 23, n. 2, p. 273-9, Feb 1992. ISSN 0039-2499. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1561658> >.
- CACERES, J. A.; GOLDSTEIN, J. N. Intracranial hemorrhage. **Emerg Med Clin North Am**, v. 30, n. 3, p. 771-94, Aug 2012. ISSN 1558-0539 (Electronic)
0733-8627 (Linking).
- CARMICHAEL, S. T. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. **NeuroRx**, v. 2, n. 3, p. 396-409, Jul 2005. ISSN 1545-5343. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16389304> >.
- CARMICHAEL, S. T. et al. Genomic profiles of damage and protection in human intracerebral hemorrhage. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 28, n. 11, p. 1860-1875, 2008. ISSN 0271-678X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000260472900010 >.
- CERVERA, A.; AMARO, S.; CHAMORRO, A. Oral anticoagulant-associated intracerebral hemorrhage. **J Neurol**, v. 259, n. 2, p. 212-24, Feb 2012. ISSN 1432-1459 (Electronic)
0340-5354 (Linking).
- CHEN, J. et al. Treadmill rehabilitation treatment enhanced BDNF-TrkB but not NGF-TrkA signaling in a mouse intracerebral hemorrhage model. **Neurosci Lett**, v. 529, n. 1, p. 28-32, Oct 31 2012. ISSN 1872-7972 (Electronic)
0304-3940 (Linking).
- CLARKE, J. et al. The effects of repeated rehabilitation "tune-ups" on functional recovery after focal ischemia in rats. In: (Ed.). **Neurorehabil Neural Repair**. United States, v.23, 2009. p.886-94. ISBN 1552-6844 (Electronic)
1545-9683 (Linking).
- COLANGELO, A. M. et al. Targeting reactive astrogliosis by novel biotechnological strategies. In: (Ed.). **Biotechnol Adv**. England: 2011 Elsevier Inc, v.30, 2012. p.261-71. ISBN 1873-1899 (Electronic)
0734-9750 (Linking).
- COLON-RAMOS, D. A. Synapse formation in developing neural circuits. **Development of Neural Circuitry**, v. 87, p. 53+, 2009. ISSN 0070-2153. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000266733400002 >.
- DANTON, G. H.; DIETRICH, W. D. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 62, n. 2, p. 127-136, 2003. ISSN 0022-3069. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000180874800002 >.
- DEBOW, S. B. et al. Constraint-induced movement therapy and rehabilitation exercises lessen motor deficits and volume of brain injury after striatal hemorrhagic stroke in rats. **Stroke**, v. 34, n. 4, p. 1021-1026, 2003. ISSN 0039-2499. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000182014300047 >.
- DEL ZOPPO, G. J. The neurovascular unit in the setting of stroke. **Journal of Internal Medicine**, v. 267, n. 2, p. 156-171, 2009. ISSN 0954-6820. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000273771200003 >.
- DEL ZOPPO, G. J. et al. Heterogeneity in the penumbra. In: (Ed.). **J Cereb Blood Flow Metab**. United States, v.31, 2011. p.1836-51. ISBN 1559-7016 (Electronic)
0271-678X (Linking).
- DIRNAGL, U. Pathobiology of injury after stroke: the neurovascular unit and beyond. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1268, p. 21-5, Sep 2012. ISSN 1749-6632 (Electronic)
0077-8923 (Linking).
- DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends in Neurosciences**, v. 22, n. 9, p. 391-397, 1999. ISSN 0166-2236. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000082021800009 >.

DIRNAGL, U.; LINDAUER, U. Pathophysiology of stroke: Lessons from animal models. **Journal of Vascular Research**, v. 43, n. 1, p. 38-39, 2006. ISSN 1018-1172. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000233953300036 >.

DOBLE, A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: Implications for therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 81, n. 3, p. 163-221, 1999. ISSN 0163-7258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000078660100001 >.

DONNAN, G. A. et al. Stroke. In: (Ed.). **Lancet**. England, v.371, 2008. p.1612-23. ISBN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking).

DURUKAN, A.; TATLISUMAK, T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 87, n. 1, p. 179-197, 2007. ISSN 0091-3057. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000247740300022 >.

EDDLESTON, M.; MUCKE, L. Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. In: (Ed.). **Neuroscience**. England, v.54, 1993. p.15-36. ISBN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking).

FARAJI, J.; KURIO, K.; METZ, G. A. Concurrent silent strokes impair motor function by limiting behavioral compensation. In: (Ed.). **Exp Neurol**. United States: 2012 Elsevier Inc, v.236, 2012. p.241-8. ISBN 1090-2430 (Electronic) 0014-4886 (Linking).

FERRAZ, A. C. et al. Failure of estrogen to protect the substantia nigra pars compacta of female rats from lesion induced by 6-hydroxydopamine. In: (Ed.). **Brain Res**. Netherlands, v.986, 2003. p.200-5. ISBN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking).

FEUERSTEIN, G. Z.; CHAVEZ, J. Translational Medicine for Stroke Drug Discovery The Pharmaceutical Industry Perspective. **Stroke**, v. 40, n. 3, p. S121-S125, 2009. ISSN 0039-2499. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000263594200040 >.

FISHER, M.; BASTAN, B. Identifying and utilizing the ischemic penumbra. In: (Ed.). **Neurology**. United States, v.79, 2012. p.S79-85. ISBN 1526-632X (Electronic) 0028-3878 (Linking).

FISHER, M.; SCHAEBITZ, W. An overview of acute stroke therapy - Past, present, and future. **Archives of Internal Medicine**, v. 160, n. 21, p. 3196-3206, 2000. ISSN 0003-9926. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000165456700003 >.

FLORCZAK-RZEPKA, M. et al. Matrix metalloproteinases in human spontaneous intracerebral hemorrhage: an update. In: (Ed.). **Cerebrovasc Dis**. Switzerland: Basel., v.34, 2012. p.249-62. ISBN 1421-9786 (Electronic) 1015-9770 (Linking).

FUXE, K. et al. Endothelin-1 induced lesions of the frontoparietal cortex of the rat. A possible model of focal cortical ischemia. **Neuroreport**, v. 8, n. 11, p. 2623-2629, 1997. ISSN 0959-4965. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997XP31300043 >.

_____. Centrally administered endothelin-1 produces lesions in the brain of the male rat. **Acta Physiol Scand**, v. 137, n. 1, p. 155-6, Sep 1989. ISSN 0001-6772 (Print) 0001-6772 (Linking).

GHARBAWIE, O. A.; GONZALEZ, C. L. R.; WHISHAW, I. Q. Skilled reaching impairments from the lateral frontal cortex component of middle cerebral artery stroke: a qualitative and quantitative comparison to focal motor cortex lesions in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 156, n. 1, p. 125-137, 2005. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000224712400013 >.

GILMOUR, G. et al. The effects of intracortical endothelin-1 injections on skilled forelimb use: implications for modelling recovery of function after stroke. **Behavioural Brain Research**, v. 150, n. 1-2, p. 171-183, 2004. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000220607400018 >.

GINSBERG, M. D. Neuroprotection for ischemic stroke: Past, present and future. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 363-389, 2008. ISSN 0028-3908. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000259428800012 >.

GO, A. S. et al. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the american heart association. In: (Ed.). **Circulation**. United States, v.127, 2013. p.e6-e245. ISBN 1524-4539 (Electronic) 0009-7322 (Linking).

GONZALEZ, C. L.; KOLB, B. A comparison of different models of stroke on behaviour and brain morphology. In: (Ed.). **Eur J Neurosci**. France, v.18, 2003. p.1950-62. ISBN 0953-816X (Print) 0953-816X (Linking).

GREEN, R. A. O., T.; ASHWOOD, T. Animal models of stroke: do they have value for discovering neuroprotective agents? **Trends in Pharmacology Science**. , v. 24, p. 402-408, 2003.

GROENEWEGEN, H. J. The basal ganglia and motor control. **Neural Plast**, v. 10, n. 1-2, p. 107-20, 2003. ISSN 2090-5904 (Print).

GUILBERT, J. J. The world health report 2002 - reducing risks, promoting healthy life. In: (Ed.). **Educ Health (Abingdon)**. England, v.16, 2003. p.230. ISBN 1357-6283 (Print) 1357-6283 (Linking).

HAMBY, M. E.; SOFRONIEW, M. V. Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. In: (Ed.). **Neurotherapeutics**. United States: Inc. Published by Elsevier Inc, v.7, 2010. p.494-506. ISBN 1878-7479 (Electronic) 1878-7479 (Linking).

HAN, Q. Q. et al. The promotion of neurological recovery in an intracerebral hemorrhage model using fibrin-binding brain derived neurotrophic factor. In: (Ed.). **Biomaterials**. England: 2011 Elsevier Ltd, v.32, 2011. p.3244-52. ISBN 1878-5905 (Electronic) 0142-9612 (Linking).

HARTINGS, J. A., ROLLI, M.L., LU, X.C., TORTELLA, F.C. . Delayed secondary phase of periinfarct depolarizations after focal cerebral ischemia: relation to infarct growth and neuroprotection. . **Journal of Neurosciences**, v. 23, p. 11602-11610, 2003.

HARTMAN, R. et al. Assessing functional outcomes following intracerebral hemorrhage in rats. **Brain Research**, v. 1280, p. 148-157, 2009. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000267909800017 >.

HAUSMANN, R. et al. Immunohistochemical investigations on the course of astroglial GFAP expression following human brain injury. **Int J Legal Med**, v. 113, n. 2, p. 70-5, 2000. ISSN 0937-9827 (Print) 0937-9827 (Linking).

HAYAKAWA, K. et al. High-mobility group box 1 from reactive astrocytes enhances the accumulation of endothelial progenitor cells in damaged white matter. **J Neurochem**, Dec 10 2012. ISSN 1471-4159 (Electronic) 0022-3042 (Linking).

_____. Inhibition of reactive astrocytes with fluorocitrate retards neurovascular remodeling and recovery after focal cerebral ischemia in mice. In: (Ed.). **J Cereb Blood Flow Metab**. United States, v.30, 2010. p.871-82. ISBN 1559-7016 (Electronic) 0271-678X (Linking).

HAYAKAWA, K.; QIU, J. H.; LO, E. H. Biphasic actions of HMGB1 signaling in inflammation and recovery after stroke. **Innate Inflammation and Stroke**, v. 1207, p. 50-57, 2010. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000284744000010 >.

HEISS, W. D. The ischemic penumbra: how does tissue injury evolve? **Ann N Y Acad Sci**, v. 1268, p. 26-34, Sep 2012. ISSN 1749-6632 (Electronic) 0077-8923 (Linking).

HEO, J. H.; HAN, S. W.; LEE, S. K. Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39, n. 1, p. 51-70, 2005. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000230045000003 >.

HOSSMANN, K. A. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 26, n. 7-8, p. 1057-1083, 2006. ISSN 0272-4340. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000242657500001 >.

HUANG, Y. Z.; MCNAMARA, J. O. Ischemic stroke: "Acidotoxicity" is a perpetrator. **Cell**, v. 118, n. 6, p. 665-666, 2004. ISSN 0092-8674. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000223992400001 >.

IHLE-HANSEN, H. et al. Risk factors for and incidence of subtypes of ischemic stroke. In: (Ed.). **Funct Neurol**. Italy, v.27, 2012. p.35-40. ISBN 0393-5264 (Print) 0393-5264 (Linking).

IKRAM, M. A.; WIEBERDINK, R. G.; KOUDSTAAL, P. J. International epidemiology of intracerebral hemorrhage. **Curr Atheroscler Rep**, v. 14, n. 4, p. 300-6, Aug 2012. ISSN 1534-6242 (Electronic) 1523-3804 (Linking).

JAMES, M. L.; WARNER, D. S.; LASKOWITZ, D. T. Preclinical models of intracerebral hemorrhage: A translational perspective. **Neurocritical Care**, v. 9, n. 1, p. 139-152, 2008. ISSN 1541-6933. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000258657500021 >.

JARLESTEDT, K. et al. Attenuation of reactive gliosis does not affect infarct volume in neonatal hypoxic-ischemic brain injury in mice. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e10397, 2010. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking).

JOHNSTON-WILSON, N. L. et al. Disease-specific alterations in frontal cortex brain proteins in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. The Stanley Neuropathology Consortium. **Mol Psychiatry**, v. 5, n. 2, p. 142-9, Mar 2000. ISSN 1359-4184 (Print) 1359-4184 (Linking).

JUNG, J. E. et al. Reperfusion and Neurovascular Dysfunction in Stroke: from Basic Mechanisms to Potential Strategies for Neuroprotection. **Molecular Neurobiology**, v. 41, n. 2-3, p. 172-179, 2010. ISSN 0893-7648. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000278095800012 >.

KEINER, S. et al. Rehabilitative therapies differentially alter proliferation and survival of glial cell Populations in the perilesional zone of cortical infarcts. **Glia**, v. 56, n. 5, p. 516-527, 2008. ISSN 0894-1491. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000254070300004 >.

KELLY, P. J. et al. Functional recovery following rehabilitation after hemorrhagic and ischemic stroke. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 84, n. 7, p. 968-72, Jul 2003. ISSN 0003-9993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12881818> >.

KETTENMANN, H.; VERKHRATSKY, A. Neuroglia: the 150 years after. In: (Ed.). **Trends Neurosci**. England, v.31, 2008. p.653-9. ISBN 0166-2236 (Print) 0166-2236 (Linking).

KIM, S. Y.; JONES, T. A. Lesion size-dependent synaptic and astrocytic responses in cortex contralateral to infarcts in middle-aged rats. **Synapse**, v. 64, n. 9, p. 659-71, Sep 2010. ISSN 1098-2396. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20336630> >.

KNOFLACH, M. et al. Functional recovery after ischemic stroke--a matter of age: data from the Austrian Stroke Unit Registry. In: (Ed.). **Neurology**. United States, v.78, 2012. p.279-85. ISBN 1526-632X (Electronic) 0028-3878 (Linking).

KOLOMINSKI-RIBAS, P. L. W., M.; GEFELLER, O.; NEUNDÖRFER, B.; HEUSCHMANN, P.U. . Epidemiology of ischemic stroke subtypes according to the TOAST criteria: incidence, recurrence, and long-term survival in ischemic stroke subtypes: a population-based study. , 32: . **Stroke**, p. 2735-2740, 2001.

KRAFFT, P. R. et al. Etiology of stroke and choice of models. **Int J Stroke**, v. 7, n. 5, p. 398-406, Jul 2012. ISSN 1747-4949. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22712741> >.

LAKHAN, S. E.; KIRCHGESSNER, A.; HOFER, M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, 2009. ISSN 1479-5876. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000272253900001 >.

- LANGHORNE, P.; BERNHARDT, J.; KWAKKEL, G. Stroke rehabilitation. **Lancet**, v. 377, n. 9778, p. 1693-702, May 2011. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21571152> >.
- LAURENCE, J. A.; FATEMI, S. H. Glial fibrillary acidic protein is elevated in superior frontal, parietal and cerebellar cortices of autistic subjects. In: (Ed.). **Cerebellum**. England, v.4, 2005. p.206-10. ISBN 1473-4222 (Print) 1473-4222 (Linking).
- LAURETANI, F. et al. Rehabilitation in patients affected by different types of stroke. A one-year follow-up study. **Eur J Phys Rehabil Med** v. 46, n. 4, p. 511-516 2010.
- LI, L. et al. Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. In: (Ed.). **J Cereb Blood Flow Metab**. United States, v.28, 2008. p.468-81. ISBN 0271-678X (Print) 0271-678X (Linking).
- LIU, Y.; LIU, X. J.; SUN, D. Ion transporters and ischemic mitochondrial dysfunction. **Cell adhesion and migration**, v. 3, n. 1, p. 94-98, 2009.
- LIZASOAIN, I. et al. Targets of cytoprotection in acute ischemic stroke: present and future. **Cerebrovascular diseases**, v. 21 n. Suppl 2, p. 1-8, 2006.
- LLOYD, J. Heart Disease and Stroke Statistics-2009 Update: A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee (vol 119, pg e21, 2009). **Circulation**, v. 122, n. 1, p. E11-E11, 2010. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000279560800027 >.
- LO, E. H.; DALKARA, T.; MOSKOWITZ, M. A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 5, p. 399-415, 2003. ISSN 1471-0048. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000182665100016 >.
- LO, E. H.; ROSENBERG, G. A. The Neurovascular Unit in Health and Disease Introduction. **Stroke**, v. 40, n. 3, p. S2-S3, 2009. ISSN 0039-2499. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000263594200002 >.
- LOFTSPRING, M. C. et al. Intracerebral hemorrhage leads to infiltration of several leukocyte populations with concomitant pathophysiological changes. In: (Ed.). **J Cereb Blood Flow Metab**. United States, v.29, 2009. p.137-43. ISBN 1559-7016 (Electronic) 0271-678X (Linking).
- LOPEZ-NEBLINA, F.; TOLEDO, A. H.; TOLEDO-PEREYRA, L. H. Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. **Journal of Investigative Surgery**, v. 18, n. 6, p. 335-350, 2005. ISSN 0894-1939. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000234532400009 >.
- LU, A. G. et al. Brain genomics of intracerebral hemorrhage. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 26, n. 2, p. 230-252, 2006. ISSN 0271-678X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000235975600008 >.
- LUNDGREN, J. et al. Site of brain lesion and functional capacity in rehabilitated hemiplegics. **Scand J Rehabil Med**, v. 14, n. 3, p. 141-3, 1982. ISSN 0036-5505 (Print) 0036-5505 (Linking).
- LUSARDI, T. A. et al. Effect of acute calcium influx after mechanical stretch injury in vitro on the viability of hippocampal neurons. **Journal of Neurotrauma**, v. 21, n. 1, p. 61-72, 2004.
- MACLELLAN, C. L. et al. Gauging recovery after hemorrhagic stroke in rats: implications for cytoprotection studies. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 26, n. 8, p. 1031-42, Aug 2006. ISSN 0271-678X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16395282> >.
- _____. A critical threshold of rehabilitation involving brain-derived neurotrophic factor is required for poststroke recovery. In: (Ed.). **Neurorehabil Neural Repair**. United States, v.25, 2011. p.740-8. ISBN 1552-6844 (Electronic) 1545-9683 (Linking).
- _____. Assessing cognitive function after intracerebral hemorrhage in rats. In: (Ed.). **Behav Brain Res**. Netherlands, v.198, 2009. p.321-8. ISBN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking).

_____. Rodent models of intracerebral hemorrhage. In: (Ed.). **Stroke**. United States, v.41, 2010. p.S95-8. ISBN 1524-4628 (Electronic) 0039-2499 (Linking).

_____. Intracerebral hemorrhage models in rat: comparing collagenase to blood infusion. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 28, n. 3, p. 516-525, 2008. ISSN 0271-678X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000253410400009 >.

MANNO, E. M. Update on intracerebral hemorrhage. In: (Ed.). **Continuum (Minneapolis)**. United States, v.18, 2012. p.598-610. ISBN 1080-2371 (Print) 1080-2371 (Linking).

MARRET, S. et al. Effect of ibotenate on brain development: an excitotoxic mouse model of microgyria and posthypoxic-like lesions. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 54, n. 3, p. 358-70, May 1995. ISSN 0022-3069 (Print) 0022-3069 (Linking).

MARTINEZ, F. G. et al. Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the medial amygdala subnuclei across the estrous cycle and in castrated and treated female rats. In: (Ed.). **Brain Res**. Netherlands, v.1108, 2006. p.117-26. ISBN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking).

MASUDA, T. et al. Increase in neurogenesis and neuroblast migration after a small intracerebral hemorrhage in rats. In: (Ed.). **Neurosci Lett**. Ireland, v.425, 2007. p.114-9. ISBN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking).

MAYER, S. A.; RINCON, F. Treatment of intracerebral haemorrhage. **Lancet Neurology**, v. 4, n. 10, p. 662-672, 2005. ISSN 1474-4422. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000232245900023 >.

MCILVOY, L. The effect of hypothermia and hyperthermia on acute brain injury. **AACN Clinical Issues**, v. 16, n. 4 p. 488-500, 2005.

MERGENTHALER, P.; DIRNAGL, U.; MEISEL, A. Pathophysiology of stroke: Lessons from animal models. **Metabolic Brain Disease**, v. 19, n. 3-4, p. 151-167, 2004. ISSN 0885-7490. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000224325500002 >.

MESTRINER, R. G. et al. Skilled reaching training promotes astroglial changes and facilitated sensorimotor recovery after collagenase-induced intracerebral hemorrhage. **Experimental Neurology**, v. 227, n. 1, p. 53-61, 2011.

METZ, G. A.; WHISHAW, I. Q. 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. In: (Ed.). **J Neurosci Methods**. Netherlands, v.115, 2002. p.169-79. ISBN 0165-0270 (Print) 0165-0270 (Linking).

_____. The ladder rung walking task: a scoring system and its practical application. **J Vis Exp**, n. 28, 2009. ISSN 1940-087X (Electronic) 1940-087X (Linking).

MICHALSKI, D. et al. A novel quantification of blood-brain barrier damage and histochemical typing after embolic stroke in rats. **Brain Research**, v. 1359, p. 186-200, 2010. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000283976500019 >.

MIDDELDORP, J.; HOL, E. M. GFAP in health and disease. **Prog Neurobiol**, v. 93, n. 3, p. 421-43, Mar 2011. ISSN 1873-5118 (Electronic) 0301-0082 (Linking).

MIGUEL-HIDALGO, J. J. et al. Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the prefrontal cortex distinguishes younger from older adults in major depressive disorder. In: (Ed.). **Biol Psychiatry**. United States, v.48, 2000. p.861-73. ISBN 0006-3223 (Print) 0006-3223 (Linking).

MORO, C. et al. **Programa de aperfeiçoamento continuado no tratamento do acidente vascular cerebral - Pacto AVC: Sociedade Brasileira de Doenças Cerebrovasculares** 2009.

MOSKOWITZ, M. A.; LO, E. H.; IADECOLA, C. The Science of Stroke: Mechanisms in Search of Treatments. **Neuron**, v. 67, n. 2010, p. 181-198, 2010. ISSN 0896-6273. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000280461500005 >.

MURPHY, T. H.; CORBETT, D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. In: (Ed.). **Nat Rev Neurosci**. England, v.10, 2009. p.861-72. ISBN 1471-0048 (Electronic) 1471-003X (Linking).

NAKAMURA, T. et al. Holo-transferrin and thrombin can interact to cause brain damage. **Stroke**, v. 36, n. 2, p. 348-352, 2005. ISSN 0039-2499. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000226507600052 >.

NAVARATNA, D. et al. Mechanisms and targets for angiogenic therapy after stroke. In: (Ed.). **Cell Adh Migr**. United States, v.3, 2009. p.216-23. ISBN 1933-6926 (Electronic) 1933-6918 (Linking).

NEDELMANN, M. et al. Cerebral embolic ischemia in rats: correlation of stroke severity and functional deficit as important outcome parameter. In: (Ed.). **Brain Res**. Netherlands, v.1130, 2007. p.188-96. ISBN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking).

NOWAK, D. A. G., C.; AMELI, M.; FINK, G.R. . Interhemispheric competition after stroke: brain stimulation to enhance recovery of function of the affected hand. **Neurorehabil Neural Repair**, v. 23, n. 7), p. 641-656, 2009.

OHIRA, K. et al. Truncated TrkB-T1 regulates the morphology of neocortical layer I astrocytes in adult rat brain slices. In: (Ed.). **Eur J Neurosci**. France, v.25, 2007. p.406-16. ISBN 0953-816X (Print) 0953-816X (Linking).

ORAKCIOGLU, B. et al. Evolution of early perihemorrhagic changes - Ischemia vs. edema: An MRI study in rats. **Experimental Neurology**, v. 193, n. 2, p. 369-376, 2005. ISSN 0014-4886. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000229134900010 >.

OTANI, N. et al. Enhanced hippocampal neurodegeneration after traumatic or kainate excitotoxicity. **J Clin Neurosci**, v. 13, n. 9, p. 934-8, Nov 2006. ISSN 0967-5868 (Print) 0967-5868 (Linking).

PAGNUSSAT, A. D. et al. Skilled forelimb reaching in Wistar rats: Evaluation by means of Montoya staircase test. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 177, n. 1, p. 115-121, 2009. ISSN 0165-0270. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000262706300014 >.

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**, v. 1486, p. 53-61, Nov 27 2012. ISSN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993 (Linking).

PAOLUCCI, S. et al. Functional outcome of ischemic and hemorrhagic stroke patients after inpatient rehabilitation a matched comparison. **Stroke**, v. 34, n. 12, p. 2861-2865, 2003. ISSN 0039-2499. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000186980900019 >.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. San Diego: 2004.

PAYLOR, R. et al. The use of behavioral test batteries, II: effect of test interval. In: (Ed.). **Physiol Behav**. United States, v.87, 2006. p.95-102. ISBN 0031-9384 (Print) 0031-9384 (Linking).

PEKKNY, M.; PEKNA, M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. **J Pathol**, v. 204, n. 4, p. 428-37, Nov 2004. ISSN 0022-3417 (Print) 0022-3417 (Linking).

PENHUNE, V. B.; STEELE, C. J. Parallel contributions of cerebellar, striatal and M1 mechanisms to motor sequence learning. In: (Ed.). **Behav Brain Res**. Netherlands: 2011 Elsevier B.V, v.226, 2012. p.579-91. ISBN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking).

PLOUGHMAN, M. et al. Brain-derived neurotrophic factor contributes to recovery of skilled reaching after focal ischemia in rats. In: (Ed.). **Stroke**. United States, v.40, 2009. p.1490-5. ISBN 1524-4628 (Electronic) 0039-2499 (Linking).

PROVENCIO, J. J. Inflammation in subarachnoid hemorrhage and delayed deterioration associated with vasospasm: a review. **Acta Neurochir Suppl**, v. 115, p. 233-8, 2013. ISSN 0065-1419 (Print) 0065-1419 (Linking).

QURESHI, A. I. et al. Extracellular glutamate and other amino acids in experimental intracerebral hemorrhage: An in vivo microdialysis study. **Critical Care Medicine**, v. 31, n. 5, p. 1482-1489, 2003. ISSN 0090-3493. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000182981300029 >.

QURESHI, A. I.; HANLEY, D. F. Spontaneous intracerebral hemorrhage. Reply. **New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 10, p. 770-770, 2001. ISSN 0028-4793. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000170772900022 >.

QURESHI, A. I.; MENDELOW, A. D.; HANLEY, D. F. Intracerebral haemorrhage. In: (Ed.). **Lancet**. England, v.373, 2009. p.1632-44. ISBN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking).

QURESHI, A. I. 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**, v. 38, n. 7, p. 2180-2184, 2007. ISSN 0039-2499. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000247513300046 >.

_____. Apoptosis as a form of cell death in intracerebral hemorrhage. **Neurosurgery**, v. 52, n. 5, p. 1041-1047, 2003. ISSN 0148-396X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000182676100011 >.

RADANOVIC, M. Características do atendimento de pacientes com acidente vascular cerebral em hospital secundário. **Arquivos de Neuro Psiquiatria**, v. 58, n. 1, p. 99-106, 2000.

ROGER, V. L. et al. Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. In: (Ed.). **Circulation**. United States, v.125, 2012. p.e2-e220. ISBN 1524-4539 (Electronic) 0009-7322 (Linking).

ROSENBERG, G. A.; ESTRADA, E. Y.; MOBASHERY, S. Effect of synthetic matrix metalloproteinase inhibitors on lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier opening in rodents: Differences in response based on strains and solvents. **Brain Research**, v. 1133, n. 1, p. 186-192, 2007.

ROSENBERG, G. A. et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. **Stroke**, v. 21, n. 5, p. 801-807, 1990. ISSN 0039-2499. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1990DD82900018 >.

ROSENGREN, L. E. et al. A sensitive ELISA for glial fibrillary acidic protein: application in CSF of children. **J Neurosci Methods**, v. 44, n. 2-3, p. 113-9, Sep 1992. ISSN 0165-0270 (Print) 0165-0270 (Linking).

ROTH, D. L. et al. Race and gender differences in 1-year outcomes for community-dwelling stroke survivors with family caregivers. In: (Ed.). **Stroke**. United States, v.42, 2011. p.626-31. ISBN 1524-4628 (Electronic) 0039-2499 (Linking).

RUTKA, J. T. et al. Effects of antisense glial fibrillary acidic protein complementary DNA on the growth, invasion, and adhesion of human astrocytoma cells. **Cancer Res**, v. 54, n. 12, p. 3267-72, Jun 15 1994. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking).

_____. Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review. **J Neurosurg**, v. 87, n. 3, p. 420-30, Sep 1997. ISSN 0022-3085 (Print) 0022-3085 (Linking).

- SATO, Y. et al. White matter activated glial cells produce BDNF in a stroke model of monkeys. In: (Ed.). **Neurosci Res.** Ireland, v.65, 2009. p.71-8. ISBN 1872-8111 (Electronic) 0168-0102 (Linking).
- SAUR, L. et al. Physical exercise increases GFAP expression and induces morphological changes in hippocampal astrocytes. **Brain Struct Funct**, Jan 4 2013. ISSN 1863-2661 (Electronic) 1863-2653 (Linking).
- SAYAH, S. et al. Expression of cytokines by human astrocytomas following stimulation by C3a and C5a anaphylatoxins: Specific increase in interleukin-6 mRNA expression. **Journal of Neurochemistry**, v. 72, n. 6, p. 2426-2436, 1999. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000080434800023 >.
- SCHAECHTER, J. D. Motor rehabilitation and brain plasticity after hemiparetic stroke. **Progress in Neurobiology**, v. 73, n. 1, p. 61-72, 2004. ISSN 0301-0082. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000222406700002 >.
- SCHALLERT, T. Behavioral tests for preclinical intervention assessment. **NeuroRx**, v. 3, n. 4, p. 497-504, Oct 2006. ISSN 1545-5343. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17012064> >.
- SCHELLINGER, P. D. et al. Stroke MRI in intracerebral hemorrhage: is there a perihemorrhagic penumbra? **Stroke**, v. 34, n. 7 p. 1674-1679, 2003.
- SCHEPERS, V. P. et al. Functional recovery differs between ischaemic and haemorrhagic stroke patients. **J Rehabil Med**, v. 40, n. 6, p. 487-9, Jun 2008. ISSN 1650-1977. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18509566> >.
- SHEN, J. et al. Neurogenesis after primary intracerebral hemorrhage in adult human brain. In: (Ed.). **J Cereb Blood Flow Metab.** United States, v.28, 2008. p.1460-8. ISBN 1559-7016 (Electronic) 0271-678X (Linking).
- SHEN, L. H.; LI, Y.; CHOPP, M. Astrocytic endogenous glial cell derived neurotrophic factor production is enhanced by bone marrow stromal cell transplantation in the ischemic boundary zone after stroke in adult rats. **Glia**, v. 58, n. 9, p. 1074-81, Jul 2010. ISSN 1098-1136 (Electronic) 0894-1491 (Linking).
- SINGH, V. K. et al. Circulating autoantibodies to neuronal and glial filament proteins in autism. In: (Ed.). **Pediatr Neurol.** United States, v.17, 1997. p.88-90. ISBN 0887-8994 (Print) 0887-8994 (Linking).
- SMITH, W. S. Pathophysiology of focal cerebral ischemia: a therapeutic perspective. **Journal of Vascular and Interventional Radiology**, v. 15, p. S3-S12, 2004.
- SOFRONIEW, M. V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. **Trends Neurosci**, v. 32, n. 12, p. 638-47, Dec 2009. ISSN 1878-108X (Electronic) 0166-2236 (Linking).
- SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathol**, v. 119, n. 1, p. 7-35, Jan 2010. ISSN 1432-0533 (Electronic) 0001-6322 (Linking).
- SOZMEN, E. G.; HINMAN, J. D.; CARMICHAEL, S. T. Models that matter: white matter stroke models. **Neurotherapeutics**, v. 9, n. 2, p. 349-58, Apr 2012. ISSN 1878-7479 (Electronic) 1878-7479 (Linking).
- SOZMEN, E. G. et al. A white matter stroke model in the mouse: axonal damage, progenitor responses and MRI correlates. In: (Ed.). **J Neurosci Methods.** Netherlands, v.180, 2009. p.261-72. ISBN 1872-678X (Electronic) 0165-0270 (Linking).
- SZYMANSKA, A. et al. Minocycline and intracerebral hemorrhage: Influence of injury severity and delay to treatment. **Experimental Neurology**, v. 197, n. 1, p. 189-196, 2006. ISSN 0014-4886. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000234534200019 >.

- TAFT, J. R.; VERTES, R. P.; PERRY, G. W. Distribution of GFAP+ astrocytes in adult and neonatal rat brain. **Int J Neurosci**, v. 115, n. 9, p. 1333-43, Sep 2005. ISSN 0020-7454 (Print) 0020-7454 (Linking).
- THEODOSIS, D. T.; POULAIN, D. A.; OLIET, S. H. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron. **Physiol Rev**, v. 88, n. 3, p. 983-1008, Jul 2008. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333 (Linking).
- TURNER, R. C. et al. The science of cerebral ischemia and the quest for neuroprotection: navigating past failure to future success. **J Neurosurg**, Jan 18 2013. ISSN 1933-0693 (Electronic) 0022-3085 (Linking).
- TURNER, R. J.; VINK, R. Combined tissue plasminogen activator and an NK1 tachykinin receptor antagonist: An effective treatment for reperfusion injury following acute ischemic stroke in rats. **Neuroscience**, Jun 2012. ISSN 1873-7544. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22750240> >.
- VERKHRATSKY, A. et al. Neurological diseases as primary gliopathies: a reassessment of neurocentrism. **ASN Neuro**, v. 4, n. 3, 2012. ISSN 1759-0914 (Electronic).
- VIOLA, G. G. et al. Morphological changes in hippocampal astrocytes induced by environmental enrichment in mice. In: (Ed.). **Brain Res**. Netherlands, v.1274, 2009. p.47-54. ISBN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993 (Linking).
- WAGNER, K. R. et al. Heme and iron metabolism: Role in cerebral hemorrhage. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 23, n. 6, p. 629-652, 2003. ISSN 0271-678X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000183489900001 >.
- WANG, S. H. et al. Anhedonia and activity deficits in rats: impact of post-stroke depression. In: (Ed.). **J Psychopharmacol**. United States, v.23, 2009. p.295-304. ISBN 0269-8811 (Print) 0269-8811 (Linking).
- WHISHAW, I. Q.; OCONNOR, W. T.; DUNNETT, S. B. The contributions of motor cortex, nigrostriatal dopamine and caudate-putamen to skilled forelimb use in the rat. **Brain**, v. 109, p. 805-843, 1986. ISSN 0006-8950. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1986F041300001 >.
- WINDLE, V. et al. An analysis of four different methods of producing focal cerebral ischemia with endothelin-1 in the rat. **Exp Neurol**, v. 201, n. 2, p. 324-34, Oct 2006a. ISSN 0014-4886. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16740259> >.
- WOODLEE, M. T. et al. Testing forelimb placing "across the midline" reveals distinct, lesion-dependent patterns of recovery in rats. **Experimental Neurology**, v. 191, n. 2, p. 310-317, 2005. ISSN 0014-4886. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000226637800009 >.
- XAVIER, L. L. et al. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase. **Brain Res Brain Res Protoc**, v. 16, n. 1-3, p. 58-64, Dec 2005. ISSN 1385-299X (Print) 1385-299X (Linking).
- XI, G. H.; KEEP, R. F.; HOFF, J. T. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage. **Lancet Neurology**, v. 5, n. 1, p. 53-63, 2006. ISSN 1474-4422. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000234328100028 >.
- YANAGISAWA, M. et al. A NOVEL PEPTIDE VASOCONSTRICTOR, ENDOTHELIN, IS PRODUCED BY VASCULAR ENDOTHELIUM AND MODULATES SMOOTH-MUSCLE CA-2+ CHANNELS. **Journal of Hypertension**, v. 6, p. S188-S191, 1988. ISSN 0263-6352. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1988T395200056 >.
- ZAZULIA, A. R. et al. Hypoperfusion without ischemia surrounding acute intracerebral hemorrhage. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 21, n. 7, p. 804-810, 2001. ISSN 0271-678X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000169653700005 >.
- ZHANG, D. et al. Astroglialosis in CNS pathologies: is there a role for microglia? **Mol Neurobiol**, v. 41, n. 2-3, p. 232-41, Jun 2010. ISSN 1559-1182 (Electronic) 0893-7648 (Linking).

ZILLES, K. et al. Mapping of glial fibrillary acidic protein-immunoreactivity in the rat forebrain and mesencephalon by computerized image analysis. **J Comp Neurol**, v. 308, n. 3, p. 340-55, Jun 15 1991. ISSN 0021-9967 (Print)
0021-9967 (Linking).