



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
CELULAR E DO DESENVOLVIMENTO**

**Histopatologia do Córtex Motor Cerebral em Modelo
de Acidente Vascular Isquêmico em Camundongo**

JUÇARA LOLI DE OLIVEIRA

FLORIANÓPOLIS, 2014.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
CELULAR E DO DESENVOLVIMENTO**

**Histopatologia do Córtex Motor Cerebral em Modelo
de Acidente Vascular Isquêmico em Camundongo**

JUÇARA LOLI DE OLIVEIRA

Tese apresentada Pós-Graduação em
Biologia Celular e do
Desenvolvimento da Universidade
Federal de Santa Catarina, para
obtenção de Título de Doutor em
Biologia Celular e do
Desenvolvimento.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Alvarez-
Silva

FLORIANÓPOLIS, 2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

OLIVEIRA, JUÇARA LOLI DE

Histopatologia do Córtex Motor Cerebral em Modelo de
Acidente Vascular Isquêmico em Camundongo / JUÇARA LOLI DE
OLIVEIRA ; orientador, Marcio Alvarez-Silva -
Florianópolis, SC, 2014.

76 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. isquemia
cerebral. 3. cortex motor. 4. astrogliose. 5.
citoarquitetura. I. Alvarez-Silva, Marcio. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III.
Título.

O conhecimento deve ser dividido, aperfeiçoado, e os méritos devem ser reconhecidos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Professor Dr. Marcio Alvarez-Silva, pelo aceite e orientação desta tese, e pela oportunidade de desenvolver o trabalho desta pesquisa em seu laboratório, utilizando reagentes e equipamentos, fundamentais para a obtenção dos resultados e conclusão desta pesquisa.

A professora Andréa Gonçalves Trentin por disponibilizar, seu laboratório e equipamentos que permitiram o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Programa e a Coordenação da Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, pelo empenho e dedicação profissional, que solidificam o curso, compartilhando aperfeiçoamento científico e intelectual, na formação de mestres e doutores.

A instituição, Universidade Federal de Santa Catarina e ao Centro de Ciências Biológicas, pela apoio e incentivo na formação acadêmica.

Aos profissionais e amigos do LAMEB (laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia) Chirle Ferreira, Demétrio Gomes Alves, Emily Daiana dos Santos, pela dedicação, profissionalismo e preciosa colaboração nos trabalhos de pesquisas da UFSC, fundamentais no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos amigos e colegas do curso, especialmente Rodrigo Willamil Dos Santos e Eder Carlos Schmidt, por compartilharem experiências, conhecimento e dicas importantes.

Ao professor Eduardo Cargin Ferreira pelas recomendações destinadas no procedimento histológico.

Em especial, a minha família, que sempre incentivou o aperfeiçoamento profissional, e soube compreender a total ausência neste período de formação.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram e participaram desse estudo e que não foram aqui citados, meu muito obrigado!

RESUMO

Modelo experimental de isquemia cerebral focal em camundongos C57/BL6 resultou em isquemia patológica no córtex cerebral. Neste estudo, a isquemia focal foi induzida pela oclusão da artéria cerebral média. Analisamos as camadas corticais I, II/III, V and VI nas áreas motoras *caudal forelimb area* (CFA) e *medial agranular cortex* (AGm) em Grupos controle e isquêmico. Nossos resultados demonstraram evidentes diferenças morfológicas e quantitativas em neurônios normais, neurônios isquêmicos, astrócitos e microglia-like localizados nas camadas superficial (II/III) e profunda (V). Alterações patológicas celulares foram mais proeminentes, na camada V, da CFA, mostrando picnose nuclear, fragmentação da cromatina, degeneração principalmente em neurônios, como também, evidências morfológicas de apoptose. A área cortical motora CFA, foi severamente comprometida pelo insulto isquêmico comparado a área AGm, revelando neuroinflamação no tecido pela da proliferação de astrócitos e microglia-like.

Também identificamos alterações celulares nas áreas motoras AGm e CFA, após 48 horas, de isquemia focal experimental, empregando procedimento histológico padrão com as colorações de Hematoxilina–Eosina (H&E) e Nissl e imunomarcacão com NeuN, GFAP e Caspase-3. Entre as alterações patológicas o edema celular foi observado em neurônios e astrócitos, devido a lesão isquêmica especialmente na CFA. O edema é uma severa complicação clínica que ocorre em muitas doenças neurovasculares, e constitui uma das maiores causas de morbidade e morte em todo o mundo. Verificamos neste modelo, que o evento hipóxico/isquêmico foi associado com edema citotóxico e edema vasogênico. A permanente oclusão vascular resultou na redução do fluxo sanguíneo para o cérebro e conseqüentemente acúmulo de líquido em neurônios e astrócitos principalmente no córtex motor primário (referido como CFA). Alterações vasculares foram caracterizadas por descontinuidade endotelial e evidente hipertrofia de astrócitos em torno do edema vasogênico. Gliose reativa foi caracterizada por alterações específicas na morfologia dos astrócitos e aumento na síntese de *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP) e cicatriz glial. Baseados em nossos resultados, concluímos que o modelo de isquemia focal em camundongos, determinou importante astrogliose, na camada V da CFA, e a AGm não demonstrou esta alteração patológica.

Palavras-chave isquemia cerebral, cortex motor, astrogliose, citoarquitetura, apoptose, edema.

ABSTRACT

Experimental focal cerebral ischemia results in cortical brain lesion followed by ischemic stroke. In this study, focal cerebral ischemia was induced in mice by occlusion of the middle cerebral artery. We studied I, II/III, V and VI cortical layers in caudal forelimb area (CFA) and medial agranular cortex (AGm) from control and ischemic motor cortex C57BL/6 mice. We observed significant differences in the extent of the neurons, ischemic neurons, astrocytes and microglia in the superficial II/III and deep V cortical layers analyzed in CFA and AGm motor cortex. We verified that the cellular changes were more prominent on V layer of primary motor cortex (CFA) with nuclear pyknosis, chromatin fragmentation, necrosis and degeneration, as well as, morphologic evidence of apoptosis mainly in neurons. As result, the caudal forelimb area (CFA) was more severity impaired than medial agranular cortex (AGm) in focal cerebral ischemic model. This was evident with proliferation of astrocytes that could result in neuroinflammation by microglia-like cells.

This study described pathologic variations produced by ischemic lesion in mice, especially in the AGm and CFA, after forty-eight hours of the focal ischemia, by histologic procedure standard with Hematoxilina–Eosina (H&E) e Nissl staining and immunohistochemistry with NeuN, GFAP e Caspase-3 antybody. The results revealed pronounced edema in the neurons and astrocytes with altered nuclear volume. Brain edema is a severe clinical complication in a number of pathologies, and it is a major cause of increased morbidity and death worldwide. Cerebral hypoxia/ischemia is associated with cytotoxic edema and vasogenic edema. In a mouse model of ischemic lesion, we observed permanent vascular occlusion, resulting in reduced blood flow to the brain, swollen neurons and pronounced cytotoxic astrocyte swelling, as well as neuropathological indications of vasogenic edema, especially in the primary motor of the cortex (CFA). Vascular damage was characterized by endothelial discontinuity and evident reactive astrocyte hypertrophy around areas of vasogenic edema. Reactive astrogliosis was characterized by specific alterations of astrocyte morphology with pronounced upregulation of Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) expression and scar formation. Based on results from our mouse model of focal cerebral ischemia, it was concluded that reactive astrogliosis was prominent in layer V of CFA motor cortex, while no layer of AGm demonstrated such abnormality.

Keywords: cerebral ischemia, motor cortex, reactive astrogliosis, cytoarchitecture, apoptosis, edema.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama da Vascularização do Encéfalo em ratos. Mostra a origem da ACM na artéria carótida interna e sua distribuição no córtex cerebral (Longa, E.Z. <i>et al</i> , 1989).	23
Figura 2 - Diagrama com a representação das áreas de Penumbra e o Centro isquêmico.	25
Figura 3 - Campo cirúrgico entre a órbita esquerda e orelha externa esquerda.....	35
Figura 4 - Campo cirúrgico entre a órbita esquerda e orelha externa esquerda, mostrando ressecção do músculo temporal, acesso a fossa temporal e posição da ACM.	36
Figura 5 - Imunofluorescência de secção coronal do córtex cerebral de camundongos, demonstrando as áreas motoras AGm e CFA, e a citoarquitetura com a disposição das camadas corticais representadas por números romanos. Barra 500 μm	38
Figura 6 - Representação da área Teste para Quantificação de 140x105 μm (14700 μm^2) (córtex cerebral de camundongos). Barra 500 μm	39
Figura 7 - Secção coronal do córtex cerebral do grupo controle corados com Nissl, demonstrando neurônios com morfologia normal nas áreas motoras AGm e CFA. Barra 50 μm	43
Figura 8 - Secção coronal do córtex cerebral do grupo isquêmico corados com Nissl, demonstrando neurônios com alterações morfológicas (picnose e retração) e degeneração nas áreas motoras do córtex cerebral AGm e CFA. Barra 50 μm	45
Figura 9 - Secção coronal do córtex cerebral do grupo isquêmico corados com H&E, demonstrando edema vasogênico e edema em núcleos de astrócitos e neurônios nas áreas motoras AGm e CFA. Barra 50 μm	45
Figura 10 - Análise Quantitativa de células nas camadas II/III e V, das áreas motoras AGm e CFA, entre os grupos controle e isquêmico. Os dados foram apresentados como mediana \pm quartil do grupo controle (5 secções/animal) e isquêmico (5 secções/animal). Significante correlação entre os grupos controle e isquêmico foi indicada por asteriscos, Teste não paramétrico de Mann-Whitney (U). (A) Expressa a densidade de neurônios (células/ μm^2), com morfologia nuclear normal, * $p < 0,001$. (B) Expressa a densidade de neurônios (células/ μm^2) com alterações na morfologia nuclear, * $p < 0,001$. (C) Expressa a soma de astrócitos (células/ μm^2), * $p < 0,001$, ** $p < 0,001$. (D) Expressa a soma de núcleos de microglia-like (células/ μm^2), * $p < 0,001$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,04$	47

Figura 11 - Imunohistoquímica para caspase-3 nas áreas AGm e CFA do grupo isquêmico, mostrou a expressão da caspase-3 (marrom claro) em neurônios. Barra: 20 μ m (Ver fotos complementares publicadas em Oliveira J.L. <i>et al</i> , 2014, Journal Chemical Neuroanatomy).....	48
Figura 12 - Secção coronal do córtex cerebral do grupo isquêmico corados com H&E, demonstrando núcleos de neurônios com edema e picnose nas áreas motoras AGm e CFA. Barra 50 μ m (Ver fotos publicadas em Oliveira J.L. <i>et al</i> , 2014, Journal Chemical Neuroanatomy).	49
Figura 13 - Imunofluorescência para NeuN nas áreas motoras AGm e CFA do grupo controle. Barra: 200 μ m (Ver fotos complementares publicadas em Oliveira J.L. <i>et al</i> , 2014, Journal Chemical Neuroanatomy).	50
Figura 14 - Imunofluorescência para NeuN nas áreas motoras AGm e CFA do grupo isquêmico. Barra: 200 μ m (Ver fotos complementares publicadas em Oliveira J.L. <i>et al</i> , 2014, Journal Chemical Neuroanatomy).	50
Figura 15 - Imunofluorescência para GFAP nas áreas motoras AGm e CFA do grupo controle. Barra: 200 μ m (Ver fotos complementares publicadas em Oliveira J.L. <i>et al</i> , 2014, Journal Chemical Neuroanatomy).	52
Figura 16 - Imunofluorescência para GFAP nas áreas motoras AGm e CFA do grupo isquêmico. Barra: 200 μ m (Ver fotos complementares publicadas em Oliveira J.L. <i>et al</i> , 2014, Journal Chemical Neuroanatomy).	52
Figura 17 - Imunohistoquímica para GFAP nas áreas motoras AGm e CFA do grupo controle, os astrócitos não expressaram imunomarcção. Barra: 50 μ m (Ver fotos complementares publicadas em Oliveira J.L. <i>et al</i> , 2014, Journal Chemical Neuroanatomy).	53
Figura 18 - Imunohistoquímica para GFAP nas áreas motoras AGm e CFA do grupo isquêmico, os astrócitos expressaram intensa imunomarcção (processo denominado de astrogliose) em torno de capilares sanguíneos com evidente edema perivascular. Barra: 50 μ m (Ver fotos complementares publicadas em Oliveira J.L. <i>et al</i> , 2014, Journal Chemical Neuroanatomy).	54

LISTA DE ABREVIATURAS

AVE	Acidente Vascular Encefálico
ACM	Artéria Cerebral Média
AIF	Fator de Indução da Apoptose
AGm	Medial Agranular Córtex
ATP	Trifosfato de Adenosina
BHE	Barreira Hematoencefálica
CFA	Caudal Forelimb Area
CEUA	Comitê de Ética em Uso de Animais
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAPI	4', 6-Diamino-2-phenylindole dihydrochloride
FBS	Soro Fetal Bovino
H&E	Hematoxilina-Eosina
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IGF-1	Fator de Crescimento semelhante Insulina -1
K +	Potássio
Na +	Sódio
PBS	Solução salina Tamponada com Fosfato
SDF-1 α	Fator 1 derivado de células estromais
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TGF-1 β	Fator Transformante de Crescimento Tumoral Beta
GFAP	Proteína ácida fibrilar Anti-gliar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 CÓRTEX MOTOR E SISTEMA MOTOR	21
1.2 FISIOLOGIA DO TECIDO NERVOSO	22
1.3 ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO OU ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL	23
1.3.1 Isquemia Cerebral Focal	24
1.3.2 Isquemia Cerebral Global	25
1.4 NEUROPATOLOGIA DA ISQUEMIA CEREBRAL	25
1.5 ISQUEMIA CEREBRAL E INFLAMAÇÃO	26
1.6 ISQUEMIA CEREBRAL E EDEMA	27
1.7 ISQUEMIA CEREBRAL E MORTE CELULAR	28
2. JUSTIFICATIVA:	31
3. OBJETIVOS:	33
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	33
4. Metodologia	35
4.1 MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA	35
4.1.1- Animais	35
4.1.2 Procedimentos para a realização da isquemia cerebral focal	35
4.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA TÉCNICAS HISTOLÓGICAS	37
4.3. TÉCNICAS HISTOMORFOLÓGICAS	37
4.4 LOCALIZAÇÃO DA ÁREA MOTORA DO CÓRTEX.....	38
4.5 QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS	39
4.6 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	40
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5 Resultados	43
5.1 HISTOLOGIA DO CÓRTEX MOTOR	43
5.2 HISTOPATOLOGIA DO CÓRTEX MOTOR	44
5.2.1 Análise Quantitativa do Córtex Motor	46
5.2.2 Apoptose em neurônios	47
5.2.3 Edema, resposta dos neurônios à isquemia cerebral.....	48
5.2.4 Edema, resposta Vascular à Isquemia Cerebral.....	51

5.2.5 Edema e astrócitos reativos em Resposta à isquemia cerebral.....	51
6 DISCUSSÃO.....	55
7 CONCLUSÕES.....	61
8 PERSPECTIVAS.....	63
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÓRTEX MOTOR E SISTEMA MOTOR

O córtex cerebral é constituído de neurônios e neuroglia ou glia (astrócitos, oligodentrócitos, microglia). As células que constituem o córtex cerebral se organizam em padrões caracterizados por arranjos laminares e colunares, cujos prolongamentos e conexões caracterizam a circuitaria neural (Meneses, 2006).

Estas células nervosas se dispõem em camadas, podendo apresentarem variações na concentração e na espessura relativa das camadas, dependendo da área cortical. Com base nas variações regionais de sua citoarquitetura, o córtex cerebral foi dividido em diferentes áreas corticais em cinco grupos fundamentais por Von Economo, em 1927. Os grupos ou tipos 2, 3 e 4 caracterizam-se por conter seis camadas típicas, são denominados homotípicos, como o córtex cerebral de camundongos. Os tipos 1 e 5, por não apresentarem as seis camadas bem definidas, são denominados heterotípicos. Apesar de mais antigo, o mapa citoarquitetônico mais conhecido é o do histologista alemão Kobinian Brodmann, feito em 1909, que identificou 52 regiões diferentes que foram numeradas para designar as áreas corticais e suas funções.

Estudos demonstraram que a integração de qualquer atividade específica não ocorre apenas em uma determinada área cortical primária e sim, abrange circuitos neurais distribuídos em áreas secundárias, e mesmo terciárias, de integração do estímulo e/ou informação (Neafsey e Sievert, 1982; Meneses, 2006).

O sistema motor é um complexo sistema que inclui várias regiões do cérebro e áreas do corpo, que contribuem para a produção do movimento (Tracy, 2003). Em decorrência do sistema motor estar diretamente, relacionado ao sistema sensorial, é muitas vezes, denominado sistema sensoriomotor.

Em roedores, o córtex motor é formado pelas áreas denominadas *medial agranular cortex* (AGm), muitas vezes descrita como área pré-motora, e pela *caudal forelimb area* (CFA) (Tennant *et al.*, 2011; Zeiler *et al.*, 2013).

A área AGm tem acesso direto ao córtex motor primário, como também à medula espinhal (Dancause *et al.*, 2006; Nudo, 1990). Estudos mostram que a AGm pode reorganizar-se em dias ou semanas após isquemia cerebral focal, favorecendo a recuperação (Zeiler *et al.*, 2013). A CFA tem importante papel no aprendizado e execução das respostas motoras, fazendo a integração sensoriomotora e o preciso

controle dos movimentos voluntários (Graziano, 2009; Hatsopoulos e Suminski, 2011). A atividade dos neurônios no córtex motor correlaciona-se à força muscular e ao movimento (Evarts, 1968; Cheney e Fetz, 1980) e, também com complexos movimentos das mãos e braços (Schwartz, 1994; Georgopoulos *et al.*, 1982).

1.2 FISILOGIA DO TECIDO NERVOSO

Aproximadamente 10% da glicose disponível no sangue é extraída e fosforilada pelo cérebro, sendo 80% dela utilizada para a formação de energia. O restante é utilizado para síntese de neurotransmissores, gorduras e algumas proteínas. O cérebro ao contrário de outros tecidos, armazena muito pouca glicose. O fluxo sanguíneo cerebral (FSC) é de 60ml/100g de cérebro por minuto; na ausência deste fluxo o cérebro dispõe de energia apenas para poucos minutos. Existe a auto regulação cerebral, um processo onde estão envolvidas fibras nervosas do sistema nervoso autônomo e consiste na manutenção do FSC, mesmo com oscilações da pressão de perfusão cerebral. A barreira hematoencefálica regula a composição iônica e molecular extracerebral dentro de limites estreitos e é muito importante para a homeostase cerebral. Pequenas alterações de sódio, glutamato ou colina afetam muito a função neuronal. A velocidade de transporte de glicose ao nível cerebral é de duas a três vezes mais rápida que seu metabolismo mas é extremamente dependente de sua concentração plasmática. Assim, a redução de 1/3 na glicemia causa diversas alterações para o tecido nervoso e para seu metabolismo (Batter e Leor, 2006).

As membranas dos neurônios e das células gliais se despolarizam depois da falência das bombas dependentes de energia e permitem o influxo de íons sódio, cálcio e o fluxo de potássio (Dugan e Choi, 1994). Níveis elevados de cálcio intracelulares ativam lipases e proteases intracelulares que determinam destruição celular. A despolarização pré-sináptica libera quantidades anormais de neurotransmissores que potencializam ainda mais a lesão (Mitani *et al.*, 1993). Muitos destes eventos são reversíveis se o FSC for restabelecido rapidamente, entre 15 e 30 minutos, e se não houverem variantes associadas como a hiperglicemia.

1.3 ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO OU ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL

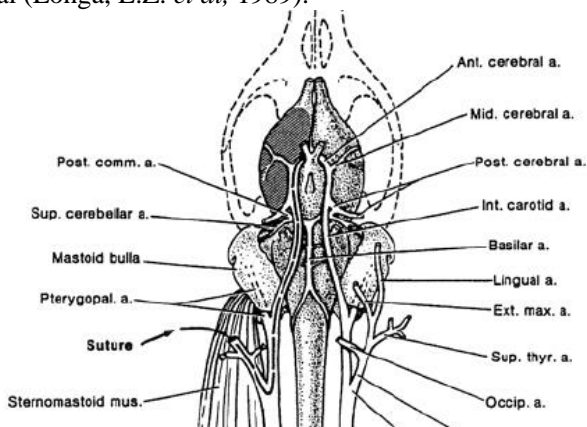
Os acidentes vasculares encefálicos (AVEs) são clinicamente definidos como uma alteração neurológica caracterizada pela rápida progressão dos sintomas de perda de função cerebral, resultante de um processo isquêmico ou hemorrágico (Feuerstein e Wang, 2000).

O acidente vascular encefálico (AVE) é a maior causa de morbidade e mortalidade, ocasionando um elevado custo nos cuidados clínicos em países industrializados. Aproximadamente metade dos pacientes que são hospitalizados por enfermidades neurológicas, são por diagnóstico de AVE (Onténiente *et al.*, 2003).

O AVE abrange a isquemia cerebral, que ocorre pela oclusão de artérias cerebrais em virtude de um trombo ou êmbolo, reduzindo o suprimento sanguíneo, e o acidente vascular hemorrágico, por formação de coágulo intracerebral ou subaracnóideo (Kunz *et al.*, 2010).

A oclusão da Artéria Cerebral Média (ACM) representa a forma mais prevalente de AVE e corresponde aproximadamente, 60% das isquemias em humanos (Modo *et al.*, 2000).

Figura 1 - Diagrama da Vascularização do Encéfalo em ratos. Mostra a origem da ACM na artéria carótida interna e sua distribuição no córtex cerebral (Longa, E.Z. *et al.*, 1989).



A ACM irriga a região lateral e posterior do córtex frontal, região lateral e anterior do córtex parietal, como também, estruturas subcorticais, tais como núcleos da base e cápsula interna (Winstein *et al.*, 1999). A ACM se distribui no território de representação cortical das

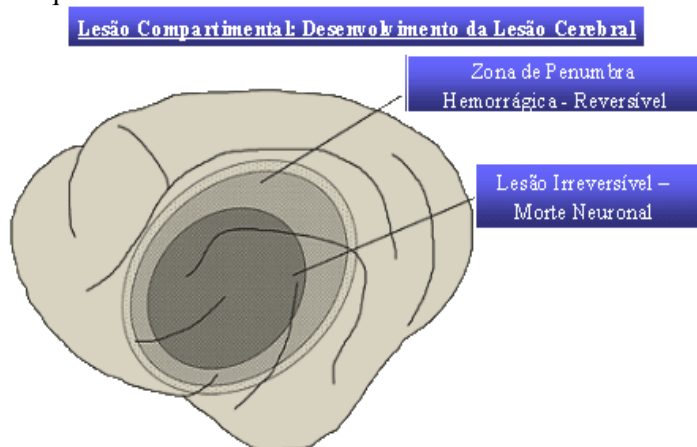
funções motora, somatosensitiva, linguagem e cognitiva. A isquemia cerebral representa a maior causa de desabilidade em adultos, afeta o córtex motor, normalmente conduzindo a déficits motores e sensitivos que afetam membros, áreas da linguagem e a face (Winstein *et al.*, 1999; Biernaskie e Corbett, 2001; Wang *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2002b).

Após o evento isquêmico, o sistema motor pode reorganizar parcial ou totalmente a função motora (Hospa e Luft, 2011).

1.3.1 Isquemia Cerebral Focal

A isquemia cerebral focal é o resultado de uma redução temporária ou permanente do fluxo sanguíneo restrito ao território de uma artéria cerebral e é tipicamente causada pela oclusão embólica ou trombótica de vasos extra e intracranianos. Em geral, o fluxo sanguíneo para a região central e para o leito vascular isquêmico fica muito reduzido, porém, quase nunca chega a zero devido ao enchimento colateral que ocorre. O fluxo sanguíneo fica moderadamente reduzido para as áreas de transição entre o tecido de perfusão normal e o núcleo central gravemente isquêmico. Esta área, denominada de centro isquêmico, é caracterizada por diminuição do oxigênio e dos estoques de ATP que, inevitavelmente, resulta na falência metabólica e morte das células em minutos, a não ser que, o fluxo sanguíneo seja rapidamente restaurado (Kunz, *et al.*, 2010). O halo moderadamente isquêmico foi chamado de Zona de Penumbra, está em torno do centro isquêmico com redução menos severa do fluxo sanguíneo, região de tecido cerebral em que a atividade neuronal foi suprimida, mas ainda potencialmente viável.

Figura 2 - Diagrama com a representação das áreas de Penumbra e o Centro isquêmico.



Embora estas células tenham um tempo de vida mais longo, a contínua privação leva a morte celular. A isquemia cerebral pode causar sinais ou sintomas clínicos, que perduram por quinze a trinta minutos, mas que levam à necrose irreversível de alguns neurônios específicos. O infarto da região é inevitável se a isquemia durar mais de uma hora (Ginsberg, 1997).

1.3.2 Isquemia Cerebral Global

A isquemia cerebral global é causada, tipicamente, por assistolia cardíaca ou fibrilação ventricular, reduzindo o fluxo sanguíneo a zero em todo o território vascular. A isquemia cerebral global por mais de cinco a dez minutos, é incompatível com a recuperação da consciência em indivíduos normotérmicos (Ginsberg, 1997).

1.4 NEUROPATOLOGIA DA ISQUEMIA CEREBRAL

Os eventos que podem ocorrer na isquemia cerebral são (Taylor *et al.*, 1996; Franseva *et al.*, 2001):

- 1- Autólise cerebral: Decorre da perda total do FSC, acompanhada de autodigestão enzimática.
- 2- Infarto cerebral: Decorre de oclusão arterial e caracteriza-se por necrose de neurônios e células da glia e, em algumas áreas, de células endoteliais.

3- Necrose isquêmica seletiva dos neurônios: Atinge áreas cerebrais mais susceptíveis à hipóxia; apesar de limitada a um pequeno número de neurônios, causa déficits intensos, inclusive cognitivos.

4- Desmielinização: Ocorre na substância branca central dos neurônios, em decorrência da intoxicação cerebral de CO₂ originada pela hipóxia prolongada.

5- Trombose retrógrada: Mecanismo de aumento da área de isquemia e que pode causar aumento progressivo da sintomatologia.

1.5 ISQUEMIA CEREBRAL E INFLAMAÇÃO

O mecanismo fisiopatológico responsável pela maioria das isquemias cerebrais é determinado pela oclusão das artérias carótidas e vasos cerebrais (Emsey e Tyrell, 2002). As consequências para o tecido cerebral, quando ocorre redução do aporte de O₂ e glicose, podem se manifestar em uma cascata de eventos que levam à necrose tecidual. No centro isquêmico, onde o fluxo sanguíneo reduz drasticamente, o tecido é perdido rapidamente como consequência da morte celular por necrose devido a hipóxia e perda de energia. Com o avanço da isquemia, seguem a reperfusão do tecido afetado e vários outros processos incluindo inflamação, excitotoxicidade, produção de óxido nítrico, radicais livres, e necrose tecidual. Dentro de minutos ou horas de redução do FSC, ocorre recrutamento de leucócitos, ativação e adesão ao endotélio da microvasculatura cerebral e trans-migração de neutrófilos e monócitos/macrófagos na área de infarto (Garcia *et al.*, 1994). A reperfusão pode influenciar a extensão do processo inflamatório.

A inflamação compreende componentes moleculares e celulares em resposta à injúria ou infecção na tentativa de defesa, conduzindo ao dano e morte celular. Estudos experimentais tem mostrado que o evento celular inflamatório ocorre entre a interface da microcirculação e células endoteliais, produzindo localmente citocinas, como interleucina 1 beta (IL-1 β) interleucina (IL-6), quimiocinas, fator 1 derivado de célula estromal (SDF-1α), fator de necrose tumoral (TNF-α), óxido nítrico e neurotransmissores (glutamato) liberados pela micróglia, astrócitos, células endoteliais e neurônios (Del Zoppo *et al.*, 2000). Estes fatores interrompem a barreira hematoencefálica (BHE) e recrutam monócitos e linfócitos para o lado da inflamação e adicional recrutamento de micróglia residente e estimulação de astrogliose, proliferação de astrócitos e micróglia. Tal recrutamento de células torna-se ativo e libera

mais fatores inflamatórios, que resulta em danos aos neurônios e leva a consequências nocivas e positivas para a neurogênese (Whitney *et al.*, 2009).

Os astrócitos apresentam um papel fundamental no suporte trófico e metabólico dos neurônios (Harald, 2001; Dional e Hertz, 2001), regulando a atividade neuronal e neurotransmissão sináptica, importantes para a homeostase do SNC (Araque, 2006). Finalmente, os astrócitos, juntamente com a micróglia, em processos patológicos, estão sujeitos à condição de reação astrogliar, e sua relevância nos processos de neurodegeneração são reconhecidos (Oliveira *et al.*, 2008). Os insultos cerebrais estimulam uma reação astrogliar específica, conhecida como gliose reativa, considerada como instrumento que limita as áreas cerebrais lesionadas (Pekny e Nilsson, 2005). Algumas funções realizadas pela astroglia e o tipo de insulto que afeta os astrócitos, determinam seu envolvimento nas enfermidades cerebrais, em maior ou menor extensão e a sobrevivência do parênquima cerebral (Chvátal *et al.*, 2008). Embora a ativação de astrócitos secreta diferentes fatores neurotróficos para a neuronal sobrevivência, acredita-se que uma rápida e severa ativação aumente ou inicie uma resposta inflamatória, levando à morte neuronal e lesão no cérebro (Tani *et al.*, 1996).

1.6 ISQUEMIA CEREBRAL E EDEMA

O edema cerebral é uma complicação clínica severa em muitas patologias e é a maior causa no aumento de morbidade e mortalidade. Edema citotóxico é uma consequência comum em encefalopatia hepática, trauma e isquemia cerebral. (Pasantes-Morales e Vázquez-Juárez, 2012). O tipo mais comum de edema citotóxico é o que ocorre em estados isquêmicos e de hipóxia e também descrito como edema isquêmico. Clinicamente, este tipo de edema envolve também edema nos vasos sanguíneos. O aumento de água no parênquima cerebral está relacionado a um gradiente osmótico que se estabelece devido à lesão no tecido. Nos estágios iniciais, a acumulação citotóxica de líquido está relacionada à privação aguda de glicose e oxigênio, desenvolvendo um distúrbio na osmoregulação celular, que depende principalmente da bomba Na⁺ e K⁺ e envolve energia. Na oclusão arterial permanente, o edema citotóxico progride e leva a mudanças no tecido, que normalmente determinam a ruptura da barreira hemato-encefálica em relação a proteínas, introduzindo o edema nos vasos. Com a progressão da injúria isquêmica, o compartimento extracelular torna-se rapidamente aumentado, determinando alterações nas membranas das células e

morte. Os catabólitos provenientes da desintegração celular necrótica e as proteínas plasmáticas induzem a um pronunciado aumento na osmolaridade e no volume de água. Assim, o edema isquêmico está associado a injúria severa no tecido nervoso, a remoção dos debris e a digestão das proteínas pode ser acompanhado por microglia e macrófagos, em contraste ao edema nos vasos, onde o tecido é usualmente melhor preservado e a remoção das proteínas plasmáticas extravasadas é realizada pelos astrócitos (Klatzo, 1987). Astrócitos regulam a ativação neuronal através da captação de potássio extracelular, mantendo um apropriado gradiente de íons, como um importante mecanismo para a regulação do volume celular em condições normais e patológicas (Jayakumar e Norenberg, 2010).

1.7 ISQUEMIA CEREBRAL E MORTE CELULAR

O tipo de morte celular mais comum em isquemia cerebral é a necrose tecidual, diante do fracasso energético, mas também pode ocorrer morte celular por apoptose. O desenvolvimento progressivo de necrose neuronal ocorre após permanente oclusão arterial, assim, intervenções terapêuticas devem ser iniciadas dentro de uma a duas horas após a oclusão, com a possibilidade de alterar a resposta histopatológica desta injúria (Garcia *et al.*, 1994). Atualmente, inúmeras pesquisas correlacionam a extensão do déficit neurológico com o número de neurônios necróticos. Em isquemia cerebral aguda ocorrem os dois tipos de morte celular (Arango-Davila, *et al.*, 2004).

A isquemia cerebral desencadeia uma sequência de fenômenos moleculares que se iniciam com o fracasso energético relacionado com a interrupção dos processos de fosforilação oxidativa e déficits na produção de trifosfato de adenosina (ATP). A interrupção dos gradientes iônicos transmembrana, devido a falhas na bomba de sódio-potássio ATPase e outras bombas dependentes de energia, são fatores relacionados com os mecanismos fisiopatológicos da isquemia e, especialmente, da morte celular. Os neurônios e as células da glia se despolarizam exageradamente pela entrada de sódio, cloro, cálcio e água no citoplasma e aumento no potássio extracelular (Hansen, 1985; Blank e Kirshner, 1996). O fracasso energético associado às mudanças iônicas ocasiona aumento de glutamato, o que determina aumento na concentração de cálcio intracelular conduzindo à despolarização e aumentando o gasto energético na área de perinfarto. O aumento de cálcio, junto com a acidose e a despolarização, contribui com o início da lesão, seguido de inflamação e ativação de apoptose (Arango-Davila,

2004). A isquemia cerebral desencadeia uma série complexa de eventos moleculares, entre os quais, a ativação e expressão de genes. Alguns destes fenômenos partem da reação direta à injúria neuronal e outros a mecanismos de reparação do tecido. Muitos outros processos têm influência no dano ao tecido pela isquemia, como a liberação de citocinas, ativação de proteases de serina e a diferenças na vulnerabilidade à isquemia de alguns grupos neuronais (por exemplo, os das camadas III e V do córtex no hipocampo de ratos). Na isquemia cerebral focal, estudos relacionam a indução de genes e fatores, como o de necrose tumoral (TNF), fator de crescimento tumoral (TGF β 1), fator de crescimento ligado a insulina (IGF-1), indução de apoptose (AIF), entre outros. Assim, a capacidade de um neurônio expressar um ou outro fator, está relacionada com sua vulnerabilidade específica à isquemia e à morte celular necrótica ou apoptótica. A apoptose é um complexo processo envolvendo ativação de cisteínas proteases da família das caspases, alterações na membrana plasmática, condensação do DNA nuclear e fragmentação (Bredesen, 1995). Durante processos de excitotoxicidade, radicais livres na membrana mitocondrial medeiam a liberação de fatores apoptóticos e citocromo c da mitocôndria que ativam caspases, finalmente produzindo a apoptose (Enari *et al.*, 1998).

2. JUSTIFICATIVA:

Muitas espécies, incluindo primatas, porcos, cães, coelhos, ratos, e camundongos, são utilizados como modelos animais no estudo de enfermidades neurológicas. Camundongos são modelos bem caracterizados em genética e biologia molecular e um aumento no número de estudos em AVE tem ocorrido desde 1990. São bem aceitos como modelos de acidente vascular isquêmico, por apresentarem pequeno tamanho, fácil monitoramento das variáveis fisiológicas, acesso a estruturas vasculares e facilidade de obtenção para suficiente resultado estatístico.

O uso e o desenvolvimento de modelos animais em AVE, são desenvolvidos, com o objetivo de identificar os mecanismos que causam dano ao tecido, e estabelecer em nível pré-clínico, a base para determinar fatores de riscos, processos de reparação neural, neuroproteção e o desenvolvimento de novas terapias anti-inflamatórias.

Modelos animais em neurodegeneração são cruciais para melhorar o entendimento das características gerais de morte neuronal e de células não neuronais, para a avaliação das diferenças neuropatológicas que afetam o sistema nervoso central. A avaliação histológica constitui um importante indicador pré-clínico que fundamenta estudos de recuperação do tecido nervoso e estratégias terapêuticas para o tratamento das doenças cerebrovasculares.

3. OBJETIVOS:

3.1 OBJETIVO GERAL

Descrever os efeitos da isquemia cerebral focal no córtex motor de camundongos C57/BL6 utilizando o modelo de oclusão do ramo distal da ACM.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Descrever as características morfológicas gerais das células distribuídas nas áreas do córtex motor AGm e CFA, em animais controle.

Determinar quais áreas e camadas do córtex motor foram mais comprometidas com o procedimento de isquemia experimental.

Identificar os eventos histopatológicos e descrever as alterações celulares nas áreas motoras AGm e CFA, após 48 horas de isquemia focal experimental, empregando procedimento histológico padrão e imunomarcção com NeuN, GFAP e Caspase-3.

Avaliar por meio de análise quantitativa, a proporção de neurônios intactos (nomais) e isquêmicos nas áreas motoras AGm e CFA, determinando áreas viáveis e o centro isquêmico no tecido nervoso.

Avaliar, por meio da quantificação de células da neurógli (astrócitos e microglia), o padrão da resposta neuroinflamatória no parênquima.

Verificar quais células nervosas demonstraram maior suscetibilidade a alteração celular isquêmica.

4. Metodologia

4.1 MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA

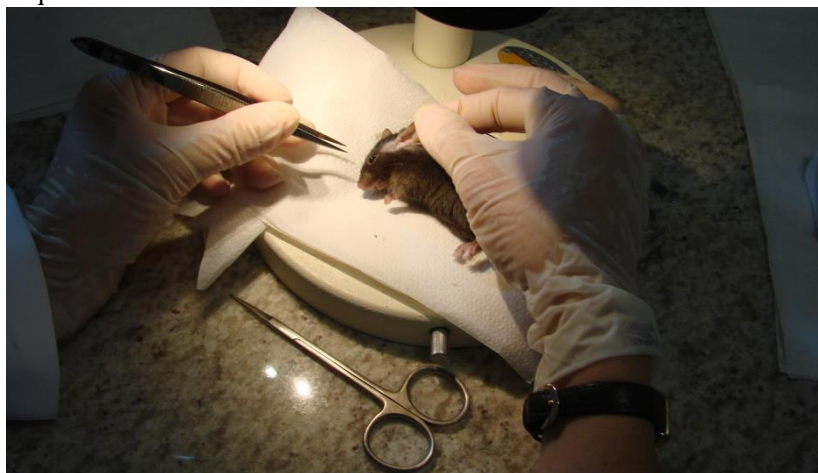
4.1.1- Animais

No presente estudo foi utilizado camundongos C57/BL6 machos para o procedimento de isquemia cerebral focal experimental por oclusão da ACM, fornecidos pelo Biotério Setorial do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG/UFSC). Os animais foram preservados em gaiolas de plástico contendo maravalha, em ambiente com temperatura e umidade controladas, ciclo/escuro de 12 horas, ração e água 'ad libitum'. Animais adultos de dois a três meses (peso corporal, 65g), foram divididos em grupo controle, com seis animais sem a intervenção cirúrgica, e grupo isquêmico, contendo seis animais submetidos a isquemia cerebral focal permanente, na ACM do hemisfério cerebral esquerdo.

4.1.2 Procedimentos para a realização da isquemia cerebral focal

A anestesia foi induzida por administração intraperitoneal de ketamina (50mg/kg) e xilazina (5mg/kg). Após anestesia, a preparação cirúrgica iniciou com tricotomia dos pêlos no campo cirúrgico, entre a parte lateral da órbita esquerda e a orelha externa esquerda.

Figura 3 - Campo cirúrgico entre a órbita esquerda e orelha externa esquerda.



Com auxílio de uma lupa (SZ2-LGB, Olympus) foi realizada uma incisão na pele, rebatendo-a e expondo o músculo temporal para ressecção junto à inserção no osso temporal e zigomático e acesso à fossa temporal com modificação (Kuraoka *et al.*, 2009).

Figura 4 - Campo cirúrgico entre a órbita esquerda e orelha externa esquerda, mostrando ressecção do músculo temporal, acesso a fossa temporal e exposição da ACM.



Foi realizado um desgaste junto do osso temporal por meio de micromotor (LB100, Beltec) para localização da porção distal da ACM esquerda, e oclusão por eletrocauterização com bisturi eletrônico (BE 3000, KVN). Todos os animais, após 48 horas da cirurgia, foram novamente anestesiados para processo de perfusão intracardíaca com solução fisiológica, e posteriormente com solução fixadora de paraformaldeído a 4% diluído em 0.1ml de PBS a pH 7,2. Em seguida, os encéfalos foram removidos do crânio e a fixação foi complementada em paraformaldeído (Sigma®) a 4%, por 48 horas, para rotina histológica.

Os protocolos experimentais de manejo dos animais utilizados neste projeto de pesquisa, seguiram as normas internacionais de experimentação com animais de laboratório. Este projeto foi aprovado pela: Comissão de Ética no uso de animais da Universidade Federal de Santa Catarina através de número de protocolo **CEUA PP 00791**. Todos os procedimentos foram realizados com os cuidados necessários para reduzir ao máximo o número de animais empregados e seu sofrimento.

4.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

As peças foram lavadas em água corrente durante duas horas, seguindo desidratação em etanol e metodologia de rotina para a inclusão em parafina purificada (Vetec®), a 58°C.

Desidratação e inclusão em parafina: Etanol 70% (12 horas), Etanol 80% (60 minutos), Etanol 90% (60 minutos), Etanol absoluto 100% I (60 minutos), Etanol absoluto II (60 minutos), Etanol-Xilol 1/1 (60 minutos), Xilol I (60 minutos), Xilol II (60 minutos), Parafina I (60 minutos), Parafina II (60 minutos), Parafina III (60 minutos).

Após inclusão em parafina, os blocos foram seccionados em uma série de cortes coronais com espessura de 5 µm utilizando um micrótomo Leica RM 2025. Esta sequência de cortes foi orientada do lobo frontal ao lobo parietal. Os cortes foram estirados e recolhidos em um banho termostático a 45°C e montados sobre lâminas gelatinizadas para sua fácil adesão.

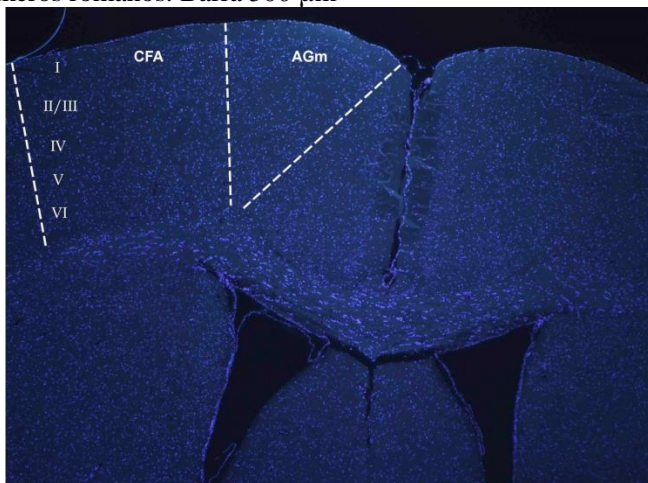
4.3. TÉCNICAS HISTOMORFOLÓGICAS

As amostras de córtex cerebral obtidas foram desparafinadas em xileno durante 20 minutos, e hidratadas em concentrações decrescentes de etanol (100%, 80%, 70%) por 5 minutos, lavadas em água destilada e submetidas à coloração de Hematoxilina–Eosina (H&E) e Nissl à 0,1% (CAPUTO, *et al*, 2009). As preparações histológicas para coloração de H&E foram dispostas em uma solução de Hematoxilina de Harris (Sigma®), água corrente e água amoniacal, e água corrente durante 1 minuto. As preparações histológicas para coloração de Nissl foram dispostas numa solução de Cresil Violeta (Sigma®) (0,1g), Água Milli-Q (100ml) e Ácido Acético (Vetec®) (10%), durante 1 minuto. Passado esse tempo, as lâminas foram então lavadas, desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 100%), diafanizadas em xilol e montadas em Entelan (Merck®). As lâminas foram analisadas qualitativamente e fotografadas em um microscópio óptico (Olympus, BX 41) com um sistema digital de captura de imagens (Q-capture Pro 5.1) acoplado a uma câmara (QColor 3C, Q-imaging).

4.4 LOCALIZAÇÃO DA ÁREA MOTORA DO CÓRTEX

Para identificação das áreas motoras e a citoarquitetura do córtex cerebral, imagens digitais de cortes histológicos coronais corados com Nissl do hemisfério cerebral esquerdo, foram adquiridos em objetiva de 4x, utilizando microscópio Olympus BX41, para identificar as áreas motoras do córtex AGm e CFA (Tennant *et al.*, 2011; Zeiler *et al.*, 2013), (Figura 1) e comparados à secção coronal equivalente estabelecida no Atlas de Cérebro de Camundongos (Franklin & Paxinos, 2008). A principal referência usada para localizar as áreas motoras foram o corpo caloso e o ventrículo lateral (Figuras 22 a 26) (Franklin & Paxinos, 2008). As áreas foram delineadas com base na posição estereotáxica das estruturas cerebrais com distâncias predeterminadas do bregma (0,62 mm a 1,10 mm) e interaural (4,42 mm a 4,90 mm). Para identificar as camadas corticais I, II/III, V, VI, cada corte foi analisado em escala gradual com objetivas de 10, 40 e 100x e esta última escala, foi adotada como padrão para identificação morfológica de células normais e alteradas entre os grupos controle e isquêmico. Este estudo, concentrou-se nas camadas superficial (II/III) e profunda (V), da AGm e CFA, respectivamente, uma vez que as mesmas demonstraram evidentes alterações estruturais com o procedimento experimental de isquemia.

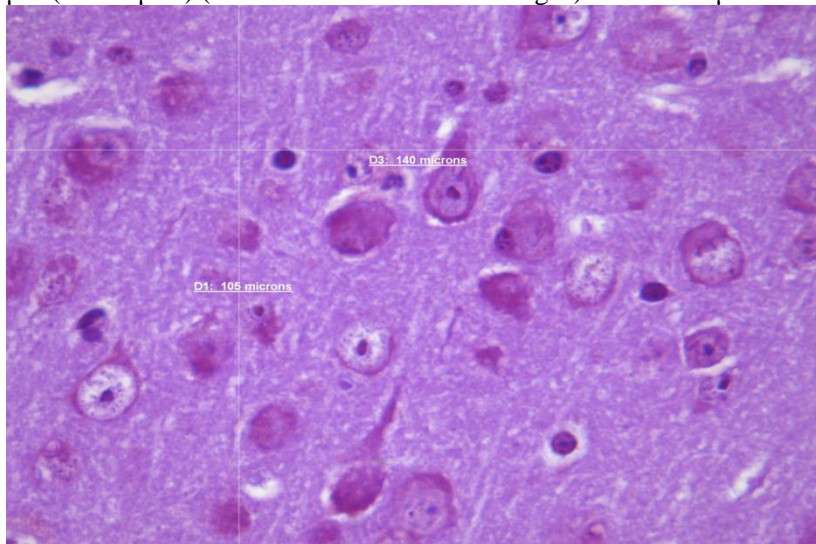
Figura 5 - Imunofluorescência de secção coronal do córtex cerebral de camundongos, demonstrando as áreas motoras AGm e CFA, e a citoarquitetura com a disposição das camadas corticais representadas por números romanos. Barra 500 μ m



4.5 QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS

O procedimento para a contagem de células foi determinado pelo reconhecimento da morfologia dos núcleos obtidos pela coloração de Nissl. A quantificação da citoarquitetura cortical, foi realizada por meio de imagens obtidas em objetivas de (40 e 100x) das camadas superficial (II/III) e profunda (V) da AGm e CFA respectivamente, para o grupo controle (n=6) e grupo isquêmico (n=6). Foram quantificados neurônios normais, neurônios isquêmicos, astrócitos e microglia-like em quatro campos (AGm superficial e profunda, utilizando as coordenadas 0 a 1, e para CFA superficial e profunda, as coordenadas 1 a 2) (Franklin & Paxinos, 2008), com $140 \times 105 \mu\text{m}$ como área teste em μm^2 , e ampliação com objetiva de 100X.

Figura 6 - Representação da área Teste para Quantificação de $140 \times 105 \mu\text{m}$ ($14700 \mu\text{m}^2$) (córtex cerebral de camundongos). Barra 500 μm



Os padrões celulares foram quantificados nas regiões do córtex do hemisfério cerebral esquerdo, considerando as linhas proibidas, não foram contadas as células que tocavam a margem superior e margem direita da área teste, descritas por Pakkenberg & Gundersen, (1977).

Foram analisados e fotografados 5 cortes por animal, que totalizou 30 cortes no grupo (controle) e 30 no grupo (isquêmico).

4.6 IMUNOHISTOQUÍMICA

Secções do cortex cerebral foram desparafinizadas a 45°C, tratadas com xileno e álcool (70, 90, 80, e 100%), e então lavadas com solução de tampão fosfato (PBS). Em seguida, a peroxidase endógena foi bloqueada por incubação com solução de peróxido de hidrogênio 3% diluído em metanol absoluto durante 30 minutos. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato a 0,01 M por 40 minutos (pH 6.0) à 93-96°C, por 45 minutos. Os cortes foram lavados com PBS acrescido de 0,1% de Tween e os sítios antigênicos inespecíficos, foram bloqueados com soro fetal bovino (FBS) a 10%, durante 30 minutos.

As secções foram incubadas durante 14 horas, em câmara úmida, a 4°C, com os anticorpos primários *caspase-3 rabbit polyclonal* (1:50, Abcam 13847), *Monoclonal Mouse Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP) (1:50, Cell Signaling, 3670) e *Neuronal nuclei* (NeuN) (1:100, Millipore, MAB 377). Após incubação, as secções foram lavadas com PBS Tween 0,1%, durante 15 minutos, seguidas por incubação com anticorpo secundário biotilado (Sigma) durante 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, as secções foram lavadas com PBS Tween 0,1% por 15 minutos, e incubadas com estreptavidina conjugada com peroxidase (1:200) (Sigma), por 40 minutos. As secções foram lavadas e incubadas com 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) como cromógeno (Sigma), acrescido de peróxido de hidrogênio durante 15-20 segundos. A reação foi interrompida com água destilada, por 5 minutos. E finalmente, os cortes foram contracorados com solução de hematoxilina durante 5 minutos e lavadas em água corrente.

Para análise de imunofluorescência as secções do cortex cerebral foram preparadas como descritas acima. Sítios antigênicos inespecíficos foram bloqueados com FBS 10%. As amostras foram incubadas com anticorpo primário GFAP (1:50, Cell Signaling, 3670) e NeuN (1:100, Millipore, MAB 377) durante 14 horas, em câmara úmida, a 4°C. As secções foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpos secundários Alexa Fluor 594 imunoglobulina (IgG, GFAP), e Alexa Fluor 488 imunoglobulina (IgG, NeuN) (Invitrogen) por 2 horas, em temperatura ambiente. A marcação nuclear foi realizada com 4', 6-Diamino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Sigma). As análises de imunofluorescência foram realizadas com microscópio (Olympus, BX 41), utilizando filtros apropriados. As imagens foram capturadas com o sistema de captura Olympus Q-Color3™ Imaging System.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

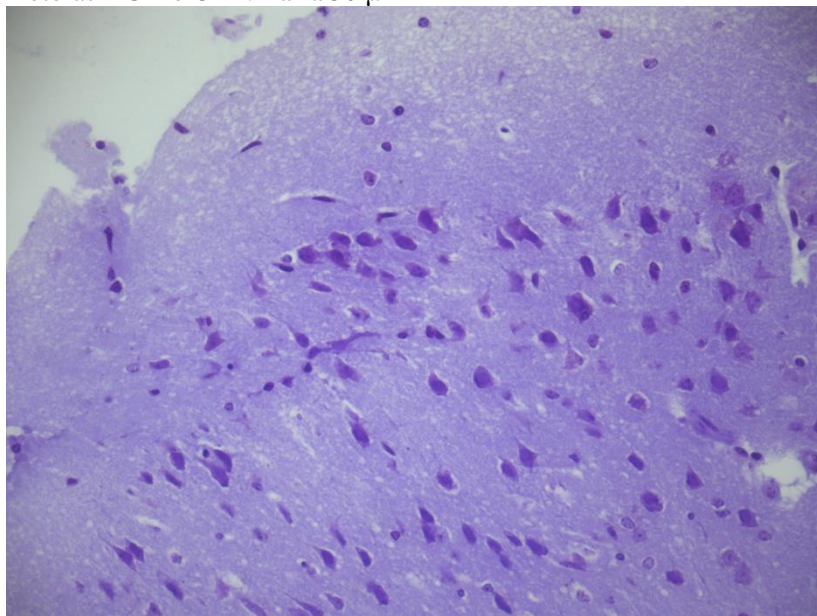
Para verificação da condição de normalidade dos dados relativos a quantificação das células, foi inicialmente utilizado o teste Shapiro-Wilk. Em seguida, foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney (U), para avaliar a ocorrência de diferenças significativas entre os grupos controle e isquêmico. A mediana e os quartis foram as medidas representativas das amostras. Os testes foram processados no Programa Estatística 8, com significância estatística considerada para valores de $p < 0,05$.

5 Resultados

5.1 HISTOLOGIA DO CÓRTEX MOTOR

A análise morfológica qualitativa revelou os diferentes tipos celulares do neurópilo do AGm e CFA em camundongos C57/BL6. Baseados na microscopia de luz, analisamos a morfologia dos núcleos de neurônios, astrócitos e microglia. Os neurônios foram identificados pela forma triangular do núcleo (Figura 7), correspondendo aos neurônios piramidais e pelo núcleo arredondado apresentando um a dois nucléolos, caracterizando neurônios não piramidais (Figura 7 e 8). Os astrócitos foram identificados por meio do núcleo esférico e arranjo heterogêneo da cromatina (Figura 12). A microglia apresentou núcleo alongado e afilado (Figura 12), bem distinto dos neurônios e astrócitos (Marks et al., 2001; Arango-Davila et al., 2004; Güler et al., 2009; Mărgăritescu et al., 2009; Garman, 2011).

Figura 7 - Secção coronal do córtex cerebral do grupo controle corados com Nissl, demonstrando neurônios com morfologia normal nas áreas motoras AGm e CFA. Barra 50 μ m



No grupo controle as camadas corticais II/III da AGm revelaram prodomínio de neurônios piramidais com morfologia normal (Figura 7) e raros astrócitos. A camada cortical profunda (V) da AGm mostrou neurônios piramidais e arredondados (Figura 7) e poucos astrócitos. A área motora primária (CFA) nas camadas II/III e V mostrou prodomínio de neurônios com núcleos arredondados e morfologia normal, com poucos astrócitos. Alterações patológicas não foram observadas nas camadas corticais da AGm e CFA do grupo controle (Figura 7).

5.2 HISTOPATOLOGIA DO CÓRTEX MOTOR

Por meio da técnica histomorfológica de H&E e Nissl (Caputo *et al.*, 2009), verificou-se a extensão da lesão isquêmica no córtex frontoparietal, evidenciando células com morfologia normal e morfologia alterada. Avaliamos o número de células que apresentaram retração e picnose nuclear, alteração da cromatina e, caracterizamos este padrão morfológico como isquêmico. Nas camadas II/III da AGm e CFA, neurônios mostraram morfologia patológica isquêmica (Figuras 8, 9), porém este padrão foi mais evidente na camada V das áreas AGm e CFA, revelando elevado número de neurônios com retração nuclear, picnose, alteração da cromatina, associado a edema celular e degeneração (Figura 8). A análise histológica das amostras dos grupos controle (Figura 7) e isquêmico (Figura 8) mostrou diferenças morfológicas, compatíveis com achados isquêmicos (Garcia *et al.*, 1997; Dias *et al.*, 2000; Zeng and Xu, 2000; Arango-Davila *et al.*, 2004; Muller *et al.*, 2004; Back *et al.*, 2004; Gurer *et al.*, 2009; Margaritescu *et al.*, 2009; Garman, 2011).

Figura 8 - Secção coronal do córtex cerebral do grupo isquêmico corados com Nissl, demonstrando neurônios com alterações morfológicas (picnose e retração) e degeneração nas áreas motoras do córtex cerebral AGm e CFA . Barra 50 μ m

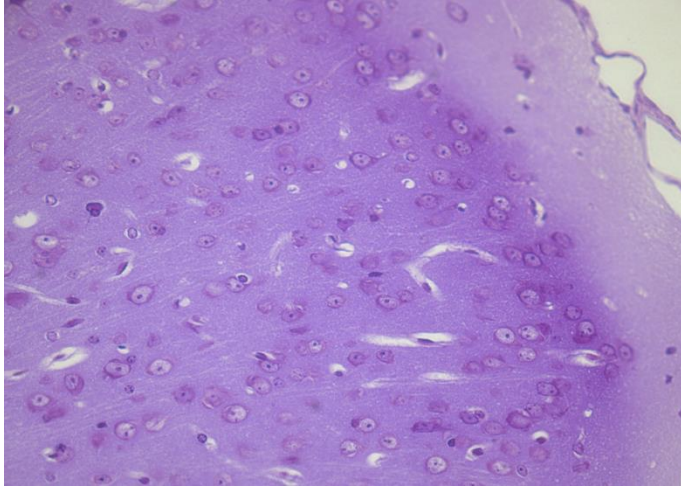
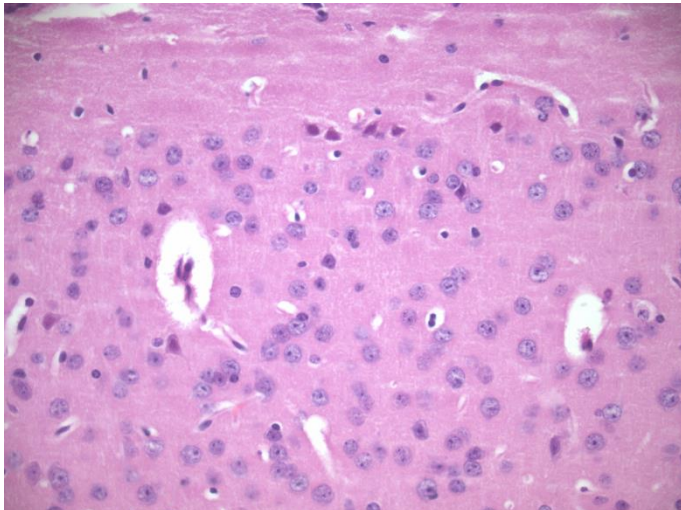


Figura 9 - Secção coronal do córtex cerebral do grupo isquêmico corados com H&E, demonstrando edema vasogênico e edema em núcleos de astrócitos e neurônios nas áreas motoras AGm e CFA. Barra 50 μ m



5.2.1 Análise Quantitativa do Córtex Motor

A caracterização de células viáveis e isquêmicas e a resposta inflamatória foi determinada pela quantificação dos núcleos celulares de: i.neurônios normais; ii.neurônios isquêmicos; iii.astrócitos; iiiii.micrógliia-like (núcleos selhantes à microglia) (Figuras 10 A-D).

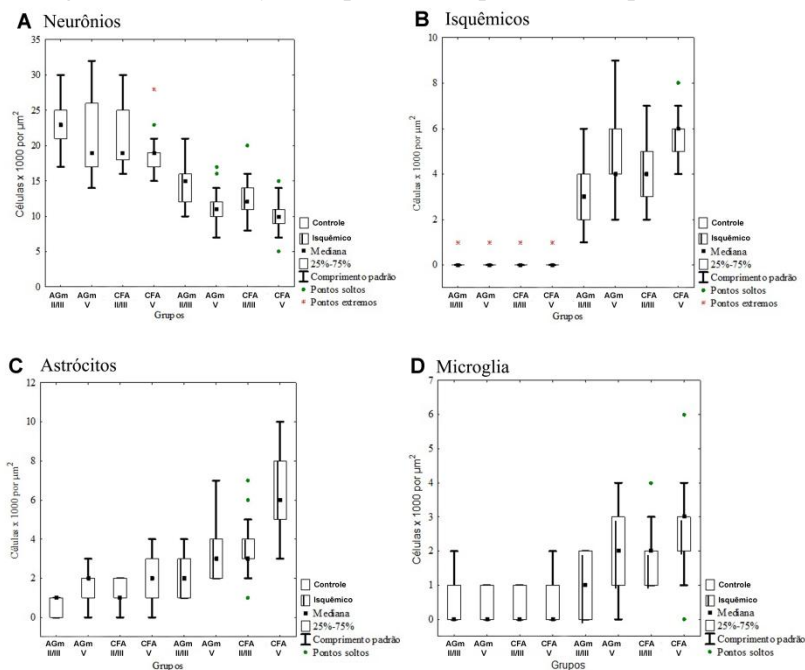
Neurônios: A análise quantitativa (Figura 10 A) de neurônios normais (viáveis), com morfologia nuclear íntegra, sem redução do volume e coloração homogênea, revelou diferenças significativas entre os Grupos (Controle) e (Isquêmico). Este padrão morfológico foi predominante nas camadas II/III/AGm ($U=10.674$), V/AGm ($U=9.000$), e nas camadas II/III/CFA ($U=19.500$) e V/CFA ($U=0.500$) do grupo controle.

A Figura 10 B, mostra que os neurônios isquêmicos foram distribuídos nas camadas II/III e V da AGm e CFA. A quantidade de neurônios isquêmicos, foi maior nas camadas II/III e V do córtex de CFA e também, na camada V de AGm (Figura 10 B).

Astrócitos: A análise quantitativa (Figura 10 C) indicou que o número de astrócitos foi significativamente maior no grupo isquêmico quando comparado ao grupo controle, nas camadas II/III/AGm ($U=52.500$), V/AGm ($U=108.000$), camadas II/III/CFA ($U=37.500$) e camada V/CFA ($U=9.500$) (Figura 10 C). Notavelmente, o número de astrócitos quantificados na camada V de CFA no grupo isquêmico foi mais expressivo.

Microglia: A quantidade de células microglia-like indicou diferenças entre o Grupo controle e o isquêmico (Figura 10 D). Estas células foram mais numerosas no grupo isquêmico, nas camadas II/III/AGm ($U=206.500$) e V/AGm ($U=73.500$), camadas II/III/CFA ($U=36.000$) e V/CFA ($U=45.000$). A camada V das áreas AGm e CFA do Grupo isquêmico mostrou maior quantidade de células microglia-like em relação as camadas II/III das mesmas áreas. O Grupo controle demonstrou menor quantidade de microglia like nas áreas motoras AGm e CFA (Figura 10 D).

Figura 10 - Análise Quantitativa de células nas camadas II/III e V, das áreas motoras AGm e CFA, entre os grupos controle e isquêmico. Os dados foram apresentados como mediana±quartil do grupo controle (5 secções/animal) e isquêmico (5 secções/animal). Significante correlação entre os grupos controle e isquêmico foi indicada por asteriscos, Teste não paramétrico de Mann-Whitney (U). **(A)** Expressa a densidade de neurônios (células/ μm^2), com morfologia nuclear normal, * $p < 0,001$. **(B)** Expressa a densidade de neurônios (células/ μm^2) com alterações na morfologia nuclear, * $p < 0,001$. **(C)** Expressa a soma de astrócitos (células/ μm^2), * $p < 0,001$, ** $p < 0,001$. **(D)** Expressa a soma de núcleos de microglia-like (células/ μm^2), * $p < 0,001$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,04$.

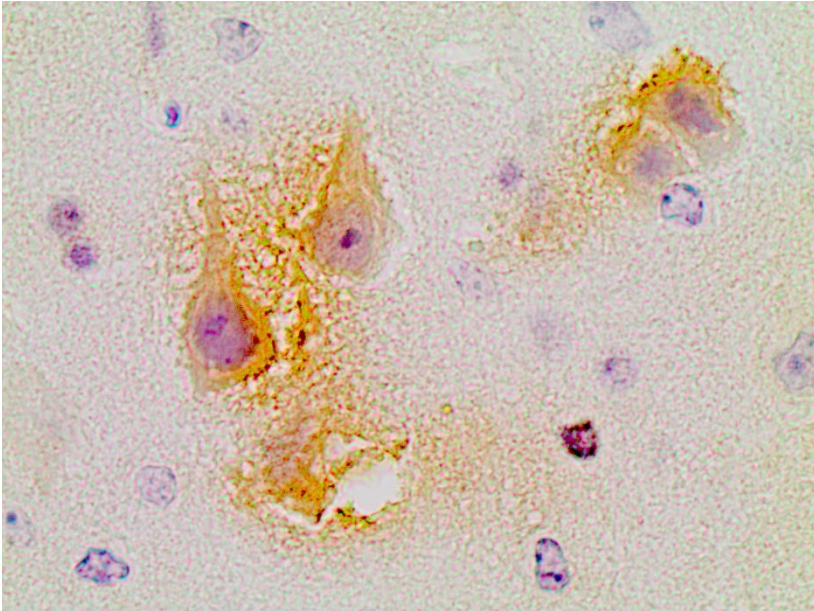


5.2.2 Apoptose em neurônios

Avaliamos a expressão de caspase-3 nas áreas do córtex motor AGm e CFA do Grupo controle e isquêmico. A imureatividade para caspase-3 foi positiva para neurônios do grupo isquêmico, (Figura 11) distribuídos nas camadas II/III e V da AGm, como também, nas camadas II/III e V da CFA. No Grupo isquêmico, a expressão de

caspace-3 nas camadas II/III da AGm ocorreu em raros neurônios quando comparado às demais áreas. O grupo controle para caspace-3 não mostrou imunoreatividade nas camadas II/III e V das áreas AGm e CFA.

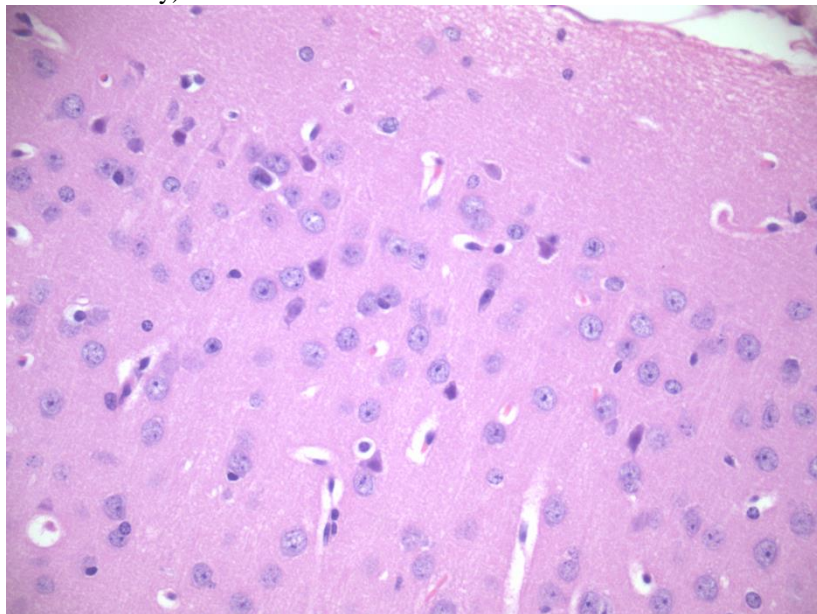
Figura 11 - Imunohistoquímica para caspace-3 nas áreas AGm e CFA do grupo isquêmico, mostrou a expressão da caspace-3 (marrom claro) em neurônios. Barra: 20 µm (Ver fotos complementares publicadas em Oliveira J.L. *et al*, 2014, Journal Chemical Neuroanatomy).



5.2.3 Edema, resposta dos neurônios à isquemia cerebral

Por meio da coloração Hematoxilina–Eosina nossos resultados demonstraram morfologia compactável a edema neuronal. Estas células apresentaram evidente aumento de volume do núcleo, coloração pálida, desorganização e fragmentação da cromatina, e muitos nucléolos degenerados (Figuras 12). Este padrão morfológico foi distinto das características verificadas no grupo controle, que não demonstraram alteração do volume nuclear, apresentaram coloração homogênea, integridade da cromatina, e não mostraram retração e picnose em núcleos de neurônios (Figura 12).

Figura 12 - Secção coronal do córtex cerebral do grupo isquêmico corados com H&E, demonstrando núcleos de neurônios com edema e picnose nas áreas motoras AGm e CFA. Barra 50 μ m (Ver fotos publicadas em Oliveira J.L. *et al*, 2014, Journal Chemical Neuroanatomy).



Para caracterizar a distribuição e a viabilidade neuronal entre as camadas corticais da AGm e CFA utilizamos anti-NeuN (Figuras 13 e 14). A proporção de células reativas para NeuN fluorescência, na camada II/III da AGm do grupo controle (Figuras 13), foi 96%, comparado a 60% no grupo isquêmico (Figuras 14). Na camada V da AGm, a marcação NeuN positiva foi detectada em 60% no grupo controle, e 30% no isquêmico. Na camada II/III da CFA a quantidade na expressão de células NeuN positivas no grupo controle foi em torno de 62%, e 60% no grupo isquêmico. Na camada V da CFA, a NeuN imunomarcação ocorreu em 66% no grupo controle (Figura 13) e 40%, no isquêmico (Figura 14).

Figura 13 - Imunofluorescência para NeuN nas áreas motoras AGm e CFA do grupo controle. Barra: 200 μm (Ver fotos complementares publicadas em Oliveira J.L. *et al*, 2014, Journal Chemical Neuroanatomy).

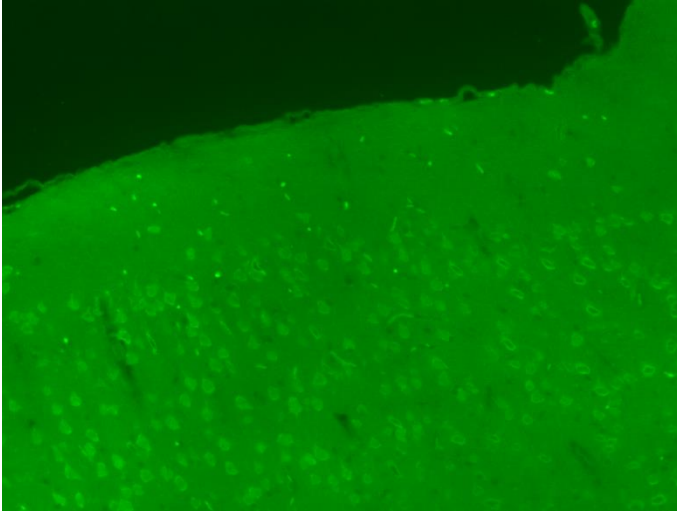
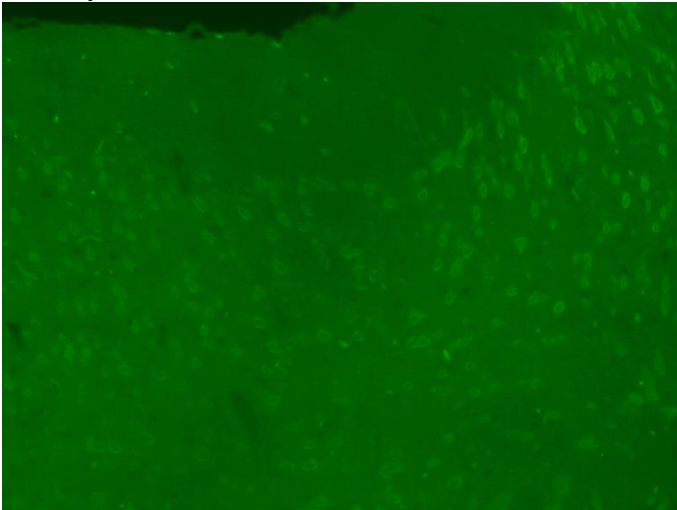


Figura 14 - Imunofluorescência para NeuN nas áreas motoras AGm e CFA do grupo isquêmico. Barra: 200 μm (Ver fotos complementares publicadas em Oliveira J.L. *et al*, 2014, Journal Chemical Neuroanatomy).



5.2.4 Edema, resposta Vascular à Isquemia Cerebral

Pela coloração de H&E foi possível evidenciar no córtex motor do Grupo isquêmico alterações vasculares nas camadas II/III e V das áreas AGm e CFA. Os capilares mostraram retração endotelial e edema perivascular, caracterizando o denominado edema cerebral tecidual, principalmente nas camadas II/III e V da CFA circundados por astrócitos reativos (Figuras 9) (Margaristecus et al., 2009; Vates et al., 2010).

5.2.5 Edema e astrócitos reativos em Resposta à isquemia cerebral

Por meio de coloração Hematoxilina–Eosina (Figura 9) e imunohistoquímica (Figura 18), nossos resultados revelaram astrócitos com aumento do volume nuclear, sugerindo moderado a pronunciado edema. Alguns astrócitos com dimensões alteradas demonstraram grande citoplasma circundando o núcleo, visíveis em H&E, são denominados astrócitos gemistocíticos, ou seja, reativos ao dano cerebral (Pintea et al., 2011).

A análise por imunofluorescência evidenciou a morfologia dos astrócitos em áreas isquêmicas (Figuras 16 e 18). A imunomarcagem para GFAP, foi intensa no grupo submetido a isquemia cerebral em relação ao grupo controle (Figuras 15 e 17).

Figura 15 - Imunoflorescência para GFAP nas áreas motoras AGm e CFA do grupo controle. Barra: 200 μm (Ver fotos complementares publicadas em Oliveira J.L. *et al*, 2014, Journal Chemical Neuroanatomy).

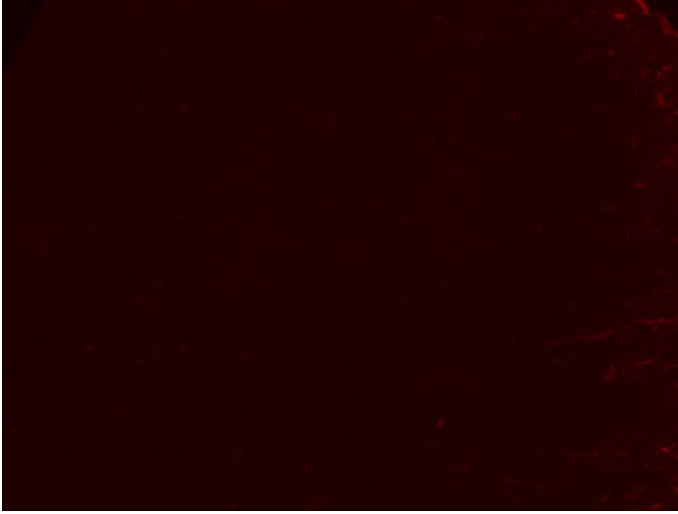
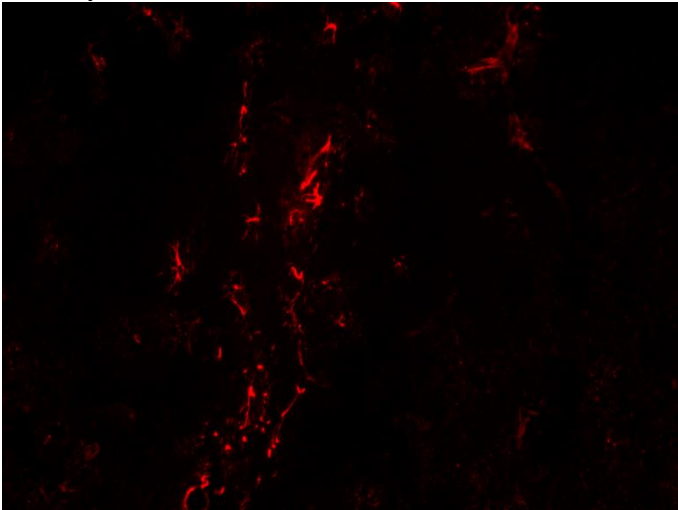


Figura 16 - Imunoflorescência para GFAP nas áreas motoras AGm e CFA do grupo isquêmico. Barra: 200 μm (Ver fotos complementares publicadas em Oliveira J.L. *et al*, 2014, Journal Chemical Neuroanatomy).



Os astrócitos localizados nas camadas II/III e V da AGm e CFA do grupo controle não expressaram marcação para GFAP, conseqüentemente, as células foram GFAP-negativas (Figuras 15 e 17). Nas camadas II/III e V da AGm do grupo isquêmico, astrócitos não expressaram pronunciado nível de GFAP, a marcação positiva não foi expressiva, 11% e 6% respectivamente. Nas camadas II/III, da CFA a marcação foi em torno de 12%, enquanto um aumento expressivo de 53%, foi observado na camada V, e os astrócitos demonstraram múltiplos processos e núcleos com grande volume (Figuras 16 e 18).

Figura 17 - Imunohistoquímica para GFAP nas áreas motoras AGm e CFA do grupo controle, os astrócitos não expressaram imunomarcação. Barra: 50 μ m (Ver fotos complementares publicadas em Oliveira J.L. *et al*, 2014, *Journal Chemical Neuroanatomy*).

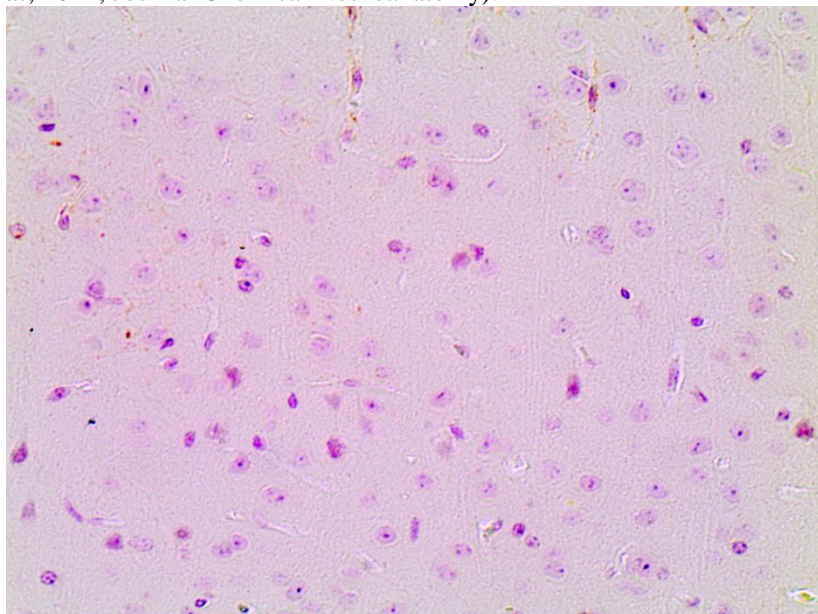
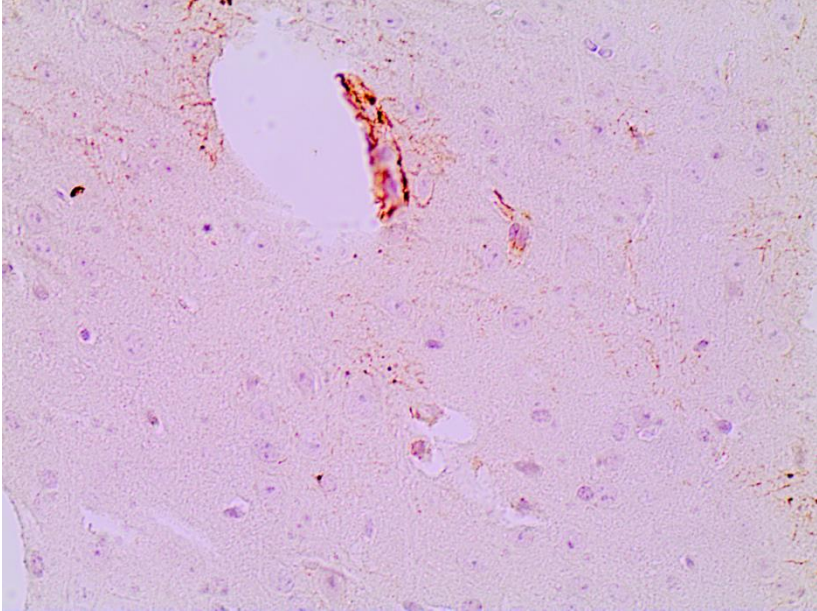


Figura 18 - Imunohistoquímica para GFAP nas áreas motoras AGm e CFA do grupo isquêmico, os astrócitos expressaram intensa imunomarcção (processo denominado de astrogliose) em torno de capilares sanguíneos com evidente edema perivascular. Barra: 50 μ m (Ver fotos complementares publicadas em Oliveira J.L. *et al*, 2014, Journal Chemical Neuroanatomy).



Severa astrogliose foi observada na camada V da CFA (Figura 16), revelando um denso emaranhado de prolongamentos celulares em torno de neurônios (Ridet *et al.*, 1997; Chen & Swanson, 2003) (Figuras 16 e 18), com formação de uma compacta cicatriz glial adjacente a áreas teciduais comprometidas pela neuroinflamação, (Panickar & Norenberg, 2005).

6 DISCUSSÃO

Os estudos das alterações celulares e reparação neural após AVC têm fundamental importância no entendimento dos mecanismos celulares básicos da reorganização dos neurônios após lesão (Carmichael, 2005). Modelos de AVC em roedores proporcionam um suporte experimental para determinar *in vivo* a aplicação de terapias em ensaios clínicos (Ginsberg, 1997; Bacigaluppi *et al.*, 2010).

Nosso estudo demonstrou, pela análise histopatológica do córtex motor do grupo isquêmico, diferenças morfológicas quando comparado ao grupo controle. Em nossa investigação, após 48 horas de isquemia focal, observamos retração e picnose em núcleos de neurônios, previamente descritos (Schmidt-Kastner & Freud, 1991; Iadecola, 1999; Garcia *et al.*, 1993; Dias *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2004; Arsava *et al.*, 2009; Güler *et al.*, 2009; Mărgăritescu *et al.*, 2009; Arsene, 2011), nas camadas superficiais (II/III) e profunda (V) das áreas AGm e CFA. Também, nossos achados demonstraram alteração estrutural da cromatina, cariólise, basofilia no citoplasma e degeneração de células principalmente por necrose (Dias *et al.*, 2000; Zeng & Xu, 2000; Auer, 2001; Müller *et al.*, 2004; Arsava *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2009; Garman, 2011). A área motora do córtex mais afetada por estas alterações histopatológicas foi a CFA.

A análise quantitativa de neurônios viáveis indicou diferenças significantes na distribuição destas células nas camadas II/III e V do córtex submetido à lesão isquêmica. Neurônios normais (viáveis) foram observados em todas as camadas da AGm e CFA do controle, enquanto no grupo isquêmico, a quantidade destas células foi significativamente reduzida, principalmente na camada profunda (V) da CFA. As alterações neuropatológicas foram seguidas por proliferação de astrócitos nas camadas II/III e V da AGm e CFA, porém expressiva quantidade destas células foi verificado na camada V de CFA. Este aumento na quantidade de astrócitos no grupo isquêmico, sugere um padrão de resposta denominado gliose reativa ou astrogliose, estabelecido em processos neuroinflamatórios envolvidos em enfermidades neurodegenerativas e neurovasculares. A gliose reativa pode contribuir para o progresso da lesão isquêmica, afetando o processo de reparação e plasticidade neuronal, mediado pela secreção de fatores neurotróficos (Nudo, 2007; Chvátal *et al.*, 2008; Lalancette-Hébert *et al.*, 2009).

A quantidade de microglia-like apresentou discreto aumento no grupo isquêmico, na camada V da AGm e CFA, sugerindo moderada

resposta ao processo inflamatório pós-isquêmico. Esta proliferação de microglia-like pode ser ativada pelo meio da produção local de mediadores pro-inflamatórios como IL-1 β e TNF α , que comprometem o tecido mas também, protegem a região isquêmica. A microglia constitui 5-20% da população de células da glia no cérebro, apresentando núcleo alongado ou em forma de "cigarra", mas somente um pequeno número destas células podem ser tipicamente reconhecidas (Garman, 2011). O pico de proliferação de microglia ocorre entre 48-72 horas pós-isquemia cerebral e, morfológicamente, são consideradas similares aos monócitos/macrófagos da circulação sanguínea (Mabuchi *et al.*, 2000; Schilling *et al.*, 2003).

Nossos resultados indicaram que as marcações imunohistoquímica e de imunofluorescência para NeuN, podem ser aplicadas para avaliar o *status* fisiológico de neurônios em estudos neuropatológicos. Muitas pesquisas têm mostrado diminuição na expressão de NeuN após severa injúria, a intensa expressão da NeuN imunofluorescência e NeuN imunohistoquímica em neurônios do grupo controle. Em contraste à redução da expressão de NeuN principalmente na camada V da AGm e CFM pode ser atribuída a alterações funcionais provocadas pelo insulto (Ünal-Çevik *et al.*, 2004; Arsava *et al.*, 2009). Esta redução na expressão de NeuN, pode ser correlacionado com nossa avaliação histopatológica, que demonstrou significativo aumento de neurônios isquêmicos em áreas idênticas visualizadas com fraca reatividade para NeuN (Figura 3, Gráfico B). Particularmente, na camada V da CFA, a depleção da imunoreatividade no citoplasma e núcleo, pode estar relacionada ao edema e à alteração celular isquêmica de neurônios no tecido (Sarnat *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2002; Ünal-Çevik *et al.*, 2004; Gurer *et al.*, 2008; Arsava *et al.*, 2009).

A redução na marcação de NeuN em enfermidades neurodegenerativas, pode estar relacionada a mudanças antigênicas nas áreas isquêmicas ou à diminuição da síntese de proteína NeuN. Assim, nossos resultados foram consistentes com outros autores, que sugerem o uso de NeuN como marcador de injúria em neurônios (Schmidt-Kastner *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 2002; Pinteá *et al.*, 2011; Lavezzi *et al.*, 2013).

Nosso estudo mostrou que após 48 horas de isquemia cerebral, os neurônios foram as células mais suscetíveis ao evento hipóxico/isquêmico. O evento de morte celular, foi mais intenso nas camadas profundas da AGm e CFA, e foi determinado principalmente por necrose após permanente oclusão arterial e, em menor proporção por apoptose (Manabat *et al.*, 2003, Arango-Davila *et al.*, 2004, Muller *et al.*, 2004; Gurer *et al.*, 2008; Margaritescu *et al.*, 2009; Garman, 2011).

A morte celular isquêmica mais comum é a necrótica, que resulta da redução aguda de energia, com perda da morfologia celular, lise e desencadeamento de processo inflamatório (Garcia *et al.*, 1993; Garcia *et al.*, 1994; Jander et al, 1995; Garcia et al., 1997; Durukan & Tatlisumak, 2007; Arsava, et al, 2009). Astrócitos mostraram maior resistência à degeneração, mas susceptíveis ao edema celular determinado pela lesão cerebral (Kimelberg, 2005; Anderova et al., 2011). O impacto clínico da isquemia cerebral depende da gravidade e da duração na redução do fluxo sanguíneo (Mies *et al.*, 1991).

Utilizando técnica histomorfológica (H&E), observamos no grupo isquêmico astrócitos e neurônios com evidente hipertrofia do núcleo, dispersão da cromatina, características de edema citotóxico e neurodegeneração. O edema citotóxico é um mecanismo patológico em que a célula acumula fluido, que pode ser localizado, como resultado de uma oclusão vascular, ou global, resultante de uma redução transitória ou permanente no fluxo sanguíneo cerebral (Wagner et al, 2012). Episódios de hipóxia ou isquemia interrompem a síntese de ATP afetando a operação da Na^+/K^+ , assim a redução da atividade da bomba favorece aumento intracelular de Na^+ e extracelular de K^+ , e o fluxo de água segue a redistribuição de íons, contribuindo para o aumento de volume celular, provocando o edema citotóxico (Pasantes-Morales & Vázquez-Juárez, 2012). Na isquemia cerebral, edema citotóxico e vasogênico são mecanismos envolvidos na patologia (Klatzo, 1976, 1987, 1994; Wagner et al, 2012). Em nossos resultados identificamos, alterações estruturais nos capilares cerebrais junto às áreas isquêmicas, e estas foram relacionadas a lesão perivascular, causada pelo edema vasogênico. Este tipo de edema está correlacionado a danos na barreira hematoencefálica induzido pela isquemia cerebral (Mărgăritescu et al, 2009).

Edema vasogênico foi identificado nas camadas II/III e V das áreas motoras AGm e CFA, porém, na camada V da CFA, esta característica patológica foi marcante e constante, evidenciando a neuropatologia. O edema vasogênico é uma complicação comum em enfermidades cerebrais, como trauma, tumores e insultos cerebrovasculares, que estão associadas com aumento da permeabilidade vascular e a entrada de proteínas no parênquima cerebral, mecanismo básico no desenvolvimento e na dinâmica deste tipo de edema (Klatzo, 1976; 1987; 1994). No grupo controle, não identificamos a presença de edema perivascular nas áreas corticais AGm e CFA.

Em nossos estudos, também, verificamos a presença de edema vasogênico com numerosos astrócitos ativos, adjacentes a áreas isquêmicas. A literatura suporta que os astrócitos têm principal influência em múltiplos processos dentro do cérebro, incluindo homeostase e manutenção da integridade da barreira hematoencefálica, suporte metabólico de neurônios, remoção de proteínas extravasadas que impactam na sobrevivência e função dos neurônios, como também na vascularização do tecido nervoso (Wasterlain et al, 1968; Klatzo, 1987; Harald, 2001; Wolf & Kirchhoff, 2008; Koehler et al., 2009; Giaume et al, 2010; Pintea et al, 2011; Garman, 2011). A CFA mostrou severo dano estrutural em vasos sanguíneos (edema vasogênico) e em neurônios (edema celular citotóxico). Astrócitos, são as células que primariamente contribuem para o edema cerebral; isto ocorre em numerosas patologias, como trauma craniano, isquemia cerebral, tumores entre outras. O edema citotóxico é causado pela interrupção da homeostase de água e íons no parênquima cerebral. Astrócitos são células componentes da barreira hematoencefálica e estão envolvidos na dinâmica entre o fluido intersticial e o sangue nos compartimentos intracelulares do cérebro, assim afetam a sobrevivência e a integridade do tecido nervoso (Araque, 2006; Pasantes-Morales & Vázquez-Juárez, 2012).

Nossos resultados revelaram também, que a isquemia cerebral induziu a ativação de astrócitos, seja a gliose reativa na CFA no córtex motor (Schmidt-Kastner et al., 1990; Arango-Davila *et al.*, 2004; Sofroniew & Vinters, 2010). De acordo com (Chen & Swanson, 2003; White *et al.*, 2010), a expressão do marcador para astrócitos depende da espécie, idade, localização anatômica, da enfermidade neuropatológica e outras variáveis. Severo e difuso processo de astrogliose reativa é geralmente verificado em áreas de lesões focais, infecções ou em áreas crônicas de neurodegeneração (Sofroniew, 2000; Sofroniew, 2005; Sofroniew, 2009; Sofroniew & Vinters, 2010). No cortex normal (grupo controle) das áreas motoras, AGm e CFA, o presente estudo mostrou que os astrócitos não expressaram níveis detectáveis de GFAP. Em contraste, o grupo isquêmico mostrou pronunciada resposta à injúria isquêmica nas camadas II/III e V de CFA, associadas com edema e degeneração neuronal. No grupo isquêmico, GFAP apresentou forte imunoreatividade na camada V da CFA, consistente com severa astrogliose (Arango-Davila, et al., 2004; Pekny & Nilsson, 2005; Chvátal et al., 2008; Sofroniew & Vinters, 2010). Nossos resultados sugerem que a lesão promoveu moderada astrogliose reativa na camada II/III da CFA e intensa e difusa astrogliose na camada V desta área.

Assim, verificamos na CFA pronunciado aumento (upregulation) da expressão de GFAP, como, também hipertrofia de astrócitos, proliferação e sobreposição de seus processos, resultando na interrupção dos domínios individuais dos astrócitos, em acordo com diversos autores (Pekny & Nilsson, 2005; Wilhemsson et al, 2006; Oliveira et al., 2008; Sofroniew, 2009; Sofroniew & Vinters, 2010; Pasantes-Morales e Vazquez-Juárez, 2012). Embora a ativação de astrócitos secrete diferentes fatores neurotróficos para a sobrevivência neuronal, a rápida e severa ativação determina uma resposta inflamatória, levando a morte neuronal e dano cerebral. Após severa ativação, os astrócitos secretam substâncias neurotóxicas e expressam elevado nível de proteína ácida glial fibrilar (GFAP), que é considerada um marcador para astrogliose (Tani et al,1996).

Nossa investigação também evidenciou, na camada V da CFA intensa astrogliose, com densos processos e formação de compacta cicatriz glial (Frisén et al., 1995) ao longo da margem do tecido isquêmico. A cicatriz glial tende a persistir por longos períodos, e age como uma barreira, não somente para a regeneração axonal, como também para as células inflamatórias e agentes infecciosos, de maneira que, protege o tecido sadio próximo a áreas com intensa inflamação (Chen & Swanson, 2003; Sofroniew, 2005; Sofroniew, 2009; Sofroniew & Vinters, 2010).

A análise das camadas superficial (II/III) e profunda (V) na AGM do grupo isquêmico, não expressou GFAP ou demonstrou poucas células positivas. De acordo com a literatura, a expressão de GFAP, em cultura de astrócitos é intensa, mas a maioria dos astrócitos protoplasmáticos do córtex cerebral e astrócitos fibrosos são GFAP-negativos em métodos de rotina para imunohistoquímica (Eng et al., 2000). A astrogliose pode determinar a progressão e as consequências da enfermidade neurológica, de forma que os astrócitos estão envolvidos em aspectos iniciais e na evolução da lesão neurológica (Sofroniew, 2000). Muitos trabalhos descrevem que a disfunção nos astrócitos é a causa direta de neurodegeneração (Araque, 2006; Kettenmann & Verkhratsky, 2008; Sofroniew & Vinters, 2010; Verkhratsky et al., 2011).

A progressão da maioria das enfermidades no sistema nervoso central (SNC) é determinada pela habilidade da neurógliia na manutenção da homeostose no cérebro (Agulhon et al., 2008; Giaume et al., 2010). A isquemia está associada com áreas de infarto e necrose tissular, edema e inflamação, e em prolongado período de isquemia, o tecido desintegra, ocasionando a necrose de liquefação (Arango-Davila,

2004; Arsene et al., 2011; Pinteá *et al.*, 2011; Sidoryk-Wegrzynowicz *et al.*, 2011).

Em conclusão nossos resultados demonstraram que a oclusão da ACM induziu lesão no córtex cerebral, resultando em alterações histopatológicas em neurônios, astrócitos, microglia, e nos vasos sanguíneos distribuídos nas camadas II/III e V da AGm e CFA. A área motora CFA, revelou severo dano celular isquêmico em neurônios, evidente processo neuroinflamatório, associado a alterações vasculares e edema cerebral, indicando ser a área mais gravemente comprometida pela lesão isquêmica neste modelo de estudo.

7 CONCLUSÕES

O modelo de oclusão do ramo distal da ACM promoveu alteração celular isquêmica nas áreas do córtex AGm e CFA e significativa redução de neurônios viáveis, aumento no número de células da microglia-like e pronunciado aumento de astrócitos na camada profunda (V) da CFA, indicando uma resposta neuroinflamatória a injúria hipóxia-isquêmica.

A proteína GFAP revelou aumento na expressão (upregulation), principalmente no centro isquêmico, camada V da CFA, indicando reação neuropatológica ao insulto.

Os astrócitos reativos se caracterizam morfológicamente, por um aumento de tamanho (hipertrofia) e aumento no número e extensão de seus prolongamentos, com formação de cicatriz glial, estabelecendo uma resposta patológica às lesões estruturais no SNC.

Após 48 horas de oclusão permanente da ACM, a atividade da caspase-3 foi verificada em poucos neurônios nas áreas AGm e CFA.

A imunomarcção para NeuN em áreas isquêmicas mostrou-se reduzida, assim, consideramos a possibilidade de correlacionar mudanças na expressão de NeuN com edema e disfunção neuronal após o insulto isquêmico.

Este modelo determinou também, eventos patológicos como: edema celular citotóxico em neurônios e astrócitos e edema vasogênico, principalmente na CFA.

Após 48 horas de isquemia focal, à área cortical motora CFA demonstrou severa alteração celular isquêmica em relação à área AGm, e os neurônios foram as células mais susceptíveis à lesão isquêmica.

O modelo mostrou-se apropriado para o entendimento histopatológico do tecido nervoso, permitindo correlacionar com enfermidades neurovasculares e neurodegenerativas em humanos, e aplicação em estudos de morte celular, inflamação e reparação neural.

8 PERSPECTIVAS

Este modelo exigiu particular habilidade em cirúrgica para produzir uma oclusão em um ramo da ACM. O presente estudo proporcionará a oportunidade de continuar as pesquisas em ciência básica aplicada, adotando este padrão de oclusão focal ou a oclusão de um vaso principal, para comparar as alterações histopatológicas promovidas pela isquemia cerebral, como também, definir vários períodos pós-isquemia, avaliando a dimensão da lesão e o grau de comprometimento do tecido nervoso e eventos microvasculares.

Temos como perspectivas incluir novas técnicas para avaliação histológica e ultraestrutural e, principalmente, introduzir o uso de novos anticorpos para análise imunohistoquímica.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGULHON C.; PETRAVICZ J.; McMULLEN A.B.; SWEGER E.J.; MINTON S.K.; TAVES S.R.; CASPER K.B.; FIACCO T.A.; McCARTHY K.D. What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? **Neuron**, 59, p. 932-46, 2008.

ANDEROVA M.; VORISEK I.; PIVONKOVAL H.; BENESOVA J.; VARGOVA L.; CICANIC M.; CHVATALL A.; SYKOVA E. Cell death/proliferation and alterations in glial morphology contribute to changes in diffusivity in the rat hippocampus after hypoxia-ischemia. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, 31, p. 894-907, 2011.

ARANGO-DAVILA, C.; ESCOBAR-BETANCOURT, M.; CARDONA-GÓMEZ, G.P.; PIMIENTA-JIMÉNEZ, H. Pathophysiology of focal cerebral ischemia: fundamental aspects and its projection on clinical practice. **Revista de Neurologia**, 39, p. 156-165., 2004.

ARAQUE, A. Astrocyte-neuron signaling in the brain-implications for disease. **Corrent Opinion Investigation Drugs**, 7, p. 619-24, 2006.

ARSAVA; E.M., GURER; G., GURSOY-OZDEMIR; Y., KARATAS, H.; DALKARA, T. A new model of transient focal cerebral ischemia for inducing selective neuronal necrosis. **Brain Research Bulletin**, 78, p. 226-231, 2009.

ARSENE, D.; VASILESCU, F.; TOADER, C.; BĂLAN, A.; POPA, C.; ARDELEANU, C. Clinico-pathological correlations in fatal ischemic stroke. An immunohistochemical study of human brain penumbra. **Romenian Journal of Morphology & Embryology**, 52, p. 29-38, 2011.

AUER, R.N. Non-pharmacologic (physiologic) neuroprotection in the treatment of brain ischemia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 939, p. 271-282, 2001.

BACIGALUPPI M.; COMI G.; HERMANN D.M. Animal Models of Ischemic Stroke Part Two: Modeling Cerebral Ischemia. **The Open Neurology Journal**, 4, p. 34-38, 2010.

BACK, T.; HEMMEN, T.; SCHULER, O.G. Lesion evolution in cerebral ischemia. **Journal of Neurology**, 25, p. 388-397, 2004.

BATTER A. & LEOR J. Stem Cell and Gene-Based Therapy. **Frontiers in Regenerative Medicine**, 5, p. 59:69, 2006.

BIERNASKIE, J.; CORBETT, D. Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury. **Journal of Neuroscience**, 21, p. 5272-280, 2001.

BLANK W.F; KIRSHNER H.S. The kinetics of extracellular potassium changes during hypoxia and anoxia in the rat cerebral cortex. **Brain Research**, 123, p. 113-24, 1996.

BREDESEN D.E. Neural apoptosis. **Annals of Neurology**, 38, 839-51, 1995.

BRODMANN K. **Brodmann's Localisation in the Cerebral Cortex**, 1, p. 13-38, 1909.

CAPUTO, L.F.G.; GITIRANA L. B.; MANSO, P. P. A. Conceito e Métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde. **Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz**, 2009.

CHENEY, P.D.; e Fetz, E.E. Functional classes of primate corticomotoneuronal cells and their relation to active force. **Journal of neurophysiology**, 44, p. 773-791, 1980.

CARMICHAEL; S.T. Rodent models of focal stroke: Size, mechanism, and purpose. **NeuroRX** 2, p. 396-409, 2005.

CHEN Y.; SWANSON R. A. Astrocytes and Brain Injury. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, 2, p.137-149, 2003.

CHVÁTAL A.; ANDEROVÁ M.; NEPRASOVÁ H.; PRAJEROVÁ I.; BENESOVÁ J.; BUTENKO O.; VERKHRATSKY. Pathological Potential of Astroglia, **Physiological Research**, v. 57, n. 3, p. 101-10, 2008.

DANBOLT N.C. Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology**, 65, p. 1-105, 2001.

DECAUSE N.; BARBAY S.; FROST S.B; ZOUBINA E.V.; PLAUTZ E.J.; MAHNKEN J.D. Effects of small ischemia lesions in the primary motor cortex on neurophysiological organization in ventral premotor cortex. **Journal Neurophysiology**, n. 96, v.3, p. 506-3511, 2006.

DEL ZOPPO G.; GINIS I.; HALLENBECK JM.; IADECOLA C.; WANG X.; FEUERSTEIN GZ. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. **Brain Pathology**, 10, p. 95-112, 2000.

DIAS, L.A.; COLLI, B.O.; COUTINHO N.J.; LACHAT, J.J. 2. Focal cerebral ischaemia induced by middle cerebral artery occlusion and the neuroprotective effect of ketoprofen in rats. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, 58, p. 1047-1054, 2000.

DIENAL G. A.; HERTZ L. Glucose and lactate metabolism during activation. **Journal Neuroscience Research**, 66. p. 824-838, 2001.

DING Y.C.; ZHOU YD.; LAI Q.; LI J.; PARK H.; DIAZ FG. Impaired motor activity and motor learning function in rat middle cerebral artery occlusion. **Behavioural Brain Research**, 132, p. 29-36, 2002b.

DURUKAN, A.; TATLISUMAK, T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 87, p. 179-197, 2007.

DUGAN, L. L.; CHOI, D. W. Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes. **Annals of Neurology**, 35, p. 17-2, 1994.

EMSLEY H.C.A.; TYRRELL P.J. Inflammation and Infection in Clinical Stroke. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, 22, p. 1399-1419, 2002.

ENARI M.; SAKAHIRA H.; YOKOYAMA H.; OKAWA K.; IWAMATSU A.; NAGATA S. A caspase-activated DNase that

degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature**, 391, p. 43-50, 1998.

ENG L.F.; GHIRNIKAR R.S.; LEE Y.L. Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). **Neurochemical Research**, n. 25, v. 9-10, p. 1439-51, 2000.

EVARTS, E.V. Relation of pyramidal tract activity to force exerted during voluntary movement. **Journal of Neurophysiology**, 31, p. 14-27, 1968.

FEUERSTEIN G.Z.; WANG X.K. A nimal models of stroke. **Molecular Medicina Today**, 6, p.133-135, 2000.

FRANSEVA, M. V.; CARLEN, P. I.; VELAZQUEZ, J. L. P. Dynamics of intracellular calcium and free radical production during ischemia in pyramidal neurons. **Free radical biology & medicine**, 31, p. 1216-1227, 2001.

FRANKLIN K.B.J. & PAXINOS G. **The Mouse Brain**. Elsevier Academic Press, 2008.

FRISÉN J.; JOHANSSON C.B.; RISLING M.; LENDAHL U. Rapid, widespred, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. **Journal Cell Biology**, 131, p. 453-464, 1995.

GARCIA J.H.; YOSHIDA Y.; CHEN H.; LI Y.; ZHANG Z.G.; LIAN, J.; CHEN S.; CHOPP M. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. **American Journal of Pathology**, 142, p. 623-635, 1993.

GARCIA J.H.; LIU K.F.; YOSHIDA Y.; LIAN J.; CHEN S., DEL ZOPPO G.J. Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). **American Journal of Pathology**, 144, p. 188-199, 1994.

GARCIA J.H.; LIU K.F.; YE Z.R.; GUTIERREZ J.A. Incomplete infarct and delayed neuronal death after transient middle cerebral artery occlusion in rats. **Stroke**, 28, p. 2303-2309, 1997.

GARMAN R.H. Histology of the central nervous system. **Toxicology Pathology**, 39, p. 22-35, 2001.

GEORGOPOULOS A.P.; KALASKA J.F.; CAMINITI R.; MASSEY J.T. On the relations between the direction of two-dimensional arm movements and cell discharge in primate motor cortex. **Journal of Neuroscience**, 2, p.1527-1537, 1982.

GIAUME C. Astroglial wiring is adding complexity to neuroglial networking. Astrocytes are organized as networks of communicating cells. **Frontiers in Neuroenergetics**, 2, p. 129, 2010.

GINSBERG M.D. **Animals: Models of global and focal ischemia**. Primer on Cerebrovascular Diseases. New York: Academic Press: p. 124-126, 1997.

GRAZIANO M.S.A. **The Intelligent Movement Machine**. 1st ed Oxford: Oxford, 2009.

GUNDERSEN H.J.G. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. **Journal of Microscopy**, 111, p. 219-223, 1977.

GURER G.; OZDEMIR Y.G.; ERDEMLI E.; CAN A., DALKARA T. Astrocytes are More Resistant to Focal Cerebral Ischemia than Neurons and Die by a Delayed Necrosis. **Brain Pathology**, 19, p. 630-641, 2008.

HANSEN A. Effect of anoxia on ion distribution in the brain. **Physiological Reviews**, 65, p. 101-148, 1985.

HARALD N. Control of Glial Immune Function by Neurons. **Glia** 36, p. 191-199, 2001.

HATSOPOULOS N.G.; SUMINSKI A.J. Sensing with the motor cortex. **Neuron** 72, p. 477- 487, 2011.

HOSP J.A.; LUFT A.R. Cortical Plasticity during Motor Learning and Recovery after Ischemic Stroke. **Neural Plasticity**, p.1-9, 2011.

IADECOLA C. Mechanisms of cerebral ischemic damage. **Cerebral ischemia: molecular and cellular pathophysiology**. Totowa NJ: Humana Press, p. 3-32, 1999.

JANDER S.; KRAEMER M.; SCHROETER M.; WITTE O.W.; STOOL G. Lymphocytic infiltration and expression of intercellular adhesion molecule-1 in photochemically induced ischemia of the rat cortex. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, 15, p. 42-51, 1995.

JAYAKUMAR A.R.; NORENBURG M.D. The Na-K-Cl Co-transporter in astrocyte swelling. **Metabolic Brain Disease**, 25, p. 31-38, 2010.

KETTENMANN H.; VERKHRATSKY A. Neuroglia: the 150 years after. **Trends Neuroscience**, n. 31, v. 12, p. 653-659, 2008.

KIMELBERG H.K. Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy. **Glia**, 50, p. 389-397, 2005.

KLATZO I. Vasogenic Brain Oedema: New aspects in its formation, resolution and therapy. **British Journal Anaesthesia**, p. 48 v. 8, p. 741-752, 1976.

KLATZO I. Pathophysiological aspects of brain edema. **Acta Neuropathologica Berl**, 72, p. 236-239, 1987.

KLATZO I. Evolution of brain edema concepts. **Acta Neurochirurgica Supplements**, 60, p. 3-6, 1994.

KOEHLER R.C.; ROMAN R.J.; HARDER D.R. Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. **Trends Neuroscience**, n. 32, v. 3, p. 160-9, 2009.

KURAOKA M.; FURUTA T.; MATSUWAKI T.; OMATSU T.; ISHII Y.; KYUWA S.; YOSHIKAWA Y. Direct Experimental Occlusion of the Distal Middle Cerebral Artery Induces High Reproducibility of Brain Ischemia in Mice. **Experimental Animals**, 58, p. 19-29, 2009.

KUNZ A.; DIRNAGL U.; MERGENTHALER P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury.

Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology, 24, p. 495-509, 2010.

LALANCETE-HÉBERT, M.; PHANEUF D.; SOUCY, G.; WENG Y.C., KRIZ, J. Live imaging of Toll-like receptor 2 response in cerebral ischaemia reveals a role of olfactory bulb microglia as modulators of inflammation. **Brain**, 132, p. 940-954, 2009.

LAVEZZI M.A.; CORNA F.M; MATTURRI L. Neuronal nuclear antigen (NeuN): A useful marker of neuronal immaturity in sudden unexplained perinatal death. **Journal of the Neurological Sciences**, 329, p. 45–50, 2013.

MABUCHI T.; KITAGAWA K.; OHTSUKI T.; KUWABARA K.; YAGITA Y.; YANAGIHARA T.; HORI M.; MATSUMOTO M. Contribution of microglia/macrophages to expansion of infarction and response of oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rats. **Stroke**, 31, p. 1735-1743, 2000.

MANABAT C.; HAN B.H.; WENDLAND M.; DERUGIN N.; FOX C.K.; CHOI J.; HOLTZMAN D.M.; FERRIERO D.M.; VEXLER Z.S. Reperfusion Differentially Induces Caspase-3 Activation in Ischemic Core and Penumbra After Stroke in Immature Brain. **National Institutes of Health Public Access**, n.34, v.1, p. 207-213, 2003.

MARGARITescu O.; MOGOANTĂ L.; PIRICI I.; PIRICI D.; CERNEA D.; MARGARITescu C. Histopathological changes in acute ischemic stroke. **Romanian Journal of Morphology & Embryology**, 50, p. 327-339, 2009.

MARKS L.; CARSWELL H.V.; PETERS E.E.; GRAHAM D.I.; PATTERSON J.; DOMINICZAK A.F.; MACRAE I.M. Characterization of the microglial response to cerebral ischemia in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, 38, p. 116-122, 2001.

MENESES M.S. **Neuroanatomia Aplicada**. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

MIES G.; ISHIMARU S.; XIE Y.; SEE K.; HOSSMANN K.A. 1991. Ischemic thresholds of cerebral protein synthesis and energy state

following middle cerebral artery occlusion in rat. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, 11, p. 753-761, 1991.

MITANI A.; YANASE H.; SAKAI K.; WAKE Y.; KATAOKA K. Origin of intracellular Ca^{2+} elevation induced by *in vitro* ischemia-like condition in hippocampal slices. **Brain Research**, 601, p. 103-110, 1993.

MODO M.; STROEMER R.P.; TANG E.; VEIZOVIC T.; SOWNISKI P.; HODGES H. Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion. **Journal of Neuroscience Methods**, 104, p. 99-109, 2000.

MULLER G.J.; STADELMANN C.; BASTHOLM L.; ELLINNG F.; LASSMANN H.; JOHANSEN F.F. Ischemia leads to apoptosis--and necrosis-like neuron death in the ischemic rat hippocampus. **Brain Pathology**, 14, p. 415-424, 2004.

NEAFSEY E.J.; SIEVERT C. A second forelimb motor area exists in rat frontal cortex. **Brain Research**, 232, p. 151-156, 1982.

NEWMAN E.A.; KETTENMANN H.; RANSOM B. Glial cell regulation of extracellular potassium. **Neuroglia**, p.717-731, 1995.

NUDO R.J.; JENKINS W.M.; MERZENICH M.M. Repetitive microstimulation alters the cortical representation of movements in adult rats. **Somatosensory and Motor Research**, 7, p. 463-483, 1990.

NUDO R.J. Postinfarct cortical plasticity and behavioral recovery. **Stroke**, 38, p.840-845, 2007.

OLIVEIRA J.L.; CRISPIM P. d. T. B.; DUARTE E.C.W.; MARLOCH G.D.; GARGIONE R.; TRENTIN A.G.; ALVAREZ-SILVA M. Histopathology of motor cortex in an experimental focal ischemic stroke in mouse model. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 57-58, p. 1-9, 2014.

PAKKENBERG B.; GUNDERSEN HJ. Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age. **Journal of Comparative Neurology**, n. 38, v. 42, p. 312-320, 1997.

PANICKAR K.S.; NORENBURG M.D. Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations. **Glia**, n. 50, v. 4, p. 287-298, 2005.

PASANTES-MORALES H.; VAZQUEZ-JUÁREZ E. Transporters and Channels in Cytotoxic Astrocyte Swelling. **Neurochemical Research**, 37, p. 2379-2387, 2012.

PAXINOS G.; FRANKLIN K.B.J. **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**. Academic Press, 2008.

PEKNY M.; NILSSON M. Astrocyte activation and reactive gliosis. **Glia**, 50, p. 427-434, 2005.

PINTEA I.L.; ROLEA E.; BĂLSEANU A.T.; PIRICI I.; POP O.T.; MOGOANTĂ L. Study of cellular changes induced by moderate cerebral ischemia achieved through internal carotid artery ligation. **Romanian journal of Morphology and Embryology**, 52, p. 1347-1353, 2011.

RIDET J.L.; PRIVAT A.; MALHOTRA S.K.; GAGE F.H., 1997. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. **Trends Neuroscience** n. 20, v. 12, p. 570-577, 1997.

SARNAT H.B; NOCHLIN D.,;BORN D.E. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in early human fetal nervous system. **Brain Development**, n. 20, v. 2, p. 88-94, 1998.

SCHILING M.; BESSELMAN M.; LEONHARD C.; MULLER M.; RINGELSTEIN E.B.; KIEFER R. Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. **Experimental Neurology**, 183, p. 25-33, 2003.

SCHMIDT-KASTNER R.; SZYMAS J.; HOSSAMAN K.A. Immunohistochemical study of glial reaction and serum protein extravasation in relation to neuronal damage in rat hippocampus after ischemia. **Neuroscience** 38, p. 527-540, 1990.

SCHMIDT-KASTNER R.; FREUND T.F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. **Neuroscience**, 40, p. 599-636, 1991.

SCHMIDT-KASTNER R.; ROBERTSON G.S, HAKIM A. Monoclonal antibody to NeuN as specific marker for neurons in immunohistochemical evaluation of global ischemic damage in rat. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, n. 15, v. 1, 230, 1995.

SCHWARTZ A.B. Direct cortical representation of drawing. **Science**, 265, p. 540-542, 1994.

SIDORYK-WEGRZYNOWIC M.; WEGRZYNOWICZ M.; LEE E. BOWMAN A.B.; ASCHNER M. Role of astrocytes in brain function and disease. **Toxicology Pathology**, 39, p. 115-123, 2011.

SOFRONIEW M.V. Astrocyte failure as a causa of CNS dysfunction. **Molecular Psychiatry**, 5, p. 230-232, 2000.

SOFRONIEW M.V. Reactive astrocytes in neural repair and protection. **Neuroscientist**, 11, p. 400-407, 2005.

SOFRONIEW M.V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. **Trends Neuroscience**, 32, p. 638–647, 2009.

SOFRONIEW M.; VINTER H. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, 119, p. 7-35, 2010.

SUN L.; KUROIWA T.; ISHIBASHI S.; MIKI K.; LI S.; XU H., ENDO S.; MIZUSAWA H. Two region-dependent pathways of eosinophilic neuronal death after transient cerebral ischemia. **Neuropathology**, 29, p. 45-54, 2009.

TAMURA A.;ASANO T.; SANO K. Correlation between rCBF and histological changes following temporary middle cerebral artery occlusion. **Stroke**, 11, p. 487-493, 1980.

TANI M.; GLABINSKI A.R.; TUOHY V.K.; STOLER M.H. ESTES M.L., RANSOHOFF R.M. In situ hybridization analysis of glial fibrillary acidic protein mRNA reveals evidence of biphasic astrocyte activation during acute experimental autoimmune encephalomyelitis. **American Journal Pathology**, 148, p. 889-896, 1996.

TAYLOR D.; OBRENOVITCH T.P.; SYMON L. Changes in extracellular acid-base homeostasis in cerebral ischemia. **Neurochemical research**, n. 21, v. 9, p. 1013-21, 1996.

TENNANT K.A.; ADKINS D.L.; DONLAN, N.A.; ASAY A.L.; THOMAS N.; KELIM J.A.; JONES T.A. The organization of the forelimb representation of the C57BL/6 mouse motor cortex as defined by intracortical microstimulation and cytoarchitecture. **Cerebral Cortex**, 21, p. 865-876, 2011.

TRACY D.F. **A mouse model for studying stroke induced impairments, recovery, and compensation in the motor cortex.** Dissertação, Departamento of Psychology and Neuroscience. University of Lethbridge, Canada p. 1-107, 2003.

ÜNAL-ÇEVİK I.; KILINÇ M.; GURSOY-ÖZDEMİR Y.; GURER G.; DALKARA T. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. **Brain Research**, 1015, p. 169-174, 2004.

VATES G.E.; TAKANO T.; ZLOKOVIC B.; NEDEGARD M. Pericyte constriction after stroke: the injury is still out. **Nature Medicine**, n. 16, v. 9, p. 959-960, 2010.

VERKRATSKY A.; SOFRONIEW M.V.; MESSING A.; deLANEROLLE N.C.; REMPE D.; RODRÍGUEZ J.J.; NEDEGAARD M. Neurological diseases as primary gliopathies: a reassessment of neurocentrism. **American Society Neurochemistry**, n. 4, v. 3, p. 131-149, 2011.

VON ECONOMO & KOSKINAS G. **The cytoarchitecture of human cortex.** Springer, 1927.

WAGNER D.C.; BOLTZE J.; KLEINSCHNITZ C.; REYMANN K.G.; REISER G.; KRANS A.; MICHALSKI D. 2012. Neurovascular pathophysiology in cerebral ischemia, dementia and the ageing brain-current trends in basic translation and clinical research. **Experimental Translation Stroke Medicina**, n. 10, v. 4, p. 1-14, 2012.

WANG R.Y.; YANG Y.R.; YU S.M. Protective effects of treadmill training on infarction in rats. **Brain Research**, 922, p. 140-143, 2001.

WASTERLAIN C.G.; TORACK R. M.; POSNER J.B. Cerebral edema in water intoxication II. An ultrastructural study. **Archives of Neurology**, n. 19, v. 1, p. 71-78, 1968.

WHITNEY N.P.; EIDEM T.M.; PENG H.; HUANG Y.; ZHENG J.C. Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: Relevance to the of brain injury and neurodegenerative disorders. **Journal Neurochemical**, n. 108, v. 6, p. 1343-1359, 2009.

WHITE R.E.; McTIGUE D.M.; Jakeman L.B. Regional heterogeneity in astrocyte responses following contusive spinal cord injury in mice. **The Journal of Comparative Neurology**, 518, p. 1370-1390, 2010.

WILHEMSSON U.; BUSHOG E.A.; PRICE D.L.; SMARR B.L.; PHUNG V.; TERADA M.; ELLISMAN M.H.; PEKNY M. Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. **Proceedings of National Academy of Sciences United States**, n. 103, v. 46, p. 17513-17518, 2006.

WINSTEIN C.J.; MERIANS A.S.; SULLIVAN KJ. Motor learning after unilateral brain damage. **Neuropsychologia**, 37, p. 975- 987, 1999.

WOLF F.; KIRCHOFF F. Neuroscience-Imaging astrocyte activity. **Science**, 320, p. 1597-1599, 2008.

XU G.P.; DAVE K.R.; VIVERO R.; SCHMIDT-KASTNER R.; SICK T.J.; PÉREZ-PINZÓN M.A. Improvement in neuronal survival after ischemic preconditioning in hippocampal slice cultures. **Brain Research**, 952, p. 153-158, 2002.

ZEILER S.R.; GIBSON E.M.; HOESCH R.E.; LI M.Y., WORLEY P.F.; O'BRIEN R.J.; KRAKAUER J.W. Medial Premotor Cortex Shows a Reduction in Inhibitory Markers and Mediates Recovery in a Mouse Model of Focal Stroke. **Stroke**, 44, p. 483-489., 2013.