

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF
CENTRO DE BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA - CBB**

BÁRBARA DE PAULA COELHO

**EFEITO DA IDADE E DO GÊNERO NA RECUPERAÇÃO FUNCIONAL EM RATOS
TRATADOS COM CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA APÓS
ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL**

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

MARÇO - 2015

BÁRBARA DE PAULA COELHO

**EFEITO DA IDADE E DO GÊNERO NA RECUPERAÇÃO FUNCIONAL EM RATOS
TRATADOS COM CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA APÓS
ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL**

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia. Área de concentração: Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Arthur Giraldi Guimarães

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

MARÇO – 2015

BÁRBARA DE PAULA COELHO

**EFEITO DA IDADE E DO GÊNERO NA RECUPERAÇÃO FUNCIONAL EM RATOS
TRATADOS COM CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA APÓS
ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL**

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.
Área de concentração: Biologia Celular.

Aprovada em 30 de Março de 2015.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Arthur Giraldi Guimarães
Orientador – Professor Associado – LBCT/CBB/UENF

Prof. Dr. Santiago Domingo Martinich Leal
**Professor Adjunto – Instituto de Ciências da Sociedade e Desenvolvimento
Regional, Polo Campos dos Goytacazes, Universidade Federal Fluminense.**

Prof. Dr. Clóvis de Paula Santos
Professor Associado – LBCT/CBB/UENF

Prof.^a Dr.^a Flávia Regina Cruz Dias
LMPA/CCTA/UENF

Dedico esta conquista aos meus pais, Alfredo e Marise, a minha tia Lúcia Regina (*in memoriam*) e a minha irmã Lívia. Obrigada por todo amor, força e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Embora a dissertação seja um trabalho acadêmico, há contribuições que não podem deixar de serem ressaltadas. Por essa razão, expresso aqui meus sinceros agradecimentos:

Em primeiro lugar agradeço a Deus por todo apoio incondicional, por ser o caminho nos momentos de incertezas e por ser o refúgio nos momentos necessários, me dando força para que eu pudesse enfrentar todos os obstáculos encontrados durante essa jornada, pois sem Ele nada disso seria possível. Agradeço também pelas pessoas tão especiais que Ele colocou na minha vida e que foram essenciais para a minha formação tanto profissional, quanto pessoal.

À minha família, por todo amor, apoio e dedicação desde sempre e por ser à base de tudo na minha vida. Em especial aos meus pais, Alfredo Ramos Coelho e Marise Rocha de Paula Coelho, e a minha irmã Lívia de Paula Coelho, minha avó Carmem Lúcia Regina e a minha tia Lúcia Regina Ramos Coelho (*in memoriam*);

Ao Professor Dr. Arthur Giraldi Guimarães pela orientação, paciência, incentivo e por todos os ensinamentos;

Aos membros da banca examinadora: Dr. Santiago Domingo Martinich Leal, Dr. Clóvis de Paula Santos e Dr.^a Flávia Regina Cruz Dias, por se disponibilizarem a avaliar este trabalho.

Ao revisor Professor Dr. André de Oliveira Carvalho pelo dedicado trabalho que tanto contribuiu na elaboração deste documento.

Ao Professor Dr. Ricardo Augusto Mendonça Vieira pelo auxílio nas análises estatísticas;

Aos meus amigos de trabalho por toda a ajuda prestada durante todo esse tempo, pelos ensinamentos, pelos momentos de descontração, pelos conselhos e por todo incentivo;

Aos meus amigos e ao Adriano Fonseca da Rocha, pelos conselhos, pela paciência, por todos os momentos de alegria e pela força nos momentos difíceis. Por sempre acreditarem em mim mesmo quando eu mesma não acreditava, por me incentivarem a continuar sempre e por me entenderem;

A toda equipe do biotério da UENF, pela dedicação e pelo fornecimento dos animais necessários para o desenvolvimento deste trabalho;

A UENF e ao Centro de Biociências e Biotecnologia por abrirem as portas para que eu pudesse realizar este trabalho. Proporcionaram-me mais que a busca de conhecimento técnico e científico, mas um aprendizado para a vida;

Aos órgãos de fomento FAPERJ, UENF, CNPq e Capes;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para esta conquista.

RESUMO

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é a segunda maior causa de morte e a principal causa de incapacidade em pessoas adultas no mundo. Esta doença acomete principalmente pessoas com idade mais avançada, assim, o número de indivíduos com AVE tende a aumentar no futuro devido ao aumento da expectativa de vida e envelhecimento da população. As alternativas de tratamento para essa doença permanecem limitadas, conseqüentemente, a busca de novas terapias para a plena recuperação ou a minimização das perdas funcionais tem sido constante. Algumas investigações pré-clínicas com Células Mononucleares de Medula Óssea (MNMOS) demonstraram o potencial terapêutico dessas células para o tratamento do AVE. No entanto, a maioria dos estudos com modelos animais de isquemia cerebral foram realizados em animais jovens. Assim, estes podem não ser apropriados para projetar abordagens terapêuticas em humanos de meia-idade e idosos. Além disso, não foi encontrado nenhum estudo que avaliasse se existe um efeito diferenciado da terapia com MNMOS para cada gênero. Deste modo, este estudo teve como objetivo avaliar se a recuperação sensório-motora promovida pelo tratamento da isquemia cerebral focal com MNMOS é influenciada pela idade e/ou gênero. Ratos machos e fêmeas *Wistar* com idade de 2-5 meses (jovens) e 12-17 meses (meia idade) foram submetidos à isquemia cortical focal unilateral por termocoagulação da vascularização superficial do córtex cerebral. Vinte e quatro horas após a isquemia, os animais receberam uma injeção intravenosa de 3×10^7 de MNMOS ou veículo (PBS). As MNMOS usadas no transplante foram obtidas de ratos doadores de mesmo gênero e mesma idade. A taxa de sobrevivência, o tamanho da lesão isquêmica e a infiltração de neutrófilos no parênquima cerebral foram quantificados. A recuperação sensório-motora foi avaliada pelos testes do cilindro e teste de remoção do adesivo. Os resultados demonstraram que o tratamento com as MNMOS promoveu recuperação sensório-motora dos ratos machos e fêmeas jovens e de meia idade. Nenhum efeito importante do gênero foi encontrado na taxa de sobrevivência, tamanho da lesão isquêmica e recuperação sensório-motora promovida pelas MNMOS. O efeito do gênero apenas foi visto na interação com a idade no teste do cilindro, onde o grupo dos machos de meia-idade apresentou o pior desempenho. Entretanto, a idade foi um fator significativo, uma vez que, os animais de meia-idade apresentaram taxa de mortalidade e volume da lesão maior do que os animais jovens. No teste do cilindro, a recuperação sensório-motora induzida pelas MNMOS não foi influenciada pela idade. No entanto, a idade influenciou o desempenho no teste de remoção do adesivo, uma vez que a recuperação promovida pelas MNMOS foi significativamente maior nos animais jovens. Assim, apesar do efeito do envelhecimento sobre a mortalidade e tamanho da lesão, ele não atrapalha a indução de recuperação da função sensório-motora pelas MNMOS. Além disso, nossos resultados evidenciaram que o tratamento com MNMOS reduziu a infiltração de neutrófilos no parênquima cerebral após a isquemia. Desta forma os resultados do presente estudo sugerem que o tratamento de acidente vascular cerebral com MNMOS pode ser benéfico, independentemente da idade ou gênero.

Palavras-chave: acidente vascular encefálico; terapia celular; recuperação sensório-motora; meia idade.

ABSTRACT

Stroke is the second largest cause of death and the leading cause of disability in adults worldwide. This disease mainly affects over aged people, so the number of individuals with stroke tends to increase in the future due to increased life expectancy and population aging. The treatment choices for this disease remains limited, thus the search for new therapies for the full recovery or minimizing loss of function has been constant. Some preclinical investigations with Bone Marrow Mononuclear Cells (BMMCs) demonstrated the therapeutic potential of these cells for the treatment of stroke. However, most studies with animal models of cerebral ischemia have used young animals. Thus, they might not be appropriated for designing therapeutic approaches for middle-aged and old humans. Moreover, we found no study assessing whether there is a differential effect of therapy with BMMCs for each gender. Therefore this study aimed to assess whether the sensorimotor recovery promoted by the treatment of focal cerebral ischemia with BMMCs is influenced by age and/or gender. Male and female Wistar rats aged 2-5 months (young) and 12-17 months (middle-aged) were subjected to ischemia by unilateral focal cortical thermocoagulation of the superficial vascularization of the cerebral cortex. Twenty-four hours after ischemia, the animals received an intravenous injection of 3×10^7 BMMCs or vehicle (PBS). The MNMOs used in transplantation were obtained from donor rats of the same gender and age. The survival rate, the size of the ischemic lesion and neutrophil infiltration in the brain parenchyma were quantified. The sensorimotor recovery was evaluated by cylinder and adhesive tests. The results demonstrated that treatment with BMMCs promoted sensorimotor recovery of young and middle-aged male and female rats. No important effect of gender was found in the survival rate, size of the ischemic lesion and sensorimotor recovery promoted by BMMOs. The effect of gender was only seen in the interaction with age in the cylinder test, where the group of middle-aged males had the worst performance. However, the age was a significant factor, since the middle-aged animals showed greater mortality rate and lesion volume than the young animals. In the cylinder test, the promotion of sensorimotor recovery by the BMMCs was not influenced by the age. However, the age influenced the performance in the adhesive test, since the recovery promoted by the BMMCs was significantly higher in the young animals. Thus, despite the effect of aging on mortality and lesion size, it did not avoid the induction of sensorimotor function recovery by the BMMCs. Furthermore, our results show that treatment with MNMOs reduced neutrophil infiltration in brain parenchyma after ischemia. Thus the results of this study suggest that the treatment of stroke with BMMC can be beneficial, irrespective of age or gender.

Keywords: stroke; cell therapy; sensorimotor recovery; middle-aged.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representativo dos diferentes tipos de Acidente Vascular Encefálico (AVE)	2
Figura 2 – Representação gráfica da cascata isquêmica induzindo danos cerebrais.	3
Figura 3 – Representação gráfica do panorama das causas de morte no Brasil na faixa etária de 20 a 59 anos.	5
Figura 4 – Representação gráfica das taxas de mortalidade segundo o sexo, a faixa etária e as causas, de adultos no Brasil em 2010.	6
Figura 5 – Representação gráfica da resposta inflamatória pós-isquêmica.	9
Figura 6 – Foto mostrando um rato Wistar com a cabeça imobilizada no aparelho estereotáxico.	28
Figura 7 – Representação esquemática da indução unilateral de isquemia no córtex sensorio-motor através da termocoagulação.	28
Figura 8 – Representação esquemática da extração da fração de células mononucleares da medula óssea a partir do fêmur de ratos <i>Wistar</i>	30
Figura 9 – Foto do frasco contendo a fração de Células Mononucleares da Medula Óssea (MNMOs) após centrifugação e isolamento por gradiente de densidade com Histopaque.	30
Figura 10 – Foto de um rato <i>Wistar</i> dentro do cilindro de vidro mostrando a exploração vertical do teste do cilindro.	35
Figura 11 – Foto de um rato <i>Wistar</i> preparado para ser submetido ao teste de remoção do adesivo.	36
Figura 12 – Representação gráfica e comparativa entre animais tratados e conrole no efeito da terapia com Células Mononucleares da Medula Óssea (MNMOs), após a indução de isquemia cerebral focal, através do teste do cilindro.	42

Figura 13 – Representação gráfica da interação significativa entre idade e gênero (F=8,53, p<0,01) no teste do cilindro.....	43
Figura 14 – Representação gráfica da interação entre o tratamento e tempo (F = 3,6, p<0,001) no teste do cilindro.	44
Figura 15 – Representação gráfica e comparativa entre animais tratados e controles no efeito da terapia com Células Mononucleares da Medula Óssea (MNMOS), após a indução de isquemia cerebral focal, através do teste de remoção do adesivo.....	45
Figura 16 – Representação gráfica dos dados reunidos de cada grupo experimental (descartando os valores do Dia Pré-Isquemia (DPI 0)) no teste de remoção do adesivo.....	46
Figura 17 – Representação gráfica da interação significativa entre idade e tratamento (F= 13,71, p <0,001) no teste de remoção do adesivo.....	47
Figura 18 – Volume da lesão isquêmica.....	48
Figura 19 – Representação gráfica do efeito da idade na extensão da lesão isquêmica.	49
Figura 20 – Representação gráfica da quantificação da infiltração de neutrófilos no tecido encefálico pós-isquêmico, 48 horas após a isquemia.	51
Figura 21 – Representação gráfica da atividade da Mieloperoxidase (MPO) no tempo de sobrevivência de 48 horas após a isquemia.	52

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Relação de ratos <i>Wistar</i> utilizados nos experimentos.....	26
Tabela 2 – Relação dos grupos experimentais relacionando o sexo e a idade de cada animal usado para análise comportamental.	33
Tabela 3 – Taxa de sobrevivência após indução da isquemia.....	40

ABREVIATURAS

AVE - Acidente Vascular Encefálico;

BHE - Barreira Hematoencefálica;

DMEM-F12 - Meio de cultura celular Dulbecco e Mistura de Nutrientes de Ham F12
(do inglês: *Dulbecco's modified eagle medium*);

DPI – Dias Pós-isquemia;

DPI 0 – Dia Pré-isquemia;

FJ – Fêmeas Jovens;

FJ-controle - Fêmeas Jovens Controle;

FJ-MNMOs - Fêmeas Jovens Tratadas;

FMI - Fêmeas de Meia Idade;

FMI-controle - Fêmeas de Meia Idade Controle;

FMI-MNMOs - Fêmeas de Meia Idade Tratadas;

i.p. - Intraperitoneal;

MJ – Machos Jovens;

MJ-controle - Machos Jovens Controle;

MJ-MNMOs - Machos Jovens Tratados;

MMI - Machos de Meia Idade;

MMI-controle - Machos de Meia Idade Controle;

MMI-MNMOs - Machos de Meia Idade Tratados;

MNMOs - Células Mononucleares de Medula Óssea;

MPO – Mieloperoxidase;

OACM - Oclusão da Artéria Cerebral Média;

PBS - Salina Tamponada com Fosfato (do inglês: *phosphate buffered saline*);

rt-PA - Ativador de Plasminogênio Tecidual Recombinante (do inglês: *recombinant tissue plasminogen activator*);

TTC - Cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (do inglês: *2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride*);

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABELAS	x
ABREVIATURAS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Acidente Vascular Encefálico	1
1.2. Resposta Inflamatória Após o AVE	7
1.2.1. Infiltração de Neutrófilos	10
1.3. Tratamento do AVE	12
1.3.1. Terapia Celular no AVE	13
1.3.1.1. Terapia com Células Mononucleares de Medula Óssea	15
1.4. Modelos Animais	17
1.5. Influência de Idade e Gênero nos Danos Causados pelo AVE	20
1.6. Testes Comportamentais para Avaliação Funcional	22
1.6.1. Teste do Cilindro	23
1.6.2. Teste de Remoção do Adesivo	23
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo Geral.....	25
2.2. Objetivos Específicos	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Animais.....	26
3.2. Indução Unilateral de Isquemia no Córtex Sensório-motor Através da Termocoagulação.....	27
3.3. Obtenção das MNMOs	29

3.4. Administração Intravenosa de Células Mononucleares da Medula Óssea ou Veículo	31
3.5. Grupos Experimentais	31
3.6. Testes para Avaliação Funcional	34
3.6.1. Teste do Cilindro:	34
3.6.2. Teste de Remoção do Adesivo:	35
3.7. Quantificação do Volume de Lesão.....	36
3.8. Avaliação da Infiltração de Neutrófilos no Tecido Encefálico Pós-Isquêmico.....	37
3.9. Análise Estatística	38
4. RESULTADOS	40
4.1. Efeito da Idade e do Gênero Sobre a Taxa de Sobrevivência Após a Isquemia	40
4.2. Avaliação do Efeito da Idade, do Gênero e do Tratamento com MNMOs Sobre a Recuperação das Funções Sensório-motoras após isquemia	41
4.2.1. Teste do Cilindro.....	41
4.2.2. Teste de Remoção do Adesivo	44
4.3. Avaliação do Volume da Lesão Isquêmica	47
4.4. Avaliação da Infiltração de Neutrófilos no Tecido Encefálico Pós-Isquêmico.....	50
5. DISCUSSÃO	53
5.1. Influência de Idade e Gênero nos Danos Causados pela Isquemia/AVE	53
5.2. Infiltração de Neutrófilos no Tecido Encefálico Pós-isquêmico	59
6. CONCLUSÃO	61
7. REFERÊNCIAS	62
8. ANEXO	78

1. INTRODUÇÃO

1.1. Acidente Vascular Encefálico

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é uma perturbação focal ou global da função cerebral, que dura pelo menos 24 horas e resulta em lesões cerebrais provocadas por alterações da irrigação sanguínea. Estas lesões cerebrais são provocadas, devido à isquemia (bloqueio de algum vaso) ou hemorragia (ruptura de algum vaso) (MAUSNER & BATH, 1999; WOLFE, 2000; MAZZOLA *et al.*, 2007; MARKUS, 2008; WHO, 2011). Deste modo o AVE pode ser classificado em dois tipos, AVE isquêmico e AVE hemorrágico (HILTON, 1992; DONNAN, 2008; SHARMA *et al.*, 2014). O AVE isquêmico é caracterizado por uma interrupção do fluxo sanguíneo cerebral causada por um bloqueio parcial ou total de um ou mais vasos sanguíneos e com isso as células do cérebro são desprovidas de oxigênio e nutrientes, ocorrendo a morte de neurônios e células gliais (Figura 1A) (PIRES *et al.*, 2004; MILLER *et al.*, 2010, BROUGHTON *et al.*, 2013; HAO *et al.*, 2014). No AVE hemorrágico ocorre um sangramento anormal dentro das áreas extra vasculares do cérebro, em consequência de aneurisma ou trauma, levando a um aumento da pressão intracraniana, lesando os tecidos cerebrais e restringindo o fluxo sanguíneo distal (Figura 1B) (ELLEKJÆR *et al.*, 1997; O'SULLIVAN & SCHMITZ, 2004; CHAVES, 2000; MAZZOLA *et al.*, 2007; DONNAN, 2008). Aproximadamente 85% dos casos de AVE são causados por isquemia e outros 15% por hemorragias. Ambos são caracterizados pela perda rápida de funções neurológicas (LAKHAN *et al.*, 2009; SAÚDE, 2010; ALBERT EINSTEIN, 2010).

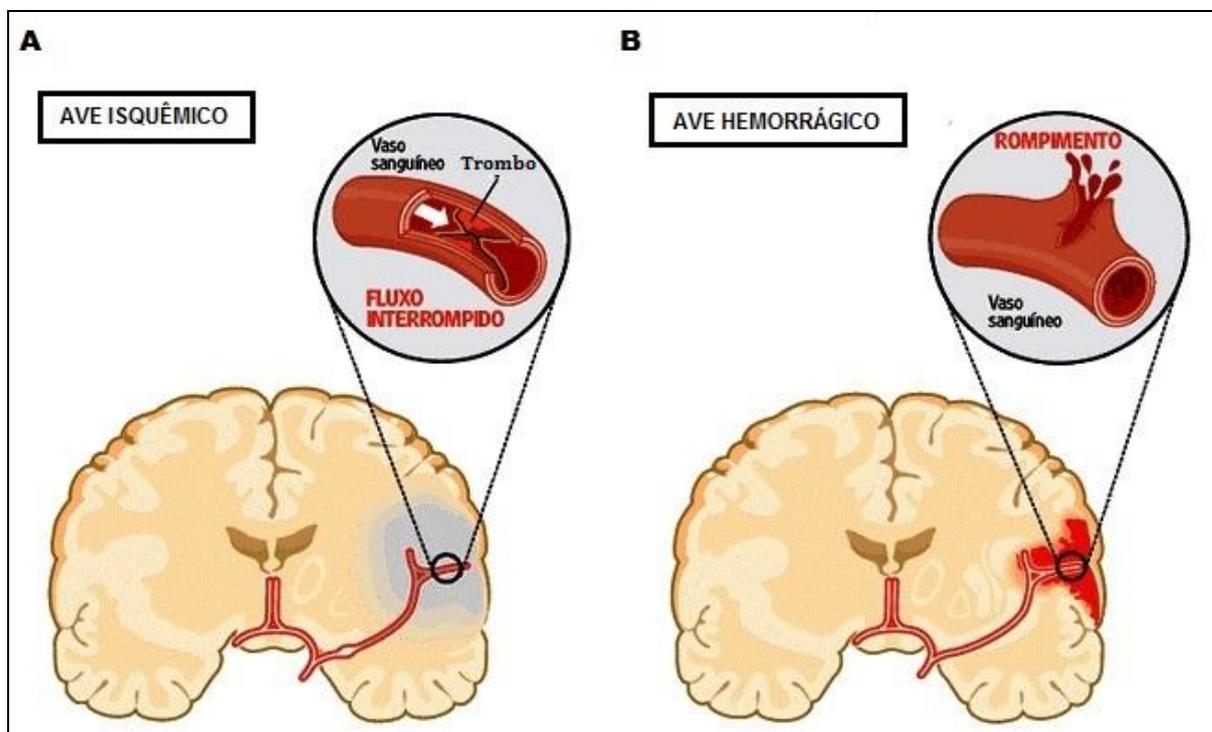


Figura 1 – Esquema representativo dos diferentes tipos de Acidente Vascular Encefálico (AVE). (A) Interrupção do fluxo sanguíneo por trombo, promovendo assim uma lesão isquêmica na região encefálica que era irrigada pelo vaso que foi interrompido. (B) Rompimento de um vaso, causando uma lesão devido à perda do suprimento sanguíneo na região irrigada pelo vaso e também pelo aumento da pressão intracraniana (Adaptado de <http://avcacidentevascular.webnode.pt/acidente-vascular-cerebral/>).

Poucos minutos sem o aporte sanguíneo adequado são suficientes para gerar danos irreversíveis no tecido cerebral, uma vez que o encéfalo depende de um aporte constante de oxigênio e glicose (HENRIQUES-FILHO & BARBOSA, 2011; SHARMA *et al.*, 2014). Desta forma a perda do fluxo sanguíneo em uma região do cérebro faz com que rapidamente seja iniciada a cascata isquêmica, a qual compreende uma série de eventos bioquímicos que conduzem eventualmente à desintegração das membranas celulares e a morte dos neurônios e células gliais no núcleo do infarto (BROUNS e DE DEYN, 2009; LAKHAN *et al.*, 2009; HAO *et al.*, 2014). A hipoperfusão focal grave leva a falha bioenergética, excitotoxicidade, estresse oxidativo, lesão microvascular, disfunção da Barreira Hematoencefálica (BHE) e a inflamação pós-isquêmica. Esses eventos todos agravam a lesão inicial e

podem levar a danos cerebrais permanentes (Figura 2) (BROUNS e DE DEYN, 2009; LAKHAN *et al.*, 2009; HAO *et al.*, 2014; SHARMA *et al.*, 2014).

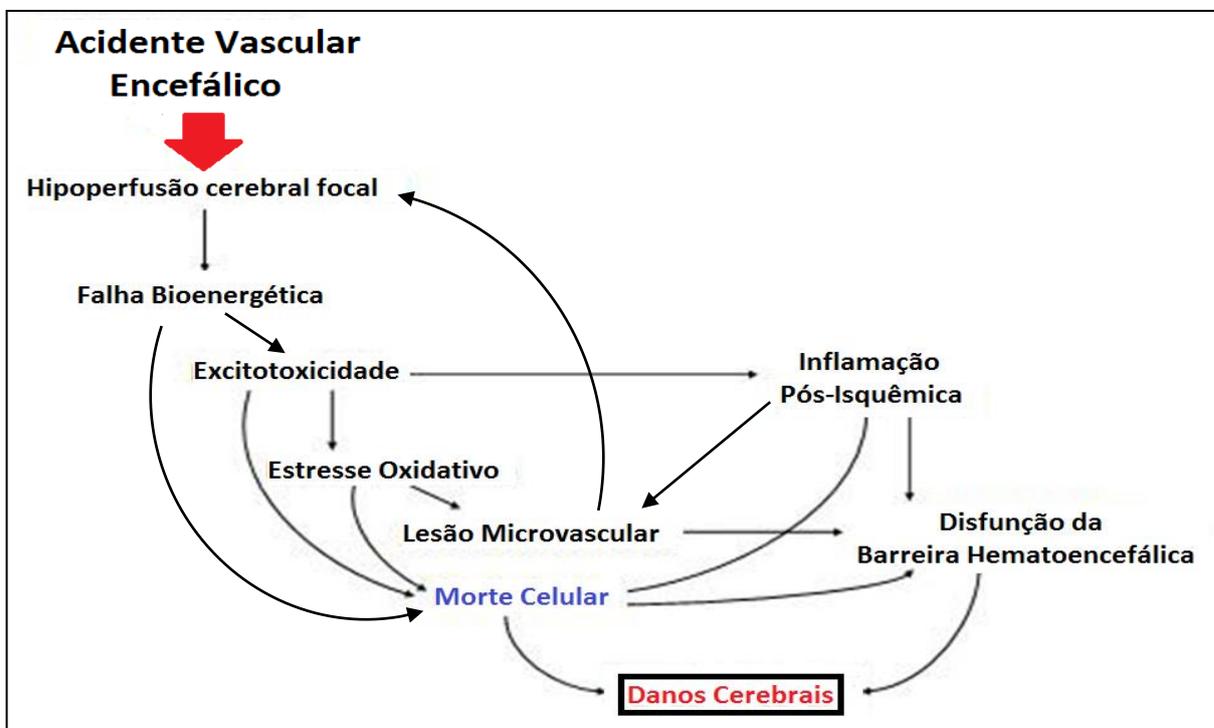


Figura 2 – Representação gráfica da cascata isquêmica induzindo danos cerebrais. Após o acidente vascular encefálico isquêmico, a hipoperfusão de uma área do cérebro inicia uma série complexa de eventos. Falha bioenergética, excitotoxicidade, estresse oxidativo, lesão microvascular, leva a disfunção da barreira hematoencefálica, a inflamação pós-isquêmica, e finalmente, a morte celular dos neurônios, células gliais e células endoteliais, ocasionando assim danos cerebrais (Adaptado de LAKHAN *et al.*, 2009).

Após o AVE duas regiões principais de dano podem ser definidas de acordo com o suprimento de sangue restante (BROUNS e DE DEYN, 2009; LAKHAN *et al.*, 2009). A área do cérebro onde ocorreu a privação completa do abastecimento de sangue é chamada de “núcleo” do infarto. Nesta região ocorre falha energética total, ou quase total, resultando em necrose, causando uma lesão neuronal irreversível em poucos minutos (CEULEMANS *et al.*, 2010; SHARMA *et al.*, 2014). Já a área que está entorno do núcleo e ficou hipoperfundida durante o período de oclusão é conhecida como “penumbra”. Nesta área o fornecimento de sangue colateral de artérias circundantes foi mantido, assim se a reperfusão for restaurada, esta região pode ser recuperada, uma vez que o tecido nessa região está danificado, mas ainda não está morto (HOSSMANN, 2006; SHARMA *et al.*, 2014). Conseqüentemente, a

penumbra é um alvo atraente para a busca de terapias que possam recuperar o tecido cerebral, uma vez, que esta região pode ficar potencialmente viável por 16 a 48 horas, permitindo assim a intervenção e redução dos danos pós-AVE (DONNAN, 2008; LAKHAN *et al.*, 2009; CEULEMANS *et al.*, 2010).

O AVE constitui atualmente um dos maiores problemas de saúde pública mundial. Segundo a Organização Mundial de Saúde o AVE e outras doenças cerebrovasculares são a segunda causa de morte e a principal causa de incapacidade no mundo (DONNAN, 2008; BROUGHTON *et al.*, 2013; WHO, 2014; SMAJLOVIC, 2015). Como esta doença acomete principalmente pessoas com idade mais avançada, o número de indivíduos com AVE tende a aumentar no futuro devido ao aumento da expectativa de vida e envelhecimento da população (DONNAN, 2008; CEULEMANS *et al.*, 2010; BROUGHTON *et al.*, 2013; MCGUCKIN *et al.*, 2013). No Brasil, os dados do Ministério da Saúde, coletados pelo Sistema de Informação de Mortalidade em 2010, mostraram que as doenças cerebrovasculares foram a principal causa de mortes de mulheres entre 20 e 59 anos e está entre as cinco principais causas de morte de homens entre 20 e 59 anos (Figura 3) (SAÚDE, 2011). Em adultos jovens o AVE é considerado uma patologia rara, com uma incidência descrita na literatura que varia entre 5 e 10% do total de AVE (SCHELP *et al.*, 2004), aumentando com a idade e ocorrendo com maior frequência em indivíduos idosos (Figura 4), aumentando o risco de ocorrer quando se soma com as alterações cardiovasculares e metabólicas relacionadas à idade (SCHELP *et al.*, 2004). Existem várias condições que representam fatores de risco para o desenvolvimento do AVE, sendo elas modificáveis (hipertensão arterial, obesidade, diabetes mellitus, tabagismo e sedentarismo) e não modificáveis como, idade, sexo, raça e genética (OLIVEIRA *et al.*, 2006; BUGA *et al.*, 2013; SMAJLOVIC, 2015).

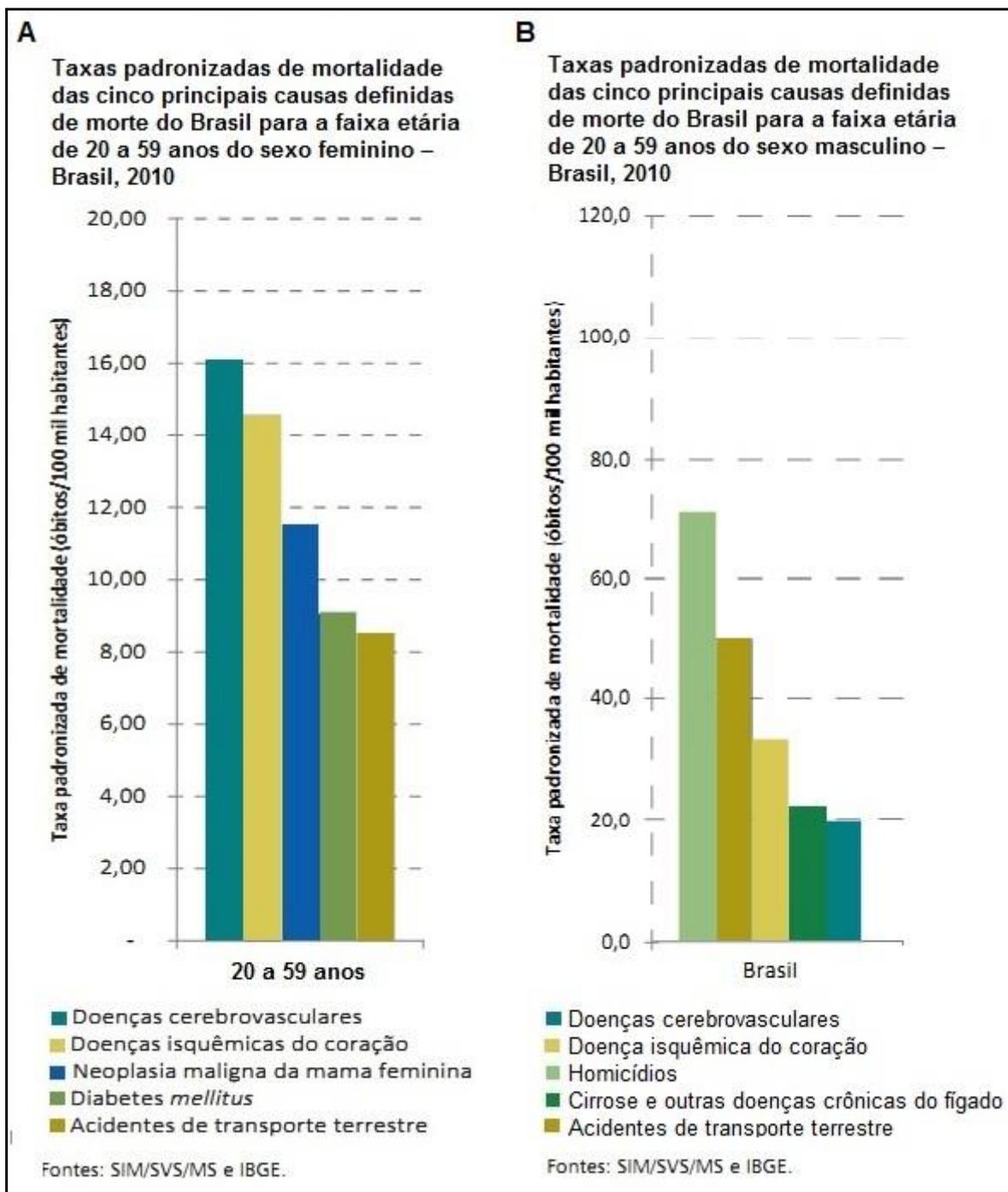


Figura 3 – Representação gráfica do panorama das causas de morte no Brasil na faixa etária de 20 a 59 anos. (A) Taxas padronizadas de mortalidade do sexo feminino. (B) Taxas padronizadas de mortalidade do sexo masculino (Adaptado de SAÚDE, 2011).

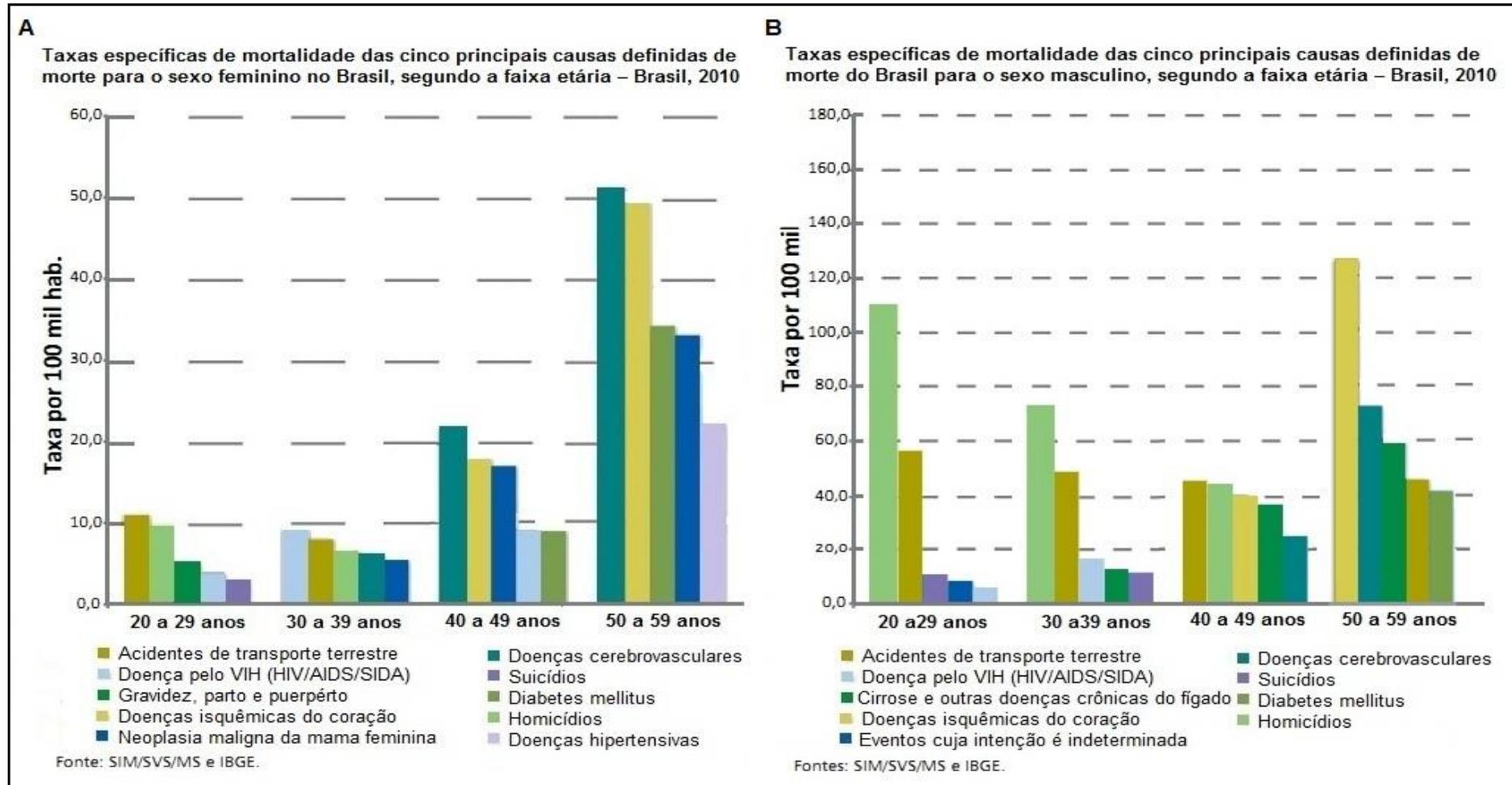


Figura 4 – Representação gráfica das taxas de mortalidade segundo o sexo, a faixa etária e as causas, de adultos no Brasil em 2010. (A) Principais causas de mortalidade segundo a faixa etária para o sexo feminino. (B) Principais causas de mortalidade segundo a faixa etária para o sexo masculino (Adaptado de SAÚDE, 2011).

O AVE pode afetar todo o organismo e quando não leva ao óbito, pode causar sequelas resultantes dos danos causados pela lesão. A extensão do dano após o AVE depende de vários fatores, dentre eles, o grau e a duração da isquemia e a capacidade de recuperação e reparação do cérebro (DIRNAGL *et al.*, 1999; LAKHAN *et al.*, 2009). Dentre as manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes acometidos por esta doença, podemos citar os prejuízos das funções motoras, sensitivas, de equilíbrio e de marcha, além do déficit cognitivo, de aprendizado, memória, atenção, e de linguagem (ERICKSON *et al.*, 2004; SCALZO *et al.*, 2010). Esses prejuízos resultam em limitação na realização das atividades de vida diária, restrições na participação social e, conseqüentemente, piora da qualidade de vida (SCALZO *et al.*, 2010). Por ocasionar uma alta mortalidade e por ser o principal responsável pela incapacitação temporária ou permanente, física e mental em adultos, há um grande número de investimentos sendo feitos em pesquisas na busca do desenvolvimento de terapias para esta doença (STRONG *et al.*, 2007; HAO *et al.*, 2014).

1.2. Resposta Inflamatória Após o AVE

A isquemia cerebral induz uma cascata complexa de alterações bioquímicas e moleculares, incluindo reações inflamatórias que podem contribuir para a progressão do AVE (BRECKWOLDT *et al.*, 2008). A inflamação é uma ferramenta essencial de defesa contra organismos infecciosos. No entanto, torna-se prejudicial quando é prolongada ou ataca autoantígenos (SIMI *et al.*, 2007; CEULEMANS *et al.*, 2010). A resposta inflamatória desempenha um importante papel na patogênese do AVE e doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, esclerose múltipla e doença de Parkinson (DANTON e DIETRICH, 2003; LUCAS *et al.*, 2006; FRANK-CANNON *et al.*, 2009; SHASTRI *et al.*, 2013). Ela é mediada por componentes moleculares e celulares, como citocinas, quimiocinas, leucócitos e células gliais, cujas propriedades podem ser pró e anti-inflamatórias e seus efeitos prejudiciais ou benéficos (EMSLEY e TYRRELL, 2002; LAKHAN *et al.*, 2009; CEULEMANS *et al.*, 2010).

Ao longo das últimas décadas, a compreensão da resposta inflamatória após o AVE tem aumentado devido à extensa pesquisa. Anteriormente, pensava-se que a

resposta inflamatória no cérebro era benéfica e necessária para a reparação. Atualmente, tornou-se claro que a resposta neuroinflamatória também pode ser prejudicial, uma vez que ataques severos de inflamação aguda ou prolongada podem produzir danos secundários a lesão inicial, reduzir a viabilidade neuronal e interferir nos processos de regeneração do cérebro (LUCAS *et al.*, 2006; LELEKOV-BOISSARD *et al.*, 2009; CEULEMANS *et al.*, 2010; BORLONGAN *et al.*, 2012). Além disso, a resposta inflamatória contribui para a formação do infarto após o AVE isquêmico (IADECOLA e ANRATHER, 2011; BORLONGAN *et al.*, 2012; FORGHANI *et al.*, 2014).

Há vários eventos envolvidos na morte celular neural no cérebro de pacientes com AVE (BARKHO e ZHAO, 2011; HAO *et al.*, 2014). Após a isquemia, começa uma resposta inflamatória aguda e prolongada, caracterizada pela ativação de células imunes residentes, a produção de mediadores pró-inflamatórios e infiltração de vários tipos de células inflamatórias no tecido cerebral isquêmico (Figura 5) (DANTON e DIETRICH, 2003; JIN *et al.*, 2010). A liberação de radicais livres após a isquemia cerebral leva à ativação de microglia e astrócitos e posterior produção de mediadores inflamatórios. Tais moléculas irão aumentar a vulnerabilidade dos neurônios, provocar perturbações na BHE, e ainda estimular a gliose (DANTON e DIETRICH, 2003; LAKHAN *et al.*, 2009; CEULEMANS *et al.*, 2010; BROUGHTON *et al.*, 2013). Além disso, as citocinas e quimiocinas estimulam a expressão de moléculas de adesão, tais como molécula de adesão intercelular-1, as moléculas de adesão vascular, selectinas e as integrinas, em células endoteliais, leucócitos e plaquetas (YILMAZ e GRANGER, 2010). Estas moléculas mediam a adesão e extravasamento de neutrófilos, monócitos e linfócitos para o tecido isquêmico (JIN *et al.*, 2010; BROUGHTON *et al.*, 2013). Estes afetam diretamente a sobrevivência e morte neuronal. Consequentemente, mais danos e morte celular ocorrerão (HUANG *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2007; LAKHAN *et al.*, 2009; LELEKOV-BOISSARD *et al.*, 2009). Tal como a cascata isquêmica progride, a morte celular leva a uma nova fase da resposta inflamatória (IADECOLA e ANRATHER, 2011; MAGNUS *et al.*, 2012). Assim, numa etapa posterior, que dura de horas a dias após a lesão, um conjunto de eventos como produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio, liberação de citocinas e quimiocinas, e a ativação de metaloproteinases de matriz, vai amplificar a resposta inflamatória encefálica, ativando ainda mais as

micróglia, astrócitos e a infiltração de leucócitos, causando aumento da quebra da BHE, edema, hemorragia e morte celular (DOYLE *et al.*, 2008; LAKHAN *et al.*, 2009; JIN *et al.*, 2010).

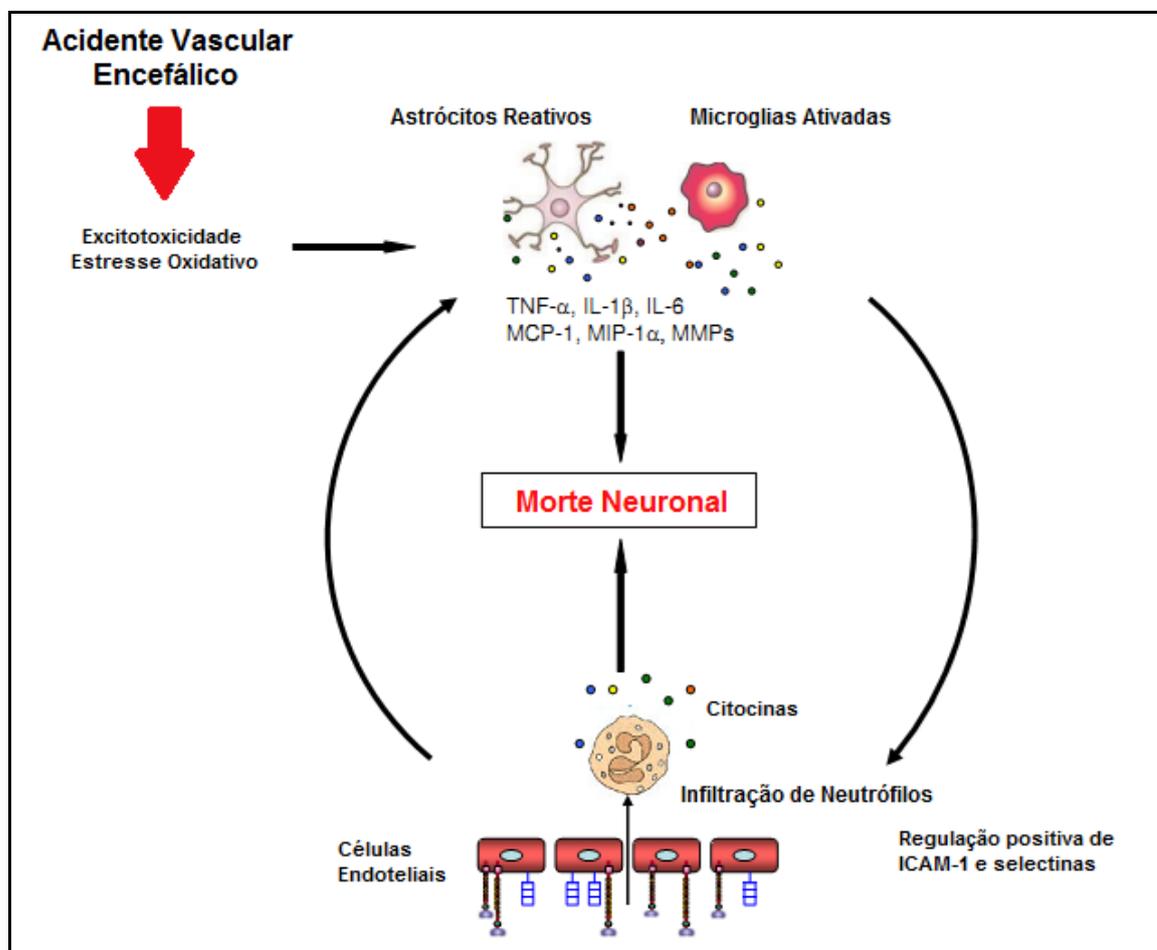


Figura 5 – Representação gráfica da resposta inflamatória pós-isquêmica. Excitotoxicidade e estresse oxidativo causado pelo evento isquêmico inicial ativa as microglias e os astrócitos que secretam citocinas, quimiocinas e metaloproteínas de matriz. Estes mediadores inflamatórios (bolinhas coloridas) conduzem a um aumento da expressão de moléculas de adesão celular em células endoteliais, permitindo que as células inflamatórias derivadas do sangue, principalmente os neutrófilos, se infiltrem na zona cerebral isquêmica. Neutrófilos também secretam citocinas que causam uma maior ativação das células gliais. Estes processos resultam em morte celular neuronal e aumento do dano no cérebro isquêmico (Adaptado de LAKHAN *et al.*, 2009).

No momento não está claro se os efeitos prejudiciais da inflamação superam os mecanismos neuroprotetores ou vice-versa (STOLL *et al.*, 1998; CEULEMANS *et al.*, 2010; MORI *et al.*, 2010). Deste modo, é necessário compreender os efeitos prejudiciais e neuroprotetores da resposta neuroinflamatória após o AVE, permitindo assim o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que reduzam os efeitos

deletérios e reforcem as ações de proteção induzida pelas células inflamatórias (CEULEMANS *et al.*, 2010).

1.2.1. Infiltração de Neutrófilos

Os neutrófilos desempenham uma função essencial na construção de uma resposta imune inata rápida contra patógenos invasores, mas também podem danificar os tecidos devido ao seu alto teor de enzima proteolítica, da capacidade de gerar intermediários reativos de oxigênio e de ativar o sistema complemento. Portanto, a ativação de neutrófilos deve ser controlada para evitar a liberação descontrolada de seu conteúdo intracelular (HERNANDEZ *et al.*, 1987; NATHAN, 2006; PEREZ-DE-PUIG *et al.*, 2014).

A infiltração de leucócitos no cérebro é impedida pela BHE, mas sob condições patológicas essas células são ativadas e podem aderir a vénulas pós-capilares e se infiltrar no parênquima cerebral através da BHE (EASTON, 2013; PEREZ-DE-PUIG *et al.*, 2014). Esta infiltração nas regiões do infarto tem sido correlacionada com a gravidade e extensão dos danos do tecido cerebral e conseqüentemente a sequelas neurológicas mais graves após o AVE (PRICE *et al.*, 2004; BRECKWOLDT *et al.*, 2008; BUCK *et al.*, 2008; LAKHAN *et al.*, 2009).

Nas primeiras quatro a seis horas após o início da isquemia, ocorre a transmigração dos leucócitos circulantes (principalmente os neutrófilos) para a região isquêmica, com subsequente liberação de mediadores pró-inflamatórios (BROUNS e DE DEYN, 2009; LAKHAN *et al.*, 2009). Os neutrófilos são os primeiros subtipos de leucócitos que entram no tecido isquêmico (30 minutos a algumas horas) (JIN *et al.*, 2010; BROUGHTON *et al.*, 2013).

Devido ao aumento da expressão das moléculas de adesão após o AVE, os neutrófilos sofrem alterações conformacionais (modificações no citoesqueleto celular) e migram através da parede do vaso endotelial (diapedese) (CEULEMANS *et al.*, 2010). Após esse cruzamento, quimiocinas irão atrair neutrófilos para o tecido isquêmico através de um gradiente de concentração (quimiotaxia) (HUANG *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2007; CEULEMANS *et al.*, 2010). Os neutrófilos colaboram direta e indiretamente para a lesão secundária do tecido potencialmente viável, através da liberação de citocinas pró-inflamatórias e outros produtos citotóxicos, tais

como, proteases, óxido nítrico, espécies reativa de oxigênio, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato e metaloproteinases de matriz (YILMAZ e GRANGER, 2010). A liberação de enzimas proteolíticas danifica as membranas das células endoteliais e da lâmina basal, aumenta a permeabilidade da BHE e contribui para o edema pós-isquêmico (GRØNBERG *et al.*, 2013; PEREZ-DE-PUIG *et al.*, 2014). Os neutrófilos também aderem à parede do vaso podendo ocasionar uma obstrução secundária na microvasculatura cerebral, a formação de edema, necrose e infarto do tecido (HUANG *et al.*, 2006; CEULEMANS *et al.*, 2010; WEI *et al.*, 2013; PEREZ-DE-PUIG *et al.*, 2014).

A Mieloperoxidase (MPO) é uma das proteínas mais abundantes nos granulócitos dos neutrófilos. Estas enzimas são armazenadas em grânulos azurófilos e quando os neutrófilos são estimulados elas são liberadas no meio (KLEBANOFF, 1999; METZLER *et al.*, 2011; WILGUS *et al.*; 2013). A MPO tem sido frequentemente utilizada para avaliar o índice de infiltração de neutrófilos no tecido cerebral (BRADLEY *et al.*, 1982; WEI *et al.*, 2013; FORGHANI *et al.*, 2014). Esta enzima também é expressa na linha mielóide, especialmente em monócitos e macrófagos / microglia (BRECKWOLDT *et al.*, 2008; FORGHANI *et al.*, 2014). A MPO interage com o peróxido de hidrogênio e gera espécies altamente reativas, incluindo hipoclorito e espécies reativas de oxigênio, e sua atividade pode promover apoptose e nitrotirosinação de proteínas (LO *et al.*, 2005; LAU & BALDUS, 2006; FORGHANI *et al.*, 2014). Assim, o aumento da atividade de MPO pode contribuir para a progressão da lesão através de alterações na proteína e geração de radicais de oxigênio que levam à morte celular (BRECKWOLDT *et al.*, 2008; FORGHANI *et al.*, 2014). MPO é amplamente distribuída nos tecidos isquêmicos e é detectada até três semanas pós-isquemia (MATSUO *et al.*, 1994). Ela é uma componente chave da inflamação e tem sido demonstrado que desempenha um papel importante na resposta inflamatória pós-isquêmica em modelos animais de AVE (HALLENBECK *et al.*, 1986; MATSUO *et al.*, 1994). Na isquemia cerebral em humanos, certos genótipos de MPO são associados com o aumento do tamanho do infarto cerebral e pior resultado funcional, além disso, os níveis séricos de MPO em pacientes com AVE são elevados em comparação com indivíduos normais (HOY *et al.*, 2003; FORGHANI *et al.*, 2014). Desta forma, a atividade desta enzima tem sido correlacionada com o tamanho da lesão cerebral (MATSUO *et al.*, 1994;

BRECKWOLDT *et al.*, 2008; FORGHANI *et al.*, 2014). Assim evidências demonstram um efeito deletério da inflamação e da elevação dos níveis de MPO associada com o AVE, com isso esta enzima participa da propagação do infarto e serve como um marcador para a inflamação (HOY *et al.*, 2003; ELKIND *et al.*, 2004; FORGHANI *et al.*, 2014).

1.3. Tratamento do AVE

Atualmente, existem poucas alternativas realmente eficazes para o tratamento e recuperação dos pacientes acometidos pelo AVE. Geralmente existem três estágios de tratamento do AVE: tratamento preventivo, tratamento do AVE agudo e o tratamento de reabilitação pós-AVE (ABC DA SAÚDE, 2010; HSC, 2012; NINDS, 2015). O tratamento preventivo inclui a identificação e controle dos fatores de risco. Esse tratamento consiste na avaliação e no acompanhamento neurológico regular, bem como o controle da hipertensão, da diabetes, a suspensão do tabagismo e o uso de determinadas drogas (anticoagulantes) que contribuem para a diminuição da incidência do AVE (PIRES *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006; BUGA *et al.*, 2013).

Alguns sinais clínicos apresentados por pacientes acometidos pelo AVE são: fraqueza ou adormecimento em apenas um lado do corpo; dificuldade para falar e/ou entender coisas simples, engolir, andar e enxergar; tontura; perda da força da musculatura do rosto; dor de cabeça intensa e perda da coordenação motora. Esses sinais acontecem de forma súbita e podem ser únicos ou combinados (ALBERT EINSTEIN, 2012). O AVE em evolução constitui uma emergência médica, deve ser tratado rapidamente em ambiente hospitalar. O tratamento do AVE isquêmico agudo consiste em receber medicamentos trombolíticos com objetivo de melhorar os sintomas e minimizar a lesão cerebral enquanto o AVE está ocorrendo, por meio da rápida dissolução do coágulo que está causando a isquemia (HACKE *et al.*, 2008). O ativador de plasminogênio tecidual recombinante (rt-PA) é a única terapia aprovada e eficaz para o AVE isquêmico até o momento (CEULEMANS *et al.*, 2010; DOEPPNER e HERMANN, 2010; BROUGHTON *et al.*, 2013). Entretanto o rt-PA deve ser administrado dentro de 3 a 4,5 horas após o início do AVE isquêmico (MARLER, 1995; DURUKAN & TATLISUMAK, 2007; HAO *et al.*, 2014). O uso de terapia antitrombótica é importante para evitar recorrências. Além disso, devem-se

controlar outras complicações, principalmente em pacientes acamados (pneumonias, tromboembolismo, infecções, úlceras de pele) onde a instituição de fisioterapia previne recorrências e tem papel importante na recuperação funcional do paciente (HSC, 2012). A reabilitação pós-AVE ajuda o indivíduo a superar as dificuldades resultantes dos danos causados pela lesão. Ela consiste em diferentes técnicas que ajudam a recuperar o máximo possível a função anterior (como a pessoa era antes). Essa reabilitação deve ser feita por uma equipe de profissionais de saúde (médicos, fisioterapeutas, psicólogos, enfermeiros e fonoaudiólogos) e sempre que possível com o envolvimento de familiares e amigos (NUNES *et al.*, 2006; HSC, 2012).

A grande maioria dos pacientes não consegue receber o tratamento emergencial com trombolíticos numa curta janela terapêutica, deste modo o tratamento é administrado em apenas 5-10% dos casos (DURUKAN & TATLISUMAK, 2007; HACKE *et al.*, 2008; WAGNER *et al.*, 2012). Somado a isto, há dificuldades enfrentadas por muitos pacientes na reabilitação, devido ao fato da maioria desses pacientes não terem condições financeiras para arcar com os custos de um tratamento adequado. Conseqüentemente, o sucesso do tratamento do AVE continua sendo um dos grandes desafios da medicina clínica (BRENNEMAN *et al.*, 2010; WAGNER *et al.*, 2012; HAO *et al.*, 2014).

1.3.1. Terapia Celular no AVE

O AVE isquêmico é caracterizado pela perda aguda de neurônios, astroglia e oligodendroglia, e rompimento da arquitetura sináptica (HAO *et al.*, 2014). A neurorestauração pós-AVE é um processo delicado que envolve diversos mecanismos de restauração (CHEN *et al.*, 2009; HERMANN e CHOPP, 2012; CHEN *et al.*, 2014). Com isso, devido a natureza complexa da lesão cerebral pós-isquêmica e da falta de tratamentos eficazes, a busca de novas terapias para a plena recuperação ou a minimização dos danos causados pelo AVE tem sido constante (BROUGHTON *et al.*, 2013). As abordagens utilizando células-tronco têm emergido como um tratamento promissor, apresentando o potencial de agir sobre vários mecanismos de lesão, promovendo a neuroproteção e neuroreparo, via secreção de vários fatores tróficos, migração, diferenciação e regeneração dos neurônios e

células gliais (BAO *et al.*, 2011; WAGNER *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2013; GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2014; HAO *et al.*, 2014).

As células-tronco são células indiferenciadas com potencial ilimitado de proliferação e autorrenovação, e são classificadas como sendo de origem embrionária, fetal ou adulta (YU *et al.*, 2009; BROUGHTON *et al.*, 2013). Embora as células-tronco embrionárias e células-tronco fetais sejam consideradas uma fonte atraente para os processos da engenharia de tecidos produzindo efeitos benéficos após o AVE experimental, a sua aplicação é limitada, devido à baixa disponibilidade, à formação de teratomas, e às preocupações éticas (DELCROIX *et al.*, 2010; DOEPPNER e HERMANN, 2010). Assim, as células-tronco adultas ou células precursoras estão sendo intensamente estudadas e seu potencial neuroprotetor após a isquemia cerebral tem sido demonstrado (HAAS *et al.*, 2005; DOEPPNER e HERMANN, 2010). As células-tronco adultas são classicamente definidas como células pluripotentes, que dão origem às células do tecido do qual foram obtidas. Nesta categoria estão incluídas as células do sangue de cordão umbilical, as de medula óssea e as células-tronco existentes dentro de cada tecido adulto, incluindo o sistema nervoso (MENDEZ-OTERO *et al.*, 2009). Dentre as células-tronco adultas, as células de medula óssea são as que vêm sendo mais utilizadas, tanto em estudos pré-clínicos, como nos estudos clínicos em andamento (MENDEZ-OTERO *et al.*, 2009).

A medula óssea é uma fonte permanente de células-tronco pluripotentes, que podem originar não somente linhagens celulares hematogênicas e mesenquimais, mas também células de vasos sanguíneos (KÖRBLING e ESTROV, 2003). Os resultados de diversos estudos pré-clínicos demonstram que células-tronco derivadas de medula óssea apresentam um efeito benéfico na recuperação funcional de animais isquêmicos (IIHOSHI *et al.*, 2004; GIRALDI-GUIMARÃES *et al.*, 2009; BRENNEMAN *et al.*, 2010; WAGNER *et al.*, 2012; SAMPAIO *et al.*, 2013). Além disso, a viabilidade e a segurança do tratamento do AVE em humanos com células-tronco de medula óssea autólogas já foram demonstradas em estudos clínicos (BANG *et al.*, 2005; BARBOSA DA FONSECA *et al.*, 2010; BATTISTELLA *et al.*, 2011; SAVITZ *et al.*, 2011; BANERJEE *et al.*, 2012; ROSADO-DE-CASTRO *et al.*, 2013).

Estas células têm sido utilizadas logo após a retirada da medula (a denominada fração mononuclear) ou após diversas etapas de expansão em cultura (células mesenquimais de medula óssea). A vantagem da utilização das células-tronco derivadas da medula óssea em relação a outros tipos é a possibilidade de terapia celular com células retiradas da medula óssea do próprio paciente, o que elimina todas as questões éticas e de disponibilidade (MENDEZ-OTERO *et al.*, 2009). Outras vantagens incluem a ausência de rejeição, facilidade de obtenção, modulação da resposta inflamatória, liberação de fatores neurotróficos e o seu pequeno potencial de diferenciação, o que evita a possibilidade de formação de tumores (MENDEZ-OTERO *et al.*, 2009; MALGIERI *et al.*, 2010).

Embora atualmente não haja uma compreensão clara dos mecanismos detalhados pelo qual as células-tronco de medula óssea medeiam à recuperação neural, existem várias possibilidades (DOEPPNER e HERMANN, 2010; MILLER *et al.*, 2010). Inicialmente, acreditava-se que estas células-tronco poderiam dar origem a células de diferentes tecidos, incluindo neurônios e células da glia. No entanto, mais recentemente vem-se demonstrando que a capacidade de transdiferenciação em células do sistema nervoso e a fusão destas células a outras, como por exemplo, aos neurônios, são muito restritas (ALVAREZ-DOLADO *et al.*, 2003; CRAIN *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2013). Assim, este mecanismo pode não ser o principal responsável pelos efeitos benéficos no tratamento da lesão isquêmica, sugerindo que a capacidade dessas células de serem quimioatraídas para os tecidos lesionados e de liberarem citocinas e fatores tróficos, direta ou indiretamente, sejam os mecanismos predominantes responsáveis por tais efeitos (KRAUSE *et al.*, 2001; CHOPP e LI, 2002; CRAIN *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2013). Desta forma, estes fatores possivelmente resultam em aumento da angiogênese, neurogênese e sinaptogênese, e diminuição da inflamação, com conseqüente aumento no remodelamento do sistema nervoso e melhora funcional (MALGIERI *et al.*, 2010; BORLONGAN *et al.*, 2011; HAO *et al.*, 2014).

1.3.1.1. Terapia com Células Mononucleares de Medula Óssea

Dentre as terapias com células-tronco derivadas de medula óssea, um protocolo alternativo vem sendo estabelecido utilizando as Células Mononucleares

de Medula Óssea (MNMOs). A fração de MNMOs pode ser separada do restante das células da medula óssea por gradiente de densidade (sendo as MNMOs menos densas). Esta fração é bastante heterogênea e numerosa, não sendo necessária a proliferação em cultura para obtenção de quantidade terapeuticamente suficiente (SAVITZ *et al.*, 2011; GIRALDI-GUIMARÃES *et al.*, 2012). Ela é constituída por uma fração muito pequena de células tronco mesenquimais (representam apenas 0,001-0,01% do total de células nucleadas da medula óssea), por uma pequena quantidade de células-tronco hematopoiéticas (que representam apenas 0,0001% do total de células da medula óssea), além de células progenitoras hematopoiéticas e células hematopoiéticas diferenciadas (PITTENGER *et al.*, 1999, ORKIN, 2000; KRAUSE *et al.*, 2001; GIRALDI-GUIMARÃES *et al.*, 2012). Esta constituição heterogênea de células pode favorecer a quimioatração para os tecidos lesados e a produção de várias citocinas e fatores tróficos que promovem, no tecido isquêmico, angiogênese, neurogênese e neuroproteção (KRAUSE *et al.*, 2001; CHOPP e LI, 2002; CRAIN *et al.*, 2005). As MNMOs não exigem manipulações prolongadas, o que as torna mais seguras, principalmente em estudos clínicos com um grande número de pacientes. Elas podem ser obtidas sem cultivo, sendo colhidas entre 1,5 e 6 h para administração autóloga (IIHOSHI *et al.*, 2004; BRENNEMAN *et al.*, 2010; WAGNER *et al.*, 2012; SAMPAIO *et al.*, 2013). Assim, o tratamento pode ser realizado durante a fase aguda de AVE (MENDEZ-OTERO *et al.*, 2007; BANERJEE *et al.*, 2012).

Algumas investigações pré-clínicas com células derivadas de medula óssea demonstraram o potencial terapêutico das MNMOs para o tratamento do AVE (IIHOSHI *et al.*, 2004; GIRALDI-GUIMARÃES *et al.*, 2009; BRENNEMAN *et al.*, 2010; DE VASCONCELOS DOS SANTOS *et al.*, 2010; WAGNER *et al.*, 2012; MINNERUP *et al.*, 2013; SAMPAIO *et al.*, 2013). Além disso, vários ensaios clínicos estão em andamento (BANERJEE *et al.*, 2012; ROSADO-DE-CASTRO *et al.*, 2013).

Tem sido demonstrado que o transplante de MNMOs reduziu o comprometimento neurológico em modelos animais de isquemia cerebral focal nas fases aguda e subaguda; mediou melhorias neurológicas, incluindo, a redução do volume da lesão, a modulação da ativação da microglia, e promoveu a recuperação pós-isquêmica (IIHOSHI *et al.*, 2004; BAKER *et al.*, 2007; KAMIYA *et al.*, 2008; GIRALDI-GUIMARÃES *et al.*, 2009; BRENNEMAN *et al.*, 2010; DE VASCONCELOS

DOS SANTOS *et al.*, 2010; NAKANO-DOI *et al.*, 2010; SHARMA *et al.*, 2010; WAGNER *et al.*, 2012; SAMPAIO *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013). Foi demonstrado também que as MNMOs transplantadas, podem cruzar a BHE e promover a recuperação funcional diminuindo a neurodegeneração, promovendo a angiogênese e arteriogênese, a redução do nível de citocinas pró-inflamatória e liberando numerosos fatores tróficos (BRENNEMAN *et al.*, 2010; SAMPAIO *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013; HAO *et al.*, 2014).

Apesar de alguns estudos demonstrarem que as MNMOs promovem efeitos benéficos devido a sua capacidade de se diferenciar em células gliais, neurônios, células do músculo liso e células endoteliais (ZHANG *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2013). Evidências recentes sugerem que o principal mecanismo responsável pelas melhorias promovidas por essas células é a produção e secreção de citocinas e fatores tróficos, tais como, o fator de crescimento de fibroblastos básico, fator neurotrófico derivado do cérebro, fator de crescimento endotelial vascular e fator neurotrófico derivado das células gliais (BRENNEMAN *et al.*, 2010; SHARMA *et al.*, 2010; BANERJEE *et al.*, 2012). Estes, por sua vez, promovem uma resposta neuroprotetora, modulando a resposta inflamatória pós-isquêmica e atenuando a morte das células neuronais e gliais (BAKER *et al.*, 2007; BRENNEMAN *et al.*, 2010; SHARMA *et al.*, 2010; HAO *et al.*, 2011; SAVITZ *et al.*, 2011; WAGNER *et al.*, 2012).

Avanços significativos têm sido feitos no campo da pesquisa com células-tronco para o AVE e os benefícios potenciais de tais tratamentos são amplos, contribuindo favoravelmente para a neuroproteção e neurorestauração (CEULEMANS *et al.*, 2010). A tradução para a prática clínica, no entanto, tem um longo caminho para ser percorrido. Uma série de ensaios clínicos está em andamento, embora estudos pré-clínicos ainda precisam ser realizados para superar os desafios ainda significativos, que impedem a utilização destas células como uma opção real de tratamento (BANERJEE *et al.*, 2012).

1.4. Modelos Animais

Modelos animais são desenvolvidos para estudo das causas, mecanismos e terapêutica das doenças humanas. Um modelo deve ter características suficientes

para ser semelhante ao objeto imitado e poder ser manipulado sem as limitações do objeto imitado (ROLLIN, 1995). Um modelo animal deverá atender aos seguintes pressupostos: permitir o estudo dos fenômenos biológicos ou de comportamento do animal; permitir que um processo patológico espontâneo ou induzido possa ser investigado; permitir que o fenômeno, em um ou mais aspectos, seja semelhante ao fenômeno em seres humanos (ROLLIN, 1995). As limitações para se investigar uma doença humana podem envolver aspectos éticos ou inerentes à própria doença e ao modo de investigação (ROLLIN, 1995; HART, 1998). Algumas das limitações que podem dificultar ou inviabilizar uma investigação em seres humanos são: esclarecimento e informação a respeito dos eventuais benefícios ou malefícios do procedimento proposto; número suficiente de investigados para representatividade estatística; acompanhamento por todo o período da investigação (tarefa trabalhosa, onerosa e demanda longo tempo); escolha do tratamento padrão ou o uso de eventual placebo é um processo de difícil encaminhamento; dificuldade de encontrar número expressivo de casos para o estudo (baixa incidência ou baixa prevalência da doença na população); coleta do material de avaliação do processo patológico pode exigir procedimentos invasivos, dolorosos ou demorados; entre outros (LEVIN, 1987; FLETCHER *et al.*, 1996). O uso de modelo animal de certas doenças pode superar estas limitações e proporcionar a investigação de uma relação causal de modo mais rápido, menos trabalhoso e menos oneroso (LEVIN, 1987; FLETCHER *et al.*, 1996).

Devido à complexidade do cérebro e da sua resposta a uma lesão, a utilização de sistemas *in vitro* sozinho não consegue avaliar completamente a isquemia cerebral e suas consequências (GRAHAM *et al.*, 2004). Assim a utilização de roedores como modelo para indução de isquemia tem sido frequente. Ratos representam uma adequada espécie para o estudo do AVE por apresentar uma patogenia similar ao humano, e também por possuir uma circulação cerebral anatomicamente semelhante à humana (GRAHAM *et al.*, 2004; JIN *et al.*, 2010). Além de algumas vantagens como o tamanho menor do cérebro, permitindo uma avaliação mais extensa e abrangente de todo o cérebro, sem excesso de tempo, custo, e trabalho (LEVIN, 1987; FLETCHER *et al.*, 1996).

Os modelos de isquemia em roedores podem ser classificados em três categorias de acordo com a localização da lesão, podendo ser isquemias global (bloqueio da circulação em todo o encéfalo), multifocal (ocorrência de isquemia em

vários locais através de embolização) ou focal (redução do fluxo sanguíneo em uma região específica do cérebro) (HUNTER *et al.*, 1995; MURPHY *et al.*, 2004). De acordo com a duração da oclusão, estas podem ser classificadas em isquemia permanente ou transitória (HUNTER *et al.*, 1995; MURPHY *et al.*, 2004). O bloqueio da circulação em todo o encéfalo no modelo de isquemia global só pode ser feito de forma transitória e pode ser induzida através de torniquete no pescoço ou insuflação, oclusão da artéria cefálica, oclusão da aorta e veia cava, parada cardíaca, afogamento, oclusão de quatro vasos (as duas artérias carótidas comuns e as duas artérias vertebrais) ou oclusão bilateral de dois vasos (artérias carótidas comuns) resultando no acometimento de grande parte do encéfalo (GRAHAM *et al.*, 2004; MURPHY *et al.*, 2004). Na isquemia multifocal, vários locais de isquemia resultam a partir de embolização, com coágulos de sangue autólogos ou heterólogos, com microesferas ou tromboes fotoquímicas; a principal desvantagem desse modelo é a inconsistência na localização das lesões (MURPHY *et al.*, 2004). Já a redução do fluxo sanguíneo em uma região específica do cérebro no modelo de isquemia focal pode ser feita de forma transitória (com subsequente reperfusão do tecido isquêmico) ou de forma permanente (sem reperfusão do tecido isquêmico) (HUNTER *et al.*, 1995; GRAHAM *et al.*, 2004), através de infarto cerebral espontâneo, oclusão da artéria cerebral media (OACM), oclusão ipsilateral da artéria carótida comum, ou pela oclusão bilateral da artéria carótida comum (MURPHY *et al.*, 2004).

Na literatura, a maioria dos modelos de isquemia focal envolve a OACM. A oclusão dessa artéria em modelos animais pode ser feita através de injeção de fibrina, tromboes fotoquímica, eletrocoagulação, clips cirúrgicos vasculares, suturas, aplicação de endotelina-1, e introdução de um filamento intraluminal nos vasos (GRAHAM *et al.*, 2004). Sendo este modelo de grande relevância devido ao fato desse vaso ser comumente afetado em vítimas humanas de AVE (HUNTER *et al.*, 1995; GRAHAM *et al.*, 2004).

Outro modelo de isquemia focal é o da termocoagulação, no qual se coagula o sangue dentro dos vasos subpiais sem que haja destruição da dura-máter, com o auxílio de uma sonda quente, que é aproximada à superfície do córtex cerebral promovendo a coagulação do sangue por calor. A isquemia por termocoagulação induz uma lesão nas seis camadas do córtex cerebral localizadas imediatamente

abaixo dos vasos coagulados, sem acometimento da substância branca nem do corpo caloso (SZELE *et al.*, 1995; MIR *et al.*, 2004). Após a indução da isquemia por termocoagulação ocorre a perda progressiva de neurônios na área sob os vasos coagulados, este processo de degeneração se completa de 5 a 7 dias após a isquemia (SZELE *et al.*, 1995). Este modelo é interessante, pois permite que se faça a lesão em diferentes regiões da porção dorsal do córtex, de acordo com a necessidade da pesquisa. Pode-se também variar a extensão da lesão, abrangendo mais ou menos áreas corticais (SZELE *et al.*, 1995; MIR *et al.*, 2004).

1.5. Influência de Idade e Gênero nos Danos Causados pelo AVE

Embora a maior incidência do AVE ocorra em pessoas com idade mais avançada, a maioria dos estudos experimentais de AVE na literatura foram realizados em animais jovens (DIRNAGL *et al.*, 1999; BUGA *et al.*, 2013). No entanto, o envelhecimento promove a queda natural dos processos endógenos de regeneração e reparo, deste modo, os resultados positivos em estudos com animais jovens podem não ser apropriados para projetar abordagens terapêuticas em humanos de meia-idade e idosos (LI *et al.*, 2010; MANWANI *et al.*, 2011; BUGA *et al.*, 2013).

Tanto nos seres humanos quanto nos roedores, o envelhecimento leva a resultados mais graves em idosos do que em indivíduos jovens sobreviventes acometidos pelo AVE e está associado a uma redução na resposta positiva aos tratamentos (ROTHWELL *et al.*, 2004; DINAPOLI *et al.*, 2008; WANG-FISCHER, 2008; POPA-WAGNER *et al.*, 2011; TITOVA *et al.*, 2011). Declínio funcional e cognitivo estão intimamente relacionados com alterações morfológicas do cérebro durante o processo de envelhecimento (BUGA *et al.*, 2013). Além disso, o aumento da vulnerabilidade do cérebro envelhecido ao AVE leva à recuperação desfavorável das funções físicas e cognitivas em indivíduos idosos (MANWANI *et al.*, 2011).

Uma das principais razões para a diferença na resposta do tecido cerebral a um insulto isquêmico entre indivíduos jovens e indivíduos com a idade mais avançada é o nível de resposta do sistema imune inato do cérebro. O cérebro

envelhecido tem rápida formação de cicatriz astrogliar, aumento da reatividade microglial e maior liberação de citocinas, o que prejudica o crescimento axonal e a recuperação do tecido neuronal (LUCIN e WYSS-CORAY, 2009; MANWANI *et al.*, 2011; BUGA *et al.*, 2013).

Apesar do interesse considerável na investigação de determinados fatores de risco para o AVE, tais como hipertensão, hipercolesterolemia, e diabetes, evidências demonstram que a idade é o maior fator de risco para incidência dessa doença (DINAPOLI *et al.*, 2010). Portanto, inúmeros estudos têm enfatizado a importância e relevância de incorporar animais de meia idade e idosos em pesquisa pré-clínica do AVE (DIRNAGL *et al.*, 1999; YAGER *et al.*, 2006; BROUNS e DE DEYN, 2009; BUGA *et al.*, 2013).

Além disso, há evidências de que o gênero também é um fator relevante no nível da lesão, resultados e efeito das terapias (ALKAYED *et al.*, 2000; BENICE *et al.*, 2006; GOKCAY *et al.*, 2011). Muitos aspectos do AVE, como a apresentação clínica e tratamento são semelhantes em ambos os gêneros, mas existem diferenças de gênero, na incidência, na recorrência, nos resultados funcionais, fisiopatologia, e nas taxas de mortalidade (MURPHY *et al.*, 2004). Com isso, as diferenças entre gênero na lesão cerebral e o papel dos esteroides sexuais nestas diferenças tornou-se uma área emergente da pesquisa do AVE (MURPHY *et al.*, 2004). Tem sido bastante enfatizadas as questões sobre saúde da mulher, assim originando investigações relacionadas com os ciclos hormonais, fisiologia da menopausa e terapia de reposição hormonal, uma vez que esses fatores são importantes na ocorrência de muitas doenças, incluindo o AVE (CURRY, 2001). Antes da menopausa, as mulheres têm um menor risco de incidência do AVE em relação aos homens da mesma idade, após a menopausa, a incidência em mulheres, aumenta rapidamente (ALKAYED *et al.*, 2000; TOWFIGHI *et al.*, 2007).

Na literatura, os modelos animais para estudo de AVE e de doenças neurológicas quase exclusivamente utilizam machos (CURRY, 2001). O uso desse gênero foi justificado como um meio de reduzir a variabilidade experimental causada pelos hormônios femininos e baseou-se no pressuposto de que os mecanismos de lesão celular ou efeitos do tratamento nos machos também se aplicam às fêmeas (GRAHAM *et al.*, 2004). No entanto, nos últimos anos, tem-se reconhecido que as condições de doenças e a resposta à terapia podem ser diferentes entre os gêneros,

e as mulheres devem ser incorporadas em ensaios clínicos e de investigação humana (MERKATZ *et al.*, 1993; CURRY, 2001). Fêmeas jovens são mais resistentes à isquemia cerebral; apresentando menores taxas de mortalidade e menores volumes de lesão após o AVE experimental em comparação com machos de mesma idade (ALKAYED *et al.*, 1998). A resposta favorável à isquemia em fêmeas parece diminuir com o aumento da idade, sugerindo um possível papel dos hormônios sexuais na proteção contra a lesão isquêmica (ALKAYED *et al.*, 2000; GOKCAY *et al.*, 2011). Esta diferença entre os gêneros na lesão cerebral isquêmica em animais jovens desaparece após a ovariectomia cirúrgica e pode ser restaurado por reposição hormonal (SIMPKINS *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 1999; ALKAYED *et al.*, 2000).

Portanto, a inclusão de animais mais velhos e a comparação entre os gêneros em modelos experimentais são necessárias para avaliar o real potencial de terapias para o AVE.

1.6. Testes Comportamentais para Avaliação Funcional

Em estudos pré-clínicos de doenças neurológicas são realizados testes comportamentais para avaliar as funções motoras e somatossensorial (SCHALLERT *et al.*, 2000; SCHALLERT, 2006). Através deles é possível detectar o conjunto de prejuízos que ocorrem após o AVE (SCHAAR *et al.*, 2010). Como exposto anteriormente o AVE é o principal responsável pela incapacitação física e mental em adultos no mundo. Algumas das manifestações clínicas apresentadas são prejuízos das funções motoras, sensitivas, de equilíbrio e de marcha, além do déficit cognitivo, de aprendizado, atenção, memória e de linguagem (HILTON, 1992; ELLEKJÆR *et al.*, 1997; ERICKSON *et al.*, 2004). Essas disfunções neurológicas podem ser temporárias ou permanentes. A restauração destas funções é uma das principais metas estabelecidas no tratamento do AVE (SCHALLERT *et al.*, 2000).

Animais com dano unilateral na região do córtex sensório-motor do cérebro irão apresentar déficits na função somatossensorial e conseqüentemente, no uso das patas contralaterais. Assim, esses animais irão exibir uma assimetria comportamental que pode ser facilmente quantificada, através de testes simples, sensíveis e confiáveis, amplamente usados em estudos que envolvem lesões no

Sistema Nervoso Central (SCHALLERT *et al.*, 2000; SCHAAR *et al.*, 2010). Neste estudo foram utilizados os testes do cilindro e de remoção do adesivo, os quais são descritos abaixo, para fazer uma avaliação funcional do efeito da idade e do gênero na eficácia do tratamento com MNMOs no modelo de isquemia cerebral focal.

1.6.1. Teste do Cilindro

O teste do cilindro é utilizado para investigar a função cerebral através da análise dos comportamentos exploratórios de ratos em um cilindro transparente, permitindo avaliar o sistema motor do animal avaliando a preferência na utilização das patas dianteiras no apoio nas paredes do cilindro durante a exploração vertical (SCHALLERT *et al.*, 2000; GHARBAWIE *et al.*, 2004; SCHAAR *et al.*, 2010; VOLKOV *et al.*, 2011). Os números de vezes em que o animal se apoia com a pata dianteira ipsilateral (pata não afetada), com a pata dianteira contralateral (pata afetada) e com ambas é contado e filmado durante um período de tempo (SCHALLERT *et al.*, 2000; GHARBAWIE *et al.*, 2004; SCHAAR *et al.*, 2010; VOLKOV *et al.*, 2011). A partir desses números, calcula-se a taxa de assimetria (% de uso com a ipsilateral - % de uso com a contralateral). Quando o animal é submetido à isquemia focal pela termocoagulação da circulação cortical, os danos causados pela lesão cerebral fazem com que esse animal exiba uma assimetria no uso da pata dianteira durante a exploração vertical, permitindo concluir que quanto maior o valor da taxa de assimetria maior foi a deficiência motora da pata contralateral (SCHAAR *et al.*, 2010).

O teste do cilindro é considerado fácil e objetivo, sensível para déficits crônicos e de alta confiabilidade. Não exige pré-treinamento, embora seja necessária a obtenção prévia de dados antes da indução da lesão cerebral para que se registre o desempenho do animal no estado normal (SCHALLERT *et al.*, 2000).

1.6.2. Teste de Remoção do Adesivo

O teste de remoção do adesivo é um teste sensório-motor utilizado para averiguar os prejuízos relacionados à extinção tátil, após uma lesão focal cortical ou estriatal (SCHAAR *et al.*, 2010). Esse teste é usado para avaliar a preferência de

remoção do adesivo colado no pulso de cada pata dianteira. Consiste de quatro sessões, separadas por intervalo de no mínimo 5 min, de colocação de um pedaço de papel adesivo em cada pulso e posterior verificação de qual pata (contralateral ou ipsilateral) o rato primeiro remove o adesivo (SCHALLERT, 2006; SCHAAR *et al.*, 2010). O animal usa a boca para remover os adesivos. No entanto, após uma lesão no córtex sensório-motor ou no estriado, normalmente ocorre uma tendência deste animal em remover primeiramente o adesivo da pata ipsilateral (SCHALLERT, 2006; SCHAAR *et al.*, 2010).

Este teste não exige treinamento prévio, mas recomenda-se a obtenção de dados antes da indução da lesão cerebral a fim de obter o desempenho do animal no estado normal, bem como a identificação de assimetrias pré-operatórias (SCHAAR *et al.*, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral do estudo foi verificar, em modelo animal de isquemia cerebral focal, o efeito da idade e do gênero na eficácia da terapia com as MNMOs na recuperação das funções sensório-motoras.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar se a idade, mais especificamente entre animais jovens (2-5 meses de vida) e de meia idade (12-17 meses de vida), influencia na recuperação sensório-motora, através da análise de dois testes comportamentais (teste do cilindro e teste de remoção do adesivo);
- Avaliar se o gênero dos animais influencia na recuperação sensório-motora através da análise de dois testes comportamentais (teste do cilindro e teste de remoção do adesivo);
- Quantificar o volume da lesão, avaliando se existe diferença na extensão da lesão isquêmica de acordo com a idade e o gênero;
- Avaliar a infiltração de neutrófilos no tecido encefálico pós-isquêmico através da quantificação da atividade enzimática da mieloperoxidase no grupo de animais machos jovens.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Machos Jovens (MJ) (2-5 meses de vida), Machos de Meia Idade (MMI) (12-17 meses de vida), Fêmeas Jovens (FJ) (2-5 meses de vida) e Fêmeas de Meia Idade (FMI) (12-17 meses de vida) da linhagem *Wistar* albino, fornecidos pelo Biotério Central da UENF (Tabela 1). A idade dos animais foi escolhida baseando-se no estudo feito por Quinn (2005). Neste estudo a idade do rato é correlacionada com a do ser humano, se baseando em vários fatores como: quantos dias de um rato equivalem a 1 ano humano, nascimento, a idade da puberdade, o desmame, a maturidade musculo-esquelética, senescência reprodutiva e expectativa de vida. Desta forma, pode-se fazer uma estimativa aproximada para se utilizar animais que tenham a idade comparada à faixa etária humana na qual a incidência do AVE é elevada.

Os animais foram mantidos em condições controladas de luz (ciclo de 12 horas de claro/escuro) e temperatura de 21 ° C, recebendo água e ração disponíveis *ad libitum*. Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram mantidos, sob as mesmas condições, em local destinado a manutenção de animais experimentais, localizado no próprio biotério.

Todos os animais foram submetidos a procedimentos aprovados pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA – UENF), sob o número de protocolo nº 86 em 02/09/2010.

Tabela 1 – Relação de ratos *Wistar* utilizados nos experimentos.

Animais utilizados para quantificar o volume de lesão	Animais utilizados para extração de MNMOs	Animais utilizados nos testes comportamentais	Animais utilizados para quantificar a infiltração de neutrófilos no parênquima lesionado	Óbitos durante os experimentos	Número total de animais utilizados
16	19	76	19	25	155

3.2. Indução Unilateral de Isquemia no Córtex Sensório-motor Através da Termocoagulação

Os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (10 mg/Kg) e cloridrato de quetamina (100 mg/kg), por via Intraperitoneal (i.p.), e acomodados em uma cama cirúrgica. Cada animal teve sua cabeça fixada num aparelho estereotáxico (Insight®, Ribeirão Preto, SP, Brasil) (Figura 6). Foi realizada uma tricotomia na superfície dorsal da cabeça, com uma posterior incisão na pele e retirada do periósteo craniano com uma solução de peróxido de hidrogênio a 10% para exposição das fissuras cranianas. Com auxílio do estereotáxico foi realizado o alinhamento craniano a partir do bregma para marcação das coordenadas estereotáxicas (eixo médio lateral $\pm 2,0$ mm e anteroposterior, +2,0 mm a -6,0 mm a partir do bregma) obtidas do atlas estereotáxico do encéfalo de rato (PAXINOS e WATSON, 2006). Em seguida foi feita uma craniotomia com o auxílio de uma broca cirúrgica de ponta fina, para exposição dos vasos sanguíneos submeningeanos no córtex sensório-motor esquerdo ou direito. Para escolha do lado da isquemia, levou-se em consideração a pata dianteira de preferência do animal no teste de remoção do adesivo pré-isquemia (sendo sempre induzida a lesão no hemisfério cerebral contralateral à pata de preferência). O sangue dos vasos sanguíneos localizados sob a pia-máter foi coagulado por calor aproximando uma sonda quente (40W, 450-550°C) da dura-máter, mas sem tocá-la, por aproximadamente 20 minutos (Figura 7). A medida que foi induzida a termocoagulação foi observado através de um microscópio estereoscópio binocular com braço pantográfico (D. F. Vasconcellos S.A.®) o escurecimento do sangue no interior dos vasos (Figura 7). A indução da isquemia cortical por termocoagulação levou a uma lesão focal afetando os vasos sanguíneos submeningeanos, incluindo as seis camadas corticais e poupando a substância branca (SZELE *et al.*, 1995; SAMPAIO *et al.*, 2013). Após a termocoagulação, a pele foi suturada e os animais foram mantidos sob aquecimento constante e devolvidos ao biotério após a recuperação da anestesia e mantidos até o tempo de sobrevivência desejado.



Figura 6 – Foto mostrando um rato Wistar com a cabeça imobilizada no aparelho estereotáxico. Foi realizada uma tricotomia, com posterior incisão na pele, retirada do periósteo craniano, e em seguida foi feita uma craniotomia com o auxílio de uma broca cirúrgica de ponta fina para exposição dos vasos sanguíneos subdurais no córtex sensório-motor. (Fonte: acervo pessoal).

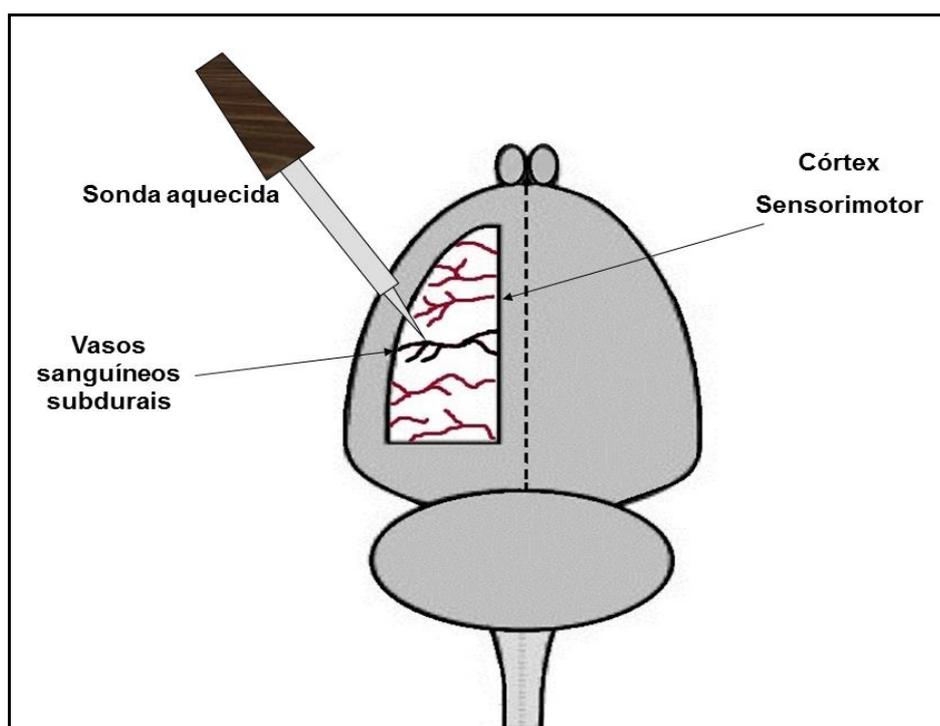


Figura 7 – Representação esquemática da indução unilateral de isquemia no córtex sensório-motor através da termocoagulação. O sangue dos vasos sanguíneos localizados sob a pia-máter foi coagulado por calor através da aproximação de uma de sonda quente (Adaptado de NAPIERALSKI *et al.*, 1998).

3.3. Obtenção das MNMOs

Animais MJ, MMI, FJ e FMI, não integrantes dos grupos experimentais, foram submetidos à eutanásia em uma câmara de dióxido de carbono. O fêmur e a tíbia foram extraídos e separados dos tecidos adjacentes. Em ambiente estéril, as epífises dos ossos foram cortadas, permitindo o acesso à medula com uma seringa contendo 10 ml de meio de cultura DMEM/F12 (do inglês *Dulbecco's modified Eagle medium*; Gibco[®] BRL, Grand Island, NY, EUA) sem soro. Assim, o conteúdo da medula foi lavado e coletado em tubos estéreis de 15 ml, dissociados mecanicamente e centrifugado por 5 minutos (400 x g, velocidade de 8,5 rpm, 25 °C). Recolheu-se o precipitado e, novamente, este foi suspenso em meio de cultura (2 ml de DMEM/F12 sem soro) e submetido à centrifugação (400 x g, velocidade de 8,5 rpm, 25 °C) em 2 ml de Histopaque 1083 (densidade 1,083 g/ml - Sigma-Aldrich Inc.[®] St. Louis, MO, EUA), durante 30 minutos. Para a extração das MNMOs (Figura 8 e 9), foram retiradas as células entre o Histopaque 1083 e o DMEM/F12 sem soro. Essas células foram colocadas em um tubo com 3 ml de PBS 10 mM pH 7,4 para realização da primeira lavagem, ressuspensão e centrifugação por 5 min (400 x g, velocidade de 8,5 rpm, 25 °C). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionados 3 ml de PBS para uma segunda lavagem, ressuspensão das células, centrifugação nas mesmas condições e descarte do sobrenadante. Mais uma lavagem foi efetuada, e após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 1 ml de PBS. As células foram contadas em câmara de *Neubauer* (Kasvi[®]) e foi feita a avaliação simultânea da viabilidade celular pela coloração do azul de tripan (4%). Esta coloração permitiu que as células mortas, que ficam coradas, não fossem contadas. Ao final da contagem, foi feito um cálculo para identificar o volume de solução que continha 30 milhões ($3,0 \times 10^7$) de células. Este volume foi calculado com a seguinte fórmula: n° de células x diluição x $10^4 / 4$. Essas células foram utilizadas para transplante sistêmico em animais previamente submetidos à isquemia. Foram injetados volumes diferentes de acordo com cada nova extração (média de 340 μ l), sendo que o número de células injetado foi o mesmo para todos os animais tratados, ou seja, $3,0 \times 10^7$ células.

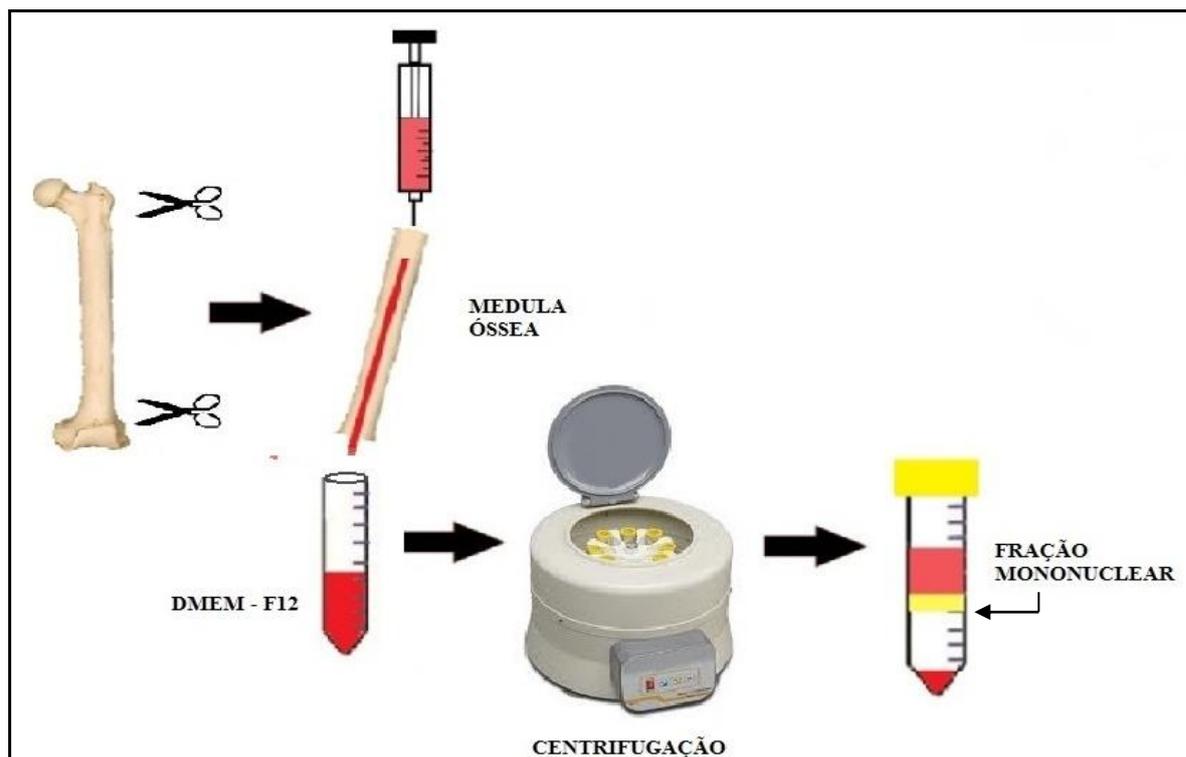


Figura 8 – Representação esquemática da extração da fração de células mononucleares da medula óssea a partir do fêmur de ratos *Wistar*. (Adaptado de DE FREITAS, 2011).

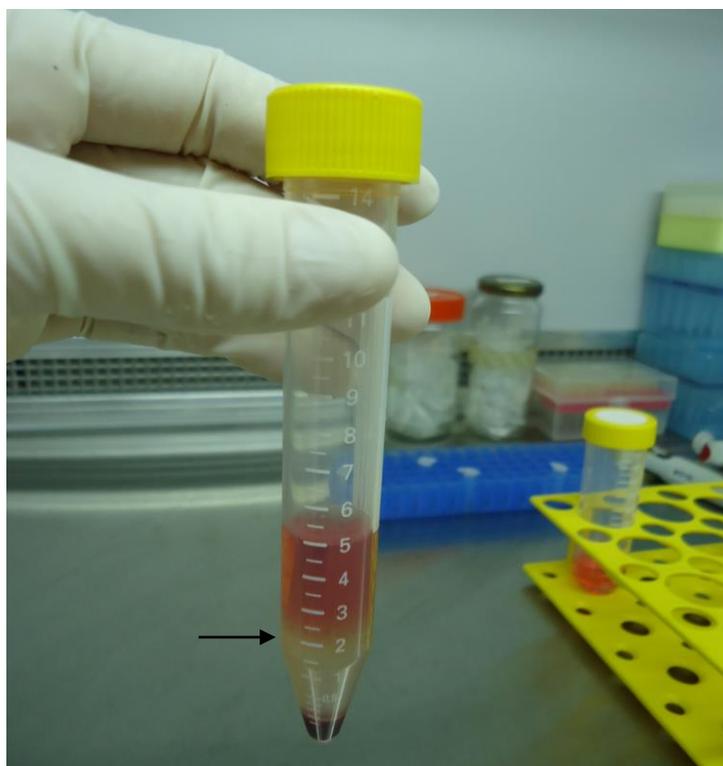


Figura 9 – Foto do frasco contendo a Fração de Células Mononucleares da Medula Óssea (MNMOs) após centrifugação e isolamento por gradiente de densidade com Histopaque. As MNMOs se encontram indicadas com a seta, entre o DMEM F12 e Histopaque 1083. (Fonte: acervo pessoal).

3.4. Administração Intravenosa de Células Mononucleares da Medula Óssea ou Veículo

Aproximadamente 24 horas após a indução da isquemia, foi realizada uma injeção intravenosa de solução PBS contendo MNMOs, em cada animal dos grupos tratados. Estes receberam uma dose de 30 milhões ($3,0 \times 10^7$) de células em volumes que variaram de acordo com cada nova extração (média de 340 μ l). As células foram colhidas de animais doadores com o mesmo gênero e mesma idade. Os animais de grupos controle receberam através de injeção intravenosa, o mesmo volume que foi injetado nos animais tratados, sendo que nestes foi injetado apenas PBS. Para tal, os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (10 mg/Kg, i.p.) e cloridrato de quetamina (100 mg/kg, i.p.) e acomodados em uma cama cirúrgica. Uma incisão foi feita no pescoço, e realizou-se uma dissecação muito cuidadosa a fim de expor a veia jugular. Uma seringa com agulha ultrafina foi introduzida na luz do vaso, e então se injetou, lentamente, as MNMOs ou o veículo (PBS). A injeção foi efetuada na veia jugular situada no lado ipsilateral à lesão isquêmica, para que não ocorressem interferências nos resultados dos testes comportamentais. Em seguida, a incisão foi suturada, os animais observados e, após a recuperação da anestesia, foram devolvidos ao biotério.

3.5. Grupos Experimentais

A avaliação do efeito da idade e do gênero na eficácia do tratamento com as MNMOs na recuperação das funções sensório-motoras em modelo animal de isquemia cerebral focal, foi feita em oito grupos experimentais. Todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de isquemia por termocoagulação e receberam a administração intravenosa de células MNMOs ou veículo (Salina Tamponada com Fosfato (PBS) aproximadamente 24 horas após a indução da isquemia. Testes do cilindro e de remoção do adesivo foram realizados em todos os grupos. Desta forma, constituíram-se os seguintes grupos:

- **MMI-MNMOs:** constituído pelos ratos machos de meia idade tratados com MNMOs (receberam as MNMOs de machos doadores de mesma idade).
- **MMI-controle:** constituído pelos ratos machos de meia idade controle, que receberam administração intravenosa de PBS (veículo).
- **FMI-MNMOs:** constituído pelas ratas fêmeas de meia idade tratadas com MNMOs (receberam as MNMOs de fêmeas doadoras de mesma idade).
- **FMI-controle:** constituído pelas ratas fêmeas de meia idade controle, que receberam administração intravenosa de PBS (veículo).
- **MJ-MNMOs:** constituído pelos ratos machos jovens tratados com MNMOs (receberam as MNMOs de machos doadores de mesma idade).
- **MJ-controle:** constituído pelos ratos machos jovens controle, que receberam administração intravenosa de PBS (veículo).
- **FJ-MNMOs:** constituído pelas ratas fêmeas jovens tratadas com MNMOs (receberam as MNMOs de fêmeas doadoras de mesma idade).
- **FJ-controle:** constituído pelas ratas fêmeas jovens controle, que receberam administração intravenosa de PBS (veículo).

O número de animais para cada grupo e as suas idades estão apresentados na tabela 2.

No grupo sham, também conhecido como grupo “cirurgia-controle”, os animais são submetidos aos procedimentos para a indução da isquemia até o passo da craniotomia e em seguida a pele é suturada. Este grupo não foi avaliado neste estudo, pois anteriormente já foi demonstrado que este procedimento não induz lesão, desta forma os animais não apresentaram nenhuma perda de função sensório-motora (RODRIGUES *et al.*, 2013).

Tabela 2 – Relação dos grupos experimentais relacionando o sexo e a idade de cada animal usado para análise comportamental.

Grupos Experimentais	MJ-MNMOs	MJ-controle	MMI-MNMOs	MMI-controle	FJ-MNMOs	FJ-controle	FMI-MNMOs	FMI-controle
Número de animais utilizados	9	8	11	10	10	10	9	9
	80	80	370	370	56	56	370	371
	80	80	402	370	56	56	370	371
	80	80	402	424	56	56	452	371
	115	115	424	424	114	114	452	452
	115	115	424	424	114	114	452	452
Idade de cada animal isquêmico (em dias)	115	115	424	435	114	114	476	476
	115	115	435	438	114	134	476	476
	115	115	438	445	134	134	476	476
	126	-	445	515	134	135	476	476
	-	-	515	515	135	135	-	-
	-	-	515	-	-	-	-	-

(-), indica posição na tabela que não foi preenchida com um animal em relação a um grupo experimental.

3.6. Testes para Avaliação Funcional

Para avaliação das funções motora e somatossensorial, foram realizados testes apropriados para estudos pré-clínicos de doenças neurológicas (SCHALLERT *et al.*, 2000; SCHALLERT, 2006). Todos os animais de cada grupo experimental foram submetidos aos testes do cilindro e de remoção do adesivo. Tanto no teste do cilindro quanto no teste de remoção do adesivo foram medidos os rendimentos dos indivíduos machos e fêmeas, jovens e de meia idade (tratados e controles) um dia antes da isquemia (Dia Pré-isquemia, DPI 0), com o intuito de avaliar o estado normal do animal, e nos seguintes Dias Pós-isquemia (DPI): 2, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84 e 91. Os resultados de cada grupo em cada tempo foram comparados.

3.6.1. Teste do Cilindro:

Consiste na avaliação da preferência na utilização das patas dianteiras no apoio na parede de um cilindro de vidro transparente (20 cm de diâmetro x 30 cm de altura) durante a exploração vertical (Figura 10). Cada animal foi colocado dentro do cilindro e filmado por 5-10 minutos. Os vídeos foram analisados com programas de vídeo, e foram contados os números de vezes que em o animal se apoiou com a pata contralateral à lesão, com a ipsilateral e com ambas. Cada apoio só foi considerado e contado como um evento independente se ocorrer por no mínimo 1 segundo. Foi calculada a taxa de assimetria (% de uso com a ipsilateral - % de uso com a contralateral. As porcentagens foram calculadas em relação ao total de subidas: número de usos com a contralateral + com a ipsilateral + com ambas). Assim $X = 0$ indica uso simétrico das patas; $0 < X \leq 100$ indica uso maior da ipsilateral e $-100 \leq X < 0$ um uso maior da contralateral (SCHALLERT *et al.*, 2000). A deficiência motora da pata contralateral estava relacionada diretamente com a taxa de assimetria, então, quanto maior o valor da taxa de assimetria maior foi a deficiência motora da pata contralateral à lesão.

Com o intuito de padronizar os déficits motores causados pela indução da isquemia, animais que apresentaram taxa de assimetria menor que 30 no 2^o DPI, não foram incluídos neste teste (mas puderam ser usados no teste de remoção do

adesivo). Além disso, não foram usados animais com possíveis déficits prévios à isquemia. Assim, somente animais com taxa de assimetria de no máximo 15 no teste pré-isquemia (realizado um dia antes da cirurgia), foram usados neste estudo.



Figura 10 – Foto de um rato *Wistar* dentro do cilindro de vidro mostrando a exploração vertical do teste do cilindro. (Fonte: acervo pessoal).

3.6.2. Teste de Remoção do Adesivo:

Este teste avalia a preferência de remoção de um adesivo colado em cada pulso de cada pata dianteira (Figura 11). O teste consistiu de quatro sessões, separadas por intervalos de no mínimo 5 min, em que um papel adesivo redondo (diâmetro de 13 mm) era colado em cada pulso, observando-se em seguida de qual pata (contralateral ou ipsilateral) o rato primeiro removeu o adesivo. A porcentagem de preferência pelo lado contralateral foi calculada (nº de retiradas primeiramente no

lado contralateral / nº de retiradas primeiramente no lado contralateral + nº de retiradas primeiramente no lado ipsilateral), sendo: 50% indica sem preferência; >50% indica preferência pelo lado contralateral; < 50% indica preferência pelo lado ipsilateral (SCHAAR *et al.*, 2010).

Para padronização dos déficits sensitivos entre os animais após a indução da isquemia, se estabeleceu que o percentual de preferência no 2º DPI fosse de 0%. Animais que apresentaram preferência maior que 0% não foram usados neste teste (mas puderam ser usados no teste do cilindro).

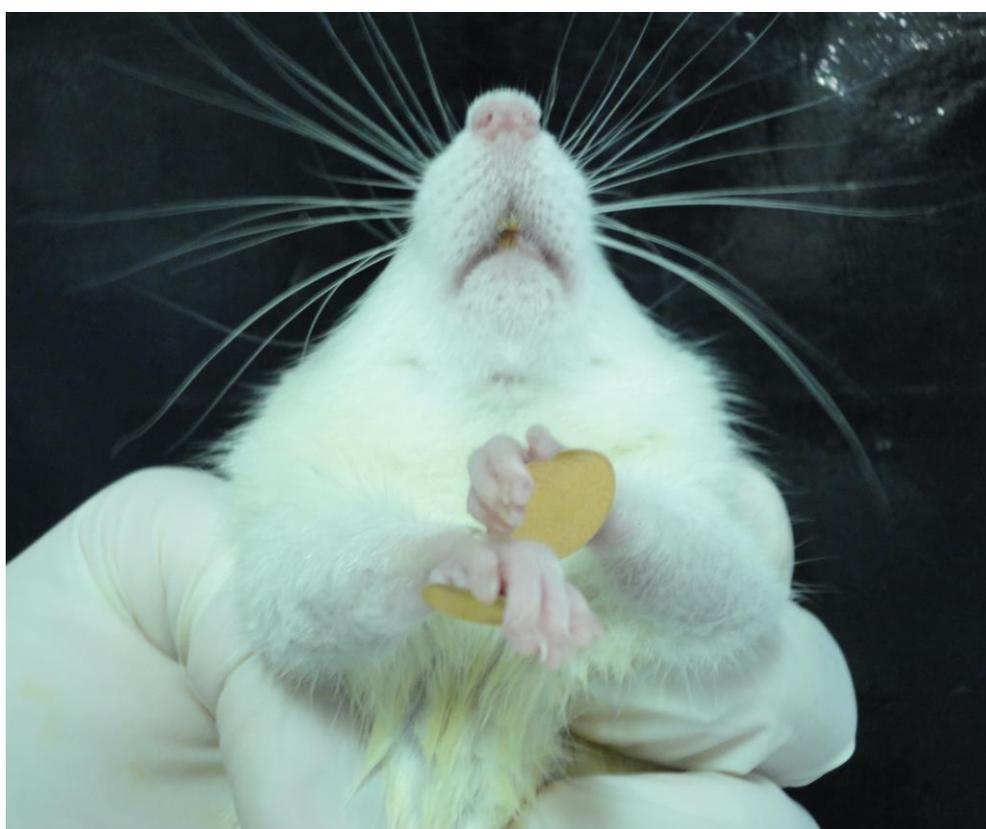


Figura 11 – Foto de um rato *Wistar* preparado para ser submetido ao teste de remoção do adesivo. Sob o pulso de suas patas dianteiras encontra-se colado o papel adesivo de 13 mm que o rato terá que retirar. (Fonte: acervo pessoal).

3.7. Quantificação do Volume de Lesão

O cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC) é um sal que atravessa a membrana plasmática da célula e sofre uma redução química, recebendo um íon de H⁺ de enzimas desidrogenases participantes do ciclo de Krebs, nas mitocôndrias das células vivas. Esta redução origina o trifetil formazan, que leva a diferença de

coloração entre um tecido sem lesão e o infartado, o tecido sem lesão apresentou uma cor vermelha, já a região da lesão isquêmica cortical focal apresenta morte celular, assim esta região é caracterizada por ausência de marcação pelo TTC e conseqüentemente esta região tecidual apresentou-se branca (BEDERSON *et al.*, 1986).

Para quantificação do volume da lesão foram utilizados MMI (n=4), MJ (n=4), FMI (n=4) e FJ (n=4), nenhum deles foi submetido a testes funcionais ou a qualquer tratamento. Esses animais isquêmicos foram eutanasiados em uma câmara de dióxido de carbono, 24 horas após a indução da isquemia. O encéfalo de cada animal foi imediatamente removido da caixa craniana, inserido numa matriz acrílica para corte de encéfalo de rato (Insight Equipamentos Científicos LTDA®) e cortado no sentido coronal (2 mm de espessura). As fatias que continham tecido lesado (sendo a posição estereotáxica de cada fatia padronizada em todos os encéfalos) foram lavadas com PBS 10 mM e então incubadas com solução de TTC por 30 minutos a 37 ° C, protegidas da luz. Em seguida, foram lavadas 3 vezes em PBS 10mM e fixadas em paraformaldeído 4% por um período de 24 horas.

Imagens das fatias foram captadas por uma câmara digital acoplada a um microscópio estereoscópico e a um computador. A área da lesão em cada fatia foi medida a partir das imagens utilizando-se ferramentas específicas do programa IMAGEJ®. A área de lesão de cada fatia foi multiplicada pela sua espessura (2 mm), obtendo-se o volume (mm³). Para cada animal, o volume total de lesão utilizado para a quantificação foi obtido pelo somatório dos volumes das suas respectivas fatias. Para verificar possíveis diferenças no tamanho do cérebro entre os grupos, a área da fatia localizada na porção de maior espessura do cérebro (cerca de -5,88 mm a partir da bregma; (PAXINOS e WATSON, 2006)) também foi medida para cada animal.

3.8. Avaliação da Infiltração de Neutrófilos no Tecido Encefálico Pós-Isquêmico

A atividade da MPO foi medida para determinar a extensão da invasão de neutrófilos no tecido encefálico pós-isquêmico, pois esta enzima é um marcador de acumulação de neutrófilos no tecido cerebral. Assim a dosagem da MPO

correlaciona-se fortemente com a quantidade de neutrófilos recrutados na lesão durante a inflamação. 48 horas, após a indução da lesão isquêmica ratos machos jovens foram eutanasiados em uma câmara de dióxido de carbono e intracardiacamente perfundidos com 200 ml de solução salina 0,9%, com o intuito de lavar os componentes sanguíneos no interior dos vasos. Em seguida, o encéfalo foi removido do interior da caixa craniana, foi realizada a dissecação do hemisfério ipsilateral (lesado) e do hemisfério contralateral (não lesado), estas amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer - 70 °C até o ensaio da MPO.

Os hemisférios isquêmicos e não isquêmico de cada animal foram descongelados e pesados (o peso úmido foi então registrado). Os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (a razão peso/volume é de 1 g do tecido para 10 ml), e em seguida deixado em repouso durante 2 minutos a 4 °C (em banho de gelo). Este material foi submetido a centrifugação (27.000 x g, 4 °C) durante 15 minutos e o sobrenadante obtido foi utilizado para o ensaio da atividade da MPO. Em uma placa de 96 poços, 7 µl/poço do sobrenadante foi misturado com 193 µl/poço de solução cromógena (tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6) contendo 0,167 mg/ml (0,53 µmol/ml) de δ -dianisidina di-hidrocloreto (Sigma Chemical Co[®], St Louis, MO, EUA) mais peróxido de hidrogênio 30% (a uma razão de 12 µl para 60 ml)). A variação na absorvância foi medida a um comprimento de onda de 460 nm, em intervalos de 15 segundos, durante 5 minutos, a 25 ° C, utilizando-se um espectrofotômetro com capacidade cinética. A atividade da MPO foi calculada como a quantidade de MPO necessária para metabolizar 1 µmol de peróxido de hidrogênio/min a 25 ° C. Os resultados foram expressos em U/g de tecido.

3.9. Análise Estatística

Para a avaliação das diferenças na porcentagem de sobrevivência após a isquemia entre grupos, as comparações foram feitas pelo teste do chi-quadrado.

A análise estatística do teste do cilindro foi feita através do programa estatístico SAS (versão 9, SAS Systems, Inc., Cary, NC, USA). Os fatores analisados foram: idade, gênero, tratamento e tempo (DPI). Tempo foi o fator ligado. Os valores de DPI 0 foram descartados da análise. Dada à necessidade de análise

de medidas repetidas ao longo do tempo, para os quais a modelagem da estrutura de covariância é essencial (LITTELE *et al.*, 1998), foi utilizado o procedimento de modelos mistos com máxima verossimilhança restrita como o método de estimativa. Com base em critérios de informação, como descrito por Burnham e Anderson (2004) e Vieira *et al.* (2012), a estrutura de variância-covariância Toeplitz foi escolhido como a melhor. A interação significativa entre idade e gênero foi analisada pelo pós-teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. A interação significativa entre “tratamento x DPI” foi analisada por regressão, e um modelo não linear foi ajustado para cada tratamento, com base em médias estimadas para as medidas do DPI.

Para o teste de remoção do adesivo, os valores de DPI 0 foram descartados da análise. Em todos os grupos experimentais, a distribuição da variável (% de preferência contralateral) não passou no teste de normalidade (teste de normalidade omnibus D'Agostino & Pearson) (D'AGOSTINO, 1970) dentro de cada DPI. Assim, o fator "tempo (DPI)" foi descartado, e os dados a partir do DPI de cada animal foram analisados. Os fatores analisados foram: idade, gênero e tratamento. Os dados analisados de cada grupo passaram no teste de normalidade e a análise foi feita por ANOVA de três fatores. A interação significativa entre a idade e o tratamento foi analisada pelo pós-teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações.

Para a avaliação do volume de lesão isquêmica e as possíveis diferenças no tamanho do cérebro entre os grupos, a comparação entre grupos foi feita por ANOVA de dois fatores (idade x gênero).

Para a análise da atividade da MPO, foi feita a ANOVA de dois fatores com medidas repetidas (lado x tratamento; lado como o fator ligado). O desdobramento foi feito entre os tratamentos dentro do lado ipsolateral, pelo teste *t*.

Para todas as análises estatísticas, o nível de significância foi considerado o de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito da Idade e do Gênero Sobre a Taxa de Sobrevivência Após a Isquemia

Houve diferenças na taxa de sobrevivência após o procedimento de isquemia focal entre as diferentes combinações de idade e gênero (Tabela 3). Os animais morreram ao longo da primeira semana pós-isquêmica. Os MMI apresentaram menor porcentagem de sobrevivência, o que foi significativamente diferente dos MJ e FJ (Tabela 3). As FMI não apresentaram diferença significativa em relação aos animais jovens, mas uma fraca evidência de diferença foi encontrada quando comparado com o MMI (Tabela 3). Assim, no que diz respeito a taxa de mortalidade, os resultados sugerem que os MMI possam constituir o grupo mais vulnerável ao AVE, com quase metade dos animais perdidos por morte após a cirurgia. Entretanto, uma vez que a maioria das mortes ocorreu logo após a cirurgia, não podemos excluir como causa de mortes uma possível diferença entre os grupos na vulnerabilidade aos anestésicos. Por alguma razão desconhecida, o MMI pode ser o mais vulnerável.

Tabela 3 – Taxa de sobrevivência após indução da isquemia.

Grupos Experimentais	Número de animais submetidos à cirurgia para indução de isquemia*	Número de animais que morreram após a cirurgia**	Taxa de sobrevivência (%)
MJ	19	2	89,5 ^a
MMI	38	17	55,3 ^{a, b}
FJ	21	1	95,2 ^b
FMI	23	5	78,3

A taxa de sobrevivência não foi igual para todos os grupos (rejeição da hipótese nula: $p < 0,01$; $Df=3$; valor de qui-quadrado = 14,83). As comparações entre pares de grupos (por método de tabela de contingência de quatro vezes) revelou uma diferença significativa entre MJ e MMI (^a = $p < 0,01$; $Df=1$; valor de qui-quadrado = 6,67), e entre FJ e MMI e (^b = $p < 0,01$; $Df=1$; valor qui-quadrado = 10,19). A diferença entre o MMI e FMI não foi significativo ao nível de $p < 0,05$, mas estava ao nível de $p < 0,1$ ($p=0,07$; $Df=1$; qui-quadrado = 3,29), o que significa uma fraca evidência de uma diferença (Df), graus de liberdade. * Animais utilizados na análise de volume da lesão isquêmica e na análise de infiltração de neutrófilos, não foram considerados. ** Todos os animais morreram ao longo da primeira semana pós-isquêmica.

4.2. Avaliação do Efeito da Idade, do Gênero e do Tratamento com MNMOs Sobre a Recuperação das Funções Sensório-motoras após isquemia

4.2.1. Teste do Cilindro

As análises dos vídeos realizados no DPI 0, demonstraram que não ocorreu diferença significativa entre os grupos experimentais. No 2º DPI, todos os grupos apresentaram alta taxa de assimetria, demonstrando uma perda funcional, em consequência da isquemia (Figura 12). O tratamento com MNMOs promoveu recuperação significativa ao longo do tempo em todas as idades e gêneros (Figura 12). Apesar dos grupos controle apresentarem tendência de recuperação, esta foi maior nos grupos tratados. A análise estatística não mostrou interação entre “tratamento” e os fatores “idade” e “gênero”. Assim, a recuperação sensório-motora promovida pelas MNMOs não foi influenciada por esses fatores. No entanto foi encontrada interação significativa para “Tratamento x Tempo”, e para “Gênero x Idade”.

A figura 12 mostra o desempenho de recuperação dos grupos tratados com células (MMI-MNMOs, FMI-MNMOs, MJ-MNMOs, FJ-MNMOs) e controles (MMI-controle, FMI- controle, MJ- controle, FJ- controle) antes da isquemia e ao longo dos DPI segundo o teste do cilindro. A "Taxa de assimetria" avalia a preferência dos animais no uso das patas durante a exploração vertical no cilindro.

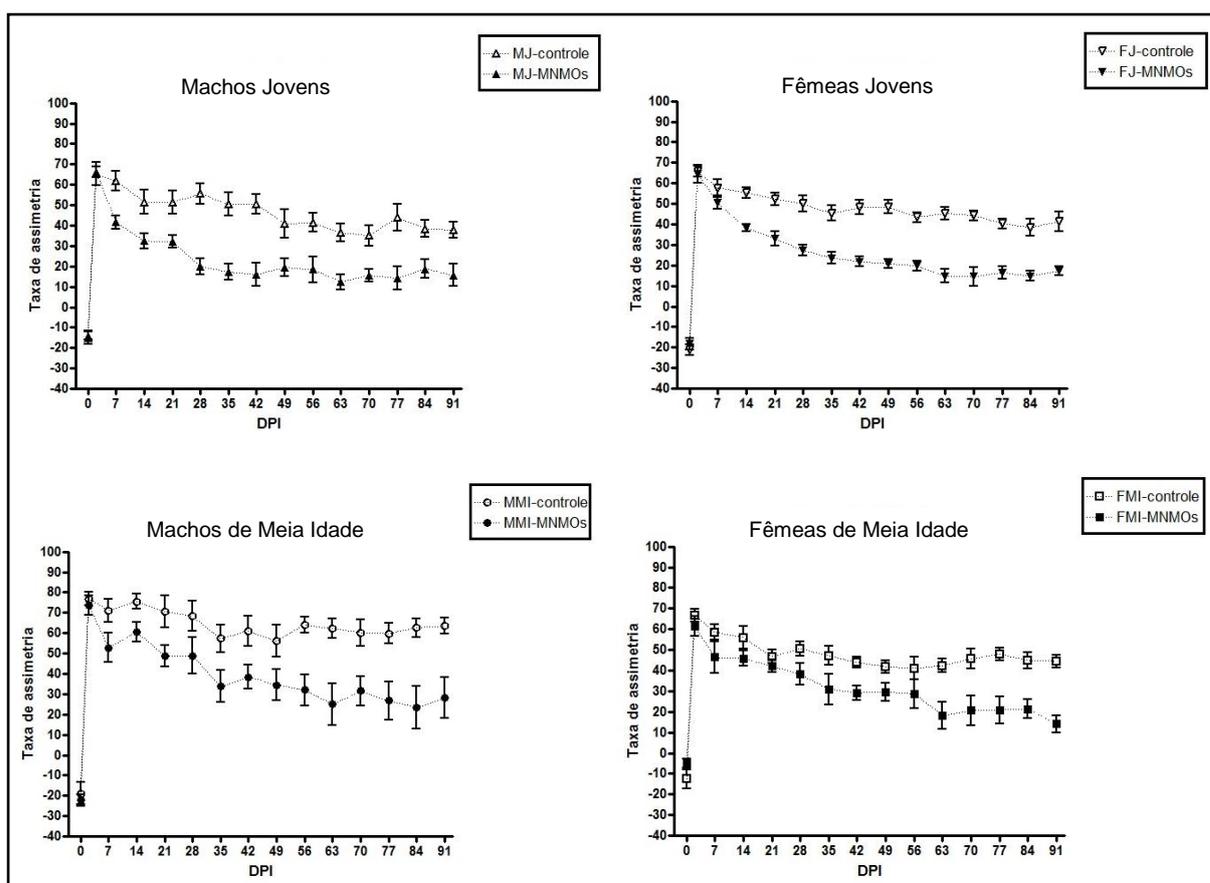


Figura 12 - Representação gráfica e comparativa entre animais tratados e controle no efeito da terapia com Células Mononucleares da Medula Óssea (MNMOs), após a indução de isquemia cerebral focal, através do teste do cilindro. Os gráficos mostram o acompanhamento do desempenho dos grupos experimentais antes da isquemia (DPI 0) e ao longo dos Dias Pós-isquemia (DPI). Uma maior assimetria foi sempre observada no DPI 2. Em todas as combinações de idade e gênero, o tratamento com MNMOs promoveu recuperação significativa. Machos Jovens Tratados (MJ-MNMOs), n=9; Machos Jovens Controle (MJ-controle), n=8; Fêmeas Jovens Tratadas (FJ-MNMOs), n=10; Fêmeas Jovens Controle (FJ-MNMOs), n=10; Machos de Meia Idade Tratados (MMI-MNMOs), n=11; Machos de Meia Idade Controle (MMI-controle), n=10; Fêmeas de Meia Idade Tratadas (FMI-MNMOs), n=9; Fêmeas de Meia Idade Controle (FMI-controle), n=9; As barras representam o erro padrão da média.

Foi encontrada uma interação significativa entre a idade e o gênero, mostrando que o desempenho geral sensório-motor foi influenciado por idade e gênero, independentemente do tratamento (Figura 13). Assim, dentre os machos, os animais de meia idade apresentaram déficit maior do que os animais jovens e dentre os animais de meia-idade, os machos apresentaram déficit maior do que as fêmeas. Portanto, o grupo MMI teve pior desempenho em relação aos outros grupos (Figura 13).

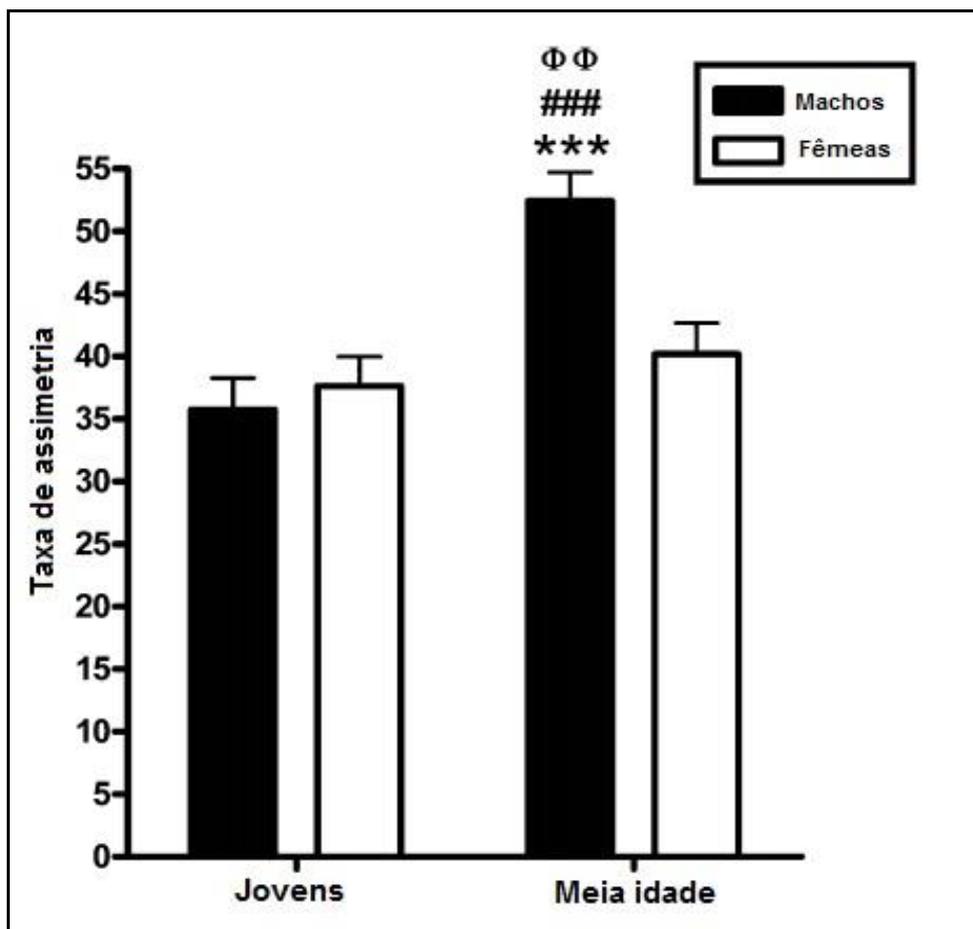


Figura 13 – Representação gráfica da interação significativa entre idade e gênero ($F=8,53$, $p<0,01$) no teste do cilindro. Somente o grupo dos machos de meia idade apresentou desempenho significativamente pior do que os outros (comparação com machos jovens: *** = $p<0,001$; comparação com fêmeas jovens: ### = $p<0,001$; comparação com fêmeas de meia idade: $\Phi\Phi$ = $p<0,01$; Teste de Tukey-Kramer). As barras representam médias estimadas com erro padrão da média.

Observou-se também uma interação significativa entre tratamento e tempo (DPI). Assim, houve uma recuperação significativa promovida pela MNMOs, mas o efeito de cada tratamento foi tempo-dependente, tal como descrito pelos modelos melhores ajustados (Figura 14).

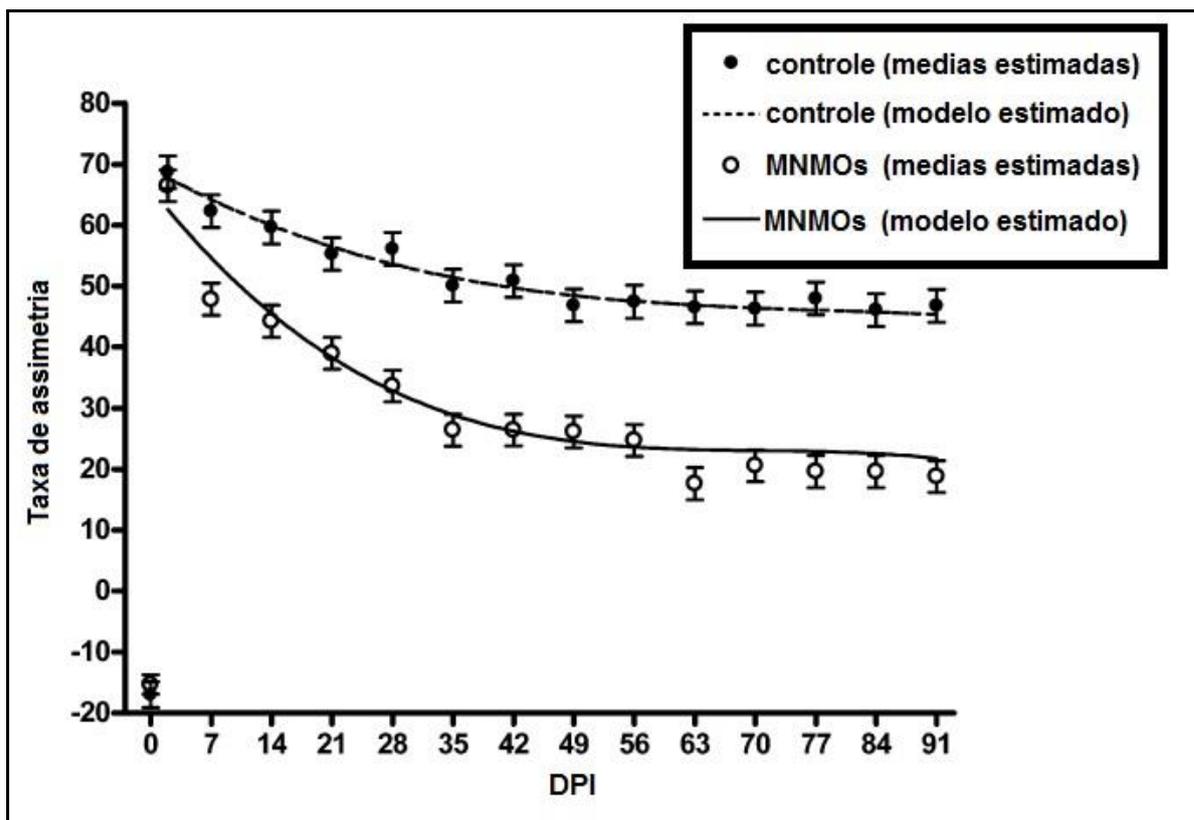


Figura 14 – Representação gráfica da interação entre o tratamento e tempo ($F=3,6$, $p<0,001$) no teste do cilindro. Os modelos estimados, ajustados por análise de regressão, foram: Controle, $y = 69,3132 - 0,7934x + 0,009463x^2 - 0,000004x^3$; MNMOs, $y = 66,0800 - 1,8034x + 0,02538x^2 - 0,00012x^3$. Células Mononucleares da Medula Óssea (MNMOs); DPI= Dias Pós-Isquemia; Círculos (preto e branco) representam medias estimadas com erro padrão da média.

4.2.2. Teste de Remoção do Adesivo

No teste de remoção do adesivo, na avaliação DPI 0, é possível visualizar que os grupos apresentaram uma alta porcentagem de preferência no uso da pata contralateral. No 2º DPI, ambos os grupos removeram primeiramente o adesivo da pata ipsilateral, o que resultou em 0% de remoção em primeiro lugar no lado contralateral, sugerindo uma perda tátil em consequência da isquemia. Os resultados encontrados mostraram que o tratamento com MNMOs promoveu uma recuperação significativa em todas as idades e gêneros (Figura 15 e 16). A análise estatística não mostrou nenhum efeito do gênero no tratamento. No entanto, houve um efeito de tratamento na idade, uma vez que, uma interação significativa foi encontrada entre esses fatores.

A figura 15 mostra o desempenho de recuperação dos grupos tratados (MMI-MNMOs, FMI-MNMOs, MJ-MNMOs, FJ-MNMOs) e controle (MMI-controle, FMI-controle, MJ-controle, FJ-controle) antes da isquemia e ao longo das semanas pós-isquemia segundo o teste de remoção do adesivo. A "preferência contralateral" avalia a preferência para remoção do adesivo da pata afetada.

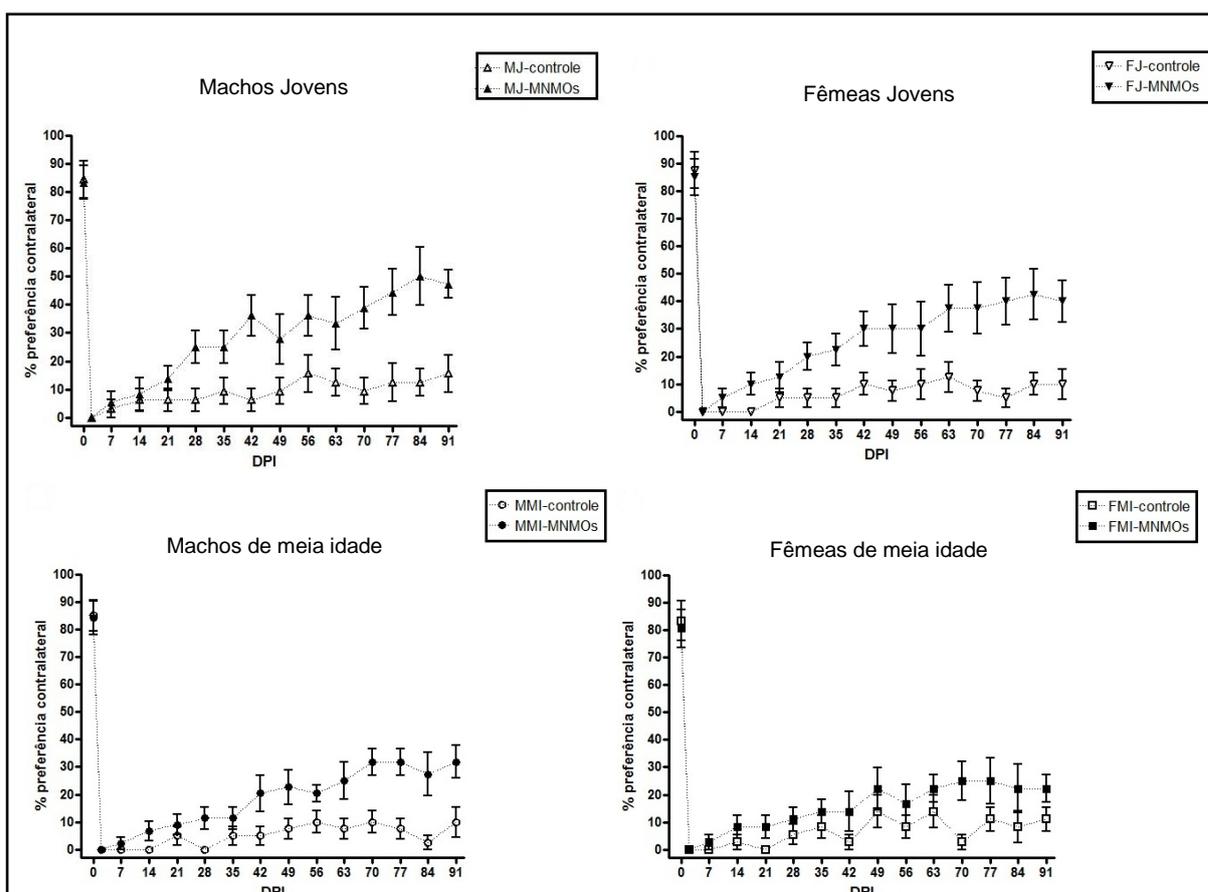


Figura 15 – Representação gráfica e comparativa entre animais tratados e controles no efeito da terapia com Células Mononucleares da Medula Óssea (MNMOs), após a indução de isquemia cerebral focal, através do teste de remoção do adesivo. Gráficos ilustrando o acompanhamento do desempenho dos grupos experimentais antes da isquemia (DPI 0) e ao longo dos Dias Pós-isquemia (DPI). O nível mais baixo de preferência contralateral sempre foi visto em DPI 2. Em todos os grupos, o tratamento com MNMOs promoveu recuperação significativa. Machos Jovens Tratados (MJ-MNMOs), n=9; Machos Jovens Controle (MJ-controle), n=8; Fêmeas Jovens Tratadas (FJ-MNMOs), n=10; Fêmeas Jovens Controle (FJ-MNMOs), n=10; Machos de Meia Idade Tratados (MMI-MNMOs), n=11; Machos de Meia Idade Controle (MMI-controle), n=10; Fêmeas de Meia Idade Tratadas (FMI-MNMOs), n=9; Fêmeas de Meia Idade Controle (FMI-controle), n=9; DPI= Dias Pós-Isquemia; As barras representam o erro padrão da média.

É possível observar que em todos os grupos de animais discriminados nas figuras 15 e 16 houve recuperação significativa dos déficits dos animais tratados em

relação aos animais controle. No entanto, os animais jovens tratados se recuperaram mais que os animais de meia idade tratados (Figura 17). Este fato já não se repete quando consideramos apenas os animais dos grupos controle, uma vez que os resultados dos animais controle mostraram que, ao contrário dos animais tratados com MNMOs, todos os grupos apresentaram baixa preferência pelo uso da pata contralateral, não importando o gênero e a idade dos animais. Assim não houve diferença significativa entre os grupos controles dos animais jovens e de meia idade (Figura 17).

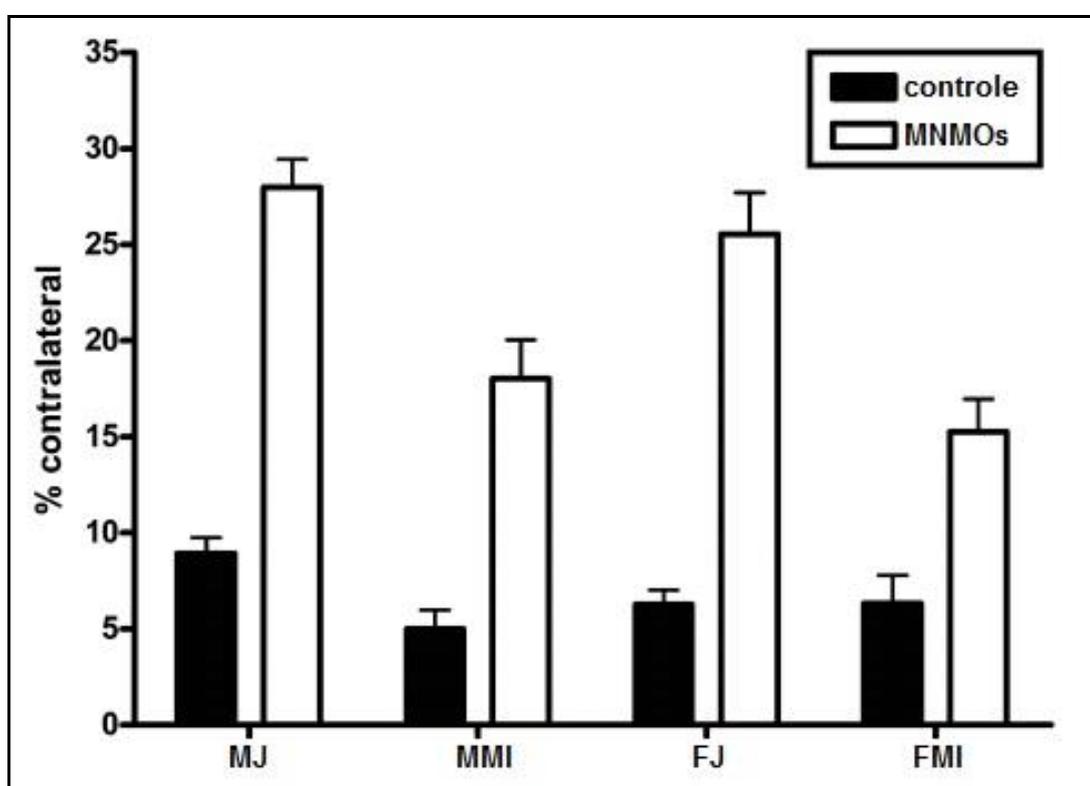


Figura 16 – Representação gráfica dos dados reunidos de cada grupo experimental (descartando os valores do Dia Pré-Isquemia (DPI 0)) no teste de remoção do adesivo. O fator "tempo (DPI 0)" foi descartado para a análise estatística. Células Mononucleares da Medula Óssea (MNMOs); Machos Jovens (MJ); Machos de Meia Idade (MMI); Fêmeas Jovens (FJ); Fêmeas de Meia Idade (FMI); As barras representam médias estimadas com erro padrão da média.

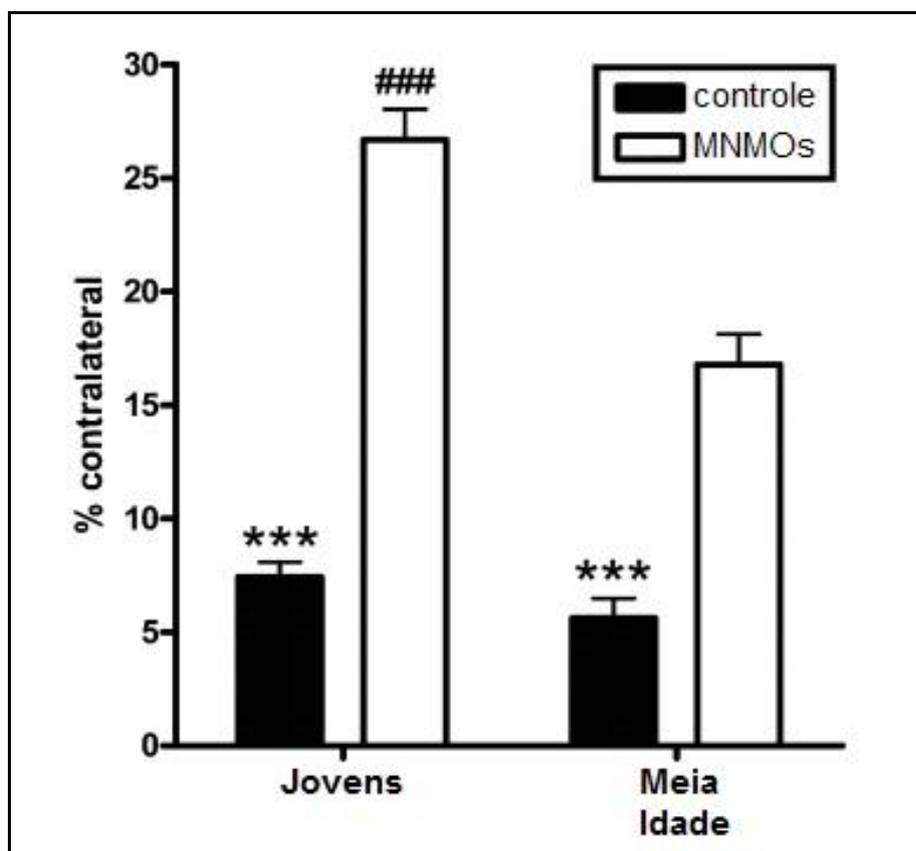


Figura 17 – Representação gráfica da interação significativa entre idade e tratamento ($F= 13,71$, $p < 0,001$) no teste de remoção do adesivo. As Células Mononucleares da Medula Óssea (MNMOs) promoveram recuperação significativa em ambos os animais jovens e de meia idade, mas a recuperação nos animais jovens tratados com MNMOs foi maior do que nos animais de meia idade tratados com as MNMOs (comparação entre os tratamentos dentro da idade: *** = $p < 0,001$; comparação com animais de meia idade tratados com MNMOs: ### = $p < 0,001$. Tukey-Kramer). As barras representam médias estimadas com erro padrão da média.

4.3. Avaliação do Volume da Lesão Isquêmica

Como descrito anteriormente, a indução da isquemia cortical por termocoagulação produziu uma lesão focal afetando os vasos sanguíneos submeningeanos, incluindo as seis camadas corticais e poupando a substância branca (SZELE *et al.*, 1995; SAMPAIO *et al.*, 2013) (Figura 18). Cortes coronais demonstraram que em todos os animais houve morte celular na lesão isquêmica cortical focal, a qual é caracterizada por ausência de marcação pelo TTC e consequentemente a região tecidual apresentou-se branca (Figura 18C).

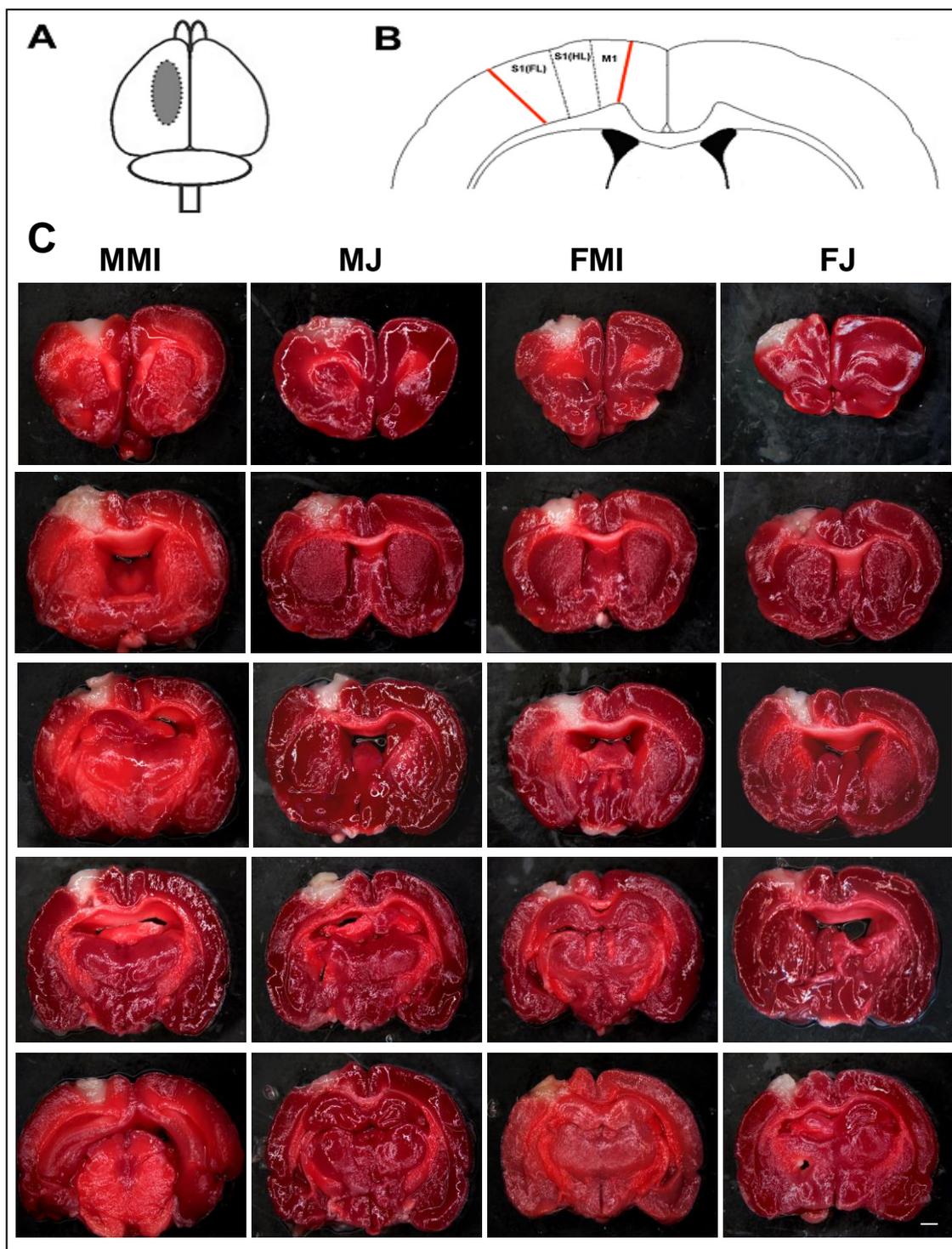


Figura 18 – Volume da lesão isquêmica. (A) Ilustração esquemática da visão dorsal do cérebro de rato, mostrando a localização aproximada e extensão da lesão isquêmica no córtex cerebral (em cinza). (B) Ilustração esquemática da visão frontal de uma secção coronal do cérebro de rato, mostrando a extensão mediolateral aproximada da lesão isquêmica (as linhas vermelhas delimitam as bordas medial e lateral da lesão, poupando a substância branca localizada abaixo). As partes afetadas após a lesão: S1(FL) (representação dos membros anteriores do córtex somatossensorial primário), o S1 (HL) (representação dos membros posteriores do córtex somatossensorial primário), e parte da M1 (córtex motor primário). (C) Imagens das sequências de cortes coronais rostro-caudal dos encéfalos de animais representativos de cada grupo experimental coradas pela reação com cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC). Para cada animal, a porção mais rostral da lesão isquêmica foi colocada no topo, e a porção mais caudal, na parte inferior. Machos de Meia Idade (MMI); Machos Jovens (MJ); Fêmeas de Meia Idade (FMI); Fêmeas Jovens (FJ); Barra de escala = 2 mm.

A quantificação do volume da lesão revelou efeito significativo da idade, com maiores volumes de lesão nos animais de meia idade (Figura 19). O tamanho da abertura feita no crânio foi padronizado. Assim, a área da superfície cortical submetida à termocoagulação foi a mesma para todos os animais. A ocorrência de uma potencial diminuição idade-dependente do tamanho do cérebro (por exemplo, por neurodegeneração) poderia ser um viés no efeito observado de idade. No entanto, essa possibilidade foi descartada uma vez que a estimativa da espessura do cérebro não mostrou nenhuma diferença entre os grupos (Figura 19).

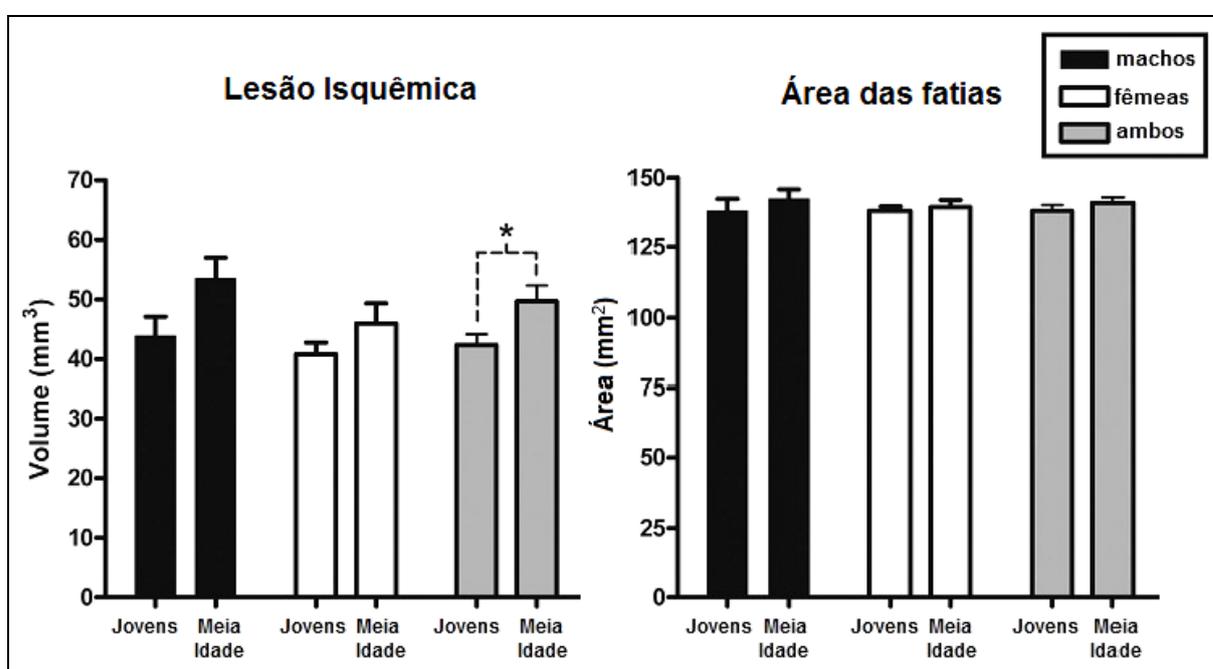


Figura 19 – Representação gráfica do efeito da idade na extensão da lesão isquêmica. Gráfico esquerdo: A quantificação do volume da lesão feita a partir de fatias de cérebro coradas com cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC) dos animais dos quatro grupos experimentais. A análise estatística por ANOVA de dois fatores não revelou qualquer interação ($F=0,5$, $p=0,49$) e nenhum efeito de gênero ($F=2,97$, $p=0,11$), mas efeito significativo da idade ($F=5,77$, $*=p<0,05$). Gráfico direito: Quantificação das áreas das fatias de cérebro localizado na porção de maior espessura não revelaram qualquer interação ($F=0,22$, $p=0,64$), nem um efeito de idade ($F=0,84$, $p=0,38$) ou de gênero ($F=0,22$, $p=0,65$), sugerindo que não houve diferença no tamanho do cérebro entre os grupos ($n=4$ para cada grupo). Em ambos os gráficos: as barras representam médias estimadas com erro padrão da média; Ambos: dados agrupados de machos e fêmeas para ilustração.

4.4. Avaliação da Infiltração de Neutrófilos no Tecido Encefálico Pós-Isquêmico

Estudos tem demonstrado que a atividade elevada da MPO após a isquemia é derivada da infiltração de neutrófilos para o cérebro isquêmico. Assim a atividade desta enzima é um excelente marcador para a avaliação desses neutrófilos infiltrados no tecido lesionado (MATSUO *et al.*, 1994; EASTON, 2013).

A figura 20B mostra os gráficos da atividade da MPO no lado ipsilateral e contralateral a isquemia, medida através de um espectrofotômetro com capacidade cinética, em intervalos de 15 s, durante 5 minutos. O lado ipsilateral dos animais controles apresentou uma elevada atividade da MPO, demonstrando que devido à inflamação pós-isquêmica, houve uma elevada infiltração dos neutrófilos no parênquima lesionado (Figura 20). Essa elevada atividade não foi observada no lado ipsilateral dos animais tratados com MNMOs, demonstrando deste modo que o tratamento com as MNMOs reduziu a infiltração de neutrófilos (Figura 20). Já no lado contralateral, tanto dos animais tratados com MNMOs, quanto nos animais controle, praticamente não houve atividade da MPO, ratificando que esta enzima é um marcador da infiltração de neutrófilos e está diretamente relacionada à presença desses no tecido (Figura 20).

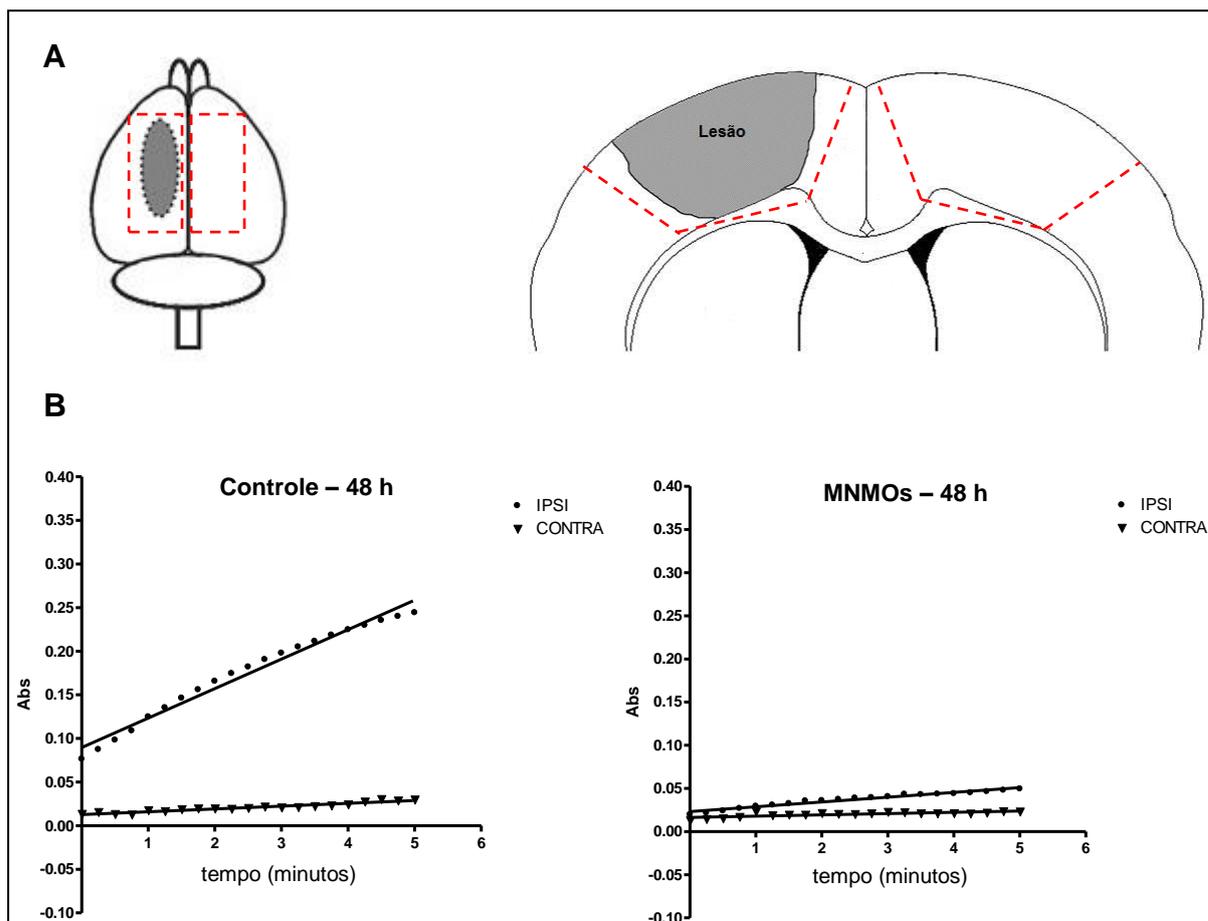


Figura 20 – Representação gráfica da quantificação da infiltração de neutrófilos no tecido encefálico pós-isquêmico, 48 horas após a isquemia. (A) Ilustrações esquemáticas mostrando as regiões dissecadas para o experimento da atividade da mieloperoxidase. As regiões em cinza representam a lesão isquêmica. As linhas pontilhadas vermelhas representam as regiões corticais que foram dissecadas para o experimento da atividade da mieloperoxidase. A região localizada ao lado da lesão constituiu o lado ipsilateral, enquanto a região localizada no outro hemisfério constituiu o lado contralateral. O esquema da esquerda representa a visão dorsal do cérebro de rato, mostrando a localização aproximada e extensão da lesão isquêmica no córtex cerebral. O esquema da direita representa a visão frontal de uma secção coronal do cérebro de rato, mostrando a extensão mediolateral aproximada da lesão isquêmica. **(B)** Gráficos representativos do nível de atividade da mieloperoxidase nos tecidos isquêmico (ipsilateral) e não isquêmico (contralateral), de um animal controle (esquerda) e de um animal tratado com Células Mononucleares de Medula Óssea (MNMOs) (direita), 48 horas após a indução de isquemia. A regressão linear foi significativa apenas no lado ipsilateral (ipsi), e praticamente não houve atividade no lado contralateral (contra). Abs= Absorvância.

Através da quantificação da atividade da MPO no tecido cerebral pós-isquêmico foi possível observar que o tratamento com MNMOs reduziu a infiltração de neutrófilos no parênquima cerebral após a isquemia. Uma vez que os animais tratados com estas células apresentaram menor atividade desta enzima no lado ipsilateral, em comparação com os animais controles (Figura 21).

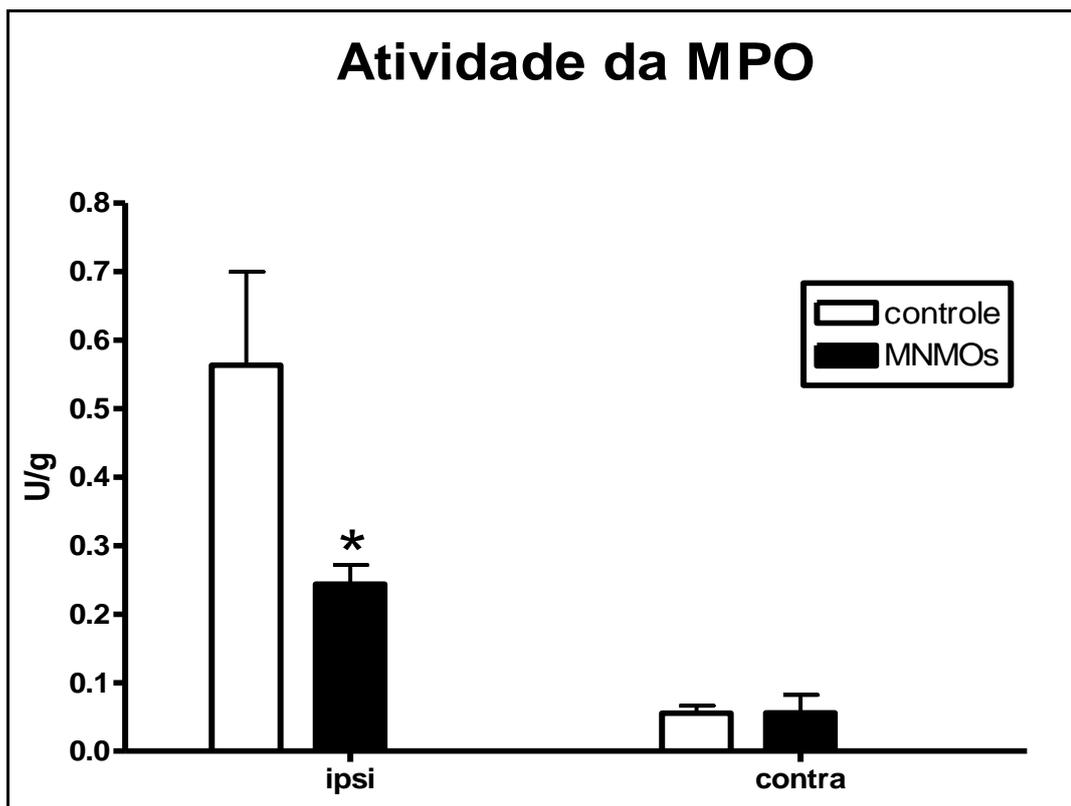


Figura 21 – Representação gráfica da atividade da Mieloperoxidase (MPO) no tempo de sobrevivência de 48 horas após a isquemia. O tratamento com Células Mononucleares de Medula Óssea (MNMOs) reduziu a atividade específica da MPO, sugerindo redução da presença de neutrófilos no lado ipsilateral (lado isquêmico) do encéfalo em relação ao grupo controle (* = $p < 0,001$). Controle: $n=9$; MNMOs: $n=10$; Ipsi (lado ipsilateral); contra (lado contralateral a lesão isquêmica); As barras representam médias estimadas com erro padrão da média.

5. DISCUSSÃO

5.1. Influência de Idade e Gênero nos Danos Causados pela Isquemia/AVE

O AVE ocorre principalmente em pessoas com idade mais avançada e afeta ambos os gêneros. No entanto, na literatura a maioria dos estudos experimentais dessa doença foram realizados em animais jovens (DIRNAGL *et al.*, 1999; WAGNER *et al.*, 2012; BUGA *et al.*, 2013). Outra característica comum na maioria dos estudos em modelo de isquemia cerebral é a utilização quase exclusiva de animais machos (CURRY, 2001), sendo que existem diferenças na incidência, recorrência, resultados funcionais, fisiopatologia e nas taxas de mortalidade entre os gêneros (MURPHY *et al.*, 2004). Desta forma, as diretrizes recentemente estabelecidas sobre como melhorar a validade preditiva de modelos animais de AVE têm enfatizado que a introdução de animais mais velhos e fêmeas em estudos pré-clínicos do AVE é fundamental para produzir resultados com maior relevância clínica (SHEN *et al.*, 2007; BUGA *et al.*, 2013). Vários estudos descreveram o efeito do envelhecimento e do gênero na expressão gênica, perda funcional, na recuperação, nas alterações anatômicas e fisiológicas após a indução de isquemia no cérebro (ALKAYED *et al.*, 2000; BENICE *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2010; GOKCAY *et al.*, 2011; MANWANI *et al.*, 2011; BUGA *et al.*, 2013). No entanto, surpreendentemente, poucos estudos avaliaram a eficácia das células derivadas de medula óssea em promover a recuperação de animais mais velhos após isquemia cerebral (SHEN *et al.*, 2007; BRENNEMAN *et al.*, 2010; TAGUCHI *et al.*, 2011; WAGNER *et al.*, 2012). Além disso, até o momento não foram encontrados estudos na literatura que avaliassem a influência do gênero sobre a eficácia do tratamento com MNMOs em modelo animal de AVE. Desta forma, este estudo foi o primeiro que avaliou diretamente o impacto de idade e gênero, descrevendo as interações e principais efeitos na recuperação sensório-motora promovida pelas MNMOs.

Uma exata correspondência entre as idades de ratos e humanos é muito difícil. Na verdade, uma perfeita correspondência pode não ser possível, tendo em conta as várias diferenças nos padrões de desenvolvimento, maturação e envelhecimento entre estas duas espécies (QUINN, 2005). O tempo médio de vida de ratos criados no biotério é de aproximadamente três anos, e por isso, os animais

com 12-17 meses de idade utilizados no presente estudo foram considerados como animais de meia idade, bem como na maior parte dos relatos na literatura. Assim, a inclusão de animais até mais velhos em pesquisas futuras deve ser feita para melhorar a extrapolação dos resultados para as pessoas idosas. Outro ponto importante é a senescência reprodutiva (menopausa) nas fêmeas, uma vez que, estudos tem sugerido que os hormônios sexuais femininos são neuroprotetores (ALKAYED *et al.*, 2000; GOKCAY *et al.*, 2011). As ratas geralmente entram na menopausa entre 10 e 12 meses de idade (LU *et al.*, 1994). Portanto, as FMI utilizadas no neste estudo, provavelmente, já são senescentes reprodutivamente (pós-menopausa) e, portanto, não têm o efeito neuroprotetor desses hormônios femininos (ALKAYED *et al.*, 2000).

Os resultados do presente estudo demonstraram que os animais de meia-idade apresentaram taxas de sobrevivência menores do que os animais jovens. Os MMI apresentaram menor taxa de sobrevivência, o que foi significativamente diferente dos MJ e FJ. Já as FMI não apresentaram diferença significativa em relação aos animais jovens, mas uma fraca evidência de diferença foi encontrada quando comparado com o MMI. Esses resultados coincidem com os encontrados em humanos, uma vez que, a mortalidade após o AVE apresenta uma mudança idade-dependente (GOKCAY *et al.*, 2011). Homens e mulheres jovens apresentam baixas taxas de incidência e mortalidade do AVE, com o envelhecimento ocorre um aumento na taxa de incidência e uma diminuição na taxa de sobrevivência em ambos os gêneros (ALKAYED *et al.*, 1998; GOKCAY *et al.*, 2011; BUGA *et al.*, 2013). Após a menopausa estudos tem demonstrado aumento na incidência e na taxa de mortalidade de mulheres com AVE, sugerindo que os hormônios sexuais desempenhem uma proteção contra a lesão isquêmica (ALKAYED *et al.*, 2000; GOKCAY *et al.*, 2011). No entanto, mulheres de 45 a 74 anos têm um risco menor de mortalidade por doenças cerebrovasculares em comparação com os homens, ao passo que tal vantagem de sobrevivência não é observada para as mulheres de 75 a 80 anos (REEVES *et al.*, 2008). Assim, as taxas de mortalidade em mulheres mais velhas podem até superar as taxas observadas em homens de mesma faixa etária (AYALA *et al.*, 2002). Essa mudança na mortalidade em mulheres ocorre aproximadamente entre os 65 a 75 anos de idade, sugerindo que as mulheres continuam a ter mecanismos de proteção aproximadamente 20 anos após a

menopausa. Assim, tem sido sugerido que esta proteção é mediada pela presença contínua de baixos níveis de estrogênio até certa idade após a menopausa (NORDELL *et al.*, 2003; SUNDAY *et al.*, 2007; GOKCAY *et al.*, 2011). No entanto, a ação neuroprotetora promovida pelo estrogênio ainda está em discussão (MAKI, 2013; SCHREIHOFER e MA, 2013).

Poucos estudos avaliaram a eficácia da recuperação promovida pelas células derivadas de medula óssea após isquemia cerebral em animais mais velhos. O tratamento de ratas isquêmicas de meia idade com células estromais de medula óssea de doadores ratos machos jovens resultou na recuperação funcional, mas nenhum animal jovem isquêmico foi utilizado para a comparação estatística (SHEN *et al.*, 2007). Em relação as MNMOs, o tratamento com MNMOs autólogas promoveu recuperação sensório-motora em ratos machos machos jovens e de meia-idade (BRENNEMAN *et al.*, 2010). Além disso, o transplante de medula óssea de ratos machos jovens espontaneamente hipertensos propensos ao AVE para ratas de meia-idade espontaneamente hipertensas propensas ao AVE, por injeção intravenosa e intra-óssea, promoveu recuperação após a indução de isquemia cerebral no trigésimo dia pós-transplante (TAGUCHI *et al.*, 2011). Um resultado negativo sobre a eficácia das MNMOs em ratos machos idosos espontaneamente hipertensos foi descrito, uma vez que não foi encontrada recuperação, após estes terem sido tratados com MNMOs de doadores humanos jovens ou idosos saudáveis (WAGNER *et al.*, 2012). No entanto, como os próprios autores argumentaram, este efeito negativo foi provavelmente devido à falta do uso de um tratamento imunossupressor, permitindo a rejeição do xenotransplante.

No presente estudo, a avaliação da recuperação funcional, utilizando testes comportamentais (teste do cilindro e teste de remoção do adesivo), demonstrou que o tratamento com MNMOs resultou na recuperação sensório-motora dos ratos jovens e de meia idade de ambos os gêneros. Na literatura também são encontrados outros trabalhos que utilizaram esses testes para avaliar a recuperação sensório-motora (GIRALDI-GUIMARÃES *et al.*, 2009; DE VASCONCELOS DOS SANTOS *et al.*, 2010; SAMPAIO *et al.*, 2013). Porém estes trabalhos utilizaram somente ratos machos jovens.

Os resultados do teste do cilindro, mostraram que no 2º DPI, todos os grupos apresentaram alta taxa de assimetria, sugerindo uma perda funcional da pata

dianteira contralateral a lesão em consequência da isquemia, assim como demonstrado em outros estudos (ADKINS *et al.*, 2004; GIRALDI-GUIMARÃES *et al.*, 2009; BRENNEMAN *et al.*, 2010; DE VASCONCELOS DOS SANTOS *et al.*, 2010; SAMPAIO *et al.*, 2013). A análise estatística revelou efeito significativo do tratamento com MNMOs ao longo do tempo em todas as idades e gêneros, demonstrando assim que o tratamento promoveu recuperação nos animais jovens e de meia-idade em relação aos animais controles. Este resultado está de acordo com as descrições anteriores de indução de recuperação sensório-motora pelas MNMOs em modelos animais de AVE isquêmico em animais machos (GIRALDI-GUIMARÃES *et al.*, 2009; BRENNEMAN *et al.*, 2010; DE VASCONCELOS DOS SANTOS *et al.*, 2010; SAMPAIO *et al.*, 2013). Assim como no presente trabalho, nos estudos feitos por Giraldi-Guimarães *et al.*, (2009), De Vasconcelos dos Santos *et al.* (2010) e Sampaio *et al.* (2013) foi utilizado o modelo de indução de isquemia através da termocoagulação, no entanto, estes autores utilizaram apenas animais machos jovens. Já no estudo feito por Brenneman *et al.*, (2010) foi utilizado um modelo de OACM em ratos machos jovens e de meia idade. Não foi encontrado nenhum estudo que avaliasse a recuperação sensório-motora induzida pelas MNMOs no teste do cilindro em fêmeas. Desta forma, a discussão desses dados fica um pouco limitada, visto que tais estudos apresentam diferenças no modelo de isquemia cerebral, na idade e gênero dos animais. Neste teste, nossos resultados demonstraram uma interação significativa entre a idade e o gênero, mostrando que o desempenho geral sensório-motor foi influenciado pela idade e gênero, independentemente do tratamento, uma vez que, dentre os machos, os animais de meia idade apresentaram déficit maior que os animais jovens e dentre os animais de meia-idade, os machos apresentaram déficit maior que as fêmeas. Portanto, o grupo MMI teve pior desempenho em relação aos outros grupos. Estes resultados confirmam as informações presentes em outros estudos, que relatam sequelas muito mais graves em idosos do que em indivíduos jovens acometidos pelo AVE (ROTHWELL *et al.*, 2004; DINAPOLI *et al.*, 2008; WANG-FISCHER, 2008; POPA-WAGNER *et al.*, 2011; TITOVA *et al.*, 2011). Ratos idosos também apresentam um aumento da resposta neuroinflamatória, que resulta em consequências como neuropatologia aprimorada com decréscimos no acompanhamento da função e em atrasos na recuperação (DILGER e JOHNSON, 2008). Em relação ao efeito do gênero para os animais de

meia idade, nossos resultados corroboram com a hipótese apresentada em outros estudos, onde tem sido sugerido que as mulheres continuam a ter mecanismos de proteção por um período de tempo após a menopausa (NORDELL *et al.*, 2003; SUNDAY *et al.*, 2007; GOKCAY *et al.*, 2011). Entretanto, nossos resultados divergem dos estudos de Simpkins *et al.*, (1997) e Wang *et al.*, (1999), nos quais é relatado que os danos neuronais não são diferentes entre os machos e as fêmeas após ovariectomia ou após a fêmea entrar em senescência reprodutiva.

Os resultados do teste de remoção do adesivo mostraram que no 2º DPI, todos os grupos reduziram significativamente a remoção do adesivo da pata contralateral, sugerindo uma perda sensório-motora em consequência da isquemia, assim como demonstrado em outros estudos (ADKINS *et al.*, 2004; GIRALDI-GUIMARÃES *et al.*, 2009; BRENNEMAN *et al.*, 2010; DE VASCONCELOS DOS SANTOS *et al.*, 2010; SAMPAIO *et al.*, 2013). Nossos resultados mostraram que o tratamento com MNMOs promoveu uma recuperação significativa em relação aos grupos dos animais controle. A análise estatística não mostrou nenhum efeito do gênero no tratamento. No entanto, houve um efeito de tratamento na idade, uma vez que, os animais jovens tratados se recuperaram mais que os animais de meia idade tratados, apesar de os animais de meia idade tratados, também de ambos os gêneros, apresentarem melhoras em sua função sensório-motora. Este fato já não se repete quando consideramos apenas os animais dos grupos controle, pois, esses grupos apresentaram baixa preferência pelo uso da pata contralateral, não importando o gênero e a idade dos animais. Esses resultados corroboram com os descritos, por Shen *et al.* (2007) e Sampaio *et al.* (2013). Shen *et al.* (2007) utilizaram o modelo de OACM em fêmeas de meia idade, tratadas com células estromais de medula óssea de ratos machos jovens doadores. Já Sampaio *et al.* (2013) utilizaram o modelo de isquemia cerebral por termocoagulação em animais machos jovens, tratados com MNMOs.

Para a avaliação do volume da lesão isquêmica foi utilizado a reação histoquímica com o TTC, 24 horas após a indução da isquemia por termocoagulação. Esta mostrou que a lesão acometeu as seis camadas do córtex cerebral, localizadas imediatamente abaixo dos vasos coagulados, sem acometimento da substância branca e do corpo caloso. Este padrão de lesão está de acordo com as observações encontradas em outros estudos (SZELE *et al.*, 1995; GIRALDI-GUIMARÃES *et al.*,

2009; DE VASCONCELOS DOS SANTOS *et al.*, 2010; SAMPAIO *et al.*, 2013). A quantificação do volume da lesão no nosso estudo revelou efeito significativo da idade, com maiores volumes de lesão nos animais de meia idade em relação aos animais jovens, assim como descrito em outros trabalhos (DINAPOLI *et al.*, 2010; TAGUCHI *et al.*, 2011). O cérebro envelhecido de humanos e de animais fica mais vulnerável a neurodegeneração aguda do que o cérebro de adultos jovens (BADAN *et al.*, 2003; YAGER *et al.*, 2006; ONYSZCHUK *et al.*, 2008; TOKUTOMI *et al.*, 2008; POPA-WAGNER *et al.*, 2011). Além disso, ratos idosos mostram um desenvolvimento acelerado do infarto na primeira semana pós-AVE experimental em comparação com ratos jovens (POPA-WAGNER *et al.*, 2007a; POPA-WAGNER *et al.*, 2007b). Essas diferenças podem ser explicadas devido a uma série de fatores, como o aumento da resposta neuroinflamatória (DILGER e JOHNSON, 2008), morte neuronal precoce, aumento da necrose, apoptose, danos a BHE e aumento da ativação microglial observados em animais mais velhos (DINAPOLI *et al.*, 2008; ONYSZCHUK *et al.*, 2008; POPA-WAGNER *et al.*, 2011). Badan *et al.* (2003) demonstraram a diferença de idade no desenvolvimento do infarto após a indução de um rápido episódio de isquemia cerebral, ocasionado uma degeneração neuronal moderada em ratos jovens e um elevado grau de degeneração nos ratos idosos, três dias após a isquemia.

Alguns estudos demonstram que os hormônios esteroides parecem proporcionar certo grau de proteção contra os danos e ocorrência do AVE em fêmeas jovens, deste modo elas apresentam volume de lesão reduzido em comparação com os dos machos de mesma faixa etária (SALÃO *et al.*, 1991; SIMPKINS *et al.*, 1997; ALKAYED *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 1999; GIBSON *et al.*, 2006; GOKCAY *et al.*, 2011). Tem sido demonstrado também que o efeito do gênero no tamanho do volume da lesão desaparece após as ratas entrarem na menopausa ou após ovariectomia (ALKAYED *et al.*, 1998; ALKAYED *et al.*, 2000; GOKCAY *et al.*, 2011). Desta forma, a dimensão do infarto aumenta com a idade em ratas fêmeas, podendo chegar a apresentar volume do infarto maior que nos machos idosos (ALKAYED *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2009; GOKCAY *et al.*, 2011). Esses resultados divergem do nosso estudo, uma vez que, não houve diferença significativa no volume de lesão entre esses dois gêneros.

Os resultados deste estudo corroboram que o envelhecimento tem um efeito prejudicial na isquemia cerebral, uma vez que, os animais de meia-idade apresentaram pior desempenho funcional e maiores volumes de lesão e mortalidade. No entanto, não impediu a promoção significativa da recuperação pelas MNMOs, sugerindo que o tratamento com MNMOs autólogas no AVE deve ser eficaz para indivíduos mais velhos. Ressalta-se também a falta de um efeito significativo de gênero, na taxa de sobrevivência, no volume da lesão isquêmica e na recuperação sensório-motora promovida pelas MNMOs. Com exceção do efeito do gênero visto na interação com a idade no teste do cilindro, onde MMI apresentaram pior desempenho. Sugerindo desta forma, que pelo menos na função sensório-motora, a perda da produção dos hormônios femininos pela menopausa nas FMI não deve afetar a recuperação promovida pelas MNMO após a isquemia. Assim, o tratamento com MNMOs autólogas no AVE pode ser igualmente benéfico para homens e mulheres de qualquer idade.

Desta forma, este estudo ratifica a importância de analisar se um determinado tratamento é eficaz em diferentes gêneros e idades, visto que foi mostrado que houve algumas diferenças na recuperação dos animais de acordo com esses parâmetros, com isso demonstrando a relevância de usar animais mais velhos e fêmeas para estudar as condições de recuperação do AVE.

5.2. Infiltração de Neutrófilos no Tecido Encefálico Pós-isquêmico

Os efeitos benéficos da administração de MNMOs já foram descritos em diversos estudos em modelos animais de AVE isquêmico (MENDEZ-OTERO *et al.*, 2007; MEZEY, 2007). Além disso, vários ensaios clínicos estão em andamento (SAVITZ *et al.*, 2011; BANERJEE *et al.*, 2012; ROSADO-DE-CASTRO *et al.*, 2013). No entanto, os mecanismos responsáveis por tais efeitos ainda não estão completamente elucidados. Estudos têm relatado que estas células apresentam propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras, que podem mediar os efeitos protetores e reparadores após o início da isquemia cerebral (MENDEZ-OTERO *et al.*, 2009; CEULEMANS *et al.*, 2010; WAGNER *et al.*, 2012; HAO *et al.*, 2014). Muitas pesquisas têm associado a infiltração de neutrófilos no tecido isquêmico com a gravidade e extensão dos danos no tecido cerebral e consequentemente com

sequelas neurológicas mais graves após o AVE (MATSUO *et al.*, 1994; MATSUO *et al.*, 1995; YAMASAKI *et al.*, 1997; PRICE *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2006; BRECKWOLDT *et al.*, 2008; BUCK *et al.*, 2008; AMANTEA *et al.*, 2009; LAKHAN *et al.*, 2009; CEULEMANS *et al.*, 2010; JIN *et al.*, 2010; PEREZ-DE-PUIG *et al.*, 2014). Desta forma, no presente estudo foi feito um experimento adicional para analisar o possível efeito da terapia com as MNMOs nessa infiltração.

O acúmulo de neutrófilos foi medido pela determinação da atividade de MPO. Muitos trabalhos têm demonstrado que a atividade elevada da MPO após a isquemia é um excelente marcador para a avaliação dos neutrófilos infiltrados no tecido lesionado (MATSUO *et al.*, 1994; ZHANG *et al.*, 1995; BRECKWOLDT *et al.*, 2008; EASTON, 2013; WEI *et al.*, 2013; FORGHANI *et al.*, 2014). Nossos resultados evidenciaram que o tratamento com MNMOs reduziu a infiltração de neutrófilos no parênquima cerebral após a isquemia, uma vez que, os animais tratados com essas células apresentaram baixa atividade da MPO no lado ipsilateral a lesão isquêmica, em comparação com os animais controles. Já no lado contralateral, tanto nos animais tratados com MNMOs quanto nos animais controle, praticamente não houve atividade desta enzima, ratificando que esta enzima é um marcador da infiltração de neutrófilos e está diretamente relacionada à presença desses no tecido lesado. Numerosos estudos têm demonstrado que a depleção de neutrófilos está correlacionada com a diminuição do dano no tecido cerebral (MATSUO *et al.*, 1994; EASTON, 2013; SCHOFIELD *et al.*, 2013; WEI *et al.*, 2013; PEREZ-DE-PUIG *et al.*, 2014). Nossos resultados corroboram com alguns estudos utilizando outras abordagens terapêuticas no modelo OACM, uma vez que estes também demonstraram efeitos neuroprotetores através da diminuição da infiltração de neutrófilos após a isquemia (GRØGAARD *et al.*, 1989; BEDNAR *et al.*, 1991; ZHANG *et al.*, 1994; MATSUO *et al.*, 1994; PRESTIGIACOMO *et al.*, 1999; KRAMS *et al.*, 2003; EASTON, 2013). Assim, podemos sugerir que um dos mecanismos utilizados pelas MNMOs para promover os efeitos benéficos após o AVE experimental é a modulação da resposta inflamatória pós-isquêmica, através da diminuição da infiltração de neutrófilos.

6. CONCLUSÃO

- O tratamento com MNMOs é capaz de induzir a recuperação funcional nos animais ao longo do tempo, independentemente de ser macho ou fêmea e jovem ou de meia-idade, sugerindo que o tratamento do AVE com o MNMOs pode ser benéfico, independentemente da idade ou gênero.
- Nenhum efeito importante do gênero foi encontrado na taxa de sobrevivência, tamanho da lesão isquêmica e recuperação sensório-motora promovida pelas MNMOs. O efeito do gênero apenas foi visto na interação com a idade no teste do cilindro.
- A idade foi um fator significativo, uma vez que, os animais de meia idade apresentaram maior mortalidade e tamanho da lesão. A idade não influenciou na recuperação sensório-motora promovida pela MNMOs no teste do cilindro, mas influenciou no teste de remoção do adesivo.
- O tratamento com MNMOs reduziu a infiltração de neutrófilos no parênquima cerebral 48 horas após a isquemia. Isto sugere que o tratamento pode estar reduzindo a resposta inflamatória.

7. REFERÊNCIAS

- ABC DA SAÚDE. Acidente Vascular Cerebral. 2010. Disponível em: <<http://www.abcdasaude.com.br/neurologia/acidente-vascular-cerebral>>. Acesso em: 21/04/2015.
- ADKINS, D.; VOORHIES, A.; JONES, T. Behavioral and neuroplastic effects of focal endothelin-1 induced sensorimotor cortex lesions. **Neuroscience**, v. 128, n. 3, p. 473-486, 2004.
- ALBERT EINSTEIN. Acidente Vascular Cerebral. O atendimento é uma corrida contra o tempo. 2010. Disponível em: <<http://www.einstein.br/einstein-saude/pagina-einstein/Paginas/acidente-vascular-cerebral-o-atendimento-e-uma-corrída-contra-o-tempo.aspx>>. Acesso em: 12/04/2015.
- ALBERT EINSTEIN. Acidente Vascular Cerebral Isquêmico. 2012. Disponível em: <<http://www.einstein.br/einstein-saude/doencas/Paginas/tudo-sobre-acidente-vascular-cerebral-isquemico.aspx>>. Acesso em: 21/04/2015.
- ALKAYED, N. J.; HARUKUNI, I.; KIMES, A. S.; LONDON, E. D.; TRAYSTMAN, R. J.; HURN, P. D. Gender-linked brain injury in experimental stroke. **Stroke**, v. 29, n. 1, p. 159-166, 1998.
- ALKAYED, N. J.; MURPHY, S. J.; TRAYSTMAN, R. J.; HURN, P. D. Neuroprotective effects of female gonadal steroids in reproductively senescent female rats. **Stroke**, v. 31, n. 1, p. 161-168, 2000.
- ALVAREZ-DOLADO, M.; PARDAL, R.; GARCIA-VERDUGO, J. M.; FIKE, J. R.; LEE, H. O.; PFEFFER, K.; LOIS, C.; MORRISON, S. J.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Fusion of bone-marrow-derived cells with purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. **Nature**, v. 425, n. 6961, p. 968-973, 2003.
- AMANTEA, D.; NAPPI, G.; BERNARDI, G.; BAGETTA, G.; CORASANITI, M. T. Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators. **FEBS Journal**, v. 276, n. 1, p. 13-26, 2009.
- AYALA, C.; CROFT, J. B.; GREENLUND, K. J.; KEENAN, N. L.; DONEHOO, R. S.; MALARCHER, A. M.; MENSAH, G. A. Sex differences in US mortality rates for stroke and stroke subtypes by race/ethnicity and age, 1995–1998. **Stroke**, v. 33, n. 5, p. 1197-1201, 2002.
- BADAN, I.; BUCHHOLD, B.; HAMM, A.; GRATZ, M.; WALKER, L.; PLATT, D.; KESSLER, C.; POPA-WAGNER, A. Accelerated glial reactivity to stroke in aged rats correlates with reduced functional recovery. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 23, n. 7, p. 845-854, 2003.
- BAKER, A. H.; SICA, V.; WORK, L. M.; WILLIAMS-IGNARRO, S.; DE NIGRIS, F.; LERMAN, L. O.; CASAMASSIMI, A.; LANZA, A.; SCHIANO, C.; RIENZO, M. Brain protection using autologous bone marrow cell, metalloproteinase inhibitors, and metabolic treatment in cerebral ischemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 9, p. 3597-3602, 2007.

BANERJEE, S.; WILLIAMSON, D. A.; HABIB, N.; CHATAWAY, J. The potential benefit of stem cell therapy after stroke: an update. **Vascular Health and Risk Management**, v. 8, p. 569, 2012.

BANG, O. Y.; LEE, J. S.; LEE, P. H.; LEE, G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. **Annals of Neurology**, v. 57, n. 6, p. 874-882, 2005.

BAO, X.; WEI, J.; FENG, M.; LU, S.; LI, G.; DOU, W.; MA, W.; MA, S.; AN, Y.; QIN, C. Transplantation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes behavioral recovery and endogenous neurogenesis after cerebral ischemia in rats. **Brain Research**, v. 1367, p. 103-113, 2011.

BARBOSA, F. L. M.; GUTFILEN, B.; ROSADO DE CASTRO, P. H.; BATTISTELLA, V.; GOLDENBERG, R.; KASAI-BRUNSWICK, T.; CHAGAS, C. L.; WAJNBERG, E.; MAIOLINO, A.; SALLES XAVIER, S. Migration and homing of bone-marrow mononuclear cells in chronic ischemic stroke after intra-arterial injection. **Experimental Neurology**, v. 221, n. 1, p. 122-128, 2010.

BARKHO, B. Z.; ZHAO, X. Adult neural stem cells: response to stroke injury and potential for therapeutic applications. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 6, n. 4, p. 327, 2011.

BATTISTELLA, V.; DE FREITAS, G. R.; DA FONSECA, L. M. B.; MERCANTE, D.; GUTFILEN, B.; GOLDENBERG, R. C.; VIEIRA DIAS, J.; KASAI-BRUNSWICK, T. H.; WAJNBERG, E.; ROSADO-DE-CASTRO, P. H. Safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with nonacute ischemic stroke. **Regenerative Medicine**, v. 6, n. 1, p. 45-52, 2011.

BEDERSON, J. B.; PITTS, L. H.; TSUJI, M.; NISHIMURA, M.; DAVIS, R.; BARTKOWSKI, H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. **Stroke**, v. 17, n. 3, p. 472-476, 1986.

BEDNAR, M. M.; RAYMOND, S.; MCAULIFFE, T.; LODGE, P. A.; GROSS, C. E. The role of neutrophils and platelets in a rabbit model of thromboembolic stroke. **Stroke**, v. 22, n. 1, p. 44-50, 1991.

BENICE, T.; RIZK, A.; KOHAMA, S.; PFANKUCH, T.; RABER, J. Sex-differences in age-related cognitive decline in C57BL/6J mice associated with increased brain microtubule-associated protein 2 and synaptophysin immunoreactivity. **Neuroscience**, v. 137, n. 2, p. 413-423, 2006.

BORLONGAN, C. V.; GLOVER, L. E.; SANBERG, P.; HESS, D. C. Permeating the blood brain barrier and abrogating the inflammation in stroke: Implications for stroke therapy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 25, p. 3670, 2012.

BORLONGAN, C. V.; GLOVER, L. E.; TAJIRI, N.; KANEKO, Y.; FREEMAN, T. B. The great migration of bone marrow-derived stem cells toward the ischemic brain: therapeutic implications for stroke and other neurological disorders. **Progress in Neurobiology**, v. 95, n. 2, p. 213-228, 2011.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, n. 3, p. 618-622, 1982.

BRECKWOLDT, M. O.; CHEN, J. W.; STANGENBERG, L.; AIKAWA, E.; RODRIGUEZ, E.; QIU, S.; MOSKOWITZ, M. A.; WEISSLEDER, R. Tracking the inflammatory response in stroke in vivo by sensing the enzyme myeloperoxidase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 47, p. 18584-18589, 2008.

BRENNEMAN, M.; SHARMA, S.; HARTING, M.; STRONG, R.; COX, C. S.; ARONOWSKI, J.; GROTTA, J. C.; SAVITZ, S. I. Autologous bone marrow mononuclear cells enhance recovery after acute ischemic stroke in young and middle-aged rats. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 30, n. 1, p. 140-149, 2010.

BROUGHTON, B. R.; LIM, R.; ARUMUGAM, T. V.; DRUMMOND, G. R.; WALLACE, E. M.; SOBEY, C. G. Post-stroke inflammation and the potential efficacy of novel stem cell therapies: focus on amnion epithelial cells. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 6, 2013.

BROUNS, R.; DE DEYN, P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 111, n. 6, p. 483-495, 2009.

BUCK, B. H.; LIEBESKIND, D. S.; SAVER, J. L.; BANG, O. Y.; YUN, S. W.; STARKMAN, S.; ALI, L. K.; KIM, D.; VILLABLANCA, J. P.; SALAMON, N. Early neutrophilia is associated with volume of ischemic tissue in acute stroke. **Stroke**, v. 39, n. 2, p. 355-360, 2008.

BUGA, A.-M.; DI NAPOLI, M.; POPA-WAGNER, A. Preclinical models of stroke in aged animals with or without comorbidities: role of neuroinflammation. **Biogerontology**, v. 14, n. 6, p. 651-662, 2013.

BURNHAM, K. P.; ANDERSON, D. R. Multimodel inference understanding AIC and BIC in model selection. **Sociological methods & research**, v. 33, n. 2, p. 261-304, 2004.

CEULEMANS, A.-G.; ZGAVC, T.; KOOIJMAN, R.; HACHIMI-IDRISSI, S.; SARRE, S.; MICHOTTE, Y. The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, n. 1, p. 74, 2010.

CHAVES, M. L. F. Acidente vascular encefálico: conceituação e fatores de risco. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 4, p. 372-82, 2000.

CHEN, J.; VENKAT, P.; CHOPP, M. Neurorestorative therapy for stroke. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 8, p. 382, 2014.

CHEN, J.; ZACHAREK, A.; CUI, X.; SHEHADAH, A.; JIANG, H.; ROBERTS, C.; LU, M.; CHOPP, M. Treatment of stroke with a synthetic liver X receptor agonist, TO901317, promotes synaptic plasticity and axonal regeneration in mice. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 30, n. 1, p. 102-109, 2009.

CHEN, S. H.; WANG, J. J.; CHEN, C. H.; CHANG, H. K.; LIN, M. T.; CHANG, F. M.; CHIO, C. C. Umbilical cord blood-derived CD34+ cells improve outcomes of traumatic brain injury in rats by stimulating angiogenesis and neurogenesis. **Cell Transplantation**, 2013.

CHOPP, M.; LI, Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. **The Lancet Neurology**, v. 1, n. 2, p. 92-100, 2002.

CRAIN, B. J.; TRAN, S. D.; MEZEY, E. Transplanted human bone marrow cells generate new brain cells. **Journal of the neurological sciences**, v. 233, n. 1, p. 121-123, 2005.

CURRY, B. B. Animal models used in identifying gender-related differences. **International journal of toxicology**, v. 20, n. 3, p. 153-160, 2001.

D'AGOSTINO, R.B. Transformation to normality of the null distribution of g_1 . **Biometrika**, v. 57, n. 3, p. 679-681, 1970.

DANTON, G. H.; DIETRICH, W. D. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 62, n. 2, p. 127-136, 2003.

DE FREITAS, H. T. Indução de recuperação funcional pela terapia com células-tronco mesenquimais em modelo de lesão por ablação focal no córtex cerebral de ratos. **Campos dos Goytacazes: UENF**, 2011.

DE VASCONCELOS DOS SANTOS, A.; DA COSTA REIS, J.; DIAZ PAREDES, B.; MORAES, L.; GIRALDI-GUIMARÃES, A.; MENDEZ-OTERO, R. Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats. **Brain Research**, v. 1306, p. 149-158, 2010.

DELCROIX, G. J.-R.; SCHILLER, P. C.; BENOIT, J.-P.; MONTERO-MENEI, C. N. Adult cell therapy for brain neuronal damages and the role of tissue engineering. **Biomaterials**, v. 31, n. 8, p. 2105-2120, 2010.

DILGER, R. N.; JOHNSON, R. W. Aging, microglial cell priming, and the discordant central inflammatory response to signals from the peripheral immune system. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, n. 4, p. 932-939, 2008.

DINAPOLI, V.; BENKOVIC, S.; LI, X.; KELLY, K.; MILLER, D.; ROSEN, C.; HUBER, J.; O'CALLAGHAN, J. Age exaggerates proinflammatory cytokine signaling and truncates signal transducers and activators of transcription 3 signaling following ischemic stroke in the rat. **Neuroscience**, v. 170, n. 2, p. 633-644, 2010.

DINAPOLI, V. A.; HUBER, J. D.; HOUSER, K.; LI, X.; ROSEN, C. L. Early disruptions of the blood-brain barrier may contribute to exacerbated neuronal damage and prolonged functional recovery following stroke in aged rats. **Neurobiology of Aging**, v. 29, n. 5, p. 753-764, 2008.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends in Neurosciences**, v. 22, n. 9, p. 391-397, 1999.

DOEPPNER, T. R.; HERMANN, D. M. Mesenchymal stem cells in the treatment of ischemic stroke: progress and possibilities. **Stem Cells and Cloning: Advances and Applications**, v. 3, p. 157, 2010.

DONNAN, G. A.; FISHER, M.; MACLEOD, M.; DAVIS, M. Stroke. **The Lancet**, v.371, n.9624, p.1612–1623, 2008.

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

DURUKAN, A.; TATLISUMAK, T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 87, n. 1, p. 179-197, 2007.

EASTON, A. S. Neutrophils and stroke—Can neutrophils mitigate disease in the central nervous system? **International immunopharmacology**, v. 17, n. 4, p. 1218-1225, 2013.

ELKIND, M. S.; CHENG, J.; RUNDEK, T.; BODEN-ALBALA, B.; SACCO, R. L. Leukocyte count predicts outcome after ischemic stroke: the Northern Manhattan Stroke Study. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 13, n. 5, p. 220-227, 2004.

ELLEKJÆR, H.; HOLMEN, J.; INDREDAVIK, B.; TERENT, A. Epidemiology of Stroke in Innherred, Norway, 1994 to 1996: Incidence and 30-Day Case-Fatality Rate. **Stroke**, v. 28 n. 11, p.2180-2184, 1997.

EMSLEY, H. C.; TYRRELL, P. J. Inflammation and infection in clinical stroke. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 22, n. 12, p. 1399-1419, 2002.

ERICKSON, K. I.; MILHAM, M. P.; COLCOMBE, S. J.; KRAMER, A. F.; BANICH, M. T.; WEBB, A.; COHEN, N. J. Behavioral conflict, anterior cingulate cortex, and experiment duration: implications of diverging data. **Human Brain Mapping**, v. 21, n. 2, p. 98-107, 2004.

FLETCHER, R. H.; FLETCHER, S.; WAGNER, E. H. Epidemiologia clínica: elementos essenciais. In: (Ed.). **Série Médica**: Artes Médicas, 1996.

FORGHANI, R.; KIM, H. J.; WOJTKIEWICZ, G. R.; BURE, L.; WU, Y.; HAYASE, M.; WEI, Y.; ZHENG, Y.; MOSKOWITZ, M. A.; CHEN, J. W. Myeloperoxidase propagates damage and is a potential therapeutic target for subacute stroke. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, 2014.

FRANK-CANNON, T. C.; ALTO, L. T.; MCALPINE, F. E.; TANSEY, M. G. Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases. **Molecular Neurodegener**, v. 4, n. 47, p. 1-13, 2009.

GHARBAWIE, O. A.; WHISHAW, P. A.; WHISHAW, I. Q. The topography of three-dimensional exploration: a new quantification of vertical and horizontal exploration, postural support, and exploratory bouts in the cylinder test. **Behavioural Brain Research**, v. 151, n. 1, p. 125-135, 2004.

GIBSON, C. L.; GRAY, L. J.; MURPHY, S. P.; BATH, P. M. Estrogens and experimental ischemic stroke: a systematic review. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 26, n. 9, p. 1103-1113, 2006.

GIRALDI-GUIMARÃES, A.; DE FREITAS, H. T.; COELHO, B. D. P.; MACEDO-RAMOS, H.; MENDEZ-OTERO, R.; CAVALCANTE, L. A.; BAETAS-DA-CRUZ, W. Bone marrow mononuclear cells and mannose receptor expression in focal cortical ischemia. **Brain Research**, v. 1452, p. 173-184, 2012.

GIRALDI-GUIMARÃES, A.; REZENDE-LIMA, M.; BRUNO, F. P.; MENDEZ-OTERO, R. Treatment with bone marrow mononuclear cells induces functional recovery and decreases neurodegeneration after sensorimotor cortical ischemia in rats. **Brain Research**, v. 1266, p. 108-120, 2009.

GOKCAY, F.; ARSAVA, E. M.; BAYKANER, T.; VANGEL, M.; GARG, P.; WU, O.; SINGHAL, A. B.; FURIE, K. L.; SORENSEN, A. G.; AY, H. Age-dependent susceptibility to infarct growth in women. **Stroke**, v. 42, n. 4, p. 947-951, 2011.

GRAHAM, S. M.; MCCULLOUGH, L. D.; MURPHY, S. J. Animal models of ischemic stroke: balancing experimental aims and animal care. **Comparative Medicine**, v. 54, n. 5, p. 486-496, 2004.

GRØGAARD, B.; SCHURER, L.; GERDIN, B.; ARFORS, K. E. Delayed hypoperfusion after incomplete forebrain ischemia in the rat. The role of polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 9, n. 4, p. 500-505, 1989.

GRØNBERG, N. V.; JOHANSEN, F. F.; KRISTIANSEN, U.; HASSELDAM, H. Leukocyte infiltration in experimental stroke. **Journal Neuroinflammation**, v. 10, p. 115, 2013.

GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, M.; RODRÍGUEZ-FRUTOS, B.; RAMOS-CEJUDO, J.; TERESA VALLEJO-CREMADES, M.; FUENTES, B.; CERDÁN, S.; DÍEZ-TEJEDOR, E. Effects of intravenous administration of allogenic bone marrow-and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on functional recovery and brain repair markers in experimental ischemic stroke. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 4, n. 11, 2013.

HAAS, S.; WEIDNER, N.; WINKLER, J. Adult stem cell therapy in stroke. **Current Opinion in Neurology**, v. 18, n. 1, p. 59-64, 2005.

HACKE, W.; KASTE, M.; BLUHMKI, E.; BROZMAN, M.; DÁVALOS, A.; GUIDETTI, D.; LARRUE, V.; LEES, K. R.; MEDEGHRI, Z.; MACHNIG, T. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 13, p. 1317-1329, 2008.

HALLENBECK, J. M.; DUTKA, A. J.; TANISHIMA, T.; KOCHANNEK, P. M.; KUMAROO, K.; THOMPSON, C. B.; OBRENOVITCH, T. P.; CONTRERAS, T. J. Polymorphonuclear leukocyte accumulation in brain regions with low blood flow during the early postischemic period. **Stroke**, v. 17, n. 2, p. 246-253, 1986.

HAO, L.; ZOU, Z.; TIAN, H.; ZHANG, Y.; ZHOU, H.; LIU, L. Stem Cell-Based Therapies for Ischemic Stroke. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

HAO, Q.; SU, H.; PALMER, D.; SUN, B.; GAO, P.; YANG, G.-Y.; YOUNG, W. L. Bone marrow-derived cells contribute to vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in the adult mouse brain by supplying matrix metalloproteinase-9. **Stroke**, v. 42, n. 2, p. 453-458, 2011.

HART, L. A. **Responsible Conduct with Animals in Research**. Oxford University Press., 1998.

HENRIQUES-FILHO, G.; BARBOSA, O. Tratamento da hipertensão intracraniana. **Intensiva**, v. 18, n. 3, p. 39, 2011.

HERMANN, D. M.; CHOPP, M. Promoting brain remodelling and plasticity for stroke recovery: therapeutic promise and potential pitfalls of clinical translation. **The Lancet Neurology**, v. 11, n. 4, p. 369-380, 2012.

HERNANDEZ, L. A.; GRISHAM, M. B.; TWOHIG, B.; ARFORS, K. E.; HARLAN, J. M.; GRANGER, D. N. Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 253, n. 3, p. H699-H703, 1987.

HILTON, R. C. Acidentes Vasculares Encefálicos. In: Samuels MA, editor. Manual de Neurologia. Diagnóstico e tratamento. **Rio de Janeiro: Medsi**; 1992.

HOSSMANN, K.-A. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 26, n. 7-8, p. 1055-1081, 2006.

HOY, A.; LEININGER-MULLER, B.; POIRIER, O.; SIEST, G.; GAUTIER, M.; ELBAZ, A.; AMARENCO, P.; VISVIKIS, S. Myeloperoxidase polymorphisms in brain infarction. Association with infarct size and functional outcome. **Atherosclerosis**, v. 167, n. 2, p. 223-230, 2003.

HSC. (HOSPITAL SANTA CATARINA). Derrame Cerebral. 2012. Disponível em: <http://www.hsc.org.br/site/portal_hsc/pt/Imprensa/saude/saude_detalhes_8360.aspx>. Acesso em: 07/06/2014.

HUANG, J.; UPADHYAY, U. M.; TAMARGO, R. J. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. **Surgical Neurology**, v. 66, n. 3, p. 232-245, 2006.

HUNTER, A. J.; GREEN, A. R.; CROSS, A. J. Animal models of acute ischaemic stroke: can they predict clinically successful neuroprotective drugs? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 16, n. 4, p. 123-128, 1995.

IADECOLA, C.; ANRATHER, J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. **Nature Medicine**, v. 17, n. 7, p. 796-808, 2011.

IHOSHII, S.; HONMOU, O.; HOUKIN, K.; HASHI, K.; KOCSIS, J. D. A therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats. **Brain Research**, v. 1007, n. 1, p. 1-9, 2004.

JIN, R.; YANG, G.; LI, G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 87, n. 5, p. 779-789, 2010.

KAMIYA, N.; UEDA, M.; IGARASHI, H.; NISHIYAMA, Y.; SUDA, S.; INABA, T.; KATAYAMA, Y. Intra-arterial transplantation of bone marrow mononuclear cells

immediately after reperfusion decreases brain injury after focal ischemia in rats. **Life Sciences**, v. 83, n. 11, p. 433-437, 2008.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase. **Proceedings of the Association of American Physicians**, v. 111, n. 5, p. 383–389, 1999.

KÖRBLING, M.; ESTROV, Z. Adult stem cells for tissue repair—a new therapeutic concept? **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 6, p. 570-582, 2003.

KRAMS, M.; LEES, K. R.; HACKE, W.; GRIEVE, A. P.; ORGOGOZO, J.-M.; FORD, G. A. Acute stroke therapy by inhibition of neutrophils (ASTIN) an adaptive dose-response study of UK-279,276 in acute ischemic stroke. **Stroke**, v. 34, n. 11, p. 2543-2548, 2003.

KRAUSE, D. S.; THEISE, N. D.; COLLECTOR, M. I.; HENEGARIU, O.; HWANG, S.; GARDNER, R.; NEUTZEL, S.; SHARKIS, S. J. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. **Cell**, v. 105, n. 3, p. 369-377, 2001.

LAKHAN, S. E.; KIRCHGESSNER, A.; HOFER, M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, n. 1, p. 97, 2009.

LAU, D.; BALDUS, S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. **Pharmacology Therapy**, v. 111, p. 16–26, 2006.

LELEKOV-BOISSARD, T.; CHAPUISAT, G.; BOISSEL, J.-P.; GRENIER, E.; DRONNE, M.-A. Exploration of beneficial and deleterious effects of inflammation in stroke: dynamics of inflammation cells. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 367, n. 1908, p. 4699-4716, 2009.

LEVIN, J. Por que o pesquisador usa estatística. **Estatística Aplicada a Ciências Humanas**. 2ª ed. São Paulo: Harbra, p. 1-12, 1987.

LI, S.; OVERMAN, J. J.; KATSMAN, D.; KOZLOV, S. V.; DONNELLY, C. J.; TWISS, J. L.; GIGER, R. J.; COPPOLA, G.; GESCHWIND, D. H.; CARMICHAEL, S. T. An age-related sprouting transcriptome provides molecular control of axonal sprouting after stroke. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 12, p. 1496-1504, 2010.

LITTELE, R.; HENRY, P.; AMMERMAN, C. Statistical Analysis of Repeated Measures Data Using SAS Procedures1. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 1216-1231, 1998.

LIU, F.; YUAN, R.; BENASHKI, S. E.; MCCULLOUGH, L. D. Changes in experimental stroke outcome across the life span. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 29, n. 4, p. 792-802, 2009.

LO, E. H.; MOSKOWITZ, M. A.; JACOBS, T. P. Exciting, radical, suicidal: how brain cells die after stroke. **Stroke**, v. 36, p. 189–192, 2005.

LU, J.; ANZALONE, C.; LAPOLT, P. Relation of neuroendocrine function to reproductive decline during aging in the female rat. **Neurobiology of aging**, v. 15, n. 4, p. 541-544, 1994.

LUCAS, S. M.; ROTHWELL, N. J.; GIBSON, R. M. The role of inflammation in CNS injury and disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. S1, p. S232-S240, 2006.

LUCIN, K. M.; WYSS-CORAY, T. Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? **Neuron**, v. 64, n. 1, p. 110-122, 2009.

MAGNUS, T.; WIENDL, H.; KLEINSCHNITZ, C. Immune mechanisms of stroke. **Current Opinion in Neurology**, v. 25, n. 3, p. 334-340, 2012.

MAKI, P. M. The Critical Window Hypothesis of Hormone Therapy and Cognition: A Scientific Update on Clinical Studies. **Menopause (New York, NY)**, v. 20, n. 6, p. 695, 2013.

MALGIERI, A.; KANTZARI, E.; PATRIZI, M. P.; GAMBARDELLA, S. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 3, n. 4, p. 248, 2010.

MANWANI, B.; LIU, F.; XU, Y.; PERSKY, R.; LI, J.; MCCULLOUGH, L. D. Functional recovery in aging mice after experimental stroke. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 8, p. 1689-1700, 2011.

MARLER, J. R. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. **New England Journal of Medicine**, v. 333, n. 24, p.1581–1587, 1995.

MARKUS, H.S. Stroke: causes and clinical features. **Medicine (Baltimore)**, v.32, n.10, p.57-61. 2008.

MATSUO, Y.; KIHARA, T.; IKEDA, M.; NINOMIYA, M.; ONODERA, H.; KOGURE, K. Role of neutrophils in radical production during ischemia and reperfusion of the rat brain: effect of neutrophil depletion on extracellular ascorbyl radical formation. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 15, n. 6, p. 941-947, 1995.

MATSUO, Y.; ONODERA, H.; SHIGA, Y.; NAKAMURA, M.; NINOMIYA, M.; KIHARA, T.; KOGURE, K. Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion. **Stroke**, v. 25, n. 7, p. 1469-1475, 1994.

MAUSNER, J.; BATH, A. Introdução à Epidemiologia. **Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian**, 1999.

MAZZOLA, D.; POLESE, J. C.; SCHUSTER, R. C.; DE OLIVEIRA, S. G. Perfil dos pacientes acometidos por acidente vascular encefálico assistidos na clínica de fisioterapia neurológica da Universidade de Passo Fundo. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 20, n. 1, p. 22-27, 2007.

MCGUCKIN, C. P.; JURGA, M.; MILLER, A.; SARNOWSKA, A.; WIEDNER, M.; BOYLE, N. T.; LYNCH, M. A.; JABLONSKA, A.; DRELA, K.; LUKOMSKA, B.; DOMANSKA-JANIK, K.; KENNER, L.; MORIGGL, R.; DEGOUL, O.; PERRUISSEAU-CARRIER, C.; FORRAZ, N. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 534, p. 88–97, 2013.

MENDEZ-OTERO, R.; DE FREITAS, G. R.; ANDRÉ, C.; FURTADO DE MENDONÇA, M. L.; FRIEDRICH, M.; OLIVEIRA-FILHO, J. Potential roles of bone marrow stem cells in stroke therapy. **Regenerative Medicine**, v. 2, n. 4, p. 417-423, 2007.

MENDEZ-OTERO, R.; GIRALDI-GUIMARÃES, A.; PIMENTEL-COELHO, P. M.; FREITAS, G. R. Terapia celular no acidente vascular cerebral. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 99-103, 2009.

MERKATZ, R. B.; TEMPLE, R.; SOBEL, S.; FEIDEN, K.; KESSLER, D. A. Women in clinical trials of new drugs-A change in food and drug administration policy. **New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 4, p. 292-296, 1993.

METAMORFOSES. Acidente Vascular Cerebral. 2012. Disponível em: < <http://avcacidentevascular.webnode.pt/acidente-vascular-cerebral/> >. Acesso em: 17/12/2014.

METZLER, K. D.; FUCHS, T. A.; NAUSEEF, W. M.; REUMAUX, D.; ROESLER, J.; SCHULZE, I.; WAHN, V.; PAPAYANNOPOULOS, V.; ZYCHLINSKY, A. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. **Blood**, v. 117, n. 3, p. 953-959, 2011.

MEZEY, É. Bone marrow-derived stem cells in neurological diseases: stones or masons? **Regenerative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 37-49, 2007.

MILLER, R. H.; BAI, L.; LENNON, D. P.; CAPLAN, A. I. The potential of mesenchymal stem cells for neural repair. **Discovery Medicine**, v. 9, n. 46, p. 236-242, 2010.

MINNERUP, J.; WAGNER, D.-C.; STRECKER, J.-K.; PÖSEL, C.; SEVIMLI-ABDIS, S.; SCHMIDT, A.; SCHILLING, M.; BOLTZE, J.; DIEDERICH, K.; SCHÄBITZ, W.-R. Bone marrow-derived mononuclear cells do not exert acute neuroprotection after stroke in spontaneously hypertensive rats. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, 2013.

MIR, H. M.; TATSUKAWA, K. J.; CARMICHAEL, S. T.; CHESSELET, M.-F.; KORNBLUM, H. I. Metabolic correlates of lesion-specific plasticity: an in vivo imaging study. **Brain Research**, v. 1002, n. 1, p. 28-34, 2004.

MORI, T.; ASANO, T.; TOWN, T. Targeting S100B in Cerebral Ischemia and in Alzheimer's Disease. **Cardiovascular Psychiatry and Neurology**, v. 2, p. 1-14, 2010.

MURPHY, S. J.; MCCULLOUGH, L. D.; SMITH, J. M. Stroke in the female: role of biological sex and estrogen. **ILAR Journal**, v. 45, n. 2, p. 147-159, 2004.

NAKANO-DOI, A.; NAKAGOMI, T.; FUJIKAWA, M.; NAKAGOMI, N.; KUBO, S.; LU, S.; YOSHIKAWA, H.; SOMA, T.; TAGUCHI, A.; MATSUYAMA, T. Bone marrow mononuclear cells promote proliferation of endogenous neural stem cells through vascular niches after cerebral infarction. **Stem Cells**, v. 28, n. 7, p. 1292-1302, 2010.

NAPIERALSKI, J.; BANKS, R.; CHESSELET, M. Motor and somatosensory deficits following uni-and bilateral lesions of the cortex induced by aspiration or thermocoagulation in the adult rat. **Experimental Neurology**, v. 154, n. 1, p. 80-88, 1998.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 3, p. 173-182, 2006.

NINDS (National Institute of Neurological Disorders and Stroke). Stroke. 2015. Disponível em: <<http://www.ninds.nih.gov/disorders/stroke/stroke.htm>>. Acesso em: 22/04/2015.

NORDELL, V. L.; SCARBOROUGH, M. M.; BUCHANAN, A. K.; SOHRABJI, F. Differential effects of estrogen in the injured forebrain of young adult and reproductive senescent animals. **Neurobiology of Aging**, v. 24, n. 5, p. 733-743, 2003.

NUNES, S.; PEREIRA C.; SILVA G. Evolução funcional de utentes após AVC nos primeiros seis meses após a lesão. **EssFisiOnline**, v.1,n. 3, p. 3-20, 2005.

OLIVEIRA, A.; MARQUES, G.; KOHLER, R.; CARDOSO, R. Atuação da fisioterapia na prevenção dos fatores de risco modificáveis que predisõem o acidente vascular encefálico. **Fisioterapia Brasil**, v. 5, p. 484-489, 2006.

ONYSZCHUK, G.; HE, Y.-Y.; BERMAN, N. E.; BROOKS, W. M. Detrimental effects of aging on outcome from traumatic brain injury: a behavioral, magnetic resonance imaging, and histological study in mice. **Journal of Neurotrauma**, v. 25, n. 2, p. 153-171, 2008.

ORKIN, S. H. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. **Nature Reviews Genetics**, v. 1, n. 1, p. 57-64, 2000.

O'SULLIVAN, S. B.; SCHMITZ, T. J. Fisioterapia: avaliação e tratamento. **3ªed. Rio de Janeiro: Manole**, p. 110-120, 2004.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition**. Academic Press, 2006.

PEREZ-DE-PUIG, I.; MIRÓ-MUR, F.; FERRER-FERRER, M.; GELPI, E.; PEDRAGOSA, J.; JUSTICIA, C.; URRÁ, X.; CHAMORRO, A.; PLANAS, A. M. Neutrophil recruitment to the brain in mouse and human ischemic stroke. **Acta Neuropathologica**, p. 1-19, 2014.

PIRES, S. L.; GAGLIARDI, R. J.; GORZONI, M. L. Estudo das freqüências dos principais fatores de risco para acidente vascular cerebral isquêmico em idosos. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 62, n. 3-B, p. 844-51, 2004.

POPA-WAGNER, A.; BADAN, I.; WALKER, L.; GROPPA, S.; PATRANA, N.; KESSLER, C. Accelerated infarct development, cytogenesis and apoptosis following transient cerebral ischemia in aged rats. **Acta Neuropathologica**, v. 113, n. 3, p. 277-293, 2007a.

POPA-WAGNER, A.; BUGA, A.-M.; KOKAIA, Z. Perturbed cellular response to brain injury during aging. **Ageing Research Reviews**, v. 10, n. 1, p. 71-79, 2011.

POPA-WAGNER, A.; CARMICHAEL, S. T.; KOKAIA, Z.; KESSLER, C.; WALKER, L. C. The response of the aged brain to stroke: too much, too soon? **Current Neurovascular Research**, v. 4, n. 3, p. 216-227, 2007b.

PRESTIGIACOMO, C. J.; KIM, S. C.; CONNOLLY, E. S.; LIAO, H.; YAN, S.-F.; PINSKY, D. J. CD18-mediated neutrophil recruitment contributes to the pathogenesis of reperfused but not nonreperfused stroke. **Stroke**, v. 30, n. 5, p. 1110-1117, 1999.

PRICE, C.; MENON, D.; PETERS, A.; BALLINGER, J.; BARBER, R.; BALAN, K.; LYNCH, A.; XUEREB, J.; FRYER, T.; GUADAGNO, J. Cerebral neutrophil recruitment, histology, and outcome in acute ischemic stroke an imaging-based study. **Stroke**, v. 35, n. 7, p. 1659-1664, 2004.

QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? **Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 775-777, 2005.

REEVES, M. J.; BUSHNELL, C. D.; HOWARD, G.; GARGANO, J. W.; DUNCAN, P. W.; LYNCH, G.; KHATIWODA, A.; LISABETH, L. Sex differences in stroke: epidemiology, clinical presentation, medical care, and outcomes. **The Lancet Neurology**, v. 7, n. 10, p. 915-926, 2008.

RODRIGUES, A. M. G.; MARCÍLIO, F. S.; MUZITANOB, M. F.; GIRALDI-GUIMARÃES, A. Therapeutic potential of treatment with the flavonoid rutin after cortical focal ischemia in rats. **Brain research**, v. 1503, p. 53-61, 2013.

ROLLIN, B. E. **The Experimental Animal in Biomedical Research: Care, Husbandry, and Well-Being-An Overview by Species**. CRC Press, 1995.

ROSADO-DE-CASTRO, P. H.; PIMENTEL-COELHO, P. M.; BARBOSA DA FONSECA, L. M.; DE FREITAS, G. R.; MENDEZ-OTERO, R. The rise of cell therapy trials for stroke: review of published and registered studies. **Stem Cells and Development**, v. 22, n. 15, p. 2095-2111, 2013.

ROTHWELL, P.; COULL, A.; GILES, M.; HOWARD, S.; SILVER, L.; BULL, L.; GUTNIKOV, S.; EDWARDS, P.; MANT, D.; SACKLEY, C. Change in stroke incidence, mortality, case-fatality, severity, and risk factors in Oxfordshire, UK from 1981 to 2004 (Oxford Vascular Study). **The Lancet**, v. 363, n. 9425, p. 1925-1933, 2004.

SALÃO, E.; PAZARA, K.; KL, L. Sex differences in post-ischemic necrosis in rodents. **Journal Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 11, p. 292-298, 1991.

SAMPAIO, M. D. F. D. S.; MARCÍLIO, F. D. S.; GIRALDI-GUIMARÃES, A. Does treatment with bone marrow mononuclear cells recover skilled motor function after focal cortical ischemia? Analysis with a forelimb skilled motor task in rats. **Brain Research**, v. 1492, n. 0, p. 130-139, 2013.

SAÚDE, M. D. Saúde Brasil 2010: Saúde lança consulta pública para o aprimoramento da assistência a pacientes com AVC. 2010. Disponível em: <

http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=11825 >. Acesso em: 22/08/2013.

SAÚDE, M. D. Mortalidade do adulto no Brasil: taxas de mortalidade segundo o sexo, as causas e as regiões, 2010. **Saúde Brasil 2011: uma análise da situação de saúde e a vigilância da saúde da mulher**. p. 185-208, 2011.

SAVITZ, S. I.; MISRA, V.; KASAM, M.; JUNEJA, H.; COX, C. S.; ALDERMAN, S.; AISIKU, I.; KAR, S.; GEE, A.; GROTTA, J. C. Intravenous autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic stroke. **Annals of Neurology**, v. 70, n. 1, p. 59-69, 2011.

SCALZO, P. L.; DE SOUZA, E. S.; DE OLIVEIRA, A. G.; MOREIRA, D. A. F. V. Qualidade de vida em pacientes com Acidente Vascular Cerebral: clínica de fisioterapia Puc Minas Betim. **Revista Neurociências**, p. 139-144, 2010.

SCHAAR, K. L.; BRENNEMAN, M. M.; SAVITZ, S. I. Functional assessments in the rodent stroke model. **Experimental & translational stroke medicine**, v. 2, n. 1, p. 13, 2010.

SCHALLERT, T. Behavioral tests for preclinical intervention assessment. **NeuroRx**, v. 3, n. 4, p. 497-504, 2006.

SCHALLERT, T.; FLEMING, S. M.; LEASURE, J. L.; TILLERSON, J. L.; BLAND, S. T. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 5, p. 777-787, 2000.

SCHELP, A. O.; COLA, P. C.; GATTO, A. R.; SILVA, R. D.; CARVALHO, L. D. Incidência de disfagia orofaríngea após acidente vascular encefálico em hospital público de referência. **Arquivo de Neuropsiquiatria**, v. 62, n. 2-B, p. 503-506, 2004.

SCHOFIELD, Z. V.; WOODRUFF, T. M.; HALAI, R.; WU, M. C.-L.; COOPER, M. A. Neutrophils—a key component of ischemia-reperfusion injury. **Shock**, v. 40, n. 6, p. 463-470, 2013.

SCHREIHOFFER, D. A.; MA, Y. Estrogen receptors and ischemic neuroprotection: who, what, where, and when? **Brain research**, v. 1514, p. 107-122, 2013.

SHARMA, S.; YANG, B.; STRONG, R.; XI, X.; BRENNEMAN, M.; GROTTA, J. C.; ARONOWSKI, J.; SAVITZ, S. I. Bone marrow mononuclear cells protect neurons and modulate microglia in cell culture models of ischemic stroke. **Journal of Neuroscience Research**, v. 88, n. 13, p. 2869-2876, 2010.

SHARMA, A.; SANE, H.; NAGRAJAN, A.; GOKULCHANDRAN, N.; BADHE, P.; PARANJAPE, A.; BIJU H. Autologous bone marrow mononuclear cells in ischemic cerebrovascular accident paves way for neurorestoration: a case report. **Case Reports in Medicine**. doi: 10.1155/2014/530239, 2014.

SHASTRI, A.; BONIFATI, D. M.; KISHORE, U. Innate immunity and neuroinflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, 2013.

SHEN, L. H.; LI, Y.; CHEN, J.; CUI, Y.; ZHANG, C.; KAPKE, A.; LU, M.; SAVANT-BHONSALE, S.; CHOPP, M. One-year follow-up after bone marrow stromal cell treatment in middle-aged female rats with stroke. **Stroke**, v. 38, n. 7, p. 2150-2156, 2007.

SIMI, A.; TSAKIRI, N.; WANG, P.; ROTHWELL, N. J. Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 1122-1126, 2007.

SIMPKINS, J. W.; RAJAKUMAR, G.; ZHANG, Y.-Q.; SIMPKINS, C. E.; GREENWALD, D.; YU, C. J.; BODOR, N.; DAY, A. L. Estrogens may reduce mortality and ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the female rat. **Journal of Neurosurgery**, v. 87, n. 5, p. 724-730, 1997.

SMAJLOVIC, D. Strokes in young adults: epidemiology and prevention. **Vascular Health and Risk Management**, v. 11, p. 157-164, 2015.

STOLL, G.; JANDER, S.; SCHROETER, M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. **Progress in Neurobiology**, v. 56, n. 2, p. 149-171, 1998.

STRONG, K.; MATHERS, C.; BONITA, R. Preventing stroke: saving lives around the world. **The Lancet Neurology**, v. 6, n. 2, p. 182-187, 2007.

SUNDAY, L.; OSUNA, C.; KRAUSE, D. N.; DUCKLES, S. P. Age alters cerebrovascular inflammation and effects of estrogen. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, n. 5, p. H2333-H2340, 2007.

SZELE, F.; ALEXANDER, C.; CHESSELET, M. Expression of molecules associated with neuronal plasticity in the striatum after aspiration and thermocoagulatory lesions of the cerebral cortex in adult rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 6, p. 4429-4448, 1995.

TAGUCHI, A.; ZHU, P.; CAO, F.; KIKUCHI-TAURA, A.; KASAHARA, Y.; STERN, D. M.; SOMA, T.; MATSUYAMA, T.; HATA, R. Reduced ischemic brain injury by partial rejuvenation of bone marrow cells in aged rats. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 31, n. 3, p. 855-867, 2011.

TITOVA, E.; OSTROWSKI, R. P.; ADAMI, A.; BADAUT, J.; LALAS, S.; GHOSH, N.; VLKOLINSKY, R.; ZHANG, J. H.; OBENAU, A. Brain irradiation improves focal cerebral ischemia recovery in aged rats. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 306, n. 1, p. 143-153, 2011.

TOKUTOMI, T.; MIYAGI, T.; OGAWA, T.; ONO, J.-I.; KAWAMATA, T.; SAKAMOTO, T.; SHIGEMORI, M.; NAKAMURA, N. Age-associated increases in poor outcomes after traumatic brain injury: a report from the Japan Neurotrauma Data Bank. **Journal of Neurotrauma**, v. 25, n. 12, p. 1407-1414, 2008.

TOWFIGHI, A.; SAVER, J. L.; ENGELHARDT, R.; OVBIAGELE, B. A midlife stroke surge among women in the United States. **Neurology**, v. 69, n. 20, p. 1898-1904, 2007.

VIEIRA, R. A. M.; CAMPOS, P. R. D. S. S.; DA SILVA, J. F. C.; TEDESCHI, L. O.; TAMY, W. P. Heterogeneity of the digestible insoluble fiber of selected forages in situ. **Animal Feed Science and Technology**, v. 171, n. 2, p. 154-166, 2012.

VOLKOV, A.; LEBEDEV, S.; STARYKH, E.; VOLKOVA, N.; CHEKHONIN, V. Post-Stroke Neurological Impairments in Rats with Functional Asymmetry of the Cerebral Hemispheres. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v. 41, n. 8, p. 865-870, 2011.

WAGNER, D.-C.; BOJKO, M.; PETERS, M.; LORENZ, M.; VOIGT, C.; KAMINSKI, A.; HASENCLEVER, D.; SCHOLZ, M.; KRANZ, A.; WEISE, G. Impact of age on the efficacy of bone marrow mononuclear cell transplantation in experimental stroke. **Experimental and Translational Stroke Medicine**, v. 4, p. 17, 2012.

WANG-FISCHER, Y. **Manual of Stroke Models in Rats**. CRC press, 2008.

WANG, J.; YU, L.; JIANG, C.; CHEN, M.; OU, C.; WANG, J. Bone marrow mononuclear cells exert long-term neuroprotection in a rat model of ischemic stroke by promoting arteriogenesis and angiogenesis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 34, p. 56-66, 2013.

WANG, Q.; SANTIZO, R.; BAUGHMAN, V. L.; PELLIGRINO, D. A. Estrogen provides neuroprotection in transient forebrain ischemia through perfusion-independent mechanisms in rats. **Stroke**, v. 30, n. 3, p. 630-637, 1999.

WANG, Q.; TANG, X. N.; YENARI, M. A. The inflammatory response in stroke. **Journal of Neuroimmunology**, v. 184, n. 1, p. 53-68, 2007.

WEI, J.; FANG, W.; SHA, L.; HAN, D.; ZHANG, R.; HAO, X.; LI, Y. XQ-1h suppresses neutrophils infiltration and oxidative stress induced by cerebral ischemia injury both in vivo and in vitro. **Neurochemical Research**, v. 38, n. 12, p. 2542-2549, 2013.

WHO. (World Health Organization). 2011. Disponível em: <http://www.who.int/topics/cerebrovascular_accident/en/>. Acesso em: 24/08/2014.

WHO. (World Health Organization). The top 10 causes of death. 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>>. Acesso em: 17/05/2014.

WILGUS, T. A.; ROY, S.; MCDANIEL, J. C. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. **Advances in Wound Care (New Rochelle)**, v.2, n. 7, p. 379–388, 2013.

WOLFE, C.D. The impact of stroke. **British Medical Bulletin**, v.56, n.2, p.275-286, 2000.

YAGER, J. Y.; WRIGHT, S.; ARMSTRONG, E. A.; JAHRAUS, C. M.; SAUCIER, D. M. The influence of aging on recovery following ischemic brain damage. **Behavioural Brain Research**, v. 173, n. 2, p. 171-180, 2006.

YAMASAKI, Y.; MATSUO, Y.; ZAGORSKI, J.; MATSUURA, N.; ONODERA, H.; ITOYAMA, Y.; KOGURE, K. New therapeutic possibility of blocking cytokine-induced

neutrophil chemoattractant on transient ischemic brain damage in rats. **Brain Research**, v. 759, n. 1, p. 103-111, 1997.

YILMAZ, G.; GRANGER, D. N. Leukocyte recruitment and ischemic brain injury. **Neuromolecular Medicine**, v. 12, n. 2, p. 193-204, 2010.

YU, S. J.; SONCINI, M.; KANEKO, Y.; HESS, D. C.; PAROLINI, O.; BORLONGAN, C. V. Amnion: a potent graft source for cell therapy in stroke. **Cell Transplantation**, v. 18, n. 2, p. 111-118, 2009.

ZHANG, R.; CHOPP, M.; LI, Y.; ZALOGA, C.; JIANG, N.; JONES, M.; MIYASAKA, M.; WARD, P. Anti-ICAM-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. **Neurology**, v. 44, n. 9, p. 1747-1747, 1994.

ZHANG, R.; LIU, Y.; YAN, K.; CHEN, L.; CHEN, X.-R.; LI, P.; CHEN, F.-F.; JIANG, X.-D. Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cell transplantation in experimental traumatic brain injury. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10, n. 1, p. 106, 2013.

ZHANG, R. L.; CHOPP, M.; JIANG, N.; TANG, W. X.; PROSTAK, J.; MANNING, A. M.; ANDERSON, D. C. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rat. **Stroke**, v. 26, n. 8, p. 1438-1443, 1995.

ZHANG, X.-M.; DU, F.; YANG, D.; WANG, R.; YU, C.-J.; HUANG, X.-N.; HU, H.-Y.; LIU, W.; FU, J. Granulocyte colony-stimulating factor increases the therapeutic efficacy of bone marrow mononuclear cell transplantation in cerebral ischemia in mice. **BMC Neuroscience**, v. 12, n. 1, p. 61, 2011.

8. ANEXO

Artigo **“Effect of age and gender on recovery after stroke in rats treated with bone marrow mononuclear cells”** publicado na revista Neuroscience Research.