

**Neuroproteção mediada pelo Fator Estimulador de  
Colônias de Granulócitos (G-CSF) em modelo de  
isquemia cerebral global de camundongos  
hipercolesterolêmicos**

**Brunelli da Rós Peruch**

**Dissertação de Mestrado em Bioquímica e Farmacologia**

**Universidade Federal do Espírito Santo**

**Vitória, Fevereiro de 2015**

**Brunelli da Rós Peruch**

**Neuroproteção mediada pelo Fator Estimulador  
de Colônias de Granulócitos (G-CSF) em modelo  
de isquemia cerebral global de camundongos  
hipercolesterolêmicos.**

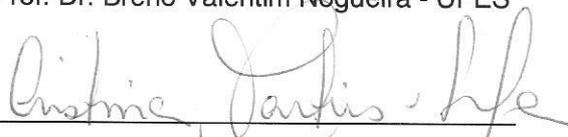
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Farmacologia na área de concentração Farmacologia Bioquímica e Molecular.

Aprovado em 26 de fevereiro de 2015.

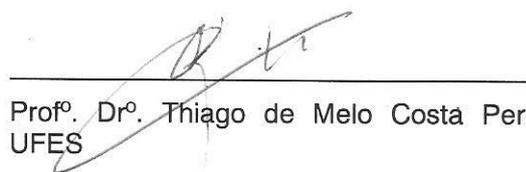
**COMISSÃO EXAMINADORA**



Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira - UFES



Profª. Drª. Cristina Martins e Silva - UFES



Profº. Drº. Thiago de Melo Costa Pereira - UFES

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

P471n Peruch, Brunelli da Rós, 1988-  
Neuroproteção mediada pelo Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (G-CSF) em modelo de isquemia cerebral global de camundongos hipercolesterolêmicos / Brunelli da Rós Peruch – 2015.  
73 f. : il.

Orientador: Breno Valentim Nogueira.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) –  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Isquemia Cerebral. 2. Crescimento Celular. 3. Estresse Oxidativo. 4. Hipercolesterolemia. I. Nogueira, Breno Valentim. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

---

Mas em todas estas coisas somos mais que vencedores por meio daquele que nos amou. (Romanos 8:37)

## DEDICATÓRIA

Aos meus queridos e amados pais, Ana e José, pela oportunidade da vida, dos estudos, da formação, pela base e pelo apoio em toda e qualquer decisão.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ser meu refúgio em todos os momentos desta grande caminhada, por atender às minhas preces, me dar forças, me dar paz e por abençoar a minha vida profissional.

A minha família, pais e irmã, pela base sólida que são e pelo porto seguro.

Ao Professor Dr. Breno Valentim Nogueira que me orientou na realização deste trabalho.

As alunas de iniciação científica Rafaela Aires (agora mestranda) e Brenna Lepaus Monteiro pelos treinamentos no início dos trabalhos e auxílio na realização de algumas etapas do estudo.

A professora Silvana Meyrelles e ao Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular (LTCC) por ceder os animais *knockout* utilizados neste estudo, e a Marcella L. Porto, aluna de doutorado deste laboratório, pela colaboração na realização do ensaio para o estresse oxidativo plasmático (AOPP).

Aos colegas das primeira e segunda turmas de mestrado deste programa de pós-graduação que tão companheiros foram durante o cumprimento dos créditos de disciplinas, a Flávia, Carol, Alexandre, Rafaela, Lorena, Livia, Lorraine, Agihane e especialmente Juliana e Nadmy, amigas e confidentes.

A todos os colegas do Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins, o LUCCAR, Bárbara, Afrânio, Jairo, Wanderson, Tadeu, Flávia, Débora, Rayssa, professor Marco Cunegundes, Sueli e Hélio, pelo aprendizado, apoio técnico, companheirismo, diversão, convivência, aniversários e comemorações durante todo o tempo do mestrado. Ao longo de 2 anos passamos por uma bela transição que nos uniu ainda mais e ao final dessa jornada os considero uma família.

A FAPES pela concessão da bolsa de estudos durante o mestrado.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	18
1.1	Acidente Vascular Encefálico .....	18
1.2	Fatores de Crescimento Celular .....	24
1.2.1	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (G-CSF).....	25
1.3	Aterosclerose .....	28
1.3.1	Camundongos <i>knockout</i> para apolipoproteína E .....	31
2	JUSTIFICATIVA .....	34
3	OBJETIVOS .....	35
3.2	Objetivos Específicos.....	35
4	MÉTODOS .....	36
4.1	Animais Experimentais .....	36
4.2	Modelo de Isquemia Cerebral Global Bicarotídea (Bi-CCAo) .....	36
4.3	Mensuração da Força Muscular ( <i>Grip Force</i> ).....	37
4.4	Contagem de Leucócitos .....	38
4.5	Dosagem de Colesterol Plasmático .....	39
4.6	Análise Macroscópica das Áreas de Infarto Cerebral .....	39
4.7	Processamento e Corte Histológico .....	40
4.8	Coloração Hematoxilina e Eosina .....	40
4.9	Imunohistoquímica (IHQ) .....	41
4.10	Ensaio Morte Celular (TUNEL).....	42
4.11	Concentração Plasmática dos <i>Advanced Oxidation Protein Products</i> (AOPP) .....	43
4.12	Análise Estatística .....	44
5	RESULTADOS .....	45
5.1	Força Muscular .....	45
5.2	Relação Peso úmido Baço/Peso Corporal.....	45

<b>5.3 Contagem de Leucócitos Totais Sanguíneos .....</b>	<b>46</b>
<b>5.4 Dosagem Colesterol Total Plasmático .....</b>	<b>47</b>
<b>5.5 Estresse Oxidativo Plasmático.....</b>	<b>47</b>
<b>5.6 Área macroscópica de infarto cerebral.....</b>	<b>48</b>
<b>5.8 Neurônios marcados por imunohistoquímica.....</b>	<b>50</b>
<b>5.9 Receptores de G-CSF (G-CSF-R) marcados por imunohistoquímica .....</b>	<b>52</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>64</b>
<b>9. ANEXO .....</b>	<b>73</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Principais causas de óbitos por faixa etária no Espírito Santo no ano de 2012.....	19
<b>Figura 2.</b> Esquema representando as vias patofisiológicas da isquemia cerebral...	22
<b>Figura 3.</b> Cascata de sinalização do receptor do G-CSF.....	27
<b>Figura 4.</b> Fases de desenvolvimento da lesão aterosclerótica.....	30
<b>Figura 5.</b> Níveis plasmáticos de Colesterol Total, HDL Colesterol e Triglicerídeos em camundongos ApoE <i>knockout</i> heterozigotos e homozigotos .....	32
<b>Figura 6.</b> Representação dos sítios de predileção (indicados em preto no lúmen) para o desenvolvimento da lesão aterosclerótica ao longo da árvore arterial.....	33
<b>Figura 7:</b> Demonstração do animal em decúbito dorsal com as artérias carótidas comuns direita e esquerda isoladas e ocluídas.....	37
<b>Figura 8:</b> Demonstração do teste de força ao qual os animais foram submetidos mostrando o agarre das patas dianteiras ao aparato e gráfico do registro dos picos pelo software.....	38
<b>Figura 9:</b> Reações enzimáticas através das quais o colesterol plasmático é quantificado.....	39
<b>Figura 10.</b> Mensuração da força muscular ( <i>grip force</i> ) em “g” .....	45
<b>Figura 11.</b> Relação Peso úmido do baço/Peso do animal em gramas (g) .....	46

<b>Figura 12.</b> Contagem de leucócitos em células por mm <sup>3</sup> .....	46
<b>Figura 13.</b> Dosagem de colesterol total plasmático em mg/dL .....	47
<b>Figura 14.</b> Concentração plasmática dos produtos de oxidação proteica (AOPP) em μM C-T/mg proteína .....	48
<b>Figura 15. A.</b> Cérebro corado com trifetil tetrazólio com área pronunciada de infarto (setas), animal do grupo controle. <b>B.</b> Cérebro corado com trifetil tetrazólio com pequena área de penumbra (seta), animal do grupo tratado com 100μg/kg/dia.....	48
<b>Figura 16.</b> Tamanho da área macroscópica de infarto cerebral em cm <sup>2</sup> .....	49
<b>Figura 17.</b> Ensaio do TUNEL para morte celular. <b>A.</b> controle negativo sem marcação para células em morte. <b>B.</b> Grupo controle ApoE <sup>-/-</sup> que recebeu solução glicosada 5%, com numerosas células em morte marcadas (setas). <b>C.</b> Grupo ApoE <sup>-/-</sup> tratado com G-CSF na dose de 100μg/kg/dia com algumas células em morte marcadas (setas). <b>D.</b> Representação quantitativa da relação entre o número de células positivas (marcadas) e o número de células negativas (não marcadas) para o TUNEL.....	50
<b>Figura 18. A.</b> Corte histológico de região do córtex cerebral corado por hematoxilina e eosina com presença de neurônios (setas) e células da glia. <b>B.</b> Corte histológico de região do córtex cerebral mostrando neurônios (em marrom) marcados através da imunohistoquímica com utilização do anticorpo Anti-NeuN. Magnificação 40x. Barra de escala: 10μm. <b>C.</b> Relação entre número de neurônios marcados (células NeuN positivas) e o número de células não marcadas .....	51
<b>Figura 19. A.</b> Corte histológico de região do córtex cerebral mostrando marcação de receptores de G-CSF (setas) (G-CSF-R ou CD114) presente em células da glia e neurônios. Magnificação 40x. Barra de escala: 10μm. <b>B.</b> Número de células CD114 (G-CSF-R) positivas .....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP: Adenosina Difosfato.

AIT: Ataque Isquêmico Transitório.

ANOVA: Análise de Variância.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

AOPP: Produtos Avançados de Oxidação Proteica (*Advanced Oxidation Protein Products*).

ApoB: Apolipoproteína B.

ApoE: Apolipoproteína E.

ApoE <sup>-/-</sup>: Apolipoproteína E *knockout*.

ATP: Adenosina Trifosfato.

AVC: Acidente Vascular Cerebral.

AVE: Acidente Vascular Encefálico.

BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain-Derived Neurotrophic Fator*).

BHE: Barreira Hematoencefálica.

BiCCAo: Oclusão Bilateral das Artérias Carótidas Comuns (*Bilateral Common Carotid Artery Occlusion*).

CAT: Catalase.

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais.

CID 10: Classificação Internacional de Doenças.

CML: Células Musculares Lisas.

CO<sub>2</sub>: Dióxido de Carbono ou Gás Carbônico.

CR: Remanescente de Quilomicron (*Chylomicron Remnants*).

DAB: *Diaminobenzidine*.

DATASUS: Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde.

DG: Giro Denteado.

EDRF: Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio (*Endothelium Derived Relaxing Factor*).

EMESCAM: Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória.

EPM: Erro Padrão da Média.

EPO: Eritropoetina.

ERK: Quinase Regulada por Sinal Extracelular (*Extracellular-Signal-Regulated Kinase*).

FDA: *Food and Drug Administration*.

G-CSF: Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos.

G-CSF-R: Receptor do Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos.

GM-CSF: Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos.

GSH: Glutathiona.

GSHPx: Glutathiona Peroxidase.

GSSG-R: Glutathiona Redutase.

HDL: Lipoproteína de Alta Densidade (*High Density Lipoprotein*).

HE: Hematoxilina e Eosina.

IDL: Lipoproteína de Densidade Intermediária (*Intermediate-Density Lipoprotein*).

IHQ: Imunohistoquímica.

IL-1: Interleucina 1.

IL-4: Interleucina 4.

JAK: Janus Kinase.

LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade (*Low Density Lipoprotein*).

LDLR: Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade.

LTCC: Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular.

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*.

NESIS/ES: Núcleo Especial de Sistemas de Informação em Saúde do Espírito Santo.

nNOS: Óxido Nítrico Sintase Neuronal.

NO: Óxido Nítrico.

OMS: Organização Mundial da Saúde.

PA: Puro para análise.

PBS: Tampão fosfato (*Phosphate Buffer Solution*).

PI3K/Akt: phosphatidylinositol 3' -kinase/Protein kinase B.

RNS: Espécies Reativas de Nitrogênio.

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio.

SCF: Fator de Células Estaminais.

SNC: Sistema Nervoso Central.

SOD: Superóxido Dismutase.

STAT: Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição (*Signal Transducer and Activator of Transcription*).

TI: Tolerância Isquêmica.

TNF: Fator de Necrose Tumoral.

tPA: Fator Ativador do Plasminogênio Tecidual.

TTC: cloreto de 2,3,5 – trifeniltetrazólio.

TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUtp Nick End Labeling*.

Tyr: Tirosina.

VLDL: Lipoproteína de Muito Baixa Densidade (*Very Low Density Lipoprotein*).

XO: Xantina Oxidase.

ZSN: Zona Subventricular.

## RESUMO

**Introdução.** O acidente vascular encefálico (AVE) é classicamente caracterizado como um déficit neurológico atribuído a uma lesão focal aguda do sistema nervoso central (SNC), por causa vascular, sendo uma das principais causas de invalidez e morte mundial. De todos os casos, 87% são de origem isquêmica. Os principais fatores de risco associados são idade, raça, aterosclerose, hiperlipidemia, tabagismo e outros. Até a presente data a terapia medicamentosa aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento do AVE isquêmico agudo é a utilização da classe dos agentes trombolíticos ativadores da fibrinólise. Várias citocinas parecem desempenhar um papel na neurogênese e/ou regeneração neuronal. Recentemente, estudos demonstraram que o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) possui efeitos neuroprotetores em camundongos submetidos à isquemia cerebral, porém seus efeitos frente ao aumento do estresse oxidativo e à hipercolesterolemia/aterosclerose, uma das principais causas de AVE, ainda é desconhecido e foi o objeto deste estudo. **Métodos.** Foram utilizados camundongos *knockout* para a apolipoproteína E (ApoE<sup>-/-</sup>) e C57BL/6 machos, adultos jovens, com idade variando entre 12-14 semanas e pesando em média 28 g divididos em três grupos: controle ApoE<sup>-/-</sup>, tratado G-CSF ApoE<sup>-/-</sup> e controle C57BL/6. Todos os animais foram submetidos a oclusão das artérias carótidas comuns direita (temporária) e esquerda (permanente) seguida de administração de solução glicosada 5% (controles) e G-CSF 100µg/kg/dia (tratado) logo após e 24h depois da cirurgia. No terceiro dia após a oclusão os animais foram sacrificados e foi obtido o peso úmido do baço, coletada amostra de sangue e extraído o cérebro. As comparações estatísticas foram realizadas por teste *t* de Student e ANOVA de 1 via, seguida do *post hoc* de Fisher. **Resultados e Discussão.** A contagem de leucócitos circulantes no grupo G-CSF ApoE<sup>-/-</sup> apresentou-se estatisticamente superior (6661±1059 céls/mm<sup>3</sup>) quando comparado ao grupo controle ApoE<sup>-/-</sup> (4044±610 céls/mm<sup>3</sup>) e ao grupo controle C57BL/6 (3965±409 céls/mm<sup>3</sup>) evidenciando o efeito sistêmico do G-CSF no recrutamento e maturação de granulócitos sanguíneos. Na dosagem do colesterol total plasmático o G-CSF não reverteu a hipercolesterolemia dos animais ApoE<sup>-/-</sup>. A área macroscópica de infarto cerebral foi significativamente menor no grupo ApoE<sup>-/-</sup> tratado com G-CSF (0,03±0,01 cm<sup>2</sup>) quando comparado

com o grupo ApoE<sup>-/-</sup> controle (0,18±0,03 cm<sup>2</sup>). Observou-se ainda diferença significativa quando comparamos a área de infarto do grupo controle C57BL/6 (0,08±0,02 cm<sup>2</sup>) com o grupo controle ApoE<sup>-/-</sup>. A força muscular, medida através do teste do agarre (*grip force*), estava significativamente diminuída nos animais controle ApoE<sup>-/-</sup> 48h pós-cirurgia quando comparados aos controles pré-cirúrgicos (de 97,9±9,8g para 70,69±10,62g), enquanto que no grupo G-CSF ApoE<sup>-/-</sup> a força registrada antes da cirurgia foi preservada no pós-cirúrgico. No ensaio para o estresse oxidativo plasmático o tratamento com G-CSF não alterou os parâmetros nos grupos ApoE<sup>-/-</sup> (controle = 23,76 ± 3,36 vs G-CSF = 23,0 ± 3,20 μMC-T/mg) que estavam estatisticamente aumentados quando comparados ao grupo controle C57BL/6 (3,97 ±1,22 μMC-T/mg). O teste do TUNEL (*TdT-mediated-dUtp Nick End Labeling*), para evidenciar a morte celular tecidual mostrou relação de células positivas/negativas menor no grupo tratado ApoE<sup>-/-</sup> quando comparado ao grupo controle ApoE<sup>-/-</sup>. A imunomarcação de neurônios e receptores de G-CSF mostrou estímulo a sobrevivência neuronal e maior presença de receptores no grupo tratado quando comparado ao controle. **Conclusão.** Nossos achados estão de acordo com a literatura e contribuem para evidenciar o efeito neuroprotetor do G-CSF, fortemente ligado a propriedade antiapoptótica, em modelo de isquemia cerebral global mesmo na presença do principal fator de risco para o AVE, a aterosclerose/hipercolesterolemia, e do aumento do estresse oxidativo.

**Palavras chave:** Isquemia Cerebral, Fatores de Crescimento Celular, Estresse Oxidativo.

## **ABSTRACT**

**Introduction.** The stroke is classically characterized as a neurological deficit attributed to an acute focal lesion of the central nervous system (CNS), for vascular cause, and a major cause of disability and death worldwide. In all cases, 87% are ischemic. The main risk factors are age, race, atherosclerosis, hyperlipidemia, smoking, and others. To date drug therapy approved by the National Health Surveillance Agency (ANVISA) and the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of acute ischemic stroke is the use of the class of thrombolytic agents activators of fibrinolysis. Several cytokines appear to play a role in neurogenesis and /or neuronal regeneration. Recent studies have demonstrated that granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) has neuroprotective effects in mice subjected to cerebral ischemia, but its effects opposite to increased oxidative stress and hypercholesterolemia/atherosclerosis, a major cause of stroke, although is unknown and was the object of this study. **Methods.** Were used apolipoprotein E knockout (ApoE<sup>-/-</sup>) and C57BL/6 mice, male, young adults, aged between 12-14 weeks and weighing on average 28 g divided into three groups: control ApoE<sup>-/-</sup>, treated G-CSF ApoE<sup>-/-</sup> and control C57BL/6. All animals underwent occlusion of common carotid arteries (temporary) and left (standing) then administration of glucose solution 5% (controls) and G-CSF 100µg/kg/day (treated) just after and 24 hours following surgery. On the third day after occlusion the animals were sacrificed and the wet weight was obtained from the spleen, blood sample collected and extracted the brain. Statistical comparisons were performed by test t Student's and ANOVA 1 way, followed by Fisher's post hoc. **Results and discussion.** The count of circulating leukocytes in the G-CSF ApoE<sup>-/-</sup> group was statistically higher (6661 ± 1059 cells/mm<sup>3</sup>) compared to the control ApoE<sup>-/-</sup> group (4044 ± 610 cells/mm<sup>3</sup>) and the control C57BL/6 group (3965 ± 409 cells/mm<sup>3</sup>) highlighting the systemic effect of G-CSF in the recruitment and maturation of blood granulocytes. In the measurement of plasma total cholesterol G-CSF did not reverse the hypercholesterolemia in ApoE<sup>-/-</sup> animals. The macroscopic area of cerebral infarction was significantly lower in group ApoE<sup>-/-</sup> treated with G-CSF (0.03 ± 0.01 cm<sup>2</sup>) compared with the group ApoE<sup>-/-</sup> control (0.18 ± 0.03 cm<sup>2</sup>). There was also significant difference in the infarcted area of control C57BL/6 group (0.08 ± 0.02 cm<sup>2</sup>) with the control ApoE<sup>-/-</sup> group. Muscle strength,

measured by the grip test, was significantly reduced in ApoE<sup>-/-</sup> control animals 48 hours after surgery compared to preoperative controls (97.9 ± 9.8g for 70.69 ± 10,62g), while the group G-CSF ApoE<sup>-/-</sup> force recorded before surgery was preserved after surgery. In the assay for oxidative stress plasma treatment with G-CSF did not change the group parameters in ApoE<sup>-/-</sup> (control = 23,76±3,36 vs G-CSF = 23,0±3,20 μMC-T/mg) which was statistically increased compared to the C57BL/6 control group (3.97 ± 1.22 μMC-T/mg). The test TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling), to show the tissue cell death was related to positive cells/negative less in the group treated ApoE<sup>-/-</sup> as compared to the control group ApoE<sup>-/-</sup>. The immunostaining of neurons and G-CSF receptor showed stimulation for neuronal survival and increased presence of receptors in the treated group compared to the control. **Conclusion.** Our findings are in agreement with the literature and contribute to highlight the neuroprotective effect of G-CSF, strongly linked to antiapoptotic property in global cerebral ischemia model even in the presence of the major risk factor for stroke, atherosclerosis/hypercholesterolemia, and of increased oxidative stress.

**Keywords:** *Cerebral Ischemia, Cell Growth Factors, Oxidative Stress.*

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Acidente Vascular Encefálico

O acidente vascular encefálico (AVE) é classicamente caracterizado como um déficit neurológico atribuído a uma lesão focal aguda do sistema nervoso central (SNC), sendo considerado uma das principais causas de invalidez e morte no mundo (SACCO et al., 2013). Em números, o AVE representa a segunda principal causa de morte mundial sendo responsável por 6,7 milhões dos óbitos, 11,9% do total computado (CHOLLET et al., 2014; WHO, 2012). De todos os casos de AVE, 87% são de origem isquêmica, 10% são decorrentes de hemorragias intracerebrais e 3% de hemorragias subaracnóides (GO et al., 2014).

Os principais fatores de risco a ele associados são a idade, raça, histórico familiar, hipertensão arterial, diabetes mellitus, aterosclerose, arritmias cardíacas, próteses valvares, hiperlipidemia, tabagismo e outros (drogas ou hormônios, por exemplo). Os sintomas mais comuns, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), são fraqueza súbita da face, braço ou pernas - mais frequentemente de um lado do corpo - confusão, dificuldade de falar ou de entender a fala, de enxergar e de caminhar (CHIBA e UMEGAKI, 2013; ZHAO et al., 2013; ALBERTSON e SHARMA, 2014).

Com base nas informações do DATASUS, em 2009, o AVE representou 1,5% das 11.509.485 internações hospitalares registradas no Sistema Único de Saúde (PORTARIA N<sup>o</sup> 664, DE 12 DE ABRIL DE 2012 DO MINISTÉRIO DA SAÚDE). Ainda segundo o DATASUS, o ano de 2012 as doenças cerebrovasculares foram responsáveis por 100.194 óbitos do total de 1.181.166 registrados no ano.

O perfil epidemiológico de saúde do Espírito Santo de 2012 mostra que as doenças do aparelho circulatório, capítulo do código internacional de doenças (CID 10) no qual as doenças cerebrovasculares estão incluídas, configuram a segunda maior causa de óbitos na faixa etária de 20 a 59 anos e a primeira a partir dos 60 anos (Figura 1), o que também representa um grave problema na saúde pública capixaba

(NESIS/ES, 2012). Mesmo que sabidamente o representante de maior peso sobre a mortalidade dessa classe seja as doenças cardiovasculares, as doenças cerebrovasculares têm também grande impacto e contribuição para estes números visto a epidemiologia nacional e mundial.

## Principais causas de óbitos por faixa etária, ES – 2012

Faixa Etária	Colocação	Capítulos CID - 10	Nº de óbitos	%
10 a 19 anos	1º	Causas externas (acidentes,homicídios e suicídios)		78,45%
	2º	Neoplasias (tumores)		4,11%
	3º	Doenças do sistema nervoso	682	3,37%
	4º	Doenças do aparelho respiratório		3,23%
	5º	Algumas doenças infecciosas e parasitárias		1,61%
20 a 59 anos	1º	Causas externas (acidentes,homicídios e suicídios)		35,46%
	2º	Doenças do aparelho circulatório		19,29%
	3º	Neoplasias (tumores)	7191	17,02%
	4º	Doenças do aparelho digestivo		6,08%
	5º	Algumas doenças infecciosas e parasitárias		4,94%
60 ou mais	1º	Doenças do aparelho circulatório		38,50%
	2º	Neoplasias (tumores)		18,80%
	3º	Doenças do aparelho respiratório	12573	13,08%
	4º	Doenças endócrinas nutricionais e metabólicas		7,47%
	5º	Causas externas (acidentes,homicídios e suicídios)		5,00%

**Figura 1.** Principais causas de óbitos por faixa etária no Espírito Santo no ano de 2012. Fonte: (NESIS/ES, 2012)

No que tange à progressão patológica e ao tempo após o início, o AVE pode ser classificado em três fases: agudo, subagudo e crônico. Embora a duração das três seja dependente da localização, do tamanho do infarto cerebral e da idade dos pacientes, em geral, a aguda está compreendida nas primeiras 48 horas após o início do AVE; a subaguda, de 48 h ou até 6 semanas a 3 meses pós-AVE; enquanto a crônica varia de 3 a 6 meses após o AVE (ZHAO et al., 2013).

Os AVEs também podem ser classificados quanto a sua etiologia como hemorrágico ou isquêmico. A aterosclerose de pequenas e grandes artérias cerebrais é responsável pela maioria dos casos, seja hemorrágico ou isquêmico. Cerca de 20% dos AVEs são devidos a êmbolos cardiogênicos, mais comumente associados à fibrilação atrial intermitente. No entanto, após intensa investigação etiológica, pode-se concluir que cerca de 30% dos AVEs permanecem idiopáticos (DONNAN et al., 2008; ALBERS et al., 2008).

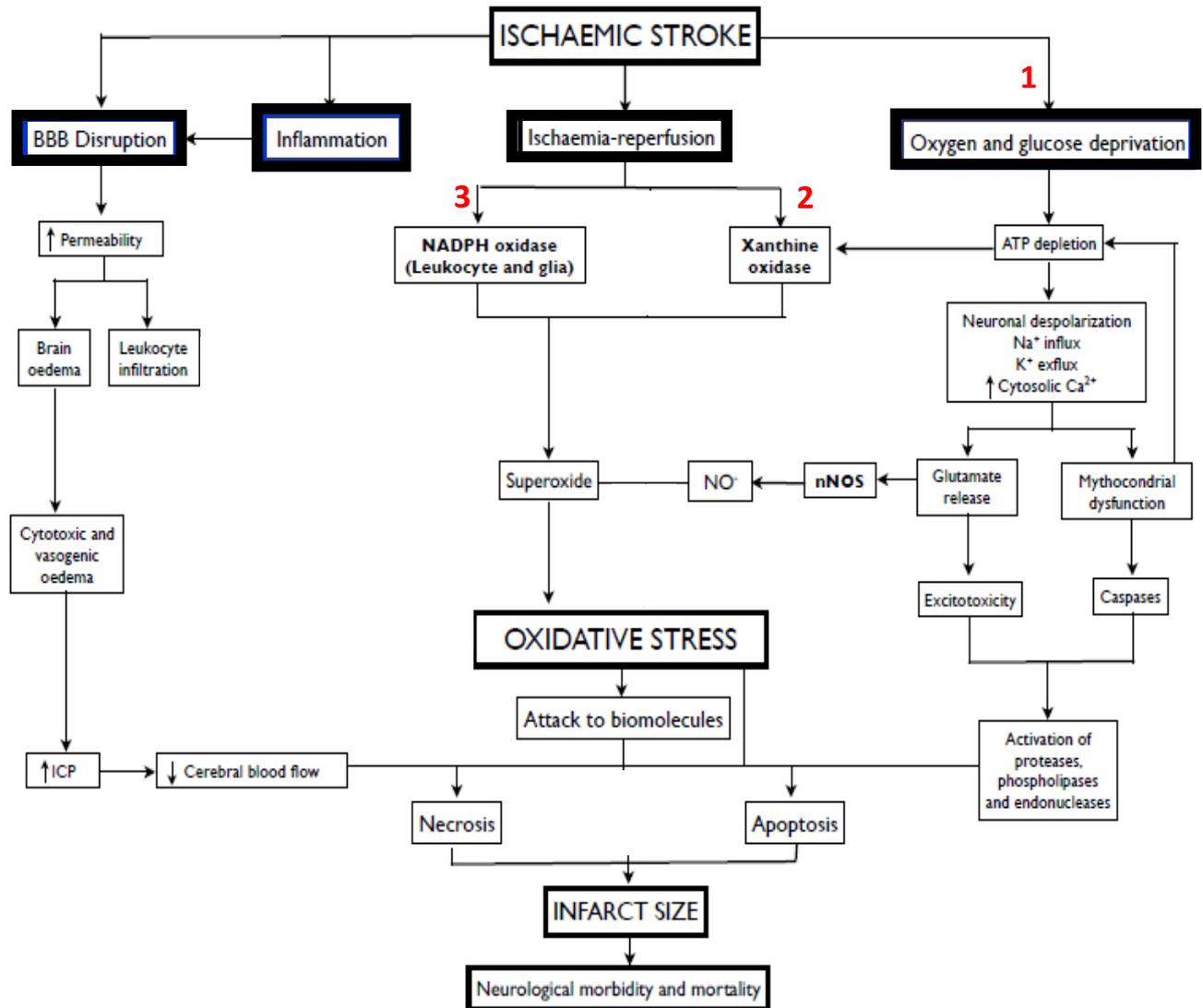
As causas mais comuns de isquemia cerebral são a hipoperfusão global, a trombose e o tromboembolismo, sendo que essas duas últimas dão origem à oclusão de artérias. Se o fornecimento de sangue é espontaneamente restaurado, e os sintomas neurológicos recuperados completamente, o episódio é convencionalmente denominado um ataque isquêmico transitório (AIT). De outro lado, se o fluxo de sangue não é rapidamente restaurado há um risco de infarto do tecido cerebral com danos permanentes associados e persistente disfunção neurológica, evento comumente chamado de acidente vascular cerebral, sendo a maior parte dos casos do tipo isquêmico (FLYNN, MACWALTER e DONEY, 2008; RODRIGO et al., 2013; ALBERTSON e SHARMA, 2014).

Sabe-se que o cérebro é altamente vulnerável à isquemia. Em parte, a vulnerabilidade do tecido cerebral à isquemia reflete suas altas exigências metabólicas com uma demanda relativamente alta de produção de energia e dependente quase que exclusivamente da fosforilação oxidativa para isso. Embora o peso do cérebro humano represente apenas cerca de 2% do peso corporal total, esse órgão tem uma elevada atividade metabólica e utiliza 20% de oxigênio e 25% de glicose consumida por todo o corpo. O bom funcionamento das células cerebrais depende de uma oferta abundante e contínua de oxigênio usado pela mitocôndria para gerar adenosina-5'-trifosfato (ATP). A energia no cérebro é principalmente formada quando a glicose é oxidada a gás carbônico (CO<sub>2</sub>) e água através da fosforilação oxidativa mitocondrial. No indivíduo em repouso, cerca de 40% da energia cerebral é usada para manter e restaurar gradientes iônicos da membrana celular; e ainda mais energia é usada durante atividades (BRETÓN; CÉSAR; RODRÍGUEZ, 2012).

A isquemia inicia uma cascata complexa de eventos metabólicos (Figura 2), muitos dos quais envolvem a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) que medeiam a maioria dos danos ocorridos na região de penumbra do infarto. A sequência de eventos começa no nível mitocondrial com uma diminuição crítica na atividade da cadeia de transporte de elétrons, com consequente esgotamento de ATP. Uma vez que a síntese de ATP mitocondrial é inibida pela isquemia global, o ATP é consumido dentro de minutos, causando despolarização da membrana plasmática neuronal, vazamento de potássio ( $K^+$ ) para o espaço extracelular e de sódio ( $Na^+$ ) para o interior das células. Essa deficiência bioenergética também impede a  $Ca^{2+}$ -ATPase da membrana plasmática de manter a baixa concentração normal de  $Ca^{2+}$  citosólico (RODRIGO et al., 2013).

Logo em seguida à cessação do fluxo de sangue, a rápida interrupção do metabolismo local causa um grande aumento na atividade neuronal e maior liberação de glutamato. Após a isquemia cerebral, a liberação neuronal de glutamato ativa vários receptores pré e pós-sinápticos, resultando em influxo de  $Ca^{2+}$ , levando a lesão excitotóxica. Além disso, a elevada concentração extracelular de glutamato pode ativar a NO sintase neuronal (nNOS) como um resultado de influxo de  $Ca^{2+}$ . Altos níveis de  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  e adenosina difosfato (ADP) podem também conduzir à disfunção das mitocôndrias e geração de ROS e RNS, além de ativação de proteases, fosfolipases, e endonucleases que conduzem à morte celular (GYENGESI; PAXINOS; ANDREWS, 2012; RODRIGO et al., 2013; SILBERMAN et al., 2010).

A isquemia cerebral também é seguida por uma reação inflamatória no tecido afetado, o que pode continuar por dias ou semanas após o evento. É amplamente aceito que tais processos inflamatórios contribuem para a progressão da lesão isquêmica cerebral e para a exacerbação dos déficits neurológicos focais. Porém, por outro lado, a inflamação pós-isquêmica também demonstrou efeitos benéficos como, por exemplo, no contexto de tolerância isquêmica (TI) e da reparação de tecidos. A TI no cérebro é um fenômeno transitório do aumento da resistência a um desafio isquêmico letal resultante de um estímulo nocivo subletal aplicado em tempo hábil antes do estímulo letal (KUNZ; DIRNAGL; MERGENTHALER, 2010).



**Figura 2.** Esquema representando as vias patofisiológicas da isquemia cerebral. A lesão isquêmica leva a desestabilização da barreira hematoencefálica, inflamação e estresse oxidativo, neste último proteínas, lipídios e DNA são atacados por espécies reativas de oxigênio (ROS). O estresse oxidativo leva à ativação de vias de apoptose e necrose as quais determinam o tamanho final da área de infarto. Três fases distintas de geração de ROS que ocorrem temporalmente foram identificadas em cultura de células .1: ocorre durante a privação de oxigênio e glicose a qual inibe o complexo IV da cadeia respiratória causando acumulação dos produtos intermediários reduzidos o que permite fuga de elétrons para gerar ROS.2: o segundo pico da ROS ocorre aproximadamente 25-35 minutos após a isquemia como resultado da ativação da xantina oxidase (XO) e é evidenciado pela forte diminuição nos níveis de ROS após exposição a oxipurinol e alopurinol, inibidores desta enzima. A depleção de ATP intracelular, passo anterior a esse, é necessária uma vez que conduz à conversão de nucleotídeos de adenina em hipoxantina e xantina, substratos para XO. 3: A restauração rápida de fluxo sanguíneo aumenta o nível de oxigenação do tecido, conduzindo a terceira fase da geração de ROS, com ativação da NADPH oxidase, que é o principal contribuinte para lesão de reperusão. Fonte: (RODRIGO et al., 2013 adaptado).

Até a presente data, a terapia medicamentosa aprovada pela ANVISA e pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento do AVE isquêmico agudo é a utilização da classe dos agentes trombolíticos ativadores da fibrinólise. A trombólise intravenosa, com ativador do plasminogênio tecidual recombinante (rtPA), é a maneira mais rápida para iniciar o tratamento de reperfusão aguda. O tPA é uma serina protease a qual catalisa a conversão de plasminogênio em plasmina que, em seguida, atua na degradação do coágulo sanguíneo, produzido no AVE isquêmico, em produtos de fibrina. Para ser eficaz, o rtPA deve ser administrado por via intravenosa dentro das primeiras 3-4,5h após o início dos sintomas, devido ao risco de transformação hemorrágica. Nos Estados Unidos, apenas cerca de 2% dos pacientes com AVE se beneficiam do acesso precoce à trombólise, a maioria dos doentes são submetidos a tratamento alternativo (BALDWIN et al., 2010; RODRIGO et al., 2013; WANG et al., 2014).

A seleção para utilização do tratamento trombolítico exige a presença de um déficit neurológico incapacitante, exclusão de sangramento (através de tomografia computadorizada do crânio) e determinação do tempo do início dos sintomas. No entanto, apenas uma minoria de pacientes com AVE chega ao serviço de saúde com estas informações, bem como a tempo de serem elegíveis para receber o referido tratamento. Além disso, devido ao risco de transformação hemorrágica se faz necessário encontrar novos alvos terapêuticos que diminuam o risco e aumentem o tempo de janela terapêutica do rtPA, protegendo o cérebro dos danos isquêmicos (TSIVGOULIS; KATSANOS; ALEXANDROV, 2014; WANG et al., 2014).

Inúmeras estratégias neuroprotetoras visando mecanismos importantes, como a toxicidade do glutamato ou formação de radicais livres, falharam devido à falta de eficácia ou efeitos colaterais intoleráveis. A recuperação das funções e melhoria das atividades da vida diária específicas são causadas por alterações intrínsecas nos neurônios, em redes já existentes ou pela geração de novos neurônios a partir de células progenitoras. Relativamente a este último, a estimulação da neurogênese no cérebro pós-isquêmico agora parece ser uma estratégia atrativa. As células progenitoras neurais que residem no cérebro adulto podem, efetivamente, iniciar uma resposta compensatória a eventos isquêmicos, o que resulta na produção de novos neurônios. Vários agentes de grande promessa estão atualmente em estágios

da pesquisa clínica e podem surgir na prática rotineira em um futuro próximo (SAHOTA E SAVITZ, 2011; SCHNEIDER ET AL., 2005).

Algumas citocinas parecem desempenhar um papel na neurogênese e/ou proteção neuronal. Tratamentos utilizando-as proporcionam uma nova estratégia terapêutica para doenças neurológicas. Muitas citocinas hematopoiéticas influenciam na proliferação de células precursoras neurais com relatos de que estas últimas possuem receptores do tipo c-kit, que é o receptor para uma das principais citocinas hematopoiéticas, o fator de células estaminais (SCF) que estimula a neurogênese *in vivo* além de receptores para outra citocina hematopoiética, o G-CSF (KAWADA et al., 2006).

## **1.2 Fatores de Crescimento Celular**

Fatores de crescimento celular são polipeptídeos essencialmente envolvidos na regulação da sobrevivência, da proliferação, da maturação e crescimento de células em desenvolvimento. Muitos fatores exibem efeitos neuroprotetores e neurotróficos endógenos. Tais efeitos também foram relatados com administração exógena de fatores de crescimento após trauma cerebral e AVE. Após a ligação dos fatores de crescimento aos receptores de membrana de alta afinidade, os efeitos destes são mediados pela ativação de uma série de cinases que se translocam para o núcleo para fosforilar fatores de transcrição. As células, em seguida, podem ser induzidas a crescer e diferenciar ou para obter suporte trófico suficiente para sobreviver (SCHÄBITZ et al., 2003).

Uma das principais limitações das estratégias neuroprotetoras para o AVE é a curta janela terapêutica durante a qual a intervenção pode ser útil. As terapias que podem ser iniciadas após o início dos sintomas têm, portanto, valor considerável. Um tratamento alternativo eficaz pode estar na utilização de vias que têm a morte neuronal isquêmica como alvo. Fatores de crescimento celular encontram-se entre as moléculas que interagem com tais passos. Por esta e outras razões, têm recebido atenção considerável na busca por terapias contra doenças neurodegenerativas, e também contra o AVE (GREENBERG e JIN, 2006).

Muitos fatores de crescimento e seus receptores são expressos no cérebro, e a *upregulation* destes fatores e dos seus receptores ocorrem após lesão cerebral ou isquemia. Vários destes fatores parecem ter efeitos benéficos para a sobrevivência e proteção dos neurônios promovendo ainda crescimento neural, formação de sinapses e neurogênese (REN e FINKLESTEIN, 2005).

Na neurogênese endógena, os fatores de crescimento induzem a proliferação e a diferenciação de células tronco neuronais adultas em neurônios maduros, da zona subventricular (ZSV) dos ventrículos laterais e da zona subgranular do giro denteado (DG) do hipocampo, em modelos animais e humanos. Esses resultados sugerem que a terapia com fatores de crescimento poderia representar uma alternativa terapêutica para promover a migração e diferenciação e melhorar a sobrevivência de células tronco por modulação da neurogênese (LANFRANCONI et al., 2011; MINNERUP; SEVIMLI; SCHÄBITZ, 2009).

Estudos experimentais mostram também que fatores de crescimento hematopoiéticos (G-CSF, Eritropoetina, GM-CSF e etc.) podem interferir na evolução do AVE através de seus efeitos pleiotrópicos que incluem, além da neurogênese, a promoção de angiogênese e a ativação de vias antiapoptóticas. A maioria desses fatores atua através da ligação a receptores específicos, ativando diferentes vias de sinalização e induzindo a expressão de genes envolvidos na proliferação e diferenciação celular. Por exemplo, a ativação da proteína cinase, ativada por mitógeno (MAPK), em resposta a ligação no receptor, promove a proliferação, ao passo que a estimulação da via PI3K/AKT, principalmente, inibe vias apoptóticas. Assim, a resposta específica para fatores de crescimento é influenciada pela expressão de seus receptores correspondentes nas células-alvo (LANFRANCONI et al., 2011).

### 1.2.1 Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (G-CSF)

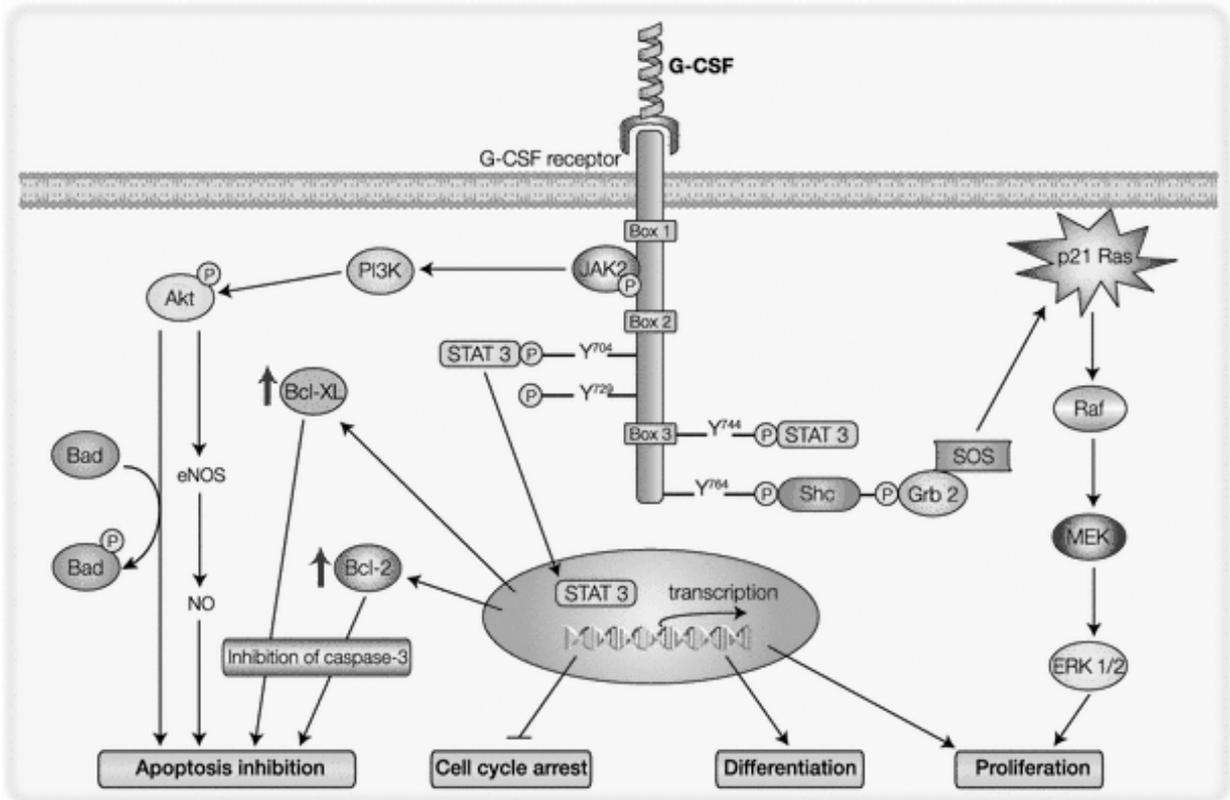
O G-CSF é uma glicoproteína de 19,6 kDa codificada por um único gene localizado no cromossomo 17q11-12. Esse fator é produzido, principalmente, por monócitos

ativados em resposta a citocinas inflamatórias, mas também por células endoteliais, fibroblastos, células mesoteliais e plaquetas. O fator de necrose tumoral (TNF), a interleucina 1 (IL-1), o fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF), a interleucina 4 (IL-4) e o lipopolissacarídeo bacteriano podem induzir a produção de G-CSF *in vitro*. As ações do G-CSF como um fator estimulante se dão depois da ligação ao seu receptor (G-CSFR), que é uma proteína de membrana que consiste em quatro domínios, uma porção extracelular e três porções intracelulares com diferentes níveis de conservação. O G-CSF-R é expresso não apenas por células hematopoiéticas (neutrófilos, plaquetas, linfócitos e monócitos), mas também por neurônios e células gliais (LANFRANCONI ET AL., 2011; SOLAROGLU ET AL., 2006).

A ligação do G-CSF ao G-CSFR ativa uma variedade de vias de sinalização intracelulares (Figura 3), incluindo as proteínas Janus cinases (JAK), os ativadores transcricionais (STATs), e as vias Ras/MAPK e PI3K/Akt. A ativação dessas vias medeia a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência de células que expressam o receptor. Os efeitos farmacológicos e o perfil de efeitos secundários do G-CSF são conhecidos uma vez que o G-CSF recombinante, um medicamento licenciado, é utilizado na prática clínica para o tratamento da neutropenia induzida pela quimioterapia em pacientes com câncer e para aumentar a mobilização de células tronco na medula óssea. O G-CSF endógeno desempenha um papel importante na resposta à isquemia cerebral e a administração de G-CSF em modelos animais de AVE está associado com redução do volume de infarto, diminuição da mortalidade e melhora nos resultados clínicos (LANFRANCONI ET AL., 2011; MINNERUP; SEVIMLI; SCHÄBITZ, 2009).

Um pré-requisito para uma ação direta de G-CSF no cérebro seria a penetração pela barreira hematoencefálica (BHE). Schneider et al. (2005) determinou a quantidade de G-CSF iodado ( $^{131}\text{I}$ -G-CSF) no cérebro e no soro 1, 4, e 24 horas após injeção intravenosa em ratos não isquêmicos e calculou a relação cérebro/soro de  $^{131}\text{I}$ -G-CSF, utilizando  $^{131}\text{I}$ -albumina como um controle do índice de permeabilidade, já que a mesma não atravessa a BHE em condições basais. Em cada ponto de observação, o G-CSF mostrou uma proporção mais elevada cérebro/soro, o que

indica a passagem através da barreira intacta (BARTOLINI et al., 2011; SCHNEIDER et al., 2005a; ZHAO et al., 2007).



**Figura 3.** Cascata de sinalização do receptor do G-CSF após a ligação da molécula. A região citoplasmática do G-CSF-R pode ser subdividida em um domínio proximal à membrana, o qual contém dois subdomínios conservados conhecidos como Box 1 e Box 2, e um domínio de membrana distal, o Box 3, menos conservado. Nas células mielóides, o domínio proximal à membrana é essencial para a sinalização mitogênica, enquanto o domínio membrana distal é essencial para a transdução de sinais de diferenciação. Além disso, há quatro resíduos de tirosina (Tyr) na região citoplasmática do G-CSF-R, nas posições 704, 729, 744, e 764 do receptor humano. A ligação ao G-CSF-R resulta na rápida fosforilação destes quatro resíduos de tirosina que formam potenciais locais de ligação para moléculas de sinalização que contém homologia Src 2 (SH2) ou domínios obrigatórios de fosfotirosina. Os resíduos Tyr-704 e Tyr-744 do G-CSF-R estão envolvidos com o recrutamento e ativação de STAT3 e o resíduo Tyr-764 é necessário para a formação de complexos Shc / Grb2 / P140 bem como a activação de p21ras. **Fonte:** (LANFRANCONI et al., 2011; WARD et al., 1999).

### 1.3 Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre (V DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE, 2013).

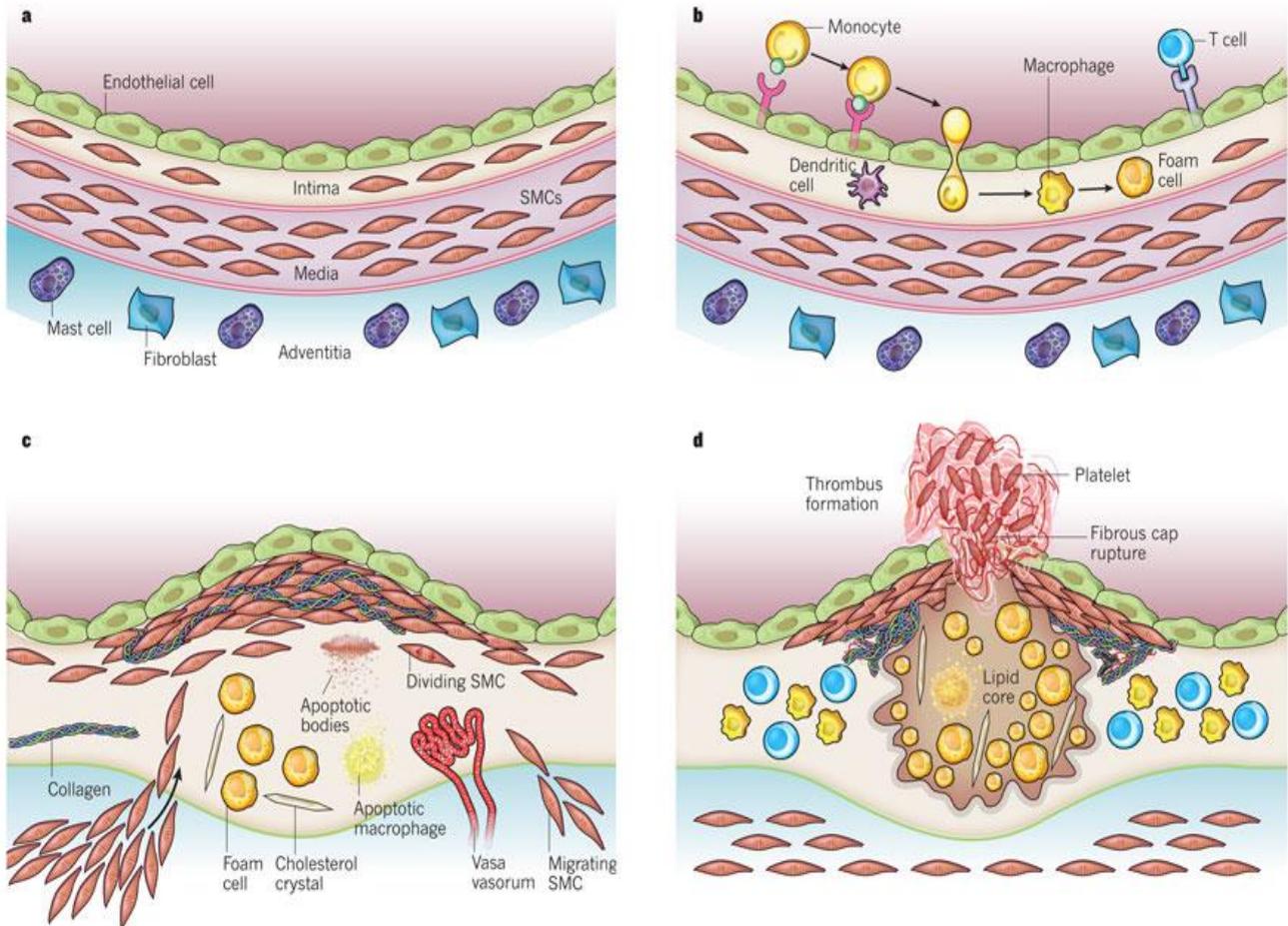
O endotélio normal e saudável regula o tônus e a estrutura vascular, além de ter propriedades anticoagulante, antiagregante plaquetária e fibrinolítica. A manutenção do tônus vascular é conseguida através da liberação de numerosas substâncias dilatadores e constritoras. Uma importante substância vasodilatadora liberada pelo endotélio é o óxido nítrico (NO), originalmente identificada como fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF). Outros vasodilatadores derivados do endotélio incluem a prostaciclina e a bradicinina. A prostaciclina atua sinergicamente com NO para inibir a agregação plaquetária. A bradicinina estimula a liberação de NO, de prostaciclina e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio, outro vasodilatador, que contribui para a inibição da agregação plaquetária. A bradicinina também estimula a produção do fator ativador de plasminogénio tecidual (t-PA), e, assim, pode desempenhar um papel importante na fibrinólise (DAVIGNON e GANZ, 2004).

A aterosclerose representa um dos principais fatores de risco para o AVE e caracteriza-se por uma complexa disfunção endotelial induzida por níveis de lipoproteínas baixa densidade (LDL) elevados, radicais livres de microrganismos infecciosos, hipertensão, toxinas do fumo ou a combinação destes e de outros fatores que conduzem a uma resposta inflamatória compensatória. A disfunção endotelial é representada pela diminuição da síntese de óxido nítrico, oxidações locais de lipoproteínas circulantes e sua entrada na parede dos vasos. Espécies reativas de oxigênio intracelulares são induzidas de maneira semelhante pelos múltiplos fatores de risco para aterosclerose e levam a um maior estresse oxidativo em células vasculares, ativando sinalização intracelular de vias envolvidas em expressão gênica e na *upregulation* da produção de moléculas de adesão que

facilitam a aderência de leucócitos ao endotélio disfuncional e sua migração subsequente para dentro da parede dos vasos (STOLL e BENDSZUS, 2006).

O colesterol é uma molécula envolvida em muitas funções, tais como a manutenção das membranas celulares, a produção de vitamina D e de hormônios e possivelmente ajudando conexões de células no cérebro. A homeostase do colesterol é centrada no metabolismo de lipoproteínas, que medeiam o transporte de lipídios. Quando em circulação, o colesterol, sendo um lipídio, requer uma vesícula de transporte. Ocorre então a sua interação com várias proteínas, chamadas de apoproteínas, formando as chamadas micelas. Estas partículas, conhecidas como lipoproteínas, são heterogêneas no tamanho, na forma, na composição (variações no conteúdo de ácidos graxos livres, triglicérides, ésteres de colesterol, fosfolipídios, enzimas e apoproteínas – ou apolipoproteínas), na função e na sua contribuição para a doença vascular (DANIELS et al., 2009).

A placa aterosclerótica plenamente desenvolvida (Figura 4) é constituída por elementos celulares, componentes da matriz extracelular e núcleo lipídico e necrótico, formado principalmente por debris de células mortas. As placas estáveis caracterizam-se por predomínio de colágeno, organizado em capa fibrosa espessa, escassas células inflamatórias e núcleo lipídico e necrótico de proporções menores. As instáveis apresentam atividade inflamatória intensa, especialmente nas suas bordas laterais, com grande atividade proteolítica, núcleo lipídico e necrótico proeminente e capa fibrótica tênue. A ruptura dessa capa expõe material lipídico altamente trombogênico, levando à formação de um trombo sobrejacente. Esse processo, também conhecido por aterotrombose, é um dos principais determinantes das manifestações clínicas da aterosclerose (V DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE, 2013).



**Figura 4.** Fases de desenvolvimento da lesão aterosclerótica. **A:** artéria normal com três camadas, a camada íntima revestida por uma monocamada de células endoteliais que está em contato com o sangue que se sobrepõe uma membrana basal; a túnica média, com células musculares lisas (CML) incorporadas em uma matriz extracelular complexa; e a adventícia, camada exterior de artérias, com mastócitos, terminações nervosas e microvasos. **B:** passos iniciais da aterosclerose com a adesão de leucócitos do sangue para a monocamada endotelial ativada, dirigindo migração para a íntima, maturação dos monócitos (os mais numerosos leucócitos recrutados) em macrófagos e a captação de lipídios, dando origem as células espumosas. **C:** migração de CMLs para a íntima, proliferação das residentes na camada íntima e das derivadas de média, síntese aumentada de macromoléculas da matriz extracelular, como colágeno, elastina e proteoglicanos, morte de macrófagos e CMLs, algumas por apoptose, e depósito de lípido extracelular derivado de células mortas acumulando-se na região central da placa, chamada de core lipídico ou necrótico. Placas em estágio avançado também contêm cristais de colesterol e microvasos. **D:** a trombose, complicação final da aterosclerose, culmina com a ruptura física da placa aterosclerótica o que permite que os componentes de coagulação do sangue entrassem em contato com os fatores de tecido no interior da placa provocando a formação de um trombo que se estende para dentro do lúmen do vaso, onde podem impedir o fluxo de sangue. **Fonte:** (LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2011 modificado).

A lipoproteína de alta densidade (HDL) promove o transporte reverso, ou seja, extração do colesterol a partir dos tecidos para o fígado. Por outro lado, as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) fazem o transporte do colesterol do fígado para os tecidos. Antes que qualquer molécula de colesterol alcance uma fração de HDL ou LDL, estas são geralmente submetidas a um processo de maturação que começa com a síntese hepática ou intestinal da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). VLDLs, LDLs e HDLs compõem três das seis principais frações de lipoproteínas, que também incluem quilomícrons, remanescentes de quilomícrons (CRs) e lipoproteínas de densidade intermediária (IDLs) (DANIELS et al., 2009).

Variações nas concentrações de quilomícrons e VLDL, em circulação são altamente dependentes da expressão gênica de um tipo de apolipoproteína, a E (ApoE). Camundongos sem ApoE funcional, que possuem a fração VLDL em predominância, têm até 500% mais colesterol no plasma e desenvolvem aterosclerose grave rapidamente em comparação com camundongos do tipo selvagem (HATCH *et al.*, 2012). Este efeito é produto, principalmente, da perda de ligação ao receptor de LDL (LDLR) no fígado já que a ApoE funciona como sítio reconhecedor para ligação no receptor e internalização das lipoproteínas como a VLDL. Devido à sua tendência para desenvolver hipercolesterolemia e placas ateroscleróticas o camundongo *knockout* para ApoE é um modelo muito usado para aterosclerose (DANIELS et al., 2009).

### 1.3.1 Camundongos *knockout* para apolipoproteína E

Entre os fatores que estão sendo identificados como partes do complexo de causas da aterosclerose estão as mutações em genes envolvidos no metabolismo lipídico, incluindo o gene que codifica apolipoproteína E (ApoE). A ApoE é uma glicoproteína com um peso molecular de aproximadamente 34kD que é sintetizada no fígado, cérebro e outros tecidos tanto em humanos quanto em camundongos. Além disso, é um componente estrutural de todas as lipoproteínas exceto da *low density lipoprotein* (LDL). Uma das mais importantes funções é servir como um ligante de alta afinidade para os receptores de ApoE, ApoB e de remanescentes de quilomícrons (ZHANG et al., 1992).

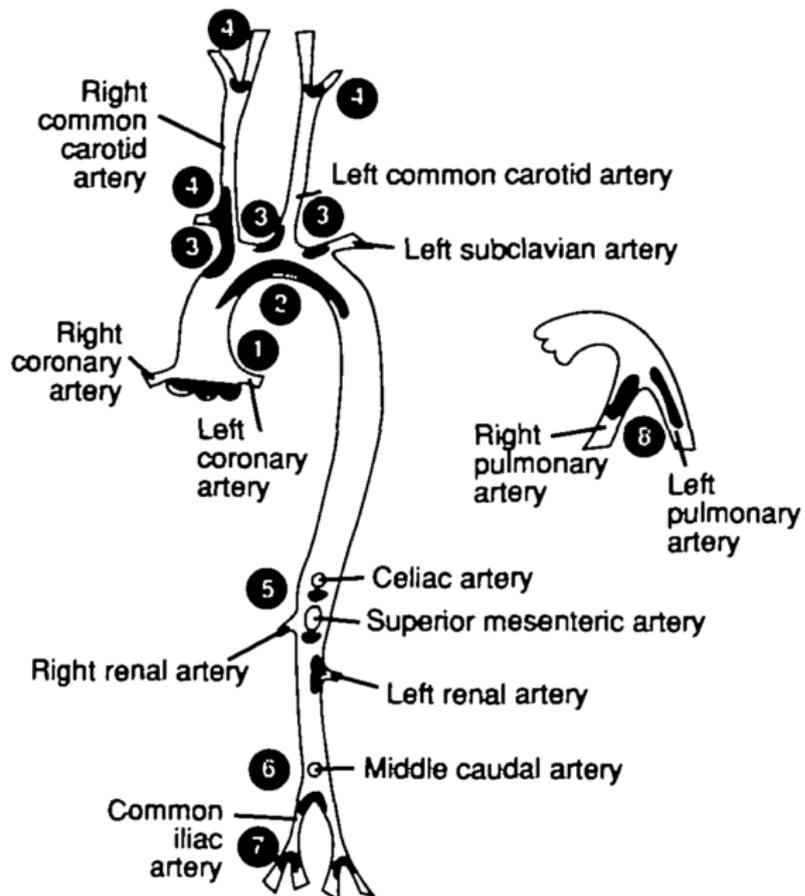
Camundongos deficientes de ApoE são gerados por inativação do gene correspondente através, principalmente, de técnicas de transgênese em células tronco embrionárias. Os *knockout* homozigotos ou heterozigotos para o gene da ApoE parecem saudáveis (PIEDRAHITA et al., 1992). Não se observa diferença nos seus pesos corporais em comparação com camundongos normais. Acasalamentos entre homozigotos, entre heterozigotos e entre homozigotos e heterozigotos têm ninhadas de rendimento de tamanho normal sem problemas reprodutivos aparentes. No entanto, as diferenças fenotípicas significativas entre animais normais e os mutantes homozigotos foram observados em seus perfis lipídicos e lipoproteico (Figura 5). Os camundongos deficientes para a ApoE têm seus níveis de colesterol total aumentado e são cinco vezes superiores aos dos animais normais. Estes níveis não são afetados pela idade ou sexo dos animais. Além disso, camundongos *knockout* para apolipoproteína E (ApoE<sup>-/-</sup>) com ou sem dieta rica em colesterol oferece um modelo de hipercolesterolemia refletindo o contexto da aterosclerose (DIETRICH, 2007; MATTER et al., 2006; MEIR; LEITERSDORF, 2004; PLUMP et al., 1992; ZHANG et al., 1992).

Animals	Total cholesterol in mg/dl ± SD (n)	HDL cholesterol in mg/dl ± SD (n)	Triglyceride in mg/dl ± SD (n)
Normal	86 ± 20 (46)	73 ± 28 (34)	73 ± 36 (32)
Heterozygous	88 ± 22 (47)	75 ± 18 (29)	102 ± 40 (41)
Homozygous	434 ± 129 (40)	33 ± 15 (28)	123 ± 51 (42)

**Figura 5.** Níveis plasmáticos de Colesterol Total, HDL Colesterol e Triglicerídeos em camundongos ApoE *knockout* heterozigotos e homozigotos comparados com animais normais. **Fonte:** (ZHANG et al., 1992).

Camundongos hipercolesterolêmicos ApoE *knockout*, desenvolvem lesões ateroscleróticas semelhantes às encontradas em humanos, com formação de placas ateromatosas nas artérias carótidas (Figura 6) com prejuízo do seu relaxamento e aumento do estresse oxidativo cerebral (D'USCIO, SMITH e KATUSIC, 2001; KITAYAMA et al., 2007; NAKASHIMA e PLUMP, 1994; YONEKURA et al., 2004).

De acordo com Drake et al., ratos *knockout* para a apolipoproteína E (ApoE<sup>-/-</sup>) submetidos à dieta aterogênica mostram indução da ativação microglial no parênquima cerebral dentro de 8 semanas e aumento da expressão de moléculas de adesão vascular. Também foram observadas deposição focal de lipídios e neuroinflamação em áreas periventriculares e corticais com marcado recrutamento de fagócitos mielóides ativados, células T e granulócitos para o plexo coroide (DRAKE et al., 2011).



**Figura 6.** Representação dos sítios de predileção (indicados em preto no lúmen) para o desenvolvimento da lesão aterosclerótica ao longo da árvore arterial com destaque para as artérias carótidas comum direita e esquerda e suas bifurcações (correspondente aos números 3 e 4). **Fonte:** (NAKASHIMA e PLUMP, 1994).

## **2 JUSTIFICATIVA**

Recentemente, estudos demonstraram que a administração do G-CSF possui propriedades neuroprotetoras em camundongos submetidos à isquemia cerebral, porém seus efeitos frente ao aumento do estresse oxidativo e à hipercolesterolemia/aterosclerose, uma das principais causas associadas ao AVE, ainda são desconhecidos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Estudar os efeitos da terapia com o G-CSF em modelo de isquemia cerebral global de camundongos hipercolesterolêmicos, *knockout* para a apolipoproteína E.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Avaliar os efeitos do G-CSF sobre:

- a força muscular pré e pós-oclusão bicarotídea;
- a relação peso do baço/peso corporal;
- a contagem de leucócitos sanguíneos 48h após oclusão bicarotídea;
- os níveis plasmáticos de colesterol total;
- o estresse oxidativo plasmático;
- a área cortical macroscópica de infarto cerebral;
- a morte celular no tecido cerebral cortical;
- a marcação de neurônios no tecido cerebral cortical;
- a marcação de receptores para o G-CSF no tecido cerebral cortical.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Animais Experimentais

Foram utilizados 16 (dezesesseis) camundongos *knockout* para a apolipoproteína E (ApoE<sup>-/-</sup>) e 5 (cinco) camundongos C57BL/6 machos, adultos jovens, com idade variando entre 12-14 semanas e pesando em média 28g. Os animais receberam água e ração (Labina<sup>®</sup>, Purina) livremente, sendo controlado o ciclo de 12 horas claro/escuro, a temperatura (22±2°C) do local onde permaneceram. Ambos foram provenientes do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular (LTCC) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Os procedimentos foram aprovados pelo CEUA-EMESCAM sob o protocolo número 011/2011 (anexo).

Os animais foram divididos em 3 grupos, o grupo controle ApoE<sup>-/-</sup> (n=8) submetido a oclusão bilateral e administração de veículo (solução glicosada 5%), o grupo ApoE<sup>-/-</sup> tratado com G-CSF (n=8), o qual recebeu, por via subcutânea, a dose de 100 µg/kg/dia de G-CSF (Filgrastim<sup>®</sup>, BioSidus S.A., Argentina) e o grupo controle normocolesterolêmico C57BL/6 (n=5) submetido a oclusão bilateral e administração de veículo (solução glicosada 5%). O G-CSF e a solução glicosada a 5% foram administrados nos grupos logo após a retirada da oclusão e readministrados após 24 horas.

### 4.2 Modelo de Isquemia Cerebral Global Bicarotídea (Bi-CCAo)

Para a produção da isquemia cerebral, através da oclusão bicarotídea (Bi-CCAo), os animais foram previamente pesados e anestesiados com uma solução de Ketamina (Quetamina<sup>®</sup>, Vetnil) 91mg/Kg e Xilazina (Rompun<sup>®</sup>, Bayer) 9,1mg/Kg via intraperitoneal. Decorrido o período para sedação completa, o animal foi posicionado em decúbito dorsal, fixando-se os membros dianteiros e traseiros à mesa cirúrgica. Com auxílio de tesoura e pinças específicas foram realizadas tricotomia e incisão na linha média da região cervical para exposição das artérias carótidas comuns direita e esquerda (figura 7). As artérias foram isoladas dos tecidos adjacentes e separadas

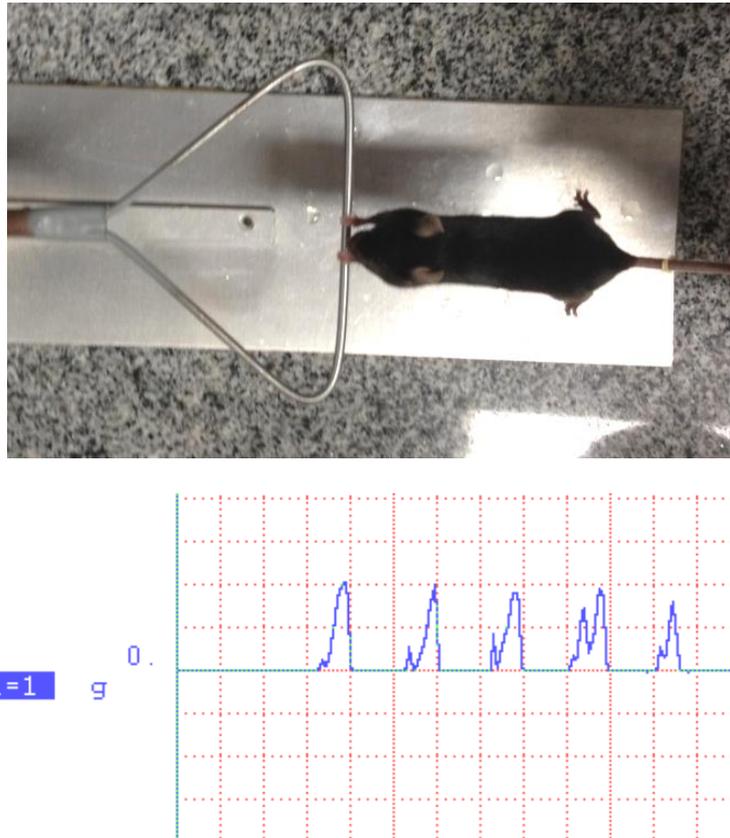
do nervo vago para oclusão com fio de nylon. A artéria carótida comum esquerda ficou permanentemente ocluída, e a direita foi ocluída por 60 minutos, tendo seu fluxo liberado após esse tempo. Os animais foram suturados e acomodados em caixas individuais para recuperação anestésica (SMITH et al., 1984 modificado).



**Figura 7.** Demonstração do animal em decúbito dorsal com as artérias carótidas comuns direita e esquerda isoladas e ocluídas. Fonte: Imagem própria.

### **4.3 Mensuração da Força Muscular (*Grip Force*)**

A mensuração da força dos camundongos foi realizada no período pré e pós-cirúrgico, por meio de uma adaptação feita em balança eletrônica acoplada ao sistema de aquisição de dados (DATAQ, Instruments Hardware Manager, USA), de modo que o animal exercia uma força de tração na balança contra a força do examinador, que tracionava o animal pela cauda (figura 8) (FOWLER et al., 2002; KILIC et al., 2008; TILSON; CABE, 1978). A média de dez picos de força pré e pós-cirúrgicos dos grupos controle e tratados foi tabulada para posterior análise e comparação dos dados registrados.



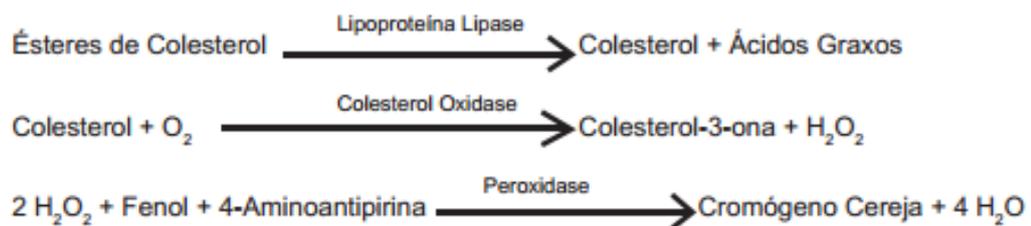
**Figura 8.** Demonstração do teste de força ao qual os animais foram submetidos mostrando o agarre das patas dianteiras ao aparato e gráfico do registro dos picos pelo software. Fonte: Imagem própria.

#### 4.4 Contagem de Leucócitos

Para a contagem dos leucócitos totais sanguíneos uma alíquota de 20 $\mu$ L de sangue, foi adicionada a um microtubo (Eppendorf®) contendo 380  $\mu$ L de ácido acético a 2% para a lise das hemácias. Após 2 minutos de homogeneização, uma alíquota de 10  $\mu$ L foi colocada em cada lado da câmara de Neubauer (0,100 mm profundidade, Labor Oplitik) coberta por uma lamínula apropriada. Decorrido 5 minutos para a distribuição adequada das células, a câmara de Neubauer foi levada a um microscópio óptico, onde se deu a contagem dos leucócitos totais. Foram contadas as células dos quatro quadrantes externos superiores e dos quatro inferiores. A média das células contidas nos quadrantes foi realizada e multiplicada por 200, a fim de alcançar o valor absoluto dos leucócitos totais sanguíneos por milímetro cúbico ( $\text{mm}^3$ ).

#### 4.5 Dosagem de Colesterol Plasmático

Uma amostra de sangue foi coletada com heparina no momento do sacrifício, imediatamente transferida para um tubo contendo heparina e centrifugada a 2500 rpm durante 15 min. O plasma foi separado e mantido a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o ensaio. O colesterol plasmático foi quantificado através de um kit enzimático colorimétrico (Colesterol Monorreagente, Bioclin®) no qual a intensidade da cor, lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 500 nm, obtida após reação de cada amostra era diretamente proporcional a concentração de colesterol na mesma quando comparada com um padrão de concentração conhecida (figura 9).



**Figura 9.** Reações enzimáticas através das quais o colesterol plasmático é quantificado. O produto formado pela oxidação da 4-aminoantipirina (4-antipirilquinonimina) é de coloração avermelhada e sua intensidade diretamente proporcional à concentração de colesterol no plasma. A cor vermelha, formada pela reação é medida em espectrofotômetro. Fonte: Bula do Kit Bioclin® Colesterol Monorreagente.

#### 4.6 Análise Macroscópica das Áreas de Infarto Cerebral

Os animais foram sacrificados 48 (quarenta e oito) horas após o AVE com sobredose de anestésico. O encéfalo foi extraído e corado com cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (vermelho de tetrazólio, TTC, Sigma Aldrich) a 2%, durante 30 minutos na temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  e então fixado em solução de paraformaldeído (4%), de modo que o tecido não infartado apareceu na cor vermelho escuro, enquanto a área de infarto de coloração branca. Foi realizada quantificação da área macroscópica do infarto cerebral através de análise morfométrica com programa *Image J - National Institute of Health, USA – Software livre*.

#### **4.7 Processamento e Corte Histológico**

As amostras identificadas foram alocadas em cassetes histológicos e posteriormente colocadas em um processador automático de tecidos – histotécnico (LUPE®, Brasil - PT05) passando por baterias de desidratação crescente em alcoois (70%, 80%, 90% e 3 repetições de 100%), em solução álcool-xilol (1:1), diafanização em xilol puro (3 repetições) e inclusão em parafina histológica, com tempo total de processamento de 3 horas e 10 minutos. O emblocamento do material foi realizado utilizando-se moldes histológicos de alumínio e os blocos parafinizados foram armazenados em freezer (a -20°C) até o momento da microtomia. Foram obtidos cortes histológicos coronais de 5µm de espessura em micrótomo manual (Leica Biosystems, Germany) e confeccionadas lâminas para coloração, ensaio de morte celular (silanizadas, Starfrost®, Knittel) e imunohistoquímica (silanizadas, Starfrost®, Knittel).

#### **4.8 Coloração Hematoxilina e Eosina**

Para a coloração com hematoxilina e eosina (HE), a bateria de desparafinização química foi iniciada com o uso de xilol, por três sucessivas passagens, uma bateria de álcool PA e xilol (1:1) e três passagens em álcool PA – todos em tempos de cinco minutos cada. Seguiu-se o protocolo de dez minutos em hematoxilina, trinta segundos em álcool-ácido, lavagem em água corrente por cinco minutos e passagem em eosina por dois minutos. Logo após procedeu-se a lavagem em água corrente, passagem em álcool PA por três vezes, solução de álcool-xilol e baterias de xilol PA. Todas as passagens foram realizadas com o tempo de cinco minutos. A montagem final das lâminas foi feita em meio não aquoso utilizando DPX [p-xylene-bis (N-pyridinium bromide)] (Sigma-Aldrich, USA).

Foram capturadas imagens aleatórias da área cortical de cada lâmina utilizando um fotomicroscópio (Olympus® AX70) acoplado a uma câmera digital (AxioCam Erc5s, Zeiss®) nas magnificações de 200 e 400 vezes.

#### 4.9 Imunohistoquímica (IHQ)

Seguindo o protocolo utilizado no laboratório (Biogen®) aquecia-se o tampão citrato, pH 6,0 (Spring Bioscience® Germany) em banho-maria (95°C a 100°C), no qual foi mergulhado o aparato onde as lâminas estavam por trinta minutos. Após esta etapa, denominada de recuperação antigênica, resfriava-se o conjunto tampão-lâminas à temperatura ambiente, seguida de lavagem em água deionizada. Posteriormente realizou-se a secagem individual de cada lâmina, demarcação dos cortes com caneta hidrofóbica (Sigma-Aldrich, USA), e procedia-se à etapa de bloqueio da peroxidase endógena, no escuro, com peróxido de hidrogênio 3% em metanol, em câmara úmida por dez minutos à temperatura ambiente seguida de lavagem com tampão de fosfato pH 7,4 (PBS) por cinco minutos. Para a etapa de bloqueio de proteína utilizou-se solução de 5% de soro normal de cabra em TritonX-100/PBS por dez minutos seguida de lavagem com PBS por dois tempos de três minutos cada.

Os anticorpos primários Anti-NeuN (ab177487, Monoclonal, Abcam®) e AntiCD114/G-CSF-R (bs-2574R, Policlonal, Bioss®) foram diluídos em diluente de anticorpo comercial (Spring Bioscience®, Germany) e incubados em câmara úmida à temperatura ambiente, por uma hora nas diluições de 1:500 e 1:200, respectivamente. Decorrido o tempo de incubação, as lâminas foram lavadas em PBS, três tempos de três minutos cada e, para amplificar a visualização, foi aplicado o Polímero NHistofine (*Simple Stain Mouse MAX PO (R) Universal Immunoperoxidase Polimer for mouse tissues, Anti-rabbit*, Nichirei, Japan), conjugado com peroxidase durante trinta minutos, em câmara úmida. Seguiu-se uma última etapa de lavagem com PBS em três tempos de três minutos cada. Para revelação da reação, foi utilizado o substrato-cromógeno diaminobenzidina (DAB líquido – Spring Bioscience®, Germany), preparado de acordo com as recomendações do fabricante, e mantido sobre o material por dez minutos, sendo o excesso lavado durante cinco minutos em água corrente.

Para melhor detecção do marcador proteico, foi feita a contra-coloração com Hematoxilina de Harris durante trinta segundos, retirando-se o excesso do corante em água corrente e subsequente imersão das lâminas em água amoniacal, por um minuto. Como etapa final do protocolo, fez-se a montagem das lâminas seguindo a

ordem de desidratação dos tecidos em álcool PA, passagem rápida em álcool-xilol (1:1), em xilol e montagem em meio não-aquoso DPX (Sigma-Aldrich, USA).

Foram capturadas 5 imagens aleatórias da área cortical de cada lâmina, utilizando um fotomicroscópio (Olympus® AX70) acoplado a uma câmera digital (Axiocam Erc5s, Zeiss®.) na magnificação de 400 vezes. Posteriormente, a análise quantitativa foi feita no programa *Image J* (National Institute of Health, USA) através do *plugin cell counter*.

#### **4.10 Ensaio Morte Celular (TUNEL)**

O ensaio para morte celular utilizado foi o TUNEL (TdT mediated dUTP nick end labeling), realizado através do kit comercial (Roche Diagnostics GmbH, Germany ®), via marcação de fragmentos terminais de DNA (porção 3' -OH), caracteristicamente relacionado com a fragmentação do DNA nuclear, possibilitando a identificação de células em morte nos cortes histológicos.

Os cortes foram submetidos a um pré-tratamento com uso de tampão citrato, pH 6,0 (Spring Bioscience®, Germany) em microondas, durante cinco minutos em potência média (380-450W). Após esta etapa, resfriava-se o conjunto tampão-lâminas, por cinco minutos, à temperatura ambiente, seguida de duas lavagens por solução de tampão PBS pH 7,4 à 0,1M. Para a etapa seguinte, era feita a secagem individual de cada lâmina e demarcação dos cortes com caneta hidrofóbica (Sigma-Aldrich, USA). Seguia-se a aplicação da solução reativa de TUNEL (Roche Diagnostics GmbH, Germany), a qual consistia mistura solução de marcação com solução enzimática. O tempo de reação foi de uma hora, em câmara úmida e escura, à temperatura ambiente e seguiam-se três novas lavagens com PBS, um minuto cada. Posteriormente, foi feita a aplicação do conversor POD (Peroxidase – Roche Diagnostics GmbH, Germany), durante trinta minutos, em câmara úmida e no escuro, à temperatura ambiente seguida de lavagem com PBS em três tempos de três minutos cada.

Para revelação da reação, foi utilizado o DAB líquido (Spring Bioscience®, Germany), por dez minutos, seguido de lavagem durante cinco minutos em água corrente. Para melhor detecção, foi feita a contra-coloração com hematoxilina de Harris durante trinta segundos, retirando-se o excesso do corante em água corrente e subsequente imersão das lâminas em água amoniacal por um minuto. Para o controle negativo foi utilizada lâmina com corte de cérebro sendo omitida a etapa de adição da solução reativa.

Foram capturadas 5 imagens aleatórias da área cortical de cada lâmina utilizando um fotomicroscópio (Olympus® AX70) acoplado a uma câmera digital (AxioCam Erc5s, Zeiss®.) na magnificação de 400 vezes. Posteriormente, a análise quantitativa foi feita no programa *Image J* (National Institute of Health, USA) através do *plugin cell counter*.

#### **4.11 Concentração Plasmática dos *Advanced Oxidation Protein Products* (AOPP)**

Os valores plasmáticos de produtos avançados de oxidação proteica (Advanced Oxidation Protein Products [AOPP]) foram determinados por espectrofotometria em leitora de microplacas em parceria com o LTCC. A reação foi calibrada com Cloramina -T nas concentrações de 0-100  $\mu\text{M}$  (Vetec) na presença de iodeto de potássio (KI) e ácido acético lidas a 340 nm. O plasma foi diluído 1/5 em tampão fosfato (PBS), diretamente na microplaca (Kasvi K30-5096U). Em seguida, foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  de iodeto de potássio 1,16 M e posteriormente foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  de ácido acético glacial ultra puro. A densidade óptica foi lida imediatamente a 340 nm contra um controle contendo 200  $\mu\text{L}$  de PBS, 10  $\mu\text{L}$  de KI e 20  $\mu\text{L}$  de ácido acético. As análises foram realizadas em duplicata. As concentrações de AOPP foram expressas como  $\mu\text{M}$  de cloramina-T/mg de proteína (WITKO-SARSAT et al., 1996 modificado; BRADFORD, 1976).

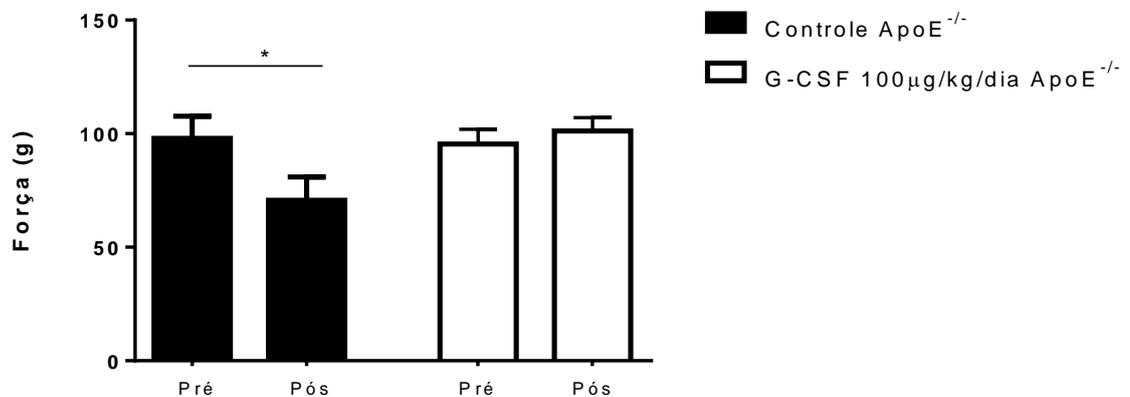
#### 4.12 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism Versão 6.0.1 (GraphPad Software; San Diego, Califórnia, EUA, Versão Trial). Para os diferentes parâmetros avaliados, foram utilizados os testes *t* de Student e ANOVA de 1 via (de medidas repetidas e de medidas independentes) com *post hoc* de Fisher. Para o teste de normalidade foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Força Muscular

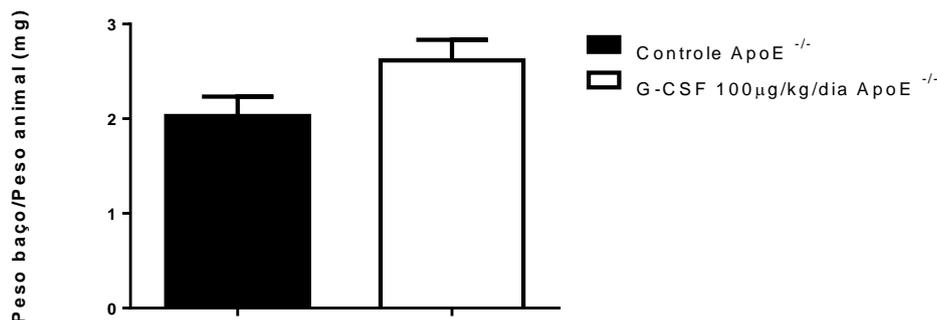
A força muscular, medida através do teste do agarre (*grip force*) das patas dianteiras do animal a um aparato, estava significativamente diminuída nos animais controle 48h pós-cirurgia, quando comparados aos controles pré-cirúrgicos (de  $97,9 \pm 9,8$  para  $70,69 \pm 10,62$ g;  $*p = 0,0154$ , ANOVA de medidas repetidas *post hoc* Fisher), enquanto que no grupo G-CSF a força registrada antes da cirurgia foi preservada no pós-cirúrgico, como mostrado na figura 10.



**Figura 10.** Mensuração da força muscular (*grip force*) em “g” dos animais dos grupos controle ApoE<sup>-/-</sup>, que recebeu solução glicosada 5% (n=8), e tratado com G-CSF ApoE<sup>-/-</sup> na dose de 100µg/kg/dia (n=8) pré e pós-cirurgia. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM. ( $*p < 0,05$ , ANOVA 1 Via de medidas repetidas com *post hoc* Fisher)

### 5.2 Relação Peso úmido Baço/Peso Corporal

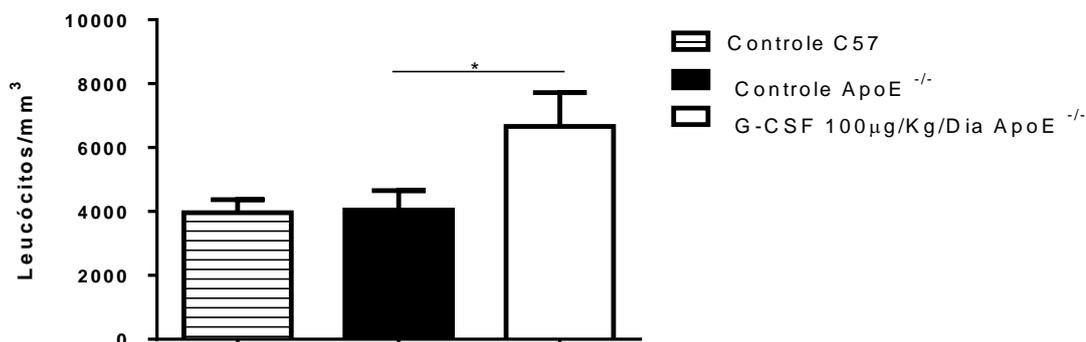
A relação peso úmido do baço/peso dos animais (Figura 11), apesar de não apresentar diferença estatística entre os grupos (controle =  $2,03 \pm 0,20$  vs G-CSF =  $2,62 \pm 0,22$  mg;  $p = 0,0698$  teste *t* Student), mostra uma tendência do grupo G-CSF a ter relação maior que o grupo controle.



**Figura 11.** Relação Peso úmido do baço/Peso do animal em miligramas (mg) dos grupos controle, que recebeu solução glicosada 5% (n=8), e tratado com G-CSF na dose de 100µg/kg/dia (n=8). Dados apresentados como média  $\pm$  EPM; ( $p=0,0698$ , teste *t* de Student).

### 5.3 Contagem de Leucócitos Totais Sanguíneos

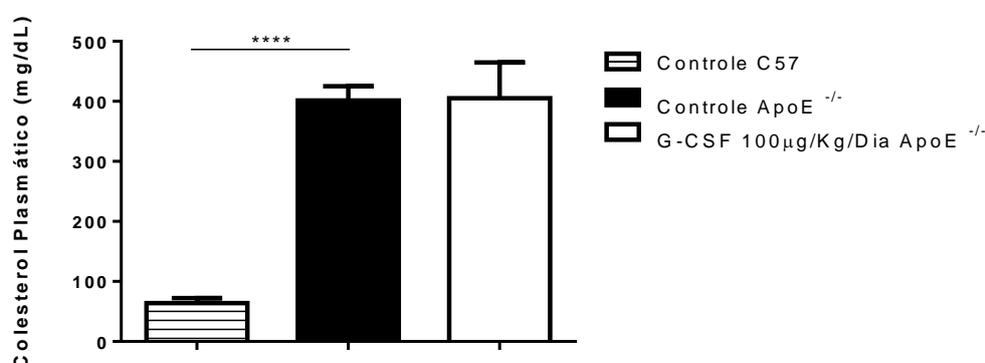
A partir da amostra de sangue total, foi realizada a contagem de leucócitos circulantes para observação da ação do G-CSF no recrutamento de granulócitos. O grupo G-CSF apresentou contagem estatisticamente maior ( $6661 \pm 1059$  céls/mm<sup>3</sup>) de leucócitos circulantes por mm<sup>3</sup> de sangue quando comparado ao grupo controle ApoE<sup>-/-</sup> ( $4044 \pm 610$  céls/mm<sup>3</sup>) e controle C57BL/6 ( $3965 \pm 409$  céls/mm<sup>3</sup>), como mostrado na figura 12.



**Figura 12.** Contagem de leucócitos em células por mm<sup>3</sup> dos grupos controle C57BL/6 (n=5), controle ApoE<sup>-/-</sup> (n=8) que receberam solução glicosada 5% e tratado com G-CSF ApoE<sup>-/-</sup> na dose de 100µg/kg/dia (n=8). Dados apresentados como média  $\pm$  EPM. (\* $p < 0,05$ , ANOVA 1 Via com *post hoc* Fisher)

## 5.4 Dosagem Colesterol Total Plasmático

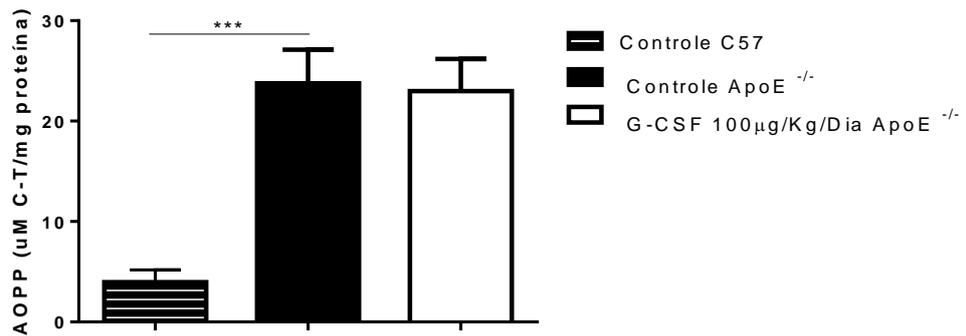
Na figura 13, temos a dosagem do colesterol total plasmático dos animais ateroscleróticos que não apresentou diferença estatística entre os grupos controle ApoE<sup>-/-</sup> (401,3±23,9) e tratado com G-CSF ApoE<sup>-/-</sup> (405,2±59,81 mg/dL;  $p = 0,95$  teste *t* Student). Para fins de comparação do estado basal deste parâmetro, podemos visualizar também na figura 15 a média do grupo de animais C57BL/6 (63,9±8,3 mg/dL), que não possuem a deleção do gene para a ApoE, estatisticamente menor quando comparada com o grupo controle ApoE<sup>-/-</sup>.



**Figura 13.** Dosagem de colesterol total plasmático em mg/dL dos grupos controle C57BL/6 (n=5), controle ApoE<sup>-/-</sup> (n=8), que receberam solução glicosada 5% e tratado com G-CSF ApoE<sup>-/-</sup> na dose de 100µg/kg/dia (n=8). Dados apresentados como média ± EPM; (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ; ANOVA 1 Via com *post hoc* Fisher)

## 5.5 Estresse Oxidativo Plasmático

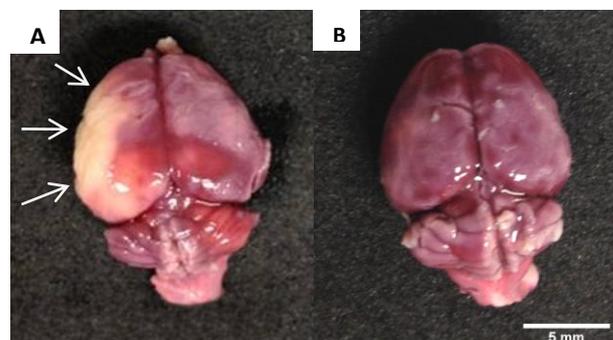
O teste para comparação do estresse oxidativo dos diferentes grupos foi realizado através da medida da concentração plasmática de produtos de oxidação proteica (AOPP). Na figura 14 podemos observar que o tratamento com o G-CSF no animal ApoE<sup>-/-</sup> não interferiu nos níveis plasmáticos de produtos oxidados. Ao compararmos o grupo controle ApoE<sup>-/-</sup> com o grupo controle C57BL/6 notamos níveis significativamente elevados de produtos oxidados nos animais que não expressam a ApoE.



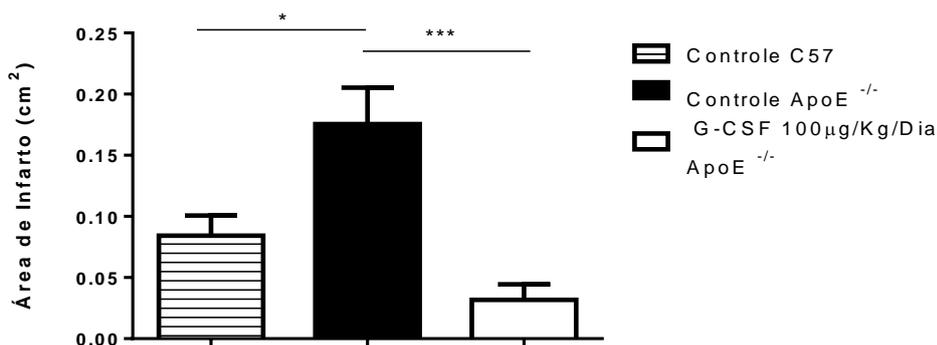
**Figura 14.** Concentração plasmática dos produtos de oxidação proteica (AOPP) em  $\mu\text{M}$  Cloramina-T/mg proteína dos grupos controle C57BL/6 ( $n=5$ ), controle ApoE<sup>-/-</sup> ( $n=8$ ), que receberam solução glicosada 5% e tratado com G-CSF ApoE<sup>-/-</sup> na dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  ( $n=8$ ). Dados apresentados como média  $\pm$  EPM; (\*\*\*) $p < 0,001$ ; ANOVA 1 Via com *post hoc* Fisher)

## 5.6 Área macroscópica de infarto cerebral

A área macroscópica de infarto cerebral (Figuras 15 e 16) foi significativamente menor no grupo tratado com G-CSF ApoE<sup>-/-</sup> ( $0,03 \pm 0,01 \text{ cm}^2$ ;  $p = 0,0006$ ), quando comparado com o grupo controle ApoE<sup>-/-</sup> ( $0,18 \pm 0,03 \text{ cm}^2$ ), representando uma redução média de 83,3% da área. Observou-se ainda considerável diferença entre os grupos controle C57BL/6 ( $0,08 \pm 0,02 \text{ cm}^2$ ) e controle ApoE<sup>-/-</sup> ( $0,18 \pm 0,03 \text{ cm}^2$ ), com área de isquemia mais exacerbada no grupo ApoE *knockout*.



**Figura 15.** **A.** Cérebro corado com trifetil tetrazólio com área pronunciada de infarto (setas), animal do grupo controle. **B.** Cérebro corado com trifetil tetrazólio com pequena área de penumbra (seta), animal do grupo tratado com G-CSF 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ . Barra de escala: 5mm.

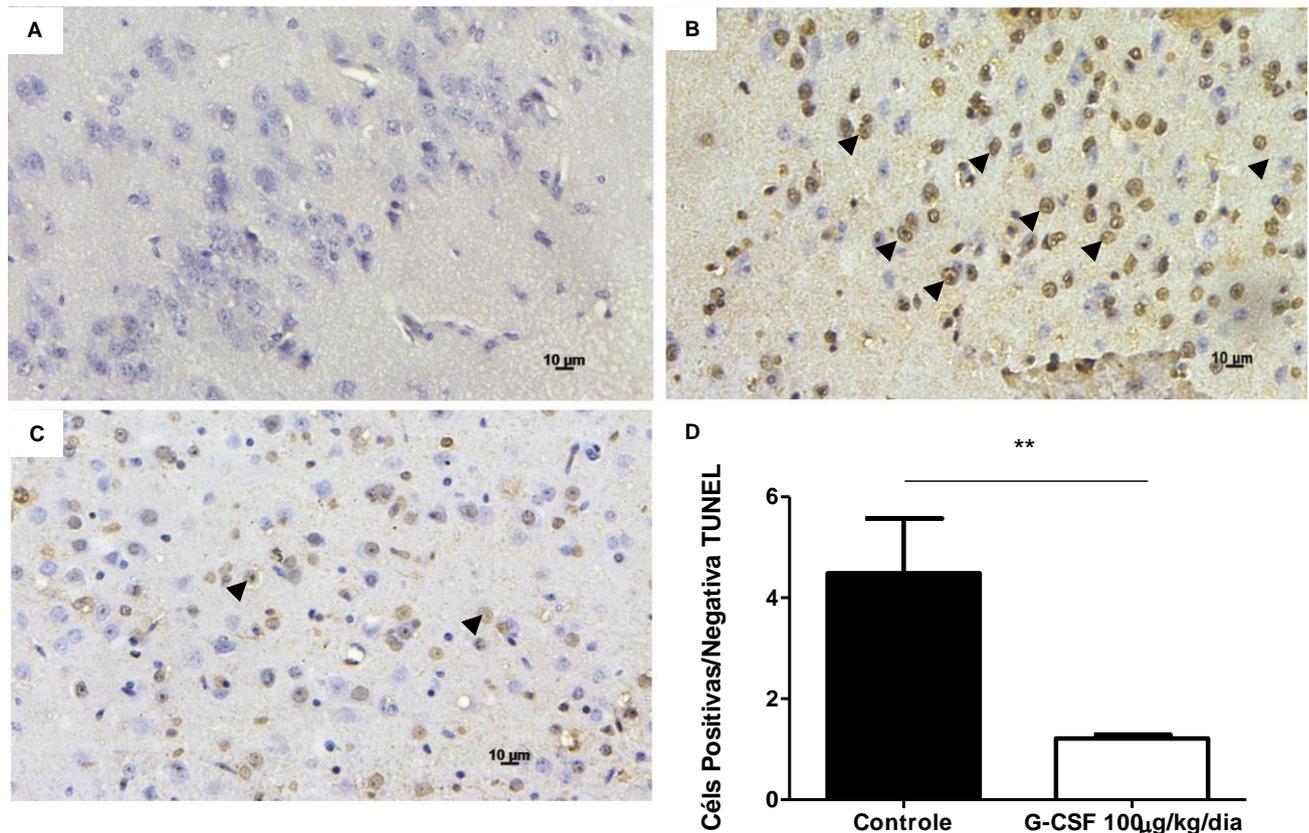


**Figura 16.** Tamanho da área macroscópica de infarto cerebral em cm<sup>2</sup> dos grupos controle C57BL/6 (n=5) e ApoE<sup>-/-</sup> (n=8), que receberam solução glicosada 5%, e tratado com G-CSF na dose de 100µg/kg/dia ApoE<sup>-/-</sup> (n=8). Dados apresentados como média ± EPM. (\*p<0,05 \*\*\*p<0,001, Anova de 1 Via *post hoc* Fisher)

## 5.7 Ensaio TUNEL

A fim de avaliar a ação antiapoptótica do G-CSF na neuroproteção evidenciada neste estudo, performamos o teste do TUNEL no tecido cerebral. Como pode ser visto na figura 17, tanto qualitativamente (17b e 17c) quanto quantitativamente (17d) percebe-se uma relação significativamente menor (de  $4,48 \pm 1,08$  no grupo controle ApoE<sup>-/-</sup> para  $1,21 \pm 0,07$  células no grupo G-CSF ApoE<sup>-/-</sup>) do número de células positivas, marcadas, com o número de células negativas, não marcadas, no grupo tratado com G-CSF.

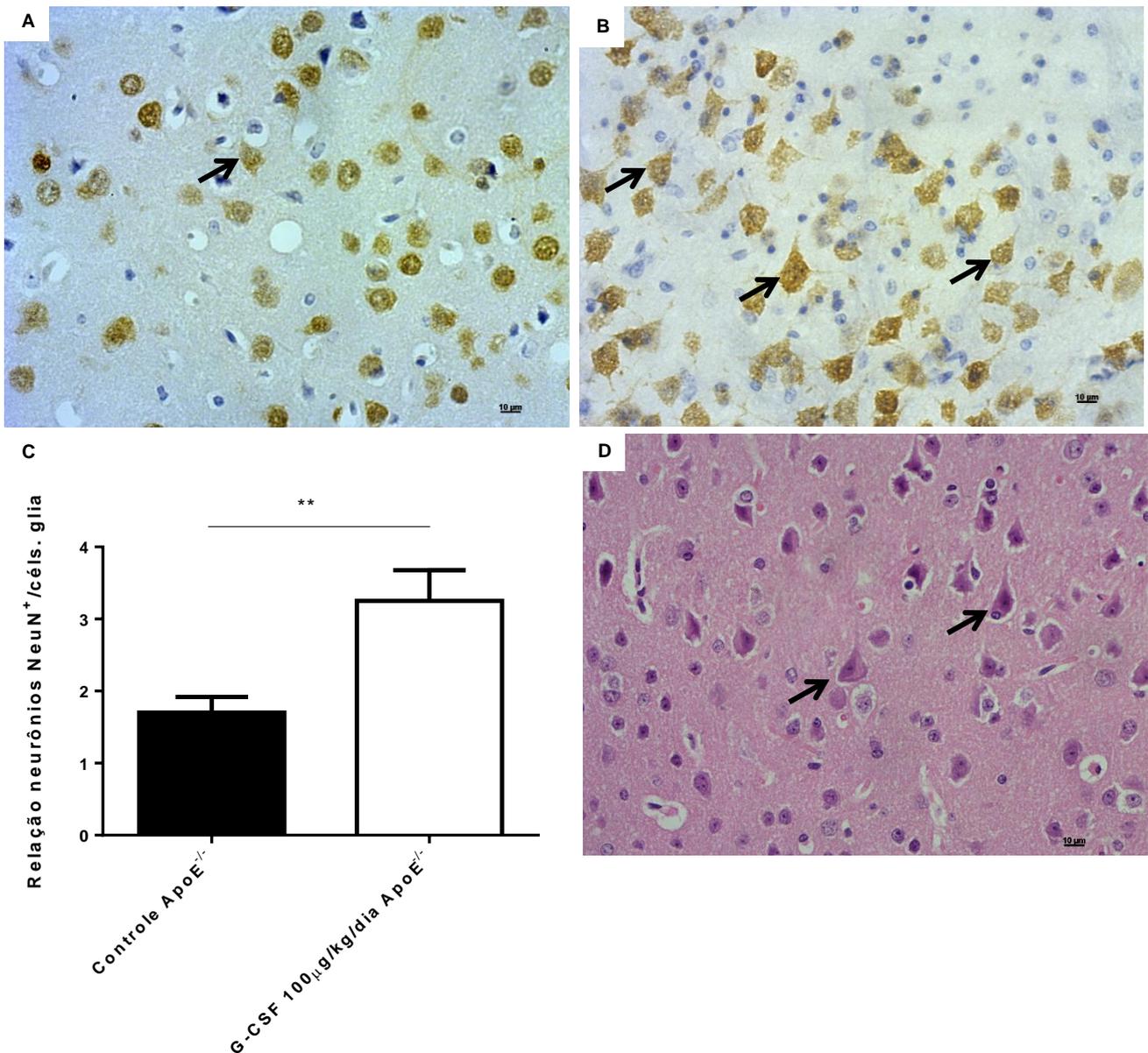
Os resultados quantitativos estão baseados na relação células positivas/negativas. As fotos utilizadas para a nossa análise foram obtidas aleatoriamente de áreas do tecido cerebral cortical de ambos os grupos.



**Figura 17.** Ensaio do TUNEL para morte celular. **A.** controle negativo sem marcação para células em morte. **B.** Grupo controle ApoE<sup>-/-</sup> que recebeu solução glicosada 5%, com numerosas células em morte marcadas (setas). **C.** Grupo ApoE<sup>-/-</sup> tratado com G-CSF na dose de 100µg/kg/dia com algumas células em morte marcadas (setas). **D.** Representação quantitativa da relação entre o número de células positivas (marcadas) e o número de células negativas (não marcadas) para o TUNEL. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM. (\*\* $p < 0,01$ , Teste *t* de Student)

### 5.8 Neurônios marcados por imunohistoquímica

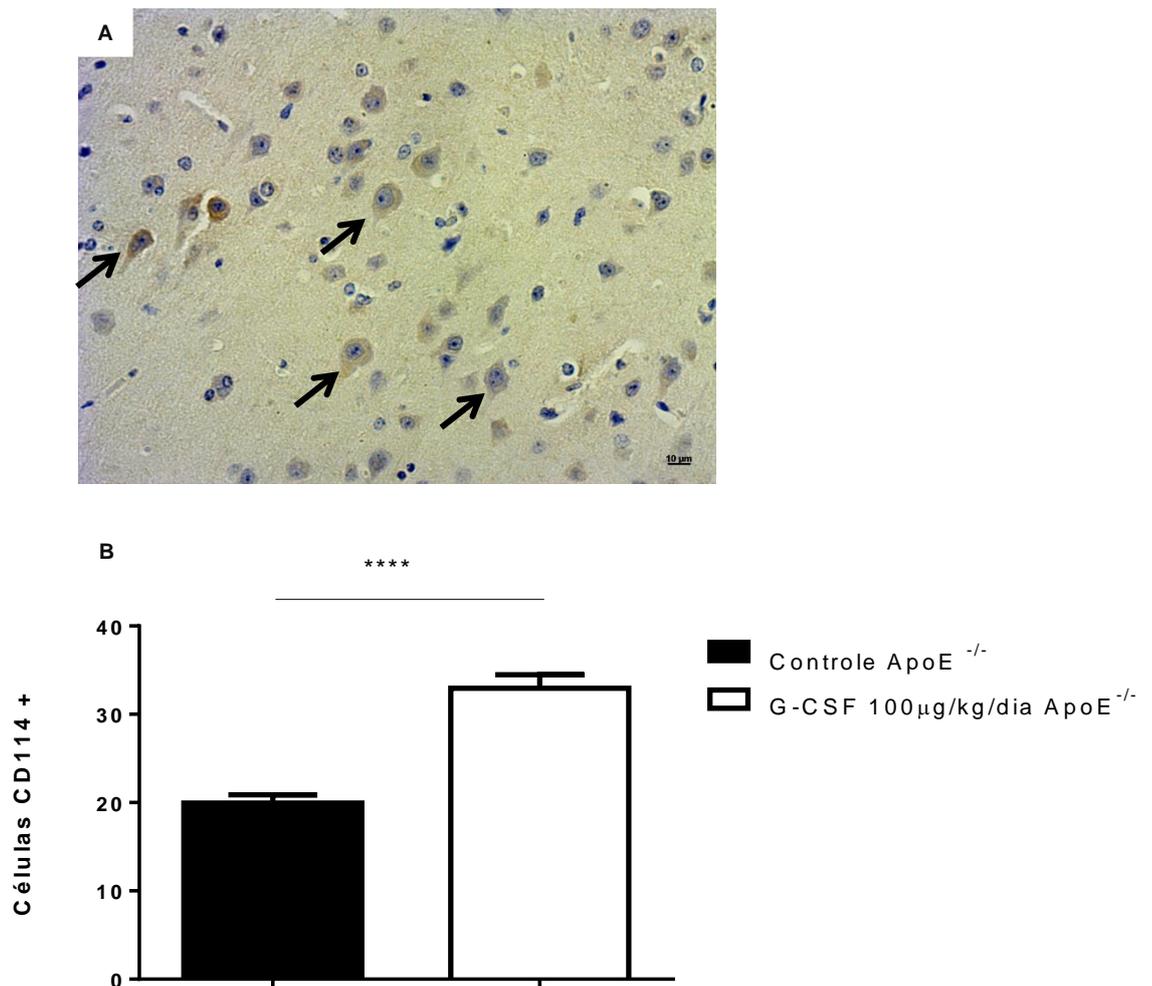
A análise quantitativa da marcação específica para células neuronais adultas, através da utilização do anticorpo anti-NeuN, mostrou presença de número de neurônios, em relação ao número de células glia, maior no grupo tratado com G-CSF ( $3,25 \pm 0,42$  células), quando comparado ao grupo controle ( $1,70 \pm 0,22$  células) (Figura 18c).



**Figura 18.** **A.** Corte histológico de região do córtex cerebral de animal do grupo controle mostrando neurônios (em marrom) marcados através da imunohistoquímica com utilização do anticorpo Anti-NeuN. **B.** Corte histológico de região do córtex cerebral de animal do grupo tratado mostrando neurônios (em marrom) marcados. **C.** Relação entre número de neurônios marcados (células NeuN positivas) e o número de células não marcadas dos grupos controle ApoE<sup>-/-</sup>, que recebeu solução glicosada 5%, e tratado com G-CSF na dose de 100µg/kg/dia ApoE<sup>-/-</sup>. **D.** Corte histológico de região do córtex cerebral corado por hematoxilina e eosina com presença de neurônios (setas) e células da glia. Magnificação 40x. Barra de escala: 10µm. Dados apresentados como média ± EPM. (\*\*p<0,01, Teste t de Student)

### 5.9 Receptores de G-CSF (G-CSF-R) marcados por imunohistoquímica

A figura 19 apresenta corte histológico com células marcadas para o receptor de G-CSF (19a, setas) e análise quantitativa da marcação de células que apresentavam o G-CSF-R através da utilização do anticorpo anti-CD114 (19b). Nota-se que o grupo tratado apresentou número maior de células positivas para a presença do receptor expresso ( $32,94 \pm 1,56$  células), quando comparado ao controle ( $19,94 \pm 0,95$  células).



**Figura 19. A.** Corte histológico de região do córtex cerebral mostrando marcação de receptores de G-CSF (setas) (G-CSF-R ou CD114) presente em células da glia e neurônios. Magnificação 40x. Barra de escala: 10 μm. **B.** Número de células CD114 (G-CSF-R) positivas dos grupos controle ApoE<sup>-/-</sup>, que recebeu solução glicosada 5%, e tratado com G-CSF na dose de 100 μg/kg/dia ApoE<sup>-/-</sup>. Dados apresentados como média ± EPM. (\*\*\*\*p<0,0001, Teste *t* de Student)

## 6 DISCUSSÃO

Como dito, o AVE é a segunda causa mais comum de mortalidade global, depois das doenças cardiovasculares, e uma das principais causas de incapacidade a longo prazo, sendo a maioria dos casos do tipo isquêmico. Como tal, tem um enorme impacto sócio econômico em todo o mundo (KUNZ; DIRNAGL; MERGENTHALER, 2010).

A partir do ano de 1970, modelos animais de isquemia cerebral foram desenvolvidos com o objetivo de identificar os mecanismos que causam os danos aos tecidos e fornecer a base para o desenvolvimento, no nível pré-clínico, de novas terapias para o AVE. Os modelos de isquemia cerebral utilizados na prática podem ser majoritariamente classificados em focais ou globais. A isquemia focal é caracterizada por uma redução do fluxo sanguíneo em uma região específica do cérebro, ao passo que na isquemia global a redução do fluxo de sangue afeta a totalidade do órgão. A isquemia focal se dá, na maioria dos casos, pela oclusão das porções média ou distal da artéria cerebral, enquanto que no modelo global faz-se a oclusão bilateral das artérias carótidas comuns acompanhada ou não da oclusão das artérias vertebrais (BACIGALUPPI; COMI; HERMANN, 2010; CASALS et al., 2011; KUNZ; DIRNAGL; MERGENTHALER, 2010).

Embora a utilização e desenvolvimento de modelos de acidente vascular em não humanos e mamíferos seja uma meta importante, os pequenos animais são preferidos para pesquisas pré-clínicas por serem bem adaptados para acidentes vasculares isquêmicos, por suas variáveis fisiológicas poderem ser monitoradas, além de ser mais viável e econômico alcançar o número suficiente de animais para adequada análise estatística. Desde que a melhor caracterização genética e molecular dos camundongos foi alcançada e muitos animais transgênicos desta espécie foram desenvolvidos um número crescente de estudos foram realizados a partir da década de 1990 (BACIGALUPPI; COMI; HERMANN, 2010).

A fim de mimetizar a isquemia cerebral nos camundongos hipercolesterolêmicos/ateroscleróticos geneticamente modificados, foi executado, neste estudo, um modelo global com oclusão de ambas as carótidas comuns, direita

e esquerda, sendo a primeira temporária e a última definitiva. O modelo foi escolhido pela relativa simplicidade da técnica e exacerbada capacidade de causar áreas de isquemia pelo cérebro podendo assim evidenciar melhor o efeito da droga testada (TRAYSTMAN, 2003).

Nem todas as células cerebrais morrem imediatamente após a oclusão de uma artéria cerebral. A taxa de morte celular no tecido cerebral afetado evolui temporal e espacialmente (KUNZ; DIRNAGL; MERGENTHALER, 2010). Astrup (1981) introduziu esse fenômeno com o conceito penumbra, segundo a qual a redução do fluxo sanguíneo cerebral é maior no centro ou "núcleo" do território isquêmico. Esta área é caracterizada por um rápido decréscimo nos níveis de ATP e estoques de energia, o que inevitavelmente resulta em falha metabólica precoce e morte celular em poucos minutos, a menos que o fluxo de sangue seja rapidamente restaurado. Em torno desse 'core' de isquemia cerebral está uma área em que a redução do fluxo sanguíneo cerebral é menos grave devido à perfusão residual de vasos colaterais. Esta região periférica do território isquêmico é denominada "penumbra isquêmica". A penumbra representa um tecido cerebral potencialmente aproveitável em que a atividade neuronal é suprimida, mas que ainda é viável (ASTRUP, 1981; KUNZ, DIRNAGL e MERGENTHALER, 2010).

O tamanho final da área de infarto depende de múltiplas circunstâncias, tais como a existência ou ausência de circulação colateral, a saúde prévia do tecido isquêmico, o "ambiente local" (excitotoxicidade, resposta inflamatória e etc.) e até mesmo a resposta genética ao insulto isquêmico. Desde a criação do conceito de penumbra, o acidente vascular encefálico isquêmico é reconhecido como um processo dinâmico e não apenas como um processo irreversível, resultando somente na morte definitiva dos neurônios. A enorme diversidade de variáveis que poderiam influenciar a evolução do AVE isquêmico levanta uma grande variedade de opções de alvos terapêuticos. Infelizmente, apesar da grande quantidade de conhecimento adquirido ao longo dos últimos 25 anos, ainda existem poucos tratamentos com eficácia clínica comprovada contra o AVE (SEGURA; CALLEJA; JORDAN, 2008).

Durante o século XX, estudos pré-clínicos identificaram pelo menos 75 agentes como potencialmente ativos e estes foram testados em 178 ensaios clínicos. Apenas

três deles foram positivos e apenas um medicamento, o rt-PA, foi registrado pelas autoridades de saúde pública mundial. Terapias farmacológicas têm o potencial de reduzir a incapacidade motora e cognitiva em uma grande parte dos pacientes que sobrevivem ao AVE. A capacidade do cérebro para se reorganizar após o evento isquêmico, através de mecanismos de plasticidade, pode ser modulada por agentes farmacológicos. Um grande número de intervenções terapêuticas está em estudo como a utilização de pequenas moléculas, fatores de crescimento, e também moléculas maiores, como os anticorpos monoclonais, e até células tronco (CHOLLET et al., 2014).

O fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) é um fator de crescimento que está envolvido na diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas para a formação de granulócitos e de neutrófilos que hoje é utilizado na clínica para o tratamento da neutropenia, principalmente em pacientes em quimioterapia antineoplásica, além de estar sendo usado para facilitar a recuperação hematopoética após transplante de medula óssea, para mobilizar as células progenitoras do sangue periférico em doadores saudáveis, e para tratar a neutropenia congênita grave. No mercado existem algumas apresentações e a liberação do comércio pela ANVISA no Brasil ocorreu no final dos anos de 1990 (SOLAROGLU et al., 2006; ANVISA, 2014).

A função natural de G-CSF na mobilização de células-tronco da medula óssea desencadeou investigações iniciais de seu uso potencial no tratamento de infarto do miocárdio e do AVE com a ideia de que mobilização poderia ser direcionada para o órgão lesionado melhorando a evolução da doença. Evidências, tanto em termos do coração quanto de cérebro, no entanto, levantaram dúvidas sobre a percepção de que a mobilização das células-tronco induzida por G-CSF é o único, ou até mesmo mais importante mecanismo deste fator hematopoiético nestes casos (DIEDERICH et al., 2014; SCHÄBITZ; SCHNEIDER, 2007; SCHNEIDER et al., 2005a).

Uma série de estudos pré-clínicos utilizando G-CSF para o tratamento de AVE isquêmico foi iniciada para responder à questão: as células mobilizadas da medula óssea é que contribuem para melhor resultado? A capacidade de células derivadas de medula óssea restaurarem a função do cérebro danificado foi de fato

demonstrada, mas o mecanismo desta ação permanece incerto (DIEDERICH et al., 2014; MINNERUP; SEVIMLI; SCHÄBITZ, 2009).

Lu e Xiao (2006) demonstraram que a injeção subcutânea de G-CSF aumentou a mobilização de células CD34<sup>+</sup> (ou seja, células precursoras hematopoiéticas) circulantes que foram observadas ao redor dos espaços perivasculares no hemisfério isquêmico, indicando que as células CD34<sup>+</sup> mobilizadas por G-CSF podem chegar aos tecidos cerebrais isquêmicos através da circulação sanguínea. Entre os mecanismos responsáveis pela maior sobrevivência e melhora das conseqüências neurológicas após a isquemia cerebral e administração do G-CSF está que as células CD34<sup>+</sup> mobilizadas integram no tecido, substituem as células danificas e promovem a reconstrução dos circuitos neurais. Outra hipótese razoável é que a interação de células CD34<sup>+</sup> com as células do parênquima do tecido isquêmico pode levar a produção de fatores tróficos, como o *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), que contribuem para a recuperação das funções neurais (LU; XIAO, 2006).

A isquemia cerebral contém vários grupos de células em diferentes estágios de apoptose ou necrose. A morte neuronal depois de isquemia pode envolver uma combinação de processos apoptóticos e necróticos mesmo no nível de cada neurônio. O cérebro de mamíferos adultos tem células-tronco neurais e células progenitoras neurais na zona subventricular anterior, na via migratória rostral, no bulbo olfatório e no DG. O G-CSF e seu receptor são também expressos em neurônios das regiões citadas e levam a um aumento na população de células que expressam marcadores neuronais maduros, indicando sua função de regular a diferenciação de células tronco e progenitoras neuronais adultas (LU; XIAO, 2006; SCHNEIDER et al., 2005a).

Uma primeira indicação de um potencial efeito sobre as células do tecido cerebral surgiu com a observação que o G-CSF teve um efeito protetor direto nos neurônios cultivados *in vitro* e submetidos à indução de morte celular pela presença de glutamato. Após a isquemia cerebral, G-CSF endógeno é provavelmente liberado para atuação no receptor (G-CSF-R) que está super expresso em regiões periisquêmicas em risco, a chamada penumbra, podendo fornecer proteção contra a

morte de neurônios por apoptose. Schneider mostrou que, após a interação com seu receptor, o G-CSF atua através da via JAK de sinalização e ativa três rotas anti-apoptóticas independentes: a do transdutor de sinal e ativação de transcrição (STAT3), da quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K/Akt) (CHOI et al., 2011; MINNERUP; SEVIMLI; SCHÄBITZ, 2009; SCHÄBITZ et al., 2003).

O principal efeito na atuação do G-CSF é visto através da via PI3K/Akt, já que a ativação de PI3K responde por sua atividade anti-apoptótica. Em células hematopoiéticas, o G-CSF ativa as vias de sinalização intracelular, incluindo STAT3 e Akt, os quais são ligados à supressão da apoptose e proliferação. Por isso, a sinalização de G-CSF e o seu papel na supressão de apoptose parecem ser conservados tanto em células da linhagem hematopoiética quanto em neurônios. O envolvimento da via antiapoptótica PI3K/Akt em neurônios é o mais provável mecanismo para o efeito de redução do volume de infarto agudo após tratamento com G-CSF (SCHNEIDER et al., 2005a; SOLAROGLU et al., 2009).

O teste do TUNEL foi utilizado neste estudo para avaliar a ação do G-CSF sobre morte celular induzida no tecido cerebral pela oclusão carotídea e consequente isquemia tecidual. As células positivas para o TUNEL estavam em menor número no grupo tratado com G-CSF quando comparado ao controle, nas primeiras 48 horas após o evento isquêmico. Resultado semelhante foi encontrado por Matchett *et al.* (2008) ao submeter ratos a oclusão bicarotídea e tratamento com G-CSF 50µg/kg/dia antes e após ao dia da cirurgia e por Hong et al. (2012) que avaliou ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média, na presença de hiperlipidemia, e tratados com G-CSF 50µg/kg/dia por 5 dias (HONG et al., 2012; MATCHETT et al., 2008). Tais achados evidenciam o papel do G-CSF na inibição da morte celular no tecido cerebral.

Além dos mecanismos citados acima, o G-CSF pode atuar através da indução da angiogênese, ou seja, formação de novos vasos sanguíneos, restaurando o fornecimento de sangue e, conseqüentemente, reduzindo a área da isquemia e também através de efeitos antiinflamatórios ao diminuir expressão de TNF- $\alpha$ , iNOS e TGF $\beta$ , mediadores pró-inflamatórios (HONG et al., 2012; SEHARA et al., 2007).

Minnerup et al. (2008) revisaram 13 estudos que avaliaram a eficácia do G-CSF em modelos animais de isquemia cerebral focal num total de 277 animais, utilizados para determinar o tamanho da área do infarto, e 258 animais utilizados para fins avaliação de resultados funcionais. A redução global do tamanho do infarto foi de 42% e melhora funcional de déficits sensório-motores de 24% a 40% foi observada. Neste mesmo estudo, a eficácia aguda do G-CSF (no prazo de 6 horas) pareceu ser dependente da dose, e o seu efeito benéfico após a administração tardia também foi confirmada (MINNERUP et al., 2008).

A maioria dos estudos pré-clínicos não consideram as comorbidades, tais como hipercolesterolemia, que estão frequentemente presentes em pacientes que sofrem um AVE. A hipercolesterolemia não só promove o desenvolvimento da placa aterosclerótica, mas também induz a inflamação local na parede de vasos e de artérias periféricas, situação esta associada com grandes alterações sistêmicas, afetando quase todos os subtipos de células do sistema imune inato e adaptativo (HERZ et al., 2014). Existem evidências de que os fatores inflamatórios fora do cérebro marcadamente influenciam na susceptibilidade ao AVE e em suas consequências. A inflamação sistêmica exacerba o dano cerebral em modelos animais experimentais de isquemia cerebral (AYATA et al., 2013; HERZ et al., 2014; KIM et al., 2008).

A hiperlipidemia promove o aumento do estresse oxidativo e eleva o risco para o AVE aterotrombótico e cardioembólico. No entanto, o seu impacto sobre a regulação cerebrovascular no órgão normal ou isquêmico é pouco compreendida. Independente de estenoses ateroscleróticas, a hiperlipidemia prejudica a função endotelial e do músculo liso em artérias sistêmicas e cerebrais e perturba relaxamento dependente do endotélio das artérias carótidas e basilar. Além disso, lipoproteínas de baixa densidade oxidadas aumentam o recrutamento de leucócitos na microvasculatura. Portanto, a hiperlipidemia pode ter impacto na fisiologia vascular cerebral através do endotélio, músculo liso, e células circulantes (AYATA et al., 2013).

A redução significativa da área de lesão cerebral encontrada neste estudo, em animais hipercolesterolêmicos, também foi mostrada por Sugiyama (2011), o qual demonstrou redução da média de volume de infarto por administração de G-CSF após oclusão unilateral da artéria carótida comum (SUGIYAMA et al., 2011). Os achados estão ainda de acordo com os de Gibson, Bath e Murphy (2005) e Schäbitz et al. (2003) que, no caso, ao utilizarem o modelo de isquemia cerebral focal, com oclusão da artéria cerebral média por 60 e 90 minutos acompanhada por tratamento com G-CSF 50µg/kg em camundongos e 60µg/kg em ratos, respectivamente, mostraram redução da área de infarto cerebral no grupo tratado em 45 e 47% (GIBSON; BATH; MURPHY, 2005; SCHÄBITZ et al., 2003).

Observou-se ainda, ao compararmos somente os grupos controles C57BL/6 e ApoE<sup>-/-</sup>, uma área mais exacerbada de isquemia nos animais hipercolesterolêmicos. Tal observação foi constatada por Herz et al. (2014) ao submeter dois grupos de animais, um ApoE *knockout* e outro C57BL/6, ambos com dietas hipercolesterolêmicas, a isquemia cerebral focal e comparação das áreas de infarto cerebral (HERZ et al., 2014). No estudo de Elali et al. (2011) a condição aterosclerótica exacerbou também o edema cerebral de camundongos ApoE<sup>-/-</sup> submetidos a oclusão da artéria cerebral média quando comparados aos C57BL/6 ditos selvagens (ELALI et al., 2011).

As medidas de peso úmido do baço em relação ao peso corporal e a dosagem de colesterol total plasmático foram mensuradas para que pudessemos avaliar possível efeito do G-CSF alterando a função esplênica e a condição aterosclerótica, respectivamente. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos para a relação peso úmido baço/peso animal possivelmente devido ao curto prazo de tratamento previsto no estudo não sendo possível notar ainda aumento estatístico no volume do órgão devido ao aumento do número de leucócitos circulantes nos animais tratados com G-CSF, ainda que Doycheva et al. (2013) também não tenham encontrado diferença significativa ao tratar ratos com 50µg/kg/dia de G-CSF por 5 dias e avaliada a relação peso baço/peso corporal após 14 dias da cirurgia de oclusão carotídea (DOYCHEVA D, SHIH G, CHEN H, APPLGATE R, ZHANG J H, 2013).

Os níveis de colesterol plasmático total nos grupos ApoE<sup>-/-</sup>, já elevados pela condição aterosclerótica pré-existente, não foram alterados pelo tratamento com o G-CSF. Resultado semelhante foi encontrado por Matsumoto et al. (2010) em coelhos que receberam dieta hipercolesterolêmica e foram tratados com 100 µg/kg/dia de G-CSF por 5 dias e também por Hasegawa et al. (2006), nos quais os níveis de colesterol total não foram diferentes entre os grupos (HASEGAWA et al., 2006; MATSUMOTO et al., 2009).

O teste de força utilizado, baseado num modelo descrito por Kilic et al. (2008), com modificações, permitiu avaliar um dos sintomas mais marcantes após um evento isquêmico cerebral: a perda de força e/ou movimento principalmente em membros (KILIC et al., 2008). No modelo de isquemia desenvolvido, o teste foi capaz de detectar diminuição estatística da média de força após a cirurgia de oclusão das artérias carótidas, não observada no grupo que recebeu tratamento com G-CSF 100µg/kg/dia. A diminuição da área macroscópica de infarto cerebral juntamente com a preservação da força muscular pós-cirurgia, e constatado o aumento do número de leucócitos circulantes, nos animais tratados, contribuem para evidenciar o efetivo papel neuroprotetor do G-CSF.

De acordo com Harrison et al. (2003), um grande número de estudos em animais experimentais tem mostrado que a hipercolesterolemia aumenta a produção de radicais livres de oxigênio, não apenas por células endoteliais, mas também por células de músculo liso e células da adventícia de artérias. Estes radicais livres iniciam vários processos envolvidos na aterogênese, incluindo expressão de moléculas de adesão, estimulação da proliferação de músculo liso vascular, apoptose no endotélio, oxidação de lipídios, de proteínas e etc. e representam um dos principais fatores de risco para o AVE isquêmico (HARRISON et al., 2003) .

O estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como superóxido (O<sup>2•-</sup>) e hidroxila (radicais OH), com defesas antioxidantes, o que leva a danos oxidativos de lipídios, proteínas e DNA. O corpo humano tem desenvolvido vários mecanismos para proteger as biomoléculas contra os efeitos deletérios de ROS. Estes incluem as enzimas antioxidantes, como o superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutational

redutase (GSSG-R), a glutathiona peroxidase (GSHPx), bem como antioxidantes solúveis em água e em lípidios, tais como GSH, ascorbato (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) e  $\beta$ -caroteno (ALBUALI, 2014).

As proteínas são os principais alvos para o dano oxidativo *in vivo* devido à sua relativa abundância e a sua capacidade de eliminar algumas espécies reativas que são geradas durante o estresse oxidativo. As reações de oxidação induzem a modificação de resíduos de aminoácidos, alteram a estrutura e função de proteínas, e podem também levar à formação de ligações cruzadas de proteína e a fragmentação. A acumulação de produtos de proteínas oxidadas aumenta durante o processo normal de envelhecimento e é causalmente relacionada a diversas doenças relacionadas à idade e/ou crônicas. Uma família de compostos oxidados de proteínas plasmáticas, denominada "*advanced oxidation protein products*" (AOPP), se acumula em diversos distúrbios tais como diabetes mellitus, síndrome metabólica, aterosclerose, doença arterial coronariana e doença renal crônica. Os AOPP são um grupo de produtos de proteína que contém ditirosinas, pentosidinas e carbonilas geradas pela reação de proteínas plasmáticas com ácido hipocloroso (HOCl) e cloraminas durante o estresse oxidativo, geralmente carregadas pela albumina na circulação sanguínea (COLOMBO et al., 2014).

Os valores plasmáticos das AOPP não foram influenciados pelo tratamento com G-CSF nos grupos ApoE<sup>-/-</sup>. Ao compararmos os grupos controles C57BL/6 e ApoE<sup>-/-</sup> notamos que a condição hipercolesterolêmica aumenta marcadamente a quantidade dos produtos oxidados plasmáticos corroborando para a evidencia da sua contribuição no processo da aterogênese.

A análise imunohistoquímica nos permitiu avaliar o número de neurônios nos cortes histológicos através da utilização do anticorpo anti-NeuN específico para neurônios maduros e também avaliar a presença do receptor de G-CSF, o G-CSF-R ou CD114, nas células cerebrais através da utilização do anticorpo anti-CD114. Nossos achados permitem inferir, novamente, que o tratamento com G-CSF previne a morte celular, mais especificamente agora a morte neuronal, vista pela presença de maior número destas células no tecido tratado quando comparado ao controle. Resultado semelhante foi descrito por Solaroglu et al (2009) que, juntamente com aumento do

número de células NeuN positivas após 24 horas de tratamento com uma única dose de G-CSF, mostrou a diminuição da expressão, através de imunoblot, de enzimas como caspase-3 ativada envolvidas no processo de apoptose desencadeado pela indução da isquemia cerebral evidenciando esta via como a provável responsável pela neuroproteção (SOLAROGLU et al., 2009).

Encontramos também maior número de células expressando o receptor para o fator de crescimento no tecido tratado indicando que o tratamento tem papel regulatório estimulando provavelmente a expressão do receptor que já sofre *upregulation* influenciada pelo próprio evento isquêmico como descrito por Schneider *et al.* (2005) que mostrou indução do mRNA, do G-CSF-R 6 horas após indução de isquemia por oclusão da artéria cerebral média além de indução da produção do ligante G-CSF (SCHNEIDER et al., 2005b).

## 7. CONCLUSÕES

- O tratamento com o G-CSF 100µg/kg/dia por dois dias preveniu a exacerbação da área de infarto cerebral e preservou a força muscular pós cirurgia de indução da isquemia cerebral global;
- Não alterou os níveis plasmáticos de colesterol total dos animais ApoE<sup>-/-</sup>, nem os níveis plasmáticos de produtos de oxidação proteica, utilizado como parâmetro para mensurar o estresse oxidativo plasmático;
- Preveniu a morte celular visto que o grupo tratado apresentou relação de células positivas/células negativas para o TUNEL menor quando comparado ao grupo controle, ou seja, menos células em morte celular. Além disso, após marcação específica para neurônios, a quantidade destes, em relação as células da glia, no tecido cerebral de animais do grupo tratado estava significativamente maior em relação ao grupo controle;
- Pareceu promover *upregulation* dos receptores G-CSF-R visto a maior presença destes no tecido cerebral dos animais tratados quando comparados ao controle.

Ao considerarmos os achados acima descritos juntamente com o aumento significativo da contagem de leucócitos totais sanguíneos e tendência de maior relação peso baço/peso corporal no grupo tratado com G-CSF este estudo evidenciou a atuação do fármaco sistemicamente e corroborou para atribuição do efeito neuroprotetor encontrado ao G-CSF mesmo na presença da hipercolesterolemia e aumento do estresse oxidativo plasmático.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Consulta de Registro de Medicamentos. Disponível em: [http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta\\_Produto/rconsulta\\_produto\\_detalhe.asp](http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto/rconsulta_produto_detalhe.asp)

ALBERS, G. W. et al. Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). **Chest**, v. 133, n. 6 Suppl, p. 630S–669S, jun. 2008.

ALBERTSON M, SHARMA J. Stroke: current concepts. **South Dakota Medicine : the Journal of the South Dakota State Medical Association**, v. 67, n. 11, 2014.

ALBUALI, W. H. Evaluation of oxidant-antioxidant status in overweight and morbidly obese Saudi children. **World journal of clinical pediatrics**, v. 3, n. 1, p. 6–13, fev. 2014.

ASTRUP J, S. B. & S. L. Thresholds in Cerebral Ischemia — The Ischemic Penumbra. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 12, n. December, 1981.

AYATA, C. et al. Hyperlipidemia disrupts cerebrovascular reflexes and worsens ischemic perfusion defect. **Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 33, n. 6, p. 954–62, jun. 2013.

BACIGALUPPI, M.; COMI, G.; HERMANN, D. M. Animal models of ischemic stroke. Part two: modeling cerebral ischemia. **The open neurology journal**, v. 4, p. 34–8, jan. 2010.

BALDWIN, K. et al. Acute Ischemic Stroke Update. **Pharmacotherapy**, v. 30, n. 5, 2010.

BARTOLINI, A. et al. G-CSF administration to adult mice stimulates the proliferation of microglia but does not modify the outcome of ischemic injury. **Neurobiology of disease**, v. 41, n. 3, p. 640–649, mar. 2011.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Portaria nº 664, de 12 de abril de 2012 do Ministério da Saúde.

BRETÓN, R. R.; CÉSAR, J.; RODRÍGUEZ, G. Excitotoxicity and Oxidative Stress in Acute Ischemic Stroke. In: **Acute Ischemic Stroke - InTechOpen**, 2012.

CASALS, J. B. et al. The use of animal models for stroke research: a review. **Comparative medicine**, v. 61, n. 4, p. 305–13, ago. 2011.

CHIBA, T.; UMEGAKI, K. Pivotal roles of monocytes/macrophages in stroke. **Mediators of inflammation**, v. 2013, p. 759103, jan. 2013.

CHOI, J. K. et al. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor shows anti-apoptotic activity in neural progenitor cells via JAK/STAT5-Bcl-2 pathway. **Apoptosis : an international journal on programmed cell death**, v. 16, n. 2, p. 127–34, fev. 2011.

CHOLLET, F. et al. Pharmacological therapies in post stroke recovery: recommendations for future clinical trials. **Journal of neurology**, v. 261, n. 8, p. 1461–8, ago. 2014.

COLOMBO, G. et al. A central role for intermolecular dityrosine cross-linking of fibrinogen in high molecular weight advanced oxidation protein product (AOPP) formation. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1850, n. 1, p. 1–12, out. 2014.

DATASUS. Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde. Mortalidade e Morbidade de 1996 a 2012. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205>.

D'USCIO, L. V.; SMITH, L. A.; KATUSIC, Z. S. Hypercholesterolemia Impairs Endothelium-Dependent Relaxations in Common Carotid Arteries of Apolipoprotein E-Deficient Mice. **Stroke**, v. 32, n. 11, p. 2658–2664, 1 nov. 2001.

DANIELS, T. F. et al. Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. **International journal of biological sciences**, v. 5, n. 5, p. 474–88, jan. 2009.

DAVIGNON, J.; GANZ, P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Circulation**, v. 109, n. 23 Suppl 1, p. III27–32, 15 jun. 2004.

DIEDERICH, K. et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) treatment in combination with transplantation of bone marrow cells is not superior to G-CSF treatment alone after cortical stroke in spontaneously hypertensive rats. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, n. December, p. 1–9, 2014.

DIETRICH, H. H. Apolipoprotein E in hypercholesteremia and beyond. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 38, n. 7, p. 2036, jul. 2007.

DONNAN, G. A. et al. Stroke. **The Lancet**, v. 371, 2008.

DOYCHEVA D, SHIH G, CHEN H, APPLGATE R, ZHANG J H, T. J. Granulocyte-colony stimulating factor in combination with stem cell factor confers greater neuroprotection after hypoxic- ischemic brain damage in the neonatal rats than a solitary treatment. **Translational Stroke Research**, v. 4, n. 2, p. 171–178, 2013.

DRAKE, C. et al. Brain inflammation is induced by co-morbidities and risk factors for stroke. **Brain, behavior, and immunity**, v. 25, n. 6, p. 1113–22, ago. 2011.

ELALI, A. et al. Increased blood-brain barrier permeability and brain edema after focal cerebral ischemia induced by hyperlipidemia: role of lipid peroxidation and calpain-1/2, matrix metalloproteinase-2/9, and RhoA overactivation. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 42, n. 11, p. 3238–44, nov. 2011.

FLYNN, R. W. V; MACWALTER, R. S. M.; DONEY, A. S. F. The cost of cerebral ischaemia. **Neuropharmacology**, v. 55, p. 250–256, 2008.

FOWLER, S. . et al. Motor and associative deficits in D2 dopamine receptor knockout mice. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 20, n. 3-5, p. 309–321, jun. 2002.

GIBSON, C. L.; BATH, P. M. W.; MURPHY, S. P. G-CSF reduces infarct volume and improves functional outcome after transient focal cerebral ischemia in mice. **Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 25, n. 4, p. 431–439, abr. 2005.

GO, A. S. et al. **AHA Statistical Update Heart Disease and Stroke Statistics — 2014 Update A Report From the American Heart Association WRITING GROUP MEMBERS**. [s.l.: s.n.].

GREENBERG, D. A.; JIN, K. Growth factors and stroke. **NeuroRx: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 3, n. 4, p. 458–65, out. 2006.

GYENGESI, E.; PAXINOS, G.; ANDREWS, Z. B. Oxidative Stress in the Hypothalamus: the Importance of Calcium Signaling and Mitochondrial ROS in Body Weight Regulation. **Current neuropharmacology**, v. 10, p. 344–53, 2012.

HARRISON, D. et al. Role of oxidative stress in atherosclerosis. **The American journal of cardiology**, v. 91, n. 02, p. 7A–11A, 2003.

HASEGAWA, H. et al. G-CSF prevents the progression of atherosclerosis and neointimal formation in rabbits. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 344, p. 370–376, 2006.

HERZ, J. et al. Exacerbation of ischemic brain injury in hypercholesterolemic mice is associated with pronounced changes in peripheral and cerebral immune responses. **Neurobiology of Disease**, v. 62, p. 456–468, fev. 2014.

HONG, Y. et al. Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor in a focal cerebral ischemic rat model with hyperlipidemia. **Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban**, v. 32, n. 6, p. 872–8, dez. 2012.

KAWADA, H. et al. Administration of hematopoietic cytokines in the subacute phase after cerebral infarction is effective for functional recovery facilitating proliferation of intrinsic neural stem/progenitor cells and transition of bone marrow-derived neuronal cells. **Circulation**, v. 113, n. 5, p. 701–10, 7 fev. 2006.

KILIC, E. et al. Delayed melatonin administration promotes neuronal survival, neurogenesis and motor recovery, and attenuates hyperactivity and anxiety after mild focal cerebral ischemia in mice. **Journal of pineal research**, v. 45, n. 2, p. 142–8, set. 2008.

KIM, E. et al. CD36/fatty acid translocase, an inflammatory mediator, is involved in hyperlipidemia-induced exacerbation in ischemic brain injury. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 18, p. 4661–70, 30 abr. 2008.

KITAYAMA, J. et al. Cerebral vascular dysfunction during hypercholesterolemia. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 38, n. 7, p. 2136–41, jul. 2007.

KUNZ, A.; DIRNAGL, U.; MERGENTHALER, P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. **Best practice & research. Clinical anaesthesiology**, v. 24, n. 4, p. 495–509, dez. 2010.

LANFRANCONI, S. et al. **Growth factors in ischemic stroke** **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, ago. 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1582-4934.2009.00987.x/full>>. Acesso em: 9 jan. 2015

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; HANSSON, G. K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 317–25, 19 maio 2011.

LU, C.-Z.; XIAO, B.-G. G-CSF and neuroprotection: a therapeutic perspective in cerebral ischaemia. **Biochemical Society transactions**, v. 34, n. Pt 6, p. 1327–33, dez. 2006.

MATCHETT, G. A. et al. The effect of granulocyte-colony stimulating factor in global cerebral ischemia in rats. **Brain Research**, v. 1136, n. 1, p. 200–207, 2008.

MATSUMOTO, T. et al. Appropriate doses of Granulocyte-Colony Stimulating Factor Reduced Atherosclerotic Plaque Formation and Increased Plaque Stability in Cholesterol-Fed Rabbits. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, p. 84–96, 2009.

MATTER, C. M. et al. Increased balloon-induced inflammation, proliferation, and neointima formation in apolipoprotein E (ApoE) knockout mice. **Stroke**, v. 37, n. 10, p. 2625–2632, out. 2006.

MEIR, K. S.; LEITERSDORF, E. Atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse: A decade of progress. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, p. 1006–1014, 2004.

MINNERUP, J. et al. Meta-analysis of the efficacy of granulocyte-colony stimulating factor in animal models of focal cerebral ischemia. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 39, n. 6, p. 1855–61, jun. 2008.

MINNERUP, J.; SEVIMLI, S.; SCHÄBITZ, W.-R. Granulocyte-colony stimulating factor for stroke treatment: mechanisms of action and efficacy in preclinical studies. **Experimental & translational stroke medicine**, v. 1, p. 2, jan. 2009.

NAKASHIMA, Y. et al. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. **Arteriosclerosis and thrombosis: a journal of vascular biology / American Heart Association**, v. 14, n. 1, p. 133–140, 1994.

NESIS, S. G. Indicadores de Saúde Espírito Santo 2012. 2012.

PIEDRAHITA, J. A et al. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. May, p. 4471–4475, 1992.

PLUMP, A. S. et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. **Cell**, v. 71, p. 343–353, 1992.

REN, J. M.; FINKLESTEIN, S. P. Growth factor treatment of stroke. **Current drug targets. CNS and neurological disorders**, v. 4, n. 2, p. 121–5, abr. 2005.

RODRIGO, R. et al. Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 12, n. 5, p. 698–714, ago. 2013.

SACCO, R. L. et al. An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 44, n. 7, p. 2064–89, jul. 2013.

SAHOTA, P.; SAVITZ, S. I. Investigational therapies for ischemic stroke: neuroprotection and neurorecovery. **Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 8, n. 3, p. 434–51, jul. 2011.

SCHÄBITZ, W.-R. et al. Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 34, n. 3, p. 745–751, mar. 2003.

SCHÄBITZ, W.-R.; SCHNEIDER, A. New targets for established proteins: exploring G-CSF for the treatment of stroke. **Trends in pharmacological sciences**, v. 28, n. 4, p. 157–61, abr. 2007.

SCHNEIDER, A. et al. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 8, p. 2083–2098, 2005a.

SCHNEIDER, A. et al. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 8, p. 2083–98, ago. 2005b.

SEGURA, T.; CALLEJA, S.; JORDAN, J. Recommendations and treatment strategies for the management of acute ischemic stroke. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 9, n. 7, p. 1071–85, maio 2008.

SEHARA, Y. et al. Decreased focal inflammatory response by G-CSF may improve stroke outcome after transient middle cerebral artery occlusion in rats. **Journal of neuroscience research**, v. 85, n. 10, p. 2167–74, 1 ago. 2007.

SILBERMAN, G. A. et al. Uncoupled cardiac nitric oxide synthase mediates diastolic dysfunction. **Circulation**, v. 121, n. 4, p. 519–528, 2010.

SOLAROGLU, I. et al. A novel neuroprotectant granulocyte-colony stimulating factor. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 37, n. 4, p. 1123–8, abr. 2006.

SOLAROGLU, I. et al. Granulocyte colony-stimulating factor protects the brain against experimental stroke via inhibition of apoptosis and inflammation. **Neurological research**, v. 31, n. 2, p. 167–72, mar. 2009.

STOLL, G.; BENDSZUS, M. Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 37, n. 7, p. 1923–32, jul. 2006.

SUGIYAMA, Y. et al. Granulocyte colony-stimulating factor enhances arteriogenesis and ameliorates cerebral damage in a mouse model of ischemic stroke. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 42, n. 3, p. 770–5, mar. 2011.

TILSON, H.; CABE, P. Assessment of chemically-induced changes in the neuromuscular function of rats using a new recording grip meter. **Life sciences**, v. 23, p. 1365–1370, 1978.

TRAYSTMAN, R. J. Animal Models of Focal and Global Cerebral Ischemia. **ILAR Journal**, v. 44, n. 2, p. 85–95, 2003.

TSIVGOULIS, G.; KATSANOS, A. H.; ALEXANDROV, A. V. Reperfusion therapies of acute ischemic stroke: potentials and failures. **Frontiers in neurology**, v. 5, n. November, p. 215, jan. 2014.

V DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, n. 4, 2013.

WANG, W. et al. Hemorrhagic Transformation after Tissue Plasminogen Activator Reperfusion Therapy for Ischemic Stroke: Mechanisms, Models, and Biomarkers. **Molecular neurobiology**, nov. 2014.

WARD, A. C. et al. Multiple Signals Mediate Proliferation, Differentiation, and Survival from the Granulocyte Colony-stimulating Factor Receptor in Myeloid 32D Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 21, p. 14956–14962, 21 maio 1999.

WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney international**, v. 49, n. 5, p. 1304–1313, 1996.

YONEKURA, I. et al. A model of global cerebral ischemia in C57 BL/6 mice. **Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 24, n. 2, p. 151–158, fev. 2004.

ZHANG, S. H. et al. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. **Science**, v. 258, n. 5081, p. 468–71, 16 out. 1992.

ZHAO, L. R. et al. Brain repair by hematopoietic growth factors in a rat model of stroke. **Stroke**, v. 38, n. 9, p. 2584–2591, set. 2007.

ZHAO, L. R. et al. The role of stem cell factor and granulocyte-colony stimulating factor in treatment of stroke. **Recent patents on CNS drug discovery**, v. 8, n. 1, p. 2–12, abr. 2013.

WHO. World Health Organization. **The 10 leading causes of death in the world**. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>. (accessed November 15, 2014).

## 9. ANEXO



**EMESCAM**

Tradição e Conhecimento em Saúde

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 011/2011, relativo ao projeto intitulado "**Terapia com Fatores de Crescimento Celular na Isquemia Cerebral de Camundongos Ateroscleróticos**", que tem como responsável **Breno Valentim Nogueira** está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, Adotados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-EMESCAM), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 22/09/2011. Este certificado expira-se em 22/09/2015.

We hereby certify that the Protocol nº 011/2011, related to the project entitled "**Cell Growth Factors Therapy In Atherosclerotic Stroke Mice**", under the supervision of **Breno Valentim Nogueira**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA-EMESCAM), and was approved in 22/09/2011.

*Danielo Nagib Salomão Paulo*  
Danielo Nagib Salomão Paulo  
Coordenador do CEUA-EMESCAM

