

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

KAMILA BRISON CRICO

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DOS FATORES  
DE CRESCIMENTO CELULAR EPO E G-CSF EM MODELO DE  
ISQUEMIA CEREBRAL**

VITÓRIA-ES

2017

KAMILA BRISON CRICO

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DOS FATORES  
DE CRESCIMENTO CELULAR EPO E G-CSF EM MODELO DE  
ISQUEMIA CEREBRAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira

VITÓRIA-ES

2017

KAMILA BRISON CRICO

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DOS FATORES  
DE CRESCIMENTO CELULAR EPO E G-CSF EM MODELO DE  
ISQUEMIA CEREBRAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Aprovada em 14/03/2017 por:

---

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira, Orientador - UFES

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Cristina Martins e Silva, UFES

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Renata Dalmaschio Daltoé, UFES

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que me sustentou ao longo dessa jornada, e não permitiu que eu desistisse mesmo com todas as dificuldades que surgiram no caminho.

Aos meus pais, Pedro e Nilzete, que sempre tiveram como prioridade a minha educação, me apoiaram de todas as formas, em todos os momentos, e torceram sempre por mim.

A minha tia Tereza e sua família, que me acolheram como uma filha em sua casa durante a realização do mestrado. Não tenho como agradecer tudo o que fizeram por mim!

Ao professor Dr. Breno Valentim Nogueira, pela orientação na realização deste trabalho, compreensão e paciência.

Aos companheiros do LUCAR, pelo conhecimento compartilhado, orientações em protocolos e ajuda nos experimentos. Agradeço em especial a Brunelli, Brenna e Lohayne pela ajuda no início dos trabalhos. A Valmara, Mateus e Natália pela colaboração em boa parte dos experimentos. Agradeço imensamente a Gabriela e Suzanny, pela imensa ajuda na imunohistoquímica!

À professora Cristina e colegas do LNMC, especialmente Tassiane, pela ajuda nos primeiros testes comportamentais e cirurgias, e Lara, pela amizade e colaboração.

Aos colegas de trabalho da Prefeitura de Rio Novo do Sul, em especial Creuzinha, Selma e Marcia, pela compreensão e ajuda durante minhas ausências.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia, que tanto contribuíram em minha formação.

Ao meu namorado Marlon, pelo apoio incondicional e por me acompanhar nos experimentos nos finais de semana.

A minha irmã, Ana Paula, avós Maria e Antônio, e amigos que sempre estiveram na torcida...

À FAPES pelo auxílio financeiro.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse até aqui, deixo o meu 'Muito obrigada'!

*“Só os que se arriscam a ir longe demais são  
capazes de descobrir o quão longe se pode ir”*

Thomas Stearns Eliot

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática dos eventos que levam a morte celular no AVEi.....	19
<b>Figura 2</b> - Representação esquemática da cascata de sinalização desencadeada por G-CSF.....	28
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática das vias de sinalização relacionadas à sobrevivência, proliferação e diferenciação celular, induzidas por EPO.....	31
<b>Figura 4</b> – Desenho Experimental .....	34
<b>Figura 5</b> - Demonstração do teste de resistência de agarre.....	36
<b>Figura 6</b> - Demonstração do teste de força.....	37
<b>Figura 7</b> - Peso relativo do baço dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	41
<b>Figura 8</b> - Tempo de latência para queda dos animais.....	42
<b>Figura 9</b> - Mensuração da força muscular ( <i>grip strenght</i> ).....	42
<b>Figura 10</b> - Tempo de descida no teste de escalada em haste vertical.....	43
<b>Figura 11</b> - Contagem de leucócitos.....	44
<b>Figura 12</b> - Contagem de eritrócitos.....	45
<b>Figura 13</b> – Cortes coronais de cérebros corados com TTC.....	45
<b>Figura 14</b> - Área macroscópica de infarto cerebral em relação à área cerebral total (%)......	46
<b>Figura 15.A.</b> - Corte histológico de região do córtex cerebral corado por hematoxilina e eosina com presença de neurônios (setas) e células da glia.....	47

**Figura 15.B.** - Relação entre o número de neurônios/células da glia (n=5)..... 47

## LISTA DE ABREVIATURAS

AK: Cainato

AMPA: Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AVE: Acidente Vascular Encefálico

AVEi: Acidente Vascular Encefálico Isquêmico

ATP: Trifosfato de adenosina

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CID 10: Código Internacional de Doenças

DPX: p-xylene-bis (N-pyridinium bromide)

EPM: erro padrão da média

EPO: Eritropoetina

EPOR: Receptor de Eritropoetina

EPOrh: Eritropoetina recombinante

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

FCs: Fatores de crescimento

FDA: *Food and Drug Administration*

G-CSF: Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos

G-CSFR: Receptor do Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos

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

HIF: *Hypoxia-Inducible Transcription Fator* – Fator de Transcrição Induzido por Hipóxia

IGluRs: Receptores glutamatérgicos ionotrópicos

IL: Interleucina

i.p.: Intraperitoneal

JAK: *Janus kinase*

MAPK: Proteína cinase ativada por mitógenos

mGluRs: Receptores glutamatérgicos metabotrópicos

MMPs: Metaloproteinases de matriz

MO: Medula óssea

NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: Óxido nítrico

OMS: Organização Mundial de Saúde

PBS: *Phosphate buffered saline* - Tampão fosfato salino

PI3K: *Phosphoinositide-3-kinase* - fosfatidilinositol-3-cinase

rh-GCSF: Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos recombinante

SCF: Fator de células-tronco

SNC: Sistema Nervoso Central

STAT: *Signal Transducers and Activators of Transcription* - Transdutores de sinal e ativadores de transcrição

TGF- $\beta$ 1: Fator de Transformação do Crescimento beta

TNF: *Tumor Necrosis Factor* – Fator de Necrose Tumoral

tPA: Ativador do plasminogênio tecidual

TTC: cloreto de 2,3,5 – trifeniltetrazólio

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
1.1 Acidente Vascular Encefálico .....	16
1.1.1 Fisiopatologia do AVEi .....	18
1.1.1.1 Excitotoxicidade glutamatérgica .....	19
1.1.1.2 Estresse oxidativo .....	21
1.1.1.3 Inflamação.....	22
1.1.1.4 Apoptose .....	23
1.1.2 Tratamento para o AVE.....	25
1.2 Fatores de Crescimento Celular .....	26
1.2.1 Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (G-CSF).....	27
1.2.2 Eritropoetina (EPO) .....	29
2 JUSTIFICATIVA .....	32
3 OBJETIVOS .....	33
3.1 Objetivo Geral.....	33
3.2 Objetivos Específicos.....	33
4 MÉTODOS .....	34
4.1 Animais Experimentais .....	34
4.2 Modelo de Isquemia Cerebral Global Bicarotídea (BI-CCAO) .....	35
4.3 Teste de Resistência de Agarre ( <i>Wire Hang</i> ) .....	35
4.4 Mensuração da Força Muscular ( <i>Grip Test</i> ) .....	36
4.5 Teste de Escalada em Haste Vertical ( <i>Pole Test</i> ) .....	37
4.6 Contagem de Leucócitos Sanguíneos Totais .....	37

4.7 Contagem de Hemácias .....	38
4.8 Determinação da Área Macroscópica de Infarto .....	38
4.9 Processamento e Corte Histológico.....	39
4.10 Coloração com Hematoxilina e Eosina (HE).....	39
4.11 Análise Estatística.....	40
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
5.1 Relação Peso Úmido do Baço/Peso Corporal .....	41
5.2 Teste De Resistência De Agarre ( <i>Wire Hang</i> ) .....	41
5.3 Mensuração da Força Muscular ( <i>Grip Test</i> ) .....	42
5.4 Teste de Escalada em Haste Vertical ( <i>Pole Test</i> ) .....	43
5.5 Contagem de Leucócitos Sanguíneos Totais .....	43
5.6 Contagem de Hemácias .....	44
5.7 Determinação da Área Macroscópica de Infarto .....	45
5.8 Relação Neurônios/Células da Glia.....	46
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
6.1 Função Esplênica e Parâmetros Hematológicos .....	50
6.2 Análise da Função Motora .....	51
6.3 Área Macroscópica de Infarto Cerebral e Histologia.....	53
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>57</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>58</b>

## RESUMO

**Introdução.** O acidente vascular encefálico (AVE) é uma síndrome neurológica decorrente do suprimento sanguíneo insuficiente ao sistema nervoso central (SNC). Atualmente é uma das principais causas morte e invalidez no mundo, sendo que a maioria dos casos são de origem isquêmica. O tratamento do AVE isquêmico agudo é a utilização da classe dos agentes trombolíticos ativadores da fibrinólise, que apresentam curta janela terapêutica e inúmeras contra-indicações. Estudos recentes apontam citocinas como o Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (G-CSF) e Eritropoetina (EPO) como potenciais neuroprotetores em animais submetidos à isquemia cerebral. Porém, os efeitos da associação destes são pouco conhecidos e foram o objeto deste estudo. **Métodos.** Foram utilizados camundongos suíços machos, adultos jovens, divididos nos grupos: controle, grupo tratado com 5000 UI/kg/dia de EPO, grupo tratado com G-CSF 100µg/kg/dia e grupo tratado com ambos nas mesmas doses. Todos os animais foram submetidos a oclusão das artérias carótidas comuns direita (temporária) e esquerda (permanente) seguida de administração de solução glicosada (controles) e das drogas, 3 horas após a oclusão e nos quatro dias seguintes, sendo sacrificados em seguida, quando foi obtido o peso úmido do baço, coletada amostra de sangue e extraído o cérebro para as análises. **Resultados e Discussão.** A relação peso úmido do baço/peso corporal foi maior em todos os grupos tratados em relação ao controle. A análise dos parâmetros motores por meio de *wire hang*, *grip force* e *pole test*, demonstraram que a cirurgia promoveu danos motores no grupo controle e esses danos foram prevenidos nos grupos tratados. A contagem de leucócitos circulantes foi superior nos grupos G-CSF e EPO/G-CSF em relação ao controle, não havendo alteração no grupo EPO. Já contagem de eritrócitos circulantes foi superior apenas no grupo EPO. A área macroscópica de infarto cerebral foi significativamente menor em todos os grupos tratados, não havendo diferenças estatísticas entre eles. O tratamento com EPO não foi capaz de promover aumento na contagem de neurônios, o que foi verificado apenas quando EPO foi associada a G-CSF ou com o uso de G-CSF de forma individual. **Conclusão.** Os achados reforçam os dados da literatura em

relação aos efeitos neuroprotetores de EPO e G-CSF utilizados individualmente. A associação entre os dois fatores de crescimento não melhorou significativamente os resultados em relação aos obtidos quando se utilizou os fármacos de forma isolada.

**Palavras-chave:** Isquemia Cerebral, Fatores de Crescimento Celular, Neuroproteção, Recuperação motora.

## **ABSTRACT**

**Introduction.** Stroke is a neurological syndrome due to insufficient blood supply in the central nervous system (CNS). Today it is one of the leading causes of death and disability around the world, with a majority of cases being of ischemic origin. The treatment of acute ischemic stroke is the use of the class of thrombotic agents activating fibrinolysis, which has a short therapeutic window and numerous contraindications. Recent studies point to cytokines such as the Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) and Erythropoietin (EPO) as potential neuroprotectors in animals submitted to cerebral ischemia. However, the effects of this association are little known and were the object of this study. **Methods.** Male Swiss mice, young adults, divided into four groups: control group, group treated with 5000 IU/kg/ day of EPO, group treated with 100µg/kg/day of G-CSF, and group treated with both factors. All animals were submitted to occlusion of the right (temporary) and left (permanent) common carotid arteries, followed by administration of glycosidic solution (control) or drugs, 3 hours after occlusion and on the next four days, then sacrificed and the spleen and blood sample was collected and the brain was extracted for analysis. **Results and discussion.** The wet weight/body weight proportion was higher in all treated groups than control. The analysis of motor parameters by means of hanging wire, clamping force and pole test, demonstrated that surgery promoted damage in control group and these damages were prevented in the treated groups. The circulating leukocyte count was higher in the G-CSF and EPO/G-CSF groups than control, with no change in the EPO group. Already count of circulating erythrocytes was superior only in the EPO group. The macroscopic area of cerebral infarction was significantly lower in all treated groups, and there were no statistical differences between them. Treatment with EPO was not able to promote increased neuron counts, which was verified only when EPO was associated with G-CSF or with the use of G-CSF individually. **Conclusion.** The findings reinforce the literature data regarding the neuroprotective effects of EPO and G-CSF individually used. The association between the two growth factors did not improve the results in relation to when the drugs were used alone.

**Keywords:** *Cerebral Ischemia, Cell Growth Factors, Neuroprotection, Motor recovery.*

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Acidente Vascular Encefálico

O acidente vascular encefálico (AVE) é uma síndrome neurológica complexa envolvendo anormalidade usualmente súbita do funcionamento cerebral decorrente de uma interrupção da circulação encefálica ou de hemorragia (NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKE, 1995). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que no ano de 2015 o AVE foi a segunda principal causa de morte no mundo, gerando 6,24 milhões de óbitos (WHO, 2017). Além disso, o AVE é uma doença altamente incapacitante, sendo a principal causa de incapacidade a longo prazo (MURRAY, 2012), por gerar graves sequelas motoras e sensoriais (SCHELP et al., 2004).

Com base em informações do DATASUS, apenas no ano de 2015, foram registradas no Brasil 166.777 de internações por acidente vascular cerebral, não especificado como hemorrágico ou isquêmico. No mesmo período, o número de casos que resultaram em óbitos correspondeu a um percentual de 15,4%. Dados epidemiológicos do estado do Espírito Santo do ano de 2012 mostram que o AVE foi a quarta maior causa de óbitos na faixa etária de 60 a 69 anos, e terceira maior em homens com idade entre 70 e 79 anos. Esses dados demonstram que essa doença é também um grave problema na saúde pública capixaba (SESA, 2012).

O AVE pode ocorrer em todas as fases da vida, mas a apresentação clínica, fisiopatologia e outras perspectivas clínicas são variáveis, dependendo da idade do paciente (ROSA et al., 2015). A ocorrência é rara na infância, com incidência de 1-6/100.000 casos (MALLICK et al., 2014), e mais frequente a partir dos 60 anos de idade, sendo que 50% dos sobreviventes nessa faixa etária requerem cuidados especiais (STONE; HUMPHRIES, 2013).

Um AVE apresenta-se de maneira súbita, por meio de sinais e sintomas neurológicos focais, que variam de acordo com a área do cérebro atingida (SÁ, 2009). No entanto, pode-se citar problemas na fala, fraqueza súbita unilateral, perda

de visão, frequentemente em apenas um olho e inconsciência como sendo os sintomas mais comuns de um AVE (MIKULÍK et al., 2008).

O AVE pode ser classificado em três fases, em relação à sua progressão patológica e ao tempo após seu início: agudo, subagudo e crônico. Apesar da duração de cada tipo ser dependente da localização, do tamanho da área de infarto cerebral (tecido cerebral morto) e da idade dos pacientes, o agudo é descrito, de forma geral, como as 48 horas iniciais após a ocorrência de um AVE; o subagudo vai de 48 até de 6 semanas a 3 meses após o AVE, e o crônico varia entre 3 a 6 meses (ZHAO et al., 2012).

Quanto à sua fisiopatologia, os AVEs classificam-se em isquêmicos (AVEi) e hemorrágicos. O AVE isquêmico, que representa a maioria dos casos (70-80%), é um déficit neurológico resultante da insuficiência de suprimento sanguíneo cerebral, que pode ser transitório ou permanente (VASQUES, 2002). Sua alta prevalência justifica-se pelo fato de o AVEi ser recorrente, podendo tornar-se crônico (OVBIAGELE; NGUYEN-HUYNH, 2011). Já no AVE hemorrágico ocorre ruptura de um vaso sanguíneo e conseqüente extravasamento de sangue; a falta de suprimento sanguíneo causa infarto na área suprida pelo vaso e as células morrem (COHEN, 2001). Tal classificação pode ser realizada apenas por métodos de neuroimagem, e a distinção entre os subtipos é fundamental para o tratamento, por apresentarem importantes diferenças fisiopatológicas (YEN e CHENG, 2009; MWITA et al., 2014).

Os principais fatores de risco para a ocorrência de um AVE são histórico de aterosclerose, hipertensão, tabagismo atual ou no passado, obesidade, sedentarismo, diabetes mellitus e ingestão abusiva de álcool (O'DONNELL et al., 2010; COPSTEIN et al., 2013). Larsson e colaboradores (2013) sugerem que a melhora da dieta e do estilo de vida é fundamental para a redução do risco de AVE na população geral.

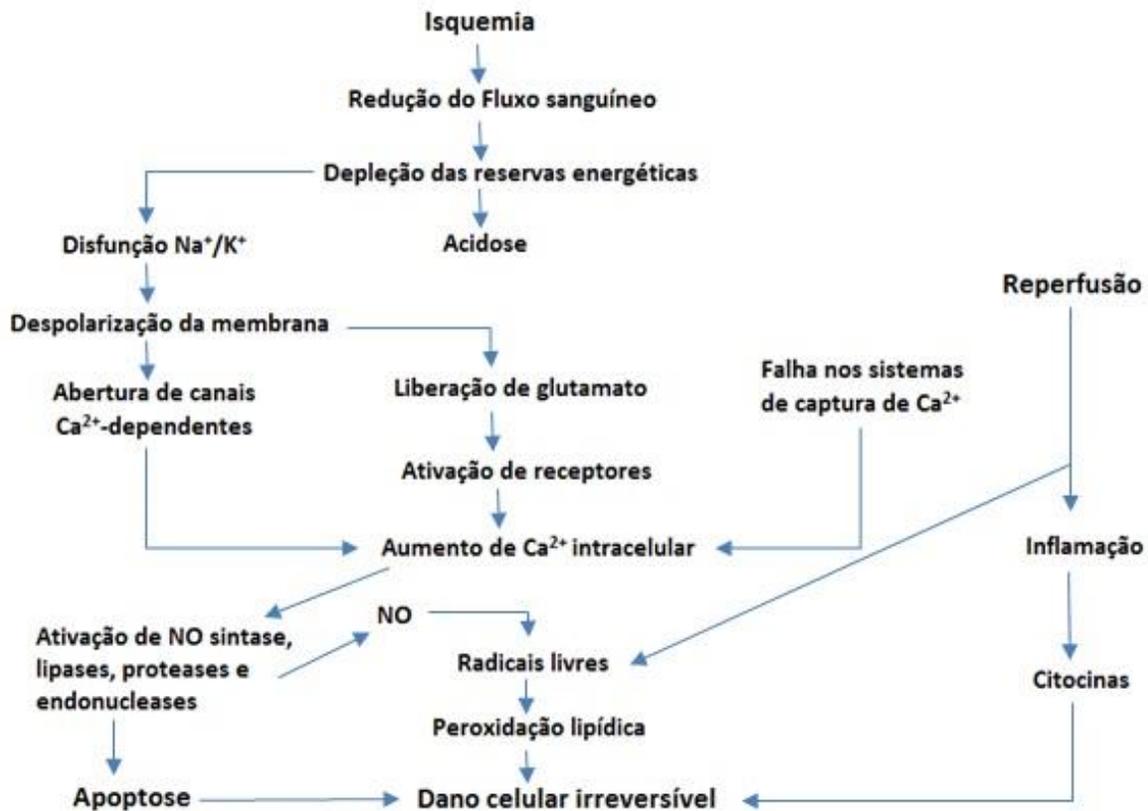
Já as complicações mais frequentes relacionadas ao AVEi são coma, síndrome de hipertensão intracraniana, complicações cardíacas e, principalmente,

transformação do isquêmico para o hemorrágico. Este último é comumente associado a fatores como diabetes, fibrilação atrial, hipertensão, idade avançada, tratamento com anticoagulantes e a região atingida ser a artéria cerebral média (SLUJITORU et al., 2012).

#### 1.1.1. Fisiopatologia do AVEi

Por ser desprovido de reservas, o tecido nervoso é totalmente dependente do metabolismo aeróbico, e utiliza oxigênio e glicose como nutrientes. Além disso, o fato de o cérebro apresentar uma alta taxa metabólica torna-o mais suscetível a danos decorrentes de eventos isquêmicos quando comparado com outros órgãos. Assim, alterações no fluxo sanguíneo promovem mudanças no metabolismo com consequente redução ou parada total da atividade funcional na área atingida. Interrupções superiores a três minutos são suficientes para provocar alterações funcionais irreversíveis e morte tecidual (ZEMKE et al., 2004).

Passados segundos a minutos da interrupção do fornecimento de sangue para uma região do cérebro, a cascata isquêmica é logo iniciada, a qual envolve uma série de eventos bioquímicos subsequentes que podem levar à desintegração das membranas celulares e morte neuronal no centro/núcleo do infarto (figura 1). Um AVEi focal inicia-se com hipoperfusão grave, que leva à excitotoxicidade e ao dano oxidativo, que por sua vez causa lesão microvascular e, com a disfunção da barreira hematoencefálica, tem início a inflamação pós-isquêmica. Estes eventos intensificam a lesão inicial e podem conduzir a lesões cerebrais permanentes (LAKHAN et al., 2009).



**Figura 1:** Representação esquemática dos eventos que levam à morte celular no AVEi. A hipoperfusão da área do cérebro afetada inicia uma complexa série de acontecimentos. Mecanismos encefálicos intrínsecos de sinalização intracelular e intercelular tornam-se prejudiciais em situações de isquemia, provocando a falência energética e exacerbando as vias finais de morte celular isquêmica. Fonte: Modificado de Miguel, 2011.

#### 1.1.1.1. Excitotoxicidade Glutamatérgica

O processo de excitotoxicidade ocorre em algumas situações de patologia cerebral nas quais transportadores iônicos sofrem disfunção, causando acúmulo de glutamato no espaço extracelular, levando a danos neuronais e, eventualmente, apoptose (PINTO; RESENDE, 2014).

Ao longo do evento isquêmico e logo após sua ocorrência, o potencial de membrana é perdido e, com a disfunção do transportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, os neurônios sofrem

despolarização. Essa mudança na homeostase iônica afeta o transporte de neurotransmissores na fenda sináptica, o que induz a ativação de canais de cálcio voltagem-dependentes, que levam a uma volumosa liberação de glutamato (CASTRO, 2013). O glutamato é o principal e mais abundante neurotransmissor excitatório do SNC, onde desempenha um papel essencial em mecanismos relacionados à plasticidade sináptica, os quais são parte da base fisiológica dos processos de cognição e memória (PRYBYLOWSKI; WENTHOLD, 2004).

Para manter sua homeostase, os neurônios possuem mecanismos envolvidos na manutenção intracelular da localização e da concentração dos íons  $Ca^{2+}$ , mediante uma complexa relação entre o influxo, efluxo, captação e armazenamento destes íons no retículo endoplasmático e mitocôndria. O influxo de  $Ca^{2+}$  tem ação regulatória sobre a excitabilidade da membrana e o grau da transmissão sináptica por meio de ativação de cascatas de sinalização intracelular cálcio-dependentes. Com o aumento da concentração de glutamato nas sinapses ocorre estimulação exacerbada dos receptores e entrada excessiva de  $Ca^{2+}$  no terminal pós-sináptico. Somada à liberação do  $Ca^{2+}$  das reservas intracelulares, este estímulo eleva a concentração de  $Ca^{2+}$  acima do limiar necessário para a ativação de mecanismos regulatórios, levando à ativação de mecanismos de excitotoxicidade, que resultam em morte neuronal (SATTLER; TYMIANSKI, 2000).

Há pouca ou nenhuma conversão bioquímica de glutamato no espaço extracelular, pois não há uma enzima que o degrade, como ocorre para muitos neurotransmissores. Na membrana pós-sináptica o glutamato promove suas ações através de interações com os receptores específicos classificados como metabotrópicos (mGluRs) ou ionotrópicos (IGluRs). Os receptores alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e cainato (AK) estão relacionados à transmissão sináptica rápida no SNC e são caracterizados pelas rápidas cinéticas de ativação e desativação (STROEH, 2008). Canais ligados a receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) tendem a permanecer abertos por mais tempo do que canais de receptores AMPA ou do tipo AK e permitem um fluxo significativo de cálcio (FEATHERSTONE, 2010).

#### 1.1.1.2. Estresse Oxidativo

Normalmente, a cascata isquêmica dura horas e até dias, apesar do reestabelecimento da circulação sanguínea. Mesmo sendo necessária para a restauração da função cerebral normal, a reperfusão pode levar a danos secundários, chamados de lesões decorrentes de isquemia/reperfusão (I/R). O mecanismo patofisiológico das lesões geradas por I/R não é bem conhecido, mas sugere-se que mediadores de estresse oxidativo, como espécies reativas de oxigênio (EROs) desempenhem um papel relevante neste cenário (CASTRO, 2013).

EROs são consideradas moléculas bifásicas, uma vez que desempenham um importante papel em processos fisiológicos normais, como sinalização celular, indução de mitose e defesa imunológica, mas, por outro lado, também estão implicados em vários processos patológicos, através do qual eles medeiam danos em estruturas celulares, incluindo lipídeos, membranas, proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA) (ALLEN; BAYRAKTUTAN, 2009). Acredita-se que seus efeitos nocivos variem conforme a quantidade e sua força oxidante (ZACKS et al., 2005).

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio fisiológico entre oxidantes e antioxidantes em favor do primeiro, gerando danos ao organismo (FRANCISCO, 2011). O estresse oxidativo leva à morte celular durante a isquemia cerebral, por meio da formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, através de vários mecanismos de lesão, tais como a inibição mitocondrial, sobrecarga de  $Ca^{2+}$ , lesões de reperfusão e inflamação (LAKHAN et al., 2009).

Evidências demonstram que um rápido aumento na produção de EROs ocorre imediatamente após AVEi, sobrecarregando rapidamente as defesas antioxidantes do organismo, o que aumenta ainda mais os danos nos tecidos. Estes EROs podem reagir e danificar macromoléculas celulares relacionadas à autofagia, apoptose e necrose. Além disso, a rápida restauração do fluxo sanguíneo aumenta ainda mais

o nível de oxigenação do tecido e promove uma segunda explosão de geração de EROs, responsável pelas lesões de reperfusão (RODRIGO et al., 2013).

As EROs primárias e os seus derivados têm sido relacionados à vasodilatação através da abertura de canais de potássio e alterações da permeabilidade vascular, ruptura da barreira hematoencefálica e lesões destrutivas focais em modelos animais de AVEi (ALLEN; BAYRAKTUTAN, 2009). O aumento de EROs desencadeia a expressão de genes pró-inflamatórios, induzindo a síntese de fatores de transcrição, NF-kB, fator I induzido por hipóxia, fator I regulador de interferon e STAT3. Como resultado, as citocinas são reguladas positivamente no tecido cerebral, induzindo a expressão de moléculas de adesão na superfície celular, incluindo a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), P-selectina e E-selectina que medeiam a adesão de leucócitos no endotélio de células na periferia do infarto (YILMAZ, GRANGER, 2008).

#### 1.1.1.3. Inflamação

Em termos histológicos, a inflamação caracteriza-se tradicionalmente pela presença de células do sistema imunológico em determinado tecido. A inflamação desempenha um papel importante na patogênese do AVEi e outras formas de lesão cerebral isquêmica. Evidências crescentes sugerem que a resposta inflamatória não só agrava a lesão cerebral secundária na fase aguda do AVE, mas também contribui benéficamente para a recuperação do cérebro. Células imunitárias circulantes ganham acesso ao cérebro isquêmico devido primeiramente à rápida regulação positiva de moléculas de adesão. Assim, tais células podem então ter acesso ao cérebro lesionado e elaborar moléculas que exacerbam a morte celular isquêmica. Além disso, células cerebrais isquêmicas ativam células do sistema imunológico local, como micróglia e astrócitos (JIN et al., 2013; KIM et al., 2014).

A fase inflamatória caracteriza-se pela migração de neutrófilos, ativação de células gliais e secreção de mediadores inflamatórios potencialmente citotóxicos sintetizados por essas células, o que pode resultar em prejuízo funcional ou morte

das células afetadas. A ativação de segundos mensageiros por  $\text{Ca}^{2+}$ , o acúmulo de radicais livres, bem como a própria hipóxia, promovem a ativação de fatores de transcrição, que levam à expressão de citocinas e quimiocinas que induzem a expressão de moléculas de adesão intercelular pelo endotélio nos capilares, que promovem a adesão e migração de leucócitos. Neutrófilos aderem às paredes dos vasos e migram para as regiões afetadas, onde produzem uma variedade de moléculas citotóxicas tais como citocinas pró-inflamatórias, metaloproteinases de matriz (MMPs), óxido nítrico (NO) e EROs, que intensificam os danos celulares (KIM et al., 2014; SOUZA, 2012).

O termo microglia refere-se às principais células imunológicas residentes no SNC, as quais atuam como células removedoras no caso de inflamação, isquemia, e neurodegeneração. A microglia pode ser ativada rapidamente em resposta a isquemia cerebral, sendo que sua ativação e expansão atinge um pico de 2-3 dias após o AVEi e dura até semanas após a lesão inicial. Os papéis exatos da microglia no AVEi são em grande parte desconhecidos, mas ela parece desempenhar funções duplas, uma vez que pode produzir mediadores inflamatórios que conduzem a danos e morte celular e, por outro lado, também pode produzir TGF- $\beta$ 1, com ação neuroprotetora (JIN et al., 2013).

A cascata inflamatória também inclui o aumento da expressão de várias enzimas. A via do ácido aracdônico é iniciada por meio da ativação da fosfolipase A2, promovida pelo aumento da concentração intracelular de cálcio. Esta enzima atua sobre glicerofosfolídeos originando, formando ácido aracdônico, que é metabolizado pelas ciclooxigenases ou lipoxigenases, convertendo-se em prostoglandinas ou leucotrienos, respectivamente. Os leucotrienos, durante a isquemia, tem sido relacionados à disfunção da barreira hematoencefálica, edema e morte neuronal (SILVA et al., 2011).

#### 1.1.1.4. Apoptose

O estudo da morte celular só despertou o interesse da comunidade científica quando Kerr, Wyllie e Currie demonstraram a existência de pelo menos duas formas distintas de morte celular: necrose e apoptose. A morte por necrose é rápida, intensa e afeta um grande número de células no tecido atingido, caracterizando-se pelo aumento do volume citoplasmático, destruição de organelas e lise da membrana citoplasmática, com conseqüente extravasamento de fluidos. Já a apoptose caracteriza-se por atingir células individuais, que apresentam uma série de alterações morfológicas distintas como células em picnose, com condensação do citoplasma e núcleo, manutenção da integridade de organelas, retração da membrana celular e posterior fragmentação e formação de corpos apoptóticos, sem liberação de conteúdo citoplasmático. Células em apoptose são desmontadas a partir de dentro, de uma forma organizada que minimiza danos e perturbações às células vizinhas (BROUGHTON et al., 2009; KERR et al., 1972; SOUZA, 2012).

As lesões isquêmicas originam processos necróticos, porém, em paralelo, algumas células sofrem apoptose, sendo este o principal processo que ocorre na região de penumbra. Diversos fatores determinam qual destes processos é predominante, sendo os principais o grau de isquemia e a concentração de cálcio livre intracelular (SILVA et al., 2011).

Até o momento, foram identificadas duas vias principais de indução da apoptose: via intrínseca e extrínseca. A via intrínseca, também conhecida como via mitocondrial, caracteriza-se por um evento principal: a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, que leva a liberação de proteínas responsáveis pela apoptose para o citosol. Já na via extrínseca há ativação dos receptores de membrana da família TNF (*Tumor Necrosis Factor* – Fator de Necrose Tumoral), por meio de ligantes específicos. Uma das conseqüências é a ativação da caspase-8, que leva à ativação das caspases 7 e 10, responsáveis pela desestruturação celular, além de ativar proteínas pró-apoptóticas, que levam à ativação da via intrínseca, possibilitando a amplificação do sinal (BATISTA, 2008).

### 1.1.2. Tratamento para o AVE

Apesar da enorme morbidade e mortalidade decorrente de um AVEi, as opções de tratamento permanecem limitadas. O principal recurso terapêutico é o uso de medicamentos anti-trombolíticos endovenosos, como o ativador de plasminogênio tecidual recombinante (rt-PA), usado para desobstruir o vaso, reestabelecendo o fluxo sanguíneo e reduzindo a morte celular (T.ISHII et al., 2013). O fármaco permanece relativamente inativo no sistema circulatório e, ao ligar-se à fibrina, a substância é ativada, convertendo plasminogênio em plasmina, que promove a dissolução da fibrina do coágulo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

A introdução do tratamento com este agente trombolítico no AVE isquêmico agudo melhorou a evolução clínica dos pacientes que iniciam tratamento imediatamente após o início dos sintomas. No entanto, com pequena janela terapêutica e várias contraindicações, este tratamento é aplicável a um número restrito de pacientes, deixando a grande maioria sem tratamento específico. Além disso, os estudos que avaliaram uso do rt-PA no tratamento do AVE isquêmico não demonstraram benefícios na redução da mortalidade, embora ocorra redução de sequelas neurológicas em cerca de 34% dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Dessa forma, torna-se importante e necessária a descoberta de novas terapias, que sejam viáveis a mais pacientes, em especial aos não passíveis ao rt-PA (EHRENREICH et al., 2009).

Diversos mecanismos fisiopatológicos fundamentais de isquemia cerebral foram identificados nos últimos anos, mas a evolução do tratamento farmacológico direcionado a esses mecanismos não melhorou de forma significativa os resultados clínicos após um AVE. A principal justificativa para esse fracasso é a multiplicidade de mecanismos que desencadeiam danos neuronais durante a isquemia, anteriormente mencionados. Medicamentos visando um modo de ação multimodal poderiam superar este dilema, e, recentemente, mostraram proporcionar um benefício notável em estudos pré-clínicos (MINNERUP; SCHÄBITZ, 2009).

Ensaios clínicos têm demonstrado que a neuroproteção ainda é uma opção promissora para o tratamento de AVE isquêmico (MORETTI et al., 2014). Ela é definida como qualquer estratégia ou combinação de estratégias, que antagoniza, interrompe ou retarda a sequência de eventos bioquímicos e moleculares prejudiciais que, se não controlada, resulta em lesões isquêmicas irreversíveis. Assim, estratégias neuroprotetoras diferem da terapia atual, que tem como objetivo a manutenção da permeabilidade circulatória ou a reversão da oclusão vascular, agindo por via hemodinâmica e não por mecanismos metabólicos (GINSBERG, 2008). Nas últimas décadas estudos tem elucidado mecanismos em nível vascular, celular e molecular, levando à identificação de vários alvos potenciais para a neuroproteção e neuroreparação (MORETTI et al., 2014). Estes incluem mecanismos de excitotoxicidade, reações inflamatórias e apoptose (SAHOTA; SAVITZ, 2011; MINNERUP et al., 2012).

## **1.2 Fatores de Crescimento Celular**

Visando superar as limitações da terapia farmacológica existente e proporcionar melhor qualidade de vida aos pacientes, novas abordagens para restaurar a função após o AVE estão sob investigação. Em estudos envolvendo o transplante de células-tronco, sugeriu-se que a diferenciação celular, sobrevivência celular e suporte trófico é promovida por fatores de crescimento (FCs). Lanfranconi e colaboradores (2011) revisaram estudos nos quais foi evidenciado que, na neurogênese endógena, FCs induzem a proliferação e diferenciação de células estaminais neuronais adultas a partir da zona sub-ventricular dos ventrículos laterais e o giro denteado do hipocampo em neurônios maduros tanto em modelos animais quanto em humanos. Os resultados desses estudos sugerem que a terapia empregando FCs poderia representar uma abordagem terapêutica alternativa para promover a migração e diferenciação e para melhorar a sobrevivência de células estaminais endógenas, através da modulação da neurogênese.

Como dito, uma das principais limitações das estratégias neuroprotetoras para o AVE é a curta janela terapêutica durante a qual a intervenção é eficaz. Dessa forma, terapias que possam ser iniciadas após o início dos sintomas seriam opções viáveis. Uma maneira de realizar o tratamento tardio pode estar na utilização de vias que tenham a morte neuronal isquêmica como alvo terapêutico e, pelo fato de estarem relacionados a tais vias, FCs têm recebido atenção considerável na busca por terapias contra o AVE (GREENBERG; JIN, 2006).

A maioria dos FCs atua através da ligação a receptores específicos ativando diferentes vias de sinalização e induzindo a expressão de genes envolvidos na proliferação e diferenciação celular. Assim, a resposta específica para fatores de crescimento é influenciada pela expressão de seus receptores correspondentes nas células-alvo (LANFRANCONI et al., 2011).

Estudos experimentais mostram também que fatores de crescimento hematopoiéticos (G-CSF, EPO, GM-CSF e etc) podem interferir na evolução do AVE através de seus efeitos pleiotrópicos que incluem, além da neurogênese, a neuroproteção, a promoção de angiogênese e a ativação de vias antiapoptóticas (SPRIGG; BATH, 2005). Além de estarem envolvidos na regulação das células derivadas da medula óssea, fatores de crescimento hematopoiéticos estão presentes no cérebro, onde as suas funções são mediadas por receptores expressos nos neurônios. Dois fatores são particularmente promissores como neuroprotetores para isquemia cerebral: fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e eritropoetina (EPO) (MORETTI et al., 2014).

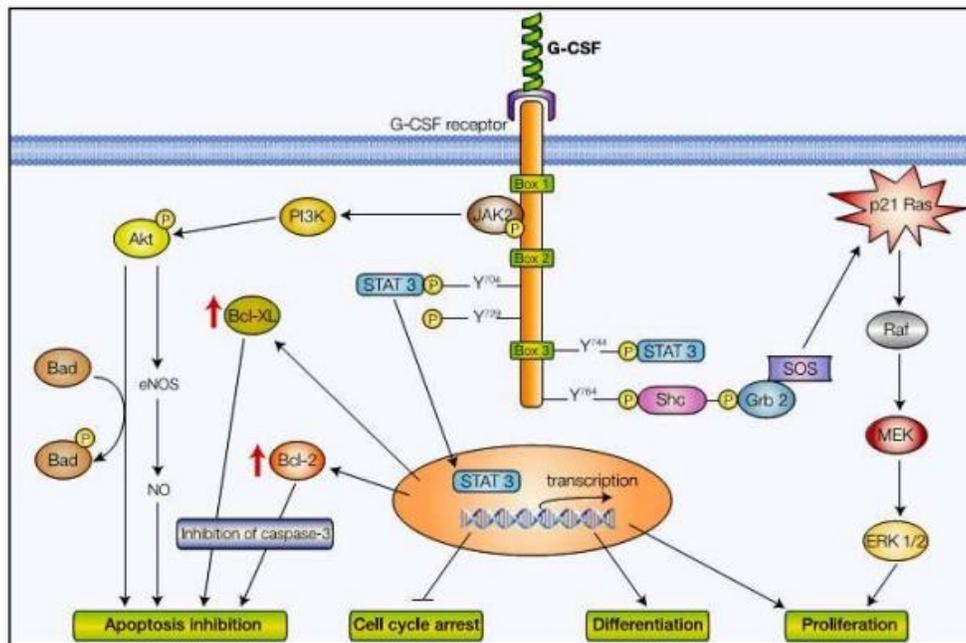
#### 1.2.1 Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (G-CSF)

O fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) é um hormônio glicoproteico de 19,6 kDa codificado por um único gene localizado no cromossomo 17q11-12 (SIMMERS et al., 1987). É uma citocina linhagem específica, responsável pelo desenvolvimento inicial de células hematopoiéticas e pela maturação terminal de

neutrófilos, e exerce um papel chave na regulação da granulopoiese (SILVA, 2012; ENGLAND et al., 2012).

O G-CSF é produzido pelas células do estroma da medula óssea (MO), por fibroblastos, células endoteliais, monócitos, macrófagos e micróglia sob estímulo de citocinas inflamatórias, tais como interleucina 1 e 3 (IL-1 e IL-3), Fator de Necrose Tumoral (TNF) e por endotoxinas bacterianas (ABUD et al., 2010; HENRY et al., 1998).

As atividades biológicas do G-CSF são mediadas por um receptor específico na superfície celular das células responsivas (Figura 2). Esse receptor (G-CSFR) está presente em células progenitoras mielóides, células de leucemia mielóide, neutrófilos maduros, plaquetas, monócitos e algumas células linfóides T e B. Além dessas células da linhagem hematopoiética, receptores para G-CSF são encontrados em diversos tipos celulares não-hematopoiéticos, incluindo neurônios (GUO et al., 2014).



**Figura 2:** Representação esquemática da cascata de sinalização desencadeada por G-CSF. A dimerização de G-CSFR causa a ativação de diferentes vias de sinalização, como Jak/STAT, MAPK e AKT via PI3-quinase, que induzem diferenciação, proliferação e sobrevivência celular, respectivamente. Fonte: Adaptado de Sanganalmath et al, 2011.

O G-CSFR tem uma estrutura composta, que consiste de um domínio extracelular, um único domínio transmembranar, e um domínio citoplasmático, constituído por três sequências de aminoácidos conservados. Sua estimulação promove a maturação, sobrevivência, proliferação e ativação funcional de granulócitos (DEMETRI; GRIFFIN, 1991).

O G-CSF recombinante (rh-GCSF) é utilizado na terapêutica com o nome genérico filgrastim. Este medicamento é a forma aplicável da citocina, produzida a partir do genoma de *E. coli* (GOMES, 2010), registrado no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2002 (BRASIL, 2002). É utilizado na prática clínica como mobilizador de células-tronco hematopoiéticas em situações caracterizadas por intensa neutropenia ou em casos onde há risco de neutropenia (SILVA, 2009).

Recentemente, tem sido demonstrado que o G-CSF endógeno desempenha um papel importante na resposta à isquemia cerebral e a administração de G-CSF recombinante tem sido associada à redução do volume de infarto, diminuição da mortalidade e melhora nos resultados clínicos. Lanfranconi e colaboradores (2011) revisaram 17 trabalhos que avaliaram a eficácia do G-CSF em diferentes doses e esquemas terapêuticos, em modelos animais de isquemia cerebral focal. Na maioria deles foi verificada redução significativa do volume de infarto, além de recrutamento de células progenitoras neurais e melhora funcional.

### 1.2.2 Eritropoetina (EPO)

A eritropoetina (EPO) é um hormônio glicoproteico de 30,4 kDa produzido principalmente nos rins, que atua na regulação da produção diária de  $2 \times 10^{11}$  glóbulos vermelhos necessários para manter o transporte de oxigênio pelo sangue periférico em condições fisiológicas, sendo nomeada justamente devido à sua potente estimulação da eritropoese (JELKMANN, 1992; 2008).

A produção de EPO ocorre em resposta à hipóxia tecidual, que induz a ativação do fator de transcrição induzido pela hipóxia (HIF - *hypoxia-inducible transcription*

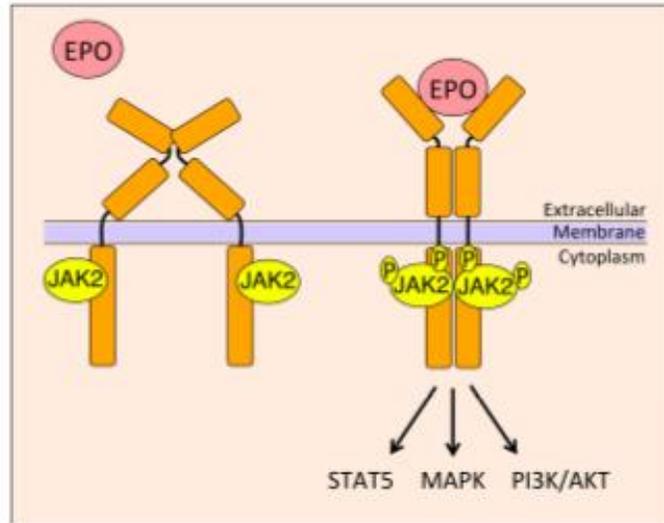
*factor*), o qual leva a aumento da produção de EPO dentro de algumas horas. Na medula óssea, a EPO atua como fator hormonal de estimulação mitótica e de diferenciação, aumentando a formação de eritrócitos maduros a partir de células progenitoras eritróides. Essa ação se dá por meio da ligação a receptores específicos localizados na superfície das células progenitoras, estimulando sua diferenciação em hemácias (FRIED, 2009; HARDEE et al., 2006; UDUPA, 2006).

A EPO recombinante (EPOrh) é produzida pela tecnologia do DNA recombinante, contém a sequência de aminoácidos idêntica à forma nativa e possui a mesma atividade biológica (EGRIE et al.; 1986). É amplamente utilizada na prática clínica para o tratamento de anemia em pacientes com insuficiência renal crônica e outras situações que gerem intensa anemia (LANFRANCONI et al., 2011; LANGSTON et al., 2003).

EPO é um fator de crescimento hematopoiético que, assim como G-CSF tem sido extensivamente testado em ensaios pré-clínicos de AVE (MINNERUP; SCHÄBITZ, 2009), uma vez que EPO é produzida em níveis baixos no sistema nervoso central (SNC), e seu receptor é expresso na maioria dos tipos de células do SNC, incluindo neurônios, astrócitos e microglia (GENC et al., 2004).

Conforme mostra a figura 3, a ligação de EPO a EPOR leva à fosforilação da quinase associada a receptor de tirosina (JAK-2), que tem como primeira consequência a fosforilação/ativação da proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição (STAT), que dissocia-se do receptor e é translocada para o núcleo, onde promove a transcrição de genes como o Bcl-xL e a ciclina D1, que provavelmente promovem os efeitos anti-apoptóticos da EPO. Além de STAT-3, classicamente associado com a ativação de EPOR, acredita-se que EPO também sinalize através de STAT-5. STAT-3 está associada com a propagação de crescimento em neurônios maduros e a sobrevivência das células, aumento no tecido inibidor de metaloproteinase de matriz (TIMP)-1, que promove a sobrevivência de células, crescimento e diferenciação. A ativação da via RAS-MAPK envolve diversos mecanismos. Em síntese estes mecanismos levam à ativação de genes relacionados a respostas mitogênicas e de diferenciação, além

da regulação da apoptose. A via PI-3K quando ativada promove fosforilação do AKT e indução de diversas proteínas anti-apoptóticas e previne a transcrição de genes pró-apoptóticos (MOREIRA, 2008; SOUVENIR et al., 2015).



**Figura 3:** Representação esquemática das vias de sinalização relacionadas à sobrevivência, proliferação e diferenciação celular, induzidas pela EPO. Fonte: Zhang et al., 2014.

Em estudo realizado por Brines e colaboradores (2000) foi evidenciado que a EPO<sub>rh</sub> atravessa a barreira hematoencefálica de forma eficaz e proporciona neuroproteção em modelos de isquemia cerebral e lesão cerebral traumática em roedores. Estudos em modelos animais de AVE provaram a sua eficácia na redução volumes de infarto e em déficit neurocomportamental (MINNERUP et al., 2009; JERNDAL et al., 2010).

## **2 JUSTIFICATIVA**

Como dito, estudos recentes demonstraram que EPO e G-CSF possuem efeitos neuroprotetores em camundongos submetidos à isquemia cerebral. O uso desses fatores de crescimento celular surge então como promissora alternativa terapêutica para o AVE.

Segundo Yu e colaboradores (2014), frequentemente a EPO e outros agentes neuroprotetores ou neurotróficos precisam ser combinados para otimizar a recuperação funcional. Por esse motivo, a associação de diferentes fatores de crescimento para o tratamento do AVE tem sido amplamente estudada (CUI et al., 2016; YU et al., 2014).

Apesar de a ação neuroprotetora individual de EPO e G-CSG ser bem descrita na literatura, os efeitos da associação entre EPO e G-CSF ainda são pouco conhecidos, sendo objeto do presente estudo.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Estudar o efeito neuroprotetor da terapia com o G-CSF e eritropoetina, de forma individual e associados, em modelo de isquemia cerebral global.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

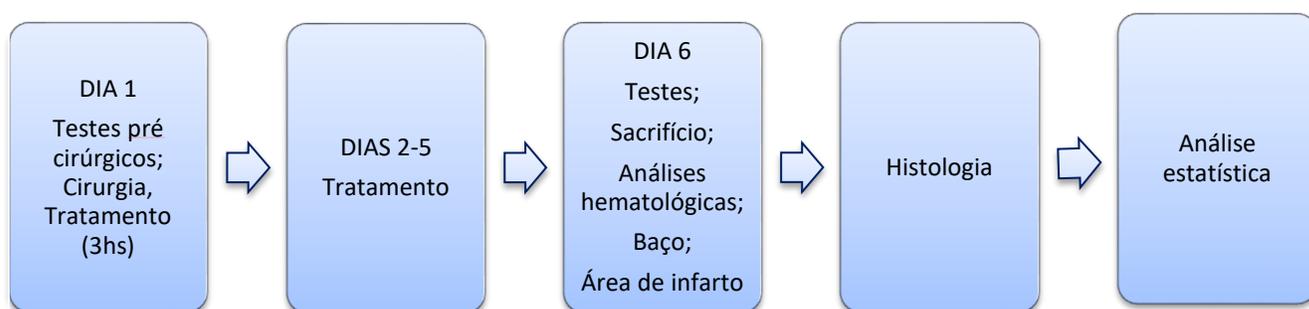
Avaliar os efeitos dos diferentes tratamentos sobre:

- o peso relativo do baço;
- a contagem de eritrócitos e leucócitos sanguíneos;
- a força muscular;
- o equilíbrio e coordenação motora dos animais;
- a área macroscópica de infarto cerebral;
- a relação neurônios/células da glia.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Animais Experimentais

Foram utilizados camundongos suíços, machos, com idade variando entre 8 a 12 semanas e pesando entre 30 e 40 gramas. Os animais receberam água e ração (Labina®, Purina) *ad libitum* e tiveram controlado o ciclo de 12 horas claro/escuro, bem como a temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e a umidade ( $60\pm 5\%$ ) do local onde permaneceram. Os animais utilizados são provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo CEUA-UFES sob o protocolo número 055/2014. O delineamento experimental é demonstrado na figura 4.



**Figura 4:** Desenho experimental.

Os animais foram divididos em 4 grupos, o grupo controle (n=8) submetido a oclusão bilateral e administração de veículo (solução glicosada 5%), o grupo tratado com G-CSF (n=8), o qual recebeu, por via subcutânea, a dose de 100 µg/kg/dia de G-CSF (Filgrastim®, Bio Sidus S.A., Argentina) (PERUCH, 2015), o grupo tratado com EPO (n=8), que recebeu, por via subcutânea, EPO (Hemax Eritron®, Aché) na dose de 5000 UI/kg/dia (JIA et al., 2010), e o grupo tratado com G-CSF e EPO, que recebeu ambas as drogas, nas doses de 100 µg/kg/dia e 5000 UI/kg/dia, respectivamente.

O tratamento foi iniciado 3 horas após o início da oclusão, sendo administrado novamente nos quatro dias seguintes. No quinto dia os animais foram submetidos a testes comportamentais e, em seguida, sacrificados com sobredose de solução anestésica.

#### **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 (91mg/Kg) e Xilazina (9,1mg/Kg) via intraperitoneal (i.p.). Posteriormente, o animal foi posicionado em decúbito dorsal, fixando-se os membros dianteiros e traseiros à mesa cirúrgica. Com auxílio de tesoura e pinças específicas realizou-se tricotomia e incisão na linha média da região cervical para exposição das artérias carótidas comuns direita e esquerda. 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 90 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).

#### **4.3 Teste de resistência de agarre (*wire hang*)**

Os testes para avaliação de parâmetros motores foram realizados no período pré-cirúrgico e pós-cirúrgico, antes do sacrifício. Os experimentos foram realizados conforme descrito por Sango e colaboradores (1996), com algumas modificações. Os animais foram habituados à sala de experimentação e manipulados pelo experimentador duas horas antes do experimento. Como aparato, foi utilizada uma grade metálica com espaçamento de 1 cm entre barras de 0,8 mm de diâmetro. Inicialmente o animal foi colocado sobre a grade, que foi brevemente agitada para

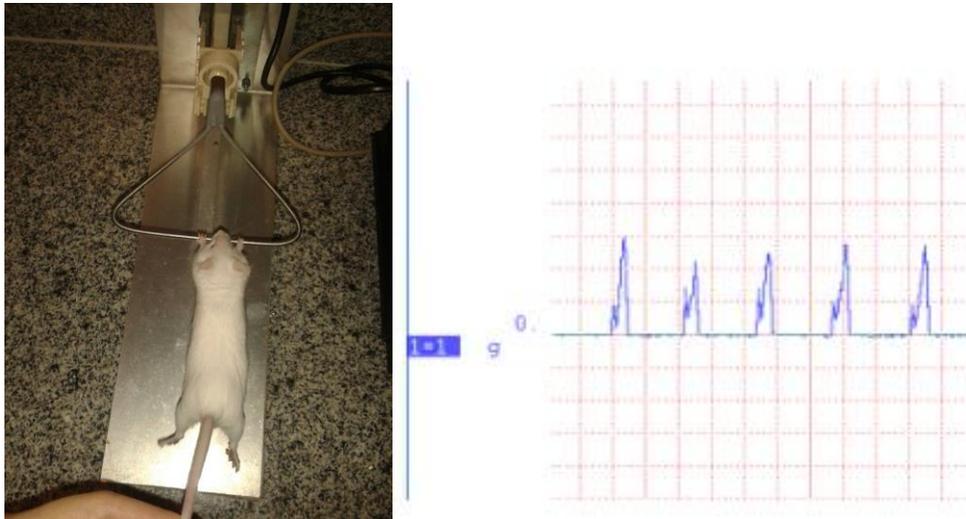
que o animal a agarrasse. A grade foi então invertida e mantida acima de uma caixa preenchida com maravalha, a uma altura suficiente para manter o animal agarrado à grade, mas incapaz de feri-lo durante a queda. A latência para queda foi medida com o uso de um cronômetro. Foram feitas três tentativas, com intervalo de três minutos entre elas, registrando-se o tempo médio.



**Figura 5:** Demonstração do teste de resistência de agarre. Fonte: Moraes, 2014

#### **4.4 Mensuração da Força Muscular (*grip test*)**

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 o tracionava pela cauda. O pico máximo de força, expresso em gramas (g), foi registrado automaticamente no momento em que o animal soltava o suporte (Figura 6). Dez tentativas foram realizadas por animal num período máximo de 2 minutos e obtida a força média.



**Figura 6:** Demonstração do teste de força. A imagem mostra o agarre das patas dianteiras ao aparato, com o examinador tracionando o animal pela cauda (esq.) e o registro dos picos de força pelo *software* (dir.). Fonte: Imagem própria

#### **4.5 Teste de escalada em haste vertical (*pole test*)**

O método foi realizado conforme descrito por Ogawa e colaboradores (1985), com algumas adaptações. Utilizou-se uma haste vertical de 50 cm de altura, envolta em gaze para impedir o deslizamento dos animais, a qual foi colocada em uma caixa preenchida com maravalha. Os camundongos foram colocados no topo do aparato com a face voltada para cima, e o tempo gasto pelo animal para orientar-se para baixo e descer até a base da haste foi cronometrado. Cada animal foi submetido a uma seção de treino e três ensaios com intervalos de três minutos, e o tempo médio para a descida foi registrado para análise.

#### **4.6 Contagem de Leucócitos sanguíneos totais**

Para a contagem dos leucócitos totais sanguíneos uma alíquota de 20  $\mu$ L de sangue

foi adicionada a um microtubo (Eppendorf®) contendo 380 µL de ácido acético a 2% para promover hemólise. Após 2 minutos de homogeneização, uma alíquota de 10 µL foi colocada em cada lado da câmara de Neubauer (0,100 mm profundidade, 0,0025 mm<sup>2</sup> – Labor Opitik) coberta por uma lamínula apropriada. Decorridos 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 calculada e multiplicada por 200, a fim de alcançar o valor absoluto dos leucócitos totais sanguíneos por milímetro cúbico (mm<sup>3</sup>).

#### **4.7 Contagem de Hemácias**

Para a contagem de eritrócitos, foram acrescentados 20 microlitros de sangue homogeneizado em um tubo de ensaio contendo 4mL de solução diluente (solução salina 0,9%). Homogeneizou-se a solução final por inversões sucessivas do tubo. Preencheu-se a câmara de Neubauer com 10 µL da solução em cada lado e, passados 5 minutos para a distribuição das células, as hemácias de 5 quadrantes médios foram contadas e o valor obtido multiplicado por 10.000, para a obtenção do número de hemácias por milímetro cúbico (mm<sup>3</sup>).

#### **4.8 Determinação da área macroscópica de infarto**

Após o sacrifício, os cérebros foram retirados e colocados em placa de Petri, com uma pequena alíquota de solução fisiológica, e levados ao *freezer* durante 20 minutos. Em seguida, o cérebro foi cuidadosamente acomodado na matriz para corte de cérebro de camundongo - *brain blocker*, e foram feitos cortes coronais, sendo o primeiro corte de 3 mm e os três demais cortes de 2 mm. Cada corte foi colocado individualmente em microtubos *Eppendorf*® contendo solução do corante

cloreto de 2,3,5 – trifeniltetrazólio (TTC) a 2%, que foram levados ao banho-maria à temperatura de 37°C durante 30 minutos. Decorrido esse tempo, o corante foi retirado e acrescentada solução de formol 4% em salina e foram armazenados em geladeira durante 24 hs para fixação do corante. No dia seguinte foram obtidas imagens digitais para posterior análise no programa *Image J*.

O princípio da técnica de coloração com TTC baseia-se na reação de redução do cloridrato de TTC, originalmente incolor, a 1,3,5-trifenil formazan, de coloração vermelha, sendo que a reação ocorre na presença de enzimas desidrogenases, abundantes na mitocôndria (KRAMER et al., 2010).

#### **4.9 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 alcoóis (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 (dimensões 15x15x5 mm) e os blocos parafinizados foram armazenados em geladeira (4°C) até o momento da microtomia.

Foram obtidos cortes histológicos de 5 µm de espessura em micrótomo manual (Leica Biosystems, Germany) e confecção de lâminas para coloração com hematoxilina e eosina (HE).

#### **4.10 Coloração com Hematoxilina e Eosina (HE)**

Para a coloração com HE, a bateria de desparafinização química foi iniciada com o uso de xilol, por três sucessivas passagens, 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 DPX [p-xylene-bis (N-pyridinium bromide)] (Sigma-Aldrich, USA).

Foram capturadas cinco imagens aleatórias da área cortical de cada lâmina utilizando um fotomicroscópio (Olympus® AX70) acoplado a uma câmera digital (Axiocam Erc5s, Zeiss®), nas objetivas de 40x.

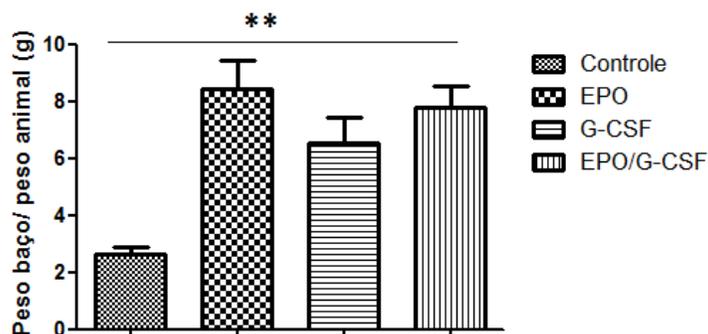
#### **4.11 Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism Versão 5.0.1 (GraphPad Software; San Diego, Califórnia, EUA). A análise dos dados referentes aos diferentes testes comportamentais e à avaliação da área macroscópica de infarto cerebral foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via com *post-hoc* Bonferroni. Para os dados de peso relativo do baço e contagens de leucócitos e hemácias, a análise estatística foi realizada por meio de ANOVA de uma via com *post-hoc* Dunnett. Em ambos os casos, as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Relação peso úmido do baço/peso corporal

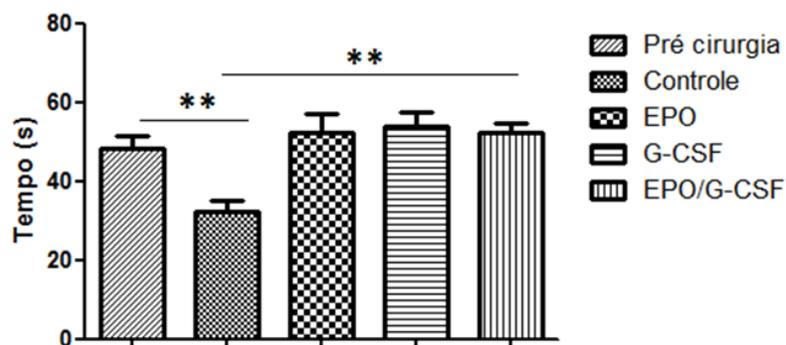
Após o sacrifício dos animais, o peso relativo do baço foi avaliado. Tanto o grupo tratado com EPO, quanto com G-CSF e com EPO e G-CSF apresentaram a relação peso úmido do baço/peso corporal estatisticamente superior ao grupo controle (Figura 7).



**Figura 7.** Peso relativo do baço dos animais dos diferentes grupos experimentais (n=8). Dados apresentados como média  $\pm$  EPM. \*\* $p < 0,05$ , ANOVA uma via, *post hoc* Dunnett.

### 5.2 Teste de resistência de agarre (*wire hang*)

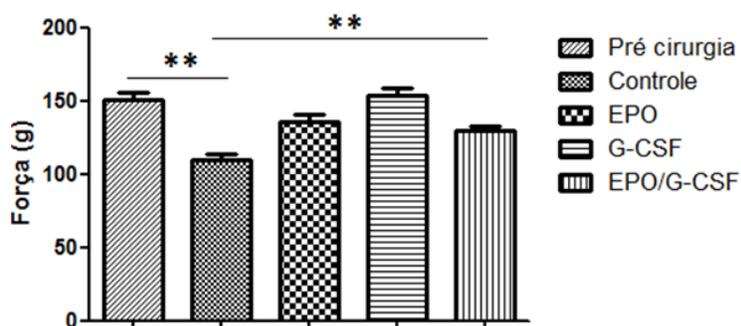
A latência para queda dos animais foi avaliada por meio da tarefa de *wire hang* com o objetivo de verificar se o tratamento foi capaz de evitar a perda de força muscular dos animais submetidos ao AVE. Conforme resultados obtidos, os animais tratados com G-CSF e EPO apresentaram latência semelhante a animais antes da intervenção cirúrgica, enquanto os animais controle sofreram queda em período inferior (figura 8).



**Figura 8.** Tempo de latência para queda dos animais. Valores expressos em segundos – ‘s’, referentes a animais no período pré-cirúrgico, e no período pós-cirúrgico do grupo controle, do grupo tratado com G-CSF na dose de 100µg/kg/dia, do grupo tratado com EPO na dose 5000 UI/kg/dia e com ambos (n=8). Dados apresentados como média ± EPM. \*\*p<0,05; ANOVA uma via, *post hoc* Bonferroni.

### 5.3 Mensuração da Força Muscular (*grip test*)

Por meio do teste de agarre, pôde-se verificar que os animais tratados com EPO e G-CSF apresentaram força muscular estatisticamente superior aos valores apresentados pelos animais do grupo controle, e não houve diferença estatística entre a força dos animais submetidos a diferentes tratamentos e a força dos animais controles pré-cirúrgicos, conforme mostrado na figura 9.

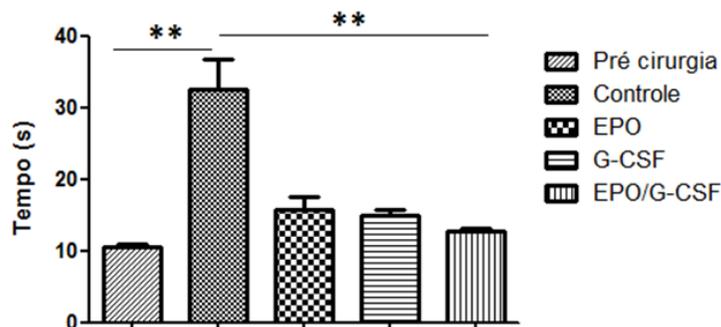


**Figura 9.** Mensuração da força muscular (*grip strenght*). Valores expressos em “g”, referentes a animais no período pré curúrgico, e dos animais dos grupos controle pós-cirúrgico, do grupo tratado com G-CSF na dose de 100µg/kg/dia, do grupo tratado com EPO na dose 5000 UI/kg/dia e com

ambos (n=8), após oclusão bicarotídea. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM.  $**p<0,05$ ; ANOVA uma via, *post hoc* Bonferroni.

#### 5.4 Teste de escalada em haste vertical (*pole test*)

Ainda para verificar o efeito do tratamento sobre parâmetros motores dos animais, foi avaliado o tempo de descida dos mesmos na tarefa *pole test*. Os dados revelam que, apesar de os animais tratados apresentarem tempo de descida superior aos controles pré-cirúrgicos, essa diferença não foi significativa. Já os animais controles pós-cirurgia tiveram tempo de escalada significativamente superior aos demais (figura 10). Esses resultados demonstram que animais submetidos a oclusão bicarotídea e tratados com EPO e G-CSF mantêm a agilidade e coordenação motora semelhante a animais controles pré-cirurgia.

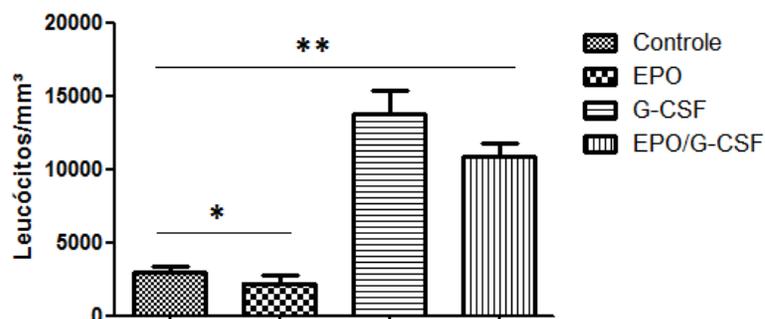


**Figura 10.** Tempo de descida no teste de escalada em haste vertical. Valores expressos em segundos – ‘s’, referentes aos animais dos diferentes grupos experimentais (n=8). Dados apresentados como média  $\pm$  EPM.  $**p<0,05$ ; ANOVA uma via, *post hoc* Bonferroni.

#### 5.5 Contagem de Leucócitos sanguíneos totais

Partindo da amostra sanguínea coletada, realizou-se a contagem de leucócitos totais, para atestar o efeito de G-CSF no estímulo da leucopoese. O grupo tratado com G-CSF apresentou contagem estatisticamente superior de leucócitos totais

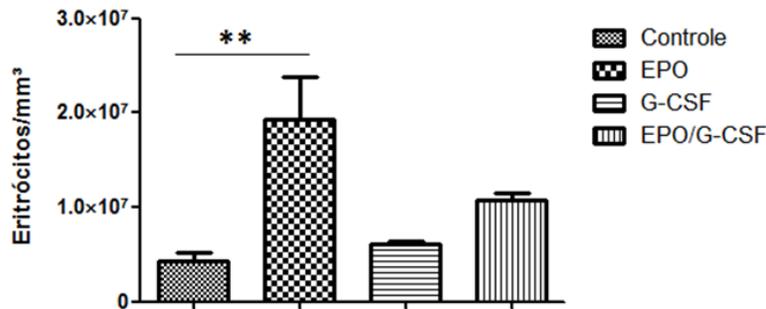
circulantes por  $\text{mm}^3$  de sangue quando comparado ao grupo controle, enquanto os animais tratados apenas com EPO não apresentaram aumento na contagem. O grupo EPO/G-CSF também apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, conforme figura 11.



**Figura 11.** Contagem de leucócitos. Valores expressos em leucócitos/ $\text{mm}^3$ , dos animais controle e tratados (n=8). Dados apresentados como média  $\pm$  EPM. \* $p > 0,05$ ; \*\* $p < 0,05$ ; ANOVA uma via, *post hoc* Dunnett.

## 5.6 Contagem de Hemácias

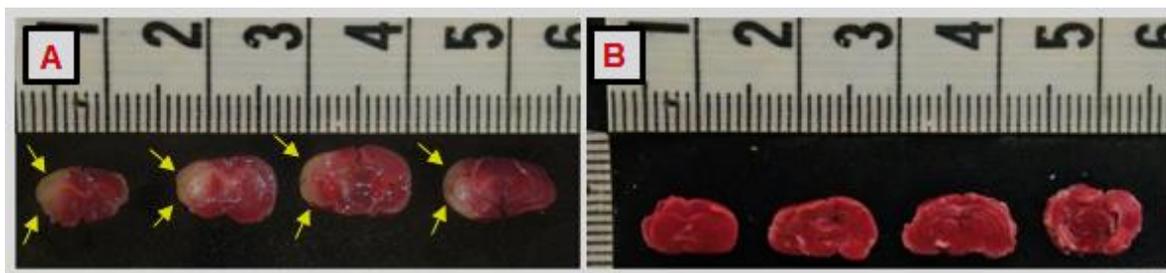
Ainda a partir da amostra de sangue, foi realizada a contagem de eritrócitos, com o objetivo de constatar a ação de EPO na eritropoiese. O grupo tratado com EPO apresentou contagem estatisticamente superior de eritrócitos circulantes por  $\text{mm}^3$  de sangue, quando comparado ao grupo controle (figura 12). Os animais tratados apenas com G-CSF não apresentaram aumento na contagem de hemácias. Já o grupo EPO/G-CSF, apesar de mostrar uma tendência ao aumento na contagem, não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.



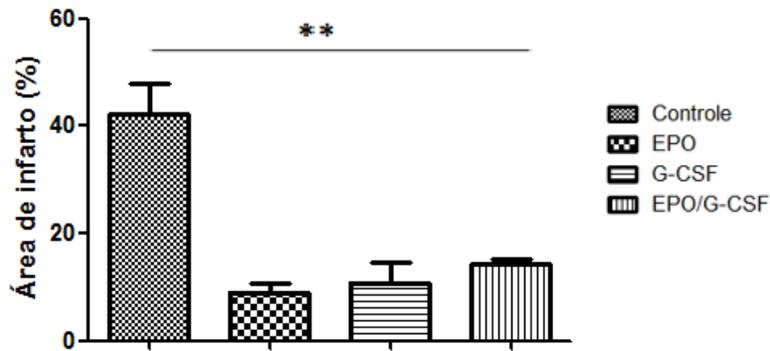
**Figura 12.** Contagem de eritrócitos. Valores expressos em eritrócitos/mm<sup>3</sup> dos diferentes grupos experimentais (n=8). Dados apresentados como média ± EPM. \*\*p<0,05; ANOVA uma via, *post hoc* Dunnett.

### 5.7 Área macroscópica de infarto cerebral

Após a coloração do tecido cerebral com TTC, o exame macroscópico dos cortes cerebrais (Figura 13) mostrou uma área extensa infartada (cor branca) em animais não tratados (42,27±5,572%), enquanto que esta área foi significativamente menor nos grupos tratados com EPO (9,048±1,745%), G-CSF (10,80±3,864%), e EPO/G-CSF (14,15±0,9221%). A análise morfométrica indicou que a extensão da área infartada foi significativamente menor (p <0,05) nos animais tratados com os diferentes fármacos em comparação com a área medida no grupo controle, e que não houve diferença significativa na área de infarto cerebral entre os diferentes esquemas terapêuticos empregados (Figura 14).



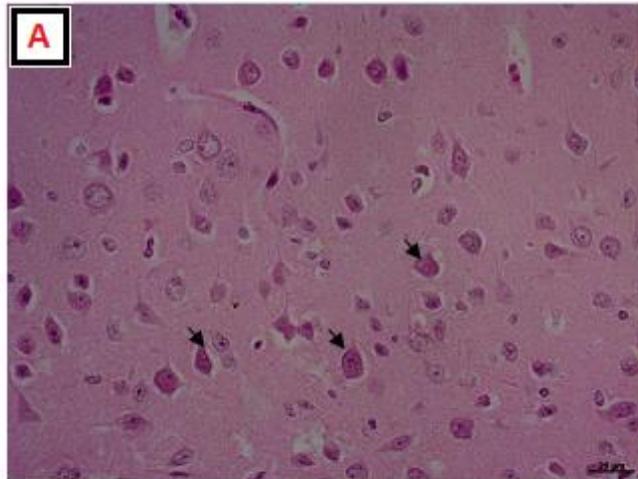
**Figura 13.** Cortes coronais de cérebros corados com TTC. **A.** Cérebro de animal do grupo controle, com extensa área de infarto (setas). **B.** Cérebro com pequena área de penumbra, de animal do grupo tratado com EPO e G-CSF (5000 UI/kg/dia + 100µg/kg/dia).



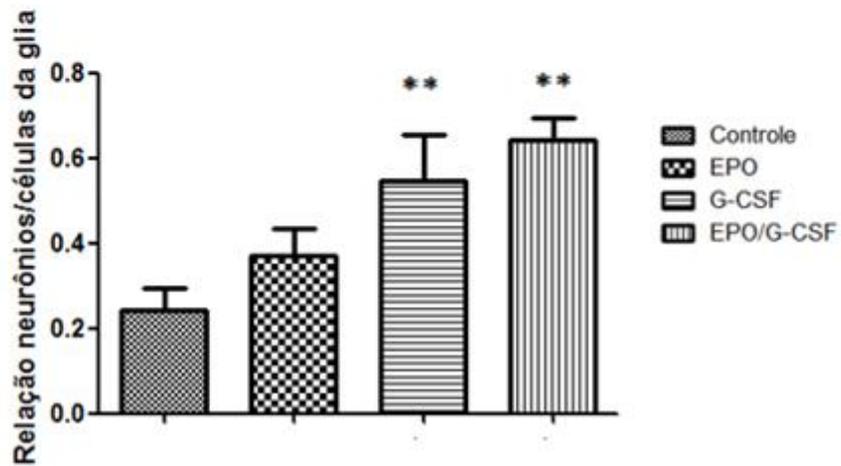
**Figura 14.** Área macroscópica de infarto cerebral em relação à área cerebral total (%), dos grupos controle pós cirúrgico, grupos tratados com EPO na dose 5000 UI/kg/dia, do grupo tratado com G-CSF na dose de 100µg/kg/dia, e do grupo tratado com com ambos (n=4). Dados apresentados como média ± EPM. \*\*p<0,05; ANOVA uma via, *post hoc* Dunnett.

### 5.8 Relação neurônios/células da glia

Na análise histológica com coloração por HE (figura 15A), foram examinados os efeitos dos diferentes esquemas terapêuticos cinco dias após isquemia. Observou-se que os grupos tratados com G-CSF e com EPO/G-CSF de forma associada apresentaram resultados significativamente superiores em relação à contagem de neurônios/células da glia. No grupo tratado apenas com EPO, apesar de haver uma tendência a maior relação, esse aumento não foi estatisticamente significativo (figura 15B).



**B**



**Figura 15. A.** 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: 20 $\mu$ m. **B.** Relação entre o número de neurônios/células da glia (n=5). Dados apresentados como média + EPM. \*\* $p < 0,05$ ; ANOVA uma via, *post hoc* Dunnett.

## 6 DISCUSSÃO

Define-se isquemia cerebral como a redução do fluxo sanguíneo cerebral a níveis críticos, gerando, por consequência, danos em todo o tecido cerebral (isquemia global) ou em uma determinada região (focal) (HARUKUNI, BHARDWAJ, 2006). Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito neuroprotetor dos fatores de crescimento EPO e G-CSF utilizando um modelo de isquemia cerebral global como forma de mimetizar um AVE.

O AVE é determinado dentro de segundos após a redução do fluxo sanguíneo para uma determinada região encefálica, resultando em imediata baixa dos níveis de oxigênio e glicose no tecido lesado. Inicia-se uma série de eventos bioquímicos que começam pela desintegração da membrana celular e culminam com a morte neuronal (LAKHAN et al., 2009). Para a avaliação do efeito neuroprotetor das drogas utilizadas no presente estudo, os animais utilizados foram submetidos a atividades capazes de avaliar sua atividade motora, além de avaliação hematológica e histológica.

O progresso recente nos tratamentos agudos é encorajador, mas eles normalmente só podem ser aplicados a uma pequena parcela da população acometida por AVE. Para além da fase aguda, existem poucos tratamentos eficazes e novas abordagens são necessárias (ENGLAND et al., 2016). Apesar dos enormes investimentos em pesquisa pré-clínica e clínica, poucas intervenções eficazes para prevenir lesões cerebrais isquêmicas foram encontradas, além do rápido restabelecimento do fluxo sanguíneo. Na verdade, o uso do ativador do plasminogênio tecidual recombinante (rtPA) é a única intervenção com eficácia clínica comprovada para AVE isquêmico.

Apesar da disponibilidade e evidência de eficácia generalizada, o tratamento de AVE agudo com ativador do rtPA é subutilizado nos países industrializados, como EUA e Reino Unido, onde menos de 8% dos pacientes com AVEi recebem este tratamento. A principal razão para as baixas taxas de uso do rtPA é atraso pré-hospitalar relacionado com o paciente e/ou testemunha responsável pela tomada de decisões após a ocorrência de um AVE (DOMBROWSKI et al., 2015).

A enorme complexidade da cascata de lesões desencadeadas durante o processo de isquemia-reperusão é um grande desafio para qualquer potencial tratamento para a isquemia cerebral (NGUYEN et al., 2014). Essa complexa fisiopatologia do AVE envolve inúmeros processos inter-relacionadas e coordenadas, incluindo a falha energética, perda de homeostase iônica celular, acidose, aumento dos níveis de cálcio intracelular, excitotoxicidade, toxicidade mediada por radicais livres, a geração de produtos de ácido araquidônico, citotoxicidade mediada por citocinas, a ativação do complemento, perturbação da barreira hematoencefálica, ativação de células gliais e a infiltração de leucócitos (WOODRUFF et al., 2011).

Neste contexto, a sinalização de fatores hematopoéticos surge como um potencial sistema protetor no cérebro, por atuar nos mecanismos-chave na patologia aguda do AVE e melhorar sua recuperação, pelo menos em parte, por meio da formação de novos neurônios. Para fins terapêuticos, fatores como EPO e G-CSF cumprem idealmente os critérios de uma droga para AVE, por atuarem em mecanismos de ação tanto de sua fisiopatologia aguda quanto da crônica (SCHNEIDER et al., 2005).

EPO e G-CSF são susceptíveis de desempenhar um amplo papel no sistema nervoso, assim como o fazem na formação do sangue, uma vez que os receptores para ambos são expressos no cérebro (YU et al., 2014). A EPO é produzida principalmente pelo fígado no período pré-natal e, no pós-parto, 90% da produção de EPO passa a ocorrer nos rins, em resposta à hipoxemia. EPO circula para a medula óssea, onde ela suprime a apoptose de unidades formadoras de colônias eritróides, promovendo a proliferação e o desenvolvimento destas células em eritrócitos maduros. A proteção anti-apoptótica de EPO em precursores eritróides foi uma indicação de que ela pode proteger de forma semelhante células de outros tecidos, incluindo o cérebro (NGUYEN et al., 2014).

Os benefícios do tratamento com EPO na terapia do AVE são enormes. Demonstrou-se que a EPO administrada por via sistêmica é prontamente permeável à barreira hematoencefálica, oferecendo assim uma vantagem para a sua utilização clínica na terapia do AVE humano (SOUVENIR et al., 2015).

O G-CSF também é apontado como neuroprotetor no AVEi quando administrado em diferentes doses, na presença de tratamento trombolítico, como indutor de recuperação funcional e promovendo a angiogênese e neurogênese, além de reduzir o volume da lesão decorrente do AVE, quando administrado de forma aguda (ENGLAND et al., 2016). Na fase aguda do AVEi, a ação anti-apoptótica, anti-inflamatória, imunomoduladora e a ação protetora contra a neurotoxicidade excitatória têm sido relatados como papéis neuroprotetores do G-CSF (MIZUMA; TAKIZAWA, 2016).

### **6.1 Função esplênica e parâmetros hematológicos**

Neste estudo, as medidas de peso úmido do baço em relação ao peso corporal e a contagem de leucócitos totais e eritrócitos foram obtidas para que se pudesse avaliar o possível efeito de G-CSF e EPO alterando a função esplênica, bem como o recrutamento de leucócitos e a eritropoese. Conforme resultados apresentados, foi encontrada diferença significativa entre todos os grupos tratados e o grupo controle para a relação peso úmido baço/peso corporal do animal, sugerindo o efeito desses fármacos na alteração da função esplênica, promovendo o aumento do volume do baço.

Doycheva e cols. (2014), ao avaliar os efeitos do uso de G-CSF em isquemia neonatal, não verificaram aumento do peso do baço após 3 dias consecutivos de tratamento. Já no estudo realizado por Kiang e cols (2014), que avaliou os efeitos de G-CSF na neutropenia induzida por radiação, foi verificado aumento significativo no peso úmido do baço de animais nos quais foi administrado o G-CSF durante 14 dias.

Os tecidos hematopoéticos e relacionados à imunidade apresentam características estruturais e funcionais em comum, atuando como filtros vasculares, com uma rede vascular onde células sanguíneas são armazenadas (TORRES et al., 2000). O baço desempenha diferentes funções relacionadas à hematopoiese, como armazenamento e eliminação de hemácias (hemocaterese) e plaquetas e, além de

participar da hematopoiese inicial, da produção linfócitos e plasmócitos, degradação de hemoglobina, estoque de ferro, remoção de corpúsculos de Howell-Jolly, corpúsculos de Heinz e parasitas dos eritrócitos (LOPES et al., 2007). Logo, o aumento de seu volume em consequência do tratamento com EPO e G-CSF era esperado, devido à indução da eritropoiese e leucopoese gerada por tais fatores.

Com a administração de EPO e G-CSF esperava-se o aumento na contagem de eritrócitos e leucócitos, respectivamente, uma vez que essas são as atividades biológicas primárias desses fatores de crescimento. Evidências sugerem que EPO promova aporte da eritropoese por desempenhar um papel instrutivo na determinação do destino da célula progenitora hematopoiética. EPO suprime a determinação de linhagens não-eritróides e, principalmente em doses elevadas, aumenta o recrutamento de células progenitoras eritróides, reduzindo células progenitoras comprometidas da linhagem de granulócitos/macrófagos e megacariócitos, além de suprimir as células formadoras de colônias linfóides, por meio de reprogramação de transcrição (GROVER et al., 2014).

Assim como o aumento da contagem de eritrócitos resultante do tratamento com EPO, também eram esperados maiores níveis de leucócitos sanguíneos em animais tratados com G-CSF. Isso porque foi demonstrado que sua administração produz um aumento dose-dependente da contagem de leucócitos sanguíneos em indivíduos saudáveis, de forma que sua deficiência gera neutropenia. De forma semelhante ao que ocorre com EPO, a administração de G-CSF estimula o desenvolvimento de leucócitos na medula óssea, possibilitando que estes atinjam a corrente sanguínea em tempo inferior ao habitual (MOLINEUX, 2002; PRICE et al., 1996). O aumento na contagem de leucócitos em animais tratados com G-CSF já pode ser identificado a partir do segundo dia após sua administração, como demonstrado por Floel e cols. (2011).

## **6.2 Análise da função motora**

Além de examinar as medidas histopatológicas em roedores, é importante avaliar o

resultado funcional após um AVE, uma vez que esta avaliação pode complementar dados histológicos quando avalia-se os efeitos, os resultados e tratamentos direcionados ao AVE (SCHAAR et al., 2010). Neste estudo, para verificar se as lesões celulares geradas pela isquemia promoveram alterações funcionais, avaliou-se o desempenho de animais do grupo controle, que receberam solução glicosada, animais tratados com G-CSF, tratados com EPO e tratados com ambos os fatores de crescimento em tarefas capazes de avaliar parâmetros motores.

A tarefa de *wire hang* permite detectar anormalidades neuromusculares através da avaliação da capacidade do camundongo em sustentar seu próprio corpo, o que requer força muscular. Nossos resultados demonstraram que animais dos diferentes grupos avaliados não apresentam diferença em relação ao grupo controle no parâmetro avaliado. Dessa forma, os animais submetidos à oclusão bicarotídea e posterior tratamento com G-CSF e EPO são capazes de sustentar seus corpos por tempo semelhante a animais não submetidos à isquemia, enquanto os animais controle pós-cirúrgicos não apresentaram a mesma capacidade.

Devido à natureza analítica deste método, utilizou-se um teste de caráter quantitativo para avaliar a força muscular em camundongos. Para tal propósito, a tarefa escolhida foi o teste de força de agarre, no qual é feita uma medida da força muscular dos membros anteriores do animal, e é considerado um método mais objetivo que o *wire hang* (HUTTER-SAUNDERS et al., 2012). Os animais tratados apresentaram valores para a força de agarre estatisticamente superiores aos valores apresentados pelos animais do grupo controle, não havendo nenhuma diferença estatística entre a força dos animais submetidos a diferentes tratamentos e a força no período pré-cirúrgico. Assim, a manutenção da força muscular em animais tratados, já antecipada pelo *wire hang*, foi novamente observada pelo *grip*.

O teste de escalada em haste vertical, também conhecido como *pole test* é uma tarefa motora cujo objetivo é avaliar a força dos membros anteriores, capacidade de compreensão e equilíbrio em camundongos (BOUET et al., 2007). Os resultados obtidos neste teste reforçam os apresentados nas tarefas de *wire hang* e *grip force*, demonstrando que as diferentes terapias avaliadas foram capazes de manter a

atividade motora semelhante à de animais controles não isquemiados. Manwani e colaboradores (2011) afirmam que tanto a escalada em haste vertical quanto *wire hang* são testes que permitem avaliar força motora, equilíbrio e coordenação de maneira simples e de baixo custo, podendo revelar os déficits motores em modelos experimentais de AVE (MANWANI et al., 2011).

No estudo de Gibson e cols. (2005), a administração de única dose de G-CSF apresentou efeitos benéficos sobre os parâmetros motores, avaliados por rotarod e *grid test*, exibindo resultados condizentes com os do presente estudo. Um trabalho recente forneceu evidências iniciais de que danos cerebrais decorrentes de um AVE podem ser reparados pela administração sistêmica do fator de células-tronco (SCF) associado ao G-CSF, que promoveram recuperação motora mesmo administrados de forma tardia (CUI et al., 2016). Tais resultados demonstram que a associação de G-CSF a outros fatores de crescimento pode ser uma terapia viável para o AVE.

### **6.3 Área macroscópica de infarto cerebral e Histologia**

Na patologia isquêmica observam-se duas áreas distintas: o centro da lesão, denominado centro isquêmico e uma região mais periférica, a penumbra isquêmica (LO et al., 2003). O centro isquêmico é uma região caracterizada por diminuição do oxigênio e dos estoques de ATP, o que resulta na falência metabólica e morte das células em minutos, a não ser que, o fluxo sanguíneo seja rapidamente restaurado (KUNZ, et al., 2010).

O conceito originalmente proposto para “penumbra” refere-se às regiões de tecido cerebral nas quais o fluxo sanguíneo é suficientemente reduzido para causar hipóxia suficientemente grave para prejudicar funções fisiológicas, mas não a ponto de provocar a falha irreversível do metabolismo energético e necrose celular (ASTRUP et al., 1981). A penumbra isquêmica é também muitas vezes definida como um tecido viável que envolve o centro isquêmico, irreversivelmente danificado (ARSENE et al., 2011). Um estudo recente revelou que muitos neurônios na penumbra isquêmica podem sofrer apoptose apenas várias horas ou dias após o

evento isquêmico e, dessa forma, são potencialmente recuperáveis por algum tempo depois do AVE (WOODRUFF et al., 2011).

A redução significativa na área de infarto cerebral nos animais tratados com EPO encontrada neste estudo também foi demonstrada por Sirén e colaboradores (2001), os quais demonstraram redução média de 75% da área de infarto com a administração de 5000 UI/kg de EPO, via i.p., no início de 60 minutos de oclusão da artéria cerebral média. Os resultados ainda estão de acordo com os de Brines e colaboradores (2000), que verificaram redução significativa do volume de infarto em ratos submetidos à isquemia cerebral focal, mesmo com a administração de EPO de forma tardia, 6 horas após oclusão-reperusão.

Apesar de ter promovido redução da área de infarto, a administração de EPO não levou a aumento significativo da relação neurônios/células da glia. Resultados contraditórios como este foram encontrados também por Ratalil e colaboradores (2014), que apesar de não observarem redução do volume de infarto após a administração de EPO, os autores verificaram outros efeitos neuroprotetores e sugeriram que EPO tenha efeito indireto sobre o edema cerebral, em consequência da preservação da barreira hematoencefálica. Outros possíveis mecanismos para a ação neuroprotetora de EPO seriam por indução de componentes-chave do arsenal antioxidante do cérebro (ZHANG et al., 2010), supressão de metaloproteinases de matriz (LI et al., 2008) e da inflamação (VILLA et al., 2003) e por proteção das sinapses contra níveis tóxicos de glutamato, por diminuir a probabilidade de liberação do neurotransmissor (KAMAL et al., 2011).

A melhora expressiva da área de lesão cerebral no grupo tratado com G-CSF também consiste com os dados encontrados na literatura consultada. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Gibson e colaboradores (2005), que observaram redução de 45% no volume de lesão cerebral, porém em um modelo de isquemia focal, com oclusão de 60 minutos e uma única administração de 50µg/kg de G-CSF, por via subcutânea, no início do período de reperusão. Observou-se, em outro estudo, a redução da área de infarto mediada pela administração de G-CSF em modelo de isquemia neonatal em ratos (LI et al., 2015).

Apesar desses resultados positivos, Popa-Wagner e colaboradores (2010) não verificaram efeitos significativos de G-CSF na redução do volume de infarto em animais idosos.

Um estudo realizado por Liu e colaboradores (2010) avaliou os efeitos da terapia utilizando EPO em combinação com G-CSF em modelo animal de isquemia focal. Os resultados obtidos demonstraram que os dois fatores atuam sinergicamente promovendo angiogênese e plasticidade do tecido no modelo estudado, levando a uma maior recuperação funcional do que quando administrados de forma isolada (LIU et al., 2010). Num outro estudo, os autores sugerem que a recuperação funcional produzida por essa terapia combinada ocorra de forma dependente do tempo, e que o mecanismo envolvido seja, provavelmente, a indução da atividade de HIF-1 (YU et al., 2014).

Um estudo recente avaliou a associação de EPO e G-CSF em pacientes com AVE crônico. Neste estudo, os pacientes receberam EPO (300 U/kg) e G-CSF (10 µg/kg), uma vez ao dia, cinco dias por mês, durante três meses, e foram acompanhados durante seis meses. Houve aumento significativo nos níveis de EPO, células estaminais hematopoiéticas CD34+, glóbulos brancos e neutrófilos no quinto dia de cada ciclo e, nos resultados funcionais, a força da mão dominante foi aumentada no grupo tratado. Não foram observados eventos adversos graves (SHIN, CHO, 2016). Os resultados deste estudo duplo-cego forneceram a primeira evidência de que a terapia EPO+G-CSF tem potencial terapêutico seguro e benéfico para pacientes com AVE crônico. No entanto, o tamanho da amostra é limitado e os autores frisam a necessidade de estudos que incluam pacientes agudos e subagudos.

Tomados em conjunto, nossos dados revelam que a associação de EPO e G-CSF melhorou os parâmetros motores dos animais tratados, reduziu expressivamente a área de infarto cerebral e aumentou a contagem de neurônios. No entanto, os resultados obtidos nas doses utilizadas, no tratamento agudo, não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os resultados observados quando se utilizou esses fármacos de forma isolada. Vale ressaltar que não foram observados efeitos deletérios, o que viabiliza futuros estudos que utilizem diferentes doses e

esquemas de administração, com a avaliação de diferentes parâmetros e estudos na fase crônica.

## 7 CONCLUSÕES

Os diferentes esquemas terapêuticos avaliados (tratamento com EPO na dose de 5000 UI/kg/dia, G-CSF na dose de 100µg/kg/dia e a associação de ambos, durante cinco dias) promoveram:

- Preservação da força muscular, do equilíbrio e da coordenação motora dos animais avaliados por meio de *wire hang*, *grip force* e *pole test*;
- Aumento da relação peso úmido do baço/peso corporal do animal;
- Aumento da contagem de leucócitos, exceto no grupo tratado apenas com EPO;
- Aumento da contagem de eritrócitos, sendo este aumento significativo apenas no grupo tratado com EPO;
- Redução significativa da área de infarto cerebral;
- Aumento significativo da relação neurônios/células da glia, exceto quando tratados apenas com EPO.

Apesar de todos os esquemas terapêuticos apresentarem efeitos positivos no tratamento da isquemia cerebral no modelo animal utilizado, os efeitos não diferiram de forma expressiva entre os diferentes grupos, mostrando que, nas doses utilizadas, no intervalo de administração empregado, na fase aguda do AVEi não houve efeito sinérgico entre as drogas. Estudos adicionais na fase crônica e incluindo diferentes doses seriam necessários para verificar a viabilidade da terapia estudada.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUD, A.P.R. **Atividade imunomodulatória de complexos altamente diluídos sobre células de medula óssea murina e linhagem leucêmica humana**. 2010. 129 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

ALLEN, C.L.; BAYRAKTUTAN, U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. **Int J Stroke**, v.4, n.6, p.461-470, 2009.

ARSENE, D., VASILESCU, F., TOADER, C., BALAN, A., POPA, C., ARDELEANU, C. Clinico-pathological correlations in fatal ischemic stroke. An immunohistochemical study of human brain penumbra. **Rom. J. Morphol. Embryol.**, v.52, n.1, p.29-38, 2011.

ASTRUP, J.; SIESJO, B.K.; SYMON, L. Thresholds in cerebral ischemia – the ischemic penumbra. **Stroke**, v.12, p.723–725, 1981.

BATISTA, L.F.Z. **Mecanismos de indução de apoptose pela presença de danos ao DNA: Um estudo sobre o papel de p53 na resistência de glioma a agentes quimioterápicos**. 2008. 159f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BLISS, T.; GUZMAN, R.; DAADI, M. et al. Cell transplantation therapy for stroke. **Stroke**, v. 38, p. 817–26, 2007.

BOUET, V.; FRERET, T.; TOUTAIN, J.; DIVOUX, D.; BOULOUARD, M.; SCHUMANN-BARD, P. Sensorimotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse. **Exp Neurol.**, v.203, p.555–567, 2007.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução RE nº 1316, 23 de julho de 2002. Diário Oficial da União, 2002; jul 25.

BRINES, M.L.; GHEZZI, P.; KEENAN, S. et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. **Proc Natl Acad Sci**, v. 97, n. 19, p. 10526-10531, 2000.

BROUGHTON, B.R.S.; REUTENS, D.C.; SOBEY, C.G. Apoptotic Mechanisms After Cerebral Ischemia. **Stroke**, v.40, p.331-339, 2009.

CASTRO, C.C. **Investigação do efeito neuroprotetor do coumestrol em modelos in vitro e in vivo na isquemia cerebral experimental**. 2013. 156f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

COHEN, J.S. Peripheral neuropathy associated with fluorquinolones. **Annals Pharmacoth.**, v.35, p. 1-7, 2001.

COPSTEIN, L.; FERNANDES, J.G.; BASTOS, G.A.N. Prevalence and risk factors for stroke in a population of Southern Brazil. **Arq.Neuro-Psiquiatr.**, v. 71, n.5, 2013.

CUI, L.; WANG, D.; MCGILLIS, S.; KYLE, M.; ZHAO, L. Repairing the Brain by SCF+G-CSF Treatment at 6 Months Postexperimental Stroke. **ASN Neuro**, v. 8, n.4, 2016.

DEMETRI, G.D.; GRIFFIN, J.D. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. **Blood**, v. 78, p.2791–2808, 1991.

DOMBROWSKI, S.U.; FORD, G.A.; MORGENSTERN, L.B.; WHITE, M.; SNIEHOTTA, F.F.; MACKINTOSH, J.E.; GELLERT, P.; SKOLARUS, L.E. Differences Between US and UK Adults in Stroke Preparedness. **Stroke**, v.46, n.11, p.3.220-3.225, 2015.

DOYCHEVA, D.M.; HADLEY, T.; LI, L.; APPLGATE, R.L.; ZHANG, J,H.; TANG, J. Anti-neutrophil antibody enhances the neuroprotective effects of G-CSF by decreasing number of neutrophils in hypoxic ischemic neonatal rat model. **Neurobiology of disease**, v.69, p.192-199, 2014.

EGRIE, J.C.; STRICKLAND, T.W.; LANE, J. et al.Characterization and biological effects of recombinant human erythropoietin. **Immunobiology**, v. 172, p. 213–224, 1986.

EHRENREICH, H.; WEISSENORN, K.; PRANGE, H. Recombinant Human Erythropoietin in the Treatment of Acute Ischemic Stroke. **Stroke**, 2009.

ENGLAND, T.J.; ABAEI, M.; AUER, D.P. et al. Granulocyte-Colony Stimulating Factor for Mobilizing Bone Marrow Stem Cells in Subacute Stroke: The Stem Cell Trial of Recovery Enhancement After Stroke 2 Randomized Controlled Trial. **Stroke**, 2012.

ENGLAND, T.J.; SPRIGG, N.; ALASHEEV, A.M.; BELKIN, A.A.; KUMAR, A.; PRASAD, K.; BATH, P.M. Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) for stroke: an individual patient data meta-analysis. **Sci. Rep**, v.15, n.6, 2016.

FEATHERSTONE, D.E. Intercellular Glutamate Signaling in the Nervous System and Beyond. **ACS Chem Neurosci.**, v. 1, p.4-12, 2010.

FLOEL, A.; WARNECKE, T.; DUNING, T.; LATING, Y.; UHLENBROCK, J.; SCHNEIDER, A.; VOGT, G.; LAAGE, R.; KOCH,W.; KNECHT, S.; et al. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) in stroke patients with concomitant vascular disease—A randomized controlled trial. **PLoS ONE**, v.6, 2011.

FRANCISCO, A.F. **Estresse oxidativo, defesas antioxidantes e processo inflamatório na fase aguda da Doença de Chagas experimental**. 2011. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.

FRIED, W. Erythropoietin and erythropoiesis. **Experimental Hematology**, v. 37, n. 9, p. 1007-1015, 2009.

GENC, S.; KOROGLU, T.F.; GENC, K. Erythropoietin and the nervous system. **Brain Res**, v. 1000, p. 19–31, 2004.

GIBSON, C.L.; BATH, P.M.W.; MURPH, S.P. G-CSF Reduces Infarct Volume and Improves Functional Outcome after Transient Focal Cerebral Ischemia in Mice. **J Cereb Blood Flow Metab**, v.25, n.4, p.431-439, 2005.

GINSBERG, M.D. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. **Neuropharmacology**, v. 55, p. 363–389, 2008.

GOMES, F. R. **Expressão do fator estimulante de colônia de granulócitos humano recombinante (rhG-CSF) em *Escherichia coli***. 2010. 24 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

GREENBERG, D.A; JIN, K. Growth Factors and Stroke. **NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, 2006.

GROVER, A.; MANCINI, E.; MOORE, S.; MEAD, A.J.; ATKINSON, D.; RASMUSSEN, K.D.; O'CARROLL, D.; JACOBSEN, S.E.; NERLOV, C. Erythropoietin guides multipotent hematopoietic progenitor cells toward an erythroid fate. **J. Exp. Med**, v.211, n.2, p.181-188, 2014.

GUO, S. et al. Granulocyte colony-stimulating factor improves neuron survival in experimental spinal cord injury by regulating nucleophosmin-1 expression. **J Neurosci Res**, v. 92, n. 6, p. 751-60, 2014.

HARDEE, M.E.; ARCASOY, M.O.; BLACKWELL, K.L. et al. Erythropoietin Biology in Cancer. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 2, p. 332-339, 2006.

HARUKUNI, I.; BHARDWAJ, A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. **Neurologic Clinics**, v.24, p.1-21, 2006.

HENRY, C.J. et al. Veterinary uses of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. Part I. Oncology. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 20, n. 6, p. 728-734, 1998.

HUTTER-SAUNDERS, J.A.L.; GENDELMAN, H.E.; MOSLEY, R.L. Murine Motor and Behavior Functional Evaluations for Acute 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-

Tetrahydropyridine (MPTP) Intoxication. **J Neuroimmune Pharmacol**, v.7, n.1, p.279–288, 2012.

JELKMANN, W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. **Physiological Reviews**, v. 72, n. 2, p. 449-89, 1992.

JELKMANN, W. The erythropoietin receptor in normal and cancer tissues. **Crit Rev OncolHematol.**,v. 67, n. 1, p. 39-61, 2008.

JERNDAL, M.; FORSBERG, K.; SENA, E.S. et al.A systematic review and meta-analysis of erythropoietin in experimental stroke. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 30, p. 961–968, 2010.

JIA, L.; CHOPP, M.; ZHANG, L.; LU, M.; ZHANG, Z.G. Erythropoietin in combination of tissue plasminogen activator exacerbates brain hemorrhage when treatment is initiated 6h after stroke. **Stroke**, v.41, n.9, p.2071–2076, 2010.

JIN, R.; LIU, L.; ZHANG, S.; NANDA, A.; LI, G. Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke. **J Cardiovasc Transl Res**, v.6, n.5, 2013.

KAMAL, A.; AL SHAIBANI, T.; RAMAKERS, G. Erythropoietin decreases the excitatory neurotransmitter release probability and enhances synaptic plasticity in mice hippocampal slices. **Brain Res**, v. 1410, p.33–37, 2011.

KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British J. Cancer**, v.26, n.4, p.239-257, 1972.

KIANG, J.G.; ZHAI, M.; LIAO, P.-J.; BOLDUC, D.L.; ELLIOTT, T.B.; GORBUNOV, N.V. Pegylated G-CSF Inhibits Blood Cell Depletion, Increases Platelets, Blocks Splenomegaly, and Improves Survival after Whole-Body Ionizing Irradiation but Not after Irradiation Combined with Burn. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2014.

KIM, J.Y.; KAWABORI, M.; YENARI, M.A. Innate inflammatory responses in stroke: mechanisms and potential therapeutic targets. **Curr Med Chem**, v.21, n.18, p.2076–2097, 2014.

KRAMER, M.; DANG, J.; BAERTLING, F.; DENECKE, B.; CLARNER, T.; KIRSCH, C.; et al. TTC staining of damaged brain areas after MCA occlusion in the rat does not constrict quantitative gene and protein analyses. **Journal of neuroscience methods**, v.187, n.1, p.84-89, 2010.

KUNZ, A.; DIRNAGL, U.; MERGENTHALER, P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. **71 Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v.24, p. 495-509, 2010.

LAKHAN, S.E.; KIRCHGESSNER, A.; HOFER, M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. **J Transl Med.**, V.7, N.97, 2009.

LANFRANCONI, S. et al. Growth factors in ischemic stroke. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 15, n. 8, p. 1645-1687, 2011.

LANGSTON, C.E.; REINE, N.J.; KITTRELL, D. The use of erythropoietin. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.33, n.6, p.1245-1260, 2003.

LARSSON, S.C.; VIRTAMO, J.; WOLK, A. Total and specific fruit and vegetable consumption and risk of stroke: a prospective study. **Atherosclerosis**, v.2, p.147–152, 2013.

LI, L.; KLEBEB, D.; DOYCHEVAB, D.; MCBRIDE, D.W.; KRAFFT, P.R.; FLORES, J.; ZHOU, C.; ZHANG, J.H.; TANG, J. G-CSF ameliorates neuronal apoptosis through GSK-3 $\beta$  inhibition in neonatal hypoxia–ischemia in rats. **Experimental Neurology**, v. 263, p. 141–149, 2015.

LI, Y.; OGLE, M.E.; WALLACE, G.C.; LU, Z.Y.; YU, S.P.; WEI, L. Erythropoietin attenuates intracerebral hemorrhage by diminishing matrix metalloproteinases and maintaining blood-brain barrier integrity in mice. **Acta Neurochir**, v. 105, p. 105–112, 2008.

LIU, S.P.; LEE, S.D.; LEE, H.T.; LIU, D.D.; WANG, H.J.; LIU, R.S.; LIN, S.Z.; SHYU, W.C. Granulocyte Colony-Stimulating Factor Activating HIF-1 $\alpha$  Acts Synergistically with Erythropoietin to Promote Tissue Plasticity. **PLoS One**, v.5., n.4, 2010.

LO, E.H.; DALAKA, T.; MOSKOWITZ, M.A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. **Nat Rev Neurosci**, v.4, n.5, p.399-415, 2003.

LOCATELLI, F.; BERSANO, A.; BALLABIO, E. et al. Stem cell therapy in stroke. **Cell Mol Life Sci.**, v. 66, p. 757–772, 2009.

LOPES, S.T.A.; BIONDO, A.W.; SANTOS, A.P. **Manual de Patologia Clínica Veterinária**, 3<sup>a</sup>ed. - Santa Maria: UFSM/Departamento de Clínica de Pequenos Animais, 2007.

MALLICK, A.A.; GANESAN, V.; KIRKHAM, F.J.; FALLON, P.; HEDDERLY, T.; MCSHANE, T.; et al. Childhood arterial ischaemic stroke incidence, presenting features, and risk factors: a prospective population-based study. **Lancet Neurol**, v.13, p. 35–43, 2014.

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

MIKULÍK, R. et al. Calling 911 in Response to Stroke A Nationwide Study Assessing Definitive Individual Behavior. **Stroke**, v. 39, n. 6, p. 1844-1849, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **O uso do Alteplase (rt – PA) no Acidente Vascular Cerebral Isquêmico**. Brasília, 2009.

MINNERUP, J. et al. Neuroprotection for stroke: current status and future perspectives. **Int J MolSci**, v. 13, p. 11753–11772, 2012.

MINNERUP, J. et al. The efficacy of erythropoietin and its analogues in animal stroke models: a meta-analysis. **Stroke**, v. 40, p. 3113–20, 2009.

MINNERUP, J.; SCHÄBITZ, W. Multifunctional Actions of Approved and Candidate Stroke Drugs. **The Journal of the American Society for Experimental Neuro Therapeutics**, v. 6, p. 43–52, 2009.

MIZUMA, A.; TAKIZAWA, S. G-CSF treatment. **Nihon Rinsho**, v.74, n.4, p.643-648, 2016.

MOLINEUX, G. Physiologic and pathologic consequences of granulocyte colony stimulating factor deficiency. **Curr Opin Hematol.**, v.9, n.3, p.199-201, 2002.

MORETTI, A.; FERRARI, F.; VILLA, R.F. Neuroprotection for ischaemic stroke: Current status and challenges. **Pharmacology & Therapeutics**, 2014.

MURRAY, C.J.; VOS, T.; LOZANO, R.; NAGHAVI, M.; FLAXMAN, A.D.; MICHAUD, C. et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380 (9859), p. 2197–2223, 2012.

MWITA, C.C.; KAJIA, D.; GWER, S.; ETYANG, A.; NEWTON, C.R. Accuracy of clinical stroke scores for distinguishing stroke subtypes in resource poor settings; A systematic review of diagnostic teste accuracy. **J Neurosci Rural Pract**, v.5, n.4, p. 330–339, 2014.

NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKE - PA Stroke Study Group. **The New England Journal of Medicine**, v. 333, p. 1581-7, 1995.

NGUYEN, A.Q.; CHERRY, B.H.; SCOTT, G.F.; RYOU, M.G.; MALLET, R.T. Erythropoietin: Powerful Protection of Ischemic and Post-Ischemic Brain. **Exp Biol Med (Maywood)**, v.239, n.11, p.1461–1475, 2014.

O'DONNELL, M.J.; XAVIER, D.; LIU, L. et al. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. **The Lancet**, v. 376 (9735), p. 112–123, 2010.

OVBIAGELE, B.; NGUYEN-HUYNH, M.N. Stroke Epidemiology: Advancing our understanding of disease mechanism and therapy. **Neurotherapeutics**, v.8, p. 319-329, 2011.

PERUCH, B.R. **Neuroproteção mediada pelo Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (G-CSF) em modelo de isquemia cerebral global de camundongos hipercolesterolêmicos**. 2015. 73f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, Vitória, 2015.

PINTO, M.C.X.; RESENDE, R.R. Excitotoxicidade e doenças neurológicas. **Nanocell**, v.2, n.4, 2014.

POPA-WAGNER, A.; STOCKER, K.; BALSEANU, A.T.; ROGALEWSKI, A.; DIEDERICH, K.; MINNERUP, J.; MARGARITescu, C.; SCHABITZ, W. Effects of Granulocyte-Colony Stimulating Factor After Stroke in Aged Rats. **Stroke**, v.41, p.1027-1031, 2010.

**Portaria nº 664, de 12 de abril de 2012 do Ministério da Saúde**. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2012/PRT0664\\_12\\_04\\_2012.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2012/PRT0664_12_04_2012.html).

PRICE, T.H.; CHATTA, G.S.; DALE, D.C. Effect of recombinant granulocyte colony-stimulating factor on neutrophil kinetics in normal young and elderly humans. **Blood**, v.88, n.1, p. 335-340, 1996.

PRYBYLOWSKI, K.; WENTHOLD, R.J. N-Methyl-D-aspartate receptors: subunit assembly and trafficking to the synapse. **J Biol Chem**, v.279, p.9673-6, 2004.

RATILAL, B.O.; ARROJA, M.M.C.; ROCHA, J.P.F.; FERNANDES, A.M.A.; BARATEIRO, A.P.; BRITES, D.M.T.O.; PINTO, R.M.A.; SEPODES, B.M.N.; MOTA-FILIPPE, H.D. Neuroprotective effects of erythropoietin pretreatment in a rodent model of transient middle cerebral artery occlusion: Laboratory investigation. **Journal of Neurosurgery**, v.121, n.1, p.55-62, 2014.

RODRIGO, R.; FERNÁNDEZ-GAJARDO, R.; GUTIÉRREZ, R.; MATAMALA, J.M.; CARRASCO, R.; MIRANDA-MERCHAK, A.; FEUERHAKE, W. Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v.12, n.5, p.698-714, 2013.

ROSA, M.; DE LUCIA, S.; RINALDI, V.E.; LE GAL, J.; DESMAREST, M.; VEROPALUMBO, C.; ROMANELLO, S.; TITOMANLIO, L. Paediatric arterial ischemic stroke: acute management, recent advances and remaining issues. **Italian Journal of Pediatrics**, 41:95, 2015.

SÁ, M.J. Neurologia Clínica – **Compreender as Doenças Neurológicas**. Universidade Fernando Pessoa, 2009.

SAHOTA, P.; SAVITZ, S.I. Investigational therapies for ischemic stroke: neuroprotection and neurorecovery. **Neurotherapeutics**, v. 8, p. 434–451, 2011.

SATTLER, R.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. **J Mol Med**, v. 78, p. 3-13, 2000.

SCHAAR, K.L.; BRENNEMAN, M.M.; SAVITZ, S.I. Functional assessments in the rodent stroke model. **Experimental & Translational Stroke Medicine**, v.2, n.13, 2010.

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

SCHELP, A.O. et al. Incidência de disfagia orofaríngea após acidente vascular encefálico em hospital público de referência. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 62, p. 503-506, 2004.

SCHNEIDER, A.; KUHN, H.G.; SCHÄBITZ, W.R. A Role for G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) in the Central Nervous System. **Cell Cycle**, v.4, n.12, p.1753-1757, 2005.

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE. **Indicadores de Saúde: Espírito Santo 2012**. Núcleo Especial de Sistemas de Informação em Saúde, 2012.

SHIN, Y.K.; CHO, S.R. Exploring Erythropoietin and G-CSF Combination Therapy in Chronic Stroke Patients. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, 2016.

SILVA, A.L.M. **Efeito do Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos recombinante humano (rhG-CSF) sobre o número de leucócitos, plaquetas e sobre a mobilização de células-tronco hematopoéticas CD34+ para o sangue periférico de cães saudáveis**. 2012. 71f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, 2012.

SIRÉN; A.; FRATELLI, M.; BRINES, M.; GOEMANS, C.; CASAGRANDE, S.; LEWCZUK, P.; KEENAN, S.; GLEITER, C.; PASQUALI, C.; CAPOBIANCO, A.; MENNINI, T.; HEUMANN, R.; CERAMI, A.; EHRENREICH, H.; GHEZZI, P. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.98, p.4044–4049, 2001.

SILVA, L.F.M. **Uso do Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (G-CSF) na mobilização de células tronco da medula óssea em pacientes com cirrose hepática**. 2009. 54 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA, 2009.

SILVA, E.; SOUZA, F.; RODRIGUES, P.; VIEIRA, R. Neuroproteção Farmacológica no AVC Isquêmico: Bases Bioquímicas. **Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar**, 2011.

SIMMERS, R.N.; WEBBER, L.M.; SHANNON, M.F. et al. Localization of the G-CSF gene on chromosome 17 proximal to the breakpoint in the acute promyelocytic leukemia. **Blood**, v. 70, p. 330–332, 1987.

SLUJITORU, A. S., et al., Clinical and morphological correlations in acute ischemic stroke. **Rom J Morphol Embryol**, v.53, n.4, p. 917-926, 2012.

SMITH, M. L et al. Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat: a 2-vessel occlusion model. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 69, p. 385–401, 1984.

SOUVENIR, R.; DOYCHEVA, D.; ZHANG, J.H.; TANG, J. Erythropoietin in Stroke Therapy: Friend or Foe. **Curr Med Chem**, v.22, n.10, p.1205-1213, 2015.

SOUZA, C.M. **Efeito neuroprotetor da curcumina sobre o estresse oxidativo, inflamação, memória e dano neuronal de ratos submetidos à isquemia cerebral transitória**. 2012. 100f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

SPRIGG, N.; BATH, P. Pharmacological enhancement of recovery from stroke. **Stroke Review**, v. 8, p. 33–40, 2005.

STONE, C.K.; HUMPHRIES, R.L. **Current Medicina de Emergência: Diagnóstico e tratamento**. (2013). Porto Alegre: ArtMed., Cap.37, p.620-647.

STROEH, E. **Estudo do inibidor da 3-Hidróxi 3-Metilglutaril-Coenzima A Redutase (Atorvastatina) na Transmissão e Toxicidade Glutamatérgica** (monografia). Florianópolis: UFSC, 2008. 53 p.

ISHII, T.; FUKUTA, T.; AGATO, Y.; OYAMA, D.; YASUDA, N.; SHIMIZU, K.; KAWAGUCHI, A.T.; ASAI, T.; OKU, N. Nanoparticles accumulate in ischemic core and penumbra region even when cerebral perfusion is reduced. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 430, n. 4, p. 1201-1205, 2013.

TORRES, O.J.M.; MACEDO, E.L.; PICCIANI, E.R.G.; NUNES, P.M.S.; COSTA, J.V.G.; CARVALHO, A.B.; LOBATO JUNIOR, P.S. Estudo histológico da regeneração esplênica de ratos submetidos a esplenectomia subtotal. **Acta Cir. Bras.**, v.15, n.2, 2000.

UDUPA, K.B. Functional Significance of Erythropoietin Receptor on Tumor Cells. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 46, p. 7460-7462, 2006.

VASQUES, M.A.A. **Óxido nítrico e isquemia cerebral: Estudo experimental em roedores**. 2002. 85f. Dissertação (Mestrado em Neuropsiquiatria). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

VILLA, P.; BIGINI, P.; MENNINI, T.; AGNELLO, D.; LARAGIONE, T.; CAGNOTTO, A.; VIVIANI, B.; MARINOVICH, M.; CERAMI, A.; COLEMAN, T.R.; BRINES, M.; GHEZZI, P. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. **J Exp Med**, v. 198, p. 971–975, 2003.

WOODRUFF, T.M.; THUNDYIL, J.; TANG, S.; SOBEY, C.G.; TAYLOR, S.M.; ARUMUGAM, T.V. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. **Mol Neurodegener**, v.6, n.11, 2011.

YEW, K.S.; CHENG, E. Acute stroke diagnosis. **Am Fam Physician**, v.80, n.1, p. 33–40, 2009.

YILMAZ, G.; GRANGER, D.N. Moléculas de adesão celular e acidente vascular cerebral isquêmico. **Neurol Res.**, v.30, p. 783-793, 2008.

WHO – World Health Organization, 2017. **Top 10 causes of death worldwide**. Disponível em < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> >. Acesso em: 09/01/2017.

YU, J.H.; SEO, J.H.; LEE, J.E.; HEO, J.H.; CHO, S.R. Time-dependent effect of combination therapy with erythropoietin and granulocyte colony-stimulating factor in a mouse model of hypoxic-ischemic brain injury. **Neurosci Bull**, v.30, n.1, p.107–117, 2014.

ZACKS, M.A.; WEN, J.J.; VYATKINA, G.; BHATIA, V.; GARG, N. An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. **An Acad Bras Cien**, v.77, p.695-715, 2005.

ZHANG, J.; ZHU, Y.; ZHOU, D.; WANG, Z.; CHEN, G. Recombinant human erythropoietin (rhEPO) alleviates early brain injury following subarachnoid hemorrhage in rats: possible involvement of Nrf2-ARE pathway. **Cytokine**, v.52, p. 252–257, 2010.

ZEMKE, D.; SMITH, J.L.; REEVES, M.J.; MAJID, A. Ischemia and ischemic tolerance in the brain: an overview. **Neurotoxicology**, v. 25, p. 895-904, 2004.

ZHAO, L.R. et al. The Role of Stem Cell Factor and Granulocyte-Colony Stimulating Factor in Treatment of Stroke. **Recent Patentson CNS Drug Discovery**, 2012.