

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS VÁRIOS TIPOS DE CÉLULAS DO SNC NA LESÃO
DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO ASSOCIADO AO AVC**

Sofia Lousada dos Santos

Dissertação orientada pelo Professor Doutor João Pedro Fidalgo Rocha e
coorientada pela Professora Doutora Adelaide Maria Afonso Fernandes Borralho

Mestrado em Ciências Biofarmacêuticas

2021

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS VÁRIOS TIPOS DE CÉLULAS DO SNC NA LESÃO
DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO ASSOCIADO AO AVC**

Sofia Lousada dos Santos

Dissertação orientada pelo Professor Doutor João Pedro Fidalgo Rocha e
coorientada pela Professora Doutora Adelaide Maria Afonso Fernandes Borralho

Mestrado em Ciências Biofarmacêuticas

2021

“The mind adapts and converts to its own purposes the obstacle to our acting.
The impediment to action advances action. What stands in the way becomes the way.”

– Marcus Aurelius

Resumo

A isquemia cerebral caracteriza-se pela obstrução de um vaso sanguíneo que irriga o cérebro, resultando num processo inflamatório que conduz a neurodegeneração. Após o evento isquémico as células gliais são gradualmente ativadas, desempenhando um papel importante primeiro na contenção do dano, mas posteriormente no agravamento da patologia, através da libertação de mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios. O acidente vascular cerebral (AVC) é uma doença com a capacidade de provocar danos neurológicos irreversíveis e, como tal, torna-se necessário investigar terapêuticas adequadas para a redução das complicações neurológicas, uma vez que a única terapêutica farmacológica direcionada para abordagem de doentes com AVC isquémico (administração de trombolíticos) apresenta muitas limitações.

Este trabalho surge com o objetivo de estudar as alterações e comportamentos que ocorrem nas células do sistema nervoso central (SNC) durante as diferentes fases de isquemia-reperusão, contribuindo para uma melhor compreensão fisiopatológica desta condição, assim como também descobrir potenciais novos alvos terapêuticos. O modelo de oclusão da artéria cerebral média foi desenvolvido em 8 ratos, divididos aleatoriamente por dois grupos: o grupo de isquemia de 1 hora (I 1h) e o grupo de isquemia-reperusão de 1 hora (I/R 1h). Posteriormente, os cérebros dos animais foram utilizados para determinar a expressão de marcadores de microglia (Iba1, iNOS, Arg) e astrócitos (GFAP, S100B); mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 β , IL-10); proteínas de sinalização específicas (Akt, GSK-3 β); e proteínas sinápticas (PSD-95, Syn) utilizando os métodos de Western Blot e qRealTime-PCR.

Os nossos resultados sugerem que o TNF- α é mais expresso no grupo I/R 1h (~ 3,5 fold), enquanto os ratos dos dois grupos mostram níveis diminuídos de IL-10 no hemisfério afetado (~ 0,2 fold – I 1h; ~ 0,4 fold - I/R 1h), significando que a inflamação está presente e pode desempenhar um papel relevante na lesão cerebral. Além disso, houve uma diminuição semelhante na expressão génica de PSD-95 e Syn em ambos os grupos (~ 0,5 fold), sugerindo uma rápida lesão sináptica após o período de isquemia. Houve também uma tendência de perda de células da micróglia no hemisfério lesado, conforme observado pela expressão reduzida de Iba1 no grupo I/R 1h (~ 0,4 fold), enquanto para os astrócitos houve um aumento da expressão de GFAP no hemisfério contralateral, no grupo I/R (~ 1,6 fold), sugerindo o recrutamento destas células para auxiliar a região afetada pelo tempo de isquemia.

Apesar destes resultados, é necessário investigar o que acontece aos parâmetros estudados noutras janelas de tempo, tentando encontrar novas abordagens terapêuticas direcionadas ao processo inflamatório para redução da lesão cerebral causada pela isquemia-reperusão.

Palavras-Chave: AVC, isquemia, reperusão, OACM, inflamação, células gliais

Abstract

Cerebral ischemia is characterized by the obstruction of a blood vessel that irrigates the brain, resulting in an inflammatory process that leads to neurodegeneration. After the ischemic insult, the glial cells are gradually activated, playing an important role both in damage resolution as well as in aggravating the pathology, through the release of pro-inflammatory and anti-inflammatory mediators. Stroke can cause irreversible neurological damage, so it becomes necessary to investigate appropriate therapies, since the only one indicated pharmacological therapy for ischemic stroke patients (administration of thrombolytics) has many limitations.

This work aims to study the changes that occur in the cells of the central nervous system (CNS) during the different phases of ischemia-reperfusion, contributing to a better pathophysiological understanding of this condition, as well as to discover potential new therapeutic targets. Thus, the middle cerebral artery occlusion model was developed in 8 rats, randomly divided into two groups: the group of animals subjected to 1h of ischemia (I 1h) and the group of animals subjected to 1h of ischemia followed by 1h of reperfusion (I/R 1h). Subsequently, the animals' brains were isolated and cut into sections to determine the expression of reactive markers of microglia (Iba1, iNOS, Arg) and astrocytes (GFAP, S100B); inflammatory mediators (TNF- α , IL-1 β , IL-10); specific signaling proteins (Akt, GSK-3 β); and synaptic partners (PSD-95, Syn) using Western Blot and qRealTime-PCR methods.

Our results suggest that TNF- α is more expressed in the I/R 1h group (~ 3,5 fold), while the rats in both groups show decreased levels of IL-10 in the affected hemisphere (~ 0,2 fold - I 1h; ~ 0,4 fold - I/R 1h), meaning that inflammation is present and may play a role in brain damage, differently depending on the damage phase. In addition, there was a similar decrease in PSD-95 and Syn gene expression in both groups (~ 0,5 fold), suggesting a rapid synaptic lesion after the ischemia. There was also a tendency to lose microglia cells in the injured hemisphere, as observed by the reduced expression of Iba1 in the I/R 1h group (~ 0,4 fold), while for astrocytes there was an increase in GFAP expression in the contralateral hemisphere in the I/R group (~ 1,6 fold), suggesting the recruitment of these cells to assist the region affected by the ischemia time.

Despite these auspicious results for future studies, it is necessary to investigate what happens to the parameters studied in other time windows, trying to find new therapeutic approaches aimed at the inflammatory process to reduce brain damage caused by ischemia-reperfusion.

Keywords: stroke, ischemia, reperfusion, MCAO, inflammation, glial cells

Dedicatória

Aos meus avós, Bé e Carlos

Agradecimentos

A realização desta dissertação de mestrado marca o final de um capítulo da minha vida, pela qual eu lutei com muito esforço e dedicação. Desenvolver uma dissertação de mestrado é, por si só, um grande desafio, quanto mais desenvolver um projeto final de curso em plena pandemia. Não foi nada fácil. Foram muitos os momentos em que me senti sem rumo, sem motivação, angustiada e desesperada. Confesso que foram muitas as vezes que ponderei desistir. Derramei muitas lágrimas por não conseguir prosperar. Tive que enfrentar muitos obstáculos inesperados e alheios a mim que me colocaram à prova. Foi difícil aceitar a minha realidade. No entanto, apesar de todas as amarguras vividas ao longo destes longos meses, estas ajudaram-me a crescer. Aprendi a ser resiliente, paciente, mais perseverante e que, afinal das contas, não tenho o poder de controlar tudo o que me rodeia. Hoje percebo que estas pedras no meu caminho foram meros desafios para que o sentimento final de “missão cumprida” fosse mais gratificante. Todavia, esta caminhada não teria sido possível se a tivesse enfrentado sozinha. Felizmente tive a sorte de estar rodeada de pessoas certas que tornaram esta aventura mais leve. Agora é o momento de agradecer a essas pessoas fantásticas que me apoiaram incansavelmente.

Em primeiro lugar, aos meus **pais Alexandra e Hélder**, por todos os esforços que fizeram para me proporcionarem um futuro melhor, por me apoiarem sempre e incentivarem-me a lutar pelos meus sonhos. Aquilo que tenho de melhor eu devo a eles.

Aos meus **irmãos Tânia e Ricardo**, por serem um exemplo e estarem sempre dispostos a encorajar-me das minhas capacidades e lutar por aquilo que idealizo.

Aos **amores da minha vida**, os meus **sobrinhos e afilhada, Salomé e Josué**, que apesar de tão pequenos que são, conseguiram sempre perceber quando a tia estava abalada e, por magia, conseguiam fazer-me sempre sorrir e esquecer tudo o resto.

Aos meus **avós maternos, Bé e Carlos**, por serem a minha maior fonte de inspiração para a realização deste trabalho, em especial o meu avô que é mais uma das vítimas do AVC.

À minha **tia Noélia** por ser uma segunda mãe para mim e por toda a preocupação prestada durante todo o meu percurso académico.

À minha **melhor amiga, Ana Catarina**, por me apoiar, não me deixar desistir, ajudar-me a organizar as ideias, chamar-me à terra quando precisava, por sempre me acalmar e, acima de tudo, por ser uma amiga insubstituível e muito “espacial”.

Ao **meu Tiago** por ter surgido na minha vida quando eu mais precisava, por todo o apoio, compreensão, encorajamento e estar sempre disponível para tornar os meus dias mais leves e bonitos, mas, acima de tudo, por nunca me ter largado a mão durante este caminho.

Ao meu **amigo de infância, Floyd**, pela amizade, por toda a ajuda e por estar sempre disponível para me acalmar e fazer-me ver os problemas de outra perspetiva.

A todos os meus **amigos** por toda a ajuda e palavras de encorajamento que me deram mais força para continuar e completar este desafio.

Ao meu **orientador, Professor Doutor João Rocha**, que desde o início me recebeu de braços abertos, por todas as oportunidades que me proporcionou, por toda a disponibilidade, preocupação e orientação e, por todo o encorajamento e confiança que me transmitiu ao longo de todo o mestrado. Ambos sabemos que este trajeto não foi nada fácil, com muitos percalços pelo caminho e muitas dificuldades ultrapassadas que, sem a sua ajuda, nada disto teria sido possível de concretizar.

À minha **coorientadora, Professora Doutora Adelaide Fernandes**, por toda a preocupação, disponibilidade e orientação prestada ao longo deste último ano. Sem a professora, este projeto não teria sido possível e fico muito grata por todo o conhecimento transmitido e por se mostrar incansável até ao fim.

Ao **João Solas**, por todas as horas infindáveis fechados no biotério e por todo o conhecimento que me transmitiu.

À **Catarina Barros** por toda a sua disponibilidade e simpatia em explicar-me os métodos de interesse para a realização deste projeto.

A todas as **outras pessoas envolvidas** neste projeto de investigação que, de forma direta ou indireta contribuíram para a realização e conclusão desta dissertação de mestrado.

Índice Geral

Resumo.....	i
Abstract.....	iii
Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vii
Índice Geral.....	ix
Índice de Figuras.....	xi
Índice de Tabelas.....	xiii
Lista de Abreviaturas.....	xv
1. Introdução.....	1
1.1. <i>Motivação</i>	1
2. Objetivos.....	3
3. Fundamentos Teóricos.....	5
3.1. <i>O acidente vascular cerebral</i>	5
3.1.1. Perspetiva histórica.....	5
3.1.2. A definição.....	5
3.1.3. AVC isquémico.....	5
3.1.4. Dos sintomas ao diagnóstico.....	6
3.1.5. Dados epidemiológicos no mundo e em Portugal.....	7
3.1.6. Prevenção e fatores de risco.....	7
3.1.7. Terapêutica.....	8
3.1.8. Impacto da COVID-19 nos doentes de AVC.....	8
3.2. <i>A isquemia cerebral</i>	9
3.2.1. Fisiopatologia da Isquemia Cerebral.....	10
3.3. <i>Neuroinflamação na isquemia cerebral</i>	12
3.3.1. Principais células intervenientes na isquemia cerebral.....	12
3.3.2. Biomarcadores das células do SNC.....	14
3.3.3. Proteínas expressas na isquemia cerebral.....	16
3.3.4. Marcadores inflamatórios na isquemia cerebral.....	16
3.3.5. Proteínas sinápticas na isquemia cerebral.....	17
3.4. <i>Modelo de isquemia cerebral</i>	18
3.4.1. Animais utilizados.....	18
3.4.2. Oclusão da artéria cerebral média.....	19
4. Materiais e Métodos.....	21

4.1. Técnica de oclusão da artéria cerebral média	21
4.1.1. Animais	21
4.1.2. Intervenção cirúrgica.....	21
4.2. Condições de Isquemia e de Reperfusão	23
4.3. Análise do fluxo sanguíneo cerebral	23
4.4. Extração, tratamento e armazenamento das amostras	24
4.5. Extração e quantificação de proteínas nos tecidos cerebrais	26
4.5.1. Extração de proteínas.....	26
4.5.2. Quantificação de proteínas	26
4.6. Western Blot	27
4.7. Isolamento de RNA.....	29
4.8. Síntese de cDNA	30
4.9. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRealTime-PCR)	30
4.10. Análise Estatística	32
5. Resultados e Discussão de Resultados	33
5.1. A isquemia seguida de reperfusão aumentou a expressão de TNF- α enquanto a isquemia isolada como também a isquemia-reperfusão inibiram a expressão de IL-10.....	34
5.2. Redução dos marcadores sinápticos evidenciam lesão neuronal após isquemia e isquemia-reperfusão	36
5.3. A isquemia-reperfusão diminuiu a expressão de Iba1 na região lesada e aumentou a expressão de GFAP na região ileso	37
5.4. A isquemia-reperfusão aumenta a expressão de pAkt na região ileso e diminuição da pGSK-3 β na região lesada.....	40
6. Conclusões.....	43
7. Futuras abordagens.....	45
8. Referências Bibliográficas	47

Índice de Figuras

Figura 1 – Caracterização do AVCi	6
Figura 2 – Evolução da lesão isquêmica	10
Figura 3 – Efeito da acumulação de cálcio no meio intracelular dos neurónios após o insulto isquémico	11
Figura 4 – Sinalização imunológica de microglia e astrócitos após a isquemia	13
Figura 5 – Esquema do modelo MCAO através da sutura intraluminal.....	19
Figura 6 – Formulário de extração de dados	24
Figura 7 – Esquema da cirurgia de perfusão	25
Figura 8 – Matriz de cérebros de ratos adultos para cortes cerebrais coronais com 2 mm de espessura.....	25
Figura 9 – Montagem da cassete de transferência no Western Blot.....	28
Figura 10 – Avaliação da inflamação cerebral	34
Figura 11 – A isquemia e isquemia-reperfusão promovem a perda de marcadores sinápticos	36
Figura 12 – A isquemia-reperfusão diminui a expressão de microglia	37
Figura 13 – A isquemia-reperfusão altera a astrogliose na zona de lesão.....	39
Figura 14 – A isquemia-reperfusão aumenta a expressão proteica de pAkt na região ilesa e diminui a expressão proteica de pGSK-3 β na região lesada.....	41

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Dados para a construção da curva padrão	27
Tabela 2 – Composição do gel de corrida e de concentração da eletroforese.....	27
Tabela 3 – Anticorpos primários e secundários utilizados no Immunoblotting	28
Tabela 4 – Lista de pares de <i>primers</i> utilizados para o qRealTime-PCR.....	31
Tabela 5 – Etapas do processo de qRealTime-PCR	31

Lista de Abreviaturas

ACA – Artéria Carótica Anterior

Akt – Proteína Cinase B

AMPA – α -Amino-3-Hidroxi-5-Metil-4-soxazolepropiónico

Arg1 – Arginase 1

ATP – Adenosina Trifosfato

AVC – Acidente Vascular Cerebral

AVCi – Acidente Vascular Cerebral Isquémico

BCA – Ácido Bicinconínico, do inglês "*Bicinchoninic Acid*"

BHE – Barreira Hemato-Encefálica

BSA – Albumina de Soro Bovino, do inglês "*Bovine Serum Albumin*"

CBF – Fluxo Sanguíneo Cerebral, do inglês "*Cerebral Blood Flow*"

CCA – Artéria Carótida Comum, do inglês "*Common Carotid Artery*"

cDNA – Ácido Desoxirribonucleico Complementar, do inglês "*Complementary Deoxyribonucleic Acid*"

CT – Número de Ciclos

DCV – Doença Cerebrovascular

DEPC – Dietilpirocarbonato

DNA – Ácido Desoxirribonucleico, do inglês "*Deoxyribonucleic Acid*"

ECA – Artéria Carótida Externa, do inglês "*External Carotid Arterie*"

GFAP – Proteína Glial Fibrilar Ácida, do inglês "*Glial Fibrillary Acidic Protein*"

GSK-3 – Glicogénio Sintase Cinase 3, do inglês "*Glycogen Synthase Kinase 3*"

GSK-3 α – Glicogénio Sintase Cinase 3 α , do inglês "*Glycogen Synthase Kinase 3 α* "

GSK-3 β – Glicogénio Sintase Cinase 3 β , do inglês "*Glycogen Synthase Kinase 3 β* "

I 1h – Grupo Isquemia 1h

I/R 1h – Grupo Isquemia-Reperusão 1h

Iba1 – Molécula Adaptadora de Ligação de Cálcio Ionizada 1, do inglês "*Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1*"

ICA – Artéria Carótida Interna, do inglês "*Internal Carotid Artery*"

IL-10 – Interleucina-10

IL-1 β – Interleucina-1 β

IL-4 – Interleucina-4

IL-6 – Interleucina-6

iNOS – Sintase do Óxido Nítrico Indutível, do inglês "*Inducible Nitric Oxide Synthase*"

IP – Intraperitoneal

LPS – Lipopolissacarídeos

- MCA – Artéria Cerebral Média do inglês “*Middle Cerebral Artery*”
- MCAO – Oclusão da Artéria Cerebral Média, do inglês “*Middle Cerebral Artery Occlusion*”
- NF-kB – Fator Nuclear kappa B, do inglês “*Nuclear Factor kappa B*”
- NMDA – N-metil D-Aspartato
- nNOS – Sintase do Óxido Nítrico Neuronal do inglês “*Neuronal Nitric Oxide Synthase*”
- OACM – Oclusão da Artéria Cerebral Média
- PBS – Tampão Fosfato-Salino, do inglês “*Phosphate-Buffered Saline*”
- PCOM – Artéria Comunicante Posterior, do inglês “*Posterior Communicating Artery*”
- PCR – Reação em Cadeia Polimerase, do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”
- PI3K – Fosfatidilinositida 3-Cinase, do inglês “*Phosphoinositide 3-Kinase*”
- PIP3 – 3,4,5-Trifosfato de Fosfatidilinositol, do inglês “*Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate*”
- PPA – Artéria Pterigopalatina, do inglês “*Pterygopalatine Artery*”
- PSD-95 – Proteína de Densidade Pós-Sináptica 95, do inglês “*Post-Synaptic Density Protein 95*”
- qRealTime-PCR – Reação em Cadeia Polimerase em Tempo Real, do inglês “*Real Time Polymerase Chain Reaction*”
- RIPA – Tampão de Ensaio de Radioimunoprecipitação
- RM – Ressonância Magnética
- RNA – Ácido ribonucleico, do inglês “*Ribonucleic Acid*”
- RNase – Ribonuclease
- ROS – Espécies Reativas de Oxigênio, do inglês “*Reactive Oxygen Species*”
- S100B – Proteína B de Ligação ao Cálcio S100
- SDS-PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida de Dodecil Sulfato de Sódio, do inglês “*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*”
- SNC – Sistema Nervoso Central
- Syn – Sinaptofisina, do inglês “*Synaptophysin*”
- TAC – Tomografia Axial Computadorizada
- TBS – Tampão Salino Tris, do inglês “*Tris-Buffered Saline*”
- TBST- Solução Salina Tris com Tween 0,1%, do inglês “*Tris-Buffered Saline with Tween 0,1%*”
- TEMED – Tetrametiletilenodiamina, do inglês “*Tetramethylethylenediamine*”
- TGF- β – Fator de Transformação de Crescimento β , do inglês “*Transforming Growth Factor β* ”
- tMCAO – Oclusão Transitória da Artéria Cerebral Média, do inglês “*Transient Middle Cerebral Artery Occlusion*”
- TNF – Fator de Necrose Tumoral, do inglês “*Tumor necrosis factor*”
- TNF- α – Fator de Necrose Tumoral α , do inglês “*Tumor Necrosis Factor α* ”
- t-PA – Ativador plasminogênio tecidual, do inglês “*Tissue Plasminogen Activator*”
- WR – “Working Reagent”

1. Introdução

Esta dissertação surgiu no âmbito do Mestrado em Ciências Biofarmacêuticas facultado pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. Este trabalho foi o culminar de um ano de trabalho para compreender as alterações que ocorrem nas células do SNC em ambiente de isquemia e de reperfusão cerebral.

1.1. Motivação

O acidente vascular cerebral (AVC) é um sério problema global. Apesar da situação clínica ter vindo a melhorar de forma gradual e progressiva, a sua incidência ainda continua a ser elevada ¹. Esta patologia causa graves danos neurológicos (sensoriais, cognitivos e motores) e, infelizmente, muitos destes danos são irreversíveis, diminuindo a qualidade de vida de milhares de doentes ². Têm sido realizados muitos estudos na tentativa de oferecer novas abordagens terapêuticas, contudo poucas têm mostrado resultados eficazes. O AVC é uma das principais causas de mortalidade no mundo ³, mas mesmo assim, esta patologia não recebe o reconhecimento e atenção devidos. Apesar de ser conhecido que durante o AVC isquémico (AVCi), a microglia e os astrócitos são ativados e que durante a reperfusão do tecido isquémico, vários mecanismos que ocorrem contribuem ainda mais para o agravamento da lesão isquémica ⁴, as alterações que ocorrem nessas células durante os períodos de isquemia e reperfusão ainda não estão completamente esclarecidas. Cada célula do SNC tem um papel crucial no AVCi, mas ainda há uma lacuna em estudos comparativos das mudanças que ocorrem nas células cerebrais durante um AVCi e durante o retorno do fluxo sanguíneo e oxigénio para o tecido lesado. A investigação e financiamento para o AVC ficam muito aquém das expectativas, estando notoriamente atrás de outras áreas de estudo, segundo um estudo realizado pela *Stroke Association* do Reino Unido no ano de 2016 ⁵. Deste modo, esta dissertação tem como motivação os aspetos referidos anteriormente, como também surge com o objetivo inovador de avaliar o comportamento das células em ambiente de isquemia e de reperfusão cerebral, de forma a providenciar informações importantes para potenciais futuras estratégias terapêuticas.

2. Objetivos

Este trabalho de investigação tem vários objetivos imperativos a serem alcançados, conforme descritos de seguida:

- Realizar uma revisão da literatura no âmbito da isquemia cerebral;
- Implementar o modelo de rato MCAO intraluminal para investigar o impacto da isquemia no tecido cerebral;
- Avaliar e compreender as alterações das células da microglia e astrócitos em ambiente de isquemia e de reperfusão cerebral;
- Avaliar e compreender a expressão das proteínas Akt e GSK-3 β , como também os marcadores inflamatórios, nomeadamente TNF- α , IL-1 β e IL-10, e ainda os marcadores de sinaptogénese, PSD-95 e Syn, em ambiente de isquemia e de reperfusão cerebral;
- Avaliar e compreender os efeitos pleiotrópicos das células envolvidas;
- Identificar possíveis alvos terapêuticos que podem ser explorados como intervenções terapêuticas farmacológicas.

Este projeto não precisa apenas de atingir estes objetivos específicos, como também pode ser levado em consideração para trabalhos ou projetos futuros, uma vez que o estudo do comportamento das células em ambiente de isquemia e reperfusão cerebral não foi realizado antes, sendo, portanto, útil para a otimização de novos estudos de abordagens farmacológicas.

3. Fundamentos Teóricos

3.1. O acidente vascular cerebral

3.1.1. Perspetiva histórica

O acidente vascular cerebral (AVC) é conhecido e investigado desde os tempos mais remotos, no entanto a sua definição nem sempre foi clara e foi sofrendo modificações ao longo dos anos. Inicialmente, o termo “apoplexia” era utilizado para descrever uma lesão aguda não traumática que ocorria a nível do cérebro, caracterizada por uma perda súbita de consciência, movimentos e sensações ⁶, tendo sido observada, pela primeira vez, por volta de 400 anos AC, por Hipócrates ^{7,8}.

Mais tarde, no século XVII, o médico suíço Johannes Jacob Wepfer verificou que a etiologia da “apoplexia” era devido a uma hemorragia intracraniana e, pela primeira vez, identificou as artérias principais cerebrais. Posteriormente, no início do século XIX, John Abercrombie conseguiu dividir a apoplexia em três grupos distintos, nomeadamente: apoplexia primária (que englobava grandes hemorragias intracerebrais com défice neurológico), provável hemorragia subaracnoide (com sintomas de dor de cabeça, mas sem défice neurológico) e pequenos enfartes ou hemorragias (com défice neurológico) ⁹. Nas décadas seguintes a medicina continuou a progredir e, no século XX, o termo “apoplexia” foi desclassificado por ser muito vago, tomando lugar o termo conhecido hoje por todos: “acidente vascular cerebral” ¹⁰. Nos dias de hoje a definição de AVC é mais explícita e concreta.

3.1.2. A definição

O AVC é definido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como sendo um “desenvolvimento rápido de sinais clínicos de distúrbios focais (ou globais) da função cerebral, com sintomas que perduram por um período superior a 24 horas ou conduzem à morte, sem outra causa aparente que a de origem vascular” ¹¹. Por outras palavras, o AVC pertence ao grupo das doenças cerebrovasculares (DCV) ¹², que se caracterizam pela rutura ou oclusão de vasos sanguíneos que irrigam o cérebro, com consequente disfunção e morte neuronal e perda de função neurológica, denominados por AVC hemorrágico e AVCi ¹³. Neste projeto de investigação será apenas abordado o AVCi.

3.1.3. AVC isquémico

O AVCi resulta na formação de um êmbolo ou trombo (coágulo) que causa a obstrução ou bloqueio de um vaso sanguíneo cerebral, na maioria dos casos a artéria cerebral média (MCA), impedindo que o fluxo sanguíneo irrigue o tecido cerebral. A representação do AVCi encontra-se na Figura 1. O impedimento do fluxo sanguíneo no cérebro implica uma diminuição de oxigénio (hipoxia) e de nutrientes (glucose) no tecido, estando o cérebro sujeito

a uma isquemia cerebral, conduzindo assim a uma inflamação que causa a morte das células cerebrais (devido à depleção de energia) e de lesões neurológicas irreversíveis¹⁴⁻¹⁷. O AVCi pode ter duas etiologias diferentes: trombótica e embólica. Quando o AVCi tem origem trombótica, o trombo é formado nas artérias cerebrais e, por sua vez, este impede o fluxo sanguíneo no cérebro, no entanto, quando o AVCi tem origem embólica, o trombo é formado noutra local do sistema circulatório e é transportado até ao cérebro proporcionando a oclusão de um vaso sanguíneo cerebral^{18,19}.

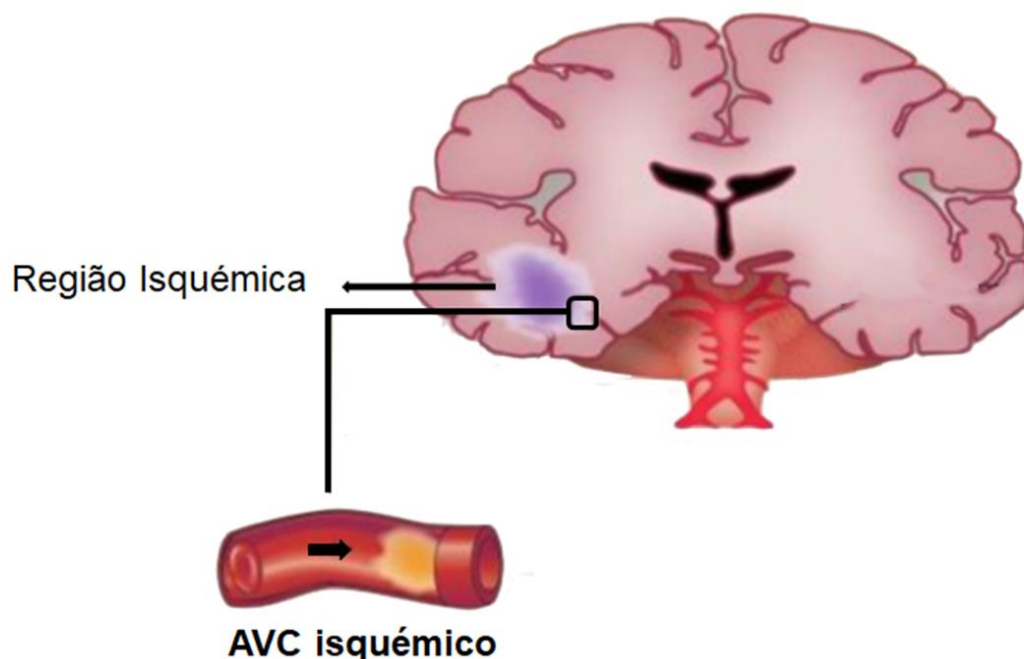


Figura 1 – Caracterização do AVCi. Adaptado de¹⁰

3.1.4. Dos sintomas ao diagnóstico

O quadro clínico em estudo determina-se tendo como base os sintomas do doente e através de um diagnóstico clínico. Os sintomas observados num doente com AVC dependem da região do cérebro lesada, todavia fraqueza, diplopia, tonturas, paralisia muscular num dos lados do corpo, dormência, perda de equilíbrio e/ou coordenação, afasia, confusões mentais, entre outros, estão associados à patologia em questão^{20,21}.

Apesar destes sintomas característicos, é imprescindível um diagnóstico por um especialista clínico certificado, porque nem sempre estes sintomas correspondem e são específicos do AVC. Deste modo, de acordo com as “Declarações e recomendações de consenso da ESO-Karolinska Stroke Update Conference” de 2019, o diagnóstico deve culminar numa avaliação precoce, incluindo parâmetros fisiológicos e análises sanguíneas de rotina, num diagnóstico por imagem, nomeadamente uma tomografia axial computadorizada (TAC) e/ou ressonância magnética (RM), como também uma avaliação cardíaca²².

3.1.5. Dados epidemiológicos no mundo e em Portugal

O AVC é uma patologia que apresenta um grande impacto grave a nível pessoal, familiar, social e económico, deixando os seus doentes com vários tipos de sequelas sensitivo-motoras, cognitivas e da fala ^{10,23,24}. Anualmente estima-se que o AVC afeta cerca de 15 milhões de pessoas em todo o mundo, na qual 5 milhões ficam incapacitadas permanentemente e outras 5 milhões não resistem ²⁵ sendo, portanto, classificado como uma das principais causas de morte no mundo ¹. Relativamente a Portugal, este é o país da Europa onde a patologia é mais representativa e, adicionalmente, a patologia é também caracterizada como sendo a principal causa de morte no nosso país ²⁶. Na verdade, é estimado que seis pessoas sofrem de AVC por hora, no nosso país, e que destas, duas a três acabam por não resistir às sequelas ²⁷.

No que respeita o público alvo desta doença, há maior suscetibilidade em indivíduos com idades compreendidas entre os 55 e 75 anos ²⁷, afetando homens e mulheres, no entanto, as taxas de incidência diferem entre os 2 géneros. As taxas de AVC em idade específica são mais elevadas em homens, todavia, as mulheres apresentam eventos de AVC mais frequentes devido ao aumento da esperança média de vida e a alta incidência de AVC em idades mais avançadas ²⁸.

No que respeita às variantes patológicas do AVC, o AVCi é a variante mais frequente, correspondendo a cerca de 80-85% dos casos ^{9,14,29}.

3.1.6. Prevenção e fatores de risco

Frequentemente, o AVC está relacionado a uma série de fatores de risco que podem ser classificados como modificáveis e não modificáveis em conformidade de poderem ser alvo de intervenção ou não. Estes fatores podem surgir num indivíduo de forma isolada ou em combinação entre si, tendo uma tendência maior de surgir um AVC no último caso ^{13,23}. Estatísticas indicam que nove em cada dez AVCs são causados por fatores modificáveis ³⁰.

Nos fatores de risco modificáveis estão incluídos várias patologias e hábitos de vida de carácter não saudável, como por exemplo, hipertensão, obesidade, hiperlipidemia, doenças cardiovasculares, fibrilação auricular, diabetes *mellitus*, sedentarismo, consumo de álcool e tabagismo ^{20,31,32}. Em contraste, os fatores de risco não modificáveis são relativamente poucos e abrangem parâmetros como a idade, o género, a etnia e fatores genéticos ^{9,20,33}.

Em relação aos fatores de risco modificáveis, estes são alvos de prevenção do AVC e, desse modo, todos os esforços devem ser realizados para diminuir a incidência da patologia. A prevenção deve ser focada na promoção de hábitos de vida saudáveis e no rastreio e monitorização das doenças que podem conduzir ao AVC ^{13,17}.

3.1.7. Terapêutica

Após o início dos sintomas de AVC é muito importante uma intervenção rápida de forma a tentar diminuir a gravidade das sequelas. Tendo em conta a incidência do AVC, são muitos os estudos que são realizados para determinar uma terapêutica eficaz que, especialmente, melhore e recupere a qualidade de vida dos doentes bem como recupere o défice neurológico. Apesar de poucas terapêuticas disponíveis, estas dependem da variante patológica do AVC³⁴.

No que diz respeito ao AVCi existe apenas um tratamento aprovado pelas agências reguladoras do medicamento e recomendado pelas normas terapêuticas internacionais, que promove a reperfusão da área afetada¹⁵. Esta terapêutica consiste na fibrinólise do coágulo que está a causar o bloqueio do vaso sanguíneo, através da administração de trombolíticos, fármacos análogos do ativador plasminogénio tecidual (t-PA)³⁵⁻³⁷. Esta intervenção promove a destruição do trombo e devolve, assim, o fluxo sanguíneo à região lesada, porém, este fármaco apresenta uma relação benefício-risco muito limitada, influenciada fortemente pelo tempo, devendo de ser administrado até 4,5h após o início dos sintomas^{13,38}. A administração de trombolíticos apresenta várias contraindicações (algumas relativas e outras absolutas) e um risco elevado de hemorragia que impede, por sua vez, a terapêutica de muitos doentes^{39,40}. Além disso, a tentativa de reperfusão pode causar danos maiores do que aquele causado pelo tempo de isquemia, isto é, uma rápida devolução de fluxo sanguíneo à região lesada pode provocar uma lesão de maior magnitude. Tal acontece porque os tecidos ao sofrerem reoxigenação serão formadas espécies reativas de oxigénio (ROS) que iniciam um stresse oxidativo causando lesão diretamente nas células cerebrais e na barreira hematoencefálica (BHE)^{15,41}.

3.1.8. Impacto da COVID-19 nos doentes de AVC

É de conhecimento geral que o mundo está a enfrentar uma pandemia, pandemia esta que é causada pela infeção do vírus SARS-CoV-2 resultando na então conhecida doença, COVID-19. Em vista disso, é pertinente fazer um enquadramento do impacto desta patologia nos doentes de AVC.

A COVID-19 já afetou milhões de pessoas em todo o mundo, no entanto, apresenta maior gravidade em doentes idosos, indivíduos do sexo masculino e em doentes com comorbilidades associadas como por exemplo, hipertensão, diabetes, doenças cardíacas e obesidade. Estes fatores são alguns dos muitos fatores de risco que levam ao AVC, conforme já foi referido nesta dissertação no tópico 3.1.6.⁴²

Assim sendo, os indivíduos com quadros clínicos de doenças cardiovasculares, como é o caso do AVC, constituem um grupo de risco e apresentam maior probabilidade de poderem desenvolver complicações graves no caso de serem infetados pelo vírus SARS-CoV-2.

Além disso, a COVID-19 pode ter um impacto bastante negativo no que respeita ao tratamento do AVC. Com o desenvolvimento da pandemia, além de muitas pessoas evitarem deslocar-se aos hospitais, privando-se de cuidados médicos atempados, os serviços de urgência apresentam maior dificuldade e/ou tempo de resposta, resultando assim em atraso nos tratamentos ^{43,44}. Este atraso nos tratamentos e até mesmo a não recorrência a tratamento implica que muitos doentes cardiovasculares sofram de danos neurológicos permanentes.

3.2. A isquemia cerebral

A isquemia cerebral é, normalmente, classificada de acordo com a severidade da oclusão das artérias cerebrais, podendo ser atribuídos os termos de “isquemia focal” e de “isquemia global” ¹⁶. A isquemia focal lesiona apenas uma região específica do cérebro e é o resultado da obstrução temporária ou permanente de um vaso sanguíneo local ⁴⁵. Na isquemia global, a região completa do cérebro é afetada, uma vez que o fluxo sanguíneo é bloqueado de forma passageira em todo o tecido ⁴⁶.

Quando ocorre a isquemia cerebral, em poucos minutos dá-se a necrose das células neuronais no centro/núcleo da região afetada, onde o fluxo sanguíneo é escasso, impedindo o seu metabolismo. Na periferia do núcleo da região isquémica encontra-se a penumbra, que é constituída essencialmente por células cerebrais que são irrigadas por vasos sanguíneos colaterais. Contudo, a perfusão pode não ser suficiente para as células manterem a atividade metabólica regulada e estas podem morrer através de apoptose, uma vez que se encontram dependentes da energia proveniente dos vasos sanguíneos colaterais. Caso o fluxo sanguíneo não seja restaurado devidamente na penumbra, o tecido morre e a região da área do enfarte cerebral expande-se até à área da penumbra prévia, conforme está representado na Figura 2 ^{16,19,47,48}. De facto, o impedimento do fluxo sanguíneo ao cérebro desencadeia uma cascata de processos bioquímicos, denominados por cascata isquémica, que levam à morte das células do SNC ²¹, conforme será explicado no capítulo 3.2.1.

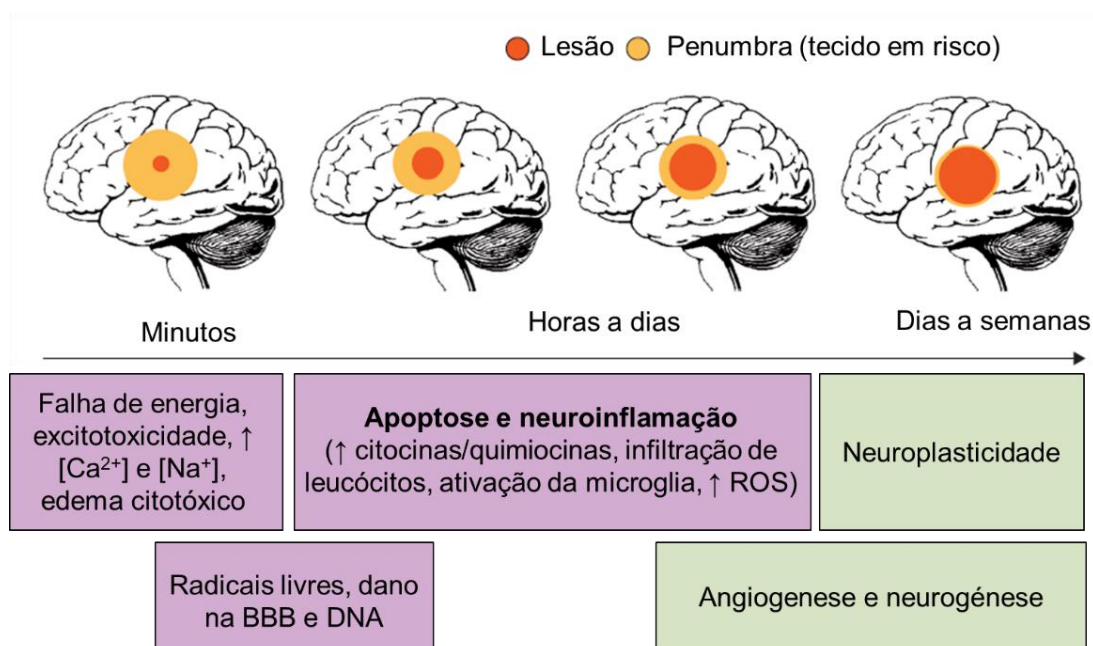


Figura 2 – Evolução da lesão isquêmica. Adaptado de ⁴⁹

3.2.1. Fisiopatologia da Isquemia Cerebral

Após o evento isquêmico são desencadeados vários processos bioquímicos complexos, denominados por cascata isquêmica, que provocam graves lesões cerebrais e levam à neurodegeneração. Os mecanismos moleculares envolvidos são, entre muitos, o stress oxidativo, a apoptose, a neuroproteção, as vias inflamatórias, o desequilíbrio iônico, despolarizações da zona peri-enfarte e os mecanismos de excitotoxicidade ^{47,50}.

De uma forma muito geral, depois do evento isquêmico e da supressão de sangue ao tecido cerebral, os neurónios iniciam um procedimento que termina na sua necrose ou na apoptose, conforme já foi referido anteriormente. A falta de recursos energéticos, neste caso, de adenosina trifosfato (ATP), desencadeia o início de uma cascata isquêmica, obrigando as células a optarem pelo metabolismo anaeróbico ^{15,51}. Contudo, existem dois problemas associados ao metabolismo anaeróbico: em primeiro lugar não é produzida energia suficiente por esta via e, em segundo, há produção de ácido láctico que, em quantidades excessivas, causa um desequilíbrio na homeostasia ácido-base regular, danificando assim os neurónios ⁵²⁻⁵⁴. Por sua vez, a diminuição de energia altera a função da célula começando, em primeiro lugar, pela disfunção da bomba sódio-potássio dependente de ATP (Na⁺/K⁺ ATPase). Esta bomba encontra-se na membrana celular e está encarregue de bombear iões de sódio para o meio extracelular e iões de potássio para o meio intracelular ¹³. Sem ATP, a bomba cessa o seu funcionamento, ocorrendo uma despolarização de membrana e, assim, o sódio acumula-se no interior da célula e, deste modo, implica que água entre para o meio intracelular para tentar equilibrar a alta concentração do ião, provocando a dilatação do neurónio, sendo esta

situação denominada por edema citotóxico, que pode matar a célula ^{54,55}. Em simultâneo, a bomba de sódio e cálcio também cessa o seu funcionamento, o que provoca um aumento dos níveis de cálcio no meio intracelular. A presença excessiva de cálcio acresce vários problemas na célula (Figura 3). Em primeiro lugar, o cálcio proporciona que o glutamato, um neurotransmissor excitatório, seja libertado, o que provoca a excitação de outros neurónios ⁵⁴. Por sua vez, o glutamato estimula dois recetores ionotrópicos, o N-metil D-Aspartato (NMDA) e o α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) ⁵⁶, que ativam enzimas como as proteases, que degradam proteínas no interior da célula, e lípases, que danificam a membrana celular do neurónio, o que permite que haja maior formação de substâncias nocivas, agravando a lesão dos neurónios ⁵². Além de que, o excesso de cálcio promove a formação de ROS que contribuem para a neurodegeneração ⁵⁰. A este processo bioquímico dá-se o nome de excitotoxicidade, isto é, a toxicidade que resulta de uma estimulação excessiva dos recetores do glutamato, levando à morte celular. O influxo e o efluxo de iões entre os meios intra e extracelular das células neuronais tornam-se impossíveis de controlar, o que compromete a integridade das membranas celulares ⁵⁴. Tal acontecimento impede que a integridade das mitocôndrias seja mantida, o que conduz à libertação de fatores apoptóticos e toxinas que promovem a morte celular através da apoptose e/ou necrose ^{50,57}.

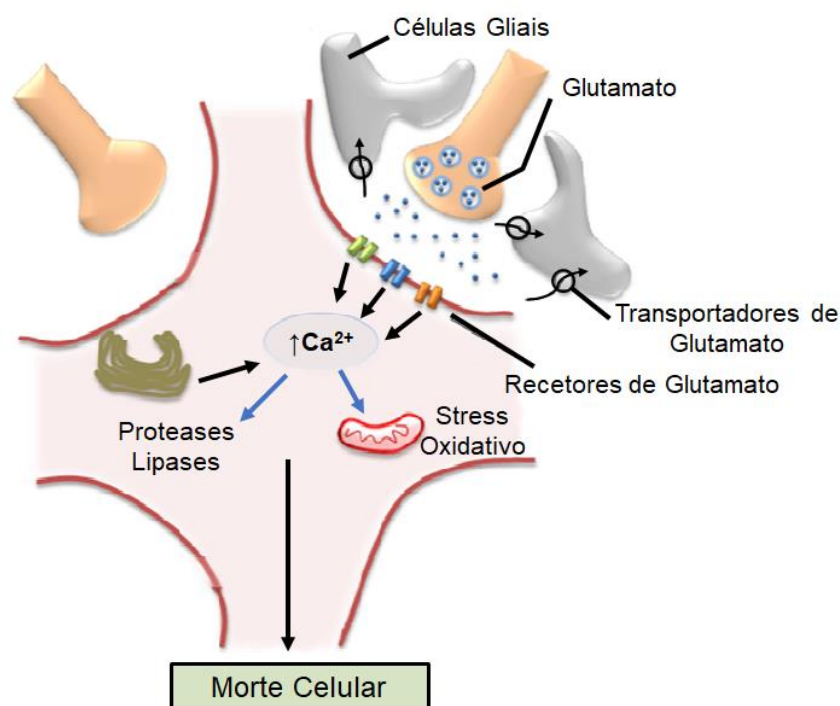


Figura 3 – Efeito da acumulação de cálcio no meio intracelular dos neurónios após o insulto isquémico. Diversos mecanismos são ativados quando a concentração de Ca^{2+} é aumentada. Em condições excitotóxicas, dá-se a ativação de vias de sinalização, incluindo a ativação de proteases e lípases, resultando na produção de ROS e mau funcionamento mitocondrial, o que provoca a neurodegeneração. Adaptado de ⁵⁸

3.3. Neuroinflamação na isquemia cerebral

Após a morte celular resultante do evento isquêmico, é desencadeada uma resposta inflamatória local denominada de neuroinflamação, que atua como resposta à formação das ROS, células necróticas e tecidos danificados ⁵⁹. Esta resposta inflamatória funciona, inicialmente, no sentido de proteger o tecido lesionado e regenerar as células danificadas do SNC, contudo, uma exacerbada inflamação também pode atuar em direção à destruição ⁴. Este processo envolve a ação de diversos tipos de células do SNC, como as células da glia, nomeadamente a microglia e astrócitos que, quando ativadas, levam à formação de citocinas e quimiocinas e ao recrutamento de linfócitos do sangue circulante para infiltração no parênquima cerebral ⁶⁰⁻⁶². De seguida, são descritas algumas das várias células que constituem o cérebro e que desempenham um papel importante na isquemia cerebral.

3.3.1. Principais células intervenientes na isquemia cerebral

São muitas as células que intervêm e desempenham um papel importante durante a isquemia cerebral, no entanto, neste projeto, serão apenas abordadas as células da microglia, astrócitos e neurónios.

A microglia é conhecida como sendo a célula com capacidade imune inata residente no SNC e representa cerca de 5 a 20% da população da glia ^{60,61}. Em condições fisiológicas, a microglia encontra-se num estado de vigilância e caracteriza-se por uma morfologia ramificada e com elevada mobilidade ^{63,64}. Sob estas condições, as células da microglia atuam como sentinelas imunes, o que permite manter a homeostasia e participar também na definição das sinapses a manter ou a remover, de modo a estabilizar o circuito neural ^{65,66}. No entanto, o dano isquêmico perturba as funções normais destas células, forçando a sua ativação. Estas células ao serem ativadas migram para a região do cérebro lesionada, sofrendo polarização e alterando o seu fenótipo para um estado pró- ou anti-inflamatório e a sua morfologia para a forma ameboide onde se tornam praticamente indistinguíveis dos macrófagos circulantes ^{4,62,67,68}.

A microglia pró-inflamatória é ativada através de lipopolissacarídeos (LPS) e pelo interferão- γ e é caracterizada pela libertação de metabolitos oxidativos e citocinas, como por exemplo as interleucinas (IL-) IL-1 β e IL-6, o fator de necrose tumoral (TNF) e o óxido nítrico (NO) ^{69,70}. Estes mediadores pró-inflamatórios produzidos podem exacerbar a excitotoxicidade, o que pode danificar a região da penumbra ^{61,71}. Esta microglia ativa ainda uma cascata de sinalização pró-inflamatória, como o fator nuclear kappa B (NF-kB) e remove patógenos e detritos celulares da área lesada por fagocitose ⁶².

Por outro lado, a microglia anti-inflamatória é ativada pela IL-4 e estas células desempenham um papel no sentido de prevenir a inflamação e reparar a zona de lesão, expressando mediadores anti-inflamatórios, tais como a IL-10 e gerando vários fatores neurotróficos com potencial para neurogênese e plasticidade, seguindo de exemplo o fator de transformação do crescimento β (TGF- β)^{4,60,61}.

O facto de a microglia adotar dois fenótipos diferentes, confere-lhe um papel duplo na progressão e na neuroregeneração do AVCi, na qual pode atuar de forma a agravar a inflamação ou a diminuir o dano cerebral dependendo da janela temporal após o dano cerebral⁶⁰. A transformação da microglia desde o estado de vigilância até à alteração de fenótipo, encontram-se descritos na Figura 4.

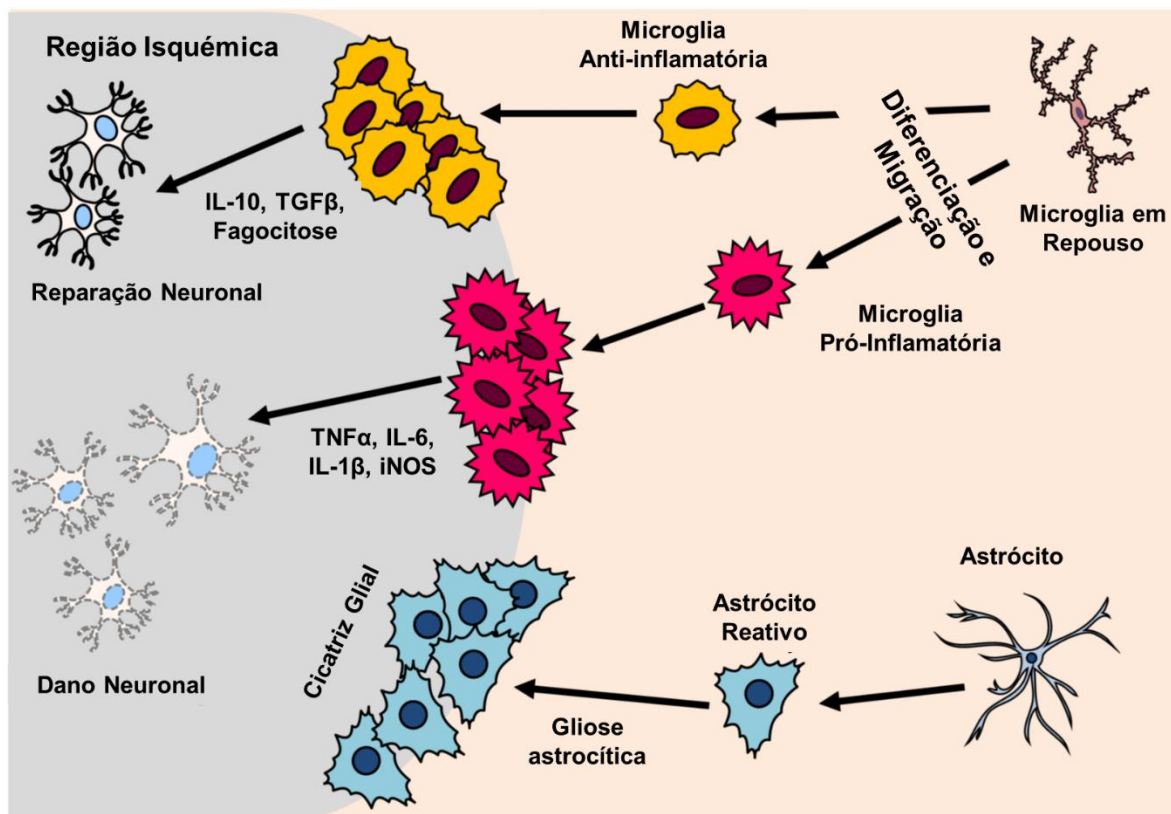


Figura 4 – Sinalização imunológica de microglia e astrócitos após a isquemia. A microglia em repouso pode sofrer polarização para o fenótipo anti-inflamatório ou pró-inflamatório. A microglia pró-inflamatória contribui para o dano neuronal através da expressão de mediadores pró-inflamatórios (TNF- α , IL-6, IL-1 β , iNOS). A microglia anti-inflamatória melhora a proteção neuronal através das suas capacidades fagocíticas e expressão de mediadores anti-inflamatórios (IL-10, TGF- β). Os astrócitos tornam-se reativos, acumulando-se no limite da lesão, formando uma cicatriz glial. Adaptado de⁷²

Os astrócitos são as células mais especializadas no SNC e representam 20 a 40% do número total de células no cérebro^{62,73}. Em condições normais, os astrócitos estão envolvidos no desenvolvimento neural e na neuroproteção através de conexões sinápticas, homeostase

iónica e eliminação de glutamato^{60,61,73}. No entanto, estas células quando ativadas, também podem desempenhar um papel semelhante à microglia ativada, uma vez que, igualmente, libertam fatores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, NO e ainda aumentam a expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP)^{4,59}.

Estes tipos de células ainda participam ativamente no aumento da gliose reativa e na formação de cicatrizes gliais⁷². Na formação destas cicatrizes, as células proliferam de forma a envolver a penumbra, formando uma barreira que impede a expansão da região de enfarte mas, por sua vez, impede a reabilitação neurológica após o AVCi⁷³. Embora este processo seja um elemento importante no melhoramento da situação clínica do AVCi, impede a regeneração neuronal⁷². Por outro lado, os astrócitos podem neutralizar as respostas neuroinflamatórias através da produção do TGF- β e prostaglandina E2⁶².

Deste modo e, tal como as células da microglia, ambas as células gliais são ativadas de forma a induzir respostas inflamatórias, estando sujeitas a perder as suas capacidades protetoras, o que provoca um agravamento da lesão neurológica⁶². O processo que o astrócito sofre ao longo do AVCi encontra-se representado na Figura 4.

Os neurónios são considerados os principais elementos estruturais e funcionais do SNC^{17,67}. Estas células apresentam uma grande capacidade de comunicação dentro do sistema nervoso, através da transmissão sináptica e de potenciais de ação. Os neurónios são altamente sensíveis durante um evento isquémico, uma vez que ficam privados de glucose e oxigénio, o que compromete as suas funções¹⁷, podendo levar à sua apoptose. De facto, a morte dos neurónios em ambiente de isquemia cerebral está intimamente relacionada com os défices neurológicos presentes nos indivíduos que sofrem AVC⁷⁴. Além disso, a morte celular neuronal na isquemia cerebral compreende vários componentes incluindo o stress oxidativo, a disfunção mitocondrial, a neuroinflamação bem como a excitotoxicidade⁷⁵.

3.3.2. Biomarcadores das células do SNC

Neste projeto de investigação foram realizados estudos dos tecidos cerebrais de forma que seja conhecido o perfil da microglia, astrócitos e neurónios em ambiente de isquemia e de reperfusão. Para a avaliação do perfil destas células é necessário recorrer a marcadores específicos que indicam as respostas farmacológicas, bem como os processos patogénicos e os processos biológicos normais das células⁷⁶.

A molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizada 1, mais conhecida por Iba1, é uma proteína citoplasmática que é expressa na microglia sendo, por isso, o marcador geralmente mais usado para identificar a densidade deste tipo celular^{77,78}. Esta proteína está envolvida na alteração da mobilidade da membrana da microglia sendo essencial para que ocorram as

mudanças morfológicas destas células, nomeadamente, mudanças da microglia ramificada quiescente para a microglia ameboide ativada. Assim, este marcador é o indicado para conhecer a morfologia da microglia durante o evento isquémico e de reperfusão, permitindo desta forma, detetar as alterações celulares ⁷⁹.

A sintase indutível do óxido nítrico (iNOS) é o principal mediador da ativação imune e da inflamação, capaz de produzir óxido nítrico a partir da L-arginina ⁸⁰. Após a exposição a estímulos imunológicos e inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias ou LPS, a expressão de iNOS é induzida em várias células, incluindo na microglia ⁸⁰. A sobre-expressão de iNOS na microglia promove um fenótipo pró-inflamatório, resultando em efeitos tóxicos ^{80,81} sendo, portanto, um ótimo biomarcador da microglia reativa.

As arginases são enzimas expressas por todo o cérebro e apresentam duas isoformas conhecidas: arginase 1 e arginase 2 ⁸². Neste trabalho será somente abordado a arginase 1. A arginase 1 (Arg1) está presente em células imunes inatas. A Arg1 partilha a L-arginina como substrato com o iNOS, por esse motivo, a Arg1 pode ser vista como um inibidor competitivo de iNOS, atuando nas células da microglia com um efeito anti-inflamatório. A sobre-expressão de Arg1 auxilia na conversão da microglia para o fenótipo mais reparador ⁸²⁻⁸⁴.

A GFAP é uma proteína de filamento intermediário e membro da família de proteínas do citoesqueleto, presente nos astrócitos ^{85,86}. Esta proteína apresenta um papel importante dado que mantém a morfologia dos astrócitos, modulando a eficácia sináptica e fornecendo também integridade à BHE ⁸⁷. Durante o evento isquémico, os astrócitos tornam-se reativos, sobre-expressando a GFAP, por esse modo, esta proteína é um marcador da lesão astrogliar tornando-se, desta forma, o alvo ideal indicativo da expressão de astrócitos no AVC ⁸⁸.

A proteína B de ligação ao cálcio S100 (S100B) é uma proteína sensor de cálcio principalmente astrocítica, que é secretada para atuar a nível extracelular e intracelular ⁸⁹. A S100B é expressa principalmente por astrócitos no SNC em condições saudáveis. Quando libertada em baixas concentrações (condições fisiológicas), esta proteína apresenta ações tróficas, no entanto, quando é libertada em altas concentrações, como é o caso da isquemia cerebral, participa na cascata de eventos que leva à lesão celular, tornando os astrócitos reativos ⁹⁰. Assim, este biomarcador é o mais adequado para verificar a reatividade de astrócitos em ambiente de isquemia e reperfusão.

Esses parâmetros permitem entender a gravidade da lesão causada pelo AVCi e o comportamento celular durante esse evento.

3.3.3. Proteínas expressas na isquemia cerebral

Após o evento isquêmico são ativadas ou expressas diversas proteínas que intervêm em várias vias de sinalização celular, como por exemplo, a proteína cinase B (Akt) e a glicogênio sintase cinase 3 β (GSK-3 β). É importante frisar que existem muitas outras vias de sinalização celular envolvidas no AVC, no entanto, neste trabalho, focamos-nos somente no estudo destas duas proteínas. De facto, a compreensão do comportamento das proteínas e consequentemente das vias de sinalização celular em que intervêm é de extrema relevância para elucidar os mecanismos envolventes durante o evento isquêmico. Ademais, compreender o comportamento de diferentes proteínas após o AVCi, permite desenvolver mais estudos e procurar novas abordagens terapêuticas para minimizar os danos neurológicos causados pelos períodos de isquemia e de reperfusão.

A Akt é uma proteína cinase serina/treonina que está envolvida quer na morte quer na sobrevivência celular, desempenhando assim, um papel importante no metabolismo, crescimento e divisão celular, como também na angiogênese e na supressão da apoptose^{91,92}. A atividade da proteína Akt é promovida através da sua fosforilação por meio da ligação a um fosfoinosítídeo. Esta fosforilação resulta no início de uma cascata de fosforilação de outras proteínas para regular várias vias metabólicas nas células⁹³. Deste modo, esta proteína está envolvida na via da fosfatidilinositida 3-cinase (PI3K), denominando-se a via da PI3K/Akt. A PI3K está intimamente relacionada com a regulação da resposta inflamatória, sendo expressa em leucócitos⁹⁴. Quando a PI3K é ativada, o grupo hidroxilo sofre fosforilação para produzir a 3,4,5-trifosfato de fosfatidilinositol (PIP3) que, por sua vez, ativa a Akt. A ativação da Akt atenua o dano cerebral como também, reduz a apoptose neuronal durante a lesão de isquemia-reperfusão cerebral⁹⁵.

A glicogênio sintase cinase 3 (GSK-3) é uma proteína serina/treonina cinase citoplasmática multifuncional que pertence à família das fosfotransferases^{96,97}. A GSK-3 desempenha um papel importante na inflamação, no metabolismo do glicogênio, regulação mitótica, embriogênese e neuroplasticidade. A GSK-3 apresenta 2 isómeros: o GSK-3 α e o GSK-3 β ⁹⁶. Esta última é abundantemente expressa no SNC e está envolvida na patogênese do AVCi^{97,98}, uma vez que é verificada o aumento da sua fosforilação no resíduo da tirosina 216 após a oclusão da artéria cerebral média (MCAO), indicando o envolvimento da GSK-3 β ativada⁹⁶. Evidências indicam que o aumento da atividade da GSK-3 β resulta na perda dos neurónios, contribuindo para a o desenvolvimento e agravamento do AVCi⁹⁷.

3.3.4. Marcadores inflamatórios na isquemia cerebral

Após o evento isquêmico são ativadas ou libertadas várias substâncias inflamatórias que podem atuar no tecido lesado de forma a protegê-lo ou a exacerbar ainda mais a lesão. Dos

inúmeros fatores que influenciam a isquemia cerebral, neste trabalho foram selecionados para estudo o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e as interleucinas (IL-) 1 β e IL-10.

O TNF- α é caracterizado como sendo uma citocina pró-inflamatória produzida, especialmente, pelos macrófagos, linfócitos e neurónios. Esta citocina desempenha um papel fulcral na inflamação do AVC, uma vez que após o insulto isquémico apresenta uma sobre-expressão, estando assim associada à exacerbação da lesão isquémica^{99,100}. O TNF- α está ainda envolvido na diferenciação e recrutamento celular como também na apoptose. Para além disso, esta citocina pró-inflamatória apresenta a capacidade de ativar as vias de transcrição que induzem o stress oxidativo à degeneração celular e ativa as células inflamatórias, iniciando o processo inflamatório durante a isquemia cerebral¹⁰¹.

A IL-1 é uma família de citocinas que apresentam funções regulatórias na imunidade inata e adaptativa e na mediação de respostas inflamatórias sistémicas. As proteínas IL-1 mais estudadas são a IL-1 α e a IL-1 β ¹⁰². Neste projeto somente será abordado a proteína IL-1 β . A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória que pode ativar a microglia e astrócitos, conduzindo assim à síntese a jusante de outros mediadores pró-inflamatórios e quimiotáticos dentro do SNC, o que contribui para o agravamento da lesão isquémica¹⁰³.

A IL-10 é caracterizada como uma citocina anti-inflamatória que apresenta a capacidade de proteger o cérebro, isto é, diminui o tamanho da lesão¹⁰⁴. A IL-10 limita a inflamação após o evento isquémico reduzindo a expressão de recetores de citocinas e inibindo a ativação dos mesmos, além de conseguir contrabalançar os efeitos potencialmente prejudiciais do TNF- α ^{104,105}. Adicionalmente, a IL-10 tem efeitos inibitórios nas células hematopoéticas que se infiltram no cérebro após a lesão, por exemplo, reduz a ativação e as funções dos macrófagos, monócitos e células T, diminuindo em última análise a resposta inflamatória à lesão¹⁰⁵.

3.3.5. Proteínas sinápticas na isquemia cerebral

São muitas as proteínas que intervêm durante a transmissão sináptica, contudo, neste projeto, são apenas abordadas a proteína de densidade pós-sináptica (PSD-95) e a sinaptofisina (Syn).

A PSD-95, também conhecida pela denominação SAP90¹⁰⁶, é uma proteína que pertence à família da guanilato cinase, que está associada à membrana de moléculas das sinapses excitatórias. As proteínas de densidade pós-sináptica têm a capacidade de regulação da função sináptica e de transdução de sinais sinápticos. No caso da PSD-95, esta proteína liga-se aos recetores NMDA e à sintase neuronal do óxido nítrico (nNOS) em sinapses excitatórias, transformando-os num complexo de sinalização macromolecular¹⁰⁷. A PSD-95 foi considerada como uma proteína sináptica importante pelo seu envolvimento na regulação da

função do canal iônico da atividade sináptica, sinalização intracelular e ainda perda cognitiva. Além disso, esta proteína ainda promove a estabilidade da sinapse, no entanto, no evento isquêmico, os neurónios são comprometidos, diminuindo o seu teor após a lesão cerebral ¹⁰⁸.

A Syn é uma proteína pré-sináptica que se encontra nas membranas das vesículas sinápticas ^{109,110}. Esta proteína, além de caracterizar a plasticidade sináptica nas lesões isquémicas ¹¹¹, está envolvida em diferentes etapas da biogénese sináptica, formação de sinapses, exo e endocitose, classificação de proteínas de vesículas e iniciação de vesículas ¹⁰⁹. Esta proteína está associada ao dano de memória causado pela isquemia cerebral, sendo caracterizado por uma regulação negativa de Syn ^{112,113}.

3.4. Modelo de isquemia cerebral

Ao longo das últimas décadas têm sido desenvolvidos vários modelos *in vitro* e *in vivo* que tentam mimetizar o AVC, com a intenção de descobrir novas abordagens farmacológicas como também para conhecer os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na lesão cerebral provocada pela isquemia ^{16,114,115}. Os modelos *in vivo* são uma ferramenta indispensável na pesquisa de isquemia cerebral pois alguns mecanismos requerem métodos invasivos que não podem ser realizados em humanos. Os modelos *in vitro*, apesar de promissores para outros estudos, não são adequados para mimetizar algumas estruturas/processos, como a vasculatura e a reperfusão, que são cruciais para o estudo do AVCi ¹¹⁶.

Na realidade existem vários modelos *in vivo* que mimetizam a isquemia cerebral, nomeadamente os modelos embólicos, o modelo de craniotomia, o modelo de sutura intraluminal da MCAO, modelo de endotelina-1, modelo de eletrocoagulação, modelo de isquemia global e modelo de fototrombose ^{17,117}. Neste trabalho será abordado o modelo de sutura intraluminal da MCAO.

3.4.1. Animais utilizados

Nas práticas experimentais de isquemia cerebral são usados um vasto leque de mamíferos, incluindo ratos, murganhos, coelhos, cães, gatos e primatas não-humanos ¹¹⁸. No entanto, as espécies mais utilizadas em estudos para entender a patologia e o tratamento do AVC são os ratos e os murganhos devido a diversas razões: 1) o seu tamanho reduzido que permite uma fácil monitorização dos parâmetros fisiológicos como também os procedimentos de fixação cerebral; 2) estes animais apresentam bastantes semelhanças a nível anatómico e fisiológico em comparação com o ser humano; 3) a sua utilização é relativamente barata comparada com animais maiores; e 4) questões de ética ^{47,115,116,119}. Estes modelos animais usados para estudar o AVC têm a capacidade de produzir a isquemia transitória ou permanente e, muitos

destes modelos de ratos ou murganhos, são projetados para induzir o AVC através da MCAO¹¹⁵. A parte *in vivo* deste projeto foi desenvolvido em modelo animal da oclusão transitória da artéria cerebral média (tMCAO).

3.4.2. Oclusão da artéria cerebral média

O modelo experimental mais utilizado de AVCi é o modelo de MCAO através da sutura intraluminal¹¹⁹, na qual a MCA pode sofrer uma oclusão de forma permanente ou provisória^{47,120}. Para induzir a MCAO, um filamento ou uma sutura intraluminal (revestido por silicone) é introduzido na artéria carótida interna (ICA) e é movimentado até ocluir a origem da MCA. Para tal, é necessário a exposição da artéria carótida no pescoço, seguido de uma oclusão temporária da artéria carótida comum (CCA) e da artéria carótida externa (ECA), de forma a alcançar a origem da MCA, conforme está representado na Figura 5.

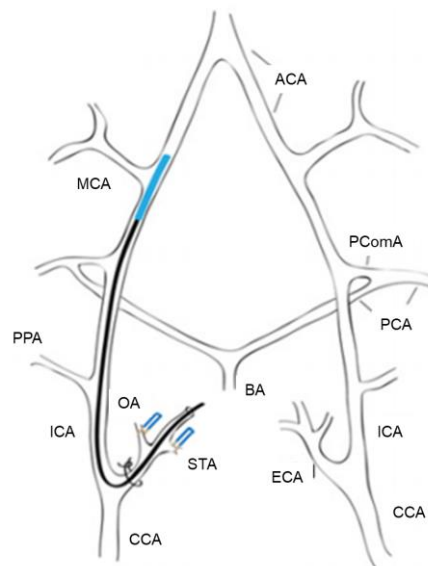


Figura 5 – Esquema do modelo MCAO através da sutura intraluminal. Uma sutura revestida de silicone (indicado a azul) é inserida na ICA e é movimentado até à origem da MCA. Os ramos da OA e STA da ECA foram ligados num nó de sutura ao redor do coto do ECA para manter o fio intraluminal no lugar. Legenda: MCA - Artéria Cerebral Média; ACA - Artéria carótica anterior; PComA - Artéria comunicante posterior; PPA - Artéria pterigopalatina; ECA - Artéria carótida externa; CCA - Artéria carótida comum; ICA - Artéria carótida interna; AO - Artéria occipital; STA - artéria tireoidiana superior. Adaptado de¹²¹

Depois da inserção do filamento na artéria, este pode permanecer no local ou pode ser retirado após um período de tempo definido para induzir a reperfusão¹¹⁷. A MCAO permite que o fluxo sanguíneo no tecido cerebral seja reduzido todavia, o/a efeito/lesão depende da duração do evento isquêmico, do local da oclusão na MCA e na quantidade de sangue colateral¹²². Ainda que este modelo seja complexo e necessite de um profissional experiente para a sua execução, não requer craniectomia ou manipulação do cérebro, o que se torna

menos invasivo e permite uma melhor recuperação dos animais ⁴⁷. O modelo MCAO foi desenvolvido e descrito pela primeira vez por Koizumi, tendo sofrido diversas modificações ao nível das artérias de acesso a intervir como também do tipo, comprimento e revestimento do filamento ^{119,123,124}.

O modelo de MCAO é facilmente reproduzível em ratos e em murganhos, contudo é necessário ter em conta que o modelo não mimetiza de forma completa a isquemia cerebral. Conforme já foi referido anteriormente, o AVCi é uma doença complexa e está associada a outras situações clínicas. A maioria dos estudos de isquemia cerebral em modelos *in vivo* não estão relacionadas a outras comorbilidades, não seguindo assim um normal quadro clínico de AVC em humanos. Além disso, o uso de anestesia nos animais para induzir o AVC pode provocar algumas alterações, influenciando o metabolismo, a pressão sanguínea e o fluxo sanguíneo cerebral, modulando alguns aspetos dos processos após o AVCi ¹¹⁹.

4. Materiais e Métodos

Os métodos explícitos neste projeto de investigação foram realizados com o objetivo de obter resultados preliminares para o desenvolvimento de estudos mais complexos. O plano inicial desta dissertação de mestrado seria desenvolver estudos mais completos e abordar outras técnicas, no entanto, devido à situação pandémica que o país e mundo enfrentam devido à COVID-19, não foi possível realizá-los e/ou tiveram que sofrer ajustes para o cumprimento dos prazos impostos.

4.1. Técnica de oclusão da artéria cerebral média

4.1.1. Animais

Para este estudo foram utilizados 8 ratos machos adultos Wistar. Os ratos foram mantidos em gaiolas com temperatura controlada e tiveram acesso *ad libitum* a alimentos e água e submetidos a ciclos de 12 horas de luz e escuridão. Os ratos foram divididos aleatoriamente em 2 grupos para posterior intervenção:

- Grupo de Isquemia 1h (I 1h) (n=4);
- Grupo de Isquemia-Reperusão 1h (I/R 1h) (n=4).

Todas as experiências foram realizadas de acordo com as regras e recomendações mais recentes para o cuidado e experimentação de animais de laboratório, nomeadamente os regulamentos atualmente adotados pela Comissão Europeia (Diretiva 2010/63/UE). Além disso, os estudos foram realizados de acordo com as Diretrizes da DGAV (Direção Geral de Alimentação e Veterinária). O projeto do protocolo animal foi aprovado pelo Organismo de Bem-Estar Animal (ORBEA) da Faculdade de Farmácia (Universidade de Lisboa).

4.1.2. Intervenção cirúrgica

A intervenção cirúrgica para a MCAO é um método reversível e não invasivo que foi, originalmente descrito por Koziumi¹²⁵, no entanto, neste trabalho, este método sofreu algumas modificações de forma a otimizar os resultados⁴⁷, estando descrito detalhadamente de seguida.

1. Cada animal foi anestesiado por via intraperitoneal (IP) com uma mistura de cetamina e xilazina (2:1), correspondente a uma dose de cetamina 100 mg/kg e xilazina 10 mg/kg.
2. O rato foi colocado numa almofada na posição ventral e a pele e o pelo da cabeça foram desinfetados com uma solução de álcool a 70%.
3. Sob o microscópio cirúrgico, foi realizada uma incisão na cabeça da linha média para expor o bregma com o objetivo de criar um pequeno orifício até à dura-máter 2mm

posteriormente ao bregma e 3,5mm lateralmente à linha média, na região de suprimento da MCA direita, onde a isquemia transitória deve ser realizada. Neste orifício, foi colada ao osso uma sonda portadora de micro-Doppler com cianoacrilato e, posteriormente, uma sonda Laser-Doppler foi colocada no lugar para medição do fluxo sanguíneo (Periflux System 4000, Probe 407, Perimed-Instruments, Estocolmo, Suécia). A incisão da pele foi fechada com uma sutura de seda 3-0.

4. A posição do animal foi alterada, para a posição supina com uma almofada sob o pescoço para estendê-lo levemente e ajudar na exposição do vaso.
5. A pele e o pelo na área cervical foram desinfetados com uma solução de álcool a 70%.
6. Sob o microscópio cirúrgico, foi realizada uma incisão no pescoço da linha média ventral e a fáscia superficial foi dissecada para expor a CCA.
7. A CCA, a ECA e a ICA foram expostas e mobilizadas dos tecidos circundantes para perto da base do crânio. O nervo vago foi fortemente dissecado da CCA e da ICA.
8. A artéria occipital (OA), um ramo da ECA, foi coagulada e os restantes ramos da ECA foram cauterizados, de forma a permitir uma maior facilidade de mobilização dos vasos maiores.
9. A ICA foi dissecada para identificar o nervo glossofaríngeo próximo à origem da artéria pterigopalatina (PPA), que é ligada próxima à origem com um clipe. Nesta etapa, a ICA é o único ramo restante da CCA.
10. Um nó de seda solto 6-0 foi colocado no início do coto da ECA, próximo à bifurcação.
11. A ECA foi dissecada, atada o mais distal possível com uma sutura de seda 6-0 e um clipe cirúrgico e depois cortada. O coto terminal da ECA foi solto do tecido circundante.
12. Foram colocados de seguida cliques microvasculares na CCA e na ICA. Uma pequena arteriotomia foi realizada com uma tesoura de mola no coto da ECA, distal ao nó solto.
13. Um monofilamento com ponta de silicone 4-0 foi inserido, gentilmente, no coto da ECA em direção à ICA. A sutura de seda solta em volta da ECA foi apertada para evitar sangramentos.
14. Os cliques microvasculares foram removidos da CCA e da ICA de forma a que o filamento fosse lentamente avançado até à origem da MCA. A isquemia foi verificada através de uma diminuição repentina na fluxometria com o Laser-Doppler.
15. O temporizador foi iniciado e a isquemia persistiu por 60 minutos.
16. Para iniciar a reperfusão da MCA, o filamento foi retirado lentamente, o nó de seda foi solto e colocou-se um clipe no tronco da ECA para bloquear o fluxo sanguíneo. O início da reperfusão foi verificada através de um aumento súbito de fluxo no Laser-Doppler.
17. A incisão na pele foi fechada com uma sutura de seda 3-0 e o animal foi colocado numa gaiola limpa. Os valores do fluxo sanguíneo cerebral (CBF) foram medidos durante o intervalo de recuperação.

18. Foi administrada por via IP, uma solução salina estéril para conceder uma hidratação ao animal durante o período de recuperação.

4.2. Condições de Isquemia e de Reperusão

Depois do monofilamento chegar à extremidade da MCA, a oclusão desta artéria foi mantida por 1h nos dois grupos em estudo. Para o caso do grupo que sofre reperusão (I/R 1h), o filamento foi removido com cuidado no final da isquemia deixando a irrigação do cérebro acontecer por 1h. No grupo de I 1h, os animais foram sacrificados e só depois o filamento removido.

4.3. Análise do fluxo sanguíneo cerebral

Para controlar as alterações que ocorrem durante as fases de isquemia e reperusão, o fluxo sanguíneo cerebral cortical foi monitorizado através da fluxometria laser-Doppler (Periflux System 4000, Sonda 407, Perimed-Instruments, Estocolmo, Suécia) no território de suprimento da MCA direita onde a isquemia foi induzida, antes da oclusão, durante a oclusão e alguns minutos após o início da reperusão. Para isso, conforme explicado anteriormente, um pequeno orifício foi realizado 2 mm posteriormente ao bregma e 3,5 mm lateralmente à linha média e a sonda micro-Doppler posicionada acima da dura-máter. Os valores basais do estado estacionário foram registados antes da oclusão e o fluxo sanguíneo cerebral cortical foi medido durante a oclusão e a reperusão. Através destes valores é possível determinar se a intervenção cirúrgica foi bem executada. O fluxo sanguíneo da região da MCA deve ser diminuída em cerca de 80% tendo em conta os valores basais iniciais e, por outro lado, a reperusão bem-sucedida é representada pela restauração do fluxo sanguíneo em mais de 70%, valores estes que devem de ser comparados com os valores basais ¹²⁶.

Para cada animal utilizado no estudo foi preenchida uma ficha de extração de dados (Figura 6) de forma a ser possível controlar qualquer eventualidade durante a intervenção cirúrgica como também garantir o conhecimento dos locais de armazenamento das amostras.

FORMULÁRIO EXTRAÇÃO DE DADOS

Ref:	Data: ___/___/___
Gênero:	Peso: _____ Idade: _____
Anestesia:	
Grupo:	
Duração Isquemia:	Duração Reperusão:

Início Isquemia Data ___/___/___ Hora ___h___min	Início Reperusão Data ___/___/___ Hora ___h___min
Fim Isquemia Data ___/___/___ Hora ___h___min	Fim Reperusão Data ___/___/___ Hora ___h___min

Eutanásia Data ___/___/___	Método:
Amostra a coletar:	Armazenamento em: Local Armazenamento:
Armazenamento Ex-Vivo Data ___/___/___ Armazenamento em: Local Armazenamento:	

Anotações:

Figura 6 – Formulário de extração de dados

4.4. Extração, tratamento e armazenamento das amostras

Após os animais dos diferentes grupos serem submetidos aos procedimentos cirúrgicos, estes foram sacrificados através da remoção do diafragma, seguido de perfusão com tampão fosfato-salino (PBS) através do sistema vascular, diretamente no coração, de forma a preservar da melhor maneira o tecido de interesse (cérebro) para os estudos posteriores ex

vivo¹²⁷. Um esquema representativo desde o sacrifício até à perfusão com PBS encontra-se na Figura 7.

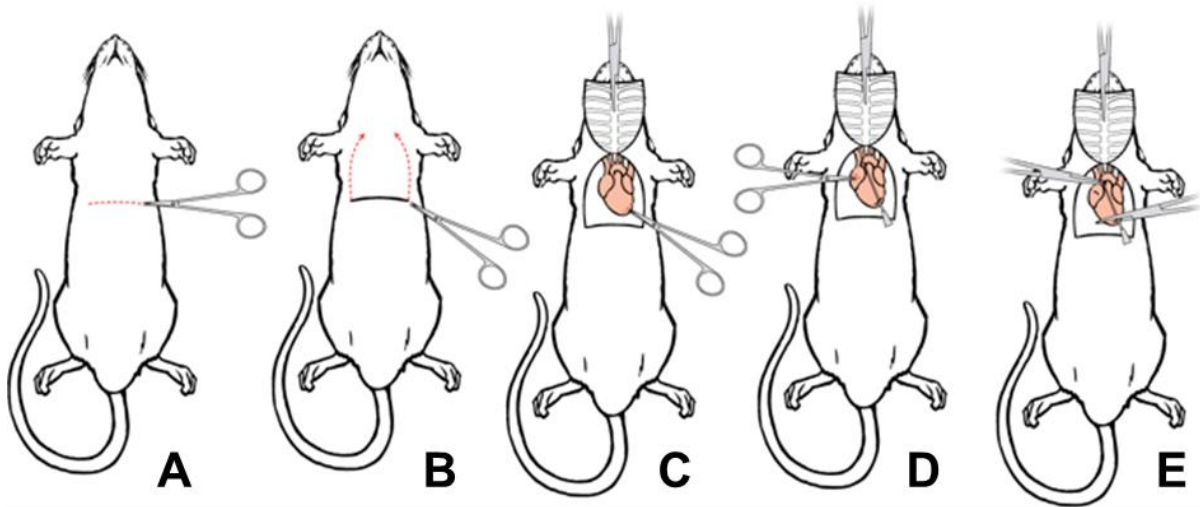


Figura 7 – Esquema da cirurgia de perfusão. A) incisão através do tegumento e da parede abdominal; B) incisão no diafragma; C) corte da caixa torácica e externo; D) incisão na extremidade posterior do ventrículo esquerdo; E) perfusão do animal¹²⁷

A perfusão foi dada por completa e validada após o fígado e coração dos animais mostrarem uma coloração esbranquiçada. Por conseguinte, o cérebro foi extraído do crânio dos ratos com cuidado para que o tecido se mantivesse intacto e foram colocados numa matriz cerebral (World Precision Instrument, Hertfordshire, Reino Unido). Uma vez na matriz, os cérebros foram cortados em secções coronais de 2 mm de espessura, conforme se verifica pela Figura 8. As secções de cérebro foram colocadas numa caixa de *petri* e o hemisfério ipsilateral (direito) foi separado do hemisfério contralateral (esquerdo), sendo este último utilizado como controlo interno. As amostras foram armazenadas em *ependorfs* a -20°C , e permaneceram nestas circunstâncias até uma seguinte intervenção.

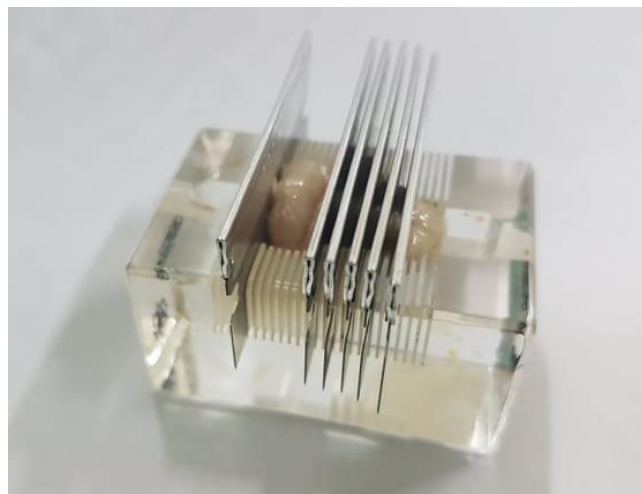


Figura 8 – Matriz de cérebros de ratos adultos para cortes cerebrais coronais com 2 mm de espessura

4.5. Extração e quantificação de proteínas nos tecidos cerebrais

4.5.1. Extração de proteínas

Para se proceder à extração de proteínas dos tecidos, em primeiro lugar foi necessário preparar uma mistura do inibidor de proteases com o tampão de lise RIPA (tampão de ensaio de radioimunoprecipitação). O tampão de lise RIPA é constituído por: Tris 1M, pH 8,0; EDTA 0,5M, pH 8,0; NaCl 5M; 10% NP-40; 50% Glicerol; SDS (10%) (final 0,1%); e H₂O. Foi adicionado 50 µL desta mistura a cada amostra e, posteriormente, todas as amostras foram homogeneizadas com pistão motorizado. De seguida, as amostras foram submetidas a sonicação (UP100H Hielscher Ultrasound Technology, Alemanha) durante 20 segundos (2 ciclos de 10 segundos) para se promover a rutura celular. Todo o manuseamento das amostras foi realizado em gelo. Após este processo as amostras foram centrifugadas na centrífuga (Beckman Coulter Microfuge R Tabletop Centrifuge, USA) durante 10 minutos a 12000g a 4°C e, de seguida, o sobrenadante foi retirado para novos *eppendorfs* e os *pellets* rejeitados. As amostras foram guardadas a -20°C até nova intervenção.

4.5.2. Quantificação de proteínas

Para se proceder à quantificação das proteínas nos tecidos cerebrais recorreu-se ao ensaio da proteína de ácido bicinonínico (BCA) (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fischer Scientific, EUA). Este teste mede a formação de Cu⁺ a partir de Cu²⁺ através do complexo biureto em soluções alcalinas de proteína usando BCA¹²⁸. Este método baseia-se num ensaio colorimétrico para a quantificação de proteína total na qual, de forma sucinta, duas moléculas de BCA quelam para cada ião de Cu⁺ provocando uma alteração de cor verde para roxo, com uma absorvância forte em 562 nm¹²⁹.

As amostras foram diluídas 1:50 com PBS e foram adicionados 10 µL da amostra diluída a uma microplaca de 96 poços. Foram realizados duplicados. Posteriormente foi preparada a curva-padrão, utilizando solução stock de albumina de soro bovino (BSA) com 2 mg/mL, armazenado em temperatura ambiente, de acordo com o descrito na Tabela 1.

Foram adicionados 10 µL da curva padrão na microplaca. De seguida foi elaborado o “Working Reagent” (WR) pela mistura de 50 partes do reagente A do BCA com 1 parte do reagente B do BCA (50:1) (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fischer Scientific, EUA). Foi adicionado 200 µL do WR a cada poço da microplaca e esta foi agitada por 30 segundos. A placa foi coberta com papel de alumínio e foi incubada a 37°C por 30 minutos. A absorvância foi lida a 562nm no leitor de microplaca (Zeiss Axio Scan Z1, Alemanha).

Tabela 1 – Dados para a construção da curva padrão

Eppendorf	[BSA] (mg/mL)	BSA (μ L)	PBS (μ L)
G	1500	75 solução stock	25
F	1000	65 solução stock	65
E	750	35 solução G	35
D	500	65 solução F	65
C	250	65 solução D	65
B	125	65 solução C	65
A	5	20 solução B	80

4.6. Western Blot

O Western Blot é um método laboratorial que permite a deteção, caracterização e análise de proteínas ^{130–132}. Através deste método é possível obter dados semi-quantitativos ou quantitativos relativamente a uma determinada proteína através de amostras biológicas simples ou complexas ¹³¹. O Western Blot, também conhecido por imunoblot, inclui várias etapas, nomeadamente: 1) separação de proteínas dependente do peso molecular através de eletroforese em gel de dodecil sulfato de poliacrilamida de sódio (SDS-PAGE); 2) transferência eletroforética de proteínas dos géis SDS-PAGE para nitrocelulose; 3) deteção de proteínas de interesse recorrendo a anticorpos específicos ^{130,132}.

Para se proceder à análise de proteínas pelo método de Western Blot, em primeiro lugar foi necessário preparar o gel SDS-PAGE de acordo com a Tabela 2. Foi ainda adicionado ao sistema, o tampão de cátodo (no topo nos poços) e o tampão do ânodo (na tina do aparelho).

Tabela 2 – Composição do gel de corrida e de concentração da eletroforese

Solução Stock	Gel de Corrida	Gel de Concentração
29:1 Acrilamida / Bisacrilamida	7,24 mL	0,484 mL
Tris-Cl / SDS, pH 8,45	6,66 mL	1,24 mL
H₂O	3,98 mL	3,276 mL
Glicerol	2,11 mL	-
10% (w/v) Persulfato de Amónio	200 μ L	60 μ L
Tetrametiletlenodiamina (TEMED)	10 μ L	6 μ L

As amostras resultantes da extração de proteína foram diluídas e a estas foi adicionado tampão de aplicação contendo o azul de bromofenol, seguido de um aquecimento de 100°C durante 5 minutos. Após o aquecimento as amostras foram colocadas em gelo. Posteriormente os poços foram preenchidos com as amostras juntamente com o marcador de peso molecular e a separação foi feita por cerca de 1-2h a 200V e 100mV. Após este passo

as proteínas presentes no gel foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, de acordo com a seguinte ordem indicada na Figura 9. Para promover a transferência, em primeiro lugar, foi adicionado tampão de transferência à tina e a transferência foi feita sobre gelo, a 200V e 300mA, durante 2 horas. No final da transferência a membrana foi removida e lavada, à temperatura ambiente, num recipiente com tampão salino Tris (TBS). A transferência de proteínas para a membrana foi verificada utilizando a coloração Amido Black® (SIGMA-Aldrich) antes da etapa de bloqueio.



Figura 9 – Montagem da cassete de transferência no Western Blot ¹³³

Posteriormente as membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado, seguida de incubação com os anticorpos primários durante a noite a 4°C. Após este período as membranas foram lavadas 3 vezes com solução salina Tris com Tween 0,1% (TBST) e foram adicionados os anticorpos secundários conjugados com peroxidase de rábano (*Horseradich peroxidase* – HRP) por 1 hora à temperatura ambiente. A lista de anticorpos utilizados para este método encontram-se descritos na Tabela 3.

Após a incubação com os anticorpos, as membranas foram lavadas três vezes com TBST durante 5 minutos e as bandas foram reveladas através da adição de WesternBright Sirius (GRISP, Portugal) e visualizadas no equipamento Chemidoc (BioRad).

Tabela 3 – Anticorpos primários e secundários utilizados no Immunoblotting

Alvo	Diluição	Primário	Secundário	kDa
GFAP	1:500	Mouse anti-GFAP	Anti-mouse-HRP	50
Iba1		Rabbit anti-Iba1	Anti-rabbit-HRP	17
pGSK3β		Goat anti-pGSK3β	Anti-goat-HRP	47
pAkt		Rabbit anti p-Akt	Anti-rabbit-HRP	60
β-Actina		Mouse anti B-Actin	Anti-mouse-HRP	42

4.7. Isolamento de RNA

Para determinar os níveis de expressão de diversos genes de interesse, os tecidos cerebrais foram submetidos a uma homogeneização em que foi adicionado 250µL de Ribozol (VWR Life Science RiboZol™ RNA Extraction Reagent, Invitrogen, Carlsbad, EUA) a cada amostra, seguido de homogeneização através de pistão motorizado. O Ribozol é uma solução de fenol de fase única usada para o isolamento do ácido ribonucleico (RNA) total. A homogeneização inibe diretamente a atividade de ribonuclease (RNase) para minimizar substancialmente a degradação de todas as classes de RNA ¹³⁴.

Assim que o tecido se encontrava completamente homogeneizado procedeu-se à separação de fases, para tal, de forma a garantir a dissociação completa dos complexos de nucleoproteínas, as amostras foram incubadas por 5 a 10 minutos à temperatura ambiente. De seguida foi adicionado 50µL de clorofórmio a cada amostra para promover a separação adequada da fase orgânica e da fase aquosa ¹³⁵ seguido de uma agitação vigorosa por 15 segundos para misturar e as amostras foram incubadas por 2 a 3 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação os tubos foram centrifugados (Beckman Coulter Microfuge R Tabletop Centrifuge, USA) a 12000g por 15 minutos a 4°C na qual, após a centrifugação, devem ser evidentes três fases: 1) vermelho inferior referente à fase fenol-clorofórmio, contendo as proteínas; 2) uma interfase branca, contendo o ácido desoxirribonucleico (DNA); e 3) uma fase aquosa superior incolor em que se encontra exclusivamente o RNA. Com cuidado foi removida a fase aquosa superior líquida para novos tubos *eppendorf*. Não se deve remover toda a camada aquosa para evitar contaminação com proteínas, DNA, lípidos e carboidratos que surgem como resíduos de material floculante na interface ¹³⁴.

Posteriormente para se proceder à precipitação de RNA foi adicionado aos novos tubos 125µL de isopropanol seguido de uma incubação por 10 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugação (Beckman Coulter Microfuge R Tabletop Centrifuge, USA) a 12000g por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação um *pellet* branco ou semelhante a gel de RNA precipitado deve-se formar ao longo da lateral e do fundo do tubo. O tamanho do *pellet* dependerá da quantidade de material de partida. Um *pellet* de RNA muito puro pode ser quase transparente e difícil de ver ¹³⁴.

A obtenção do *pellet* foi sucedida por uma lavagem na qual, em primeiro lugar, o sobrenadante foi removido cuidadosamente sem comprometer o *pellet* de RNA. O *pellet* foi lavado uma vez com 250µL de etanol 75% preparado com água livre de RNase, seguido de agitação no vortex e centrifugação (Beckman Coulter Microfuge R Tabletop Centrifuge, USA) a 12000g por 5 minutos a 4°C.

Por fim, após remoção do etanol e secagem do *pellet* ao ar por 5 a 10 minutos, este foi dissolvido em 20µL de água livre de RNase (após tratamento com DEPC – dietilpirocarbonato). Os rendimentos e a pureza de RNA foram determinados através da leitura da concentração de RNA, a uma absorvância de 260nm, através do espectrofotômetro Nanodrop ND-100 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA).

4.8. Síntese de cDNA

Para obtenção do DNA complementar (cDNA), as amostras de RNA foram ajustadas a uma concentração de 1000ng/µL usando água livre de RNase, seguido de adição de 10µL de Mastermix (Xpert cDNA Synthesis Mastermix Kit, GRiSP Research Solutions, Portugal) a cada amostra. De seguida, as amostras foram aquecidas a 65°C por 5 minutos, através do termociclador (Biometra Thermocycler T-Gradient ThermoBlock, Alemanha), seguida de 2 minutos a 4°C.

Posteriormente foi adicionado 1µL de RTase (200U/ µL, Xpert cDNA Synthesis Mastermix Kit, GRiSP Research Solutions, Portugal) a cada amostra, cada tubo foi bem misturado e foi brevemente centrifugado (Microfuge VWR Galaxy 14D, EUA) para ser submetido novamente ao termociclador, consoante os seguintes parâmetros:

- 10 min a 25°C
- 15 min a 50°C
- 5 min a 85°C
- Manter a 4°C

Finda a síntese do cDNA, este foi armazenado a -20°C até intervenção futura.

4.9. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRealTime-PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método utilizado para a deteção, amplificação e quantificação da expressão genética em tempo real através da emissão de fluorescência¹³⁶⁻¹³⁸. Este ensaio utiliza uma enzima para sintetizar uma cadeia de cDNA à cadeia utilizada como molde, sendo possível a amplificação de milhões de cópias idênticas a partir de uma pequena quantidade de DNA inicial¹³⁸. A enzima inicia a síntese da nova cadeia de DNA a partir do local de hibridação dos *primers* com a sequência alvo. Esta enzima apresenta uma atividade exonucleotídica de 5' para 3', pelo que quando deteta a sonda cliva-a, sendo possível assim detetar a emissão de fluorescência¹³⁸.

Para decorrer o qRealTime-PCR, as amostras de cDNA foram diluídas 1:4 com água livre de RNase. Depois a master mix foi preparada contendo os *primers* “forward” e “reverse”

presentes na Tabela 4, que foram diluídos para uma concentração final de 300 ng e o reagente SYBRGreen GRISP.

Tabela 4 – Lista de pares de *primers* utilizados para o qRealTime-PCR

Primer	Host	Forward	Reverse
TNF-α	Mouse	TACTGAACTTCGGGGTGATTGGTCC	CAGCCTTGTCCTTGAAGAGAACC
IL-1β		CAGGCTCCGAGATGAACAAC	GGTGGAGAGCTTTTCAGCTCATA
IL-10		GGTGGAGAGCTTTTCAGCTCATA	GCAGCTCTAGGAGCATGTGG
iNOS		ACCCACATCTGGCAGAATGAG	AGCCATGACCTTTTCGCATTAG
b-Actin	Rat	GCTCCGGCATGTGCAA	AGGATCTTCATGAGGTAGT
Syn		TCAGGACTCAACACCTCAGTGG	AACACGAACCATAAGTTGCCAA
S100B		TGTAGACCCTAACCCGGAGG	TGCATGGATGAGGAAGGCAT
Arg		CTTGGCTTGCTTCGGAACTC	GGAGAAGGCGTTTGCTTAGTTC

Na placa de 384 poços de PCR foi adicionado a cada poço 2 μ L do cDNA diluído e 6 μ L da master mix. A placa foi submetida a um *spin down* na centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5810/5810 R, Alemanha) e procedeu-se à qRealTime-PCR, de acordo com as seguintes condições descritas na Tabela 5. O qRealTime-PCR foi realizado num sistema de deteção de PCR em tempo real (QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System, Applied Biosystem, Madrid, Espanha).

Tabela 5 – Etapas do processo de qRealTime-PCR

Etapas do Processo	Configurações
	50°C, 2 minutos
Ativação da Polimerase / Desnaturação	95°C, 2 minutos
Amplificação	40 ciclos de amplificações em: 95°C, 5 segundos 62°C, 30 segundos
Análise da curva de fusão	Sim

As concentrações relativas de mRNA foram calculadas recorrendo à modificação de *Pfaffl* da equação $\Delta\Delta CT$, em que CT diz respeito ao número do ciclo no qual a fluorescência passa o limiar de deteção. Adicionalmente, os resultados foram padronizados para o gene β -actina na mesma amostra. A quantidade inicial de cada ensaio foi determinada como a expressão relativa pela fórmula seguinte: $2^{-\Delta\Delta CT}$. O ΔCT é o valor obtido para cada amostra realizando a diferença entre o valor médio de CT de cada gene de interesse e o valor médio de CT de β -actina. O $\Delta\Delta CT$ de uma amostra é a diferença entre seu valor de ΔCT e o ΔCT da amostra escolhida como controlo ¹³⁹.

4.10. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prism versão 7.0. Os dados paramétricos foram analisados usando o teste de análise de variância simples (ANOVA) para comparações únicas entre grupos e os dados não paramétricos foram submetidos ao teste de comparações múltiplas de Tukey. Os dados são apresentados como média \pm desvio-padrão da média (SEM).

5. Resultados e Discussão de Resultados

Após o evento isquémico são iniciados vários processos bioquímicos que atuam como resposta ao dano do tecido, nos quais as células do SNC desempenham um papel importante.

Neste projeto foi então desenvolvido, em primeiro lugar, o modelo *in vivo* de MCAO em ratos Wistar na qual estes foram divididos em dois grupos distintos, nomeadamente o grupo de animais submetidos a 1h de isquemia (I 1h) e o grupo de animais submetidos a 1h de isquemia seguida de 1h de reperfusão (I/R 1h). De facto, o modelo *in vivo* de MCAO, é um modelo animal que se assemelha bastante ao AVCi, no entanto é necessário ter em consideração que o modelo não imita totalmente a doença ¹¹⁹. Durante toda a cirurgia o fluxo sanguíneo cerebral cortical foi monitorizado, o que nos permitiu verificar se a isquemia foi bem-sucedida.

Após a intervenção cirúrgica os cérebros foram recolhidos e os hemisférios direito (ipsilateral) e esquerdo (contralateral) foram separados e congelados para posteriores análises *ex vivo*. Na componente *ex vivo* procurou-se caracterizar a expressão das células da microglia e astrócitos em ambiente de isquemia e em ambiente de reperfusão, procurando perceber as alterações que ocorreram nos diferentes períodos em comparação com os controlos internos. Suplementarmente também se tentou compreender a expressão de mediadores inflamatórios e proteínas sinápticas nos dois ambientes. As avaliações dos perfis celulares destas células em diferentes janelas de tempo ainda não tinham sido estudadas, desse modo este estudo apresenta uma grande relevância para se compreender a melhor altura de uma possível administração terapêutica. Neste momento, a única terapêutica recomendada para doentes com AVCi são os trombolíticos, no entanto, estes fármacos apenas apresentam uma relação benefício-risco favorável numa janela de tempo muito curta ³⁵⁻³⁷ e como tal é importante estudar as alterações celulares em diferentes períodos.

Sabe-se que após o evento isquémico são desencadeados vários mecanismos de forma a agravar ou a atenuar a lesão isquémica ⁵⁹, desde a ativação de células gliais até à formação/libertação de citocinas e quimiocinas ⁶⁰⁻⁶². Por outro lado, também é conhecido que durante a devolução de sangue ao cérebro são libertadas ROS que danificam ainda mais o tecido cerebral ^{15,41}. Estes mecanismos provocam uma sobre-expressão de proteínas até se encontrar o equilíbrio.

5.1. A isquemia seguida de reperfusão aumentou a expressão de TNF- α enquanto a isquemia isolada como também a isquemia-reperfusão inibiram a expressão de IL-10

Começou-se por estudar os marcadores indicativos de inflamação, nomeadamente o TNF- α , IL-1 β e IL-10. O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória⁹⁹ e os resultados presentes na Figura 10 sugerem que o TNF- α atuou como uma resposta rápida à lesão.

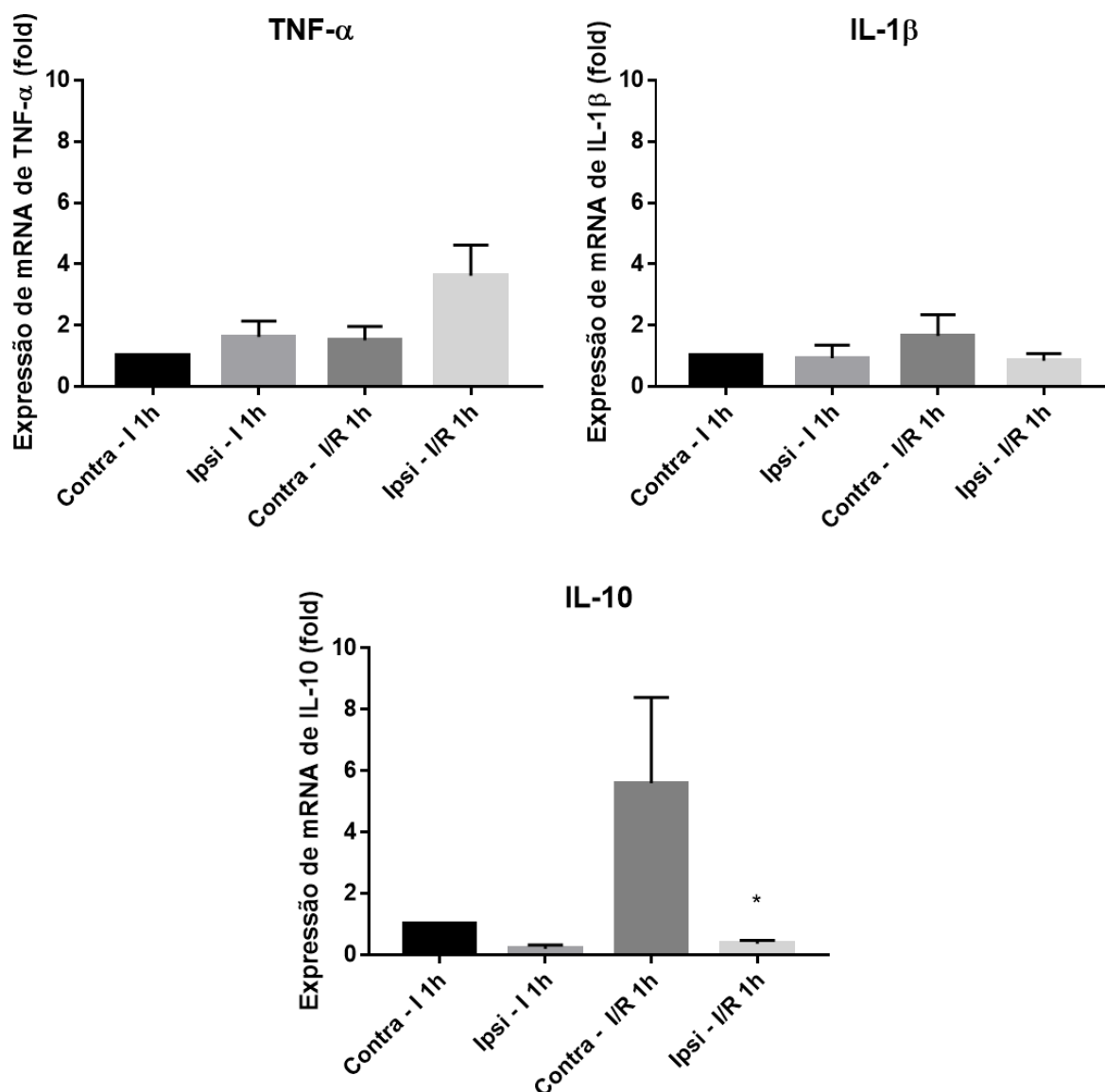


Figura 10 – Avaliação da inflamação cerebral. A inflamação cerebral foi avaliada pela expressão de mRNA dos marcadores pró-inflamatórios (TNF- α e IL-1 β) e anti-inflamatório (IL-10), através de qRealTime-PCR, nos hemisférios da lesão (Ipsilaterais – Ipsi) dos grupos de I 1h e I/R 1h em comparação com o hemisfério contralateral respetivo. A isquemia-reperfusão aumentou a expressão de TNF- α e diminuiu os níveis de IL-10 na região lesada. Os resultados são apresentados como a média \pm SEM. O significado estatístico foi avaliado por teste ANOVA com teste de comparações múltiplas de Tukey (* p <0,05 vs. Hemisfério Contralateral respetivo)

Na verdade, é relatado na literatura que o TNF- α é uma das primeiras citocinas a surgirem como resposta inflamatória ao dano cerebral isquêmico ¹⁴⁰. Os nossos resultados sugerem que há uma expressão mais elevada de TNF- α na região lesada em comparação com os respectivos hemisférios contralaterais e ainda uma maior tendência da sua expressão perante o cenário de reperfusão (~3,5 fold). Na realidade, esta citocina é descrita na literatura como sendo altamente expressa após o dano isquêmico, assim como se verificou no nosso projeto. Todavia, o aumento da expressão génica de TNF- α é descrito como mais evidenciado a partir de 6 a 12 horas após o início dos sintomas de AVC ^{99,100,140}.

A IL-1 β é também uma citocina responsável pelo agravamento da lesão cerebral, ou seja, desempenha um papel pró-inflamatório ¹⁰³. Contudo, os nossos resultados (Figura 10) deste marcador inflamatório não foram conclusivos, sendo necessário uma amostra maior para se retirar qualquer conclusão dos mesmos, bem como um estudo mais alargado no que concerne a janela de tempo. No entanto, apesar de ser escassa a informação recente na literatura, um estudo desenvolvido por Pawluk e colegas observaram que a expressão de mRNA de IL-1 β é detetado dentro de 3-6 h após a isquemia cerebral ¹⁴¹. Por outro lado, Luheshi et al. afirmam que a IL-1 β atinge o pico de expressão depois de 2h no córtex de rato ¹⁴². Num estudo mais recente, desenvolvido por Woodcock e a sua equipa, é relatado que a expressão de IL-1 β só foi verificada após 4h do início da reperfusão ¹⁴³. Nos três estudos foi verificado o pico de expressão de IL-1 β em janelas de tempo que o nosso projeto não abordou, o que pode justificar os nossos resultados não terem evidenciado uma sobre-expressão deste gene.

A IL-10 é caracterizada como sendo uma citocina anti-inflamatória, por isso atua no cérebro de forma a protegê-lo ¹²⁰. De acordo com os resultados representados na Figura 10, a região lesada tem uma tendência de diminuição da expressão de IL-10 no grupo de I 1h (~ 0,2 fold) e uma diminuição significativa no grupo de I/R 1h (~ 0,4 fold) em comparação com o hemisfério contralateral respetivo. De facto, a IL-10 apresenta a capacidade de proteger o cérebro, reduzindo o dano do tecido ¹⁴⁴. Contudo, os nossos resultados não permitem inferir essa informação, porque a janela de tempo em estudo, isto é, 1h de isquemia e 1h de reperfusão, não é extensa o suficiente para que seja possível visualizar, por completo, estes mecanismos anti-inflamatórios. Na verdade, após o insulto isquêmico, as células gliais são ativadas gradualmente dentro de horas, libertando à medida que são ativadas estes mediadores indicativos da inflamação ⁶⁰, sendo por isso difícil de retirar conclusões através dos resultados da Figura 10.

Devido à situação aguda a que o tecido cerebral é submetido, quer por isquemia, quer por reperfusão, os nossos resultados sugerem que existe uma maior expressão de mediadores inflamatórios do que anti-inflamatórios, ou seja, com o período de tempo em que a experiência

decorreu, o organismo atua de forma a agravar a lesão cerebral. Deste modo, é necessário a realização de mais estudos, com um espectro de tempo mais alargado e uma amostra maior, para que seja possível observar os mecanismos na sua totalidade e os resultados apresentarem significância.

5.2. Redução dos marcadores sinápticos evidenciam lesão neuronal após isquemia e isquemia-reperfusão

Através do método de qRealTime-PCR foi também avaliado o nível de expressão dos marcadores de sinaptogénese, PSD-95 e Syn. Os nossos resultados (Figura 11) indicam que houve uma perda de Syn, bem como da PSD-95. Ainda mais se pode inferir que a expressão de ambas as proteínas sinápticas mantiveram-se relativamente iguais, quer do grupo de I 1h, como para o grupo de I/R 1h (~0,5 fold, pelo menos $p < 0,01$), sugerindo um dano sináptico rápido após a isquemia. Na realidade, após o AVC dá-se gradualmente o dano e perda neuronal, evento este que afeta a função sináptica e a transdução de sinais sinápticos^{107,145}, pelo que é natural a observação progressiva da diminuição da expressão destes dois marcadores à medida do tempo.

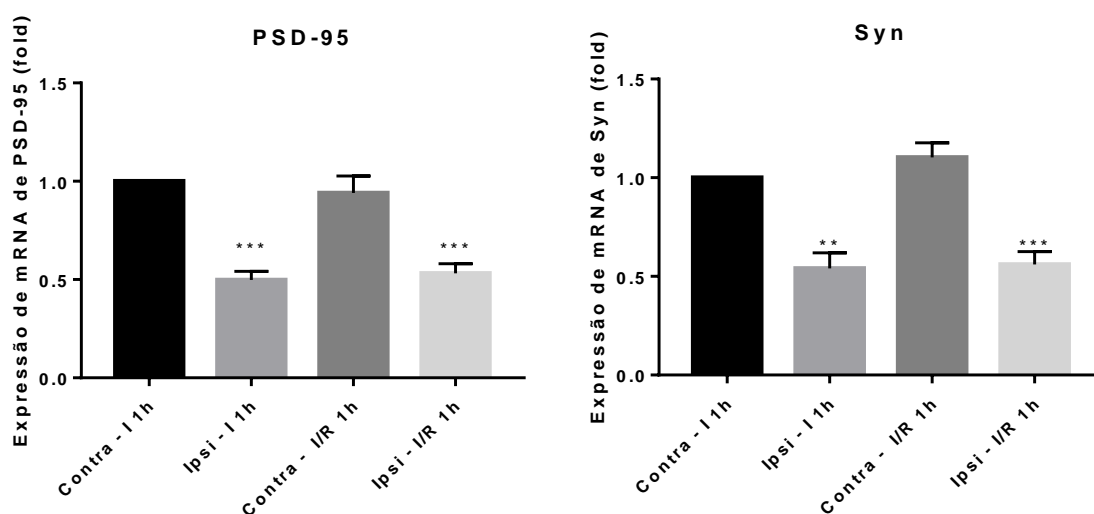


Figura 11 – A isquemia e isquemia-reperfusão promovem a perda de marcadores sinápticos. Perda de expressão génica de proteínas envolvidas na formação de sinapses evidenciada pela redução da expressão de mRNA dos marcadores de sinaptogénese (PSD-95 e Syn), por qRealTime-PCR, nos hemisférios da lesão (Ipsilaterais – Ipsi) dos grupos de I 1h e I/R 1h em comparação com o hemisfério contralateral respetivo. O significado estatístico foi avaliado por teste ANOVA com teste de comparações múltiplas de Tukey (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Hemisfério Contralateral respetivo)

5.3. A isquemia-reperfusão diminuiu a expressão de Iba1 na região lesada e aumentou a expressão de GFAP na região ilesa

Em simultâneo com a análise de qRealTime-PCR foi também realizado um Western Blot para determinar a densidade das células gliais (microglia e astrócitos). No que diz respeito às células microgliais (Figura 12) houve uma tendência de perda de células da microglia no hemisfério ipsilateral, conforme observado por uma expressão proteica reduzida de Iba1, nomeadamente no grupo I/R 1h (~ 0,4 fold), indicando que a reperfusão poderá aumentar este dano.

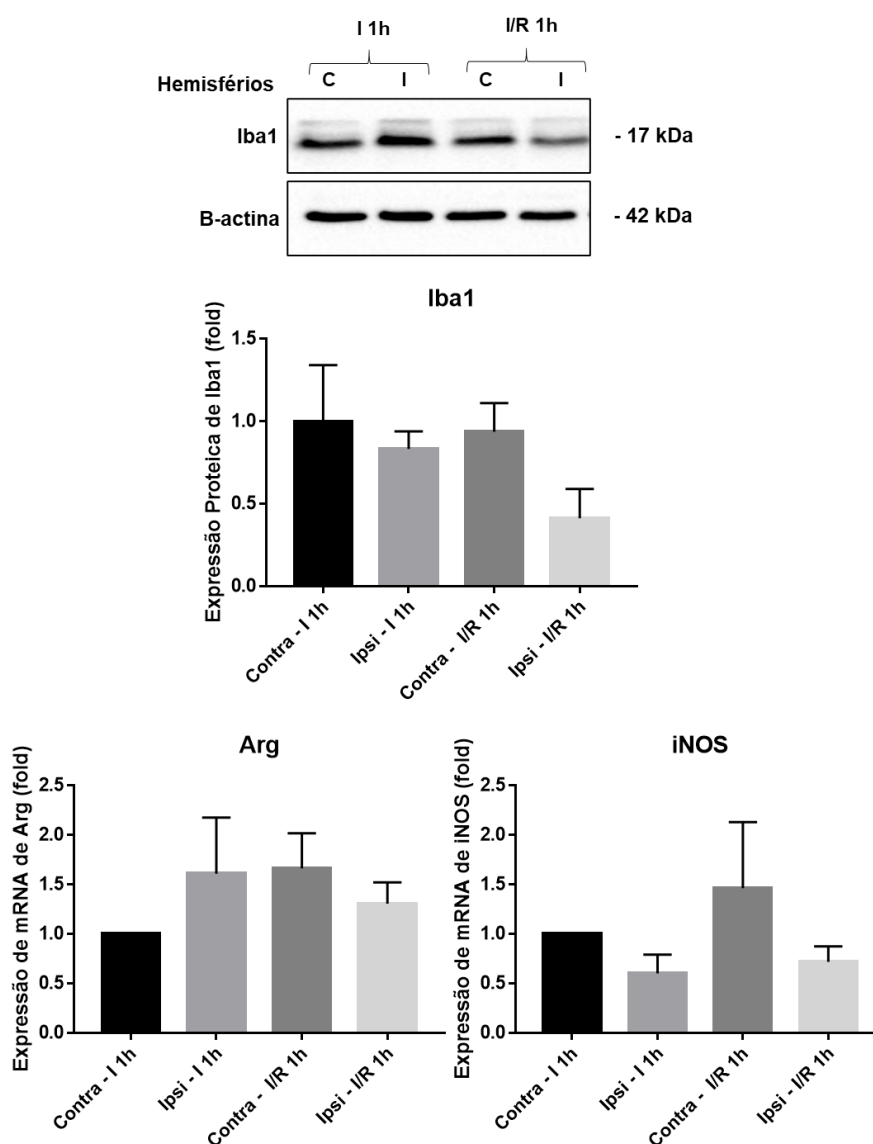


Figura 12 – A isquemia-reperfusão diminuiu a expressão de microglia. Perda das células da microglia pela redução da expressão proteica de Iba1 na isquemia-reperfusão, por Western Blot. Diminuição da expressão de mRNA de iNOS e ausência de expressão génica de Arg nos hemisférios da lesão (Ipsilaterais – Ipsi) dos grupos de I 1h e I/R 1h em comparação com o hemisfério contralateral respetivo, por qRealTime-PCR. Os resultados são apresentados como a média±SEM. O significado estatístico foi avaliado por teste ANOVA com teste de comparações múltiplas de Tukey

Os nossos resultados sugerem ainda uma diminuição da expressão génica de iNOS em ambos os grupos (~0,6 fold – I 1h; ~0,7 fold – I/R 1h), concordante com a perda de microglia. No entanto, relativamente à expressão génica de Arg, não foi verificada uma diferença relevante de um grupo para o outro. Na verdade, as células da microglia são os macrófagos residentes e são consideradas como a primeira linha de defesa contra lesões no SNC. De facto, a microglia é ativada pouco tempo depois do insulto isquémico e é recrutada para agir no local da lesão¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. No entanto, após a isquemia, o pico de proliferação da microglia ocorre entre 48 a 72h durando algumas semanas após a lesão inicial⁶⁰. Adicionalmente, um estudo presente na literatura relata que a microglia responde à perda de sinalização dos neurónios e, a partir das 24h após o insulto isquémico, estas células tornam-se hipertróficas, apresentando corpos celulares aumentados. Por outro lado, após 48h desde o AVC, a microglia adota uma forma mais arredondada, semelhante a ameboide¹⁴⁹, pelo que justifica não ser possível observar através dos nossos resultados o recrutamento das células da microglia nem a mudança de fenótipo durante a janela de tempo em estudo.

Relativamente aos astrócitos, os resultados presentes na Figura 13 sugerem uma diminuição da expressão proteica de GFAP no grupo de I/R 1h (~0,8 fold), em comparação com o hemisfério contralateral que, por sua vez, evidenciou um aumento de GFAP no grupo I/R 1h (~1,6 fold). Estes dados sugerem o recrutamento dos astrócitos em resposta à região que sofreu a lesão isquémica.

Além disso, é evidenciado pelos nossos resultados (Figura 13) uma tendência na redução da expressão génica da proteína S100B em ambos os grupos em estudo. Na realidade, os astrócitos estão encarregues de regular o fluxo sanguíneo, o equilíbrio iónico e apresentam funções antioxidantes e, após o insulto isquémico, são ativados e envolvem-se no processo inflamatório através da secreção de substâncias neurotóxicas que colaboram para a o agravamento da área isquémica^{150,151}. De acordo com o descrito na literatura, os astrócitos tornam-se reativos dentro do período de 48h a 1 semana após o AVC e formam uma cicatriz glial ao redor do núcleo da região isquémica no espaço de 2 semanas¹⁵². Estes resultados indicam mais uma vez que o nosso estudo não engloba estas janelas de tempo mais extensas para que seja possível verificar a expressão dos marcadores celulares.

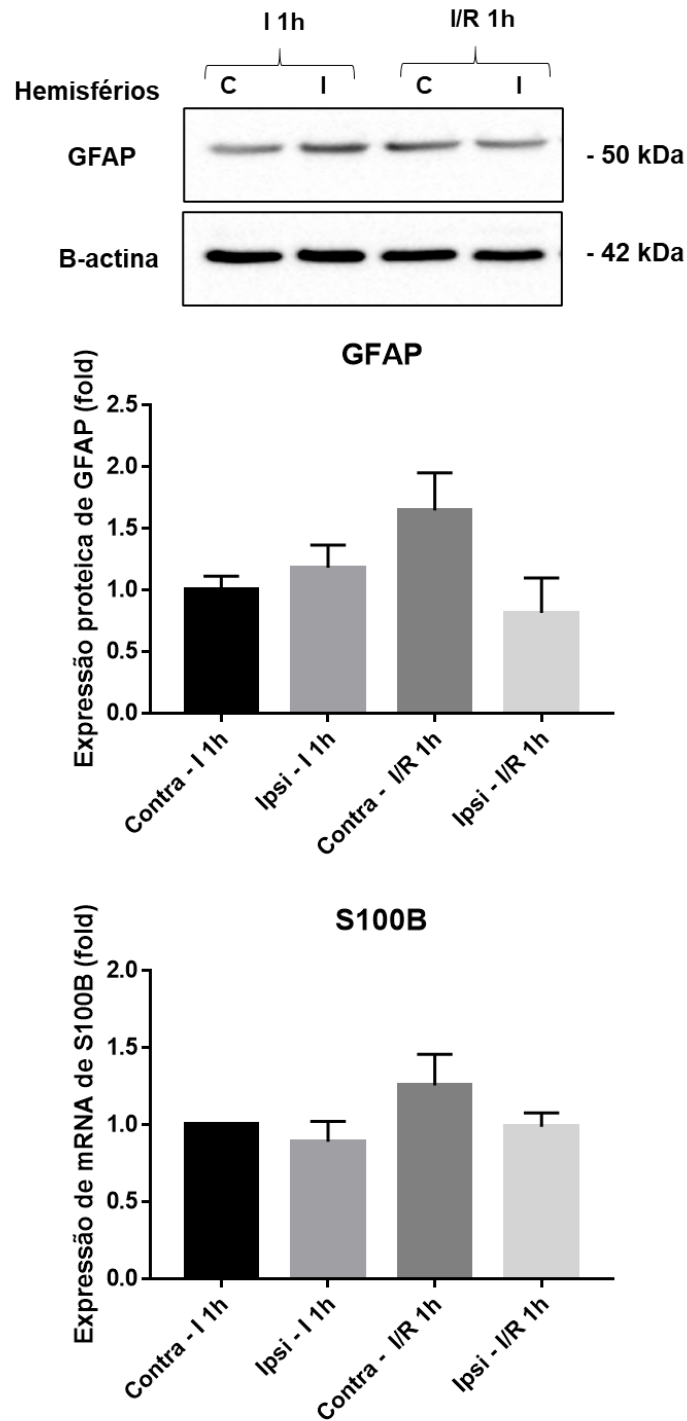


Figura 13 – A isquemia-reperfusão altera a astrogliose na zona de lesão. Diminuição da expressão proteica de GFAP na região de lesão e aumento da expressão de GFAP na região ilesa verificada por Western Blot. Região lesada apresenta redução da expressão de mRNA de S100B, nos hemisférios da lesão (Ipsilaterais – Ipsi) dos grupos de I 1h e I/R 1h em comparação com o hemisfério contralateral respectivo por qRealTime-PCR. Os resultados são apresentados como a média±SEM. O significado estatístico foi avaliado por teste ANOVA com teste de comparações múltiplas de Tukey

Quer os resultados referentes à microglia (Figura 12), quer os resultados respectivos aos astrócitos (Figura 13), sugerem que o hemisfério contralateral responde ao insulto isquêmico

através da ativação/estimulação de células para atuar no hemisfério ipsilateral (região lesada). Os nossos resultados sugerem ainda que também pode estar a ocorrer a perda celular, o que significa que se existe destruição celular não é possível observar a capacidade de expressão/resposta dos marcadores celulares e moleculares em causa. Assim, considerando a janela de tempo em estudo, há uma tendência de o organismo atuar de forma a agravar o dano cerebral, porém é imprescindível uma investigação mais aprofundada, com intervalos de tempo mais longos, para poder examinar plenamente os mecanismos celulares.

5.4. A isquemia-reperfusão aumenta a expressão de pAkt na região ilesa e diminuição da pGSK-3 β na região lesada

Por fim, foi avaliado por Western Blot a expressão dos níveis de fosforilação de resíduos específicos da Akt e da GSK-3 β , que se relacionam indiretamente com os seus níveis de atividade. A proteína Akt, quando ativada, encontra-se fosforilada no resíduo de serina 473, podendo, deste modo, fosforilar a GSK-3 β na serina 9, inibindo a atividade desta ¹⁵³.

Relativamente à proteína Akt, os resultados (Figura 14) mostram uma tendência de aumento da sua expressão em ambiente de reperfusão (~1,8 fold) no hemisfério contralateral, o que é inibido quando comparado com o hemisfério ipsilateral respetivo (~1,0 fold). No entanto, os níveis de expressão proteica mantiveram-se praticamente iguais durante o período de isquemia e durante o período de reperfusão, olhando apenas para os hemisférios com lesão. É factual que a ativação da Akt permite a redução da apoptose neuronal, como também a atenuação do dano cerebral ⁹⁵, pelo que os resultados sugerem que o hemisfério contralateral sobre-expressa esta proteína possivelmente para compensar o hemisfério ipsilateral.

Por outro lado, acerca da pGSK-3 β , os resultados presentes na Figura 14 sugerem uma diminuição da expressão desta proteína para o grupo de I/R 1h (~0,4 fold), não havendo alterações significativas no grupo de I 1h em comparação com o seu respetivo hemisfério contralateral. A GSK-3 β é conhecida por estar relacionada com o metabolismo energético celular e no desenvolvimento neuronal. Assim, a sua sobre-expressão desencadeia uma cascata de sinalização celular que leva a danos neuronais irreparáveis ¹⁵⁴. Devido à janela de tempo utilizada neste projeto estamos perante somente destruição celular, pelo que é difícil relacionar a expressão desta proteína com a cascata de sinalização referida.

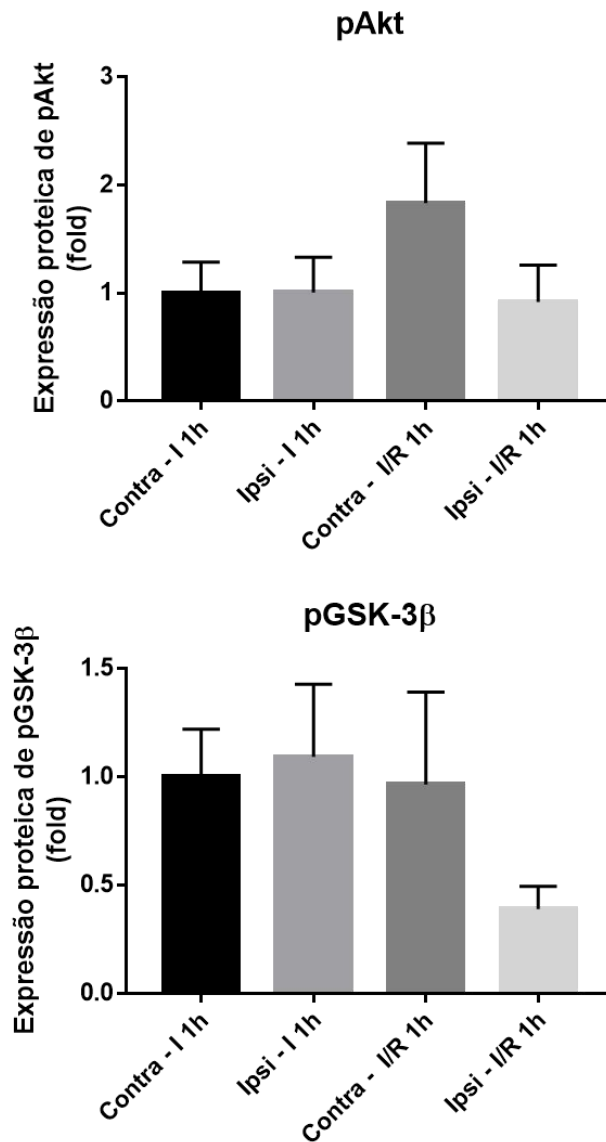
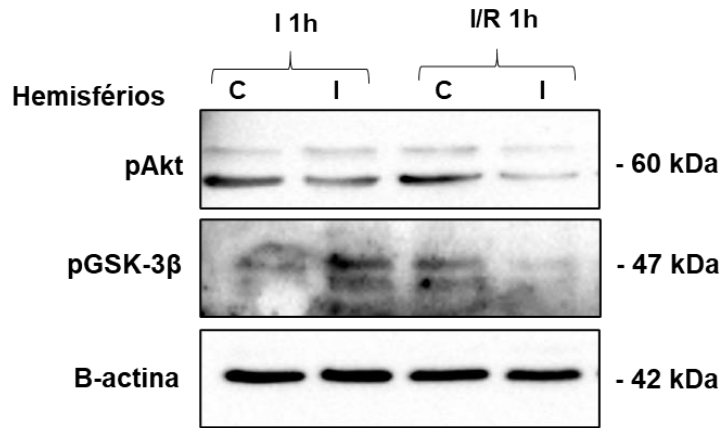


Figura 14 – A isquemia-reperfusão aumenta a expressão proteica de pAkt na região ileisa e diminui a expressão proteica de pGSK-3β na região lesada. A expressão destes marcadores foi avaliada por Western Blot nos hemisférios da lesão (Ipsilaterais – Ipsi) dos grupos de I 1h e I/R 1h em comparação com o hemisfério contralateral respetivo. Os resultados são apresentados como a média±SEM. O significado estatístico foi avaliado por teste ANOVA com teste de comparações múltiplas de Tukey

Tendo em consideração os resultados apresentados neste projeto, depreende-se que a janela de tempo utilizada é demasiado curta para se obter resultados mais específicos que permitam identificar possíveis alvos terapêuticos e determinar qual a melhor fase para a administração de um promissor fármaco. Não obstante, foi possível compreender o comportamento das células do SNC durante esta fase da doença do AVC pelo que, para futuros estudos, já será exequível uma abordagem mais consistente.

6. Conclusões

O AVC é considerado uma das principais causas de morte no mundo e encontra-se em primeiro lugar como responsável pela invalidez permanente. A isquemia cerebral resulta na obstrução de um vaso sanguíneo o que provoca a escassez de fluxo sanguíneo ao cérebro, levando assim a uma inflamação. Esta inflamação desencadeia uma cascata de eventos bioquímicos que provoca a morte dos neurónios. Na realidade, durante o dano isquémico, as células do SNC são ativadas, nomeadamente a microglia e astrócitos, o que provoca um agravamento ou atenuação da lesão cerebral.

Os trombolíticos são a única terapêutica aprovada e recomendada para o tratamento de doentes com AVCi, no entanto, como apresentam algumas limitações, não podem ser administradas em todos os doentes. Assim, este estudo surgiu no sentido de compreender melhor o papel dos vários tipos de células do SNC para que se possa desenvolver outras investigações tendo como base o comportamento das células cerebrais e desenhar novas abordagens terapêuticas para a isquemia cerebral mais adequadas e com uma janela de tempo de administração mais acessível a todos os seus doentes.

Neste projeto foi desenvolvido o modelo *in vivo* de MCAO em ratos Wistar, que foram divididos em dois grupos: grupo de isquemia de 1h e grupo de isquemia-reperusão de 1h. Após a intervenção cirúrgica, seguida do isolamento do cérebro dos animais, foi realizado um estudo *ex vivo* dos tecidos cerebrais em ambiente de isquemia e em ambiente de reperusão. Para tal, recorreu-se aos métodos de Western Blot e de qRealTime-PCR para determinar a expressão da microglia e astrócitos (GFAP, S100B, Iba1, Arg, iNOS), como também a expressão de mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 β , IL-10) e sinaptogénicos (PSD-95, Syn) e ainda de proteínas intervenientes ao longo da patologia (Akt, GSK-3 β) em ambiente de isquemia e em ambiente de reperusão.

Os nossos resultados sugerem que o TNF- α apresenta uma maior expressão no grupo de reperusão (I/R 1h) (~ 3,5 fold) e, apesar de os resultados respetivos ao IL-1 β serem inconclusivos, existe uma diminuição dos níveis de IL-10 na fase de isquemia e de isquemia-reperusão do hemisfério afetado (~ 0,2 fold – I 1h; ~ 0,4 fold - I/R 1h). Considerando a janela de tempo estudada neste projeto, estes resultados sugerem que existe um aumento dos marcadores pró-inflamatórios e diminuição dos marcadores anti-inflamatórios, o que significa que a inflamação está presente durante as fases em estudo e que esta desempenha um papel importante no dano cerebral.

Ademais, foi observado que há uma diminuição semelhante dos marcadores de sinaptogénese (Syn e PSD-95), quer na fase de isquemia, quer na fase de reperfusão (~ 0,5 fold), o que sugere que ocorreu um rápido dano na transmissão sináptica após o período de isquemia. Este rápido dano na transmissão de sinapses vai de encontro à fisiopatologia da doença em questão, isto é, durante o AVC, o primeiro evento que ocorre, é a perda gradual dos neurónios.

Além disso, foi verificada uma tendência de destruição das células gliais do SNC durante a janela temporal em estudo. No caso das células da microglia foi verificada uma tendência de redução no tecido lesionado do grupo de reperfusão, através da redução da expressão de Iba1 (~ 0,4 fold). Por outro lado, no caso dos astrócitos, manifestou-se um aumento de GFAP, também no grupo de reperfusão (~ 1,6 fold), no entanto, desta vez, no hemisfério contralateral, o que sugere que o organismo poderá estar a recrutar células do hemisfério ileso para atuar na região afetada. Com estes resultados foi possível determinar o comportamento das células durante os períodos de 1h de isquemia e 1h de reperfusão, concluindo-se assim que nesta janela de tempo existe apenas destruição celular associada ao insulto isquémico.

Com estes resultados conclui-se que o período de tempo em análise neste projeto é insuficiente para visualizar alterações notórias nas células do SNC como também a expressão de marcadores inflamatórios e de proteínas intervenientes durante o insulto isquémico. Na verdade, se estamos perante o fenómeno de perda celular durante o período imposto, é evidente que é perdida a capacidade de expressão/resposta à lesão do tecido cerebral. Independentemente disso, foi verificado que o organismo apresenta uma tendência a atuar de modo a piorar a lesão no tecido cerebral.

O número reduzido da amostra (n) de animais neste projeto implicou que os resultados obtidos não fossem significativos. Apesar deste fator ser uma das grandes limitações deste projeto, os resultados provenientes deste estudo são importantes para o desenvolvimento de investigações futuras. Com este trabalho é agora conhecido que o período de tempo em estudo é demasiado curto para investigar alvos terapêuticos. Além disso, a janela de tempo em estudo impede a delimitação de uma margem de tempo para uma possível terapia direcionada ao processo inflamatório, desenhado com o objetivo de reduzir o dano cerebral fruto da consequência da lesão causada pela isquemia-reperfusão.

7. Futuras abordagens

Os resultados obtidos neste projeto de investigação são classificados e interpretados como resultados preliminares, pelo que é conveniente outras abordagens para se compreender, de forma mais efetiva, os papéis dos vários tipos de células do SNC em ambiente de isquemia-reperusão. A compreensão dos papéis das células em questão é fulcral para a otimização de novos estudos de abordagens farmacológicas. Deste modo, como possíveis futuras abordagens, tem-se:

- Estudos com um maior número de animais;
- Estudos imunohistoquímicos das proteínas intervenientes nas vias de inflamação;
- Estudo das alterações celulares do SNC, bem como estudo de diferentes mediadores inflamatórios, proteínas intervenientes e marcadores sinápticos em outros tempos de reperusão, pelo menos até 48h de reperusão;
- Estudo comportamental e cognitivo em modelo *in vivo* nos diferentes tempos de reperusão e recuperação;
- Abordagem farmacológica que atue sobre as células gliais, diminuindo a sua ativação;
- Abordagem farmacológica que confira uma maior janela de tempo do que o tratamento já existente (trombolíticos).

Deste modo, traçando um projeto com este perfil, será provável obter resultados mais concretos e promitentes relativos às alterações que ocorrem nas células do SNC após o evento isquémico associado ao AVC.

8. Referências Bibliográficas

1. Johnson, C. O., Nguyen, M., Roth, G. A., Nichols, E., Alam, T., Abate, D., Abd-Allah, F., Abdelalim, A., Abraha, H. N., Abu-Rmeileh, N. M., Adebayo, O. M., Adeoye, A. M., Agarwal, G., Agrawal, S., Aichour, A. N., Aichour, I., Aichour, M. T. E., Alahdab, F., Ali, R., ... Murray, C. J. L. (2019). Global, regional, and national burden of stroke, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, *18*(5), 439–458. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30034-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30034-1)
2. Muntsant, A., Shrivastava, K., Recasens, M., & Giménez-Llort, L. (2019). Severe perinatal hypoxic-ischemic brain injury induces long-term sensorimotor deficits, anxiety-like behaviors and cognitive impairment in a sex-, age- And task-selective manner in C57BL/6 mice but can be modulated by neonatal handling. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *13*, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00007>
3. Katan, M., & Luft, A. (2018). Global Burden of Stroke. *Semin Neurol*, *38*, 208–211. <https://doi.org/10.1159/000441085.lifetime>
4. Kawabori, M., & Yenari, M. (2015). Inflammatory Responses in Brain Ischemia. *Curr Med Chem*, *22*(10), 1258–1277. <https://doi.org/10.2174/0929867322666150209154036>
5. Association, S. (2016). State of the Nation: Stroke statistics. *Stroke Association*, *1*, 1–40. <https://doi.org/10.4324/9781315081830-7>
6. Juodeikienė, E. S., & Jatužis, D. (2017). Descriptions of apoplexy by Joseph Frank in the beginning of the Nineteenth century in Vilnius. *European Neurology*, *78*, 8–14. <https://doi.org/10.1159/000477136>
7. Engelhardt, E. (2017). Apoplexy, cerebrovascular disease, and stroke: historical evolution of terms and definitions. *Dementia e Neuropsychologia*, *11*(4), 449–453. <https://doi.org/10.1590/1980-57642016dn11-040016>
8. Coupland, A., Thapar, A., Qureshi, M., Jenkins, H., & Davies, A. (2017). The definition of stroke. *Journal of the Royal Society of Medicine*, *110*(1), 9–12. <https://doi.org/10.1177/0141076816680121>
9. Donkor, E. S. (2018). Stroke in the 21st Century: A Snapshot of the Burden, Epidemiology, and Quality of Life. *Stroke Research and Treatment*, *2018*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/3238165>

10. D'Elvas, F. C. B. (2013). *Papel da quimiocina CXCL12 no Acidente Vascular Cerebral Isquémico – revisão da literatura*. Dissertação de Mestrado. Universidade da Beira Interior. Covilhã. 4-7. <http://hdl.handle.net/10400.6/1643>
11. Organization, W. H. (2006). WHO STEPS Stroke Manual: the WHO STEPwise approach to stroke surveillance / Noncommunicable Diseases and Mental Health. *World Health Organization*, 1–14.
12. Benjamin, E. J., Muntner, P., Alonso, A., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., Chamberlain, A. M., Chang, A. R., Cheng, S., Das, S. R., Delling, F. N., Djousse, L., Elkind, M. S. V., Ferguson, J. F., Fornage, M., Jordan, L. C., Khan, S. S., Kissela, B. M., Knutson, K. L., ... Virani, S. S. (2019). Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 281–326. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000659>
13. Teixeira, A. (2017). *Acidente Vascular Cerebral: mecanismos moleculares subjacentes à morte celular e fatores de risco*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Coimbra. Coimbra. 27-52. <http://hdl.handle.net/10316/83639>
14. Ojaghiahghighi, S., Vahdati, S. S., Mikaeilpour, A., & Ramouz, A. (2017). Comparison of neurological clinical manifestation in patients with hemorrhagic and ischemic stroke. *World Journal of Emergency Medicine*, 8(1), 34–38. <https://doi.org/10.5847/wjem.j.1920-8642.2017.01.006>
15. Lee, R. H. C., Lee, M. H. H., Wu, C. Y. C., Silva, A. C. E., Possoit, H. E., Hsieh, T. H., Minagar, A., & Lin, H. W. (2018). Cerebral ischemia and neuroregeneration. *Neural Regeneration Research*, 13(3), 373–385. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.228711>
16. Mele, M. (2013). *Modulation of GABAA Receptors in Cerebral Ischemia: alterations in receptor trafficking coupled to neuronal death after oxygen/glucose deprivation*. Tese de Doutoramento. Universidade de Coimbra. Coimbra. 21-35. <http://hdl.handle.net/10316/23953>
17. Roque, C. (2020). *Role of astrocytes in an in vitro model of ischemic stroke*. Tese de Doutoramento. Universidade da Beira Interior. Covilhã. 27-41. <http://hdl.handle.net/10400.6/10314>
18. Marques, M. V. M. (2016). *Relação entre Acidente Vascular Cerebral e Doenças Tiroideias*. Dissertação de Mestrado. Universidade da Beira Interior. Covilhã. 1-4. <http://hdl.handle.net/10400.6/5214>

19. Fernandes, M. T. R. (2017). *Acidentes Vasculares Cerebrais: Estudo retrospectivo em enfartes cerebrais isquémicos em cães*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real. 1-25. <https://catalogo.biblioteca.utad.pt/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=73946>
20. Hankey, G. J. (2016). Stroke. *Lancet*, 389(16), 641–654. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30962-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30962-X)
21. Pinheiro, S. P. (2012). *Epidemiologia genética do Acidente Vascular Cerebral: identificação de genes envolvidos na susceptibilidade e na recuperação do doente*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Lisboa. 1-10. <http://hdl.handle.net/10451/7579>
22. Ahmed, N., Audebert, H., Turc, G., Cordonnier, C., Christensen, H., Sacco, S., Sandset, E. C., Ntaios, G., Charidimou, A., Toni, D., Pristipino, C., Köhrmann, M., Kuramatsu, J. B., Thomalla, G., Mikulik, R., Ford, G. A., Martí-Fàbregas, J., Fischer, U., Thoren, M., ... Steiner, T. (2019). Consensus statements and recommendations from the ESO-Karolinska Stroke Update Conference, Stockholm 11–13 November 2018. *European Stroke Journal*, 4(4), 307–317. <https://doi.org/10.1177/2396987319863606>
23. Rabadão, T. E. L. S. (2014). *Factores de risco associados a Doença Cerebrovascular Aguda em adultos Jovens*. Dissertação de Mestrado. Universidade da Beira Interior. Covilhã. 1-7.
24. Lopes, J. (2015). *Balanço do Sistema Nervoso Autónomo em Alterações no funcionamento do Sistema Cardiovascular*. Dissertação de Mestrado. Universidade da Beira Interior. Covilhã. 1-3. <http://hdl.handle.net/10400.6/4987>
25. Organization, W. H. (2004). The atlas of Heart Disease and Stroke. *Cardiovascular Disease*, 35(4), 53–54.
26. Saúde, M. da. (2018). *Retrato da Saúde 2018*. Serviço Nacional de Saúde. Lisboa. 84-86.
27. Sousa-Uva, M., & Dias, C. M. (2014). Prevalência de Acidente Vascular Cerebral na população portuguesa : dados da amostra ECOS 2013. *Boletim Epidemiológico INE*, 9(2), 12–14.
28. Hiraga, A. (2017). Gender Differences and Stroke Outcomes. *Neuroepidemiology*, 48(1–2), 61–62. <https://doi.org/10.1159/000475451>

29. Rocha, S. (2008). *Doença Cerebrovascular Isquêmica Aguda - Avaliação de Protocolo de Trombólise*. Dissertação de Mestrado. Universidade da Beira Interior. Covilhã. 1-41. <http://hdl.handle.net/10400.6/850>
30. Towfighi, A. (2017). Stroke prevention. *Semin Neurol*, 235(37), 235–236.
31. Oza, R., Rundell, K., & Garcellano, M. (2017). Recurrent Ischemic Stroke: Strategies for Prevention. *American Family Physician*, 96(7), 436–440.
32. Béjot, Y., Daubail, B., & Giroud, M. (2016). Epidemiology of stroke and transient ischemic attacks: Current knowledge and perspectives. *Revue Neurologique*, 172(1), 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2015.07.013>
33. Boehme, A., Esenwa, C., & Elkind, M. (2018). Stroke: Risk factors and prevention. *Journal of the Pakistan Medical Association*, 60(5), 412. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308398.Stroke>
34. Naess, H. (2017). Treatment of stroke. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 137(11), 778. <https://doi.org/doi:10.4045/tidsskr.17.0434>
35. Rabinstein, A. (2017). Treatment of Acute Ischemic Stroke. *Continuum*, 23(1), 62–81. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000420>
36. Favate, A. S., & Younger, D. S. (2016). Epidemiology of Ischemic Stroke. *Neurologic Clinics*, 34(4), 967–980. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.013>
37. Zhao, G. J., Wang, Z. R., Lin, F. Z., Cui, Y. Sen, & Xu, S. L. (2019). The safety and efficacy of tPA intravenous thrombolysis for treating acute ischemic stroke patients with a history of cerebral hemorrhage. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 52(2), 1–7. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20187739>
38. Jung, S., Rosini, J. M., Nomura, J. T., Caplan, R. J., & Raser-Schramm, J. (2019). Even Faster Door-to-Alteplase Times and Associated Outcomes in Acute Ischemic Stroke. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 28(12), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2019.104329>
39. Infarmed. (2014). *Folheto Informativo: Informação para o utilizador de Actilyse Cathflo*. Infarmed. Lisboa. 1-4.
40. Koh, S. H., & Lo, E. (2015). The Role of the PI3K Pathway in the Regeneration of the Damaged Brain by Neural Stem Cells after Cerebral Infarction. *Asian Social Science*, 11(15),

171–179. <https://doi.org/10.3988/jcn.2015.11.4.297>

41. Zhai, L., Liu, M., Wang, T., Zhang, H., Li, S., & Guo, Y. (2017). Picroside II protects the blood-brain barrier by inhibiting the oxidative signaling pathway in cerebral ischemia-reperfusion injury. *PLoS ONE*, *12*(4), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174414>

42. Hess, D. C., Eldahshan, W., & Rutkowski, E. (2020). COVID-19-Related Stroke. *Translational Research in Stroke*, *11*, 322–325.

43. Kolikonda, M. K., Jandrasupalli, K. K., & Lippmann, S. (2020). Association of Coronavirus Disease 2019 and Stroke: A Rising Concern. *Neuroepidemiology*, *54*, 370–374. <https://doi.org/10.1159/000510134>

44. Nagamine, M., Chow, D. S., Chang, P. D., Boden-Albala, B., Yu, W., & Soun, J. E. (2020). Impact of COVID-19 on Acute Stroke Presentation at a Comprehensive Stroke Center. *Frontiers in Neurology*, *11*, 14–17. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00850>

45. Tasker, R. C., & Duncan, E. D. (2015). Focal cerebral ischemia and neurovascular protection: A bench-to-bedside update. *Current Opinion in Pediatrics*, *27*(6), 694–699. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000287>

46. Sanganalmath, S. K., Gopal, P., Parker, J. R., Downs, R. K., Parker, J. C., & Dawn, B. (2017). Global cerebral ischemia due to circulatory arrest: insights into cellular pathophysiology and diagnostic modalities. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *426*, 111–127. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2885-9>

47. Ratilal, B. O. (2014). *Transient Focal Cerebral Ischemia – An Experimental Model*. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. Lisboa. 1-40. <http://hdl.handle.net/10451/18264>

48. Brito, D. S. B. (2009). *Diagnóstico de Acidente Vascular Isquémico no Serviço de Urgência: Concordância entre a classificação clínica da Oxfordshire Community Stroke Project e os dados imagiológicos na Tomografia Computorizada*. Dissertação de Mestrado. Universidade da Beira Interior. Covilhã. 7-13. <http://hdl.handle.net/10400.6/1740>

49. Candelario-Jalil, E. (2009). Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: Considerations for the development of novel neurotherapeutics. *Current Opinion in Investigational Drugs*, *10*(7), 644–654. <https://doi.org/10.3389/fped.2014.00144>

50. Ramos, E., Patiño, P., Reiter, R. J., Gil-Martín, E., Marco-Contelles, J., Parada, E., los

Rios, C. de, Romero, A., & Egea, J. (2017). Ischemic brain injury: New insights on the protective role of melatonin. *Free Radical Biology and Medicine*, 104, 32–53. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.005>

51. Makris, K., Haliassos, A., Chondrogianni, M., & Tsvigoulis, G. (2018). Blood biomarkers in ischemic stroke: potential role and challenges in clinical practice and research. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 55(5), 294–328. <https://doi.org/10.1080/10408363.2018.1461190>

52. Rama, R., & García, J. C. (2016). Excitotoxicity and Oxidative Stress in Acute Stroke. *Intech*, 17–42. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/64991>

53. Hinzman, J. M., Wilson, J. A., Mazzeo, A. T., Bullock, M. R., & Hartings, J. A. (2016). Excitotoxicity and Metabolic Crisis Are Associated with Spreading Depolarizations in Severe Traumatic Brain Injury Patients. *Journal of Neurotrauma*, 33(19), 1775–1783. <https://doi.org/10.1089/neu.2015.4226>

54. Henriques, M. (2014). *Isquémia cerebral aguda e modelação pelo sulfeto de hidrogénio*. Tese de Doutoramento. Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. Lisboa. 37-58. <http://hdl.handle.net/10451/22846>

55. Michinaga, S., & Koyama, Y. (2015). Pathogenesis of brain edema and investigation into anti-edema drugs. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), 9949–9975. <https://doi.org/10.3390/ijms16059949>

56. Sun, Y., Feng, X., Ding, Y., Li, M., Yao, J., Wang, L., & Gao, Z. (2019). Phased treatment strategies for cerebral ischemia based on glutamate receptors. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13(168), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00168>

57. Liu, F., Lu, J., Manaenko, A., Tang, J., & Hu, Q. (2018). Mitochondria in Ischemic Stroke: New Insight and Implications. *Aging and Disease*, 9(5), 924. <https://doi.org/10.14336/ad.2017.1126>

58. Fernandes, J. F. C. (2014). *In vitro ischemia-induced changes in the transcriptome of hippocampal neurons Neuroprotective pathways in brain ischemia*. Tese de Doutoramento. Universidade de Coimbra. Coimbra. 1-37. <http://hdl.handle.net/10316/25227>

59. Khoshnam, S. E., Winlow, W., Farzaneh, M., Farbood, Y., & Moghaddam, H. F. (2017). Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. *Neurological Sciences*, 38(7), 1167–1186. <https://doi.org/10.1007/s10072-017-2938-1>

60. Jayaraj, R. L., Azimullah, S., Beiram, R., Jalal, F. Y., & Rosenberg, G. A. (2019). Neuroinflammation: Friend and foe for ischemic stroke. *Journal of Neuroinflammation*, *16*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1516-2>
61. Liu, R., Pan, M.-X., Tang, J.-C., Zhang, Y., Liao, H.-B., Zhuang, Y., Zhao, D., & Wan, Q. (2017). Role of neuroinflammation in ischemic stroke. *Neuroimmunology and Neuroinflammation*, *4*(8), 158. <https://doi.org/10.20517/2347-8659.2017.09>
62. Antunes, S. (2016). *Modulação da inflamação e da neurogênese no hipocampo: desvendar uma nova interação entre a histamina e o lipopolissacarídeo*. Dissertação de Mestrado. Universidade da Beira Interior. Covilhã. 1-4. <http://hdl.handle.net/10400.6/7191>
63. Xia, C. Y., Zhang, S., Gao, Y., Wang, Z. Z., & Chen, N. H. (2015). Selective modulation of microglia polarization to M2 phenotype for stroke treatment. *International Immunopharmacology*, *25*(2), 377–382. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.02.019>
64. Rosa, N. (2017). *Exploring the effect of NLRP3 Inflammasome inhibition in the ex vivo model of epileptogenesis*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Lisboa. 1-68. <http://hdl.handle.net/10451/27604>
65. Rajan, W. D., Wojtas, B., Gielniewski, B., Gieryng, A., Zawadzka, M., & Kaminska, B. (2019). Dissecting functional phenotypes of microglia and macrophages in the rat brain after transient cerebral ischemia. *Glia*, *67*(2), 232–245. <https://doi.org/10.1002/glia.23536>
66. Li, L. Z., Huang, Y. Y., Yang, Z. H., Zhang, S. J., Han, Z. P., & Luo, Y. M. (2020). Potential microglia-based interventions for stroke. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, *26*(3), 288–296. <https://doi.org/10.1111/cns.13291>
67. Marques, M. (2014). *Estudo imunohistoquímico da expressão da micróglia nos tumores gliais*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. Lisboa. 1-57. <http://hdl.handle.net/10451/11271>
68. Yao, K., & Zu, H. (2019). Microglial polarization: novel therapeutic mechanism against Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology*, *28*, 95–110. <https://doi.org/10.1007/s10787-019-00613-5>
69. Tang, Y., & Le, W. (2016). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, *53*(2), 1181–1194. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5>

70. Liu, R., Tang, J. C., Pan, M. X., Zhuang, Y., Zhang, Y., Liao, H. B., Zhao, D., Lei, Y., Lei, R. X., Wang, S., Liu, A. C., Qin, X. P., Chen, J., Zhang, Z. F., & Wan, Q. (2018). ERK 1/2 Activation Mediates the Neuroprotective Effect of BpV(pic) in Focal Cerebral Ischemia–Reperfusion Injury. *Neurochemical Research*, *43*(7), 1424–1438. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2558-z>
71. Lively, S., & Schlichter, L. C. (2018). Microglia responses to pro-inflammatory stimuli (LPS, IFN γ +TNF α) and reprogramming by resolving cytokines (IL-4, IL-10). *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*(215), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00215>
72. Kim, J. Y., Park, J., Chang, J. Y., Kim, S. H., & Lee, J. E. (2016). Inflammation after Ischemic stroke: The role of leukocytes and glial cells. *Experimental Neurobiology*, *25*(5), 241–251. <https://doi.org/10.5607/en.2016.25.5.241>
73. Fang, M., Zhong, L., Jin, X., Cui, R., Yang, W., Gao, S., Lv, J., Li, B., & Liu, T. (2019). Effect of inflammation on the process of stroke rehabilitation and poststroke depression. *Frontiers in Psychiatry*, *10*(184), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00184>
74. Tang, T., Gao, D., Yang, X., Hua, X., Li, S., & Sun, H. (2019). Exogenous Netrin-1 Inhibits Autophagy of Ischemic Brain Tissues and Hypoxic Neurons via PI3K/mTOR Pathway in Ischemic Stroke. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, *28*(5), 1338–1345. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2019.01.032>
75. Puig, B., Brenna, S., & Magnus, T. (2018). Molecular communication of a dying neuron in stroke. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(9), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms19092834>
76. Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, *5*(6), 463–466. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>
77. Xu, H., Qin, W., Hu, X., Mu, S., Zhu, J., Lu, W., & Luo, Y. (2018). Lentivirus-mediated overexpression of OTULIN ameliorates microglia activation and neuroinflammation by depressing the activation of the NF-KB signaling pathway in cerebral ischemia/reperfusion rats. *Journal of Neuroinflammation*, *15*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1117-5>
78. Waller, R., Baxter, L., Fillingham, D. J., Coelho, S., Pozo, J. M., Mozumder, M., Frangi, A. F., Ince, P. G., Simpson, J. E., & Robin Highley, J. (2019). Iba-1-/CD68+ microglia are a prominent feature of age-associated deep subcortical white matter lesions. *PLoS ONE*, *14*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210888>

79. Hovens, I., Nyakas, C., & Schoemaker, R. (2014). A novel method for evaluating microglial activation using ionized calcium-binding adaptor protein-1 staining: cell body to cell size ratio. *Neuroimmunology and Neuroinflammation*, 1(2), 82. <https://doi.org/10.4103/2347-8659.139719>
80. Cinelli, M. A., Do, H. T., Miley, G. P., & Silverman, R. B. (2019). Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Medicinal Research Reviews*, 40(1), 158–189. <https://doi.org/10.1002/med.21599>
81. Lind, M., Hayes, A., Caprnda, M., Petrovic, D., Rodrigo, L., Kruzliak, P., & Zulli, A. (2017). Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 93, 370–375. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.036>
82. Krystofova, J., Pathipati, P., Russ, J., Sheldon, A., & Ferriero, D. (2019). The Arginase Pathway in Neonatal Brain Hypoxia-Ischemia. *Developmental Neuroscience*, 40(5–6), 437–450. <https://doi.org/10.1159/000496467>
83. Petrone, A. B., O'Connell, G. C., Regier, M. D., Chantler, P. D., Simpkins, J. W., & Barr, T. L. (2016). The Role of Arginase 1 in Post-Stroke Immunosuppression and Ischemic Stroke Severity. *Translational Stroke Research*, 7(2), 103–110. <https://doi.org/10.1007/s12975-015-0431-9>
84. Zhang, H., Xiong, X., Gu, L., Xie, W., & Zhao, H. (2018). CD4 T cell deficiency attenuates ischemic stroke, inhibits oxidative stress, and enhances Akt/mTOR survival signaling pathways in mice. *Chinese Neurosurgical Journal*, 4, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s41016-018-0140-9>
85. Wilhelmsson, U., Bushong, E. A., Price, D. L., Smarr, B. L., Phung, V., Terada, M., Ellisman, M. H., & Pekny, M. (2006). Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(46), 17513–17518. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602841103>
86. Kassubek, R., Gorges, M., Schocke, M., Hagenston, V. A. M., Huss, A., Ludolph, A. C., Kassubek, J., & Tumani, H. (2017). GFAP in early multiple sclerosis: A biomarker for inflammation. *Neuroscience Letters*, 657, 166–170. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.07.050>
87. Li, J., Xu, Y., Ren, H., Zhu, Y., Peng, B., & Cui, L. (2018). Autoimmune GFAP astrocytopathy after viral encephalitis: A case report. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 21, 84–87. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2018.02.020>

88. Abdelhak, A., Huss, A., Kassubek, J., Tumani, H., & Otto, M. (2018). Serum GFAP as a biomarker for disease severity in multiple sclerosis. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33158-8>
89. Krishnan, A., Wu, H., & Venkataraman, V. (2020). Astrocytic S100B, Blood-Brain Barrier and Neurodegenerative Diseases. *Glia in Health and Disease*, 1–19. <https://doi.org/10.5772/intechopen.92146>
90. Serrano, A., Donno, C., Giannetti, S., Perić, M., Andjus, P., D'Ambrosi, N., & Michetti, F. (2017). The Astrocytic S100B Protein with Its Receptor RAGE Is Aberrantly Expressed in SOD1G93A Models, and Its Inhibition Decreases the Expression of Proinflammatory Genes. *Mediators of Inflammation*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1626204>
91. Nitulescu, G. M., Van De Venter, M., Nitulescu, G., Ungurianu, A., Juzenas, P., Peng, Q., Olaru, O. T., Grădinaru, D., Tsatsakis, A., Tsoukalas, D., Spandidos, D. A., & Margina, D. (2018). The Akt pathway in oncology therapy and beyond (Review). *International Journal of Oncology*, *53*(6), 2319–2331. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4597>
92. Zhao, E. Y., Efendizade, A., Cai, L., & Ding, Y. (2016). The role of Akt (protein kinase B) and protein kinase C in ischemia–reperfusion injury. *Neurological Research*, *38*(4), 301–308. <https://doi.org/10.1080/01616412.2015.1133024>
93. Fernandes, S. A. (2018). *Evolution of immune genes in Antarctic fish*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve. Algarve. 9-10. <http://hdl.handle.net/10400.1/13526>
94. Hawkins, P. T., & Stephens, L. R. (2015). PI3K signalling in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1851*(6), 882–897. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2014.12.006>
95. Luan, Q., Pan, L., He, D., Gong, X., & Zhou, H. (2018). SC79, the AKT activator protects cerebral ischemia in a Rat Model of Ischemia/Reperfusion Injury. *Medical Science Monitor*, *24*, 5391–5397. <https://doi.org/10.12659/MSM.910191>
96. Xu, M., Wang, S. L., Zhu, L., Wu, P. Y., Dai, W. B., & Rakesh, K. P. (2018). Structure-activity relationship (SAR) studies of synthetic glycogen synthase kinase-3 β inhibitors: A critical review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *164*, 448–470. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.12.073>
97. Chen, Y., Wu, Z., Zhu, X., Zhang, M., Zang, X., Li, X., & Xu, Y. (2019). OCT4B-190 protects against ischemic stroke by modulating GSK-3 β /HDAC6. *Experimental Neurology*, *316*, 52–62.

<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.04.005>

98. Rana, A. K., & Singh, D. (2018). Targeting glycogen synthase kinase-3 for oxidative stress and neuroinflammation: Opportunities, challenges and future directions for cerebral stroke management. *Neuropharmacology*, 139, 124–136.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.07.006>

99. Kumar, P., Misra, S., Kumar, A., Pandit, A. K., Chakravarty, K., & Prasad, K. (2016). Association between Tumor Necrosis Factor- α (-238G/A and -308G/A) Gene Polymorphisms and Risk of Ischemic Stroke: A Meta-Analysis. *Pulse*, 3(3–4), 217–228.

<https://doi.org/10.1159/000443770>

100. Palareti, G., Legnani, C., Cosmi, B., Antonucci, E., Erba, N., Poli, D., Testa, S., & Toso, A. (2016). Inhibition of TRPV1 confers neuroprotection, reduces TNF- α and increases IL-10 in a rat stroke model. *International Journal of Laboratory Hematology*, 38(1), 42–49.

<https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>

101. Akash, M. S. H., Rehman, K., & Liaqat, A. (2018). Tumor Necrosis Factor-Alpha: Role in Development of Insulin Resistance and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(1), 105–110. <https://doi.org/10.1002/jcb.26174>

102. Yu, X., Zhang, N., Liu, S., Xi, Z., & Zhang, Y. (2018). Polymorphisms in the interleukin-1 β (IL-1B) and interleukin-1 α (IL-1A) genes on risk of febrile seizures: a meta-analysis. *Neurological Sciences*, 39(9), 1529–1536. <https://doi.org/10.1007/s10072-018-3449-4>

103. Mendiola, A. S., & Cardona, A. E. (2018). The IL-1 β phenomena in neuroinflammatory diseases. *Journal of Neural Transmission*, 125(5), 781–795. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1732-9>

104. Kumar, P., Yadav, A. K., Misra, S., Kumar, A., Chakravarty, K., & Prasad, K. (2016). Role of Interleukin-10 (-1082A/G) gene polymorphism with the risk of ischemic stroke: a meta-analysis. *Neurological Research*, 38(9), 823–830.

<https://doi.org/10.1080/01616412.2016.1202395>

105. Garcia, J. M., Stillings, S. A., Leclerc, J. L., Phillips, H., Edwards, N. J., Robicsek, S. A., Hoh, B. L., Blackburn, S., & Doré, S. (2017). Role of interleukin-10 in acute brain injuries. *Frontiers in Neurology*, 8, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00244>

106. Ballarin, B., & Tymianski, M. (2018). Discovery and development of NA-1 for the treatment of acute ischemic stroke. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(5), 661–668.

<https://doi.org/10.1038/aps.2018.5>

107. Zhou, L., Li, F., Xu, H. B., Luo, C. X., Wu, H. Y., Zhu, M. M., Lu, W., Ji, X., Zhou, Q. G., & Zhu, D. Y. (2010). Treatment of cerebral ischemia by disrupting ischemia-induced interaction of nNOS with PSD-95. *Nature Medicine*, *16*(12), 1439–1444. <https://doi.org/10.1038/nm.2245>

108. Nie, J., & Yang, X. (2017). Modulation of Synaptic Plasticity by Exercise Training as a Basis for Ischemic Stroke Rehabilitation. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *37*(1), 5–16. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0348-1>

109. Gudi, V., Gai, L., Herder, V., Tejedor, L. S., Kipp, M., Amor, S., Sühs, K. W., Hansmann, F., Beineke, A., Baumgärtner, W., Stangel, M., & Skripuletz, T. (2017). Synaptophysin is a reliable marker for axonal damage. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *76*(2), 109–125. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlw114>

110. Riemann, D., Petkova, A., Dresbach, T., & Wallrafen, R. (2018). An optical assay for synaptic vesicle recycling in cultured neurons overexpressing presynaptic proteins. *Journal of Visualized Experiments*, *2018*(136), 1–9. <https://doi.org/10.3791/58043>

111. Jing, M., Yi, Y., Jinniu, Z., Xiuli, K., & Jianxian, W. (2020). Rehabilitation training improves nerve injuries by affecting Notch1 and SYN. *Open Medicine*, *15*(1), 387–395. <https://doi.org/10.1515/med-2020-0045>

112. Zhang, X., Shen, X., Dong, J., Liu, W. C., Song, M., Sun, Y., Shu, H., Towse, C. L., Liu, W., Liu, C. F., & Jin, X. (2019). Inhibition of Reactive Astrocytes with Fluorocitrate Ameliorates Learning and Memory Impairment Through Upregulating CRT1 and Synaptophysin in Ischemic Stroke Rats. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *39*(8), 1151–1163. <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00709-0>

113. Fonteles, A. A., de Souza, C. M., de Sousa Neves, J. C., Menezes, A. P. F., Santos do Carmo, M. R., Fernandes, F. D. P., de Araújo, P. R., & de Andrade, G. M. (2016). Rosmarinic acid prevents against memory deficits in ischemic mice. *Behavioural Brain Research*, *297*, 91–103. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.09.029>

114. Uzdensky, A. B. (2018). Photothrombotic Stroke as a Model of Ischemic Stroke. *Translational Stroke Research*, *9*(5), 437–451. <https://doi.org/10.1007/s12975-017-0593-8>

115. Gupta, A. K. A. V. (2016). A review on animal models of stroke: An update. *Brain Research Bulletin*, *122*, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.02.016>

-
116. Fluri, F., Schuhmann, M. K., & Kleinschnitz, C. (2015). Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 3445–3454. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S56071>
117. McCabe, C., Arroja, M. M., Reid, E., & Macrae, I. M. (2018). Animal models of ischaemic stroke and characterisation of the ischaemic penumbra. *Neuropharmacology*, 134, 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.09.022>
118. Hermann, D. M., Popa-Wagner, A., Kleinschnitz, C., & Doepfner, T. R. (2019). Animal models of ischemic stroke and their impact on drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 14(3), 315–326. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1573984>
119. Sommer, C. J. (2017). Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta Neuropathologica*, 133(2), 245–261. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1667-0>
120. Aspromonte, M. (2014). *Alteration of GABAAR trafficking during cerebral ischemia : the role of Huntingtin-associated protein 1*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Coimbra. Coimbra. 15-16. <http://hdl.handle.net/10316/28031>
121. Uluç, K., Miranpuri, A., Kujoth, G. C., Aktüre, E., & Başkaya, M. K. (2011). Focal cerebral ischemia model by endovascular suture occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *Journal of Visualized Experiments*, 48, 1–5. <https://doi.org/10.3791/1978>
122. Lobo, A. (2010). *VGLUT1 and VGLUT2 cleavage under excitotoxic conditions and in cerebral ischemia*. Tese de Doutoramento. Universidade de Coimbra. Coimbra. 15-16. <http://hdl.handle.net/10316/17798>
123. Ratilal, B. O., Rocha, J. P. F., Fernandes, A. M. A., Arroja, M. M. C., Barateiro, A. P., Brites, D. M. T. O., Pinto, R. M. A., Sepodes, B. M. N., & Mota-Filipe, H. D. (2014). TDZD-8 pre-treatment in transient middle cerebral artery occlusion. *Biomedicine and Aging Pathology*, 4(4), 361–367. <https://doi.org/10.1016/j.biomag.2014.07.005>
124. 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-Filipe, H. D. (2014). Neuroprotective effects of erythropoietin pretreatment in a rodent model of transient middle cerebral artery occlusion. *Journal of Neurosurgery*, 121(1), 55–62. <https://doi.org/10.3171/2014.2.JNS132197>
125. Koizumi, J., Yoshida, Y., Nakazawa, T., & Ooneda, G. (1986). Experimental studies of ischemic brain edema 1 : a new experimental model of cerebral embolism in rats in which
-

recirculation can be introduced in the ischemic area. *Japanese Journal of Stroke*, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.3995/jstroke.8.1>

126. Sutherland, B. A., Rabie, T., & Buchan, A. M. (2014). Laser Doppler Flowmetry to Measure Changes in Cerebral Blood Flow. *Methods Mol Biol.*, 1135, 205–211. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0320-7>

127. Gage, G. J., Kipke, D. R., & Shain, W. (2012). Whole animal perfusion fixation for rodents. *Journal of Visualized Experiments*, 65, 1–9. <https://doi.org/10.3791/3564>

128. Olson, B. J. S. C. (2016). Assays for determination of protein concentration. *Current Protocols in Pharmacology*, 2016, 1–32. <https://doi.org/10.1002/cpph.3>

129. Otieno, B. A., Krause, C. E., & Rusling, J. F. (2016). Bioconjugation of Antibodies and Enzyme Labels onto Magnetic Beads. *Methods in Enzymology*, 571, 135–150. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.10.005>

130. Jeong, D. E., Lee, Y., & Lee, S. J. V. (2018). Western blot analysis of *C. elegans* proteins. *Methods in Molecular Biology*, 1742, 213–225. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7665-2_19

131. Mishra, M., Tiwari, S., & Gomes, A. V. (2017). Protein purification and analysis: Next generation western blotting techniques. *Expert Review of Proteomics*, 14(11), 1037–1053. <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1388167>

132. Kim, B. (2017). Western blot techniques. *Methods in Molecular Biology*, 1606, 133–139. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6990-6_9

133. Abcam. (2013). General Western Blot Protocol: Guidance for running an efficient and accurate experiment. Abcam, 1–7.

134. AMRESCO, L. (2017). Directions for Use RiboZolITM RNA Extraction Reagent. VWR.

135. Toni, L. S., Garcia, A. M., Jeffrey, D. A., Jiang, X., Stauffer, B. L., Miyamoto, S. D., & Sucharov, C. C. (2018). Optimization of phenol-chloroform RNA extraction. *MethodsX*, 5, 599–608. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.05.011>

136. Guest, P. C. (Ed. . (2017). Multiplex Biomarker Techniques. *Methods in Molecular Biology*, 1546, 317. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6730-8>

137. Luthra, R., Singh, R. R., & Patel, K. P. (2016). Quantitative Real-Time PCR: Recent Advances. *Clinical Applications of PCR, Methods in Molecular Biology*, 1392, 33–42.

<https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3360-0>

138. Fernandes, C. C. (2019). *Estudo de infecção congénita por HCMV Rastreo Universal por PCR na saliva*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Médicas da Nova Medical School. Lisboa. 20-22.

139. Pascoal, P. F. M. (2017). *S100B targeting to reduce demyelination and EAE pathogenesis*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. Lisboa. 28-31. <http://hdl.handle.net/10451/33970>.

140. Pawluk, H., Woźniak, A., Grzešek, G., Kołodziejaska, R., Kozakiewicz, M., Kopkowska, E., Grzechowiak, E., & Kozera, G. (2020). The Role of Selected Pro-Inflammatory Cytokines in Pathogenesis of Ischemic Stroke. *Clin Interv Aging*, 15, 469–484. <https://doi.org/10.2147 / CIA.S233909>

141. Luheshi, N. M., Kovács, K. J., Lopez-Castejon, G., Brough, D., & Denes, A. (2011). Interleukin-1 α expression precedes IL-1 β after ischemic brain injury and is localised to areas of focal neuronal loss and penumbral tissues. *Journal of Neuroinflammation*, 8, 4–8. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-186>

142. Woodcock, T., & Morganti-Kossmann, M. C. (2013). The role of markers of inflammation in traumatic brain injury. *Frontiers in Neurology*, 4, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00018>

143. Chen, X., Zhang, X., Wang, Y., Lei, H., Su, H., Zeng, J., Pei, Z., & Huang, R. (2015). Inhibition of immunoproteasome reduces infarction volume and attenuates inflammatory reaction in a rat model of ischemic stroke. *Cell Death and Disease*, 6(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.586>

144. Mizuma, A., & Yenari, M. A. (2017). Anti-inflammatory targets for the treatment of reperfusion injury in stroke. *Frontiers in Neurology*, 8, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00467>

145. Desai, S. M., Rocha, M., Jovin, T. G., & Jadhav, A. P. (2019). High Variability in Neuronal Loss: Time Is Brain, Requantified. *Stroke*, 50(1), 34–37. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.023499>

146. Ma, Y., Wang, J., Wang, Y., & Yang, G. Y. (2017). The biphasic function of microglia in ischemic stroke. *Progress in Neurobiology*, 157, 247–272. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.01.005>

147. Wang, J., Xing, H., Wan, L., Jiang, X., Wang, C., & Wu, Y. (2018). Treatment targets for M2 microglia polarization in ischemic stroke. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 105, 518–525. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.143>
148. Qin, C., Zhou, L. Q., Ma, X. T., Hu, Z. W., Yang, S., Chen, M., Bosco, D. B., Wu, L. J., & Tian, D. S. (2019). Dual Functions of Microglia in Ischemic Stroke. *Neuroscience Bulletin*, 35(5), 921–933. <https://doi.org/10.1007/s12264-019-00388-3>
149. Buscemi, L., Price, M., Bezzi, P., & Hirt, L. (2019). Spatio-temporal overview of neuroinflammation in an experimental mouse stroke model. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36598-4>
150. Sun, L., Zhang, Y., Liu, E., Ma, Q., Anatol, M., Han, H., & Yan, J. (2019). The roles of astrocyte in the brain pathologies following ischemic stroke. *Brain Injury*, 33(6), 712–716. <https://doi.org/10.1080/02699052.2018.1531311>
151. Revuelta, M., Elicegui, A., Moreno-Cugnon, L., Bühner, C., Matheu, A., & Schmitz, T. (2019). Ischemic stroke in neonatal and adult astrocytes. *Mechanisms of Ageing and Development*, 183, 111147. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2019.111147>
152. Cekanaviciute, E., & Buckwalter, M. S. (2016). Astrocytes: Integrative Regulators of Neuroinflammation in Stroke and Other Neurological Diseases. *Neurotherapeutics*, 13(4), 685–701. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0477-8>
153. Dionísio, P. E. A. (2014). *Using TUDCA to treat Alzheimer's disease after pathology onset in APP/PS1 mice*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. Lisboa. 1-119. <http://hdl.handle.net/10451/15924>
154. Baptista, M. G. de P. (2017). *Synthesis of novel potentially bioactive Pseudo- C - Nucleosides for the treatment or control of Bipolar Disorder*. Dissertação de Mestrado. Universidade da Beira Interior. Covilhã. 1-124. <http://hdl.handle.net/10400.6/9393>