JULIANA BARBOSA CASALS

**MODELO DE ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO EM
COELHO PARA O USO DE TERAPIA CELULAR**

São Paulo
2011

JULIANA BARBOSA CASALS

**MODELO DE ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO EM
COELHO PARA O USO DE TERAPIA CELULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

São Paulo
2011

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2459
FMVZ

Casals, Juliana Barbosa

Modelo de acidente vascular encefálico em coelho para o uso de terapia celular / Juliana Barbosa Casals. -- 2011.
130 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio.

1. Vascularização encefálica. 2. Acidente vascular encefálico. 3. Modelo animal.
4. Células-tronco. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciências Básicas

Pirassununga, 21 de setembro de 2009.

Assunto: Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal da FZEA.

Prezado Professor,

Tendo por base os princípios estabelecidos no Regimento Geral do Comitê de Ética em Experimentação Animal da FZEA/USP, informo que o projeto de pesquisa *"Modelo de acidente vascular encefálico em coelhos para uso de terapia celular"*, coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio recebeu parecer favorável de um pesquisador que atua na área de experimentação animal. Deste modo, a Comissão de Ética em Experimentação Animal da FZEA considerou-o aprovado.

Atenciosamente,

Prof. Dr. João Alberto Negrão
Presidente da Comissão de Ética

Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio
Departamento de Ciências Básicas

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do Autor(a): CASALS, Juliana Barbosa

Título: Modelo de Acidente Vascular Encefálico em Coelho para o Uso de Terapia Celular

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais

Pedro Henrique, Elizabete e Luziana. Por todo amor, carinho, paciência e incentivo. É maravilhoso poder contar com vocês em mais esta etapa da minha longa caminhada.

"Pai, ninguém quer saber o que fomos, o que possuíamos, que cargo ocupávamos no mundo; o que conta é a luz que cada um já tenha conseguido fazer brilhar em si mesmo. E é a sua luz que nos guia, assim como o farol, que não deixa o barco bater nas rochas e afundar. Você pai é o exemplo que nos faz seguir em frente com segurança, pois cada vez que nos sentirmos inseguros é só olharmos pro lado, e lá estará você...Muito Obrigada!"

Ao meu filho

Leandro Henrique... Grande amigo e companheiro, meu grande motivo para seguir sempre em frente com muito amor e confiança.

"Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco, na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes. Na essência, cada dia é a preparação de nosso próprio amanhã."

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, muito obrigada por toda paciência, competência no trabalho e pelos ensinamentos em mais esta etapa da minha vida acadêmica.

A minha família, por todo apoio, carinho e incentivo... Mesmo longe, sempre me apoiando, confortando e incentivando a voar e sonhar cada vez mais alto... Muito Obrigada.

As minhas Super Amigas que estiveram ao meu lado em todos os momentos. Meus sinceros agradecimentos. São nos momentos de dificuldade que se revelam as verdadeiras e sinceras amizades, muito obrigada. Naira Caroline Godoy Pieri, Anna Carolina Mazeto Ercolin, Kelly Cristiane Santos Roballo, Marcia Ramos Monteiro da Silva, Jessica Anzolin, Fabiana Fernandes Bressan, Juliana Regina Barreiro.

A todos os meus amigos que com muito incentivo e carinho me ajudam a seguir por mais esta fase da minha vida. Muito obrigada Nilton Pedro dos Santos (técnico do laboratório de histologia da FZEA-USP), Rodrigo Barreto, Arina Lázaro Rachetti, André Franciulli, Carlos Alberto Sarmento, Matheus Levi Tajra Feitosa, Marcio Rodrigues, Rafael Cardoso.

À equipe, que com muita paciência, disposição e boa vontade estiveram sempre ao meu lado quando precisei, tanto na realização quanto na conclusão deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos ao Dr. Celso Kiyoshi Takimura, Leonora Loppnow (Leo), Richard Silva, Maicon Barbosa da Silva, Jaqueline Santana, Prof. Dr. Paulo Maiorca.

Agradeço a parceria da FAPESP que acreditou em nossa pesquisa. Obrigada por toda a confiança e financiamento para que pudéssemos realizar este projeto.

Gostaria de demonstrar minha eterna gratidão aos mestres e incentivadores, de ontem de hoje e de sempre, considerando que a ciência não se difunde sozinha. O meu muito obrigada a todos que de alguma forma colaboraram para que esta pesquisa fosse realizada, e para que a minha trajetória acadêmica se tornasse uma busca prazerosa (Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, Prof. Dr. Flávio Meirelles, Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins, entre outros Professores...).

"Confie Sempre... Não percas a tua fé entre as sombras do mundo. Ainda que os teus pés estejam sangrando, segue para frente, erguendo-a por luz celeste, acima de ti mesmo. Crê e trabalha... Esforça-te no bem e espera com paciência... Tudo passa e tudo se renova na terra, mas o que vem do céu permanecerá... De todos os infelizes os mais desditosos são os que perderam a confiança em Deus e em si mesmo, porque o maior infortúnio é sofrer a privação da fé e prosseguir vivendo... Eleva, pois, o teu olhar e caminha... Luta e serve... Aprende e adianta-te... Brilha a alvorada além da noite. Hoje, é possível que a tempestade te amarfanche o coração e te atormente o ideal, aguilhoando-te com a aflição ou ameaçando-te com a morte. Não te esqueças, porém, de que amanhã será outro dia..."

Chico Xavier

"Aos animais que com suas vidas, engrandecem o conhecimento científico. São vítimas solicitadas pela ciência para estudos que beneficiam a humanidade, e aos indivíduos da própria espécie". O meu eterno respeito e gratidão.

"Nós seres humanos, estamos na natureza para auxiliar o progresso dos animais, na mesma proporção que os anjos estão para nos auxiliar. Portanto quem chuta ou maltrata um animal é alguém que não aprendeu a amar"

Chico Xavier

RESUMO

CASALS, J. B. **Modelo de Acidente Vascular Encefálico em Coelho para o uso de Terapia Celular**. [Modelo f Stroke in Rabbits for the use of Stem Cell Therapy] 2011. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é a segunda causa de morte mundial, anualmente mais de 20 milhões de indivíduos são acometidos por esta patologia, 5 milhões destes vão a óbito. No Brasil, é a principal causa de morte. Pesquisas demonstram que é crescente o uso de inúmeros modelos animais validos em pesquisas que buscam terapias funcionais para os Acidentes Vasculares. Numerosas espécies são usadas, ratos, coelhos, caninos, suínos, ovelhas e espécies de primatas. Um grande número de estudos tem sido realizado com células-tronco de diferentes fontes em diferentes modelos animais de lesão medular, e tentativas terapêuticas até mesmo em humanos, apresentando resultados promissores. As células-tronco ideais para a realização de transplantes devem ser imunologicamente inertes, provenientes de fontes de fácil acesso, possuir rápida expansibilidade em cultivo, apresentar capacidade de sobrevivência em longo prazo e de integração no sítio hospedeiro além de serem propícias a transfecção e expressão de genes exógenos. Os objetivos desta pesquisa são o de estabelecer um modelo de AVE em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) para o uso da terapia com células-tronco e avaliar através de Fluroscopia, avaliação comportamental, parâmetros clínicos e exame histopatológico a lesão induzida. Desta forma realizamos o delineamento experimental, a indução do acidente vascular encefálico em coelhos, o cultivo das células-troco do epitélio olfatório de cães e de coelhos, a transdução com retrovírus, a análise da expressão dos genes exógenos, a preparação de células-tronco transduzidas para transplante nos animais, a Fluroscopia, a avaliação comportamental, a avaliação macroscópica e a histológica. Desta forma o modelo experimental foi validado e comprovada a ação celular no tecido lesado via implante das células no tecido, pós-lesado, comprovado clinicamente pelos nossos resultados. Ainda podemos ressaltar que a ausência de trabalhos utilizando marcadores para o rastreamento de células-tronco após o transplante em lesões vasculares encefálicas, aliado a possibilidade de utilização desta terapêutica celular em animais com lesão vascular encefálica proveniente de traumas e diversas patologias na clínica veterinária são fatos que justificam essa

pesquisa, desta forma devemos ressaltar a importância de pesquisas com terapia celular sempre visando inserções diretas e indiretas desta biotecnologia à medicina veterinária e humana.

Palavra chave: Vascularização encefálica, Acidente vascular encefálico, Modelo animal, Células-tronco.

ABSTRACT

CASALS, J. B. **Model of Stroke in Rabbits for the use of Stem Cell Therapy.** [Modelo de Acidente Vascular Encefálico em Coelho para o uso de Terapia Celular] 2011. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Stroke is the second cause of death worldwide, each year more than 20 million individuals are affected by this disease, 5 million of these die. In Brazil, this is the leading cause of death. Polls show the use of numerous animal models valid in research seeking treatments for stroke functional is increasing. Numerous species are used, rats, rabbits, dogs, pigs, sheep and species of primates. A large number of studies have been done with stem cells from different sources in different animal models of spinal cord injury, and even therapeutic trials in humans, showing promising results. The ideal stem cells for the performance of transplants should be immunologically inert, from sources of easy access, have rapid expansion in culture, ability to provide long-term survival and integration in the host site as well as being suitable for transfection and expression of exogenous genes. The objectives of this research is to establish a model of stroke in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) to the use of therapy with stem cells and measure the induced lesion and its consequences by fluoroscopic, behavioral assessment, clinical parameters and histological examination. We designed the experiment, the induction of stroke in rabbits, the cell culture of the olfactory epithelium of dogs and rabbits, transduction with retroviruses, the analysis of exogenous gene expression, the preparation of transduced stem cells for transplantation in animals, fluoroscopic, the behavioral assessment, macroscopic evaluation and histology. Thus, the experimental model was validated and the cell implantation in damaged tissue was confirmed. We emphasize that the lack of studies using markers for the tracking of stem cells after transplantation into brain vascular lesions, the possibility of combined use of cell therapy in animals with vascular brain injury from trauma and various diseases in veterinary clinics are facts that justify such a search. So we must reinforce the importance of research on cell therapy to direct and indirect insertions of this biotechnology in human and veterinary medicine.

Key words: Encephalic vascularization, Stroke, Animal model, Stem cells.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 SISTEMA NERVOSO	16
1.2 REPARO DO TECIDO NERVOSO	19
1.3 MODELOS ANIMAIS	20
1.4 CÉLULAS-TRONCO	24
1.5 LACZ E GFP	30
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS	32
3.1 GERAL - 1ª PARTE	32
3.2 ESPECÍFICO	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 ARTIGO	33
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E JUSTIFICATIVA DO USO DA ÉSPECIE	33
4.3 MODELO VASCULAR	34
4.4 INDUÇÃO DO AVE NOS COELHOS COM ELASTAZE	38
4.5 FLUOROSCOPIA	42
4.6 CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS APÓS A INDUÇÃO DO AVE	45
4.7 PROTOCOLO DE EUTANÁSIA	45
4.8 CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO DO EPITÉLIO OLFATÓRIO DE CÃES E DE COELHOS	46
4.9 TRANSDUÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO OLFATÓRIAS COM O LENTIVÍRUS CARREANDO OS GENE REPÓRTERES GFP E LACZ	48
4.10 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE EXÓGENO LACZ NAS CÉLULAS-TRONCO TRANSDUZIDAS PREVIAMENTE À IMPLANTAÇÃO NOS ANIMAIS	49
4.11 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE EXÓGENO GFP NAS CÉLULAS-TRONCO TRANSDUZIDAS PREVIAMENTE À IMPLANTAÇÃO NOS ANIMAIS	49
4.12 PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO TRANSDUZIDAS PARA TRANSPLANTE NOS ANIMAIS	50
4.13 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL	50
4.14 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA	53
4.15 HISTOLOGIA	55

5 RESULTADOS	56
5.1 COELHOS - NOVA ZELÂNDIA.....	56
5.2 VASCULARIZAÇÃO DO COELHO	56
5.3 INDUÇÃO DO AVE NOS COELHOS COM ELASTASE	59
5.4 FLUOROSCOPIA.....	59
5.5 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	62
5.6 CULTIVO CELULAR (CÃES E COELHOS)	63
5.7 MICROSCOPIA DE LUZ	67
6 DISCUSSÃO	72
7 CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	80
ANEXOS	91

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é um déficit neurológico focal súbito, devido a uma lesão vascular. Essas lesões podem ser causadas por distúrbios de coagulação ou hemodinâmicos, mesmo que não haja alterações detectáveis nas veias ou artérias (ANDRÉ, 2006).

O AVE é a segunda causa de morte mundial, anualmente mais de 20 milhões de indivíduos são acometidos por esta patologia, cinco (5) milhões destes vão a óbito. No Brasil, é a principal causa de morte com exceção do Estado de São Paulo e outras três capitais (LESSA, 1999)

A incidência do AVE aumenta com a idade e dobra a cada década de vida após os 55 anos (O'SULLIVAN, 2004). Estudos epidemiológicos relatam que os principais fatores de riscos são classificados como não-modificáveis, como idade, sexo, raça e a história familiar, e os modificáveis, como hipertensão arterial, história de ataques isquêmicos transitórios (AIT), estenose significativa da artéria carótida, fibrilação atrial de início recente, obesidade, diabetes, uso de contraceptivos principalmente associado ao fumo, abuso de álcool, inatividade física, entre outros (CHAVES, 2000).

Os resultados neurológicos decorrentes do AVE são determinados pela área cerebral afetada, pela causa do AVE, extensão da lesão e as funções das áreas lesadas. Esta patologia é a principal causa de incapacidades neurológicas em adultos. Acomete a função das extremidades dos membros, controle motor, equilíbrio, força e mobilidade (PEREIRA et al., 2004).

As causas do acidente vascular encefálico estão relacionadas com a redução crítica do débito sanguíneo devido à oclusão parcial ou total de uma artéria cerebral, sendo que a constituição de um infarto cerebral traduz-se pelo aparecimento súbito de um déficit, caracterizando o acidente vascular encefálico isquêmico cuja representação depende do território arterial atingido, ou por ruptura de um vaso, caracterizando o AVE hemorrágico (O' SULLIVAN e SCHMITZ, 2004).

Segundo Villar (1997), a destruição de regiões do cérebro é seguida por sinais e sintomas de alteração da atividade motora e, a partir deste

comprometimento, existem mecanismos que agem para desencadear a recuperação, passando por diversos estágios que se iniciam imediatamente após a lesão e podem durar meses. A reparação acontece com o retorno gradual da função, porém isto não significa o retorno dos mesmos mecanismos motores perdidos após a lesão, mas uma adaptação dos mecanismos residuais, demonstrando uma plasticidade neuronal.

Clinicamente, diversas deficiências são possíveis, inclusive danos às funções motoras, sensitivas, mentais, perceptivas e da linguagem. As deficiências motoras se caracterizam por paralisia (hemiplegia), ou fraqueza (hemiparesia) no lado do corpo oposto ao local da lesão. Os AVEs oscilam desde leves até graves, e as seqüelas podem ser temporárias ou permanentes (RYERSON, 2000).

De acordo com *The National Institute of Neurological Disorders and Stroke t-PA Stroke Study Group* (1995), o tratamento com ativador do plasminogênio tissular recombinante (rt-PA) é eficaz quando instituído em até 3 horas após o início dos sintomas, porém seu uso está limitado a cerca de 5% dos pacientes na fase aguda do AVC isquêmico. Além disso, nenhum agente para neuroproteção teve sua eficácia comprovada em estudos clínicos em humanos. Portanto, outras estratégias terapêuticas precisam ser desenvolvidas.

1.1 SISTEMA NERVOSO

O Sistema Nervoso Central (SNC) é formado por neurônios, glia, epêndima, células endoteliais e pericitos dos vasos sanguíneos, além das meninges (DYCE, SACK, WENSING, 1997; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004; BRASILEIRO FILHO, 2009; McGAVIN, ZACHARY, 2009).

As células que são classificadas como glia tem variado ao longo das últimas décadas. Histologicamente podemos classificar os astrócitos (astroglia), os oligodendrócitos (oligodendroglia), as células ependimárias (ependimócitos) e a microglia como células da glia; entretanto muitos histologistas só reconhecem os astrócitos, os oligodendrócitos e a microglia como células

gliais. Os astrócitos, os oligodendrócitos e as células endoteliais são derivados do neuroectoderma; enquanto que a microglia, parte do sistema monócito-macrófago, é derivada do mesoderma (BRASILEIRO FILHO, 2009; McGAVIN, ZACHARY, 2009).

Macroscopicamente podemos identificar no Encéfalo duas variedades de tecidos; substância branca, que forma o grosso da substância situada internamente, e a substância cinzenta que constitui a camada cortical do cérebro e cerebelo (DYCE, SACK, WENSING, 1997; JONES, HUNT, KING, 2000; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004; BRASILEIRO FILHO, 2009, McGAVIN, ZACHARY, 2009).

Anatomicamente podemos descrever que o cérebro está apoiado no diencéfalo e no tronco encefálico, formando a maior parte da massa de encéfalo. O córtex cerebral é a camada superficial de substância cinzenta do encéfalo. O diencéfalo estende-se do tronco encefálico até o cérebro e circunda o terceiro ventrículo; inclui o tálamo, hipotálamo, epitálamo e o subtálamo. O tálamo é a principal transmissor para os impulsos sensoriais para o cérebro, vindo da medula espinhal, do tronco encefálico, do cerebelo e de outras partes do cérebro. Ele permite a percepção de algumas sensações como as de dor, temperatura e pressão. Já o hipotálamo, localizado inferiormente ao tálamo. É composto por cerca de doze núcleos, formando quatro regiões principais. Mamilar, parte posterior, a região tuberal, que é a parte mais larga, inclui os núcleos dorso-medial, ventro-medial e arqueado, mais o infundíbulo. É um dos principais reguladores da homeostasia. Por meio do SNA, o hipotálamo é o principal regulador das atividades viscerais, incluindo a frequência cardíaca, movimento de alimento ao longo do trato gastrointestinal e da contração da bexiga urinária, controle da glândula hipófise (TORTORA, GRABOWSKI, 2002).

O microambiente do SNC é extremamente delicado e para que tudo funcione adequadamente é necessário um total controle das funções normais. Os astrócitos estão envolvidos diretamente na homeostasia deste microambiente, regulam o balanço iônico e de água, concentrações de antioxidantes, absorção e metabolismo de neurotransmissores e metabolismo e seqüestro de neurotoxinas como amônia, metais pesados e

neurotransmissores aminoácidos excitatórios, como o glutamato e o aspartato. As interações entre os astrócitos, a microglia e os neurônios orquestram as reações imunes no cérebro (JONES, HUNT, KING, 2000; McGAVIN, ZACHARY, 2009).

De acordo como Cardenas et al. (2000) e Izquierdo et al. (2006) o hipocampo é uma estrutura bastante acometida durante um AVC ou AVE isquêmico. Uma região muito sensível à privação de energia e que esta relacionada com a memória.

Avanços na ciência quebraram o dogma de que as células nervosas não se regeneram ou mesmo que a capacidade regenerativa do tecido nervoso no SNC é mínima. Pesquisas já demonstraram a existência de células-tronco abaixo do epitélio endotelial, na região do hipocampo e no bulbo olfatório, capazes de proliferar e originar novos neurônios. O conhecimento sobre a biologia das células-tronco no SNC, seu potencial regenerativo e fatores que podem influenciá-lo permitem vislumbrar a possibilidade de intervenções terapêuticas que visem regenerar neurônios (LOIS, GARCÍA-VERDUGO, ALVAREZ-BUYLLA, 1996; FERNANDO et al., 2010).

A neurogênese no sistema nervoso central já foi observada em mamíferos juvenis e adultos e de acordo com pesquisas ocorre por toda vida, podendo ser estimuladas também após eventos patológicos. Um processo que envolve a proliferação, migração e diferenciação de células-tronco neural ou célula progenitora. Ocorre em regiões discretas do cérebro adulto, na zona subventricular dos ventrículos laterais e na zona subgranular do giro dentado (LOIS et al., 1996; CRAMER, CHOPP, 2000; MERKLE et al., 2004; FERNANDO et al., 2010).

Estas células também são conhecidas como células do tipo B, ficam localizadas em uma zona germinal que também contém células descendentes mais que possuem um potencial limitado. Os tipos de Células B apresentam características ultra-estruturais e moleculares das células gliais, incluindo a expressão de GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) e GLAST (*glutamate aspartate transporter*) (LOIS, GARCÍA-VERDUGO, ALVAREZ-BUYLLA, 1996; CRAMER, CHOPP, 2000; MERKLE et al., 2004; FERNANDO et al., 2010).

A linhagem de Células-tronco neurais geram neurônios jovens, neuroblastos, que migram para região do bulbo olfatório, onde se integram

como interneurônios locais. Pesquisas comprovaram que diante de danos cerebrais como Acidentes Vasculares Encefálicos estas células migram para o local das lesões e se diferenciam em neurônios conseguindo até regenerar o parênquima cerebral (LOIS et al., 1996; CRAMER, CHOPP, 2000; MERKLE et al., 2004; FERNANDO et al., 2010).

1.2 REPARO DO TECIDO NERVOSO

De acordo com o grau da lesão no SNC podemos ter desde uma inflamação tecidual até uma necrose tecidual. As principais células responsáveis por reparo na região lesionada são os astrócitos. Nesse processo reparatório, astrócitos não sintetizam fibras colágenas, como fazem os fibroblastos, os astrócitos são análogos aos fibroblastos. O reparo é feito por um aumento, divisão astrocítica e proliferação dos processos celulares astrocíticos, também chamado de astrogliose (JONES, HUNT, KING, 2000; McGAVIN, ZACHARY, 2009).

Lent, (2001) descreveu que a presença em grande quantidade dos astrócitos, nas regiões de lesão do SNC se deve a um constitui, um análogo da reação inflamatória que ocorre em circunstâncias semelhantes em outros tecidos do organismo quando sofrem algum tipo de injúria. Os astrócitos são capazes de produzir fatores tróficos (NGF), sendo também células apresentadoras de antígenos como macrófagos e monócitos, o resultado é duplo: os fatores tróficos liberados no local da lesão contribuem para a sobrevivência dos neurônios atingidos, e os antígenos exteriorizados na membrana astrocítica provocam ação defensiva do sistema imunitário (linfócitos T).

Os macrófagos originados da circulação e pela microglia é que são responsáveis pela absorção dos neurônios necróticos. Macrófagos e microglia endocitam e digerem os restos do tecido necrótico, tomando o aspecto espumoso (*células Gitter*) devido à grande quantidade de lipídeos endocitados, o que é seguido de intensa proliferação glial, especialmente de astrócitos, que envolvem rapidamente os vasos sanguíneos e restabelecem a barreira hematoencefálica. O tecido morto é substituído por um foco de gliose, onde

predomina astrócitos e microglia. Quando há necrose liquefativa podemos observar uma área denominada malácia. A degeneração do Tecido nervoso na maioria das vezes não pode ser observada macroscopicamente. A recuperação funcional das deficiências que se seguem à necrose se deve em parte à hipertrofia de neurônios vizinhos, que aumentam seus prolongamentos e fazem novas conexões (JONES, HUNT, KING, 2000; McGAVIN, ZACHARY, 2009).

Experimentalmente, injeção de células-tronco no sítio de lesão recentemente produzida em ratos resulta em recuperação significativamente maior e mais rápida das deficiências funcionais decorrentes da lesão, o que tem levado os pesquisadores a tentar a terapia com células-tronco em lesões traumáticas e isquêmicas do SNC humano (JONES, HUNT, KING, 2000; McGAVIN, ZACHARY, 2009).

1.3 MODELOS ANIMAIS

É crescente, o uso de modelos animais no entendimento dos mecanismos fisiopatológicos do acidente vascular encefálico. Desta forma, nos últimos anos a etiologia da doença tem progredido consideravelmente, apesar de algumas controvérsias. Devemos destacar que vários tipos de AVEs humano ainda não foram possíveis de serem mimetizados em modelos animais e são cada vez mais crescentes as exigências dos comitês de ética em pesquisas com animais. De qualquer forma, são essas mesmas controvérsias que possibilitam o desenvolvimento dessa área em particular, com a identificação de modelos cada vez mais fidedignos aos seus propósitos (FAGUNDES, TAHA, 2004; WESSMANN, CHANDLER, GAROSI, 2009; TEOCCHI, 2010).

Os autores ainda relatam que, paralelamente ao campo das pesquisas dos AVEs com modelos animais, existe outra esfera, que, justamente, pesquisa os melhores modelos animais para esta patologia, além de outras doenças neuronais. São áreas complementares e independentes, mas que, caminham juntas, e o sucesso de uma automaticamente se reflete no sucesso da outra, ou seja, o desenvolvimento de um modelo animal mais confiável

certamente resulta em melhores resultados, que contribuem ao entendimento desta patologia.

De acordo com Fagundes e Taha, (2004) devemos destacar que é notório que o sucesso de toda pesquisa esta relacionado com a escolha correta do modelo animal. A escolha deve ser criteriosa e é ponto fundamental do planejamento da pesquisa. O modelo inadequado implicará em restrições comprometedoras, tanto nas análises como na interpretação dos resultados e no processo de indução destes resultados para os seres humanos

O pesquisador Claude Bernard, por volta de 1865, em seus estudos de fisiologia, propôs o uso de animais como modelo de estudo e transposição para a fisiologia humana. Seu trabalho “Introdução ao Estudo da Medicina Experimental” buscou estabelecer regras e princípios para o estudo experimental na medicina. Claude Bernard provocou situações físicas e químicas que resultaram em alterações nos modelos animais semelhantes à em humanos. Hoje o modelo animal é usado virtualmente em todos os campos da pesquisa biológica. A relação entre os humanos e os animais ganhou contornos mais definidos quanto à exploração, hoje temos regras e uma ética estabelecida, a indução dos resultados do animal para a espécie humana tem critérios claros e objetivos a serem preenchidos (FAGUNDES, TAHA, 2004).

Habitualmente são referidos na literatura médica quatro tipos básicos de modelos animais: induzido, espontâneo, negativo e modelo órfão. Os dois primeiros são os mais importantes. Como o nome subentende, modelos induzidos são situações nas quais a condição a ser investigada é induzida experimentalmente, como por exemplo, a indução do *diabetes mellitus* (SALÉN, 1995).

Os modelos espontâneos de doenças humanas utilizam variantes genéticas que ocorrem naturalmente. Muitas centenas de raças/linhagens com tais doenças herdadas, modelando condições similares em humanos, foram caracterizadas e conservadas.

Já os modelos negativos, os quais uma doença específica não se desenvolve, por exemplo, infecção gonocócica em coelhos também inclui animais que demonstram falta de reatividade a um estímulo específico. Sua principal aplicação é em estudos sobre o mecanismo de resistência para ganhar compreensão clara de suas bases fisiológicas.

Um modelo órfão de doença simplesmente descreve a condição que ocorre naturalmente em espécies não-humanas, mas não foi descrita ainda em humanos e a qual é “adotada” quando uma doença semelhante humana é identificada mais tarde. Exemplos são; a doença de Marek, Papilomatose e encefalopatia espongiforme bovina (BSE), também chamada de “doença da vaca louca” (SALÉN, 1995).

Pesquisas demonstram que é crescente o uso de inúmeros modelos animais validos em pesquisas que buscam terapias funcionais para os Acidentes Vasculares. Numerosas espécies são usadas, ratos, coelhos, caninos, suínos, ovelhas e espécies de primatas (REUL et al., 1997).

Teocchi (2010) destaca ainda que inúmeras espécies animais já foram e vem sendo utilizadas nas pesquisas sobre AVE e AVC. Os ratos e camundongos, sem dúvida, são os mais utilizados. Todavia, é crescente a demanda por modelos maiores, como coelhos ou até mesmo primatas não humanos, sempre objetivando o melhor entendimento da doença e as formas de tratamento.

Infelizmente, o caminho entre os resultados obtidos com animais e sua aplicabilidade em humanos é longo, e repleto de obstáculos. É comum que drogas neuroprotetoras com excelentes efeitos em animais sejam inadequadas para pessoas, por desencadearem efeitos colaterais em virtude da diferente dosagem de administração, que no animal é muito menor quando comparada à dosagem que seria necessária a uma pessoa (TEOCCHI, 2010).

Podemos destacar também que os experimentos laboratoriais, com suas variáveis controladas, não refletem a realidade dos AVEs e AVCs na população. No laboratório, existe um padrão rígido de tratamento dos animais que não pode ser aplicado em pessoas, pois um paciente com estas patologias, normalmente, pode demorar muito a perceber os sintomas e procurar ajuda médica. Quanto mais precoce a identificação dos sintomas, melhores as perspectivas de tratamento (WESSMANN, CHANDLER, GAROSI, 2009).

Wessmann, Chandler e Garosi, (2009) ainda colocam que outro ponto a ser observado é a existência de um rigoroso controle dos modelos animais utilizados nas pesquisas de qualidade. Usualmente, são animais jovens, saudáveis, todos de um mesmo sexo ou faixas etárias e até mesmo geneticamente

muito semelhantes, pois todos podem vir de uma mesma linhagem de animais de laboratório, especialmente quando se trata de roedores.

Obviamente, na população humana não existe essa homogeneidade. O típico paciente com AVE ou AVC é idoso com fatores de risco e pode apresentar complicações por outras doenças, como diabetes, hipertensão ou doenças coronárias. A idade é um fator de risco primário para estas patologias, que geralmente é negligenciado em estudos com animais. Pesquisadores do Departamento de Neurocirurgia da West Virginia University acreditam que o uso de animais envelhecidos pode acrescentar novos conhecimentos sobre os danos físicos causados pelo AVE ou AVC e facetas da recuperação que são mascaradas ou não muito bem elucidadas em modelos animais jovens (WESSMANN, CHANDLER, GAROSI, 2009).

Em um estudo publicado recentemente, em maio de 2009, pesquisadores realizaram em dois grupos de ratos – um de jovens e outro de idosos – um mesmo experimento que visou constatar a redução do volume do tecido cortical infartado pela oclusão transiente da artéria cerebral média. Os resultados foram claros: ratos jovens apresentaram melhoria em diversos aspectos, como nos volumes totais de tecidos infartados, na formação de edema, e até mesmo nas seqüelas funcionais (JOUTEL et al., 2010).

As diferenças não param por aí. Podemos ressaltar que, os cérebros de humanos e animais são diferentes; tanto anatomicamente, quando funcionalmente. O que garante a utilização de modelos animais nas pesquisas em questão é que os mecanismos básicos do AVE ou AVC são idênticos nos mamíferos em geral, mas ainda assim existem diferenças (JOUTEL et al., 2010).

Os autores ressaltaram que o campo das pesquisas com relação ao AVE e AVC exige que pesquisas paralelas sejam realizadas na busca dos melhores modelos animais. O desenvolvimento de um modelo mais confiável objetiva resultados mais fidedignos que contribuem para um melhor entendimento destas patologias. Desta forma se faz necessário o conhecimento anatômico dos vasos encefálicos das diferentes espécies utilizadas, com posse destes conhecimentos é que podemos visar uma inserção direta e indireta destes resultados as medicinas, veterinária e humana.

Embora muitos presumam que a extrapolação de uma espécie seja melhor quanto mais esta espécie assemelhe-se aos humanos, a proximidade filogenética (como alcançada por modelos primatas) não é garantia de resultados satisfatórios, como demonstrou o mal sucedido modelo de chipanzé em pesquisas relacionadas com a Síndrome de Imuno Deficiência (AIDS) (CALABRESE, 1991; SALÉN, 1995; LYNETTE, 1998).

Sendo assim os pesquisadores Calabrese, (1991), Salén, (1995) e Lynette, (1998) destacaram que, é decisivo que os fenômenos patológicos, e o resultado de uma doença ou afecção induzida na espécie testada se pareçam com os respectivos fenômenos patológicos na espécie alvo. A infecção por FIV (vírus da imunodeficiência felina) em gatos pode, portanto, ser um melhor modelo para a AIDS humana do que a infecção por HIV (vírus da imunodeficiência humana) em macacos.

1.4 CÉLULAS-TRONCO

Em modelos animais, o uso de células-tronco correlacionou-se com melhora funcional após o AVC (CHOPP, LI, 2002). Publicações recentes têm demonstrado a segurança do tratamento com Células Mononucleares da Medula Óssea (CMMO) injetadas via intracoronária em pacientes portadores de cardiopatia isquêmica aguda ou crônica (PERIN et al., 2003; WOLLERT, MEYER, LOTZ, 2004).

Já se sabe que as células-tronco têm capacidade de auto-renovação, de diferenciação em múltiplas linhagens celulares, e podem ser obtidas de fontes embrionárias, fetais ou adultas. O tipo celular ideal para reparo neuronal ainda é motivo de debate. As células-tronco adultas autólogas possuem algumas vantagens em relação às células-tronco embrionárias e outros tipos celulares: não existe risco de rejeição, não estão ligadas à formação de teratomas como as células embrionárias, e não estão relacionadas aos problemas éticos e legais (KORBLING, ESTROV, 2003).

A crescente abordagem das células-tronco na área científica e na mídia tem ocorrido devido à capacidade de reconstituição e, principalmente, à

característica de plasticidade das células-tronco; que permite a diferenciação destas em células de diversos tecidos, tais como, fígado, sistema nervoso central, rins, pâncreas, pulmões, pele, trato gastrintestinal, coração e músculo esquelético (HERZOG, CHAI, KRAUSE, 2003).

De acordo com Zago (2002) o conhecimento de que, uma única célula é capaz de dar origem a mais de 200 tipos diversos de células diferenciadas de tecidos adultos não é novo, pois constitui a premissa básica da embriologia: o óvulo fecundado divide-se, dando origem a um pequeno número de células idênticas no início do desenvolvimento embrionário. No entanto, a identificação de células com esse potencial em tecidos adultos e a sua aplicação terapêutica são muito mais recentes. Até pouco tempo atrás, acreditava-se que cada tecido adulto tem um tipo próprio de célula precursora, com capacidade limitada de diferenciação. Mais recentemente acumularam-se evidências, em animais e nos humanos, de que células-tronco dos adultos podem romper essas barreiras. Assim, células obtidas de medula óssea poderiam ser utilizadas para reconstituir fígado, sistema nervoso, músculo ou coração, característica que tem sido chamada de plasticidade. Há ainda muito debate se esses resultados são devidos a células embrionárias totipotenciais que sobrevivem nos adultos ou células-tronco tecido-específicas que se transdiferenciam segundo uma nova linhagem quando estimuladas.

Araújo et al. (2005), consideraram que as pesquisas em terapia celular têm se desenvolvido com mais intensidade com células-tronco adultas. As células do sangue do cordão umbilical humano teriam aplicação específica para o próprio recém-nascido e seriam armazenadas para uso futuro, quando necessário. Eventualmente, poderiam ser usadas em gêmeos univitelinos ou em outras pessoas que apresentassem uma tipagem HLA (*Human Leucocyte Antigen*) adequada. Poderiam ser usadas, ainda, em pacientes não compatíveis, simultaneamente com imunossupressores.

Segundo Zago (2002) as células-tronco podem ser classificadas em dois grupos: células-tronco embrionárias e células-tronco do adulto, específicas para cada órgão ou tecido. As embrionárias caracterizam-se pela sua capacidade ampla de originar as demais células do organismo e podem ser obtidas de três formas distintas. A maioria das linhagens de células embrionárias disponíveis é derivada de embriões em fase muito inicial de

desenvolvimento, uma técnica desenvolvida por J. Thomson, da Universidade de Wisconsin.

As células-tronco ideais para a realização de transplantes devem ser imunologicamente inertes, provenientes de fontes de fácil acesso, possuir rápida expansibilidade em cultivo, apresentar capacidade de sobrevivência em longo prazo e de integração no sítio hospedeiro além de serem propícias a transfecção e expressão de genes exógenos (AZIZI et al., 1998).

Um grande número de estudos tem sido realizado com células-tronco de diferentes fontes em diferentes modelos animais de lesão medular, e tentativas terapêuticas até mesmo em humanos, apresentando resultados promissores (IWANAMI et al., 2005; LIM et al., 2007; MACKAY-SIM et al., 2008).

De acordo com Gronthos e colaboradores (2002) a polpa dentária humana é uma fonte de MSC, derivadas da crista neural, recentemente descoberta, e com possibilidades terapêuticas promissoras, possui a capacidade de auto-regeneração, de diferenciação em multi-linhagem e a eficiência clonogênica das células-tronco da polpa dentária em humanos. Eles relataram a capacidade de diferenciação destas células em adipócitos e células nervosas.

Estudos focando as células-tronco do epitélio olfatório especulam sobre o possível potencial de regeneração axonal e cura de doenças desmielinizantes (MARSHALL et al., 2006). Mackay-Sim e colaboradores (2008), após um ensaio clínico de 3 anos com o transplante autólogo de células-tronco do epitélio olfatório em humanos, constatou não haver nenhuma alteração patológica ou formação de tumores após o transplante, embora também não tenham encontrado melhora clínica relevante nos pacientes tratados.

Células-tronco olfatórias têm sido amplamente utilizadas em terapias celulares. Seu acesso, na porção superior da cavidade nasal (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004) é menos invasivo se comparado às cirurgias para obtenção de células-tronco provenientes do bulbo olfatório (OTHMAN, KLUEBER, ROISEN, 2003; DULAC, ZAKHARY, 2004; SKINNER et al., 2005). Destaca-se que o procedimento para acesso dessas células periféricas não afetam o olfato (LU, ASHWELL, 2002; MARSHALL et al., 2006).

Esse tipo de células, presentes no neuroepitélio olfatório, são pluripotentes e apresentam contínua capacidade de regeneração e reposição

de neurônios (ROISEN et al., 2001; DULAC, ZAKHARY, 2004; SKINNER et al., 2005). Essa regeneração relaciona-se a presença de progenitores neuronais (OTHMAN, KLUEBER, ROISEN, 2003). A expansão das células-tronco olfatórias *in vitro* pode gerar populações celulares paciente-específicas para transplantes autólogos, bem como diagnósticos imunológicos, farmacológicos ou genéticos (ROISEN et al., 2001).

Três tipos celulares compõem o epitélio estudado. As células basais, arredondadas e pequenas, situadas entre as células olfatórias e as de sustentação, são células-tronco (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004), pois, segundo Cunningham e Klein (2008), se auto-renovam e possuem um alto potencial proliferativo e de geração de células diferenciadas. São responsáveis pela renovação do epitélio olfatório (SKINNER et al., 2005), reposição de neurônios e células de sustentação (MARSHALL et al., 2006), sendo caracterizadas por intensa atividade mitótica, identificada pela reação positiva ao PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) (ALVES et al., 2007).

A questão da compatibilidade da célula transplantada com o receptor é destacada por Pereira (2008) como um desafio para as terapias com células-tronco. O transplante autólogo das células-tronco olfatórias da cavidade nasal elimina problemas de rejeição ou imunossupressão (LU, ASHWELL, 2002; MARSHALL et al., 2006).

Segundo Lu e Ashwell (2002), as células-tronco olfatórias dão suporte aos axônios olfatórios da lâmina própria até o bulbo olfatório mielinizando axônios desmielinizados ou em regeneração (KRUDEWIG, DESCHL, WEWETZER, 2006). Os autores revelaram que essas células fornecem um substrato muito favorável para a regeneração axonal, pois secretam matriz extracelular e fatores neurotróficos. Sua habilidade de migrar pelo tecido lesado ou já recuperado após o transplante é maior se comparada com outros tipos celulares (AUDISIO et al., 2009).

Os pesquisadores Walton e Wolfe (2008) destacaram que as células-tronco nervosas, de uma maneira geral, são excelentes candidatas para transplantes porque, demonstram repor o tecido nervoso, elaborar fatores tróficos para o resgate de disfunção de neurônios endógenos, inibir inflamações e veicular proteínas terapêuticas de uma forma muito disseminada.

Estudos realizados por Murrell et al. (2009) reportaram o uso de células-tronco olfatórias na lesão dos discos intervertebrais. Dulac e Zakhary (2004) e Marshall et al. (2006) publicaram o sucesso de sua utilização em lesões de medula espinhal. Destaca-se também a possibilidade de utilização dessas células para reparo de lesões cerebrais (DULAC, ZAKHARY, 2004). Zahng et al. (2006) apontaram que além da reposição celular autóloga, as células podem ser empregadas para avaliação de diagnósticos.

As células-tronco olfatórias são classificadas como células-tronco mesenquimais devido a suas propriedades como a capacidade de adesão a superfície plástica da placa de cultivo, morfologia fibroblastóide e a capacidade de diferenciação em multilinhagens (adipócito, condrócito e osteócito, por exemplo). Durante seu crescimento inicial *in vitro*, formam colônias denominadas colônia formadora de unidades de fibroblastos (CFU-f) (SCHUSTER, MARTENS, ITESCU, 2008; BYDLOWSKI et al., 2009).

Células-tronco mesenquimais (MSCs) têm a capacidade de se expandir numerosas vezes em cultura, mantendo seu potencial de crescimento e pluripotencialidade. Sua taxa de crescimento, bem como de expansão e a manutenção do potencial de diferenciação relacionam-se com a densidade de plaqueamento inicial. Estas células apresentam inibição do crescimento por contato, ao atingir a confluência (BYDLOWSKI et al., 2009).

O comprometimento das MSCs em uma dada linhagem específica é enormemente influenciado, *in vitro*, pelas condições de cultura: métodos de isolamento, tipo de superfície da cultura, meio de cultura, densidade de semeadura, tratamento com diferentes fatores de crescimento e produtos químicos. A diferenciação das células pode ocorrer através da interação célula-célula devido à secreção de substâncias, através da divisão celular assimétrica, onde a distribuição dos componentes celulares no momento da citocinese ocorre de forma desigual ou por regulação gênica (BYDLOWSKI et al., 2009).

A grande capacidade de potencial de diferenciação das MSCs, a possibilidade de enxerto, seus efeitos imunossupressores e sua expansão em cultura levaram ao aumento do interesse clínico relativo ao uso destas células. Essas propriedades imunossupressoras relacionam-se a modulação da célula T, e inibição da proliferação, diferenciação e quimiotaxia de células B (BALL et al., 2007). O efeito imunossupressor das CTMs deve-se a falta de alguns

antígenos de histo-compatibilidade (SCHUSTER, MARTENS, ITESCU, 2008) e foi primeiramente observado na ausência de rejeição, quando CTMs geneticamente modificadas eram transplantadas em babuínos (KOLF, CHO, TUAN, 2007).

No acidente vascular cerebral, que, dependendo da dimensão da área cerebral atingida e do tipo de lesão, hemorrágica ou isquêmica, as células-tronco infundidas na área da lesão no cérebro levariam a um repovoamento do tecido necrosado e possível melhora na incapacitação motora (ZHAO et al., 2002; KAJIGUCHI et al., 2007).

Após a lesão tecidual, uma sequência complexa de eventos é desencadeada na tentativa de restaurar a integridade da área lesada. Há formação de coágulo; as plaquetas tornam-se ativadas e liberam fatores de crescimento. O desenvolvimento do processo inflamatório envolvendo as células do sistema imune (neutrófilos, macrófagos e linfócitos) (MARTIN, 1997; TSIROGIANNI, MOUTSOPOULOS, MOUTSOPOULOS, 2006).

Paralelamente à ocorrência da resposta inflamatória, as células endoteliais são ativadas pela lesão vascular e hipóxia tecidual, e mais células do sistema imune são quimio atraídas. Essa quebra na homeostasia tecidual gera um estímulo para a ativação de células-tronco mesenquimais que migram para o local de lesão (TSIROGIANNI, MOUTSOPOULOS, MOUTSOPOULOS, 2006; MEIRELLES, CAPLAN, NARDI, 2008). As MSC podem ser estimuladas pelas células residentes (nicho) a se diferenciar ou secretar fatores solúveis que estimularão outros nichos celulares, estimularão a angiogênese (GUEROUT et al., 2010) ou vão imunomodular as células do sistema imune (MEIRELLES et al., 2008). Dessa forma, quanto mais agudo o processo patológico, ou quanto mais vascularizada a região afetada, mais intensa é a sinalização do nicho e mais efetiva será a resposta das MSCs (FUCHS et al., 2004; MORRISON et al., 2008).

As culturas de MSC podem ser aplicadas *in situ* (no local da lesão) ou por infusão intravenosa (MONTEIRO, ARGOLO NETO, DEL CARLO, 2008), podendo estar diferenciadas ou não. Um inconveniente para a aplicação venosa é a necessidade de grandes quantidades de células por aplicação, visto que muitas se distribuem para locais distantes à lesão principal (MONTEIRO, ARGOLO NETO, DEL CARLO, 2010).

1.5 LACZ E GFP

Um método confiável para o rastreamento de células transplantadas a longo-prazo é o uso de marcadores genéticos como o LacZ e GFP (Green fluorescent protein) (HANNOUCHE et al., 2007). Células transduzidas com o gene que codifica a β -galactosyltransferase (LacZ) podem ser detectadas nos tecidos fixados pela reação com o X-Gal onde ocorre a hidrólise da lactose, decomposição do substrato e liberação de um composto químico azul (YAN et al., 2007).

Em 2003, pesquisadores estabeleceram um modelo experimental de hemorragia intracerebral. Um dia após a indução da lesão foi administrada a quantia de 5×10^6 células em ratos adultos. Análises histoquímicas com X-Gal foram realizadas e os resultados sugeriram que as células transplantadas migraram para as áreas de hematoma. Foi realizado também um controle negativo: animais que receberam o mesmo volume de solução salina para a prevenção de resultados falso positivos (JEONG et al., 2003).

Várias técnicas experimentais são utilizadas para a detecção de células que se proliferam em resposta a lesões. Análises de linhagens retrovirais e ensaios *in vitro* para teste da capacidade neurogênica de subpopulações de células basais enriquecidas são exemplos de procedimentos para identificação de células-tronco olfatórias (DULAC, ZAKHARY, 2004).

A fluorescência exógena das células do epitélio olfatório, permitida pela ação da proteína fluorescente verde (GFP), promove uma marcação celular que facilita sua identificação quando transplantada para hospedeiros. Essa marcação com GFP oferece um modelo útil para análise do potencial terapêutico dos progenitores de epitélio olfatório em doenças degenerativas e neurotraumas (OTHAMN, KLOEBER, ROISEN, 2003).

Células-tronco neuronais reconhecidas pela expressão do gene repórter LacZ puderam ser identificadas em estudos de neuroregeneração do sistema nervoso central de ratos (PARK, TENG, SNYDER, 2002).

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

O presente trabalho propôs um ensaio clínico com objetivo de analisamos o comportamento migratório das células-tronco de epitélio olfatório canino no transplante heterólogo (espécies diferentes) para o modelo coelho de AVC, bem como realizar uma análise comparativa entre essas células e as oriundas de coelhos (transplante alogênico mesma espécie) no que tange a capacidade de resposta a inflamação. Estas células carreando o gene repórter LacZ e GFP facilitou o rastreamento das mesmas. A ausência de trabalhos utilizando marcadores para o rastreamento de células-tronco após o transplante em lesões vasculares encefálicas, aliado a possibilidade de utilização desta terapêutica celular em animais com lesão vascular encefálica.

A utilização de grandes e médios animais, em detrimento de modelos roedores é mais vantajosa para a reprodução de patologias humanas de maneira mais confiável (ZUCCONI et al., 2010). De acordo com Wewetzer et al. (2010), células provenientes de animais como cães, porcos e macacos assemelham-se mais às de humanos do que as células de roedores, no que envolve o controle da proliferação celular, por exemplo.

OBJETIVOS

3 - OBJETIVOS

3.1 GERAL - 1ª PARTE

- Um dos objetivos propostos foi o Levantamento bibliográfico sobre o AVE, o que gerou um artigo de revisão nos seis (6) primeiros meses de execução do mestrado, sobre vascularização encefálica em vertebrados e modelos animais de Acidente Vascular Encefálico (AVE) (The Use of Animal Models for Stroke Research – Review/ Publicado: Comparative Medicine Journal – in press) (Anexos 2);
- Cultivo das células-tronco do epitélio olfatório de cães e coelhos utilizados nesta pesquisa.

3.2 ESPECÍFICO

- Demonstração da viabilidade dos coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) com modelo de AVE para o uso da terapia com células-tronco;
- O uso da fluoroscopia como exame auxiliar na criação do modelo de AVE, determinação e validação de avaliação comportamental, descrição dos parâmetros clínicos e exame histopatológico na lesão induzida.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ARTIGO

Realizamos um levantamento bibliográfico dentro dos primeiros 6 meses no qual gerou um artigo, que foi submetido à Revista Comparative Medicine Journal. Com o auxílio deste artigo pudemos estabelecer uma base fidedigna para a formulação de todo o material e métodos utilizados nesta pesquisa. Em anexo artigo submetido (Anexo 2).

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E JUSTIFICATIVA DO USO DA ESPÉCIE

No desenvolvimento desta pesquisa, foram utilizados 15 coelhos. Todos da raça Nova Zelândia, provenientes da Granja RG Comércio de Produtos Agropecuários Ltda ME-São Paulo-SP, com idade entre seis e oito meses e peso médio de 3 Kg. O experimento foi aprovado pela comissão de bioética e experimentação animal da FZEA (Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos-USP). Estes animais foram divididos em três grupos (controle, transplante de célula-tronco do epitélio olfatório de cão e célula do epitélio olfatório de coelho), todos mantidos em gaiolas individuais, adequadas à espécie, o que facilitou as avaliações e os cuidados pré e pós-operatórios; com isso pudemos assegurar um manejo adequado visando sempre o bem estar animal. Receberam água e alimentação à vontade.

Na indução do AVE em quatro (4) animais, utilizamos a técnica já descrita com a enzima Elastase, em 10 animais a indução com êmbolo e um (1) animal como modelo vascular encefálico (técnica de injeção de látex Neoprene®).

A pesquisa foi realizada de acordo com os “Princípios Éticos na Experimentação Animal”, do COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Optamos por este modelo animal devido ao grande conhecimento acumulado no meio científico sobre a espécie. Hoje podemos destacar que estes se tornaram um dos modelos mais comuns e utilizados em experimentação.

Os Lagomorfos apresentam perfil dócil, de fácil manuseio e facilidade na reprodução. São modelos facilmente encontrados, fazendo com que as pesquisas sejam “universalizadas”. Outro fator que contribuiu para a escolha do modelo desta pesquisa foi o número de citações desta espécie como modelo no decorrer do levantamento bibliográfico.

Os animais adquiridos são de criadores idôneos, o que facilitou a aquisição de exemplares saudáveis, adaptados ao grupo, ao confinamento e com um manejo humanitário e sanitário, o que acarretou num número menor de exemplares necessários. Modelos oriundos de outros lugares poderiam gerar números bem maiores, pois é sabido que fatores como estresse, mudança de ambiente, de nutrição acarreta em óbito uma vez que a sanidade e manejo destes exemplares não seriam confiáveis.

Os animais utilizados ao decorrer da pesquisa foram ortotansados conforme os princípios éticos da utilização de animais para fins de pesquisa, didática e clínica, adaptado pelos termos do COBEA.

Os coelhos utilizados como modelo experimental neste projeto de AVE, também serviram para que pudéssemos confirmar a sobrevivência das células-tronco após transplante, através da técnica de rastreamento dos genes repórteres LacZ e GFP no foco da lesão encefálica. O resultado positivo no rastreamento destas células indica que as mesmas sobrevivem ao processo de transplante, que proliferaram e de fato participaram em um processo de regeneração tecidual, o que possibilitaria o uso desta técnica em futuras pesquisas na área da medicina humana.

4.3 MODELO VASCULAR

Devido à dificuldade de encontrarmos uma referência detalhada da anatomia, distribuição e arranjo dos vasos sanguíneos que irrigam o encéfalo

desta espécie, utilizamos um (1) animal para realização de dissecação. Previamente executamos a técnica de injeção de látex Neoprene® corado de vermelho, via artéria carótida externa. Com bases nestes achados elaboramos um desenho esquemático dos vasos encontrados, que foram minuciosamente dissecados evidenciando seu trajeto, até onde foi possível identificá-los macroscopicamente (Figura 1).

Figura 1 – Desenho Esquemático da vascularização encefálica do coelho. Artéria Carótida Comum (**seta**), Artéria Carótida Externa (**ACE**), Artéria Occipital (**AO**), Artéria Basilar (**AB**), Artéria Maxilar Externa (**AME**), Artéria Lingual (**AL**), Artéria Carótida Interna (**ACI**), Artéria Cerebral Posterior (**ACP**), Artéria Cerebral Média (**ACM**), Artéria Cerebral Anterior (**ACA**), Artéria Cerebelar Superior (**ACS**), Artéria Cerebelar Inferior (**ACBI**), Artéria Tireóidea Superior (**ATS**), Artéria Vertebral (**AV**).

Após a realização da ortotanasia, o animal foi posicionado em decúbito dorsal. Realizamos uma incisão na pele na linha média ventral, começando na laringe e estendendo-se caudalmente até o manúbrio. Incisamos e rebatemos o músculo platíma e tecido subcutâneo. Separamos os músculos esternoióideos pareados ao longo da linha média, expusemos a traquéia, e com isto deixamos expostas as estruturas anatômicas adjacentes, incluindo esôfago, glândula tireóide e seus vasos tireoidianos e nervo laríngeo, tronco vagosimpático, artéria carótida e veia jugular interna. Pudemos ainda observar a veia jugular externa, glândulas salivares submandibulares, músculo miloióideo. Todo procedimento foi devidamente fotodocumentado (Figura 2).

Figura 2 – Região ventral do pescoço do coelho - Artéria Carótida comum (seta), Artéria Carótida Externa (seta), Artéria Carótida Interna (seta), Artéria Occipital (seta), Artéria Maxilas Externa (seta), Artéria Lingual (seta), Músculo Masseter (MA), Músculo Miloióideo (Mi).

4.4 INDUÇÃO DO AVE NOS COELHOS COM ELASTAZE

Após jejum alimentar de 6 horas e hídrico de 2 horas os animais receberam como medicação pré-anestésica (MPA) uma associação de 20 mg/kg de cloridrato de quetamina associada a 5 mg/kg de maleato de midazolam por via intramuscular profunda. A veia auricular direita foi canulada caso fosse necessário um reforço anestésico e para administrarmos fluido (solução fisiológica a 9%) e a artéria auricular esquerda foi canulada para aferirmos a pressão arterial média (PAM). Com o animal entubado e posicionado de forma bastante confortável com a extensão do pescoço o mais ampla possível, mantendo-se em decúbito dorsal, na região cirúrgica realizamos a tricotomia ampla e antisepsia de rotina para o acesso cirúrgico da carótida interna; realizamos uma incisão cutânea longa na margem anterior do músculo esternocleidomastoídeo. Observando sempre o cuidado de promover uma boa hemostasia durante a abordagem do plano subcutâneo e platisma, afastou-se posteriormente o músculo esternocleidomastoídeo, expondo a fáscia carotídea; depois da secção do tronco venoso tireo-língua-facial mobilizou-se a veia jugular interna lateralmente de modo que pudéssemos visualizar melhor a bifurcação carotídea. A dissecação peri-adventicial reduz o risco de lesão dos nervos auricular, vago, frênico e hipoglosso, atenção à cápsula parotídea, esta deve ser observada evitando qualquer lesão a estrutura. A bifurcação carotídea apresentou-se ao cirurgião com uma variabilidade anatômica bastante diversa, no que se refere a sua altura, com relação ao ângulo da mandíbula, como também a posição da carótida interna mais cranial, lateral ou caudal. Constatado o posicionamento da artéria carótida interna, a mesma foi ocluída com auxílio de fio de sutura de seda 7-0 em seguida injetado a enzima Elastase (Sigma – EUA) em formulação de acordo com estudos já realizados por David et al. (2002) na concentração de 5,23 unidades por miligrama, 40,1 mg/mL. Esta enzima foi infundida no lúmen da artéria durante 20 minutos. O fio de sutura de seda 7-0 foi retirado e o fluxo da artéria restabelecido. Após o procedimento do primeiro animal, o orifício

resultante nesta estrutura (artéria carótida interna) foi vedado com cola cirúrgica (Glubran®), já nos outros dois (3) coelhos o próprio organismo suprimiu o sangramento na lesão provocada na artéria. O subcutâneo foi suturado e a pele aproximada com pontos simples separados de Nylon 2-0 (Figuras 3, 4 e 5).

Figura 3 – Centro Cirúrgico do setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ/USP São Paulo, onde induzimos os primeiros animais.

Figura 4 - Animal sendo preparado para o procedimento. Artéria Auricular já canulada (**seta**) para aferirmos a pressão arterial média (PAM), a Veia Auricular canulada para fluído (**seta**) e animal já entubado (**seta**).

Figura 5 – Realização do procedimento AVE com Elastase. Coelho posicionado em decúbito dorsal (A) (seta). Acesso cirúrgico da carótida interna (B) (seta). A artéria carótida foi suturada de forma a obstruir o fluxo da mesma, região caudal e cranial com fio de sutura seda 7-0 (C) (círculo). Com auxílio de uma seringa de insulina injetamos a enzima Elastase diluída a 5,23 unidades por miligrama, 40,1 mg/mL. (D) (seta). A sutura da região cranial da artéria foi liberada com isto a Elastase pode seguir sentido encéfalo (seta), logo após liberamos a região caudal. Notar que houve um extravasamento da mesma (E) (círculo) para vedação do orifício utilizamos cola cirúrgica (Glubran®) (F). Dois animais vieram a óbito logo ao término do procedimento, já os outros dois permaneceram vivos por 24hs.

4.5 FLUOROSCOPIA

O procedimento de indução do AVC foi monitorado pela técnica de fluoroscopia com contraste que permite a visualização dos vasos sanguíneos e contribui para guiar procedimentos cirúrgicos, pesquisa patologias ou observação das funções dinâmicas do organismo (SILVA et al., 2008).

Com a colaboração Instituto do Coração, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor-HCFMUSP) sob orientação do Dr. Celso Kiyochi Takimura, realizamos o exame de fluoroscopia em tempo real. O mesmo protocolo anestésico descrito para a indução de AVE nos coelhos com a Enzima Elastase foi utilizado. Decidimos usar esta técnica por tratar-se de um exame pouco invasivo, menos traumático e estressante para os animais. Com isto obtivemos um resultado bastante satisfatório quanto ao número de animais vivos no pós-operatório, resultado este não alcançado na técnica com Elastase. Os animais após receberem a anestesia tiveram os vasos auriculares canulados, na veia receberam solução fisiológica a 9% continua para garantir a hidratação dos mesmos, e na artéria solução de Pentobarbital Sódico (30mg /kg, diluída em 20mL de solução fisiológica a 9%) sempre que necessário para manutenção da anestesia.

Os animais ainda receberam oxigênio através de máscara devidamente adaptada, tiveram a pressão cardíaca, frequência cardíaca e a saturação de oxigênio aferidas durante todo o procedimento (Figura 6).

Com os animais em plano anestésico realizamos a tricotomia da região cirúrgica, assepsia local, dissecação e canulação da artéria femoral direita; após a fixação da cânula inserimos um cateter guia flexível. Este foi introduzido pela artéria femoral direita, seguiu pela artéria ilíaca direita, aorta abdominal, aorta torácica, arco aórtico, tronco braquiocefálico e tronco bicarotídeo, desse ponto pudemos visualizar a bifurcação das artérias carótidas comum direita e esquerda, identificamos a artéria carótida interna e a rede admirável.

A visualização das artérias cerebrais foi possível após a injeção de solução de contraste iodado (Telebrix Coronar-Guerbet), e percepção das

imagens por meio de fluoroscopia (Fluoroscópio Philips BV Pulsera). O embolo foi provocado após a introdução de um fragmento de espuma de poliuretano através do cateter até a artéria carótida interna. Ao termino do procedimento, realizou-se mais uma injeção de contraste para que pudéssemos nos certificar de que a formação do embolo ocorreu de forma eficaz. Finalizado o procedimento as imagens captadas garantiram o sucesso da realização do modelo de AVE nos coelhos, uma vez que o lúmen desta artéria encontrou-se totalmente obstruído, conseqüentemente sem fluxo sanguíneo o que gerou uma hipóxia local levando esta região a necrose. Em seguida procedemos à ligadura da artéria femoral e a sutura da região.

As injeções de células-tronco foram procedidas da mesma forma seguindo o tempo de 5 minutos de intervalo entre a introdução do material para formação do embolo e a administração das células-tronco.

Figura 6 – Preparo do animal para procedimento com Fluoroscópio (A); Dissecção da artéria femoral direita (B e C); Coelho recebendo oxigênio, artéria e veia auricular canuladas (D); Monitor de pressão cardíaca, frequência cardíaca e a saturação de oxigênio (E); Imagem captada no Fluoroscópio (F), material utilizado para formação do embolo na artéria carótida interna, espuma de poliuretano (G).

4.6 CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS APÓS A INDUÇÃO DO AVE

Logo após a realização do procedimento cirúrgico, os animais receberam antibióticoterapia enrofloxacina (15mg/kg/SID) (esta medicação administrada durante 3 dias após o procedimento) e antiinflamatório não esteroide meloxicam (0,1mg/Kg/SID) (administrado durante 2 dias). Os animais foram acompanhados até o seu total restabelecimento.

Os animais que receberam a Elastase infelizmente não passaram das primeiras 24 horas, mas os demais foram avaliados diariamente, para observação e compilação dos resultados, quanto à condição sensorial e postural dos mesmos.

Buscamos reproduzir fidedignamente um modelo de lesão encefálica semelhante ao AVE causado por um êmbolo. Sabemos que este pode levar a paralisia motora, normalmente em apenas um lado do corpo, sem sensação dolorosa, podendo haver ou não algumas complicações quanto à capacidade em se alimentarem sozinhos. Permanecemos atentos para os cuidados que estas condições poderiam acarretar. Buscamos nos cercar de todos os cuidados para garantir o máximo de conforto a estes animais, no sentido de garantir uma nutrição adequada sempre que necessário. Usamos gaiolas individuais, dessa forma cada animal recebeu atenção de forma individualizada e tratamento de acordo com sua necessidade.

4.7 PROTOCOLO DE EUTANÁSIA

Os coelhos foram anestesiados com 30 mg/kg de cloridrato de quetamina e 2 mg/kg de maleato de midazolam por via intramuscular (IM). Após 15 minutos da aplicação destas drogas, os animais tiveram a veia auricular canulada com cateter 24G. Os animais foram eutanasiados com overdose de tiopental sódico (50 mg/kg) por via intravenosa. A carne destes animais foi descartada, o encéfalo coletado para posteriores avaliações (Macroscópica, histológica e rastreamento do gene repórter LacZ e GFP).

4.8 CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO DO EPITÉLIO OLFATÓRIO DE CÃES E DE COELHOS

Foram utilizadas células-tronco imaturas do epitélio olfatório de cães e de coelhos. A obtenção e cultivo destas duas espécies seguiram o protocolo já preconizado do cultivo de células do epitélio olfatório de ratos. Estas células foram obtidas do trabalho de iniciação científica da aluna **Anna Carolina Mazeto Ercolin** (Aplicação de células-tronco do epitélio olfatório de cães no modelo coelho com acidente vascular encefálico – **Bolsa RUSP Processo nº 2010-2340**) sob orientação do Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio.

Sendo assim, a manutenção, expansão “*in vitro*” e diferenciação, seguiu os protocolos desenvolvidos por essa equipe, que cultivam as células no meio Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM)/Ham’s F12 (1:1, Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA), contendo 15% de soro fetal bovino (FBS, HyClone, Logan, Utah, USA), 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina, 2mM de Lglutamina e 2mM de aminoácidos não essenciais (Figura 7).

Figura 7 – Coleta do Epitélio Olfatório de cão (A, B e C). Coleta do epitélio olfatório de Láparo (coelho) (D, E e F).

4.9 TRANSDUÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO OLFATÓRIAS COM O LENTIVÍRUS CARREANDO OS GENE REPÓRTERES GFP E LACZ

Lentivírus contendo os genes repórteres LacZ e GFP foram produzidos através da transfecção de células 293FT com os respectivos plasmídeos e os de empacotamento. O sobrenadante desta transfecção foi filtrado, aliquotado e estocado em freezer -80°C até o momento do uso.

Duas alíquotas do sobrenadante viral foram descongeladas e adicionadas ao cultivo de células-tronco olfatórias, sendo que o meio antigo foi desprezado. Juntamente ao sobrenadante viral adicionou-se polibreno. Essa substância é usada para redução da tensão superficial que viabilizará a infecção das células em cultivo com os lentivírus.

Nas células transduzidas com o gene repórter LacZ, adicionou-se blasticidina após 48h de incubação. A blasticidina é um antibiótico de seleção que é tóxico para células eucariontes visto que inibe sua síntese de proteínas. O transgene integrado no genoma celular possui um gene de resistência à blasticidina, de modo que toda célula infectada não será destruída. Esse tratamento com antibiótico foi realizado por aproximadamente 10 dias com administração da blasticidina de 3 em 3 dias, para eliminação completa de células não infectadas. Ao final do décimo dia o meio de cultivo foi trocado e observou-se o início da multiplicação das células transgênicas em cultivo.

As células transduzidas com o gene repórter GFP, por sua vez, não possuem o gene de resistência à blasticidina, e sua seleção foi realizada por citometria de fluxo, como descrito a seguir.

4.10 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE EXÓGENO LACZ NAS CÉLULAS-TRONCO TRANSDUZIDAS PREVIAMENTE À IMPLANTAÇÃO NOS ANIMAIS

Para avaliação da expressão do gene repórter LacZ nas células-tronco olfatórias de coelho, o meio de cultura foi removido e a solução de 0,5% de glutaraldeído adicionada sobre as células para a fixação das mesmas. Seguiu-se uma incubação por 15 minutos à temperatura ambiente. A solução foi removida e as células lavadas por três vezes com PBS em intervalos de 5 minutos cada. A solução de X-Gal (X-Gal 1 mg/ml, $K_4Fe(CN)_6$ 5 mM, $K_3Fe(CN)_6$ 5 mM e $MgCl_2$ 1 mM) foi adicionada às células que foram incubadas a 37°C por 1-6 horas. As células coradas foram visualizadas em microscópio de contraste de fase.

4.11 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE EXÓGENO GFP NAS CÉLULAS-TRONCO TRANSDUZIDAS PREVIAMENTE À IMPLANTAÇÃO NOS ANIMAIS

As células-tronco olfatórias de cachorro, na quinta passagem do cultivo, foram submetidas à técnica de citometria de fluxo (FACS – *fluorescence assisted cell sorting*), a fim de avaliarmos a eficácia da transdução separarmos e coletarmos as células positivas (*sorting*), continuando um cultivo com alto grau de pureza da população GFP-positiva.

As análises foram conduzidas em citômetro FACSAria (*Becton, Dickinson and Company*) e analisadas em software FACSDiva Version 6.1.1. A GFP foi excitada com o laser a 488nm (laser azul) e a emissão foi captada pelo filtro 530/30nm. Células não transduzidas foram utilizadas como células controle.

As células foram tripsinizadas, centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos e ressuspendidas em meio de cultivo próprio suplementado com 10% de soro fetal e antibióticos. Foram adquiridas 10.000 células para as análises

estatísticas, e para o *sorting*, foram recuperadas todas as células positivas em cultivo.

As respectivas porcentagens de células positivas estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 – Cultivo das Células-tronco olfatórias de cachorro com gene GFP

	controle	% GFP	% GFP - controle
Cão	0,3	95,4	95,1

4.12 PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO TRANSDUZIDAS PARA TRANSPLANTE NOS ANIMAIS

As células transduzidas em cultivo foram homogeneizadas e centrifugadas a 1000 rpm por 7 minutos. O precipitado celular ressuspendido com PBS e centrifugado a 1000 rpm por 7 minutos. Essa lavagem com PBS foi realizada duas vezes com o intuito de removermos traços de soro fetal bovino (SFB). Após a contagem das células, a quantidade estipulada (1×10^6) foi novamente ressuspendida em 0,5mL de soro fisiológico para que pudéssemos inocular nos animais. Foi realizada apenas uma (1) aplicação diretamente na artéria carótida interna.

4.13 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Os animais foram avaliados de acordo um protocolo adaptado por Takao et al. (2009), utilizando o Teste de Balanço do Corpo Elevado (TBCE) e o teste de Bederson.

Os testes servem para avaliar o grau das lesões encefálicas nos animais. O TBCE promove um parâmetro de assimetria do sistema motor, controlando o animal pela cauda pode-se registrar a direção parcial do balanço do corpo. O teste de Bederson determina a função neurológica. Realizaremos as avaliações

quanto ao comportamento de cada indivíduo no dia seguinte a indução da lesão, estas foram realizadas de acordo com o tempo estipulado de vida para cada animal (Figura 9). Todos os resultados foram compilados nas Tabelas 2, 3 e 4 e filmados para comprovação “on line”.

Figura 9 – Animais alojados individualmente (A e B). Alimentação e água servidos à vontade (C e D). Avaliação comportamental diária, postura corporal e propiocepção (E) e estímulo doloroso (F).

4.14 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

Após a ortotanásia, os encéfalos foram fixados com solução de formoldeído a 10% tamponada. Após a fixação, o encéfalo foi retirado e cortado em series por Metameria. O material foi devidamente fotodocumentado e analisado (Figura 10).

Para análise da expressão do gene repórter LacZ nos encéfalos dos coelhos, o mesmo protocolo de coloração com X-Gal descrito no item 4.10 foi utilizado. Os encéfalos foram fatiados, cortes frontais (coronais), realizados do bulbo olfatório até a região de medula oblonga. Os fragmentos fixados com formaldeído tamponado a 10%; foram lavados com solução de PBS e em seguida mergulhados na solução de X-Gal. Permaneceram imersos por 9 horas, tempo este necessário para que as regiões de lesão encefálica nos animais que receberam células transduzidas com LacZ corassem em azul.

Figura 10 – Encéfalo de coelho sendo retirado da caixa craniana (A). Após a retirada o material foi mensurado e fixado com formaldeído a 10% tamponado, vista ventral (C), vista dorsal (D). O encéfalo foi então fatiado em secções de 2mm de espessura, o material foi então separado de acordo com a região para ser processado histologicamente (B e E). As fatias do encéfalo dos animais lesionados que receberam as células-tronco com o gene LacZ, foram corados com X-Gal (F), destaque para as áreas pigmentadas em azul (**seta**), áreas de lesão onde comprovadamente estas células alojaram-se.

4.15 HISTOLOGIA

Para avaliação histológica do tecido lesionado criamos três (3) grupos distintos:

1) - Cinco (5) encéfalos com lesão mais células-tronco do epitélio olfatório de coelhos (LacZ);

2) - Cinco (5) encéfalos com lesão mais células-tronco do epitélio olfatório de cães (GFP);

3) – Quatro (4) encéfalos com lesão utilizando a enzima Elastase e sem injeção de células-tronco;

Nos dois primeiros grupos os animais permaneceram vivos durante sete (7) dias (168 horas), o terceiro grupo foi mantido por dois (2) dias (48 horas).

Os encéfalos foram processados de modo a manter ao máximo a integridade de suas estruturas originais.

Os fragmentos processados seguiram a seqüência histológica convencional: desidratação em álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Cada fragmento emblocado e cortado com espessura de 5mm em um micrótomo (BEHMER, TOLOSA, FREITAS, 1976).

Realizamos coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) para análise estrutural global. Todo material foi minuciosamente analisado e fotodocumentado.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 COELHOS - NOVA ZELÂNDIA

Esta linhagem de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) como modelo animal reuni condições ideais para a utilização em pesquisas. Bastante acessível, dócil, exige o mínimo de espaço físico e pouca despesa para sua manutenção. Estas seriam condições favoráveis ao uso da raça como modelo animal nas pesquisas de AVE.

Um ponto negativo a ser destacado nesta pesquisa com relação ao uso do modelo coelho, é que alguns indivíduos demonstraram ser sensíveis a manipulação, o que gerou uma condição de estresse altíssimo, considerado por nós, isto para os leporinos de pêlo curto, levando o mesmo a óbito durante os procedimentos.

5.2 VASCULARIZAÇÃO DO COELHO

A vascularização encefálica dos coelhos é semelhante as demais espécies já estudadas por Dellmann e McClure, (1986); Alcântara, (1997) (cães); Dyce, Sack e Wensing (1997); Faria e Prada, (2001); Casal et al. (2005); Ferreira e Prada, (2005); Lima (2006) e Ferreira et al. (2009) (suínos) (Figuras 11 e 12).

Figura 11 – Encéfalo do coelho técnica de injeção de látex Neoprene® vermelho nas artérias. Globo Ocular (GO), Cérebro (C), Cerebelo (CB), Medula Oblonga (MO), Artéria Basilar (seta), Artéria Cerebral Média (seta), Quiasma Óptico (seta), Corpo Mamilar (seta), Infundíbulo Hipofisário (seta).

Figura 12 – Vista Ventral do encéfalo. Medula Oblonga (**MO**), Pirâmides (**seta**), Ponte (**P**), Artéria Basilar (**estrelas**), Artérias Cerebelares Superiores (**Seta**), Corpo Mamilar (**coração**), Lobos Piriformes (**LP**), Infundíbulo Hipofisário (**circulo**), Artérias Cerebrais Medias (**seta**), Quiasma Óptico (**lua**), Globo Ocular (**GO**), Cerebelo (**seta**), Bulbo Olfatório (**seta**), Artéria Cerebelar Inferior (**seta**).

5.3 INDUÇÃO DO AVE NOS COELHOS COM ELASTASE

Em virtude do nosso primeiro levantamento bibliográfico realizado para que pudéssemos estabelecer qual protocolo de indução do AVE seria o mais adequado, optamos pelo uso da enzima Elastase. Este protocolo já foi descrito por David et al. (2002) e tratar-se de um protocolo de fácil execução.

O protocolo foi seguido de acordo com o preconizado pelo autor e colaboradores: dos quatro (4) indivíduos utilizados nesta fase, dois (2) vieram a óbito durante o procedimento e os dois restantes não apresentaram qualquer alteração comportamental durante o período em que permaneceram vivos (24 horas).

Por não apresentar o resultado esperado optamos pela realização de outro protocolo. Desta forma realizamos um levantamento bibliográfico mais detalhado com os principais modelos de AVC já induzidos. Com bases destes resultados geramos um artigo, conseqüentemente fizemos a escolha do modelo de AVC com êmbolo na artéria carótida interna com o auxílio do exame de fluoroscopia.

5.4 FLUOROSCOPIA

A técnica em questão foi escolhida com bases em pesquisas recentes sobre o uso da técnica de fluoroscopia como guia para diversos procedimentos cirúrgicos (SILVA et al., 2008; FERREIRA et al., 2009).

Este exame mostrou-se passível de ser realizado com segurança, apesar de ser algo bastante delicado, porém, absolutamente indicado nas pesquisas relacionadas à vascularização Encefálica. A infusão do meio de contraste positivo preencheu os vasos sanguíneos cerebrais o que proporcionou uma excelente qualidade da imagem radiográfica dos mesmos. Desta forma foi possível a visualização do ponto de origem dos vasos encefálicos, iniciando pelo tronco bicarotídeo com formação das artérias carótidas comum e artérias carótidas internas. A partir deste ponto, foi possível acompanharmos através de

um guia flexível a introdução de um fragmento de espuma de poliuretano na artéria carótida interna, o que gerou um êmbolo causando total obstrução do vaso (Figura 13).

Dos dez (10) animais submetidos a esta técnica dois (2) tiveram a artéria carótida interna direita (ACID) obstruída, juntamente com a artéria vertebral direita (AVD). Estes animais receberam uma aplicação de células-tronco do epitélio olfatório, o primeiro do epitélio olfatório de coelho com o gene LacZ, e o segundo do epitélio olfatório de cão com o gene GFP.

Os oito (8) animais restantes tiveram somente uma das artérias carótidas internas (direita ou esquerda) obstruída e também receberam uma aplicação de células-tronco, quatro (4) do epitélio olfatório coelho com o gene LacZ e quatro (4) células do epitélio olfatório de cães com o gene GFP.

Os animais submetidos à técnica de fluoroscopia tiveram uma excelente recuperação, passaram pelo pós-operatório sem qualquer complicação. Ao exame de comportamento todos apresentaram algum tipo de déficit.

Os dez (10) animais permaneceram vivos por sete (7) dias e durante todo tempo foram monitorados quanto as suas necessidades individuais.

Durante o período em que os animais estiveram vivos, foram avaliados parâmetros comportamentais.

Figura 13 – Fluoroscopia, infusão do meio de contraste positivo preenchimento os vasos sanguíneos cerebrais. Tronco bicarotídeo (**círculo**), formação das artérias carótidas comum e artérias carótidas internas (**seta**) (**A** e **B**). Após o procedimento de introdução do fragmento de poliuretano, formação do embolo e obstrução do vaso (**C**). Destaque para as artérias vertebrais (**seta**) (**D** e **E**), formação do embolo, obstrução parcial (**círculo**).

5.5 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Os testes comportamentais empregados nesta pesquisa foram de fácil aplicabilidade, objetividade e não resultaram em estresse para os animais avaliados. Não exigiram treinamento prévio e foram realizados de forma simples e sem custo. A utilização de múltiplas avaliações fez-se necessária para atender às necessidades de uma avaliação completa dos déficits motores e comportamentais dos animais lesionados. Todos estes parâmetros foram compilados em tabelas (2, 3 e 4 – Anexos 1).

Antes dos procedimentos (AVC), todos os animais apresentaram parâmetros motores e comportamentais dentro da normalidade. Foram capazes de caminhar, alimentaram-se e tomaram água, defecaram e urinaram, realizaram a cecoprofagia e tinham estímulos dolorosos quando testados.

Em relação à postura corporal e propiocepção dos membros os dez (10) indivíduos apresentaram alteração. Os coelhos que tiveram a ACID e a AVD obstruídas apresentaram paraplegia (caracterizada pela perda parcial ou total dos movimentos dos membros torácicos e pélvicos) durante os sete dias em que foram avaliados; dificuldade de comer e beber somente nos dois primeiros dias. Quanto à micção e defecação não apresentaram qualquer alteração. Observamos a total inibição do comportamento de cecoprofagia, um hábito natural e de extrema necessidade para espécie, uma vez que, através dos “cecotrofos” que eles obtêm nitrogênio, minerais, vitaminas e ácidos graxos voláteis essenciais para sua manutenção. Ausência de estímulos dolorosos nos dígitos só foi observada nos dois primeiros dias, ao terceiro dia estes animais já possuíam alguma percepção ao estímulo.

Os oito (8) que tiveram a obstrução na ACI (direita ou esquerda) apresentaram somente propiocepção dos membros pélvicos. Este déficit só foi observado nos dois primeiros dias subseqüentes ao procedimento. Logo no terceiro dia já se comportavam de forma normal.

O grupo que recebeu a enzima Elastase não apresentou nenhuma alteração comportamental ou motora.

Não foi observado em nenhum dos animais, deiscência de pontos na ferida cirúrgica (reação ao fio cirúrgico empregado).

De acordo com a avaliação comportamental não houve diferença no comportamento dos animais que tiveram a ACI (direita ou esquerda) obstruídas, nem entre os dias de avaliação quanto à recuperação das funções dos mesmos. O mesmo resultado foi observado entre os dois (2) indivíduos que tiveram a ACID e AVD obstruídas, ambos apresentaram o mesmo comportamento quanto às disfunções motoras e comportamentais.

5.6 CULTIVO CELULAR (CÃES E COELHOS)

Quanto ao cultivo celular do epitélio olfatório dos cães, obtivemos um resultado positivo quanto à transdução das células com GFP. Obtivemos uma população com aproximadamente 95% de células GFP positivas (Figura 14), e de acordo com citometria de fluxo (Figura 15).

Figura 14 - Fotomicrografias do cultivo de células-tronco de epitélio olfatório de cães transduzidas com GFP. Células de epitélio olfatório de cão após 24 horas do início do tratamento com blastidina (A). Após 48 horas do início do tratamento com blastidina (B). Células após 288 horas do início do tratamento com antibiótico (C e D). Pode-se observar considerável redução na população de células. Décimo sétimo dia Células de epitélio olfatório (E) fotografadas no microscópio de fluorescência (F) Células após 552 horas do início do tratamento com antibiótico. Barra = 20µm.

Figura 15 - Gráficos da citometria de fluxo da linhagem celular do epitélio olfatório de cães. População controle (**A**). Destacando a marcação GFP positiva no gráfico **B**.

As células do epitélio olfatório dos coelhos após o isolamento foram analisadas periodicamente e apresentaram-se aderidas a placa de Petri após aproximadamente cinco (5) dias de incubação. O meio de cultivo composto por DMEMF12 mostrou-se adequado para o desenvolvimento destas células. No cultivo com LacZ realizamos a fixação e adição de X-Gal no décimo sétimo dia, com isso pode-se observar a presença de células expressando o gene exógeno LacZ (Figura 16).

Figura 16- Fotomicrografias células-tronco do epitélio olfatório de coelho em passagem 1, evidenciando sua morfologia fusiforme, semelhante a de fibroblastos, células cultivadas em meio DMEM – F12 (A e B). Células cultivadas em meio Alfa MEM (C e D). Barra = 20µm. No sétimo dia de cultivo com LacZ realizamos a adição de X-Gal observar a presença de células expressando o gene exógeno LacZ, coram em azul (E e F). Barra= 100µm.

5.7 MICROSCOPIA DE LUZ

Nas análises macroscópicas não foram observadas lesões ou alterações no tecido encefálico dos animais avaliados. Observou-se à microscopia óptica, diversas áreas de lesão. Ressaltamos que tivemos como neuropatologista veterinário, o auxílio do Prof. Dr. Paulo Cesar Maiorka do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e zootecnia da USP.

No tecido corado com hematoxilina e eosina não observamos homogeneidade, e sim áreas com vacúolos (grandes buracos brancos). Devemos destacar também a intensa resposta fagocítica bem ilustrada com as células de gitter, resultado da necrose das fibras nervosas.

Neste caso a micróglia assume seu papel fagocítico, fagocitando fragmentos axonais e a bainha de mielina, convertendo a mielina em gordura neutra (JONES, HUNT, KING, 2000; McGAVIN, ZACHARY, 2009). Com isso surgem as células de Gitter ou células xantomatosas, com o citoplasma repleto de gordura. Pudemos evidenciar este resultado em todas as áreas de lesão.

Em todos os animais a principal lesão encefálica ocorreu na região do hipotálamo (Figura 17).

Figura 17 – Microscopia de luz do encéfalo de coelho. Foco de necrose tecidual (A) Barra= 4μm. Área de hemorragia (B) Barra= 20μm. Gliose nodular (C e D) Barra= 20μm e Barra= 40μm. Lesão em hipocampo destaque para extensão da área lesionada no órgão (E Barra= 4μm) Foco de malácia (F) Barra= 20μm.

Já os dois (2) animais que tiveram, a artéria carótida interna direita e a vertebral direita obstruídas, apresentaram extensas áreas de lesão no diencefalo: hipotálamo, epitálamo, hipocampo, algumas áreas menos extensas por tudo o encéfalo incluindo cerebelo.

Foram observadas áreas de hemorragia próximas as áreas de necrose, caracterizando uma área de compressão (Figura 18).

Histologicamente os quatro (4) animais que receberam a enzima Elastase também apresentaram áreas de lesão em hipotálamo. Acreditamos que as lesões neste grupo formaram-se por consequência da obstrução temporária realizada na artéria carótida antes e durante a aplicação da enzima.

Figura 18 – Fotomicrografia de luz do encéfalo de coelho. Parte basal do encéfalo, hipotálamo, área de hemorragia perto da fossa da hipófise (A e B) Barra= 4 μ m e Barra= 10 μ m. Epitálamo, lesão extensa na parte ventricular (C), note como é possível delimitar a área saudável da área lesionada (seta) Barra= 10 μ m. Foco de liquefação (área clara) (D) Barra= 20 μ m. Gliose nodular com a presença de células de gitter (seta) (E). Extensa lesão, área de malácia (F) Barra= 10 μ m.

Pudemos observar na região de lesão encefálica dos animais que receberam as células-tronco do epitélio olfatório de coelho, as células que carregavam o gene LacZ. Após a histologia evidenciamos o citoplasma das células corados em azul, o que nos leva a crer que as células-tronco realmente chegaram ao foco da lesão. Para que pudéssemos afirmar que estas células cujo citoplasma está corado com X-Gal (coloração azulada) fossem realmente as células-tronco injetadas necessitaríamos realizar outros processamentos. A princípio o que podemos garantir é que estas células chegaram ao foco da lesão, pois só o gene LacZ reage com o X-Gal corando então em azul o citoplasma celular (Figura 19).

Figura 19 – Fotomicrografia da lesão encefálica. Região de epitálamo células com gene LacZ coradas em azul (A) Barra= 4μm. Na figura (B) mesma região destacando região de lesão perto de um vaso sanguíneo (seta) Barra= 40μm. Células com o gene LacZ com citoplasma corados de azul (C) Barra= 100μm

No processo histológico dos encéfalos que receberam as células-tronco do epitélio olfatório de cão com o gene GFP (proteína fluorescente verde) não foi possível observamos as áreas de lesão com as células marcadas, porque o sinal GFP não foi suficientemente conservado em parafina, para microscopia de epifluorescência padrão (Figura 20).

Figura 20 – Fotomicrografia fluorescente do encéfalo de coelho. As imagens **A** e **B** são de encéfalos de coelhos que receberam o implante de células-tronco do epitélio olfatório de cão com o gene GFP. Não foi possível observar as áreas de lesão com as células transplantadas, no caso das fotomicrografias só artefatos como hemácias floresceram.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O campo das pesquisas do AVE e do AVC com modelos animais, vem crescendo por todo mundo. Nos últimos anos, o uso de modelos animais no entendimento dos mecanismos fisiopatológicos dessas patologias tem revelado resultados bastante efetivos e promissores. Desta forma, a etiologia da doença tem progredido consideravelmente. É sabido que há vários tipos de AVCs e AVEs humanos, que ainda não foram possíveis de serem mimetizados em modelos animais, para que as pesquisas sejam realizadas são inúmeras as exigências dos comitês de ética em pesquisas com animais. Com isso se faz cada vez mais necessário a identificação de modelos cada vez mais fidedignos aos seus propósitos.

Teocchi (2010) destaca que inúmeras espécies animais já foram e vem sendo utilizadas nas pesquisas sobre AVE e AVC. Os ratos e camundongos, sem dúvida, são os mais utilizados. Como citamos são espécies que geral um gasto mínimo com a manutenção.

Salén, (1995); Reul et al. (1997); Fagundes e Taha, (2004); Wessmann, Chandler, Garosi, (2009) e Teocchi, (2010) ressaltaram que o sucesso de toda pesquisa esta relacionado com a escolha correta do modelo animal. Os pontos negativos e positivos devem ser bem avaliados na hora da escolha. O uso de inúmeros modelos animais (coelhos, ratos, caninos, suínos, ovelhas e espécies de primatas) validos em pesquisas que buscam terapias funcionais para os Acidentes Vasculares.

Os pesquisadores Calabrese, (1991); Salén, (1995); Lynette, (1998) e Joutel et al. (2010) destacaram que, é decisivo que os fenômenos patológicos e o resultado de uma doença ou afecção induzida na espécie testada se pareça com os respectivos fenômenos patológicos na espécie alvo.

Os mecanismos utilizados na indução do AVE em modelos animais são os mais variados possíveis. E impressionante as inúmeras pesquisas fazendo o uso de êmbolos na tentativa de se imitar os AVEs que acometem os seres humanos (MIYAKE, (1993) (humano); FERREIRA et al. (2005) (macacos)).

Entre as causa mais comuns do AVE isquêmico estão a aterosclerose, de acordo com Silva et al. (2008) e Ferreira et al. (2009) a utilização da

arteriografia encefálica tem seu maior valor no diagnóstico de lesões encefálicas. Pode ser considerada padrão de referência no diagnóstico de aneurismas intracranianos, malformações arterio-venosas, oclusões vasculares, vasculopatias (anormalidade da parede dos vasos), neoplasias cerebrais, lesões traumáticas como hematomas subdurais ou epidurais, contusões cerebrais, hematomas intra-cerebrais e fístulas. Os autores descrevem ainda que de acordo com a clareza das imagens adquiridas, fica evidente que todos esses possíveis achados são passíveis de serem localizados e realizados em modelos animais experimentalmente.

A aplicação do exame de fluoroscopia não é uma técnica freqüente na clínica médica de diagnóstico e muito menos na medicina veterinária, sendo mais utilizada no âmbito experimental.

As pesquisas com células-tronco são de enorme interesse entre os pesquisadores, principalmente pelo seu potencial impacto na saúde humana. Tais células são definidas por suas propriedades funcionais, em particular, sua capacidade de autorrenovação, proliferação celular, migração, diferenciação e maturação, importantes fatores na manutenção da maioria das linhagens celulares de um organismo adulto, além de originarem diferentes células progenitoras.

Segundo Jeong et al. (2003); Othamn, Klueber e Roisem, (2003); Hannouche et al. (2007); Yan et al. (2007) o método confiável para o rastreamento de células transplantadas a longo-prazo é o uso de marcadores genéticos como o LacZ e GFP. As células marcadas com LacZ neste experimento puderam ser rastreadas de forma eficaz, já não obtivemos os mesmos resultados com a marcação realizada com o gene GFP. Acreditamos que por tratar-se uma proteína ela acaba se desnaturalizando na hora da fixação. Cabe a nós lermos e buscarmos mais respostas para obtermos um resultado mais satisfatório, quanto ao rastreamento destas células nas lesões.

Chopp e Li, (2002); Zago (2002); Perin, Dohmann e Borojevic, (2003); Wollert, Meyer e Lotz, (2004) descrevem experimentos de modelos animais, fazendo uso de células-tronco na melhora funcional após o AVC. É crescente abordagem das células-tronco na área científica e na mídia (HERZOG, CHAI, KRAUSE, 2003). Um grande número de estudos tem sido realizado com células-tronco de diferentes fontes em diferentes modelos animais em

tentativas terapêuticas até mesmo em humanos, apresentando resultados promissores (IWANAMI et al., 2005; LEE et al., 2007; LIM et al., 2007; MACKAY-SIM et al., 2008).

Hoje o grande número de pesquisas de células-tronco têm se desenvolvido com mais intensidade com células-tronco adultas (ZAGO 2002; GRONTHOS et al., 2002; KORBLING, ESTROV, 2003; ARAÚJO et al., 2005).

Nossos estudos focaram as células-tronco do epitélio olfatório de cães e coelho. Muitos pesquisadores especulam sobre o possível potencial de regeneração axonal e cura de doenças desmielinizantes (ROISEN et al., 2001; LU, ASHWELL, 2002; DULAC, ZAKHARY, 2004; SKINNER et al., 2005; KRUDEWIG, DESCHL, WEWETZER, 2006; MARSHALL et al., 2006; ALVES et al., 2007; MACKAY-SIM et al., 2008; AUDISIO et al., 2009) destas células.

De acordo com as pesquisas relacionadas a células-tronco os autores colocam como sendo células-tronco ideais para a realização de transplantes, as imunologicamente inertes, provenientes de fontes de fácil acesso, possuir rápida expansibilidade em cultivo, apresentar capacidade de sobrevivência em longo prazo e de integração no sítio hospedeiro além de serem propícias a transfecção e expressão de genes exógenos (AZIZI, STOKES, PROCKOP, 1998; LU, ASHWELL, 2002; OTHMAN, KLUEBER, ROISEN, 2003; DULAC, ZAKHARY, 2004; SKINNER et al., 2005; MARSHALL et al., 2006).

Na presente pesquisa realizamos transplantes autólogos, do epitélio olfatório de coelho nas lesões encefálicas de cinco coelhos. Autores destacam esta questão, descrevem que desta forma eliminamos os problemas de rejeição ou imunossupressão (LU, ASHWELL, 2002; MARSHALL et al., 2006; BALL et al., 2007; PEREIRA, 2008; SCHUSTER, MARTENS, ITESCU, 2008).

As aplicações de células-tronco nos animais lesionados foram feitas por via endovenosa. Aproveitou-se o exame de fluoroscopia para administrarmos na artéria carótida interna. Pesquisas discutem que as aplicações poder ser realizadas *in situ* (no local da lesão) ou por infusão intravenosa (DULAC, ZAKHARY, 2004; MARSHALL et al., 2006; ZAHNG et al., 2006; WALTON, WOLFE, 2008; MONTEIRO, ARGOLO NETO, DEL CARLO, 2008; MURRELL et al., 2009) podendo estar diferenciadas ou não. Um inconveniente para a aplicação venosa é a necessidade de grandes quantidades de células por

aplicação, visto que muitas se distribuem para locais distantes à lesão principal (MONTEIRO, ARGOLO NETO, DEL CARLO, 2010).

No acidente vascular cerebral, que, dependendo da dimensão da área cerebral atingida e do tipo de lesão, hemorrágica ou isquêmica, as células-tronco infundidas na área da lesão no cérebro levariam a um repovoamento do tecido necrosado e possível melhora na incapacitação motora (MARTIN, 1997; ZHAO et al., 2002; FUCHS, TUMBAR, GUASCH, 2004; TSIROGIANNI, MOUTSOPOULOS, MOUTSOPOULOS, 2006; KAJIGUCHI et al., 2007; MEIRELLES, CARPLAN, NARDI, 2008; MORRISON, SPRADLING, 2008; SCHUSTER, MARTENS, ITESCU, 2008; BYDLOWSKI et al., 2009; GUEROUT et al., 2010). Resultado este que não pudemos observar, uma vez que os animais permaneceram pouco tempo vivos. Os autores destacam que seria necessário mais de uma semana para que observássemos qualquer começo de diferenciação e repovoamento celular, entretanto, a migração das células para as áreas lesionadas foi comprovada.

Células-tronco neuronais reconhecidas pela expressão do gene repórter LacZ puderam ser identificadas em estudos de neuroregeneração do sistema nervoso central de ratos (PARK, TENG, SNYDER, 2002). Conseguimos observar células nas lesões encefálicas cujo citoplasma corou de azul, ou seja apresentavam o gene LacZ no seu citoplasma.

Várias técnicas experimentais são utilizadas para a detecção de células que se proliferam em resposta a lesões. Análises de linhagens retrovirais e ensaios *in vitro* para teste da capacidade neurogênica de subpopulações de células basais enriquecidas são exemplos de procedimentos para identificação de células-tronco olfatórias (JEONG et al., 2003; DULAC, ZAKHARY, 2004).

O encéfalo normal como não contém um estroma de tecido conjuntivo, tem a consistência de uma massa mole, mas densamente homogênea denominada neuroglia (constituente da maior parte deste órgão). Uma matriz onde podemos encontrar os corpos das células nervosas e as fibras dendríticas e axonais. Microscopicamente nesta massa identificamos dois tipos de tecidos: a substância branca (internamente) e a substância cinzenta, que constitui a camada cortical do cérebro e cerebelo. Microscopicamente quando coramos este órgão com a hematoxilina e eosina, observamos que os neurônios e a glia estão incrustados num fundo de fibrilas entrecruzados que se colore em rosa,

visualmente notamos uma homogenicidade (JONES, HUNT, KING, 2000; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004; McGAVIN, ZACHARY, 2009).

As lesões podem apresentaram as mesmas características, necrose na neuroglia, um processo de liquefação com intenso infiltrado celular (malácia), Lent, (2001) descreveu que a presença em grande quantidade dos astrócitos, nas regiões de lesão do SNC se deve a um constitui, um análogo da reação inflamatória que ocorre em circunstâncias semelhantes em outros tecidos do organismo quando sofrem algum tipo de injúria.

As lesões podem apresentaram as mesmas características, necrose na neuroglia, um processo de liquefação com intenso infiltrado celular (malácia), Lent, (2001) descreveu que a presença em grande quantidade dos astrócitos, nas regiões de lesão do SNC se deve a um constitui, um análogo da reação inflamatória que ocorre em circunstâncias semelhantes em outros tecidos do organismo quando sofrem algum tipo de injúria.

No tecido corado com hematoxilina e eosina não observamos homogenicidade, e sim áreas com vacúolos (grandes buracos brancos). Devemos destacar também a Intensa resposta fagocítica bem ilustrada com as células de gitter, resultado da necrose das fibras nervosas. Resultados estes já descritos por Jones, Hunt e King, 2000; Junqueira e Carneiro, 2004; McGavin e Zachary, 2009.

O diencefalo estende do tronco encefálico até o cérebro e circunda o terceiro ventrículo; inclui o tálamo, hipotálamo, epitálamo e o subtálamo. Segundo Cardenas et al. (2000) e Izquierdo et al. (2006) o hipocampo é uma estrutura bastante acometida durante um AVC ou AVE isquêmico. Uma região muito sensível à privação de energia e que esta relacionada com a memória.

De acordo com os pesquisadores Jones, Hunt e King, 2000; McGavin e Zachary, 2009, em seres humanos, este tipo de evento é freqüente nas arterioscleroses e na hipertensão. É popularmente conhecido como acidente vascular cerebral paralítico. Em animais a arterioscleroses é mais comum, é descrita em diversas espécies (primatas não humanos, suínos, cães e várias aves).

Park, Teng e Snyder, (2002) descreveram as mesmas observações, conseguiram observar células nas lesões encefálicas cujo citoplasma corou de azul, ou seja, apresentavam o gene LacZ no seu citoplasma.

De acordo Jeong et al. (2003); Dulac e Zakhary, (2004) várias técnicas experimentais são utilizadas para a detecção de células que se proliferam em resposta a lesões.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Nos últimos anos, estudos de métodos mais acurados têm identificado riscos não modificáveis bem como modificáveis para os AVEs. A identificação e o controle de fatores de risco visam a sua prevenção primária na população.

Desta forma se faz necessário a utilização de modelos animais com arranjos vasculares encefálicos semelhantes aos estudados em humano, uma vez que estas pesquisas fazem inserções diretas e indiretas dos resultados obtidos com a medicina humana e também com a medicina veterinária.

Como pudemos constatar nas diferentes espécies animais já estudadas os arranjos vasculares diferem, o que os tornam muitas vezes modelos com limitação nas pesquisas relacionadas aos AVEs.

Mesmo com tantas limitações devemos destacar que, a utilização destes modelos, mesmo com certas divergências, tornam-se válidos uma vez que servem de parâmetros para que possamos conhecer melhor o curso desta patologia.

A busca de um modelo que nos ajude a entender os fatores etiológicos, os mecanismos da patologia e seus tratamentos nos trazem a difícil tarefa de padronizar os procedimentos, a sistematização e organização dos conhecimentos sobre as inter-relações que fazemos dos modelos animais utilizados, o que pode proporcionar um avanço mais confiável do conhecimento gerado durante a pesquisa.

Se olharmos todos os fatores intrínsecos que envolvem a escolha de um modelo ideal nas pesquisas com AVE chegaremos à seguinte conclusão; o modelo deve ter características suficientes para ser semelhante ao objeto imitado, ou seja, permitir o estudo dos fenômenos biológicos e de comportamento; fisiologicamente em um ou mais aspectos semelhante aos seres humanos e que após a indução do processo patológico este possa ser investigado e manipulado sem limitações.

Após todas essas observações podemos concluir que o modelo animal ideal nas pesquisas relacionadas ao AVE ainda são os roedores, entretanto, o coelho mostrou-se relativamente positivo para o experimento. São modelos que

preenchem todos os requisitos básicos para que possamos induzir, manipular e tratar patologias que acometem os seres humanos. O que não significa que outros modelos possam ser utilizados em pesquisas semelhantes.

Quanto ao cultivo celular, à transdução *in vitro* das células-tronco do epitélio olfatórias de cães e de coelhos com o vetor lentiviral expressando o gene repórter GFP e LacZ foi eficiente e a população foi expandida em cultivo a uma quantidade suficiente para realização dos subseqüentes testes de caracterização e diferenciação necessários previamente às aplicações terapêuticas, os quais já estão em finalização para células leporinas e finalizados em cães por Flávio Ribeiro Alves e profa. Dra. Maria Angélica Miglino previamente.

A terapia celular (transplante de células) têm se mostrado promissor, com um crescente corpo de evidências pré-clínicos que demonstram a melhora dos resultados funcionais em modelos animais, no entanto, dúvidas ainda permanecem sobre os mecanismos de ação destas células. Os ensaios clínicos estão em andamento e vão aumentar nos próximos anos. As pesquisas nesta área continuam a ser necessárias para o completo entendimento destas terapias de reparação e remodelação do Sistema Nervoso Central.

Podemos concluir, que de fato a terapia celular realizada nos coelhos foi satisfatória. Uma vez que as células fotomicrografadas das lesão com o gene LacZ estavam coradas em azul.

Os resultados iniciais aqui presentes sugerem que o transplante de células-tronco do epitélio olfatório de coelho e de cão, são técnicas que podem ser empregas de forma segura.

No entanto, os dados ainda são preliminares e insuficientes para avaliar a eficácia da administração destas na restauração do tecido encefálico lesionado, confirmando assim, uma resposta funcional e eficiente.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, M. A. **Estudo anatômico da artéria cerebral rostral em Cães (*Canis familiares*, Linnaeus, 1758)** - Origem, trajeto, ramificação e distribuição. 1997. 151 p. Tese (Doutorado em Anatomia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

ALVES, F. R.; SANTOS, T. C.; FREIBERGER, S.; AMBROSIO, C. E.; MIGLINO, M. A. Dinâmica dos precursores celulares do epitélio olfatório de cães sem raça definida: um estudo imunohistoquímico e ultra-estrutural. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 9, p. 388-392, 2007.

ANDRÉ, C. **Manual do AVC**. 2ªed. Rio de Janeiro: Revinter, 2006.

ARAÚJO, J. D.; ARAÚJO FILHO, J. D.; CIORLIN, E.; RUIZ, M. A.; RUIZ, L. P.; GRECO, O. T.; LAGO, M. R.; ARDITO, R. V. A terapia celular no tratamento da isquemia crítica dos membros inferiores. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 4. n. 4. p. 357-65, 2005.

AUDISIO, C.; RAIMONDO, S.; NICOLINO, S.; GAMBAROTTA, G.; DI SCIPIO, F.; MACRI, L.; MONTAROLO, F.; ROBECCHI, M. G. G.; PORPORATO, P.; FILIGHEDDU, N.; GRAZIANI, A.; GEUNA, S.; PERROTEAU, I. Morphological and biomolecular characterization of the neonatal olfactory bulb ensheathing cell line. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 185, p. 89–98, 2009.

AZIZI, S. A.; STOKES, D.; PROCKOP, D. J. Survival, migration and engraftment of bone marrow stromal cells into the striatum of the adult rats. **Experimental Neurology**, v. 153, n. 2, p. 374-375, 1998.

BALL L. M.; BERNARDO M. E.; ROELOFS H.; LANKESTER A.; COMETA A.; EGELER R. M.; LOCATELLI, F.; FIBBE, W. E. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. **Blood**. 2007;110(7):2764-7.

BAPTISTA, A. G. Studies on the arteries of the brain. II. The anterior cerebral artery: some anatomic feature and their clinical implications. **Neurology**, n. 13, p. 825-835, 1963.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E.; FREITAS, A. G. N. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: EDART, 1976. p. 241.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo, Patologia Geral** / editado por: Geraldo Brasileiro Filho – ed. 4ª. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2009. p. 364.

BYDLOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M. F.; JANZ, F. L. Características biológicas das células tronco mesenquimais. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 2009;31(Supl. 1):25-35.

CALABRESE, E. J. Principles of animal extrapolation. Michigan: Ed. Lewis Publishers, 1991.

CAMPOS, A.; PRADA, I. L. S.; SANTOS JUNIOR, I.; SANTOS, D. **Encephalon basis' arteries in horses. Occipito-basilar system.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.v. 40, 2003. Supplement, 2.

CARDENAS, A.; MORO, M. A.; HURTADO, O.; LEZA, J. C.; LORENZO, P.; CASTRILLO, A.; BODELON, O. G.; BOSCA, L.; LIZASOAIN, I. 2000. Implication of Glutamate in the Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase After Oxygen and Glucose Deprivation in Rat Forebrain slices. **Journal Neurochem.** 74, 2041-8.

CARVALHO, S. M. F. **Contribuição da imagem funcional por ressonância magnética para o estudo da reorganização do córtex motor pós-AVCI.** Ribeirão Preto, SP, 2006.

CASAL, D.; ARANTES, M.; CASIMIRO, M. ; PAIS, D. ; PINA, J.A.E. Caracterização morfológica do polígono arterial de Willis no *Canis familiaris*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 100, p. 163-167, 2005.

CHAVES, M. L. F. Acidente vascular encefálico: conceituação e fatores de risco / Stroke: definition and risk factors. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 7, n. 4, p. 372-382, 2000.

CHOPP, M.; LI, Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. **Lancet Neurol** v. 1, p. 92-100, 2002. (Revisão).

CRAMER, S. C.; CHOPP, M. Recovery Recapitulates Ontogeny.**Trends Neurosci.** 2000 Jun;23(6):265-71.

CUNNINGHAM, J. G.; KLEIN, B. G. A célula: origem do tumor e disseminação do câncer. In: falta autora do livro. **Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 50-51

DAVID, F. K.; NAOMI, H. F.; STUART, S. B.; GREGORY, A. H.; HARRY, J. C. Elastase-induced saccular aneurysms in rabbits: a dose-escalation study. **AJNR Am J Neuroradiol**, v. 23, p. 295–298, 2002.

DELLMANN, H. D.; MCCLURE, R. C. Sistema Nervoso Central. In: GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. 5. ed. Guanabara Koogan, 1986. v. 2, p. 1569-1583.

DE VRIESE, B. Sur la signification morphologique des artères cérébrales. **Arch. Biol.** v. 21, p. 357-457, 1905.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 663.

DULAC, C.; ZAKHARY, L. Stem cells of the olfactory epithelium. **Handbook of Stem Cells**, v. 2, p. 233-244. 2004.

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Animal disease model: choice's criteria and current animals specimens. **Acta Cir Bras** [serial online] v. 19, n. 1, Jan-Feb. 2004. Disponível em: <URL: <http://www.scielo.br/acb>>. Acesso em: 20/04/2011

FARIA, M. M. M. D.; PRADA, I. L. S. Anatomical behavior of the basilar artery of buffalo fetuses (*Bubalus bubalis*, Linnaeus, 1758) Revista Brasileira Saúde Prod. v. 1, n. 2, p. 54-60, 2001.

FERNANDO, R. N.; ELEUTERIA, B.; ABDELHADYA, S.; NUSSENZWEIG, A.; ANDÄNGA, M.; ERNFORSA, P. Cell cycle restriction by histone H2AX limits proliferation of adult neural stem cells. Ed. Pasko Rakic, Yale University, **New Haven**. vol. 108. no. 14. P. 5837–5842. 2010.

FERREIRA. C. G. **Origem, trajeto, ramificação e distribuição da artéria cerebral rostral e suínos (*Sus scrofa domesticus* LINNAEUS, 1758)**. 2002. Faltava total de página. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

FERREIRA, G. J.; BRANCO, E.; CABRAL, R.; GREGORES, G. B.; FIORETTO, E.T. SARMENTO, C. A. P.; SILVA, W. F.; LIMA, A. R. L.; MORENO, A. M.; MAIORKA, P. C.; STOPIGLIA, A. J.; MIGLINO, M. A. Avaliação da Técnica de Arteriografia Cerebral Guiada por Fluoroscopia em Suíno . **Sacta Veterinaria Brasilica**, v.3, n.4, p.172-176, 2009.

FERREIRA, C. G.; PRADA, I. L. S. O circuito arterial da base do encéfalo em suínos (*Sus scrofa domesticus* Linnaeus, 1758), formação e comportamento. **Brazilian Journal Res. Animal Scientific**, v. 42, n. 1, p. 53-60, 2005.

FERREIRA, J. R.; LUZ DE ABREU, N. H.; PIRES, J. S.; RIBEIRO, B. N. O sistema carótico do encéfalo de primata neotropical, Anatomia da artéria inter-hemisférica (*Cebus apella*, Linnaeus, 1766). **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 203-212, 2005.

FUCHS, E.; TUMBAR, T.; GUASCH, G. Socializing with the Neighbors: stem cells and their niche. **Cell**, v.116, p.769-778, 2004.
GAVOSI, L. S.; MCCONNELL, J. F. Ischaemic stroke in dogs and humans: a comparative review. **Journal of Small Animal Practice**, v. 46, p. 521-529, 2005.

GRONTHOS, S.; BRAHIM, J.; LI, W.; FISHER, L. W.; CHERMAN, N.; BOYDE, A.; DENBESTEN, P.; ROBEY, P. G.; SHI, S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **Journal of Dental Research**, v. 81, n. 8, p. 531-535, 2002.

GUEROUT, N.; DERAMBURE, C.; DROUOT, L.; BON-MARDION, N.; DUCLOS, C.; BOYER, O.; MARIE, J. P. Comparative Gene Expression Profiling of Olfactory Ensheathing Cells from Olfactory Bulb and Olfactory Mucosa. **GLIA** 58:1570–1580 (2010).

HANNOUCHE D.; RAOULD A.; NIZARD R. S.; SEDEL L.; PETITE H. Embedding of bone samples in methylmethacrylate: a suitable method for tracking lacz mesenchymal stem cells in skeletal tissues. **Journal Histochem Cytochem**. 2007;55:255-62.

HERZOG, E. L.; CHAI, L.; KRAUSE, D. S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**, New York, v. 102, n. 10, p. 3483-3493, 2003.

IWANAMI, A.; KANEKO, S.; NAKAMURA, M.; KANEMURA, Y.; MORI, H.; KOBAYASHI, S.; YAMASAKI, M.; MOMOSHIMA, S.; ISHII, H.; ANDO, K.; TANIOKA, Y.; TAMAOKI, N.; NOMURA, T.; TOYAMA, Y.; OKANO, H.

Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. **Journal of Neuroscience Research**, v. 80, n. 2, p. 182-190, 2005.

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L. R. M.; ROSSATO, J. I.; BONINI, J. S.; SILVA, W. C.; MEDINA, J. H.; CAMMAROTA, M. The Connection Between the Hippocampal and the Striatal Memory Systems of the Brain: a Review of Recent Findings. **Neurotoxicity Research**, 2006, VOL. 10(2). pp. 113-121.

JEONG, S. W.; CHU, K.; JUNG, K. H.; KIM, S. U.; KIM, M.; ROH, J. K. Human Neural Stem Cell Transplantation Promotes Functional Recovery in Rats With Experimental Intracerebral Hemorrhage. **Stroke** 2003;34;2258-2263.

JEWELL, P. A. The anastomoses between internal and external carotid circulations in the dog. **Journal of Anatomy**, v. 86, p. 83–94, 1952.

JOUTEL, A.; MONET-LEPRETRE, M.; GOSELE, C.; BARON-MENGUY, C.; descrever os demais autores Cerebrovascular dysfunction and microcirculation rarefaction precede white matter lesions in a mouse genetic model of cerebral ischemic small vessel disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 2, p. 433-445, 2010.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho respiratório. In: falta autora do livro. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004. p. 339-343.

KAJIGUCHI, M.; KONDO, T.; IZAWA, H.; KOBAYASHI, M.; YAMAMOTO, K.; SHINTANI, S.; NUMAGUCHI, Y.; NAOE, T.; TAKAMATSU, J.; KOMORI, K.; MUROHARA, T. Safety and efficacy of autologous progenitor cell transplantation for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia. **Circ Journal**. 2007 Feb;71(2):196-201.

KOLF, C. M.; CHO, E.; TUAN, R. S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells. Regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Res Ther**. 2007;9(1):204.

KORBLING, M.; ESTROV, Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? **N Engl J Med**. v. 349, p. 570-582, 2003.

KRUDEWIG, C.; DESCHL, U.; WEWETZER, K. Purification and in vitro characterization of adult canine olfactory ensheathing cells. **Cell Tissue Res**. v. 326, p. 687–696, 2006.

LEE, S. T.; CHU, K.; JUNG, K. H.; KIM, S. J.; KIM, D. H.; KANG, K. M.; et al. Anti-inflammatory mechanism of intravascular neural stem cell transplantation in haemorrhagic stroke. **Brain**, 2007.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios** - Conceitos fundamentais de neurociência. Atheneu: São Paulo, 2001.

LESSA, I. Epidemiologia das doenças cerebrovasculares no Brasil. **Revista SOCESP**, v. 9, n. 4, p. 509-518, 1999.

LIM, J. H.; BYEON, Y. E.; RYU, H. H.; JEONG, Y. H.; LEE, Y. W.; KIM, W. H.; KANG, K. S.; KWEON, O. K. Transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dogs. **Journal of Veterinary Science**, v. 8, n. 3, p. 275-282, 2007.

LIMA, E. M. M. **Estudo anatômico das artérias da base do encéfalo em gatos (*Felis catus domesticus*)**. 2004. falta n. de página Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

LIMA, E. M. M.; SEVERINO, R. S.; CARNEIRO E SILVA, F. O.; DRUMMOND, S. S.; BOMBONADO, P. P.; CAMPOS, D. B.; RODRIGUES, G. S. Artérias da Base do Encéfalo em Suínos da Linhagem Camborough. **Biosci. Journal** v. 21, n 2, p. 137- 147, 2005.

LIMA, E. M. M. Estudo anatômico das artérias da base do encéfalo em gatos (*Felis catus domesticus*). **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 22, n. 1, p. 1-7, 2006.

LOIS, C.; GARCÍA-VERDUGO, J. M.; ALVAREZ-BUYLLA, A. (1996) Chain migration of neuronal precursors. **Science** 271:978–981.

LU, J.; ASHWELL, K. Olfactory ensheathing cells- Their potential use for repairing the injured spinal cord. **Spine**, v. 27, n. 8, p. 887-892, 2002.

LYNETTE, A. H. **Responsible conduct with animals in research**. England: Oxford Univ. Press, 1998.

MACKAY-SIM, A.; FERON, F.; COCHRANE, J.; BASSINGTHWAIGHTE, L.; BAYLISS, C.; DAVIES, W.; FRONEK, P.; GRAY, C.; KERR, G.; LICINA, P.; NOWITZKE, A.; PERRY, C.; SILBURN, P. A. S.; URQUHART, S.; GERAGHTY,

T. Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia: a 3-year clinical trial. **Brain**, v. 131, p. 2376-2386, 2008.

MARSHALL, C. T.; LU, C.; WINSTEAD, W.; ZHANG, X.; XIAO, M.; HARDING, G.; KLUEBER, K. M.; ROISEN, F. J. The therapeutic potential of human olfactory-derived stem cells. **Histology and Histopathology**, v. 21, p. 633-643, 2006.

MARSHALL, G. P.; LAYWELL, E. D.; ZHENG, T.; STEINDLER, D. A.; SCOTT, E. W. In vitro-derived "neural stem cells" function as neural progenitors without the capacity for self-renewal. **Stem Cells**, v. 24, n. 3, p. 731-738, 2006.

MARTIN, P. Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v.276, p.75-81, 1997.

McGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da Patologia em Veterinária**. Elsevier Ltda. São Paulo. Ed. 4^o – 2009. p.1504.

MEIRELLES, L. S.; CAPLAN, A. I.; NARDI, N. B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v.26, p.2287-2299, 2008.

MERKLE, F. T.; TRAMONTIN, A. D.; GARCIA-VERDUGO, J. M.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Radial Glia give rise to adult neural stem cell in the subventricular zone. **Proc Natl Acad. Sa USA**-101: 17528-17532, 2004.

MONTEIRO, B. S.; ARGOLO NETO, N. M.; DEL CARLO, R. J. Células tronco mesenquimais. **Ciência Rural** (UFSM. Impresso), v.40, p. 200-208, 2010.

MONTEIRO, B.S.; ARGOLO NETO, N. M.; DEL CARLO, R. J. Terapia celular em reparação óssea – aplicação clínica de células-tronco mesenquimais. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.11, s2, p. 95-100, 2008.

MORRISON, S. J.; SPRADLING, A. C. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance through life. **Cell**, v.132, p.598-611, 2008.

MURRELL, W.; SANFORD, E.; ANDERBERG, L.; CAVANAGH, B.; MACKAY-SIM, A. Olfactory stem cells can be induced to Express chondrogenic phenotype in a rat intervertebral disc injury model. **The Spine Journal**, v. 9, n. 7, p. 585-594, 2009.

NANDA, B. S. (1975) Blood supply to the brain. In: GETTY, R. (Ed.). falta autor **Sisson and Grossman's the anatomy of the domestic animal**. Philadelphia: W. B. Saunders,. 1975. p 1611-1617.

NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKE T-PA STROKE STUDY GROUP. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. **N Engl J Med**. v. 333, p. 1581–1587, 1995.

OLIVEIRA, J. C. D.; CAMPOS, R. Rede admirável epidural rostral e caudal e suas fontes de suprimento sangüíneo em javali (*Sus scrofa scrofa*). **Ciências Rural**, v. 34, n. 3, 2004.

O' SULLIVAN, S. B.; SCHMITZ, T. J. **Fisioterapia: avaliação e tratamento**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2004. 775 p.

OTHMAN, M. M.; KLUEBER, K. M.; ROISEN, F. J. Identification and culture of olfactory neural progenitors from GFP mice. **Biotechnic and Histochemistry**, v, 78, n. 2, p. 57-70, 2003.

PARK, K. I.; TENG, Y. D.; SNYDER, E. Y. The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstitute lost tissue. **Nature Biotechnonology** 20, 1111 – 1117, 2002.

PEREIRA, S.; COELHO, F. B.; BARROS, H. Acidente vascular cerebral: hospitalização, mortalidade e prognóstico. **Acta Med Port** .v. 17, p. 187-92, 2004.

PERIN, E. C.; DOHMANN, H. F. R.; BOROJEVIC, R. SILVA, S. A.; SOUSA, A. L. S. M. D.; MESQUITA, C. T.; ROSSI, M. I. D.; DOHMANN, H. J. F.; SILVA, G. V.; BÉLEN, L.; VIVACQUA, R.; RANGEL, F. O. D.; VAUGHN, W. K. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. **Circulation**, v. 107, p. 2294-302, 2003.

PRADA, I. L. S. **A alma dos animais**. Campos do Jordão: Mantiqueira, 1997. p. 63.

RECKZIEGEL, S. H.; LINDEMANN, T.; CAMPOS, R. A systematic study of the brain base arteries in capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). **Brazil Journal morphology Sci**. v. 18, n. 2, p. 104-110, 2001.

RECKZIEGEL, S. H.; SCHNEIDER, F. L.; EDELWEISS, M. I. A. descrever os demiais autores Anatomy of the caudal cerebral artery on the surface of capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). **Brazil Journal Morphology Sci.** v. 21, n. 3, p. 73-79, 2004.

REUL, J.; WEIS, J.; SPETZGER, U.; KONERT, T.; FRICKE, C.; THORON, A. A long-term angiographic and histopathologic findings in experimental aneurysms of the carotid bifurcation embolized with platinum and tungsten coils. **AJNR Am J Neuroradiol.** v. 18, p. 35–42, 1997.

ROISEN, F. J.; KLUEBER, K. M.; LU, C. L.; HATCHER, L. M.; DOZIER, A.; SHIELDS, C. B.; MAGUIRE, B. A. S. Adult human olfactory stem cells. **Brain Research**, v. 890, p. 11–22, 2001.

RYERSON, S. D. Hemiplegia. In: UMPHRED, D. A. **Neurological rehabilitation**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

SALÉN, J. C. W. Animal models: principles and problems. In: ROLLIN, B. E.; KESEL, M. L. **The experimental animal in biomedical research: care, husbandry and well-being: an overview by species**. 3. ed. Boston: CRC Press, 1995.

SCHUSTER, M. D.; MARTENS, T. P.; ITESCU, S. Células-Tronco Mesenquimais para Reparo Cardíaco. **Revista Brasileira Cardiologia Invas.** 2008;16(1):95-101.

SILVA; L. P.; MAURÍCIO C. L. P.; CANEVARO L. V.; OLIVEIRA P. S. Avaliação da exposição dos médicos à radiação em procedimentos hemodinâmicos intervencionistas. **Radiologia Brasileira**. 2008; 41(5):319–323.

SILVA, R. A.; FERREIRA, J. R. Estudo das artérias cerebelares do macaco-prego. Considerações sobre a nomenclatura (*Cebus apella*, L.1766). **Brazilian Journal Veterinary Res. Animal Science.** v. 39, n. 6. p. 296–300, 2002.

SKINNER, A. P. C.; PACHNICKE, S.; LAKATOS, A.; FRANKLIN, R. J. M.; JEFFERY, N. D. Nasal frontal sinus mucosa of the adult dog contain numerous olfactory sensory neurons and ensheathing glia. **Research in Veterinary Science**, v. 78, p. 9-15, 2005.

TAKAO, Y.; NORIYUKI, M.; KOICHI, H.; MINA, M.; MOHAMMED, M. A.; SEONGJIN, Y.; EUNKYUNG, B.; GUOLONG, Y.; LIN, X.; MICHAEL, M.; KRYS, B.; CASEY, C.; CESARIO, V. B. Borlongan. **Stem Cells and Development**, v. 18, n. 10, p. 1501-1514, 2009.

TANDLER, J. Zur vergleichenden anatomie der Kopfarterien beiden Mammalia. **Denksch. Akad. Wissen.** v. 67, p. 677-784, 1898.

TEOCCHI, M. A. Modelos animais no estudo de AVC. **Revista Eletrônica de Jornalismo Científico**, 2010. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/comciencia/handler.php?section=8&edicao=47&id=561>>. Acesso em: 03/03/2011.

TESTUT, L. **Traité d'anatomie humaine**. 6. ed. Paris: Octave Doin, 1911. v. 2, p. 917-20.

VILLAR, F. A. S. Alterações centrais e periféricas após lesão do sistema nervoso central. considerações e implicações para a prática da fisioterapia. **Rev. Bras. Fisiot.** v. 2, n. 1, 1997.

WALTON, R. M.; WOLFE, J. H. In vitro growth and differentiation of canine olfactory bulb-derived neural progenitor cells under variable culture conditions. **Journal of Neuroscience Methods**, v.169, p.158-167, 2008.

WESSMANN, A.; CHANDLER, K, B.; GAROSI, L. Ischaemic and haemorrhagic stroke in the dog (Review) Science Direct. **The Veterinary Journal**, v.180, p. 290-303, 2009.

WEWETZER, K.; RADTKE, C.; KOCSIS, J.; BAUMGÄRTNER, W. Species-specific control of cellular proliferation and the impact of large animal models for the use of olfactory ensheathing cells and Schwann cells in spinal cord repair. *Exp. Neurol.* (2010), doi:10.1016. **Journal expneurol.**2010.08.029.

WOLLERT, K. C.; MEYER, G.P.; LOTZ, J. descrever os demais autores Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. **Lancet**, v. 364, p. 141-148, 2004.

ZAGO, M. A. Injeções de vida: clonagem e terapia celular. **Revista Pesquisa FAPESP**, n. 73, p. 2-4, 2002. Disponível em:<http://www.revistapesquisa.fapesp.br/Suplemento_Clonagem.pdf>. Acesso em: 19/04/2011

ZHANG, X.; KLUERER, K. M.; GUO, Z.; CAI, J.; LU, C.; WINSTEAD, W. I.; QIU, M.; ROISEN, F. J. Induction of neuronal differentiation of adult human olfactory neuroepithelial-derived progenitors. **Brain Research**, v. 1073-1074 p. 109-119, 2006.

ZHAO, L. R.; DUAN, W. M.; REYES, M.; KEENE, C. D.; VERFAILLIE, C. M.; LOW, W. C. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. **Exp Neurol**. 2002;174(1):11-20.

ZUCCONI, E.; VIEIRA, N. M.; BUENO, D. F.; SECCO, M.; JAZEDJE, T.; AMBROSIO, C. E.; PASSOS-BUENO, M. R.; MIGLINO, M. A.; ZATZ, M. Mesenchymal Stem Cells Derived From Canine Umbilical Cord Vein—A Novel Source for Cell Therapy Studies. **Stem cells and development**. v 19, n 3, 2010.

ANEXOS

Tabela 2: Avaliação comportamental dos animais que receberam células com gene LacZ

Dias	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
Animais LacZ							
1 ACD + AVD	A - 0 B - 0 C - 0 D - 3 E - 0 F - 0	A - 0 B - 0 C - 0 D - 3 E - 0 F - 0	A - 0 B - 0 C - 3 D - 5 E - 0 F - 1	A - 1 B - 1 C - 5 D - 5 E - 0 F - 1	A - 1 B - 1 C - 5 D - 5 E - 0 F - 2	A - 1 B - 1 C - 5 D - 5 E - 0 F - 2	A - 1 B - 1 C - 5 D - 5 E - 0 F - 3
2 ACD	A - 4 B - 4 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5
3 ACD	A - 4 B - 4 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5
4 ACD	A - 4 B - 4 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5
5 ACD	A - 4 B - 4 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5
Valores Atribuídos: Nenhum: 0 Bom: 3 Ótimo: 5							

PARAMETROS AVALIADOS: A – Postura do Corpo; B – Propriocepção dos membros; C – Alimentação/Água; D – Micção/Defecação; E – Cecoprofagia; F – Estimulo de Dor

Tabela 3: Avaliação comportamental dos animais que receberam células com gene GFP

Dias	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
Animais GFP							
1 ACD + AVD	A - 0 B - 0 C - 0 D - 3 E - 0 F - 0	A - 0 B - 0 C - 0 D - 3 E - 0 F - 0	A - 0 B - 0 C - 3 D - 5 E - 0 F - 1	A - 1 B - 1 C - 5 D - 5 E - 0 F - 1	A - 1 B - 1 C - 5 D - 5 E - 0 F - 2	A - 1 B - 1 C - 5 D - 5 E - 0 F - 2	A - 1 B - 1 C - 5 D - 5 E - 0 F - 3
2 ACD	A - 4 B - 4 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5
3 ACD	A - 4 B - 4 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5
4 ACD	A - 4 B - 4 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5
5 ACD	A - 4 B - 4 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5	A - 5 B - 5 C - 5 D - 5 E - 5 F - 5
Valores Atribuídos: Nenhum: 0 Bom: 3 Ótimo: 5							

PARAMETROS AVALIADOS: A – Postura do Corpo; B – Propriocepção dos membros; C – Alimentação/Água; D – Micção/Defecação; E – Cecoprofagia; F – Estimulo de Dor

Tabela 4: Avaliação comportamental dos animais que receberam Enzima Elastase

Dias	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
Animais Elastase							
1 ACD	Óbito						
2 ACE	A – 5 B – 5 C – 5 D – 5 E – 5 F – 5	A – 5 B – 5 C – 5 D – 5 E – 5 F – 5 Óbito					
3 ACD	Óbito						
4 ACD	A – 5 B – 5 C – 5 D – 5 E – 5 F – 5	A – 5 B – 5 C – 5 D – 5 E – 5 F – 5 Óbito					
Valores Atribuídos: Nenhum: 0 Bom: 3 Ótimo: 5							

PARAMETROS AVALIADOS: A – Postura do Corpo; B – Propriocepção dos membros; C – Alimentação/Água; D – Micção/Defecação; E – Cecoprofagia; F – Estimulo de Dor

Decision Letter (CM-10-000127.R2)**From:** rtolwani@rockefeller.edu**To:** ceambrosio@usp.br, cajuvet@uol.com.br**CC:****Subject:** Comparative Medicine - Decision on Manuscript ID CM-10-000127.R2**Body:** @@date to be populated upon sending@@

Dear Dr. Ambrósio:

I am pleased to accept your manuscript entitled "The Use of Animal Models for Stroke Research - A Review" for publication in Comparative Medicine. We look forward to providing timely and efficient assistance to ensure that your work is published at the earliest possible date.

Approximately 6 weeks before the slated publication date, you will be emailed a copyedited version of your original manuscript. This version will also have undergone a final review by the Editor-in-Chief. When you receive the edited version, you may be required to further modify the manuscript to address queries from the Editor-in-Chief, to provide clarifications or additional information, and/or to respond to editorial corrections before publication. After you satisfactorily address these queries and approve the copyedited version of your manuscript, a PDF file of the layout will be sent for your review. At this latter stage, we can accept only minor revisions before publication, and the turnaround time will be necessarily brief to accommodate publication schedules.

If you have not yet done so, please complete the copyright form found in the "instructions and forms" link at the top right of the ScholarOne screen. Please fax (901-334-5152) or email (journals@aalas.org) the completed form to the AALAS editorial office. Contact the AALAS office at 901-754-8620 or email journals@aalas.org if you have any questions between your receipt of this letter and the publication of your paper.

Thank you for submitting your work to Comparative Medicine. On behalf of the Editors of Comparative Medicine, we look forward to receiving additional contributions in the future.

Cordially,

Ravi Tolwani
Comparative Medicine**Date Sent:** 22-Apr-2011 Close Window

The Use of Animal Models for Stroke Research - A Review

Journal:	Comparative Medicine
Manuscript ID:	CM-10-000127.R2
Manuscript Type:	Overviews (review articles)
Date Submitted by the Author:	20-Apr-2011
Complete List of Authors:	Casals, Juliana; Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, University of São Paulo, Surgery Pieri, Naira; Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, University of São Paulo, Surgery Feltosa, Matheus; Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, University of São Paulo, Surgery Ercolin, Anna; São Paulo University, Faculty of Animal Sciences and Food Engineering, Department of Basic Sciences Roballo, Kelly; São Paulo University, Faculty of Animal Sciences and Food Engineering, Department of Basic Sciences Barreto, Rodrigo; Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, University of São Paulo, Surgery Bressan, Fabiana; São Paulo University, Faculty of Animal Sciences and Food Engineering, Department of Basic Sciences Martins, Daniele; São Paulo University, Faculty of Animal Sciences and Food Engineering, Animal Science Miglino, Maria; São Paulo University, Department of Surgery; Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, University of São Paulo, Surgery Ambrósio, Carlos; São Paulo University, Department of Basic Sciences, Faculty of Animal Sciences and Food Engineering
Keywords:	Rabbits < Animal species, Dogs < Animal species, Neurologic diseases (Alzheimer, MS, Parkinson) < Health conditions, Cardiopathy < Health conditions

SCHOLARONE™
Manuscripts

For questions contact journals@aafas.org

Deleted: 04

Deleted: 20

Deleted: /20

Deleted: 04

Formatted: Portuguese (Brazil), Do not check spelling or grammar

Deleted: /2011

Deleted: *avifira*

Deleted: *avifira*

Deleted: *avifira*

Deleted: *avifira*

Deleted: *avifira*

Deleted: *avifira*

Deleted: *avifira*

6/20/2015

Deleted: 04
Deleted: 20
Deleted: 20
Deleted: 04
Formatted: Portuguese (Brazil), Do not check spelling or grammar
Deleted: /2015

23 Abstract

24 Stroke is one of the most studied diseases that affect the central nervous system and has been
25 identified as the second leading cause of death in the world. Stroke can be defined as a focal
26 neurological deficit caused by a change in cerebral circulation. The increased use of animal
27 models in recent years has improved our understanding of the physiopathology of this disease.
28 Rats and mice are the most commonly used stroke models; however, there is an increasing
29 demand for larger models, such as rabbits or even non-human primates, for the purpose of better
30 understanding the disease and its treatment. The basic mechanisms of stroke are considered to be
31 nearly identical among mammals; however, in this review, we discuss the differences among
32 human and animal encephalon models. A comparison among commonly used surgical techniques
33 in animal models is also presented. A more complete anatomical knowledge of the cerebral
34 vessels of different model species is needed to develop more reliable models for objective results
35 that can contribute to a better understanding of the pathology of stroke for both human and
36 veterinary medicine.

Deleted: pathophysiology

38 Introduction

39 The success of stroke studies in animals depends on the choice of the experimental model
40 species. This selection must be rigorous because it is the most important aspect of experiment
41 design. An inadequately chosen model may lead to limitations that compromise results and
42 analyses. Furthermore, the extrapolation of results from animal models to humans can be
43 unreliable (15).

44 Typically, four basic types of animal models are referred to in the medical literature:
45 induced, spontaneous, negative and orphan models. The first two types are the most important

4/20/2011

Deleted: 04

Deleted: 20

Deleted: /20

Deleted: 04

Formatted: Portuguese (Brazil), Do not check spelling or grammar

Deleted: /2011

Deleted: of

Deleted: disease employ genetic variants

Deleted: occur

Deleted: Spontaneous models of human disease employ naturally-occurring genetic variants that.

models. As the name suggests, in induced models, a diseased condition is induced experimentally, as in the induction of diabetes mellitus (54). Spontaneous models, for human diseases, use animal models that naturally present a disease with similar causes and symptoms. Several hundred breeds/strains of inherited diseases have been shown to display similar conditions to those in humans and have, therefore, been characterized and conserved.

Negative models designate a specific disease that inhibits growth, such as gonococcal infection in rabbits, and includes animals that are unable to react when submitted to a specific condition. The most common application of negative models relies on the mechanism of resistance to achieve a clear understanding of the physiological mechanisms.

Orphan models of disease simply describe a condition that happens naturally in non-human species but has not yet been described in humans. An orphan model is adopted when a similar disease is identified in humans (54).

Stroke

Stroke is one of the most prevalent pathologies affecting the central nervous system. Current studies have indicated that stroke has become the second most common cause of death and has an important impact on public health because it is the main cause of physical and cognitive incapacities in developing countries (2, 13, 33).

According to the World Health Organization (WHO), in 2001, stroke was responsible for 5.5 million deaths and 15 million non-lethal brain injuries. The WHO has projected that stroke will be responsible for 6.3 million deaths in 2015 and 7.8 million in 2030 (46, 67).

Stroke lethality is 11% in women and 8.4% in men and is more prevalent among black than whites, especially in the younger age groups (45). The incidence of stroke increases quickly with advancing age. In agreement with Stokes (2000), strokes are relatively rare in people under

4/20/2011

Deleted: 04

Formatted: Portuguese (Brazil), Do not check spelling or grammar

Deleted: 20

Deleted: /20

Deleted: 04

Deleted: /2011

50 years of age. Of all strokes, 88% are ischemic, 9% involve an intracerebral hemorrhage and 3% involve a subarachnoid hemorrhage. The most common type of stroke is atherothrombotic brain infarction, which accounts for approximately 61% of all strokes (excluding transient ischemic attacks). The second most common type of stroke is embolic stroke, at 22% (65). A majority of stroke survivors develop lasting symptoms, such as physical and intellectual limitations, leading to high social costs.

Stroke can be defined as a focal neurological deficit caused by an alteration in circulation in the encephalon. This term has evolved in the last decade to include injuries caused by hemodynamic disturbances and coagulation, which cannot be detected in arteries or veins (70).

Encephalic vascular accident (EVA) is the newest nomenclature referring to cerebrovascular accident (CVA) (56). EVA may occur in four different forms: 1) ischemic and transitory, with decreased blood flow and possible recovery after 24 h; 2) ischemic and complete, with neurologic deficits caused by a vascular disturbance for one day or more that remains stable; 3) progressive, with intermittent increases in deficits caused by embolisms or thrombus and 4) hemorrhagic, with ruptured vessels and blood overflow caused by increased intracranial pressure. The main risk factors of EVA are hypertension, obesity, smoking, sedentary lifestyle, stress and high cholesterol (1).

In ischemic EVA, an interruption in cellular oxidative metabolism decreases phosphate and glucose production, liberates neurotransmitters and decreases levels of calcium and sodium. These factors lead to a reduction in neuronal metabolism and mitochondrial function, energetic insufficiency, formation of arachidonic acid, prostaglandin and leukotrienes, vasoconstriction, plate aggregation and poor microvasculature (16; 27; 30; 44).

4/20/2011

Deleted: 04

Formatted: Portuguese (Brazil). Do not check spelling or grammar

Deleted: 20

Deleted: /20

Deleted: 04

Deleted: /2011

In hemorrhagic CVA, an expansive, acute lesion forms that leads to the destruction, compression and displacement of encephalic structures; a secondary ischemic lesion around the hematoma may also occur (16, 27, 30, 44).

The pathophysiology of cerebral ischemia has been studied in animal models to permit the production of several forms of ischemic lesions. These models have shown that metabolic alterations in reperfusion may lead to cellular lesions in specific regions depending on the duration of the ischemia (16, 27, 30, 44).

According to Villar (63), destruction of regions of the brain is followed by symptoms of alterations in motor activity. Recovery processes begin immediately after the lesion and last for months. Even though the recovery process begins gradually after the development of the lesion, the motor mechanisms present before the lesion will not necessarily be recovered, but the residual mechanisms may adapt, demonstrating neuronal plasticity.

The principal arteries affected by stroke and their clinical symptoms are shown in Table 1. Clinically, several deficiencies are possible, including deficits in motor function, sensitivity, perception and language skills. Motor deficiencies are characterized by paralysis (hemiplegia) or weakness (hemiparesis) on the side of the body opposite the lesion. Strokes vary from mild to serious, and the consequences can be either temporary or permanent (53).

The use of animal models in stroke research

The increasing use of animal models in recent years has provided a better understanding of the pathophysiological mechanisms of strokes, as suggested by Teocchi (60).

4/20/2011

Deleted: 04

Formatted: Portuguese (Brazil), Do not check spelling or grammar

Deleted: 20

Deleted: /20

Deleted: 04

Deleted: /2011

Numerous animal species have been used to study strokes. Mice and rats are the most commonly used models. However, there is a growing demand for larger models, such as rabbits or even non-human primates, to better understand the disease and its treatment protocols.

Unfortunately, the applicability of results obtained with animals to the treatment of human diseases has been limited, as was the case in the applicability of neuroprotection. Neuroprotection is an intervention, sometimes involving drug administration, that acts directly on the intracellular mechanisms of the ischemic cascade to interact with the area around the stroke. Neuroprotection may decrease the size of the compromised area after an acute ischemic process. Several pharmacologic agents have been effective in animal models but not in humans (22, 60).

Most variables are tightly controlled in laboratory experiments; therefore, they may not reflect factors contributing to strokes in the population as a whole. In the laboratory, animals are subjected to a rigid treatment pattern, which is not the case for people. A patient presenting an ischemic process usually takes a long time to notice the symptoms and seek medical assistance. Precise identification of the symptoms provides better treatment options and outcomes (68).

Wessmann et al. (68) observed that another important difference between animal models and humans is the rigorous control of the animal models used in quality studies. Typically, young, healthy, genetically similar animals of the same sex or age groups are used, especially in studies on rodents. However, such homogeneity does not exist in the human population. The typical stroke patient is elderly, with many risk factors, and may have complications of other diseases, such as diabetes, hypertension or coronary disease. Age is a primary risk factor for Stroke pathologies and is usually neglected in studies on animals. The use of older animals can

6/20/2016

Deleted: 04

Formatted: Portuguese (Brazil). Do not check spelling or grammar

Deleted: 20

Deleted: 20

Deleted: 04

Deleted: 2011

135 increase the knowledge obtained on the physical damage caused by strokes and facets of the
136 recovery process that are not well-represented in younger animal models (68).

137 A study involving a group of young rats and a group of older rats was used to verify the
138 reduction in blood volume resulting from a cortical infarction with transient middle cerebral
139 artery occlusion. The results show several differences in young mice, such as the total volume of
140 affected tissue, edema formation and functional consequences (31). It seems that the use of
141 animal models for related studies is preferable, even when differences are reported, because the
142 basic mechanisms of strokes are generally identical in all mammals (31).

143 The success of stroke research requires parallel studies to identify the best animal model
144 for each form of EVA. Therefore, more detailed anatomical knowledge of the encephalic vessels
145 of different species is essential for developing a model that produces reliable results to better
146 understand this pathology.

147 148 *General Encephalic Vasculature*

149 In three databases (Medline: [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>], Lilacs:
150 [<http://regional.bvsalud.org>] and SciELO: [<http://www.scielo.br/>]), the mouse was the most
151 commonly used animal model, followed by rats, rabbits, dogs, swine and primates.
152 Approximately 85% of the articles in Medline and 70.5% of the entries in Lilacs used mice as
153 models (15).

154 According to Prada (48), considering the extensive evolutionary history of animals, a
155 long time was required to construct the brain, and the brain is still undergoing structural changes
156 and evolution. Throughout evolution, the complexity of the organization of the nervous system

4/20/2011

Deleted: 04

Formatted: Portuguese (Brazil). Do not check spelling or grammar

Deleted: 20

Deleted: 20

Deleted: 04

Deleted: /2011

has increased more in simpler animals than animals with a capacity to express elaborate behaviors.

Lima et al. (38) reported that both the encephalon and the arrangement of arterial vessels are in continuous processes of modification, providing a correlation between the evolution of the central nervous system and modifications in the arrangement of encephalic vessels.

The vessels that supply the encephalon constitute the Circle of Willis. These arteries include the anterior cerebral artery, the posterior cerebral artery, the anterior communicating artery and the posterior communicating artery. The vertebral arteries that unite to form the basilar artery are also important to the encephalic blood supply (42).

In domestic animals, a phylogenetic study demonstrated the fascinating arrangements made by multiple arteries constituting the Circle of Willis, although these different morphological features do not necessarily represent evolutionary adaptations (60).

In ancient animals, the internal carotid artery directed blood to the encephalic mass via the posterior branch without the contribution of the basilar artery (8). In other animals, two posterior branches stem from a single and central branch that turns into the branch of the basilar artery. Two tiny vertebral arteries have been described, running from the bottom upward and connecting to the terminal portion of the basilar artery at the border between the pons and bulbous (8).

In the third phase of evolution, the vertebral artery enlarged to feed the basilar artery, conducting blood to the internal carotid artery that is utilized during the development of the anterior portion of the brain. The basilar artery flowed from the bottom to the top, and its two branches increased in volume and continued into the corresponding posterior cerebral arteries. The carotid and basilar arteries are known to be responsible for the blood supply to the brain and

6/30/2011

Deleted: 04
 Formatted: Portuguese (Brazil), Do not check spelling or grammar
 Deleted: 20
 Deleted: 20
 Deleted: 04
 Deleted: 2011

are connected by the posterior branches of the carotid artery that atrophies to form the posterior communicating artery in each antimer.

Regarding the architectural model of the central nervous system of the animal phyla, the ontogenetic studies of Vries (64) showed that the vasculature developmental process followed the evolution of a complex encephalon (8). Despite all of the changes that arterial branches have encountered during encephalon development, their vascular territories have remained constant during the entire evolutionary process.

Encephalic metabolism requires an adequate supply of glucose and oxygen for proper operation, which requires a high rate of blood flow. The encephalon has a peculiar vasculature; vessels enter at several points and are divided into different circulation territories and return to the bilateral carotid arteries and the vertebral-basilar system. These two systems compose a mutual anastomosis, which is not always functional, through the posterior communicating artery, which connects the internal carotid artery (anterior circulation) and the posterior cerebral artery (posterior circulation) (10).

In the anterior circulation, the internal carotid artery has a larger caliber and more distal branches compared to the anterior cerebral, middle cerebral, posterior communicating, anterior choroidal and ophthalmic arteries. In posterior circulation, blood bilaterally reaches the brain via the vertebral arteries, which originate on each side of the posterior inferior cerebellar artery and join the groove level bulbopontine to form the single and medial basilar arteries. These arteries run superior and rostral to the pons to form the bilateral anterior inferior cerebellar, superior cerebellar and posterior cerebral arteries. It has also been shown that by failing to maintain a significant level of anaerobic metabolism, the brain is subject to injury from an interruption in the blood supply for short periods of time (10).

8/20/2015

Deleted: 04

Formatted: Portuguese (Brazil), Do not check spelling or grammar

Deleted: 20

Deleted: 20

Deleted: 04

Deleted: 2015

203

204 *Particularities of Encephalic Vasculature in Animal Models*

205 Among different species, the general arrangement of encephalic arteries is conserved with
 206 some particularities that we discuss below (Table 2 and Figure 1).

207 In humans, the internal carotid artery provides the major blood supply to the encephalon,
 208 but in dogs, the vertebral artery assumes this role. This different model of blood supply with
 209 numerous intra- and extra-cranial anastomoses protects the encephalon of the dog from the
 210 effects of cerebral arterial occlusions. These differences of blood supply in the dog encephalon
 211 explain the underutilization of this animal model in ischemia studies. (25).

212 The branches of arteries that form the arterial circle of the pig encephalon may constitute
 213 two vascular networks: the basal and the cortical vascular networks (17). Ferreira and Prada (17)
 214 classified the branches of the cerebral arteries into three classes: the arteries at the base of the
 215 brain nuclei, the ventricular arteries and the arteries of the convolutions of the cortical gray layer.
 216 The initial portion of the anterior cerebral artery has small branches that supply the basal ganglia.

217 Non-human primates, especially monkeys (64), have demonstrated a similar distribution
 218 of the internal carotid and vertebral arteries to that found in humans. The anterior cerebral
 219 arteries fuse into a unique median branch, which surrounds the genu corporis callosi and
 220 bifurcates distally. The basilar artery bifurcates into the posterior cerebral arteries, which are
 221 connected to the internal carotid posterior communicating artery. In adults, the encephalon is
 222 supplied by both the internal carotid and vertebral arteries, but in embryos, blood is supplied
 223 only by the internal carotid arteries. The internal carotid artery branches from the internal
 224 ophthalmic artery, which pierces the dura mater, and stems from two terminal branches with
 225 different calibers. A posterior branch of the small arms, the posterior communicating artery and

226 the anterior branch all branch into the choroidal artery and middle cerebral artery and finish as
 227 the anterior cerebral artery.

228 In the rostral region of the anastomotic arterial circle at the base of the brain, the
 229 interhemispheric artery proceeds into the longitudinal fissure of the brain dorsal to the genu of
 230 the corpus callosum. The collateral branches are issued from the medial sides of each cerebral
 231 hemisphere from the frontal lobe, and the arteries bifurcate at the corpus callosum to produce the
 232 right and left callosum arteries (18).

233 At the base of the brain of *Cebus apella* (Capuchin), the inferior cerebellar and posterior
 234 inferior cerebellar arteries supply blood to the lower portion of the cerebellum and the lateral
 235 surface of the bulb. Before the bifurcation of the basilar artery to the right and left superior
 236 cerebellar arteries, the superior cerebellar satellites spread to the midbrain, upper stem and
 237 cerebellum (57).

238 Ferreira and Prada (19) found that the encephalic arteries of monkeys are represented by
 239 three branches of the vascular pedicle: the basilar artery, the right internal carotid artery and the
 240 left internal carotid artery. The basilar artery resulted from anastomosis by convergence of the
 241 right and left vertebral arteries. The arterial segments belonging to this system formed a closed
 242 circuit with two distinct sectors: caudal (basilar) and carotid (cranial).

243 Vries (64) classified the encephalic circulation of carnivores into three groups: a group
 244 in which the encephalic blood supply is provided by the internal carotid arteries, a group in
 245 which the encephalic blood supply is provided by the vertebral arteries and a group that with
 246 circulation characteristics of both of these groups. However, these three groups do not show an
 247 evolutionary pattern because similar classifications exist in distant phylogenetic groups.

Deleted: 04

Formatted: Portuguese (Brazil), Do not check spelling or grammar

Deleted: 20

Deleted: 20

Deleted: 04

Deleted: 2011

8/20/2015

Deleted: 04

Formatted: Portuguese (Brazil). Do not check spelling or grammar

Deleted: 20

Deleted: 20

Deleted: 04

Deleted: /2015

Lima (37) showed that the surfaces of the arteries of the dog and cat encephalons were similar and were characterized as the general model of carnivores. The intrinsic arteries follow the model described for sub-mammals and primates. The extrinsic arteries of dogs and cats have some unusual modifications and thus resemble those of some ungulates. Most importantly, there is one major source of arterial blood that supplies the encephalon of cats and dogs, which originates from the maxillary artery and acts as an anastomotic branch for the ~~the~~ admirable.

According to Lima (37), the arteries at the base of the brain in cats are dependent on the carotid and vertebral-basilar systems and are responsible for the formation of the arterial circuit of the encephalon. The rostral portion of the arterial circuit of the encephalon was located across the base, resembling an ellipse, and was closed by the rostral communicating artery. The caudal portion of this circuit had a characteristic morphological asymmetry and proper arrangement for each of the specimens, which did not represent a geometric figure, and it was closed by the caudal branches of the carotid arteries of the brain and the terminal branches of the basilar artery on both sides. The presence of a training network prepared within this circuit was also observed.

In studies of the Circle of Willis in *Canis familiaris*, Casal et al. (11) reported that the caudal communicating artery usually branches into two branches and flows laterally from the rostral to the caudal direction via the caudal artery of the brain and the rostral cerebellar artery. The first of these two communicating branches divides the flow into two distinct parts: the proximal and distal portions of the midbrain.

Animal models versus methods of occlusion induction

The diversity in experimental models represents the necessity for experimental studies on ischemia and prevents the development of a model species for studying surgical techniques. The

5/20/2011

Deleted: 04

Deleted: 20

Deleted: /20

Deleted: 04

Formatted: Portuguese (Brazil), Do not check spelling or grammar

Deleted: /2011

ideal model presents basic prerequisites: clinical relevance, facility of experimental execution and reproduction and avoidance of collateral effects not related to ischemia (7).

Several methods of ischemia induction have been described, such as craniotomy, arterial embolism and occlusion of three or four cervical vessels. The variation in time of ischemia contributes to the diversity of the experimental models utilized. The most utilized method for inducing ischemia is thrombosis by middle cerebral artery occlusion (MCAO)(7). In motor behavior tests, animals presented different degrees of functional defects on the contralateral side of the ischemia. Histologically, this method produces smaller necrotic central and apoptotic peripheral regions (5; 9; 43).

Deleted: MCAO requires an animal model in a size that permits vessel manipulation; therefore, the rat is the smallest model used in this technique (7).

Other techniques, besides MCAO, are utilized to induce stroke in animal models (Table 3). Injection of endothelin-1 (a powerful vasoconstrictor) may affect several microvessels, causing ischemic lesions. In gray matter, endothelin-1 causes small lesions with neuronal and astrocyte losses and a delayed macrophage/microglia response. In white matter, endothelin-1 causes axonal and oligodendrocyte disruption followed by myelin damage and increased astrocyte reactivity.

Embolism caused by injecting different amounts and sizes of emboli (microspheres, black beads, silicone rubber cylinders and preformed clots) into the internal carotid artery produced multiple, unpredictable infarcts. These infarcts were mostly cortical with a few in the basal ganglia and the caudate nucleus, but the subcortical lesions were poorly documented, making their relevance to lacunar infarction uncertain.

MCAO is the most commonly utilized surgical method. By first damaging subcortical structures and then damaging cortical structures, it mimics human striatocapsular infarcts in terms of size and the structures affected. Striatocapsular infarcts affect the majority of the basal

4/20/2011

Deleted: 04

Formatted: Portuguese (Brazil), Do not check spelling or grammar

Deleted: 20

Deleted: /20

Deleted: 04

Deleted: /2011

ganglia or adjacent white matter. Striatocapsular infarcts are caused by occlusion of the transient middle cerebral artery with early reperfusion or, if the occlusion persists, with good collateral flow from the anterior or posterior arteries to the cortical middle cerebral artery territory.

Perforating artery occlusion is a small cortical infarct produced in rats by occluding a cortical pial artery on the brain surface using forceps or photochemical irradiation. Perforating artery occlusions mimic lacunar infarction because they show "cavitation caused specifically by ischemia of smaller vessels"(47). This type of occlusion may result in lenticulostriate artery occlusion by eosinophilic thrombus accompanied by brain tissue softening, necrosis and cyst formation. These lenticulostriate occlusion models all produced striatocapsular sized rather than lacunar-sized lesions.

Another method involves spontaneous lesion formation in transgenic or spontaneously hypertensive stroke-prone animals.

Conclusions

There are several factors required of the ideal model for stroke research. The ideal model should have a sufficient number of features that are similar to those in humans to allow the study of the biological, behavioral and physiological factors of the pathology so that, after the induction of the pathological process, the outcomes can be investigated and treated with minimal limitations.

In summary, the most qualified animal models for research related to stroke are rodents and lagomorphs. These models satisfy all of the basic requirements needed to induce, manipulate and treat diseases that affect humans; however, other models should still be explored in similar studies.

4/30/2014

Deleted: 04

Deleted: 20

Deleted: /20

Deleted: 04

Formatted: Portuguese (Brazil), Do not check spelling or grammar

Deleted: /2011

References

1. Arthur AM, Martins T, Chingui L. 2008. Efeito da estimulação elétrica sobre a plasticidade neural: um estudo em pacientes com déficit sensorial decorrente de acidente vascular encefálico. Effects of electric stimulation in neural plasticity: a study in patients with sensorial deficit by encephalic vascular accident. *Anuário da Produção Científica Discente* 9:79-90.
2. Association NS. Stroke survivors.
3. Atochin DN, Murciano JC, Gursoy-Ozdemir Y, Krasik T, Noda F, Ayata C, Dunn AK, Moskowitz MA, Huang PL, Muzykantor VR. 2004. Mouse model of microembolic stroke and reperfusion. *Stroke* 35:2177-2182.
4. Bailey EL, McCulloch J, Sudlow C, Wardlaw JM. 2009. Potential animal models of lacunar stroke: a systematic review. *Stroke* 40:451-458.
5. Bliss T, Guzman R, Daadi M, Steinberg GK. 2007. Cell transplantation therapy for stroke. *Stroke* 38:817-826.
6. Brown AT, Skinner RD, Flores R, Hennings L, Borrelli MJ, Lowery J, Culp WC. Stroke location and brain function in an embolic rabbit stroke model. *J Vasc Interv Radiol* 21:903-909.
7. Calloni RIC. Modelo experimental de isquemia cerebral em ratos por obliteração temporária da artéria cerebral média. Experimental model of cerebral ischemia in rats by temporary obliteration of middle cerebral artery. *Medicine Surgery*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Formatted: English (U.S.)

Formatted: English (U.S.)

Formatted: English (U.S.)

Formatted: English (U.S.)

6/20/2011

- 339 8. Campos A, Prada H.S, Santos Jr I, Santos D. 2003. Encephalon basis' arteries in
 340 horses. Occipito-basilar system. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal*
 341 *Science* 40:107-117.
- 342 9. Caplan AI. 2007. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus
 343 regenerative medicine. *J Cell Physiol* 213:341-347.
- 344 10. Carvalho SMFd, Araújo DBd. 2006. Contribuição da Imagem Funcional por
 345 Ressonância Magnética para o estudo da Reorganização do Córtex Motor pós-AVC
 346 [Contribution of functional image by magnetic resonance to study of reorganization of
 347 motor cortex after CVA]. *Revista Medicina Ribeirão Preto* 39:311-312.
- 348 11. Casal D, Arentes M, Casimiro M, Pais D, Pina JAE. 2005. Caracterização morfológica
 349 do polígono arterial de Willis no *Canis familiaris* [Morphologic characterisation of Willis
 350 circle in *Canis familiaris*]. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 100.
- 351 12. Chen XW, Todd KG, Yang Y, Gordon T, Shuaib A. 2001. Patency of cerebral
 352 microvessels after focal embolic stroke in the rat. *Journal of Cerebral Blood Flow &*
 353 *Metabolism* 21:413-421.
- 354 13. Doyle P. 2002. Measuring health outcomes in stroke survivors. *Archives of Physical*
 355 *Medicine and Rehabilitation* 83:539-543.
- 356 14. Dyce KM, Sack WO, Wensing C.JG. O Sistema Cardiovascular. *Tratado de anatomia*
 357 *veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- 358 15. Fagundes DJ, Taha MO. 2004. Animal disease model: choice's criteria and current
 359 animals specimens. *Acta Cirurgica Brasileira* 19:59-65.
- 360 16. Farooqui AA, Hann SE, Horrocks LA. Ischemia and Hypoxia. In: Siegel GJ editor.
 361 *Basics Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects*. New York: Raven Press.

Deleted: 04
 Formatted: Portuguese (Brazil), Do not check spelling or grammar
 Deleted: 20
 Deleted: /20
 Deleted: 04
 Deleted: /2011

4/20/2011

Deleted: 04

Formatted: Portuguese (Brazil), Do not check spelling or grammar

Deleted: 20

Deleted: 20

Deleted: 04

Deleted: 2011

17. **Ferreira CG, Prada ILS.** 2005. O circuito arterial da base do encefalo em suínos (*Sus scrofa domestica* Linnaeus, 1758), formação e comportamento [The brain arterial circuit in swine (*Sus scrofa domestica* Linnaeus, 1758), behaviour and formation]. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 42:53-60.
18. **Ferreira JR, Abreu NHLd, Pires JS, Ribeiro BN.** 2005. O sistema carótico do encefalo de primata neotropical, Anatomia da artéria inter-hemisférica (*Cebus apella*, Linnaeus, 1766) [The carotic system of the encephalus from a neotropical primate, anatomy of the interhemispheric artery (*Cebus apella*, Linnaeus, 1766)]. *Ciência Animal Brasileira* 6:203-212.
19. **Ferreira JR, Prada ILS.** 2001. Nomenclatura proposta para denominar as artérias da base do encefalo do macaco-preto (*Cebus apella* L., 1766) [Proposal of anatomical terminology to call the arteries of the base of the encephalon in the monkey (*Cebus apella* L., 1766)]. *Acta Scientiarum* 23:635-643.
20. **Ferreira JR, PRADA ILS.** 2009. The carotid encephalic system of the *Cebus apella* sp., Linnaeus, 1766. *Biota Neotropica* 9.
21. **Fox G, Gallacher D, Shevde S, Loftus J, Swayne G.** 1993. Anatomic variation of the middle cerebral artery in the Sprague-Dawley rat. *Stroke* 24:2087-2092; discussion 2092-2083.
22. **Freitas GR, Noujaim JK, Haussen SR, Yamamoto FI, Novak EM, Gagliardi RJ.** 2005. Neuroproteção no acidente vascular cerebral. [Neuroprotection in cerebral vascular accident]. *Arquivos de Neuro-psiquiatria* 65:889-891.
23. **Frost SB, Barbay S, Mumert ML, Stowe AM, Nudo RJ.** 2006. An animal model of capsular infarct: endothelin-1 injections in the rat. *Behav Brain Res* 169:206-211.

6/20/2015

Deleted: 04
 Formatted: Portuguese (Brazil), Do not check spelling or grammar
 Deleted: 20
 Deleted: 20
 Deleted: 04
 Deleted: 2011

- 1
 - 2
 - 3
 - 4
 - 5
 - 6
 - 7
 - 8
 - 9
 - 10
 - 11
 - 12
 - 13
 - 14
 - 15
 - 16
 - 17
 - 18
 - 19
 - 20
 - 21
 - 22
 - 23
 - 24
 - 25
 - 26
 - 27
 - 28
 - 29
 - 30
 - 31
 - 32
 - 33
 - 34
 - 35
 - 36
 - 37
 - 38
 - 39
 - 40
 - 41
 - 42
 - 43
 - 44
 - 45
 - 46
 - 47
 - 48
 - 49
 - 50
 - 51
 - 52
 - 53
 - 54
 - 55
 - 56
 - 57
 - 58
 - 59
 - 60
- 385 24. Gapon MV, Dranitsyna SM, Minkovich NI, Gruden MA, Babichenko, II, Kostanyan
386 IA. 2006. Experimental model of hemorrhagic stroke: rabbit immunization with HL-60
387 promyelocytic cell differentiation factor. *Bull Exp Biol Med* 141:272-274.
388 25. Garosi LS, McConnell JF. 2005. Ischaemic stroke in dogs and humans: a comparative
389 review. *J Small Anim Pract* 46:521-529.
390 26. Gharbawi OA, Auer RN, Whishaw IQ. 2006. Subcortical middle cerebral artery
391 ischemia abolishes the digit flexion and closing used for grasping in rat skilled reaching.
392 *Neuroscience* 137:1107-1118.
393 27. Homi HM, Silva Jr BA, Velasco IT. 2000. Fisiopatologia da isquemia cerebral.
394 *[Fisiopatologia in cerebral ischemia]. Revista Brasileira de Anestesiologia* 50:405-414.
395 28. Hua R, Walt W. 2006. Minocycline treatment prevents cavitation in rats after a cortical
396 devascularizing lesion. *Brain Res* 1090:172-181.
397 29. Hughes PM, Anthony DC, Ruddin M, Botham MS, Rankine EL, Sablone M,
398 Baumann D, Mir AK, Perry VH. 2003. Focal lesions in the rat central nervous system
399 induced by endothelin-1. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 62:1276-
400 1286.
401 30. Ito U, Spatz M, Walker JT, Jr., Klatzo I. 1975. Experimental cerebral ischemia in
402 mongolian gerbils. I. Light microscopic observations. *Acta Neuropathol* 32:209-223.
403 31. Joutel A, Monet-Lepretre M, Gosele C, Baron-Menguy C, Hammes A, Schmidt S,
404 Lemaire-Carrette B, Domenga V, Schedl A, Lacombe P, Hubner N. 2010.
405 Cerebrovascular dysfunction and microcirculation rarefaction precede white matter
406 lesions in a mouse genetic model of cerebral ischemic small vessel disease. *J Clin Invest*
407 120:433-445.

4/20/2011

Deleted: 04
 Deleted: 20
 Deleted: 20
 Deleted: 04
 Formatted: Portuguese (Brazil), Do not check spelling or grammar
 Deleted: /2011

32. **Lapchak PA.** 2010. Translational Stroke Research Using a Rabbit Embolic Stroke Model: A Correlative Analysis Hypothesis for Novel Therapy Development. *Translational Stroke Research* 1:96-107.

33. **Lessa I.** 1999. Epidemiologia das doenças cerebrovasculares no Brasil [Epidemiology of cerebrovascular diseases in Brazil]. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo* 4:509-518.

34. **Levine S, Payan H.** 1966. Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Exp Neurol* 16:255-262.

35. **Levine S, Shon D.** 1969. Cerebral ischemia in infant and adult gerbils. *Archives of Pathologies* 87:315-317.

36. **Lima EMM, Prada ILS, Silva FOC, Severino RS, Santos ALQ, Borges BO, Paim TP, Vianna ARCB.** 2010. Sistematização da origem, da distribuição e dos territórios da artéria cerebral caudal na superfície do encéfalo em gatos. [Sistemization of origin, distribution and territories of caudal cerebral artery in the encephalous surface in cats]. *Ciência Rural* 40: 1961-1965.

Deleted: EMA
 Deleted: RADA
 Deleted: EVA
 Deleted: EVERINO
 Deleted: ANTOS
 Formatted: English (U.S.)
 Formatted: English (U.S.)

37. **Lima EMM, Prada ILS, Silva FOC, Severino RS, Santos ALQ, Drummond SS, Rodrigues GS.** 2006. Estudo anatômico das artérias da base do encéfalo em gatos (*Felis catus domesticus*) [Anatomic Study of arteries of the base of encephalon in cats (*Felis catus domesticus*)]. *Ars Veterinária* 22:1-7.

38. **Lima EMM, Severino RS, Silva FOC, Drummond SS, Bombonato PP, Campos DB, Rodrigues GS.** 2005. Artérias da Base do Encéfalo em Suínos da Linhagem Camborough 22 [Arteries of the base of the encephalon in pigs from the lineage Camborough 22]. *Bioscience Journal* 21:137-147.

Deleted: d
 Deleted: e

4/30/2011

Deleted: 04
 Formatted: Portuguese (Brazil), Do not check spelling or grammar
 Deleted: 20
 Deleted: 20
 Deleted: 04
 Deleted: 2011

- 1
 - 2
 - 3
 - 4
 - 5
 - 6
 - 7
 - 8
 - 9
 - 10
 - 11
 - 12
 - 13
 - 14
 - 15
 - 16
 - 17
 - 18
 - 19
 - 20
 - 21
 - 22
 - 23
 - 24
 - 25
 - 26
 - 27
 - 28
 - 29
 - 30
 - 31
 - 32
 - 33
 - 34
 - 35
 - 36
 - 37
 - 38
 - 39
 - 40
 - 41
 - 42
 - 43
 - 44
 - 45
 - 46
 - 47
 - 48
 - 49
 - 50
 - 51
 - 52
 - 53
 - 54
 - 55
 - 56
 - 57
 - 58
 - 59
 - 60
- 431 39. Lin JX, Tomimoto H, Akiguchi I, Wakita H, Shibasaki H, Horie R. 2001. White
432 matter lesions and alteration of vascular cell composition in the brain of spontaneously
433 hypertensive rats. *Neuroreport* 12:1835-1839.
- 434 40. Lindner MD, Gribkoff VK, Donlan NA, Jones TA. 2003. Long-lasting functional
435 disabilities in middle-aged rats with small cerebral infarcts. *J Neurosci* 23:10913-10922.
- 436 41. Lozano JD, Abulafia DP, Danton GH, Watson BD, Dietrich WD. 2007.
437 Characterization of a thromboembolic photochemical model of repeated stroke in mice. *J*
438 *Neurosci Methods* 162:244-254.
- 439 42. Machado A. 1988. *Neuroanatomia funcional*. Rio de Janeiro: Atheneu.
- 440 43. Mendez-Otero R, Giraldo-Guimarães A, Pimentel-Coelho PM, Freitas GR. 2009.
441 Cell therapy in strokes. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 31:99-103.
- 442 44. Molinari GF. 1988. Why model strokes? *Stroke* 19:1195-1197.
- 443 45. O'Sullivan SB, Schmitz TJ. 2004. *Fisioterapia: Avaliação e Tratamento*. São Paulo:
444 Manole.
- 445 46. Pereira AB, Alvarenga H, Pereira RS, Jr., Barbosa MT. 2009. [Stroke prevalence
446 among the elderly in Vassouras, Rio de Janeiro State, Brazil, according to data from the
447 Family Health Program]. *Cad Saude Publica* 25:1929-1936.
- 448 47. Pevsner PH, Eichenbaum JW, Miller DC, Pivawer G, Eichenbaum KD, Stern A,
449 Zakian KL, Koutcher JA. 2001. A photothrombotic model of small early ischemic
450 infarcts in the rat brain with histologic and MRI correlation. *J Pharmacol Toxicol*
451 *Methods* 45:227-233.
- 452 48. Prada H.S. 1997. *A alma dos animais [The spirit of the animals]*. Campos do Jordão:
453 Mantiqueira.

6/20/2015

- 454 49. Rogers L. 1947. The function of the circulus arteriosus of Willis. *Brain* 70:171-178.
- 455 50. Rossmeld JH, Jr., Rohleder JJ, Pickett JP, Duncan R, Herring IP. 2007. Presumed
456 and confirmed striatocapsular brain infarctions in six dogs. *Vet Ophthalmol* 10:23-36.
- 457 51. Rowland LP. 2002. *Merritt's Tratado de Neurologia / Merritt's Neurology*. Rio de
458 Janeiro: Guanabara Koogan.
- 459 52. Ruchoux MM, Domenga V, Brulin P, Maciazek J, Limol S, Tournier-Lasserre E,
460 Joutel A. 2003. Transgenic mice expressing mutant Notch3 develop vascular alterations
461 characteristic of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and
462 leukoencephalopathy. *Am J Pathol* 162:329-342.
- 463 53. Ryerson SD. Hemiplegia. In: UMPHRED DA editor. *Neurological Rehabilitation*. Rio
464 de Janeiro: Guanabara Koogan.
- 465 54. Salén JCW. Animal models: principles and problems. In: ROLLIN BE, and KESEL ML
466 editors. *The experimental animal in biomedical research: care, husbandry and well-
467 being: an overview by species*. Boston: CRC Press.
- 468 55. Shibata M, Ohtani R, Ihara M, Tomimoto H. 2004. White matter lesions and glial
469 activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* 35:2598-
470 2603.
- 471 56. Silva LLM, Moura CEM, Godoy JRP. 2005. Fatores de risco para o acidente vascular
472 encefálico. *Universitas Ciências da Saúde* 3:145-160.
- 473 57. Silva RAd, Ferreira JR. 2002. Estudo das artérias cerebelares do macaco-prego.
474 Considerações sobre a nomenclatura (*Cebus apella*, L.1766) [Study of the cerebellar
475 arteries of the capuchin monkey. Considerations on the nomenclature (*Cebus apella*, L.
476 1766)]. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 39:296-300.

Deleted: 64

Deleted: 30

Deleted: /20

Deleted: 64

Formatted: Portuguese (Brazil), Do not check spelling or grammar

Deleted: /2011

Deleted: Merritt TT

Deleted: e Neurologia

Deleted: Tratado e Neurologia

Deleted: "macaco-prego"

6/20/2014

58. Siqueira Neto EGB, Ferreira JR. 2002. Estudo anatômico da origem e distribuição dos ramos corticais das artérias cerebrais caudais do encefalo do macaco p~~re~~go. [Anatomic study of origin and distribution of cortical branch of caudal cerebral arteries of capuchin monkey encephalon] *Acta Scientiarum Biological Sciences* 2002:639-646.
59. Sironi L, Guerrini U, Tremoli E, Müller I, Gelosa P, Lascialfari A, Zucca I, Eberini I, Gemeiner M, Paoletti R, Gianazza E. 2004. Analysis of pathological events at the onset of brain damage in stroke-prone rats: a proteomics and magnetic resonance imaging approach. *J Neurosci Res* 78:115-122.
60. Teocchi MA. 2009. Modelos animais no estudo de AVC [Animals models in study of VCA]. *Revista Eletrônica de Jornalismo Científico*.
61. Testut L. 1911. *Traité d'anatomie humaine: anatomie descriptive, histologie, développement*. Paris: Octave Doin.
62. Toshima Y, Satoh S, Ikegaki I, Asano T. 2000. A new model of cerebral microthrombosis in rats and the neuroprotective effect of a Rho-kinase inhibitor. *Stroke* 31:2245-2250.
63. Villar FAS. 1997. Alterações centrais e periféricas após lesão do sistema nervoso central. Considerações e implicações para a prática da fisioterapia. [Central and peripheral alterations after lesion of central nervous system. Considerations and implications for practice of physiotherapy]. *Revista Brasileira de Fisioterapia* 2.
64. Vriese Bd. 1905. Sur la signification morphologique des artères cérébrales. *Arch Biol* 21.
65. Wang-Fischer Y. 2009. *Manual of stroke models in rat*. CRC Press.
66. Wang K, Walz W. 2003. Unusual topographical pattern of proximal astroglia around a cortical devascularizing lesion. *J Neurosci Res* 73:497-506.

Deleted: 04
 Deleted: 20
 Deleted: 20
 Deleted: 04
 Formatted: Portuguese (Brazil), Do not check spelling or grammar
 Deleted: 2011
 Formatted: English (U.S.)

5/20/2011

Deleted: 04

Formatted: Portuguese (Brazil). Do not check spelling or grammar

Deleted: 10

Deleted: 10

Deleted: 04

Deleted: 1011

- 500 67. Warlow C, Sudlow C, Dennis M, Wardlaw J, Sandercock P. 2003. Stroke. *Lancet*
- 501 362:1211-1224.
- 502 68. Wessmann A, Chandler K, Garosi L. 2009. Ischaemic and haemorrhagic stroke in the
- 503 dog. *Vet J* 180:290-303.
- 504 69. Whitehead S, Cheng G, Hachinski V, Cechetto DF. 2005. Interaction between a rat
- 505 model of cerebral ischemia and beta-amyloid toxicity: II. Effects of triflusal. *Stroke*
- 506 36:1782-1789.
- 507 70. Winikates J. Doenças vasculares [Vascular disease]. In: Rolak L editor. *Segredos em*
- 508 *neurologia [Secrets in neurology]*. Porto Alegre: Artmed.
- 509
- 510

5/20/2014

511 Table 1 – Major human arteries and specific clinical symptoms produced after stroke.

Arteries	Clinical symptom
Anterior cerebral artery	Contralateral hemiparesis, more severe in lower limb Contralateral sensorial losses Functional alterations in bladder and anal sphincter Mental manifestations Behavior alterations (frontal lobe stroke)
Middle cerebral artery	Aphasia (dominant hemisphere lesion) Contralateral hemiplegia and/or hemiparesis Homonymous hemianopsia Apraxia Alexia
Posterior cerebral artery	Thalamic sensorial syndrome Memory disorders (bilateral lesion) Homonymous hemianopsia Anton syndrome Cortical blindness associated with agnosia (bilateral lesion) Dyslexia without agraphia Hemiplegia Ataxia
Internal carotid artery	Contralateral hemiplegia with hemiparesis and aphasia (dominant hemisphere lesion) Retinal ischemia with numbness or blindness in ipsilateral eye Unconsciousness at the time of occlusion
Basilar artery	Contralateral hemiplegia or tetraplegia Facial paralysis Dysarthria and diaphasia Horn's homolateral syndrome Loss of consciousness and vertigo
Vertebrobasilar artery	Signs of cranial nerve injury and ipsilateral cerebellar connections with contralateral sensory and motor signals Weber Syndrome (midbrain lesion) Ipsilateral paralysis of the common oculomotor nerve Contralateral hemiplegia

512

Deleted: 04

Formatted: Portuguese (Brazil). Do not check spelling or grammar

Deleted: /20

Deleted: 20

Deleted: 04

Deleted: /2011

Deleted: in the

Deleted: contralateral

4/20/2011

Table 2 – Relation of the encephalic regions supplied by the major encephalic arteries and their branches.

Major artery	Artery branched of major artery	Region vascularized	Ref.
Monkey			
Internal carotid artery	ACC ACP	Temporal region and occipital and parietal regions of optic chiasm (ACC and ACP) Olfactory lobe (ACP)	(18,
Basilar artery	ACC		20,
	ACP		58)
	ACE (forked MCA and ACR or triforked MCA, ACR and ACC)		
Human			
Internal carotid artery	MCA	frontal lobe to the parieto-occipital sulcus (ACA)	(42,
Basilar artery	ACA	superolateral face of hemispheres (MCA).	49,
Posterior cerebral artery	ACP	Midbrain, occipital and temporal lobe (ACP)	51,
Anterior cerebral artery	ACOA		61)
Rat			
	ACOP		
	HTA		
Internal carotid artery	ACHA	lateral surface of the olfactory tract and cerebral cortex (MCA)	(21,
	MCA		65)
Basilar artery	ACA	posterior portion of the arterial Circle of Willis of the brain (ACOP)	
	ACP		
	AV		
Posterior cerebral artery	ACOP		
Rabbit			
Internal carotid artery			
Basilar artery	ACP		
Posterior cerebral artery			
Anterior cerebral artery			
Gerbil			
Internal carotid artery			(34,

Deleted: 04

Deleted: 20

Deleted: /20

Deleted: 04

Formatted: Portuguese (Brazil), Do not check spelling or grammar

Deleted: /2011

Deleted: f

4/26/2011

Deleted: 04

Deleted: 20

Deleted: /20

Deleted: 04

Formatted: Portuguese (Brazil), Do

not check spelling or grammar

Deleted: /2011

Basilar artery			35)
Posterior cerebral artery			
Anterior cerebral artery	united		
Cat			
Internal carotid artery	ACOP		
	MCA		
	AC rostral	Rostral colliculus bodies, middle cerebral pedunculus,	(36,
	ACC (Tectal rostral artery and	choroid plexus, third ventricle and mammillary body	37)
Basilar artery	caudal branch forked)	(ACC)	
	AV		
Dog			
Internal carotid artery	-MCA		
	-ACR		
	-ACC		
	Anterior and posterior cerebellar	Occipital lobus (AV).	(4,
	artery	Lateral parts of hemispheres (MCA).	14)
Basilar artery	(Basilar Artery <u>With Vertebral</u>		
	Anastomosis)		

Deleted: With Vertebral

3 ACA: Anterior Cerebral Artery; ACC: Caudal Cerebral Arteries; ACE: Encephalon Carotid Artery; ACHA: anterior choroidal artery

4 ACOA: Anterior Communicating Artery; ACOP: Posterior Communicating Artery; ACP: Posterior Cerebral Artery; ACR: Cerebral

5 Artery Rostral; AV: Vertebral Artery; HTA: Hypothalamus Artery; ICA: Internal Carotid Artery; MCA: Middle Cerebral artery;

6 PCA: Posterior Cerebral Artery.

4/20/2014

Deleted: 04

Deleted: 20

Deleted: /20

Deleted: 04

Formatted: Portuguese (Brazil). Do not check spelling or grammar

Deleted: /2011

1 Table 3 – Major methods of stroke induction in different animal models

Induction Method	Specie	Age/ Comorbidity	Infarct Size
Embolism			
Preformed fibrin clot into right ICA	Rat	Unknown	Unknown (12)
Fibrin microemboli	Mice	Adult	<40 mm ³ UK (3)
Photocoagulation of ICA	Mice	Range	7-15% brain volume (41)
Use of small clot	Rabbit	Unknown	Unknown (32)
single clot injection in ICA	Rabbit	Unknown	Greater stroke volume in ACA; greater percentage of stroke occurrence in MCA (6)
MCAO			
Intraluminal thread of MCAO	Rat	Adult	4-27% hemisphere (40)
	Rat	Adolescent	Percent of 3 structures damaged (26)
Perforating artery Occlusion			
Cortical photocoagulation	Rat	Adult	1.7- to 4.2-mm depth (47)
Cortical pial vessel crush	Rat	Adult	1629+-261 μ m diameter (66)
	Rat	Adult	1.09 mm ³ (28)
Endothelin-1 (ET-1) injection			
ET-1 injection (striatum and subcortical WM)	Rat	Adult	17.5 μ l/20 μ m ² (29)
ET-1 injection (striatum)	Rat	Unknown	Unknown (23)
ET-1 injection (internal capsule)	Rat	Unknown	~500 μ M diameter (69)
Spontaneous Stroke			
Naturally occurring strokes in SHRSP	Rat	Range + hypertension	Unknown (39; 59)
Naturally occurring strokes	Dog	Range	Unknown (25)
Naturally occurring strokes	Dog	Range	9-21 mm diameter (50)
Miscellaneous			
2 injections of sodium laurate into ICA	Rat	Adult	8% of slice area (62)
Genetic model of CADASIL	Mice	Range	0.2-0.6 μ m (52)
Bilateral carotid artery occlusion	Mice	Adolescent	Unknown (55)
Immunization with HL-60 Promyelocytic Cell Differentiation Factor	Rabbit	Unknown	Unknown (24)

2 ICA: internal carotid artery; ACA: anterior cerebral artery; MCA: middle cerebral artery

5/30/2014

Deleted: 04

Formatted: Portuguese (Brazil). Do not check spelling or grammar

Deleted: 20

Deleted: /20

Deleted: 04

Deleted: /2011

Figure Legends

Figure 1 – Rabbit encephalon injected with latex to show arterial vasculature (left) (Figure A and B) and a schema of the same vasculature (right) (Figure C). The origin of the inferior cerebellar artery in primates and humans is the vertebral artery, while in rabbits the origin is the basilar artery (star). The presence of the lower anterior cerebellar artery (filled arrow) and the superior cerebellar artery (arrow) in rabbits was observed as described by Andrade (1983) in rodents.

Figure 1 – Rabbit encephalon injected with latex to show arterial vasculature (left) (Figure A and B) and a schema of the same vasculature (right) (Figure C). The origin of the inferior cerebellar artery in primates and humans is the vertebral artery, while in rabbits the origin is the basilar artery (star). The presence of the lower anterior cerebellar artery (filled arrow) and the superior cerebellar artery (arrow) in rabbits was observed as described by Andrade (1983) in rodents.

166x114mm (150 x 150 DPI)