



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS**

**JONATA VITAL FERREIRA**

**PARTICIPAÇÃO NEUROPROTETORA DA PROGRANULINA EM RESPOSTAS  
COGNITIVAS E COMPORTAMENTAIS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A  
ISQUEMIA VASCULAR CEREBRAL**

Florianópolis  
2024

**JONATA VITAL FERREIRA**

**PARTICIPAÇÃO NEUROPROTETORA DA PROGRANULINA EM RESPOSTAS  
COGNITIVAS E COMPORTAMENTAIS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A  
ISQUEMIA VASCULAR CEREBRAL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Luis Reis

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Bruder do Nascimento

Florianópolis

2024

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.  
Dados inseridos pelo próprio autor.

Vital Ferreira, Jonata  
PARTICIPAÇÃO NEUROPROTETORA DA PROGRANULINA EM  
RESPOSTAS COGNITIVAS E COMPORTAMENTAIS DE CAMUNDONGOS  
SUBMETIDOS A ISQUEMIA VASCULAR CEREBRAL / Jonata Vital  
Ferreira ; orientador, Wagner Luis Reis,  
coorientador, Thiago Bruder do Nascimento, 2024. 76  
p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas,  
Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Ciências Fisiológicas. 2. Progranulina, Isquemia,  
Memória, Comportamento, Oclusão das Carótidas. I. Luis Reis,  
Wagner . II. Bruder do Nascimento, Thiago. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas. IV. Título.

Jonata Vital Ferreira

**Participação Neuroprotetora da Progranulina em Respostas Cognitivas e Comportamentais de Camundongos Submetidos a Isquemia Vascular Cerebral**

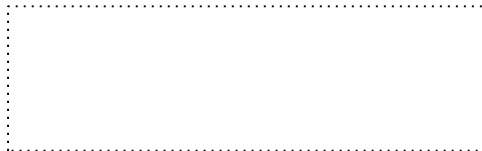
O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Luz Elena Duran Carabali  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Wagner Luis Reis  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.



Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Prof. Dr. Wagner Luis Reis  
Orientador

Florianópolis, 2024.

Este trabalho é dedicado a todos que fizeram esse sonho possível.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha família, que sempre foi e sempre será a minha base, minha inspiração e ponto de apoio. Por acreditarem em mim, por estarem ao meu lado, mesmo distantes e com a saudades, nunca me deixaram desistir.

Ao Prof. Dr. Wagner Luis Reis, meu orientador, pela oportunidade que me deu ao entrar no programa e por trabalhar com ele nesta pesquisa. Por sua amizade, seu carisma, sua paciência e seu aprendizado.

Ao Prof. Dr. Thiago Bruder do Nascimento, meu coorientador, pela ajuda e confiança para realização dessa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Eduardo e a Profa. Dra. Morgana, pela ajuda no aprendizado e nas técnicas, pela ajuda com a doação de infraestrutura e materiais para confecção da pesquisa.

Aos meus amigos, por sempre estarem ao meu lado, me ajudando quando precisava, muito obrigado por todo apoio.

A toda equipe do Lameb pela ajuda e apoio com os equipamentos e técnicas.

A UFSC e ao CAPES pelas bolsas de estudos fornecidas ao longo do mestrado.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.

(George Bernard Shaw)

## RESUMO

A isquemia cerebral, pode ser causada por acidente vascular encefálico isquêmico (AVEi) ou por parada cardíaca. Apesar das evidências, ainda, pouco se sabe sobre o papel e os mecanismos celulares envolvidos nas respostas comportamentais e na memória causados por AVEi. Terapias e tratamentos após eventos isquêmicos, ainda se demonstram ineficazes para danos causados ao longo do tempo. A progranulina (PGRN) que é uma glicoproteína, responsável por vasta variedade de respostas celulares envolvidas em processos fisiológicos e fisiopatológicos, como exemplo a diabetes, hipertensão e a demência frontotemporal. Há evidências que com a redução desta glicoproteína pode estar relacionado agravamento de eventos celulares após o acometimento de AVEi. Por outro lado, sua superexpressão central ou reposição de PGRN pode evitar déficits de memória e perda neuronal no hipocampo, sugerindo um papel neuroprotetivo. Foram utilizados em camundongos machos de 2 e meio de idade, com objetivo de investigar alterações funcionais: motoras, comportamentais e associadas a ansiedade causadas por isquemia, utilizamos a técnica de oclusão parcial bilateral das carótidas comuns (BCCAO) "*Bilateral Common Carotid Arterial occlusion*" de forma permanente. Adicionalmente, realizamos a administração central com 250 ng/μl de progranulina recombinante (PGRNr) via intracerebroventricular, avaliando sua capacidade neuroprotetora. Foi realizado testes de força muscular, locomoção, emocionalidade e memória, dessa forma, observamos que os danos cognitivos e comportamentais são gerados pelo modelo de AVEi, foram evidenciados em nossos resultados que animais com isquemia tiveram maior perda na memória de curto prazo, porém, esse efeito foi revertido pelo uso da PGRNr. Não houve diferenças significativas em animais controles e Sham (falsos operados), podendo ser uma nova janela de estudos para tratamentos terapêuticos de eventos pós isquêmico.

**Palavras-Chave:** Progranulina, Isquemia, Memória, Comportamento, Oclusão das Carótidas



## ABSTRACT

Cerebral ischemia can be caused by ischemic stroke (IS) or cardiac arrest. Despite the evidence, little is known about the role and cellular mechanisms involved in behavioral responses and memory caused. Therapies and treatments after ischemic events still prove ineffective for damage caused over time. Progranulin (PGRN), a glycoprotein, is responsible for a wide variety of cellular responses involved in physiological and pathophysiological processes, such as diabetes, hypertension and frontotemporal dementia. There is evidence that the reduction of this glycoprotein may be related to the worsening of cellular events after receiving. On the other hand, its central overexpression or PGRN configuration may prevent memory deficits and neuronal loss in the hippocampus, indicating a neuroprotective role. They were used in 2.5-year-old male mice, with the aim of investigating functional changes: motor, behavioral and anxiety-related caused by ischemia, using the technique of bilateral partial occlusion of the common carotid arteries (BCCAO) "Bilateral common carotid artery occlusion" permanently. Additionally, we performed central administration with 250 ng/ $\mu$ l of recombinant progranulin (PGRNr) via intracerebroventricular, evaluating its neuroprotective capacity. Muscle strength, locomotion, emotionality and memory tests were performed, thus, we observed that cognitive and behavioral damages are generated by the stroke model, it was evidenced in our results that animals with ischemia suffered greater loss in short-term memory, however, this effect was reversed by the use of PGRNr. There were no significant differences in control and Sham animals (false indirect), which may be a new window of studies for therapeutic treatments of post-ischemic events.

Keywords: Progranulin, Ischemia, Memory, Behavior, Carotid Occlusion

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Representação da área de lesão cerebral após evento isquêmico.....	17
Figura 02 – Figura 02. Esquema evidenciando semelhança entre a estrutura vascular de humanos e roedores .....	18
Figura 03 – Lesão de acordo com a concentração intracelular de Ca <sup>2+</sup> .....	20
Figura 04 – Principais mecanismos fisiopatológicos na lesão por AVEi.....	20
Figura 05 – Eventos celulares envolvidos na fisiopatologia da isquemia cerebral.....	22
Figura 06 – Representação dos eventos envolvidos na apoptose.....	24
Figura 07 – Representação da região de síntese da PRGN .....	25
Figura 08 – Domínios de Cisteínas .....	26
Figura 09 – Representação dos receptores de PGRN.....	29
Figura 10 – Representação da regulação de PGRN .....	31
Figura 11 – Delineamento experimental para testes comportamentais.....	37
Figura 12 – Delineamento experimental para testes cognitivos .....	38
Figura 13 – Representação da oclusão bilateral das carótidas comuns .....	39
Figura 14 – Representação da cirurgia para a canulação do ventrículo lateral encefálico .....	40
Figura 15 – Teste de força .....	45
Figura 16 – Teste de Mobilidade .....	45

Figura 17 – Teste de spray de sacarose .....	46
Figura 18 –Teste de campo aberto .....	47
Figura 19 –Teste de labirinto em cruz elevado.....	48
Figura 20 –Teste de labirinto em Y .....	49
Figura 21 –Teste de reconhecimento de objetos .....	50
Figura 22 –Teste de Índices de preferência e discriminação .....	51
Figura 23 – Teste de spray de sacarose + PGRNr .....	52
Figura 24 –Teste de campo aberto + PGRNr.....	53
Figura 25 –Teste de labirinto em cruz elevado + PGRNr .....	54
Figura 26 –Teste de labirinto em Y + PGRNr.....	55
Figura 27 –Teste de reconhecimento de objetos + PGRNr.....	56
Figura 28 –Teste de Índices de preferência e discriminação + PGRNr.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2VO Método de oclusão de dois vasos  
4VO Método de oclusão de quatro vasos  
AVEi Acidente vascular encefálico isquêmico  
AMPA Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico  
ATP Adenosina trifosfato  
BCCAO Oclusão parcial das carótidas  
BHE Barreira hematoencefálica  
DFT Demência frontotemporal  
DNA Ácido desoxirribonucleico  
DR3 Receptor de morte 3  
EGF Fator de crescimento epidermal  
E.P.M. Erro padrão da média  
GRN Granulina  
iGluRs Receptores glutamatérgicos ionotrópicos  
icv Intracerebroventricular  
ID Índice de discriminação  
IP Índice de preferência  
mGLURs Receptores glutamatérgicos metabotrópicos  
MEC Matriz extracelular  
mPTP Transição de permeabilidade mitocondrial  
NMDA N-metil-D-aspartato  
OMAC oclusão mecânica da artéria cerebral média  
PFA Paraformaldeído  
PGRN Progranulina  
RNS Espécies reativas de nitrogênio  
ROS Espécies reativas de oxigênio  
SORT1 Receptor de sortilina 1  
SNC Sistema nervoso central  
TNF Fator de necrose tumoral

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.5</b>
1.1	ISQUEMIA CEREBRAL .....	15
1.1.1	Fisiopatologia da isquemia.....	16
1.1.2	Eventos Celulares .....	18
1.2	PROGRANULINA .....	25
1.2.1	Tipos de Receptores da Progranulina.....	27
1.2.2	Relação entre a Progranulina e Neurodegeneração .....	29
1.2.3	Acidente vascular encefálico isquêmico, PGRN e neuroproteção .....	31
1.2.4	Deficiência de PGRN com consequências comportamentais e cognitivas ..	32
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>33ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>3</b>	<b>HPOTESE</b> .....	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>34</b>
4.1	Objetivo Geral.....	34
4.2	Objetivos Especificos.....	34
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E METODOS</b> .....	<b>35</b>
5.1	Animais .....	35
5.2	Delineamento Experimental .....	36
5.2.1	Avaliação da reposição central de PGRN nas repostas comportamentais em camundongos com BCCAO. ....	36
5.2.2	Avaliação da reposição central de PGRN nas repostas cognitivas em camundongos com BCCAO .....	37
5.2.3	Fármaco Utilizado .....	38
5.3	Procedimentos Cirúrgicos .....	38
5.3.1	Cirurgia de Oclusão Parcial Bilateral das Carótidas Comuns .....	38
5.3.2	Cirurgia de Canulação Intracerebroventricular.....	39
5.4	Testes para avaliação comportamental .....	40
5.4.1	Teste de Spray de Sacarose.....	40
5.4.2	Teste de Campo Aberto .....	40
5.4.3	Teste de Labirinto em Cruz Elevado .....	41
5.5	Testes para avaliação cognitiva .....	42
5.5.1	Teste de Labirinto em Y .....	42
5.5.2	Teste de Reconhecimento de Objetos .....	42

5.6	Teste para avaliação de déficit neuromotor .....	43
5.6.1	Teste de força de agarre.....	43
5.7	Análise Estatística.....	43
<b>6</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
6.1	Efeito sobre os déficits neuromotor de camundongos submetidos à isquemia cerebral induzida por BCCAo. ....	44
6.2	Efeito sobre os déficits comportamentais de camundongos submetidos à isquemia cerebral induzida por BCCAo.....	46
6.3	Efeito sobre os déficits cognitivos de camundongos submetidos à isquemia cerebral induzida por BCCAo .....	48
6.4	A Efeito do tratamento com PGRNr sobre os déficits comportamentais de camundongos submetidos à isquemia cerebral induzida por BCCAo. ....	51
6.5	A Efeito do tratamento com PGRNr sobre os déficits cognitivos de camundongos submetidos à isquemia cerebral induzida por BCCAo. ....	55
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>62</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>63</b>
	<b>ANEXO .....</b>	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Isquemia Cerebral

A isquemia cerebral (AVE), é uma das principais causas de mortalidade em todo mundo, ainda que o número de pacientes sobreviventes tenha aumentado com o avanço dos anos. O índice de deficiências comportamentais e cognitivas ao longo tempo é aumentado, juntamente com o acometimento de demência (ESCOBAR et al., 2019). Déficits de memória foram avaliados em sobreviventes de parada cardíaca entre os anos de 1980 e 1993, foi demonstrado que, geralmente é acompanhado por déficits motores e sociais (GRAVES et al., 1997). Outro estudo avaliou que, na parada cardíaca ocorre redução média de 10% no volume do hipocampo bilateralmente, sugerindo que mesmo períodos curtos de hipóxia, são suficientes para causar danos específicos nessa região (STAMENOVA et al., 2018).

O AVE é a segunda maior causa de morte mundial segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2020). Ainda há poucos dados sobre o AVE no Brasil (BENSENOR et al., 2015). Alguns dados epidemiológicos da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) pelo Instituto Brasileiro de Geografia e estatística (IBGE) de 2013, constataram que em média 2 milhões de brasileiros sofreram AVE. Podendo obter déficits de aprendizagem, memória e cognitivos. Foi demonstrado que homem e em modelos animais, as disfunções cognitivas são acompanhadas por alterações neuropatológicas, evidenciadas principalmente o hipocampo.

O acidente vascular isquêmico (AVEi) é causado pela falta de irrigação sanguínea em uma área do encéfalo, ele é gerado por obstrução de uma ou mais artérias que irrigam o encéfalo. Algumas regiões cerebrais são mais susceptíveis à lesão isquêmica, tais como hipocampo, cerebelo, tálamo e estriado, podendo comprometer um grande número de neurônios (STAMENOVA et al., 2018). WAHUL e colaboradores (2018) em um estudo realizado em animais, demonstraram que as regiões corticais e estriadas foram afetadas predominantemente no início do AVEi induzido pela cirurgia de obstrução bilateral das carótidas (BCCAO), mas não houve morte celular tardia nessas regiões, por outro lado, no hipocampo, ocorreu morte celular retardada, devido às condições isquêmicas.

Estudos apontam uma grande relevância clínica de sintomas, como depressão e ansiedade, pois, são comuns após um evento isquêmico, porém, ainda há poucos estudos sobre transtornos de disfunções físicas (VICENTINI et al., 2017).

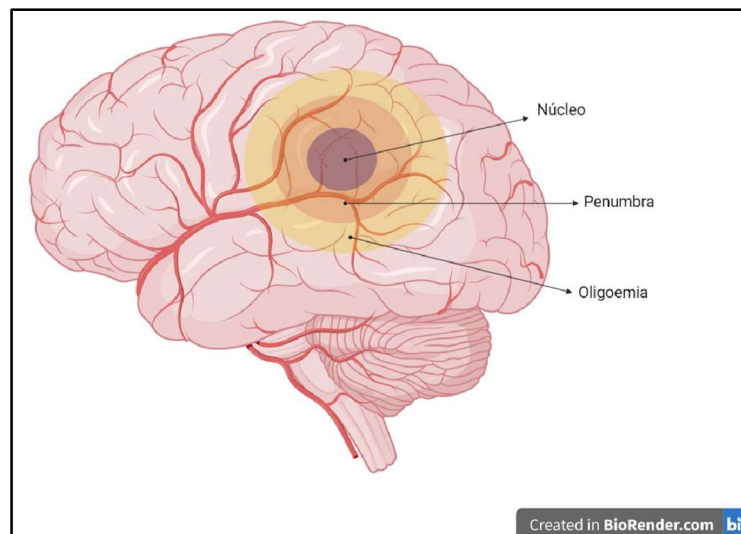
### **1.1.1 Fisiopatologia da Isquemia**

A redução ou perda do fluxo sanguíneo no AVEi, resulta em comprometimento do suprimento necessário para a produção de energia e manutenção da integridade do tecido. O desbalanço bioenergético resulta em uma cascata de eventos moleculares negativos ao sistema nervoso central (SNC), podendo resultar em dano celular, caso o fluxo sanguíneo não seja restabelecido, pode levar a morte celular. Após a hipóxia isquêmica, ocorrem danos neuronais em diferentes áreas do cérebro devido à interrupção do equilíbrio iônico, excitotoxicidade, estresse oxidativo, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (ERN), inflamação e apoptose (ESCOBAR ET AL., 2019; ROCHA, 2008).

A área de lesão resultante pode ser dividida em núcleo isquêmico, penumbra e oligoemia. O núcleo isquêmico, onde ocorre a perda mais grave do aporte de suprimentos, a penumbra, que é uma área dinâmica, potencialmente recuperável e sua extensão depende do fluxo residual e duração do evento, criando uma região sensível a uma intervenção terapêutica que promoverá recuperação do tecido com risco eminente de morte (HEISS, 2000; KIEWERT et al., 2010; LEE et al., 2005). Já a oligoemia, que consiste na faixa entre penumbra e o tecido normal, área na qual ocorre hipoperfusão, sem desencadear lesão tecidual (figura 01).



Figura 01. Representação da área de lesão cerebral após evento isquêmico



**Legenda: Desenho esquemático exemplificando a área da lesão cerebral dividida em: núcleo, penumbra e oligoemia.** Fonte: BioRender.

A utilização de modelos animais AVEi *in vivo* permitiu grandes descobertas sobre a fisiopatologia de doenças humanas. Camundongos e ratos são frequentemente escolhidos como modelo, devido ao seu baixo custo de aquisição e manutenção, facilidade de monitoramento, técnicas de manipulação mais simples (BACIGALUPPI; COMI; HERMANN, 2010; CARMICHAEL, 2005; SOMMER, 2017) e semelhanças anatômicas e neuroquímicas (Figura 02) (WANG-FISCHER, 2008).

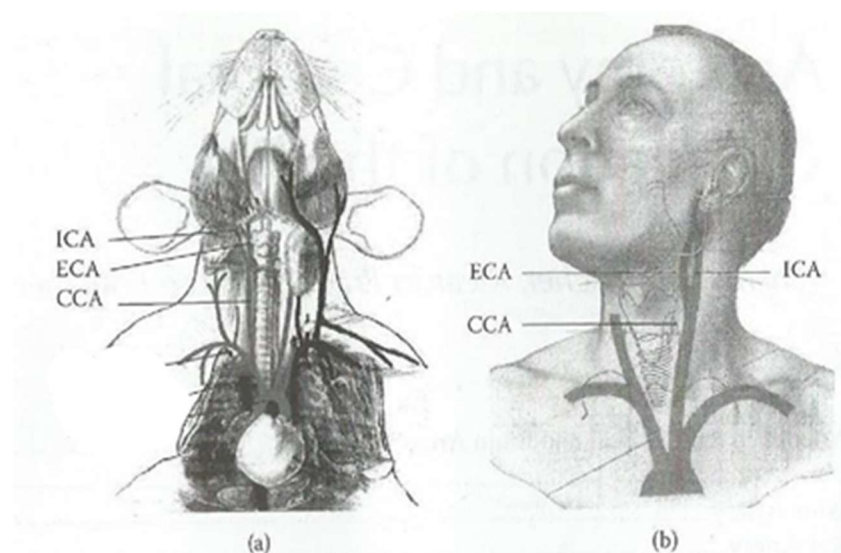
Os modelos *in vivo* de AVEi podem ser divididos em 2 modelos, focais e globais. A isquemia focal é caracterizada por uma redução do fluxo sanguíneo em uma região específica do cérebro, enquanto na isquemia global a redução do fluxo sanguíneo afeta o cérebro inteiro. A isquemia focal pode ser realizada através de diferentes técnicas, as mais estudadas são, a oclusão mecânica tanto da artéria cerebral média (OMAC) proximal quanto da distal, a oclusão trombótica por injeção de coágulos sanguíneos, a trombina diretamente na OMAC e a fototrombose após injeção do corante fotossensível rosa de bengala (BACIGALUPPI; COMI; HERMANN, 2010; CARMICHAEL, 2005; SOMMER, 2017).

A isquemia global pode ser induzida através do método de oclusão de quatro vasos (4VO), sendo a oclusão reversível das artérias carótidas comuns em conjunto com a oclusão permanente das artérias vertebrais por eletrocoagulação. Podendo ser

utilizado o método de oclusão de dois vasos (2VO), o qual é produzido pela oclusão bilateral das artérias carótidas comuns “*Bilateral Common Carotid Arterial occlusion*” (BCCAo) (BACIGALUPPI; COMI; HERMANN, 2010).

Atualmente em camundongos a isquemia cerebral global é geralmente realizada pelo método BCCAo sem associação de qualquer outro auxílio, como a oclusão permanente das artérias vertebrais, isso porque camundongos possuem o *Polígono de Willis* incompleto, e por esse motivo, não necessitam ser submetidos à hipotensão ou a outros artifícios adicionais para se promover uma isquemia cerebral mais efetiva (LIPTON, 1999; ÁBRAHAM, et al., 2000).

Figura 02. Esquema evidenciando semelhança entre a estrutura vascular de humanos e roedores.



**Legenda: Mamíferos em geral e humanos possuem estruturas vasculares semelhantes.** Na imagem demonstra a localização comparada entre humanos e roedores das artéria carótida interna (ICA), artéria carótida externa (ECA), artéria carótida comum (CCA) Fonte: WANG-FISCHER, 2008

### 1.1.2 Eventos Celulares

Consequências celulares e moleculares afetam as funções de neurônios e de células gliais, causa alterações vasculares e inflamatórias no SNC, provocando a desregulação da disponibilidade da molécula de ATP durante o início do AVEi. Os neurônios perdem seu gradiente iônico transmembrana, culminando na

despolarização durante estados de hipoperfusão, conhecido também como “*despolarização anóxica*”. O evento leva à liberação massiva de neurotransmissores em terminais pré-sinápticos, especialmente de aminoácidos excitatórios.

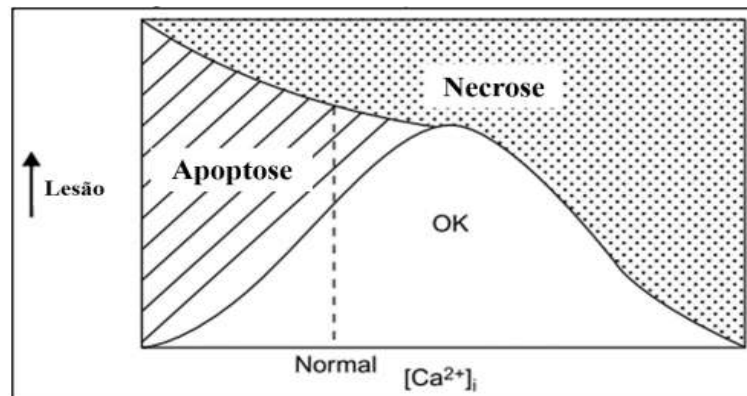
Dessa forma, a função neuronal estará comprometida, pois, a recaptação dos neurotransmissores excitatórios depende da disponibilidade contínua de ATP, que estão em déficit após o início do AVEi. Dessa forma, os níveis extracelulares aumentam, levando à ativação de seus receptores (LO; DALKARA; MOSKOWITZ, 2003).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC e atua através da ativação de seus receptores ionotrópicos e metabotrópicos. Existem três tipos de receptores glutamatérgicos ionotrópicos (iGluRs), o N-metil-Daspartato (NMDA), o receptor ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) e cainato. Até o momento, foram identificados oito subtipos de receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR 1-8), sendo expressos nas regiões pré e pós-sinápticas e em células gliais. Os mGluRs desempenham funções importantes, incluindo regulação do metabolismo, transcrição gênica, e múltiplos aspectos da função glial e comunicação neuro-glial (NISWENDER; CONN, 2010).

Com a superestimulação de receptores iGluRs, os neurônios realizam o influxo de cátions de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), assim, despolarizando e culminando em uma série de eventos citoplasmáticos e nucleares, nos quais há geração de radicais livres e ativação de enzimas dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , incluindo enzimas proteolíticas que degradam proteínas do citoesqueleto. Esses processos dependendo do nível de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, promove rapidamente a morte celular através de necrose, mas, os mecanismos excitotóxicos também ativam eventos moleculares que levam a apoptose (Figura 03) (CHOI, 1995).

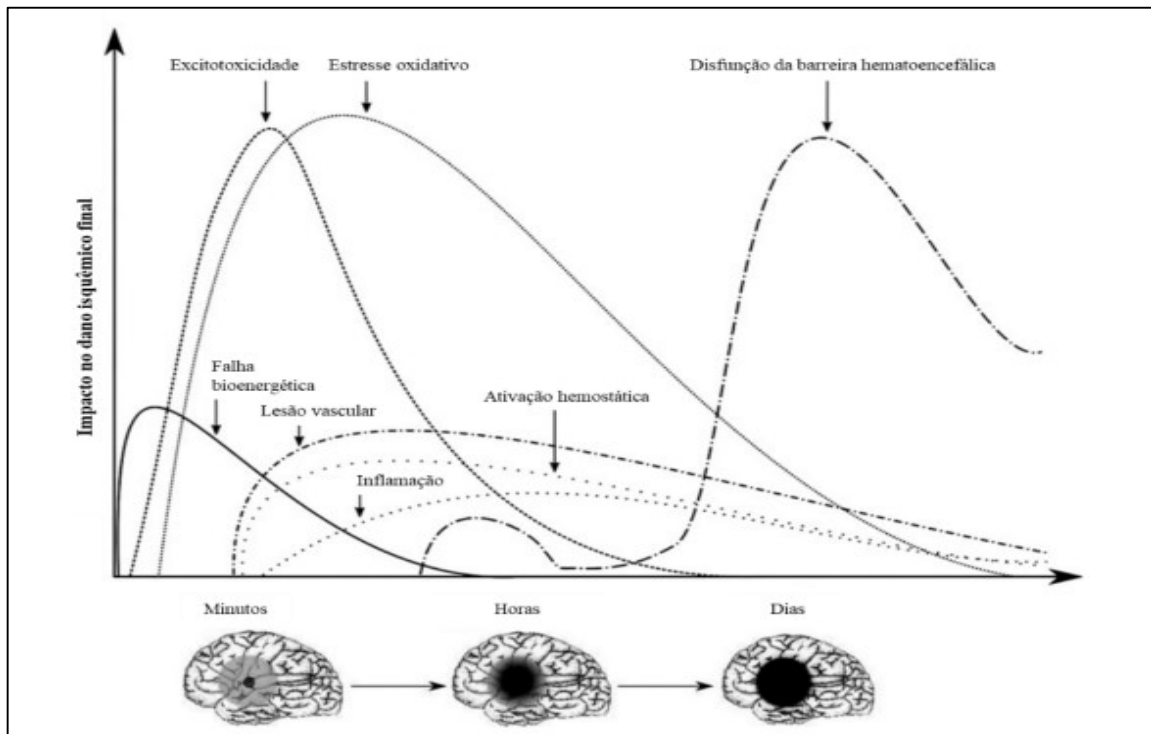
Durante o AVEi, a ativação de mGLURs presentes em células glias leva ao aumento de cálcio dentro dessas células, reduzindo a expressão de transportadores gliais de glutamato, aumentando ainda mais os níveis extracelulares desse neurotransmissor (CAMPBELL et al., 2019; KIM et al., 2016). Assim, com a estimulação dos receptores NMDA e AMPA, tem-se a entrada excessiva de cálcio na célula neuronal (WEILINGER et al., 2013). Com o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , leva o aumento significativo da concentração desse íon, ocorrendo ativação de enzimas proteolíticas, gerando ROS, cuja presença altera o balanço oxidativo celular (CAMPBELL et al., 2019).

Figura 03 - Lesão de acordo com a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Legenda:** Diagrama ilustrando a relação entre gravidade da lesão, concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  e a tríade sobrevivência/apoptose/necrose. Um único insulto pode levar tanto a apoptose quanto à necrose, ou mesmo aos dois processos simultaneamente. A gravidade da lesão pode determinar qual dos processos de morte celular predomina. Insultos moderados ou baixo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  favorecem apoptose. Níveis normais de  $\text{Ca}^{2+}$  podem favorecer processos de regeneração. Fonte: Adaptado de Choi, 1995.

Figura 04 - Principais mecanismos fisiopatológicos na lesão por AVEi.

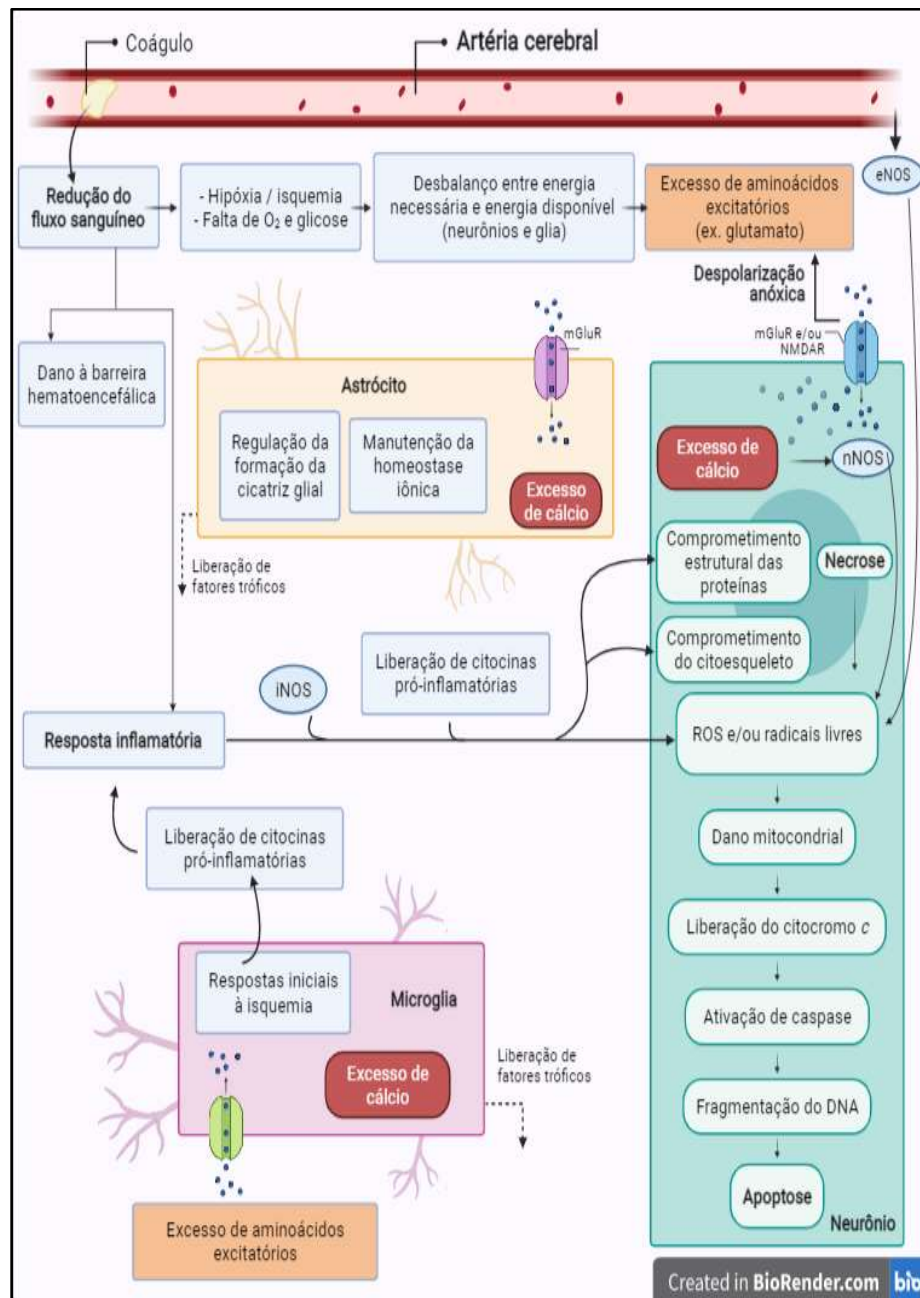


**Legenda: Gráfico representando o perfil temporal dos principais mecanismos fisiopatológicos da isquemia cerebral, mostrando a expansão das áreas de penumbra e núcleo isquêmico com o decorrer do tempo.** Fonte: Adaptado de Brouns & Deyn, 2009

Com essa série de complexos processos neuroquímicos que são desencadeados ao longo do tempo pelo AVEi, ocorrendo nesse processo ações que pode durar de horas a dias (Figura 04), mesmo após a restauração do fluxo sanguíneo (BECERRA-CALIXTO; CARDONA-GÓMEZ, 2017; XU et al., 2020).

As mitocôndrias desempenham um papel crítico na homeostase da energia celular, portanto, estão proeminentemente envolvidas durante a isquemia, quando o balanço energético é interrompido e a síntese de ATP é alterada. O influxo rápido de cálcio expresso como excitotoxicidade, leva ao acúmulo excessivo na mitocôndria, causando disfunção, o que leva à abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial e liberação do citocromo C. Esses eventos (Figura 05) criam inchaço mitocondrial e colapso da membrana, iniciando cascatas de morte celular por apoptose (LIU et al., 1996; MURPHY et al., 1999).

Figura 05. Eventos celulares envolvidos na fisiopatologia da isquemia cerebral.



**Legenda:** A isquemia causada por oclusão de uma artéria cerebral inicia uma cascata de respostas em células do SNC. A disfunção da barreira hematoencefálica e a liberação de moléculas de sinalização inicia a resposta inflamatória. A morte celular desencadeada por esses eventos ocorre tanto por necrose, quanto por apoptose. eNOS, óxido nítrico sintase endotelial; iNOS, óxido nítrico sintase induzível; nNOS, óxido nítrico sintase neuronal. Adaptado de George & Steinberg, 2015. Fonte: BioRender.

A apoptose é a forma mais comum de morte celular programada em organismos multicelulares e pode ser desencadeada pela via intrínseca (conhecida também como apoptose mitocondrial) ou extrínseca (Figura 06).

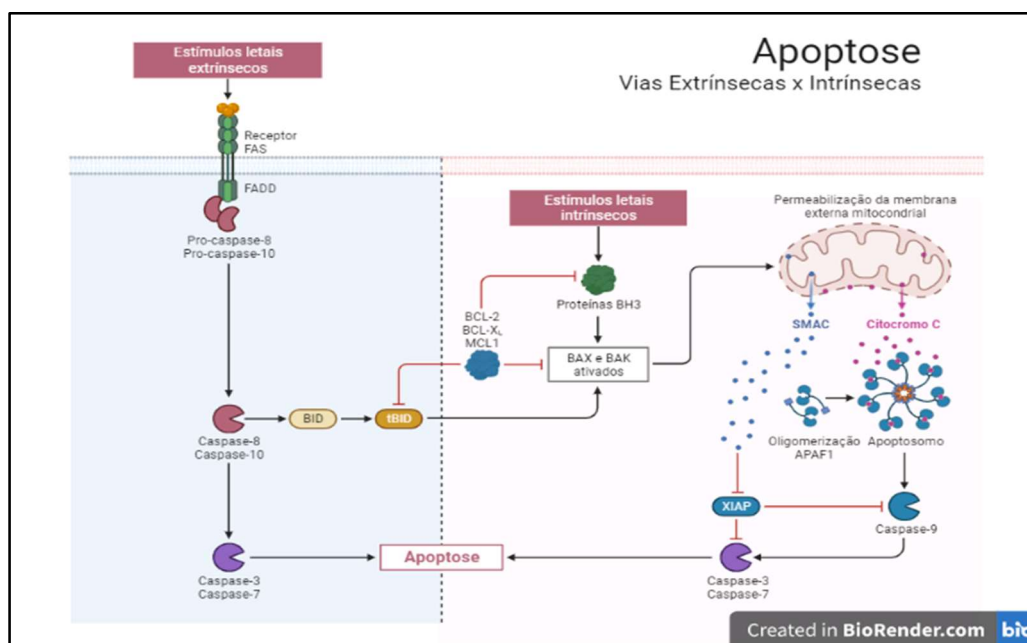
Na apoptose mitocondrial, quando ocorre a sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  desencadeia a ativação da calpaína, clivando o domínio de interação da proteína Bcl-2 (BID) em sua forma ativa truncada (tBID), que interage com proteína Bax na membrana mitocondrial, posteriormente, a Bax e tBID formam um dímero e promovem a formação de poros externos da membrana mitocondrial chamados poros de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTPs), que são permeáveis não seletivamente a solutos menores que 1,5 kDa, causando a liberação de vários fatores pró-apoptóticos, incluindo citocromo C. (CULMSEE C, ZHU C, LANDSHAMER S, et al. 2005).

Durante a apoptose extrínseca causada por AVEi, os danos a barreira hematoencefálica ativam moléculas sinalizadoras, por exemplo as citocinas, que são liberadas pelos astrócitos, micróglia e oligodendrócitos causando inflamação (Jiang X, Andjelkovic AV, Zhu L, et al. 2018). Muitos aspectos da inflamação permanecem dias ou semanas após a isquemia, a cascata de inflamação é ativada imediatamente após o bloqueio ou redução do fluxo sanguíneo.

Nos estágios iniciais do AVEi, o acúmulo de neutrófilos ocorre no núcleo isquêmico, enquanto a ativação e proliferação microglial ocorre na penumbra. A via extrínseca da apoptose é desencadeada pelos chamados “receptores de morte” da membrana plasmática, os receptores conhecidos incluem o receptor de TNF 1, o antígeno de apoptose-1 (APO1/FAS/CD95) e o TRAIL-R, podendo ocorrer de forma independente ou sinérgica com a via mitocondrial (WANG J, MINEMOTO Y, LIN A, LI Y, SHEN B, ZHANG J. IKK, 2007).

Esses receptores se ligam a um domínio de morte associado ao Fas (FADD) para criar um complexo de sinalização, induzindo a clivagem da procaspase-8, realizando a ativação da caspase-8. Uma vez que a caspase-8 é ativada, ela ativa caspases efetoras a principal, estudada é a caspase-3, por clivagem proteolítica direta ou clivagem indireta de BID em tBID, que medeia a apoptose através da via mitocondrial (Figura 06), (LANDSHAMER S, HOEHN M, BARTH N, et al. 2008)

Figura 06. Representação dos eventos envolvidos na apoptose.



**Legenda: Representação das vias apoptóticas intrínsecas e extrínsecas.** Com a apoptose extrínseca, ocorre a ativação de neuroreceptores da família FAS, em resposta as pro-caspases 8 e 10 são clivadas em suas formas ativas de caspase-8 e caspase-10, realizando a cadeia de ativação caspática, ao clivar as caspases efetoras, caspase-3 e caspase-7 inicia-se a degradação da carioteca. Na apoptose mitocondrial, ocorre inicialmente a ativação da proteína BAX e BAK, consequentemente a realização da permeabilização da parede mitocondrial, favorecendo a liberação da proteína SMAC ou citocromo C, ocasionando a ativação da caspase-9, realizando a cadeia de ativação caspática, ao clivar as caspases efetoras, caspase-3 e caspase-7 inicia-se a degradação da carioteca. Fonte: BioRender.

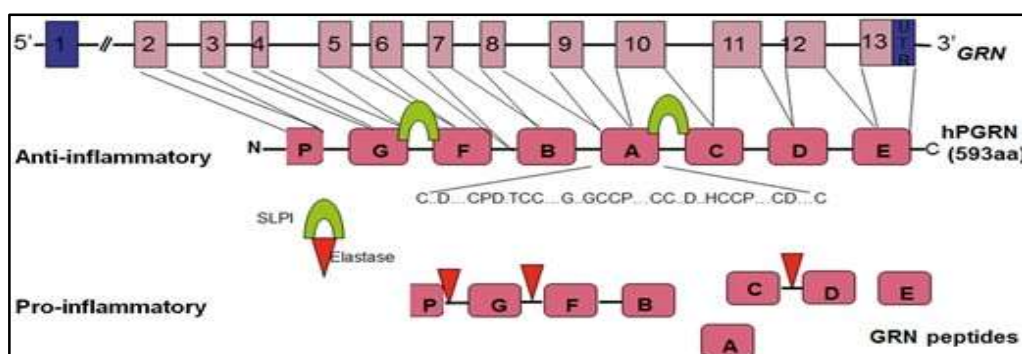
Sabendo-se dos danos celulares causados pela isquemia cerebral, juntamente com a pouca existência de tratamentos eficazes, faz-se necessário o desenvolvimento de novas terapias, visando com isso minimizar lesões teciduais após a reperfusão, enquanto promove recuperação e plasticidade neuronal (RAJAH; DING, 2017), porém, o sucesso em ensaios clínicos permanece impreciso (CAMPBELL et al., 2019). Sendo assim, esforços têm sido feitos para assegurar que os modelos animais estudados reflitam a realidade de ensaios clínicos, utilizando medidas funcionais, comportamentais e cognitivas relevantes na avaliação do potencial benéfico (STAIR, 1999)



## 1.2 Progranulina

A progranulina (PGRN), foi identificada pela primeira vez como uma glicoproteína de 593-aa (CUI Y et al., 2019; BATEMAN A et al., 1990), que pode ser processada para liberar módulos individuais como peptídeos de 6kDa, chamados granulinas. Elas são responsáveis por uma variedade de funções pleiotrópicas, ela está relacionada com funções de ativação ou inativação de mecanismos celulares, que contém controle de diferentes características fenotípicas e fisiológicas, podendo ou não estar correlacionadas (TOH H et al., 2011). O gene que codifica a progranulina está localizado no cromossomo 17 na região q21.32 (Figura 07), sendo formada por repetições em tandem de módulos de GRNs, tendo motifs definidos por um padrão conservado de 12 resíduos de cisteína (BHANDARI V, PALFREE RG, BATEMAN A., 1992).

Figura 07. Representação da região de síntese da PRGN



**Legenda: Representação do gene da proteína progranulina (do inglês, GRN) e sua via de digestão proteolítica para peptídeos de granulina.** O painel superior mostra a estrutura exônica do gene da PGRN. O painel intermediário mostra a estrutura da proteína PGRN com caixas com letras que representam módulos de granulina (GRN) individuais. As linhas finas descendentes da estrutura do gene indicam quais exons contribuem para quais módulos de GRN. O inibidor de protease leucocitária secretora (SLPI) liga-se a sequências entre os módulos de granulina para proteger a progranulina total da proteólise por elastase e outras proteases. A PGRN promove as propriedades antiinflamatórias e do fator de crescimento. O painel inferior ilustra a clivagem da progranulina em peptídeos de granulina, alguns dos quais têm atividades pró-inflamatórias e antiproliferativas. (Adaptado de Babykumari, P. et al. 2017).

Os motifs são entidades não randômicas encontradas em cadeias de DNA, tendo um padrão que pode também ser definido como um fenômeno não único, podemos definir um motif como, um curto segmento compartilhado por múltiplas sequências de DNA que pode conter informações sobre evolução, estrutura ou função celular, com configuração geral de : CX5–6CX5CCX8CCX6C CXDX2HCCPX4CX5–6C, sendo X: qualquer aminoácido, em sua estrutura total, a PGRN tem as granulias que são separadas por 7 regiões de ligantes (P1 a P7) na ordem PGFBACDE, onde, P é um motif ½ que também pode chamada de paragranulina (Figura 05) (BHANDARI V, PALFREE RG, BATEMAN A., 1992; ZHU J et al.,2002; BHANDARI V, BATEMAN A, 1992).

Os domínios estão localizados nas sequencias dos aminoácidos 264-319 (grnA), 169-244 (grnB), 347-400 (grnC), 425-479 (grnD), 501-556 (gmE), 106-162 (grnF), 41-96 (gmG) e 1-27 paragranulina (grnP). Na literatura são comparadas com a sequência da ordem dos domínios sendo paragranulina, G, F, B, A, C, D, E, não comparadas com a sequência de cisteína e a denominação da “grnA”, pois, elas não são alfabeticamente alinhadas, pelo motivo de que vários domínios foram isolados e nomeados como proteínas antes que sua origem comum fosse conhecida (Figura 08), (BHANDARI V, PALFREE RG, BATEMAN A., 1992).

Figura 08. Domínios de Cisteínas

GRANULIN A	DVKCDMEVS	CPDGYTCCR	LQSGAWG	CCPFTQAV	CCEDHIHCC	PAGFTCD	TQKGTCE
GRANULIN B	VMCPDARS	RCPDGS	TCCLEPSGKY	GCCPMPNAT	CCSDHLHCC	PQDTVCDL	I QSKCL
GRANULIN C	VPCDNVSS	CPSSDTCC	QLTSGE	WGCCPI	PEAVCCSD	HQHCCPQRYT	CVAEQQ-CQ
GRANULIN D	IGCDQHTS	CPVGGTCC	PSQGSWA	CCQLPHAV	CCEDRQHCC	PAGYTCNVK	ARSCE
GRANULIN E	DVECGEGHF	CHDNQTCC	RDNRQGW	A-CCPYAQGV	CCADRRHCC	PAGFRCARR	GTKCL
GRANULIN F	AIQCPDSQ	FECPDIFS	TCCVMVDGS	WG-CCPMPQAS	CCEDRVHCC	PHGAFCDL	VHTRCI
GRANULIN G	GGPCQVDAH	CSAGHSCI	FTVSGTSS	-CCPFPEAV	ACGDGHHCC	PRGFHCSAD	GRSCF
PARAGRANULIN	TRCPDGQF	CPVA--	CCLDPGGAS	YSCCR	PLLD		

**Legenda: Comparação dos domínios de grn's.** Resíduos que ocorrem quatro ou mais traços foram introduzidos para alinhar as cisteínas. Os limites do domínio foram determinados por microsequenciamento de fase gasosa e por comparação com a sequência de grnA. A imagem demonstra que todas grn's possuem múltiplos domínios de cistinas, gerando maior afinidade com receptores de membrana. (Adaptado de Bhandari, V. et al. 1992)

### 1.2.1 Tipos de Receptores da PGRN

A PGRN possui uma alta plasticidade e pode se ligar a um amplo espectro de proteínas da matriz extracelular (MEC) (Figura 09), isso devido, a tanto se ligar com receptores membranosos, chaperonas citoplasmáticas e hidrolases lisossomais, pela sua estrutura única de esferas em um fio e múltiplos domínios de ligação extracelular. Todos os receptores de ligação da PGRN relatados contêm o domínio rico em cisteína (DRC) e/ou do tipo da família do fator de crescimento epidermal (EGF), que são sintetizados como proteínas ancoradas à membrana celular (BABYKUMARI P. et al., 2017; TIAN Q, ZHAO S, LIU C., 2014; XU K. et al., 2007).

O DRC dos receptores de fatores de necrose tumoral (TNFR) e receptor de morte 3 (DR3) demonstraram interações com a PGRN, mas, também está presente nos domínios extracelulares dos receptores EphA2 (membro da grande família das tirosinas quinases do receptor de Efrina (PALFREE RGE, BENNETT HPJ, BATEMAN A., 2015). A Sortilina que teve interação com a região C-terminal, os receptores Dlk1 e Notch que contêm domínios do tipo EGF, também há interação, porém, ainda são desconhecidas essas regiões de ligação da PGRN e/ou grnA's (MINAMI SS. et al., 2014; CUI Y, HETTINGHOUSE A, LIU CJ., 2019).

Considerando os diferentes tipos de granulinas que podem ser clivadas, aliada as inúmeras interações com receptores, a PGRN está associada a uma série de processos de diversos estados patológicos, entre os quais estão os distúrbios no desenvolvimento e controle do ciclo celular, como em casos de realização de cicatrização de feridas (LIU C. et al., 2020) e densidade mineral óssea (MILAJERDI A. et al., 2018), pode estar relacionada também, com o fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, doença renal em estágio terminal e exibindo papel de importância no câncer, dos quais estão relacionados o câncer gástrico, câncer de mama, câncer cervical e o câncer colorretal (LIU C. et al., 2020; MINAMI SS. et al., 2014; FU Y. et al., 2017)

Metade de suas unidades, grnA, grnC e grnF mais os ligantes P3, P4 e P5 são responsáveis pela interação entre PGRN do receptor 1 e 2 do fator de necrose tumoral (TNFR1) e (TNFR2). Em resumo a pluripotência funcional de PGRN e suas estratégias de direcionamento associadas residem em sua ativação dependente de motifs de várias vias de sinalização. As associações com diferentes receptores de membrana de diferentes famílias podem ser responsáveis pelas múltiplas funções da PGRN em

diferentes condições fisiopatológicas (KÖRTVELYESSY P. et al., 2017; TIAN Q, ZHAO S, LIU C., 2014; TIAN Q. et al., 2014).

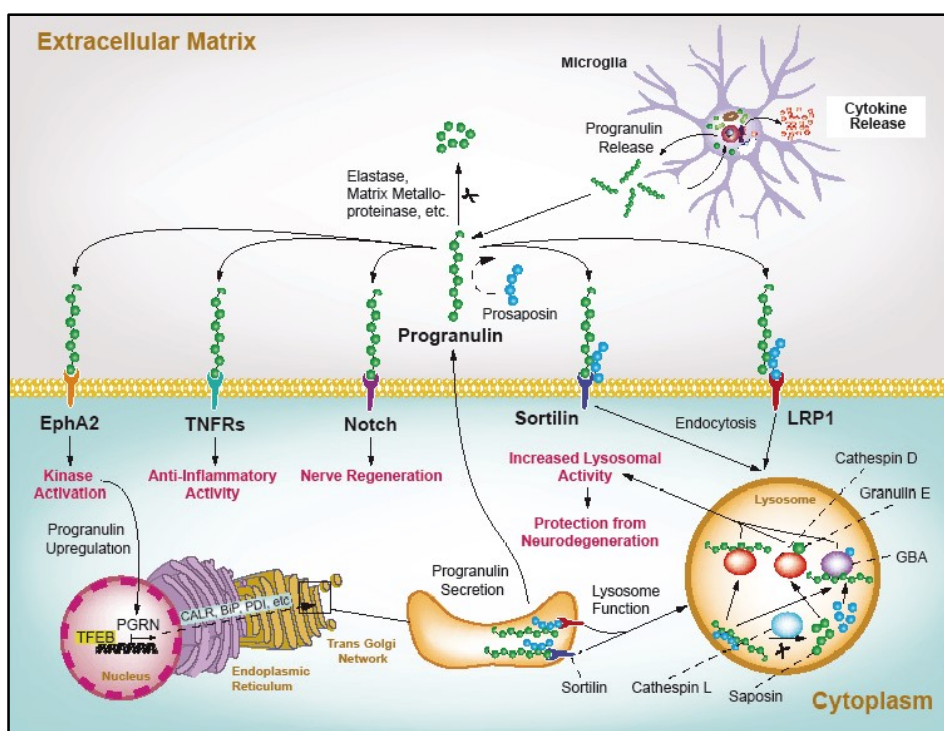
Como um exemplo, a PGRN ao se ligar ao TNFR1 onde ativa as vias ERK e PI3K / AKT, levando à inibição da via inflamatória NF- $\kappa$ B induzida por TNF- $\alpha$ , enquanto PGRN também pode se ligar diretamente a TNFR2, possui alta afinidade e promove Treg diferenciação celular pela ativação da cascata de sinal JNK-Stat3 / Foxo4.

As interações com receptores de sortilina e Notch desempenham papéis importantes no papel protetor do PGRN nos neurônios, particularmente na prevenção da degeneração neuronal. EphA2 também pode estar envolvido na proliferação celular mediada por PGRN durante a carcinogênese (CRUTS M. et al., 2006; HOLLER CJ. et al. 2017). Além de funcionar como uma molécula semelhante ao fator de crescimento extracelular, a PGRN também atua juntamente com a sortilina como uma co-chaperona citoplasmática intracelular para auxiliar o tráfego de enzimas lisossomais, e a ausência desta função leva a várias doenças de armazenamento de lisossomais (HUANG M. ET AL., 2020; BATEMAN A. et al., 1990).

No SNC o receptor de sortilina 1 (SORT1), uma proteína da família VPS10 que é altamente expressa em neurônios, atua como um receptor neuronal para PGRN. Ela rapidamente realiza a endocitose e entrega PGRN aos lisossomos (Figura 09). Assim, as interações com os receptores de sortilina desempenha papéis importantes na proteção de neurônios, particularmente na prevenção da degeneração neuronal. De outro modo, a ligação do PGRN ao TLR9 no endossomo desempenha papéis fundamentais na imunidade inata contra a infecção bacteriana (GUMINA V. et al., 2019; BHANDARI V, BATEMAN A. et al., 1992; HOLLER CJ. et al., 2017; HUANG M. et al., 2020; ZHU J. et al., 2002; GOTZL JK. et al., 2014).

SORT1, é uma glicoproteína transmembrana e um receptor de PGRN que atua facilitando a internalização do meio extracelular, têm sido associados aos níveis de PGRN, bem como a suscetibilidade a demência frontotemporal, doenças de armazenamento de lisossomais e doença de alzheimer (MIYAKAWA et al. 2020), sugerindo um papel fundamental do SORT1 na regulação dos níveis de PGRN.

Figura 09. Representação dos receptores de PGRN



**Legenda: Receptores e interações da PGRN.** Vários receptores PGRN foram identificados, incluindo EphA2, Notch, TLR9 e TNFR. Chaperonas, como BiP e PDI, garantem o dobramento adequado de PGRN no retículo endoplasmático. A PGRN madura pode ser entregue ao lisossomo a partir da rede de compartimentos de membrana (Golgi) ou do espaço extracelular por duas vias independentes. (1) PGRN liga-se diretamente ao receptor sortilina, que o entrega ao lisossomo. (2) PGRN se liga à proteína lisossomal solúvel, prosaposina, que então se liga a qualquer um de seus próprios receptores LRP1, e carrega PGRN com ele para o lisossomo (adipogem.com e adaptado de D.H. Paushter, et al. 2018; Acta Neuropathol. 136,1 e Y. Cui, et al. 2019; Cytokine Growth Factor Rev. 45, 53)

### 1.2.2 Relação entre a PGRN e Neurodegeneração

No grupo de doenças congênitas ou adquiridas do sistema nervoso, a PGRN demonstra abrangência, agindo nos processos inflamatórios e neoplásicos, ocorrendo em atividades de neurodesenvolvimento e de neurodegeneração no SNC (BATEMAN A. et al., 1990; HOLLER C.J. et al., 2017; HUANG M. et al., 2020). O nível de PGRN pode ser influenciada tanto pela idade, quanto o gênero, descobriu-se que também pode aumentar o nível em estados fisiológicos, por exemplo, durante a gravidez (Cui Y, Hettinghouse A, Liu C.J. 2019).

Devido as mutações heterozigotas e homozigotas de seu gene codificador, a PGRN está associada à demência frontotemporal (DFT) e doenças de armazenamento lisossomal (KÖRTVELYESSY P. et al., 2017), na afasia progressiva primária (MESULAM M. 2013), doença de Alzheimer e doença de Parkinson (MINAMI SS. et al., 2014)

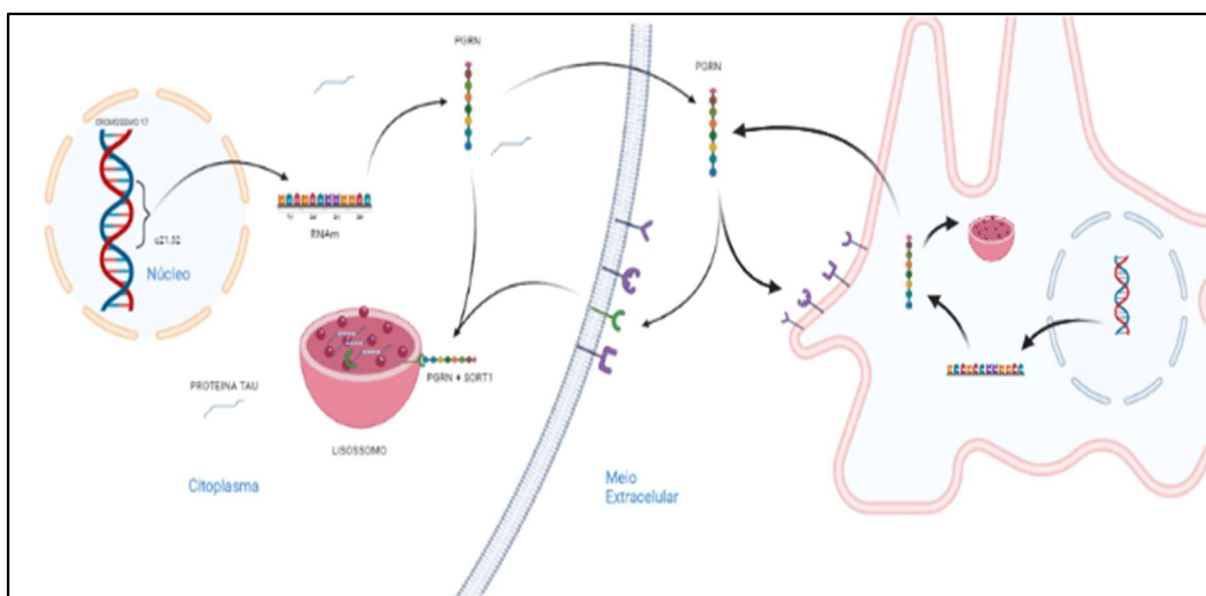
Mutações no gene da PGRN foram a causa mais comum da DFT. Observou-se que os níveis circulantes de PGRN estão diminuídos em 50% no plasma devido à mutação heterozigótica do gene da PGRN. Desta forma, a redução dos níveis de PGRN vem sendo utilizada como biomarcador para predisposição e avanço desse tipo de doença (DIAZ-CUETO L. et al., 2000; TAUFFENBERGER A. et al., 2013).

A PGRN é neuroativa, favorece a sobrevivência neuronal, agindo em muitos processos de neurodesenvolvimento e/ou impedindo a neurodegeneração. Por exemplo, a PGRN por meio de receptores de sortilina previne a degeneração neuronal. Como um potente regulador da neuroinflamação e um fator neurotrófico autócrino, a PGRN revela-se importante para a sobrevivência neuronal de longo prazo, e o aumento de sua biodisponibilidade no cérebro pode gerar benefícios terapêuticos no tratamento de doenças neurodegenerativas em diferentes tipos de demência frontotemporal (BATEMAN A. et al., 1990; HOLLER CJ. et al., 2017; HUANG M. et al., 2020).

No camundongo adulto, a PGRN é encontrada em neurônios específicos, em células de Purkinje, células piramidais do hipocampo, alguns neurônios corticais cerebrais, neurônios motores, medula espinhal e na microglia. Sob a influência da PGRN, a densidade sináptica no hipocampo aumenta, isto também ocorre em neurônios motores e com o aumento de quantidade gera um efeito citoprotetor (GUMINA V. et al., 2019).

No SNC, a PGRN é expressa principalmente por neurônios e micróglia, onde foi demonstrado que ela tem efeitos neurotróficos em neurônios em cultura, sendo que a insuficiência de progranulina neuronal pode prejudicar a função neuronal devido à perda de suporte neurotrófico. A PGRN também regula as respostas inflamatórias na microglia e macrófagos, portanto, a insuficiência da progranulina pode levar à inflamação.

Figura 10. Representação da regulação de PGRN



**Legenda: Representação esquemática da síntese de PGRN:** Interações autócrinas e parácrinas, envolvendo diferentes receptores neurais e migrogliais de PGRN. A pluripotência funcional do PGRN é associada ativação dependente de várias vias de sinalização. Associações com diferentes receptores de membrana de diferentes famílias podem ser responsáveis pelas múltiplas funções do PGRN em diferentes condições fisiopatológicas. Imagem Autoral

### 1.2.3 Acidente vascular encefálico isquêmico, PGRN e neuroproteção

Tendo o conhecimento que no modelo animal de (BCCAo) é responsável por induzir doenças neurodegenerativas (WAHUL AB. et al., 2018), mimetizando as perdas cognitivas e comportamentais relacionadas ao acidente vascular cerebral isquêmico, pode-se especular uma correlação entre BCCAo e PGRN. Apesar do desenvolvimento e progressão de inúmeras doenças neurodegenerativas, incluindo as DFT, após AVEi, não se tem conhecimento de trabalhos descrevendo esse modelo animal com a participação da PGRN em doenças neurodegenerativas causadas por isquemia.

Inúmeros trabalhos demonstraram que animais submetidos ao acidente vascular cerebral isquêmico apresentaram prejuízos na integridade da barreira hematoencefálica (BHE) (JIANG X. et al., 2018). Atualmente sabe-se que a PGRN também influencia o desenvolvimento e manutenção da BHE (JACKMAN K. et al.,

2013), sugerindo que os efeitos deletérios da AVEi na BHE podem ter sido causados diretamente pela biodisponibilidade da PGRN.

A administração de progranulina recombinante (PGRNr) pode produzir inúmeros efeitos terapêuticos benéficos, sugerindo seu papel neuroprotetivo. Foi demonstrado que a PGRNr elevou os níveis de PGRN na microglia, na coluna vertebral e em neurônios não danificados após status de acidente vascular cerebral isquêmico (VAN DEERLIN V.M. et al., 2010; ARRANT AE. et al., 2018; RYAN C.L. et al., 2009).

#### **1.2.4 Deficiência de PGRN com consequências comportamentais e cognitivas**

A deficiência de PGRN em modelos de camundongos produz fenótipos neuronais e comportamentais anormais. Em camundongos knockout para a PGRN, os fenótipos incluem acúmulo de ubiquitina neuronal (dependente da idade), vacuolização de tecido, microgliose, astrogliose e perda neuronal seletiva (BORUCKI D. et al., 2020; GUMINA V. et al., 2019; GOTZL JK. et al., 2014).

A PGRN está fortemente ligada à DFT, uma das principais causas de demência após a doença de Alzheimer, incluindo síndromes clínicas, sendo a mais comum a variante comportamental, que é caracterizada por mudanças no comportamento e de personalidade, incluindo apatia, desinibição, diminuição da interação social e comportamento compulsivo.

Algumas anormalidades comportamentais mais comuns de camundongos com ausência na produção de PGRN incluem a depressão aumentada, o déficit de aprendizagem espacial e memória e a interação social reduzida (YIN F. et al., 2010; PETKAU TL. et al., 2010). Os déficits comportamentais podem ser mais graves em animais machos, como foi relatado que o gene da PGRN é um dos genes responsivos a esteroides sexuais e que podem estar envolvidos na masculinização do hipotálamo com comportamento agressivo e ansioso (KAYASUGA Y. et al., 2007).

Apesar da relevância que a PGRN tem sido relatada pela literatura no processo de neuroproteção, pouco se sabe sobre sua funcionalidade durante a isquemia causada por BCCAO em modelos animais, faltam estudos descrevendo suas ações comportamentais e/ou cognitivas.



## **2 JUSTIFICATIVA**

Déficits neurodegenerativos afetam principalmente indivíduos acometidos por AVEi, diminuindo a qualidade e expectativa de vida. Mesmo com os métodos atualmente disponíveis na medicina moderna, suas causas e seus tratamentos ainda não são suficientemente efetivos. Neste contexto, as evidências da literatura apontam para uma importante função da PGRN na manutenção das conexões do SNC e na prevenção e/ou do surgimento de deficiências comportamentais e cognitivas. Assim, este trabalho busca investigar se a terapia de reposição desta glicoproteína poderia influenciar positivamente no tratamento após do AVEi.

## **3 HIPÓTESE**

Hipotetizamos que a indução da BCCAo, pode estar relacionada com o surgimento e/ou progresso de doenças neurodegenerativas, como déficits comportamentais e cognitivos, presumimos que a reposição central de PGRN irá contribuir para a neuroproteção e, conseqüentemente, melhorar o déficit cognitivo e comportamental de animais com oclusão parcial das carótidas.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.2 – Objetivo Geral**

Verificar o efeito neuroprotetor da administração crônica de PGRN em minimizar os prejuízos funcionais induzidos pelo modelo BCCAO, visando mimetizar a hipoperfusão cerebral crônica.

### **4.2 – Objetivos Específicos**

4.2.1 – Avaliar alterações funcionais motoras, comportamentais e cognitivas em camundongos submetidos ao modelo de (BCCAO).

4.2.2 – Avaliar alterações funcionais relacionadas ao comportamento do tipo ansioso após o tratamento crônico com progranulina recombinante via intracerebroventricular, em camundongos submetidos a BCCAO.

4.2.3 – Avaliar alterações funcionais relacionadas a memória de curto prazo após o tratamento crônico com progranulina recombinante via intracerebroventricular, em camundongos submetidos a BCCAO.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Estudos em Neuroendocrinologia e Comportamento – LENEC, do Departamento de Ciências Fisiológicas (Centro de Ciências Biológicas – CCB, bloco G) da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

Aspectos Éticos: Todos os procedimentos foram realizados por experimentadores treinados no manuseio dos animais, de acordo com a resolução normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018 e a resolução normativa nº 30, de 02 de fevereiro de 2016 do CONCEA e de acordo com a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais, além dos princípios internacionais para a prática envolvendo animais, constantes do Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th edition, 2011) do National Research Council of the National Academies. Todos os cuidados necessários e os protocolos experimentais utilizados neste projeto foram devidamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC sob o número 6666211022.

### 5.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos C57bl/6 de 2 meses e meio de idade, mantidos em mini isoladores Ventilife (Alesco®) no Biotério Setorial de camundongos do Departamento de Ciências Fisiológicas. Foram colocados em caixas coletivas (com 4 animais adultos cada) de polipropileno forradas com maravalha, aclimatados à temperatura controlada ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) com sistema de circulação de ar em fluxo contínuo e baixa velocidade, sob regime de luz com ciclo claro-escuro de 12 horas (luz, 06:00–18:00h) e livre acesso à água filtrada e alimento (ração padrão industrial). Houve troca das caixas e reposição da água e ração 2 vezes por semana. Os animais foram provenientes da colônia do Laboratório Islet Biology and Metabolism Lab foram utilizados para início da própria colônia de camundongos. Apenas camundongos machos foram utilizados na pesquisa por ênfase em estudar alterações em um único gênero e tempo hábil de realização do projeto, as fêmeas nascidas não foram utilizadas no projeto e houve a eutanásia após a confirmação do gênero.

Todos os animais submetidos a manipulações cirúrgicas e eutanásia foram previamente anestesiados com injeção intraperitoneal (ip) de uma mistura de

Cetamina (75mg/Kg) e Xilazina (10mg/Kg) associadas na mesma seringa. A avaliação da efetividade anestésica foi baseada na ausência dos reflexos córneo palpebral, interdigital e pinçamento da cauda. Após o término das cirurgias, os animais receberam três doses de analgésico (ketoprofeno, via subcutânea 2mg/kg), por recomendação veterinária, sendo a primeira assim que encerrou a cirurgia, a segunda 2 dias após e a terceira 4 dias após.

Os testes foram realizados entre o horário das 7am às 12pm, com os animais aclimatados ao ambiente por no mínimo 60 minutos antes do início, com registros salvos em vídeos, sendo analisados de forma cega em relação aos grupos experimentais.

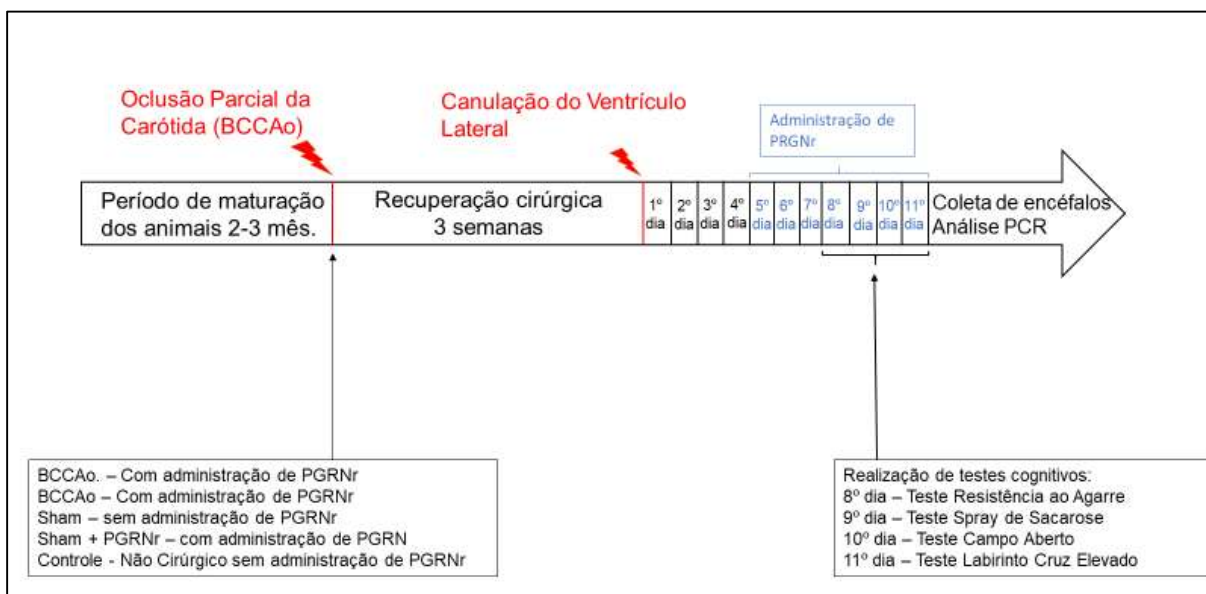
## **5.2 Delineamento Experimental**

Animais adultos machos de 2 e meio de idade foram submetidos a cirurgia de BCCAo ou a cirurgia fictícia e mantidos em suas gaiolas, foram aguardadas 3 semanas para recuperação dos animais, até os animais ser submetidos a cirurgia estereotáxica, que ocorreu 1 semana antes da realização dos testes.

### **5.2.1 Avaliação de repostas comportamentais em camundongos com BCCAo.**

No 5<sup>a</sup> 6<sup>a</sup> 7<sup>a</sup> dias após a cirurgia estereotáxica, os animais com implante de cânula intracerebroventricular (icv) receberam (via microinjeção) a administração de progranulina recombinante de 250 ng/ $\mu$ l baseados nos estudos de Hummel et. al. (2021), ou seu veículo (salina 10%). No dia dos testes (dias 8, 9, 10 e 11) comportamentais foi realizada também uma aplicação icv de PGRNr 20 minutos antes após este período, os animais foram colocados nos devidos aparatos para avaliações de resistência ao agarre (1<sup>o</sup> dia teste), spray de sacarose (2<sup>o</sup> dia teste), teste do campo aberto (3<sup>o</sup> dia teste) e do labirinto em cruz elevado (4<sup>o</sup> dia teste). Um outro conjunto de animais sem quaisquer manipulação cirúrgica foram utilizados como animais controle, sendo submetidos aos mesmos procedimentos comportamentais.

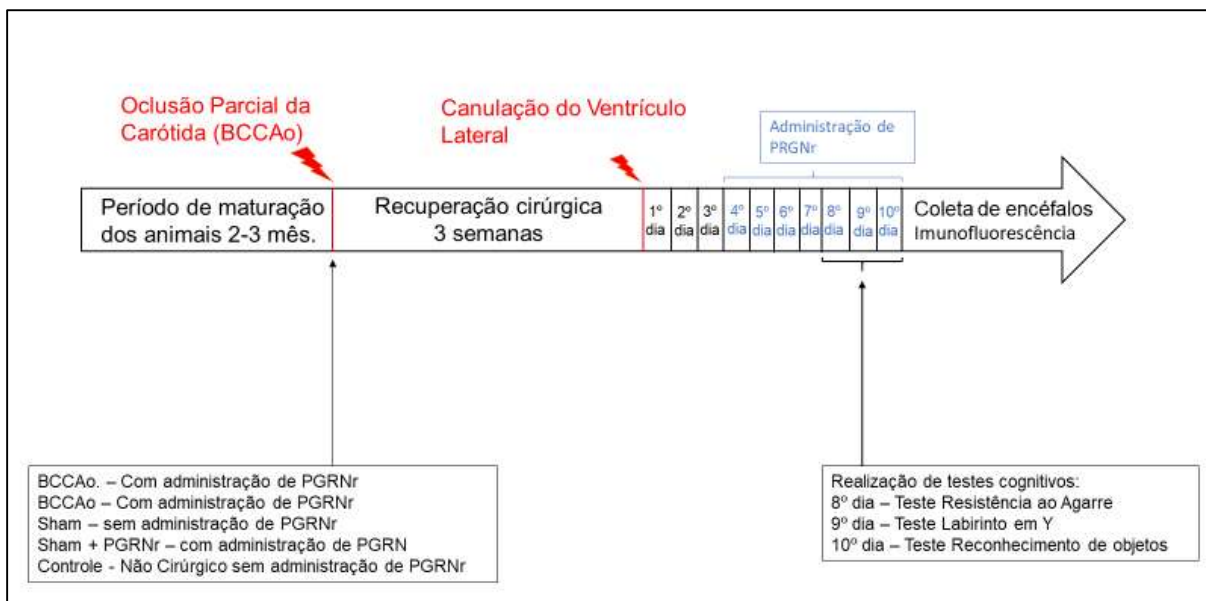
Figura 11. Esquema do delineamento experimental para testes comportamentais



### 5.2.2 Avaliação de repostas cognitivos em camundongos com BCCAo.

No 4ª 5ª 6ª dias após a cirurgia estereotáxica, os animais com implante de cânula intracerebroventricular (icv) receberam (via microinjeção) a administração de progranulina recombinante de 250 ng/μl baseados nos estudos de Hummel et. al. (2021), ou seu veículo (salina 10%). No dia dos testes (dias 8, 9 e 10) cognitivos foi realizada também uma aplicação icv de PGRNr 20 minutos antes. Após este período, os animais foram colocados nos devidos aparatos para avaliações de resistência ao agarre (1º dia teste), labirinto em Y (2º dia teste) e reconhecimento de objetos (3º dia teste). Um outro conjunto de animais sem quaisquer manipulação cirúrgica foram utilizados como animais controle, sendo submetidos aos mesmos procedimentos comportamentais.

Figura 12. Esquema do delineamento experimental para testes cognitivos



### 5.2.3 Fármaco Utilizado

Para a realização das micro-injeções por via intracerebroventricular (icv), foi utilizado uma seringa Hamilton de 10 $\mu$ l e uma agulha dental (200 $\mu$ m de diâmetro), conectados através de um tubo PE-10 de polietileno de 20cm. O volume final de cada administração no ventrículo lateral foi de 2 $\mu$ l de solução, durante um período de 30 a 60s. O fármaco PGRN recombinante 250 ng/ $\mu$ l ou 2  $\mu$ g no total; R&D Systems (Hummel et al., 2021) foi diluído em salina isotônica (NaCl 0,15M) livre de pirógenos.

### 5.3 Procedimentos Cirúrgicos

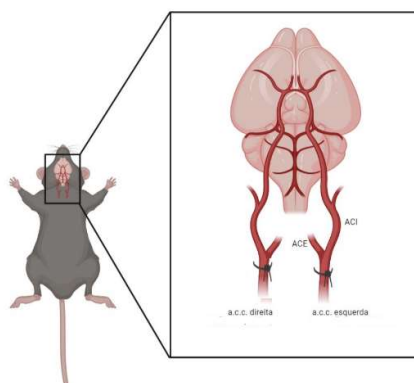
Para ambos procedimentos cirúrgicos houve o tempo de duração aproximado de 30 min com uma taxa de mortalidade de 2%, não houve possibilidade de controle de temperatura corporal.

#### 5.3.1 Oclusão parcial bilateral das carótidas comuns

O protocolo utilizado foi descrito previamente por GONÇALVES et al. (2018), no qual a isquemia vascular cerebral foi induzida por oclusão bilateral das artérias carótidas comuns. Os animais foram anestesiados e uma incisão ventral na linha

média será feita no pescoço. As artérias carótidas comum esquerda e direita foi exposta, delicadamente separada do nervo vago, e ocluídas com uma linha de algodão amarrada ao redor dos vasos de forma permanente até ocorrer a eutanásia (Figura 13). A pele foi suturada para finalização do procedimento. Nos animais falsos operados (sham) as artérias carótidas comuns foi exposta, porém não ocluídas.

Figura 13. Representação da oclusão bilateral das carótidas comuns

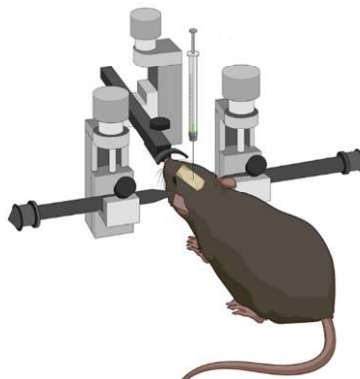


Legenda: Representação esquemática da oclusão parcial bilateral das carótidas comuns, sendo utilizado linha de algodão. Fonte: BioRender.

### 5.3.2 Canulação do Ventrículo Lateral

O animal foi anestesiado e posicionado em decúbito ventral, em um aparelho estereotáxico para pequenos animais (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) com a cabeça em posição horizontal (0 mm da linha interaural). Após tricotomia de cabeça, o osso parietal sendo exposto na região do bregma através de uma pequena incisão na pele. Uma abertura no osso parietal foi realizada, de acordo com as seguintes coordenadas: 0,5 mm posterior ao bregma, 1,1 mm lateral à linha mediana (Paxinos e Franklin, 2001). Uma cânula guia de agulha hipodérmica de tamanho de 10 mm foi fixada ao suporte do estereotáxico foi introduzida na abertura do osso parietal 1,0 mm abaixo da superfície do osso. Essa cânula guia esteve fixada ao crânio do animal utilizando resina acrílica odontológica autopolimerizável com auxílio de pequenos parafusos de aço inoxidáveis previamente fixados ao crânio do animal. Após fixação, o mandril de aço inoxidável foi introduzido na cânula para evitar a obstrução da mesma (Figura 14).

Figura 14. Representação da cirurgia de canulação do ventrículo lateral encefálico



Legenda: Representação da fixação da cânula ao crânio do animal utilizando resina acrílica odontológica autopolimerizável. Fonte: BioRender.

#### **5.4 Testes para avaliação comportamental**

Os testes de spray de sacarose, campo aberto e labirinto em cruz elevada, promovem parâmetros indicativos de ansiedade nos animais (NAKASHIMA et al., 2003; NEIGH et al., 2009; SOARES et al., 2013).

##### **5.4.1 Teste de spray de sacarose**

Neste teste, foi borrifado 1mL de solução de 10% de sacarose no dorso do animal, que foram dispostos, individualmente, em uma caixa acrílica (13 x 13 x 8 cm). Devido à sua viscosidade, a solução de sacarose “suja” o pelo do animal, induzindo um comportamento de autolimpeza (grooming) do mesmo. Depois de aplicar a solução de sacarose, a frequência (repetições) do comportamento de grooming e levantamentos são observadas por 5 minutos (ISINGRINI et al., 2010).

##### **5.4.2 Teste de campo aberto**

O teste do campo aberto foi proposto originalmente como medida de avaliação da emocionalidade em roedores. O teste consiste em colocar o camundongo em uma caixa com paredes maiores que seu ambiente natural, de modo que vivencie uma



situação de conflito entre explorar a novidade e esquivar-se frente ao estresse provocado pelo ambiente novo. Sabe-se que os padrões de exploração são influenciados pelo estado emocional dos animais, o qual pode estar alterado após isquemia cerebral, assim como acontece em humanos acometidos por essa doença (LEPPÄVUORI et al., 2003; NEIGH et al., 2009; SOARES et al., 2013).

O aparato, feito de madeira, possui 40 cm de largura x 40 cm de comprimento x 30 cm de altura, com 4 quadrantes na área central e 4 em cada lateral. Cada camundongo foi colocado no centro de campo aberto e permitindo-se que explore livremente o aparato por 5 minutos. Foram avaliados os seguintes parâmetros comportamentais: tempo em segundos no centro e tempo na periferia. A atividade locomotora dos animais foi avaliada no teste contando-se o número de quadrantes percorridos (ANTUNES; BIALA, 2012; BALKAYA et al., 2013; LEGER et al., 2013). Esse teste é comumente utilizado para avaliar função motora e locomoção exploratória dos animais.

#### **5.4.3 Labirinto em cruz elevado**

O labirinto em cruz elevado representa uma ferramenta útil para estudos de comportamentos relacionados à ansiedade/depressão. O aparato consistiu em quatro braços dispostos em forma de sinal da cruz. Feito de madeira, cada braço possui 30cm de comprimento x 6 cm de largura e 14 cm de altura nos braços fechados, elevados a 60 cm da base. Dois braços opostos são cercados por paredes de 6 cm de altura (braços fechados); ao passo que os outros dois braços são desprovidos de paredes (braços abertos). A área de junção que conecta os quatro braços (plataforma central) tem 6 x 6 cm. O protocolo experimental consiste em colocar os camundongos (individualmente) na plataforma central de frente para o um braço fechado e observar durante um período de 5 minutos.

Os seguintes parâmetros foram analisados: a % do tempo de entradas nos braços abertos e nos braços fechados não incluindo o centro e a % total (incluindo o centro), o tempo gasto nos braços abertos, braços fechados e centro, foi considerada apenas a entrada quando as quatro patas do animal estavam na região. (RODGERS e DALVI, 1997).

## **5.5 Testes para avaliação cognitiva**

### **5.5.1 Teste labirinto Y**

O labirinto em Y avalia memória de trabalho ou operacional em roedores. Os braços avaliam a exploração, isto é, se a primeira escolha do animal foi o braço 'a', na segunda ele tenderá a preferir o braço 'b' (não visitado). Esse movimento é denominado alternância espontânea e danos em estruturas encefálicas, como o hipocampo podem prejudicá-lo (DEACON E RAWLINS, 2006).

O labirinto simétrico em Y, feito de acrílico, consiste em três braços separados por 120 graus. Cada braço tem 30 cm de comprimento x 20 cm de altura x 6 cm de largura. Cada camundongo foi colocado no centro do labirinto Y e permitido explorar livremente através do labirinto durante uma sessão de 5 minutos. A sequência e o número total de entradas em todos os braços do labirinto foram registrados. Foi considerado como entrada no braço quando as patas traseiras do camundongo estiverem completamente colocadas no braço. Alternância percentual foi calculada com base na fórmula que leva em consideração o número de entradas nos três braços, dividido pelo número de alternâncias (o número total entradas nos braços - 2) / número de alternância  $\times 100$  (MIEDEL adaptado, 2017).

### **5.5.2 Teste de reconhecimento de objetos**

O aparelho utilizado para o teste da realocação de objeto é o campo aberto. Os objetos são dois retângulos plásticos idênticos (3 cm lado X 4,5 cm lado X 4,5 cm altura) os quais foram colados ao chão de maneira equidistante 7 cm de dois lados da caixa. Após 24 horas, os animais foram expostos ao campo aberto por 5 minutos, contudo nesta apresentação (treino) dois objetos idênticos eram apresentados aos animais. Neste momento, serão registrado o tempo de exploração de cada um dos objetos colocados na caixa.

Depois do treino os animais retornaram à sua caixa moradia e aguardavam até o momento do teste, 120 minutos após o treino. No momento do teste, um dos objetos foi trocado por um objeto novo. Neste momento registrou-se, novamente, o tempo de exploração de cada um dos objetos. Os seguintes comportamentos foram considerados como exploração do objeto: cheirar, tocar ou observar o objeto a menos

de 1 cm de distância. Este tempo de exploração dos objetos foi utilizado para o cálculo do índice de preferência e discriminação dos objetos, o qual foi utilizado como parâmetro de memória de curto prazo. O índice de discriminação permite medir a diferença entre o tempo de exploração do objeto novo ( $T_n$ ) e o tempo de exploração do objeto familiar ( $T_f$ ), dividindo-se esse valor pelo tempo total de exploração [ $ID = (T_n - T_f) / (T_n + T_f)$ ], que resulta em um valor entre +1 e -1. O índice de preferência foi calculado a partir da relação entre o tempo de exploração do objeto novo sobre o tempo total de exploração dos objetos [ $IP = (T_n \times 100) / (T_n + T_f)$ ]. (LEGER et al., 2013; ASSINI et al., 2009).

## **5.6 Teste para avaliação de déficit neuromotor**

### **5.6.1 Resistência de agarre**

Durante a avaliação, o experimentador segurou o camundongo pela cauda, permitindo que o animal agarrasse o suporte com as patas dianteiras e, após 2 segundos nessa posição, o examinador exerceu uma leve força (sempre paralela à superfície) até que o animal soltasse o suporte. O pico de força máxima foi registrado automaticamente no aparelho quando o animal soltou o suporte e a força de agarre foi expressa em gramas força (gf). Foi calculada a média de 3 tentativas por camundongo, com um período máximo de 60 segundos para cada animal. (BALKAYA et al., 2013; FOWLER et al., 2002; MORAES et al., 2016). Utilizou-se um transdutor de força (Force Gauge, Instrutherm, Brasil) conectado a um suporte metálico.

Os indivíduos acometidos por AVE frequentemente apresentam déficits motores (HESHMATOLLAH et al., 2020; LIM et al., 2004). Isso também pode ser observado em modelos animais de isquemia cerebral podendo ser avaliado através de testes que comparam sua força muscular após procedimento cirúrgico de indução de modelo AVEi (BALKAYA et al., 2013).

## **5.7 Análise Estatística**

As análises estatísticas foram realizadas após os dados passarem pelo teste de normalidade e usando o teste ANOVA de uma via, seguido por testes post-hoc de Tukey para comparar mais de dois grupos, usando o pacote de software GraphPad

PRISM 9. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) de pelo menos três experimentos independentes e o valor de significância foi definido como \*  $p < 0,05$ . Utilizando n 10 animais por grupo, com duplas avaliações realizadas nos vídeos sendo elas, a cegas.

## **6 RESULTADOS**

### **6.1 Efeito sobre os déficits neuromotor de camundongos submetidos à isquemia cerebral induzida por BCCAO.**

Neste bloco experimental, foram analisados os grupos controle, sham e BCCAO. Os animais submetidos a BCCAO foram avaliados utilizando os testes de comparação de força muscular de membros superiores e posteriormente, a avaliação dos testes comportamentais. Segundo BALKAYA et al., 2013, uma característica observada em modelos animais de isquemia cerebral é a diminuição de força muscular sem redução de capacidades locomotoras.

Dessa forma, os animais submetidos a BCCAO foram avaliados utilizando os testes de comparação de força muscular de membros superiores e posteriormente, a avaliação do teste de locomoção medindo a quantidade de quadrantes percorridos.

Com o teste de resistência ao agarre, avaliando a força muscular de membros superiores em gramas/força, a Figura 15 demonstra que, o grupo de animais submetidos a cirurgia Sham não obteve diferenças significativas quando comparados ao grupo controle, já os animais submetidos a cirurgia BCCAO obtiveram redução significativa da força muscular quando comparados tanto ao grupo controle, quanto ao grupo sham ( $F_{(2, 57)} = 24,56$ ;  $P < 0,05$ ).

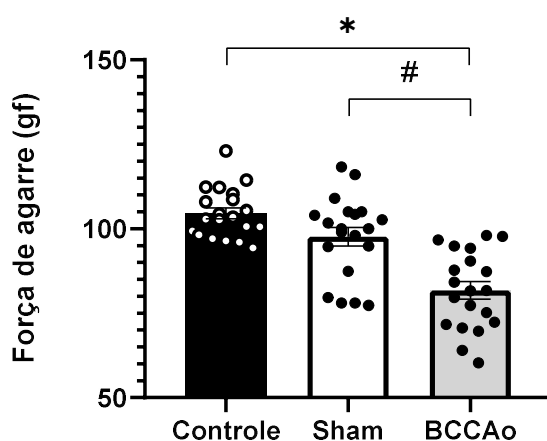


Figura 15. Avaliação de força (grama-força, gf) em camundongos submetidos a oclusão parcial das carótidas (BCCAO). As colunas representam a Média±EPM dos grupos controle sem manipulações, sham com cirurgia fictícia e BCCAO submetidos a oclusão (Círculos das colunas representam cada animal de cada grupo, n= 20 por grupo). Foi utilizado o teste Anova One-Way seguido do pós-teste de Tukey, \* e # P<0.05 vs controle ou sham.

Para o teste de mobilidade, avaliando a distância percorrida em número de quadrantes do aparato do campo aberto, a Figura 16 demonstra que, os animais submetidos a cirurgia BCCAO não obtiveram alterações em sua locomoção quando comparados ao grupo controle e ao grupo sham ( $F(2, 24) = 0,46$ ;  $P > 0,05$  para ambos).

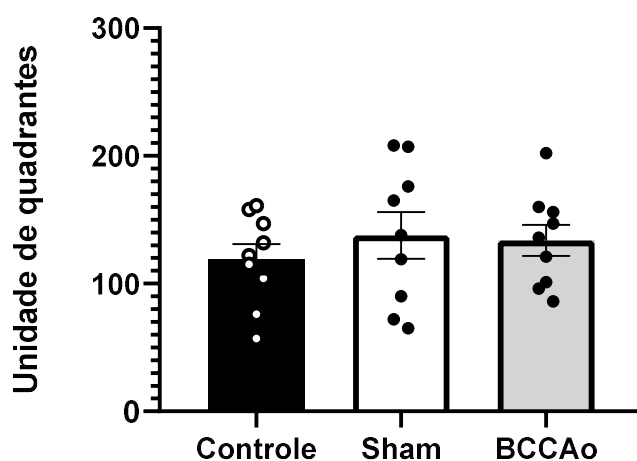


Figura 16. Avaliação de Mobilidade (distância percorrida em número de quadrantes) em camundongos submetidos a oclusão parcial das carótidas (BCCAO). As colunas representam a Média±EPM dos grupos controle sem manipulações, sham com cirurgia fictícia e BCCAO submetidos a oclusão (Círculos das colunas representam cada animal de cada grupo, n= 09 por grupo). Anova One-Way seguido do pós-teste de Tukey.

## 6.2 Efeito sobre os déficits comportamentais de camundongos submetidos à isquemia cerebral induzida por BCCAO.

Neste bloco experimental, foram analisados os grupos controle, sham e BCCAO. Utilizando os testes de spray de sacarose, campo aberto e labirinto em cruz elevado para análise de parâmetros comportamentais. Segundo LEPPÄVUORI et al., 2003; NEIGH et al., 2009; SOARES et al., 2013, os padrões de exploração são influenciados pelo estado emocional dos animais, assim como acontece em humanos acometidos por AVE. O comportamento tipo ansioso também é identificado em modelos animais de isquemia cerebral (SOARES et al., 2013).

No teste de spray de sacarose, avaliando o número de repetições de “grooming” (autolimpeza), a Figura 17A demonstra que, os animais submetidos a cirurgia BCCAO não obtiveram alterações de repetições quando comparados aos grupos controle e ao grupo sham ( $F(2, 27) = 2,04$ ;  $P > 0,05$  para ambos). Quando comparado o número de levantamentos, a Figura 17B demonstra que, os animais submetidos a cirurgia BCCAO obtiveram redução significativa do número de levantamentos quando comparado ao grupo controle, curiosamente, o grupo sham, também obteve redução significativa, quando comparado ao grupo controle ( $F(2, 27) = 6,96$ ;  $P < 0,05$  para ambos).

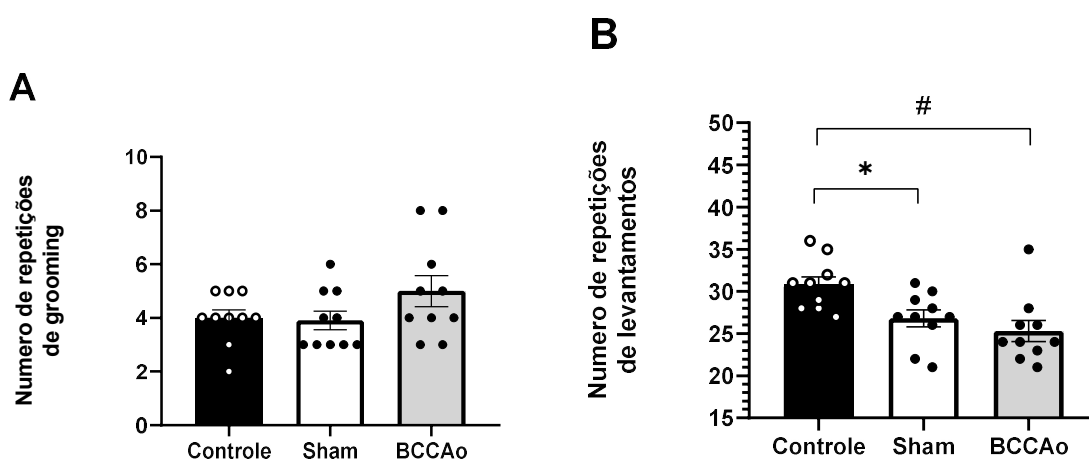


Figura 17. Avaliação do número de repetições de grooming (A) e do número de repetições de levantamentos (B) pelo teste de Spray de Sacarose em camundongos submetidos a oclusão parcial das carótidas (BCCAO). As colunas representam a Média±EPM dos grupos controle sem manipulações, sham com cirurgia fictícia e BCCAO submetidos a oclusão (Círculos das colunas representam cada

animal de cada grupo, n= 10 por grupo). Anova One-Way seguido do pós-teste de Tukey, \* e # P<0.05 vs controle ou sham.

Já com o teste de campo aberto, avaliando o tempo gasto em segundos pelos animais, na periferia e no centro do aparelho, a Figura 18A demonstra que, os animais submetidos a cirurgia BCCAO não obtiveram alterações no tempo gasto na região de periferia do aparelho, quando comparados aos grupos controle e ao grupo sham ( $F(2, 24) = 1,38$ ;  $P > 0,05$  para ambos). Quando comparado o tempo no centro, a Figura 18B demonstra que, os animais submetidos a cirurgia BCCAO também não obtiveram alterações no tempo gasto na região do centro do aparelho, quando comparados aos grupos controle e ao grupo sham ( $F(2, 24) = 1,67$ ;  $P > 0,05$  para ambos).

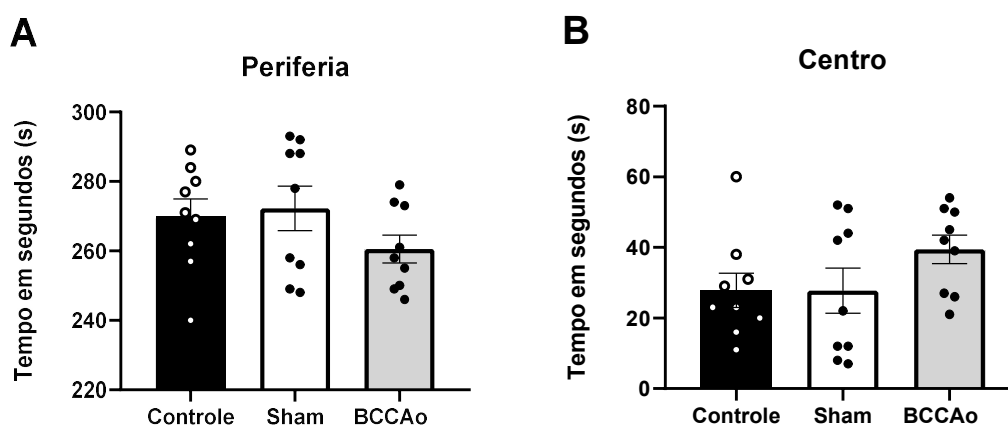


Figura 18. Avaliação do tempo em segundos na periferia (A) ou no centro (B) do teste de Campo Aberto em camundongos submetidos a oclusão parcial das carótidas (BCCAO). As colunas representam a Média±EPM dos grupos controle sem manipulações, sham com cirurgia fictícia e BCCAO submetidos a oclusão (Círculos das colunas representam cada animal de cada grupo, n= 09 por grupo). Anova One-Way seguido do pós-teste de Tukey,

Utilizando o teste do labirinto em cruz elevada, avaliando o tempo gasto em segundos pelos animais, no braço fechado, no braço aberto e no centro, a Figura 19A demonstra que, os animais submetidos a cirurgia BCCAO obtiveram aumento significativo na porcentagem (%) de permanência do tempo no braço fechado, quando comparados ao grupo controle e ao grupo sham ( $F(2, 21) = 7,09$ ;  $P < 0,05$  para ambos). A Figura 19B demonstra que, o grupo de animais submetidos a cirurgia BCCAO obtiveram diminuição significativa na % de permanência do tempo no braço aberto, quando comparados ao grupo controle e ao grupo sham ( $F(2, 21) = 7,09$ ;  $P < 0,05$  para ambos). No entanto, conforme a Figura 19C demonstra, os animais submetidos a

BCCAO reduziram a % de permanência do tempo no centro, quando comparados ao grupo controle, mas não houve diferença ao grupo sham, ( $F(2, 21) = 3,21$ ;  $P < 0,05$  para BCCAO vs controle;  $P > 0,05$  para BCCAO vs sham).

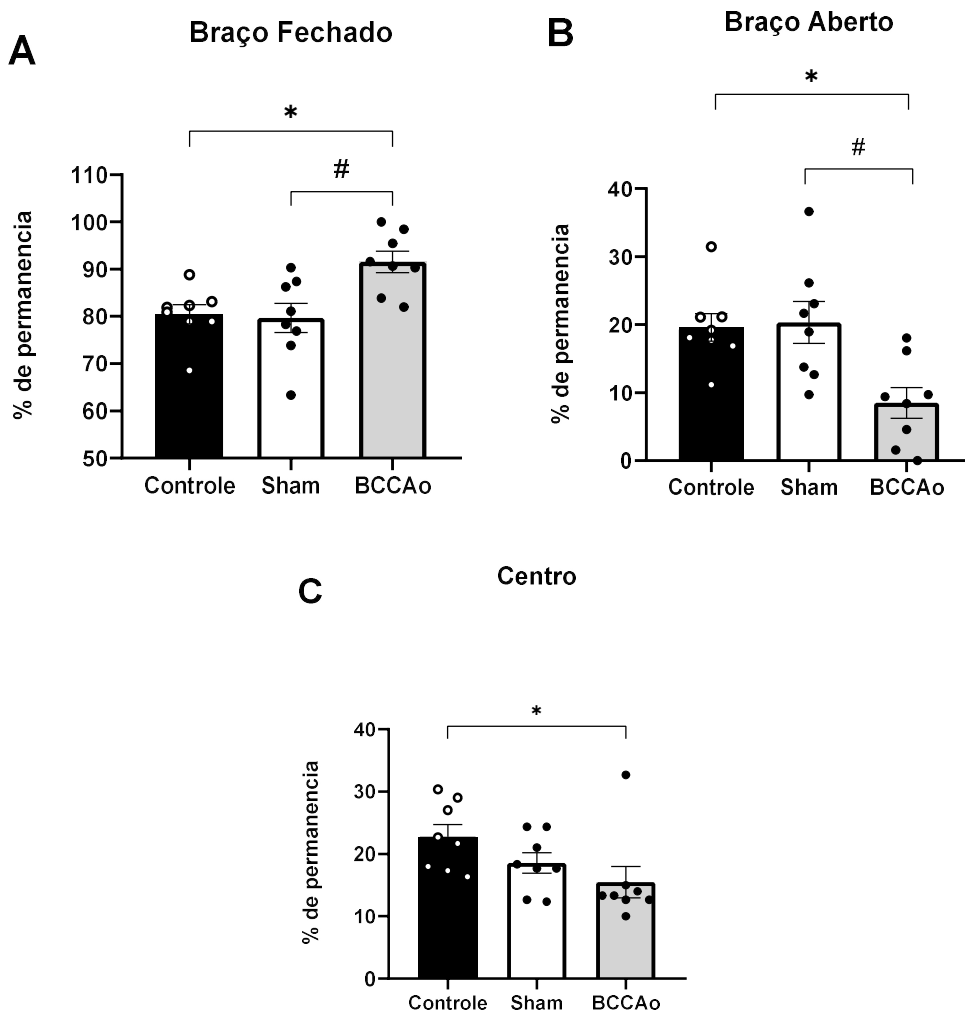


Figura 19. Avaliação da permanência (%) nos braços fechado (A), aberto (B) ou no centro (C), em camundongos submetidos a oclusão parcial das carótidas (BCCAO). As colunas representam a Média±EPM dos grupos controle sem manipulações, sham com cirurgia fictícia e BCCAO submetidos a oclusão (Círculos das colunas representam cada animal de cada grupo, n= 08 por grupo). Anova One-Way seguido do pós-teste de Tukey, \* e #  $P < 0,05$  vs controle ou sham.

### 6.3 Efeito sobre os déficits cognitivos de camundongos submetidos à isquemia cerebral induzida por BCCAO.

Neste bloco experimental, foram analisados os grupos controle, sham e BCCAO, utilizando os testes de labirinto em Y e reconhecimento de objetos para análise de parâmetros cognitivos. Segundo Deacon e Rawlins, 2006; Assini et al.,



2009; Buckmaster et al., 2004, roedores possuem um comportamento natural de exploração diante da novidade. A redução do movimento denominado “alternância espontânea” pode evidenciar danos em estruturas encefálicas, como no hipocampo, região a qual, pode prejudicar a memória espacial e de curta duração (ANTUNES; BIALA, 2012; LEGER et al., 2013). Para isso, testes cognitivos têm sido utilizados na avaliação dessas memórias.

No teste de labirinto em Y, avaliando o número total de entradas ( nos 3 braços), a Figura 20A demonstra que, os animais submetidos a cirurgia BCCAo não obtiveram alterações de número total de entradas quando comparados aos grupos controle e ao grupo sham ( $F(2, 21) = 3,40$ ;  $P > 0,05$  para ambos). Quando comparado a % de alternância, a Figura 20B demonstra que, os animais submetidos a cirurgia BCCAo obtiveram redução significativa da % de alternância quando comparado ao grupo controle e ao grupo sham ( $F(2, 21) = 17,77$ ;  $P < 0,05$  para ambos).

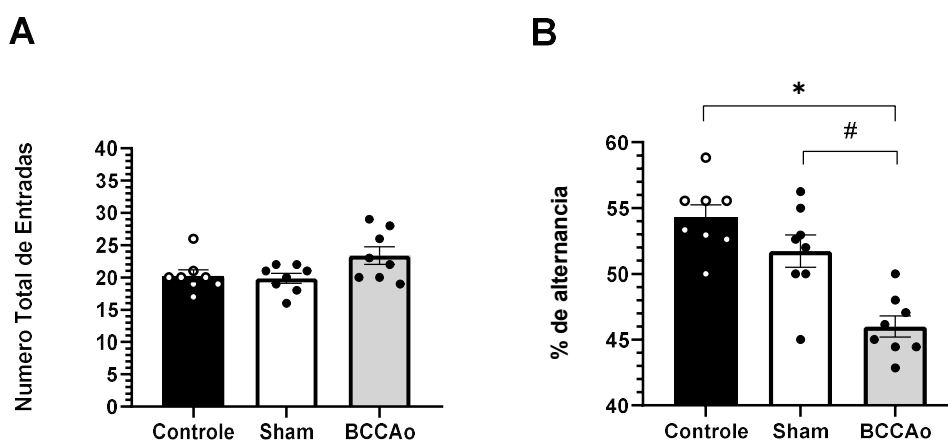


Figura 20. Avaliação do número total de entradas (A) e % de alternância (B) no teste de Labirinto em Y em camundongos submetidos a oclusão parcial das carótidas (BCCAo). As colunas representam a Média±EPM dos grupos controle sem manipulações, sham com cirurgia fictícia e BCCAo submetidos a oclusão (Círculos das colunas representam cada animal de cada grupo, n= 08 por grupo). Anova One-Way seguido do pós-teste de Tukey, \* e #  $P < 0.05$  vs controle ou sham.

No teste de reconhecimento de objetos, avaliando o tempo de exploração dos animais ao objeto novo e ao objeto familiar, na Figura 21A demonstra que, os animais submetidos a cirurgia BCCAo não obtiveram alterações ao tempo de exploração ao objeto novo, quando comparados aos grupos controle e ao grupo sham ( $F(2, 21) = 2,77$ ;  $P > 0,05$ ). A Figura 21B demonstra que, os o animais submetidos a cirurgia BCCAo obtiveram aumento significativo do tempo de exploração ao objeto familiar, quando comparado ao grupo controle e ao grupo sham ( $F(2, 21) = 24,90$ ;  $P < 0,05$  para

ambos). A Figura 21C demonstra que, os animais submetidos a cirurgia BCCAO não obtiveram alterações ao tempo de exploração total entre os dois objetos, quando comparados aos grupos controle e ao grupo sham ( $F(2, 21) = 0,50$ ;  $P > 0,05$  para ambos).

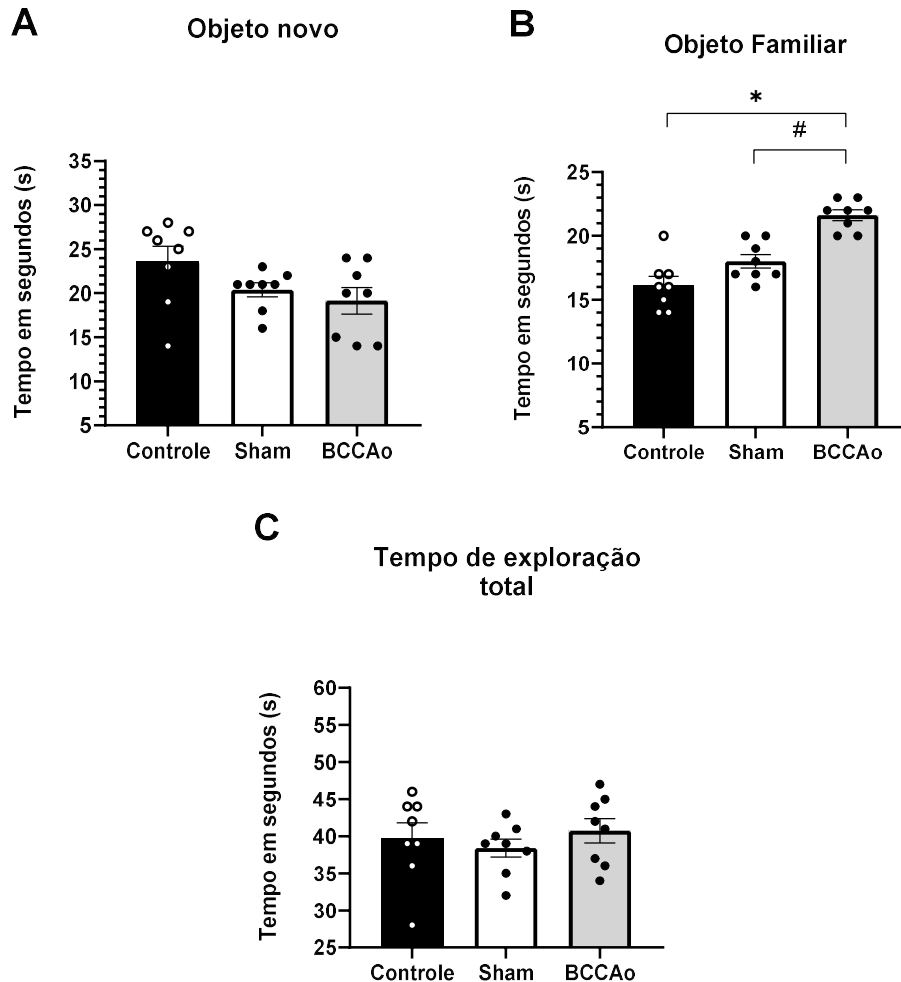


Figura 21. Avaliação do tempo de exploração de objeto novo (A), objeto familiar (B) e do tempo total (C) no teste de Reconhecimento de Objetos em camundongos submetidos a oclusão parcial das carótidas (BCCAO). As colunas representam a Média±EPM dos grupos controle sem manipulações, sham com cirurgia fictícia e BCCAO submetidos a oclusão (Círculos das colunas representam cada animal de cada grupo,  $n = 08$  por grupo). Anova One-Way seguido do pós-teste de Tukey, \* e #  $P < 0.05$  vs sham ou BCCAO.

Juntamente com os dados de tempo de exploração aos objetos novo e familiar, foram calculados os índices de discriminação (ID) e preferência (IP). A Figura 22A demonstra que, os animais submetidos a cirurgia BCCAO obtiveram redução no índice de preferência (considerado significativo ao teste apenas o inferior a 50%), quando comparado ao grupo controle e ao grupo sham ( $F(2, 21) = 14,36$ ;  $P < 0,05$  para ambos).

A Figura 22B demonstra que, os grupos de animais submetidos a cirurgia BCCAO obtiveram redução no índice de discriminação (sendo significativo ao teste apenas estando com valor inferior a 0), quando comparado ao grupo controle e ao grupo sham.

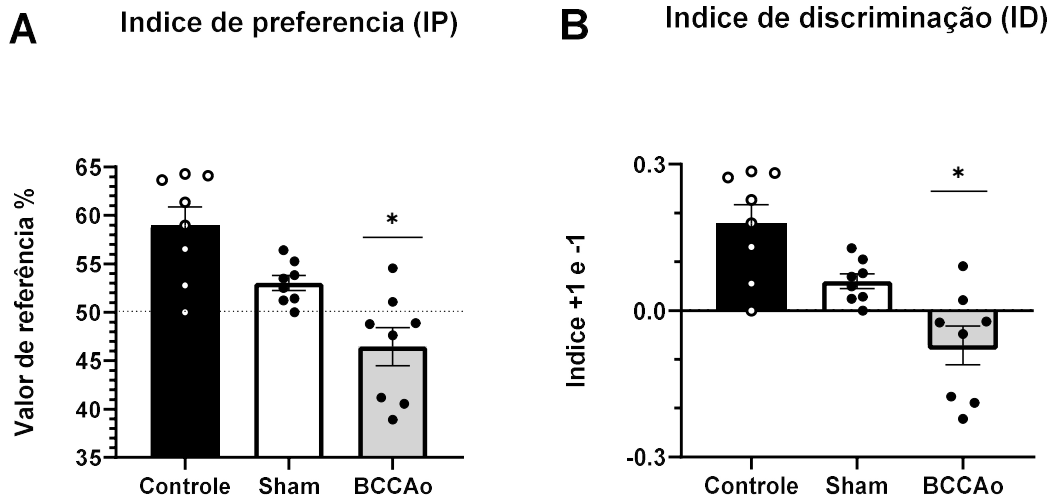


Figura 22. Índice de Preferência (A, medida em %) e Índice de Discriminação (B, valores entre +1 e -1) entre objetos novos e familiar no teste de Reconhecimento de Objetos em camundongos submetidos a oclusão parcial das carótidas (BCCAO). As colunas representam a Média±EPM dos grupos controle sem manipulações, sham com cirurgia fictícia e BCCAO submetidos a oclusão (Círculos das colunas representam cada animal de cada grupo, n= 08 por grupo). Anova One-Way seguido do pós-teste de Tukey, \*, & e # P<0.05 vs controle ou sham.

#### 6.4 Efeito do tratamento com PGRNr sobre os déficits comportamentais de camundongos submetidos à isquemia cerebral induzida por BCCAO.

Neste bloco experimental, foi analisado os parâmetros comportamentais de animais submetidos a BCCAO e tratados com PGRNr (BCCAO +PGRNr) utilizando os testes de spray de sacarose, campo aberto e labirinto em cruz elevado.

Para analisar o comportamento do tipo ansioso, utilizamos o teste de spray de sacarose, avaliando o número de repetições de “grooming” (autolimpeza), a Figura 23A demonstra que, os animais PGRNr obtiveram aumento de repetições quando comparados ao grupo e ao grupo sham, todavia, não obtiveram alterações de repetições quando comparados ao grupo e ao grupo BCCAO ( $F(2, 27) = 4,19$ ;  $P < 0,05$  PGRNr vs sham e  $P > 0,05$  PGRNr vs BCCAO). Quando comparado o número de levantamentos, a Figura 23B demonstra que, os animais PGRNr não obtiveram

alterações de repetições de levantamentos quando comparados ao grupo e ao grupo sham e BCCAo ( $F(2, 27) = 2,25$ ;  $P > 0,05$  para ambos).

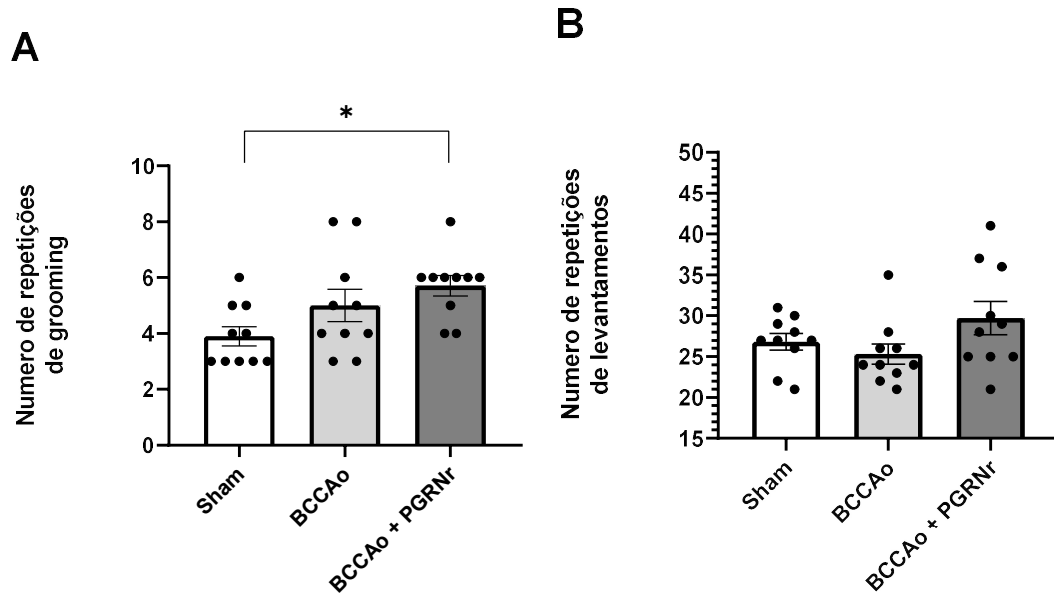


Figura 23. Avaliação do número de repetições de grooming (A) e do número de repetições de levantamentos (B) pelo teste de Spray de Sacarose em camundongos tratados com PGRNr (submetidos a oclusão parcial das carótidas e tratados com PGRNr icv (dose por 5 dias)). As colunas representam a Média±EPM dos grupos controle sem manipulações, sham com cirurgia fictícia e BCCAo submetidos a oclusão (Círculos das colunas representam cada animal de cada grupo, n= 10 por grupo). Anova One-Way seguido do pós-teste de Tukey, \* $P < 0.05$  vs sham.

No sentido de continuar investigando o comportamento do tipo ansioso, foi utilizado o teste de campo aberto, avaliando o tempo gasto em segundos pelos animais, na periferia e no centro do aparelho, a Figura 24A demonstra que, o grupo de animais PGRNr não obtiveram alterações no tempo gasto na região de periferia do aparelho, quando comparados aos grupos sham e ao grupo BCCAo ( $F(2, 24) = 1,45$ ;  $P > 0,05$ ). Quando comparado o tempo no centro, a Figura 24B demonstra que, o grupo de animais PGRNr também não obtiveram alterações no tempo gasto na região de centro do aparelho, quando comparados aos grupos sham e grupo BCCAo ( $F(2, 24) = 1,45$ ;  $P > 0,05$ ).

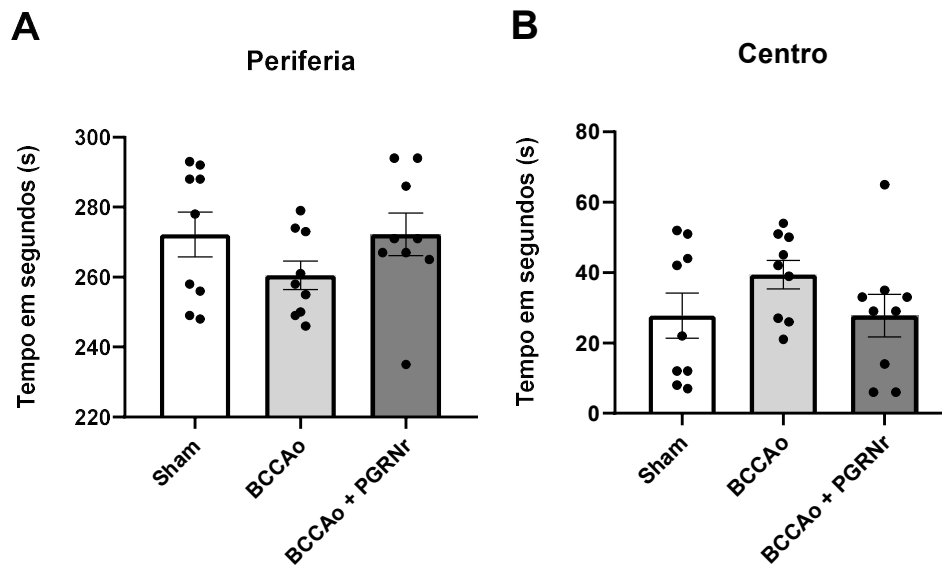


Figura 24 Avaliação do tempo em segundos na periferia (A) ou no centro (B) do teste de Campo Aberto em camundongos tratados com PGRNr (submetidos a oclusão parcial das carótidas e tratados com PGRNr icv (dose por 6 dias)). As colunas representam a Média±EPM dos grupos controle sem manipulações, sham com cirurgia fictícia e BCCAO submetidos a oclusão (Círculos das colunas representam cada animal de cada grupo, n= 09 por grupo). Anova One-Way seguido do pós-teste de Tukey,

No sentido de concluir as análises do comportamento do tipo ansioso, foi realizado o teste do labirinto em cruz elevada, avaliando a % de permanência do tempo gasto pelos animais no braço fechado, no braço aberto e no centro. A Figura 25A demonstra que, o grupo de animais submetidos a BCCAO teve aumento significativo da % de permanência do tempo no braço fechado, quando comparados ao grupo sham. Já o tratamento com PGRN reduziu significativamente a % de permanência do tempo no braço fechado quando comparados ao grupo de animais submetidos a BCCAO, ou seja, retornando aos resultados próximos ao grupo sham ( $F(2, 21) = 6,20$ ;  $P < 0,05$  BCCAO vs sham,  $P < 0,05$  PGRNr vs BCCAO,  $P > 0,05$  PGRNr vs sham). A Figura 25B demonstra que, o grupo de animais BCCAO diminuiu a % de permanência do tempo nos braços abertos, quando comparados ao grupo sham. Por outro lado, a PGRN reverteu os efeitos de redução da BCCAO na % da permanência do tempo no braço aberto, quando comparados com o grupo BCCAO, ou seja, retornando aos resultados próximos ao grupo sham ( $F(2, 21) = 4,21$ ;  $P < 0,05$  BCCAO vs sham,  $P < 0,05$  PGRNr vs BCCAO,  $P > 0,05$  PGRNr vs sham). Na Figura 25C demonstra que, não houve diferença significativa na % de tempo de permanência dos

animais BCCAO no centro do aparelho, quando comparados aos grupos sham e ao grupo PGRNr ( $F(2, 21) = 0,71$ ;  $P > 0,05$  para ambos).

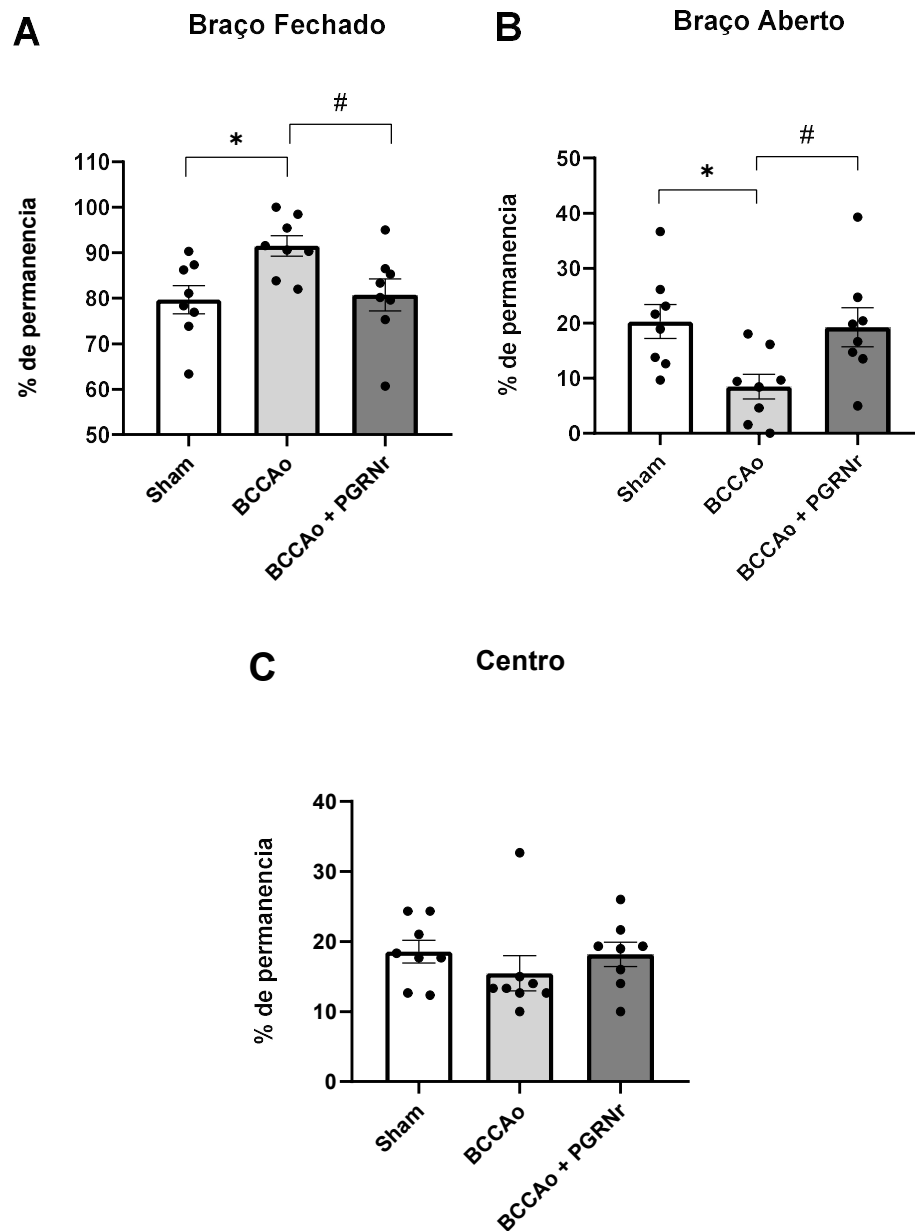


Figura 25. Avaliação da permanência (%) nos braços fechado (A), aberto (B) ou no centro (C), em camundongos tratados com PGRNr (submetidos a oclusão parcial das carótidas e tratados com PGRNr icv (dose por 7 dias)). As colunas representam a Média±EPM dos grupos controle sem manipulações, sham com cirurgia fictícia e BCCAO submetidos a oclusão (Círculos das colunas representam cada animal de cada grupo, n= 08 por grupo). Anova One-Way seguido do pós-teste de Tukey, \* e #  $P < 0.05$  vs sham ou BCCAO.

## 6.5 Efeito do tratamento com PGRNr sobre os déficits cognitivos de camundongos submetidos à isquemia cerebral induzida por BCCAo.

Neste bloco experimental, foram analisados os parâmetros cognitivos de animais submetidos a BCCAo e tratados com PGRNr (BCCAo +PGRNr) utilizando os testes de labirinto em Y e reconhecimento de objetos.

Para analisar a memória de trabalho ou operacional, foi utilizado o teste de labirinto em Y, avaliando o número total de entradas (número de entradas nos 3 braços), a Figura 26A demonstra que, o grupo de animais submetidos a BCCAo não obtiveram alterações de número total de entradas quando comparados aos grupos sham e ao grupo tratado com PGRNr ( $F(2, 21) = 2,04$ ;  $P > 0,05$  para ambos). Quando comparado a % de alternância, a Figura 26B demonstra que, o grupo de animais submetidos a BCCAo diminui a % de alternância, quando comparados ao grupo sha. Os animais tratados com PGRNr obtiveram o aumento significativo na % da alternância, quando comparados com ao grupo de animais submetidos a BCCAo, ou seja, retornando aos resultados próximos ao grupo sham  $F(2, 21) = 6,44$ ;  $P < 0,05$  BCCAo vs sham,  $P < 0,05$  PGRNr vs BCCAo,  $P > 0,05$  PGRNr vs sham).

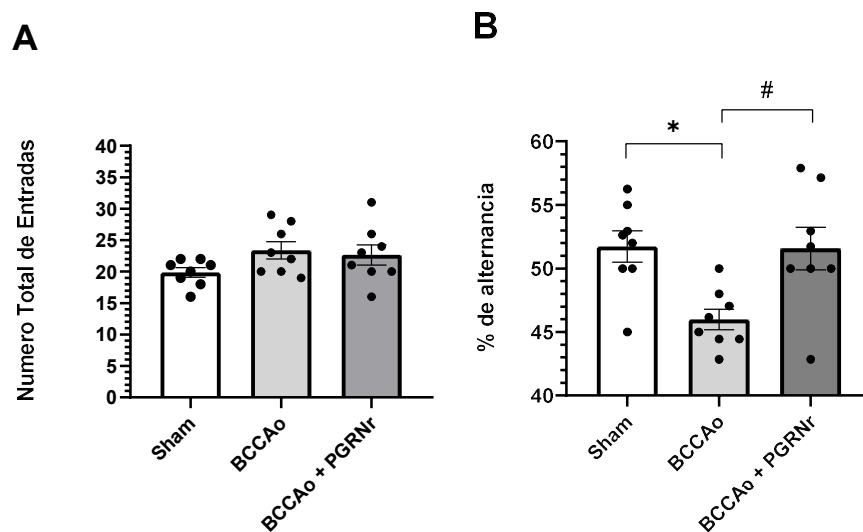


Figura 26. Avaliação do número total de entradas (A) e % de alternância (B) no teste de Labirinto em Y em camundongos tratados com PGRNr (submetidos a oclusão parcial das carótidas e tratados com PGRNr icv (dose por 6 dias)). As colunas representam a Média±EPM dos grupos controle sem manipulações, sham com cirurgia fictícia e BCCAo submetidos a oclusão (Círculos das colunas representam cada animal de cada grupo, n= 08 por grupo). Anova One-Way seguido do pós-teste de Tukey, \* e #  $P < 0,05$  vs sham ou BCCAo.

Para analisar a memória de curto prazo, foi utilizado o teste de reconhecimento de objetos, avaliando o tempo de exploração dos animais ao objeto novo e ao objeto familiar. A Figura 27A demonstra que, os animais tratados com PGRNr obtiveram aumento do tempo de exploração ao objeto novo, quando comparados ao grupo BCCAo ( $F(2, 21) = 6,35$ ;  $P < 0,05$ ). A Figura 27B demonstra que, os animais submetidos a cirurgia BCCAo obtiveram aumento significativo do tempo de exploração ao objeto familiar, quando comparado ao grupo sham. Os animais tratados com PGRNr obtiveram redução significativa do tempo de exploração ao objeto familiar em relação ao grupo BCCAo, ou seja, retornando aos resultados próximos ao grupo sham ( $F(2, 21) = 10,56$ ;  $P < 0,05$  BCCAo vs sham,  $P < 0,05$  PGRNr vs BCCAo,  $P > 0,05$  PGRNr vs sham). Já a Figura 27C demonstra que, os animais tratados com PGRNr obtiveram aumento significativo ao tempo de exploração total independente se o objeto é novo ou familiar, quando comparados ao grupo sham ( $F(2, 21) = 3,20$ ;  $P < 0,05$ ).

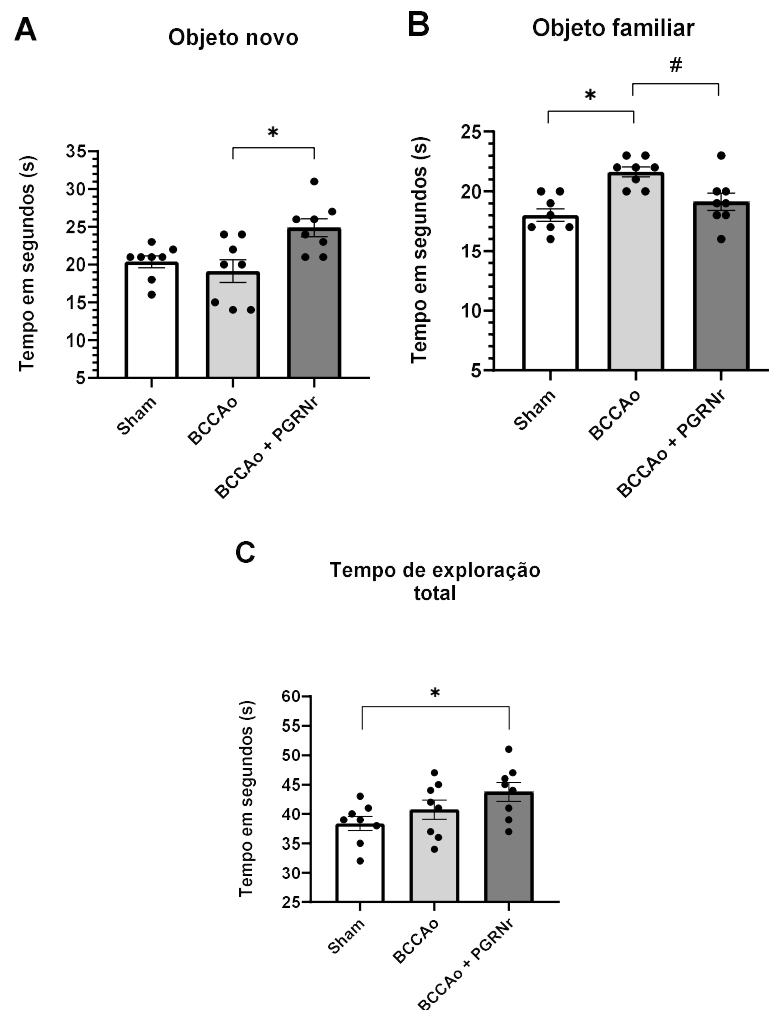


Figura 27. Avaliação do tempo de exploração de objeto novo (A), objeto familiar (B) e do tempo total (C) no teste de Reconhecimento de Objetos em camundongos tratados com PGRNr (submetidos a



oclusão parcial das carótidas e tratados com PGRNr icv (dose por 7 dias)). As colunas representam a Média±EPM dos grupos controle sem manipulações, sham com cirurgia fictícia e BCCAo submetidos a oclusão (Círculos das colunas representam cada animal de cada grupo, n= 08 por grupo). Anova One-Way seguido do pós-teste de Tukey, \* e # P<0.05 vs sham ou BCCAo.

Os dados de tempo de exploração aos objetos novo e familiar, foram calculados os índices de discriminação (ID) e preferência (IP), na Figura 28A demonstra que, os grupos de animais submetidos ao tratamento com PGRNr obtiveram aumento (acima de 50%) no índice no índice de preferência (considerado significativo ao teste apenas o inferior a 50%), quando comparados ao grupo BCCAo. O grupo sham também permaneceu com o valor acima de 50%, quando comparados ao grupo BCCAo. A Figura 22B demonstra que, os grupos de animais submetidos tratados com PGRNr obtiveram aumento no índice de discriminação, estando com valor superior a 0, quando comparado ao grupo ao grupo BCCAo. O grupo sham também permaneceu com o valor acima de 50%, quando comparados ao grupo BCCAo.

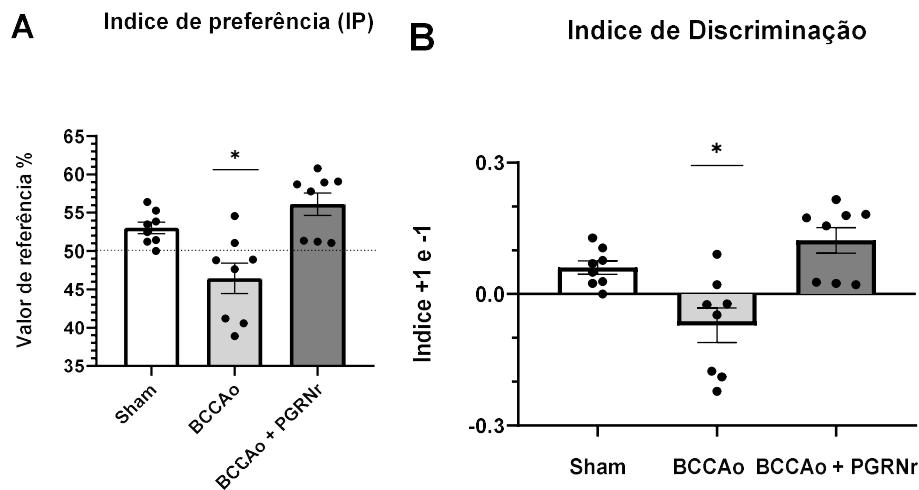


Figura 28. Índice de Preferência (A, medida em %) e Índice de Discriminação (B, valores entre +1 e -1) entre objetos novos e familiar no teste de Reconhecimento de Objetos em camundongos tratados com PGRNr (submetidos a oclusão parcial das carótidas e tratados com PGRNr icv (dose por 7 dias)). As colunas representam a Média±EPM dos grupos controle sem manipulações, sham com cirurgia fictícia e BCCAo submetidos a oclusão (Círculos das colunas representam cada animal de cada grupo, n= 08 por grupo). Anova One-Way seguido do pós-teste de Tukey, \*, & e # P<0.05 vs sham ou BCCAo.

## 7 DISCUSSÃO

Alguns estudos trazem informações importantes, sobre a taxa de sobrevivência a eventos isquêmicos, mas, não fornecem informações sobre o sucesso da recuperação do paciente (ESCOBAR et al., 2019). Como mencionado anteriormente, existe uma grande relevância clínica de sintomas, como depressão e ansiedade, pois, são comuns após um evento isquêmico, porém, ainda há poucos estudos sobre transtornos de disfunções físicas (VICENTINI et al., 2017). Sabe-se que inicialmente, os déficits motores são mais proeminentes na avaliação clínica de pacientes que sofreram isquemia cerebral (BAUMGARTNER et al., 2018) e, por isso, foram os primeiros sintomas avaliados por nosso estudo.

Este estudo demonstrou que o modelo 2VO de isquemia cerebral global utilizando a oclusão parcial bilateral das carótidas comuns (BCCAo), é capaz de desencadear déficits de força muscular sem afetar a mobilidade do animal. Além disso, o modelo animal escolhido para induzir isquemia cerebral produziu alterações cognitivas e comportamentais que se assemelham a análise clínica de pacientes que sofreram AVE (GONÇALVES et al., 2018; MARTINS-SILVA et al., 2021; SOARES et al., 2013; WAHUL et al., 2018).

Modelos animais de AVEi estudados anteriormente, apresentam comportamento do tipo ansioso em vários testes (NAKASHIMA et al., 2003; NEIGH et al., 2009; SOARES et al., 2013). Curiosamente, nosso modelo de AVEi causado por BCCAo, obteve alterações motivacionais como diminuição do número de levantamentos e maior % de tempo de permanência nos braços fechados do LCE, que são comportamentos considerados do tipo ansiolíticos (MORETTI et al., 2012).

Estudos levantam duas hipóteses para o surgimento de déficits comportamentais, a primeira é que as estruturas cerebrais diretamente comprometidas durante o AVEi estejam envolvidas na ansiedade/depressão (por exemplo, estruturas relacionadas a modulação emocional) (ÅSTRÖM, 1996; TANG et al., 2012). A segunda hipótese, é que a ansiedade/depressão não esteja associada com a localização do AVE, mas esteja correlacionada com a conectividade entre vários circuitos e redes neurais (LI et al., 2019; VICENTINI et al., 2017).

Para demonstrar consequências cognitivas do AVEi realizados em nosso estudo, foi avaliada a memória de trabalho ou operacional e memória de curta duração. Os animais apresentam prejuízo nas tarefas de alternância espontânea e reconhecimento de objeto novo, após 4 semanas de isquemia induzida BCCAo. Nossos achados vão ao encontro de diversos relatos na literatura (conforme o quadro acima), onde vemos que as alterações no hipocampo causam déficits cognitivos importantes, sendo uma estrutura cerebral consistentemente envolvida nos processos de aprendizagem e memória, demonstrando-se também, uma estrutura cerebral altamente vulnerável a insultos isquêmicos (FARKAS et al., 2007; ESCOBAR et al., 2019).

Estudos avaliaram a indução da isquemia transitória em ratos, na qual demonstraram que neurônios do hipocampo são particularmente mais sensíveis a neurodegeneração que neurônios de outras regiões (KIRINO, 1982; PULSINELLI et al., 1982). A neurodegeneração hipocampal inicia-se nas primeiras horas após a reperfusão e atinge um pico máximo dias após a isquemia (PULSINELLI et al., 1982; NIKONENKO et al., 2009). No entanto, com o passar do tempo após a reperfusão, o grau de neurodegeneração torna-se menor (BENDEL et al., 2005).

Liu Y. et al., 2016, mostraram em seus estudos que, modelos de camundongos com doenças neurodegenerativas envolvendo a patologia da demência frontotemporal induzida por clivagem da TDP-43 (DFT-TDP-43), apresentaram degeneração dos neurônios motores espinhais, neurônios corticais e lesão hipocampal significativa. Os dados foram consistentes com a rápida progressão da doença e sugerem que a perda neuronal precede a patologia muscular. Nossos achados corroboram aos dados da literatura, demonstrando que nosso modelo de isquemia causa perda da força e déficits de comportamento e memória.

Atualmente temos uma grande quantidade de fármacos que buscam benefícios como neuroprotetoras em modelos animais, porém, falham em fases clínicas (IADECOLA; ANRATHER, 2011). Faz-se necessário portanto, que ocorram estudos pré-clínicos que reflitam a realidade clínica, visando diversos alvos terapêuticos envolvidos na patologia da isquemia cerebral. Trabalhos demonstram que a PGRN está envolvido na neuroinflamação e lesão cerebral após a isquemia, ela foi ativada na microglia após lesão medular (NAPHADE et al., 2010) e lesão cerebral traumática

(TANAKA et al., 2013), indicando que a ativação da PGRN reflete em respostas microgliais. Foi demonstrado que a micróglia medeia a expansão do infarto através da inflamação na fase aguda (MABUCHI et al., 2000; YENARI et al., 2010), neste contexto, estudos recentes sugeriram que o PGRN pode suprimir a secreção de citocinas pró-inflamatórias e o recrutamento de neutrófilos associados à isquemia cerebral focal (TAO et al., 2012; EGASHIRA et al., 2013).

De acordo com Choi, et al (2020), um importante fator para intervenções terapêuticas é reduzir o dano isquêmico, intervindo em cascatas de eventos desencadeados pela isquemia cerebral, como o acúmulo excessivo de glutamato no meio extracelular ocorrendo a ativação de vias de morte celular e destruição de estruturas celulares. O autor defende que, modificar os processos iniciais tem a vantagem de inibir o início dessa cascata, porém é necessária intervenção precoce.

Estudos demonstram que, ao intervir apenas nos processos mais tardios dessa cascata de eventos, pode ter a vantagem de prolongar a janela terapêutica, com maior especificidade e menos efeitos adversos, no entanto, corre-se o risco de serem intervenções ineficazes, pois as vias não bloqueadas podem, ainda assim, provocar morte celular (BECERRA-CALIXTO; CARDONA-GÓMEZ, 2017; XU et al., 2020).

Em nosso trabalho observamos que a aplicação crônica e tardia de progranulina recombinante (PGRNr) diretamente no SNC, foi capaz de reduzir danos cognitivos e comportamentais ao modelo animal de isquemia induzida por BCCAO, possibilitando assim, futuros estudos translacionais. Vimos que animais tratados com PGRNr foram capazes de reestabelecer capacidades comportamentais e cognitivas como, maior número de grooming, maior atividade exploratória dos braços abertos do aparato, elevou a alternância espontânea e aumentou o reconhecimento de objeto novo, indicando redução do comportamento depressivo e redução de prejuízos na memória.

Trabalhos demonstraram que animais submetidos ao acidente vascular cerebral isquêmico apresentaram prejuízos na integridade da barreira hematoencefálica (BHE) (JIANG X. et al., 2018), sabe-se também que a PGRN também influencia o desenvolvimento e manutenção da BHE (JACKMAN K. et al., 2013), sugerindo efeitos positivos causados diretamente pela biodisponibilidade da PGRN. A PGRNr, mesmo níveis baixos tem potencial de intervir em diversos pontos na cascata de eventos desencadeados pela BCCAO, desde o acúmulo excessivo de glutamato no meio extracelular à ativação de vias de morte celular e destruição de

estruturas celulares (ARRANT AE et al., 2018). A PGRN também pode exibir efeitos protetores nas células neuronais após isquemia cerebral focal aguda, com base em análises utilizando camundongos transgênicos expressando PGRN (TAO et al., 2012) e camundongos knockout para PGRN (JACKMAN et al., 2013), embora a maioria dos mecanismos de neuroproteção permaneça desconhecido.

Além disso, outro estudo sugeriu que a superexpressão viral da PGRN protege neurônios positivos para tirosina hidroxilase no modelo 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) da doença de Parkinson (VAN KAMPEN et al., 2014). Finalmente, estudos demonstraram que camundongos deficientes em PGRN apresentam resultados piores do que camundongos do tipo selvagem em vários modelos de lesão ao sistema nervoso, incluindo lesão cerebral traumática, AVE e insultos inflamatórios (JACKMAN et al., 2013; TANAKA et al., 2013).

Estudos demonstram que o aumento dos níveis de PGRN neuronal é suficiente para corrigir déficits comportamentais em modelos de ratos com DFT. Isto indica que os níveis neuronais de PGRN são um alvo importante para o tratamento da DFT. (ARRANT AE et al. 2017).

Todos esses dados do trabalho sugerem que os efeitos comportamentais e cognitivos avaliados contribuíram para evidenciar que os animais tratados com PGRNr após a indução isquêmica por BCCAo tivessem um desempenho melhor nas avaliações. A diminuição de sequelas funcionais como a neuroinflamação é fundamental para que uma intervenção terapêutica seja considerada bem-sucedida. Dessa maneira, em um contexto em que não há terapias neuroprotetoras eficazes ao tecido cerebral após a isquemia, novos trabalhos precisam ser elaborados para confirmar benefícios em humanos, porém, evidencia-se efeitos benéficos com o tratamento de PGRNr, podendo vir a ser uma opção eficiente para uma intervenção terapêutica em humanos futuramente.

## **8 CONCLUSÃO**

Concluimos, portanto, que a cirurgia de oclusão parcial bilateral das carótidas comuns (BCCAo) demonstrou-se eficaz como modelo de isquemia cerebral global, induzindo efeitos de redução da força muscular de membros superiores, déficits comportamentais e redução da memória de curta duração. Entretanto o tratamento com PGRNr mitigou os déficits cognitivos e comportamentais desencadeados pela BCCAo. Abrindo possibilidades para futuros testes terapêuticos.

## REFERÊNCIAS

ÁBRAHAM H, LAZAR G. Early microglial reaction following mild forebrain ischemia induced by common carotid artery occlusion in rats. **Brain Res** 2000.

ARRANT AE, ONYILO VC, UNGER DE, ROBERSON ED. Progranulin Gene Therapy Improves Lysosomal Dysfunction and Microglial Pathology Associated with Frontotemporal Dementia and Neuronal Ceroid Lipofuscinosis. **The Journal of neuroscience**: the official journal of the Society for Neuroscience. 2018

ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive Processing**, v. 13, n. 2, p. 93–110, 2012.

ASSINI, FABRÍCIO LUIZ; DUZZIONI, MARCELO; TAKAHASHI, REINALDO NAOTO. Object location memory in mice: pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. **Behavioural brain research**, v. 204, n. 1, p. 206-211, 2009.

ÅSTRÖM, M. Generalized Anxiety Disorder in Stroke Patients. **Stroke**, v. 27, n. 2, p. 270– 275, 1996.

BABYKUMARI P CHITRAMUTHU, HUGH PJ BENNETT, ANDREW BATEMAN. Progranulin: a new path to understanding and treating neurodegenerative diseases, **Brain**, Volume 140, Issue 12, p. 3081-3104. December 2017

BACIGALUPPI, M.; COMI, G.; HERMANN, D. M. Animal Models of Ischemic Stroke. Part Two: Modeling Cerebral Ischemia. **The Open Neurology Journal**, v. 4, n. 1, p. 34 38, 2010.

BALKAYA, M. et al. Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, v. 33, n. 3, p. 330–338, 2013.

BATEMAN A, BELCOURT D, BENNETT H, LAZURE C, SOLOMON S. Granulins, a novel class of peptide from leukocytes. **Biochem Biophys Res Commun**. 1990.

BAUMGARTNER, P. et al. Sensorimotor stroke alters hippocampo-thalamic network activity. **Scientific Reports**, v. 8, n. 15770, p. 1–11, 2018.

BHANDARI V, BATEMAN A. Structure and chromosomal location of the human granulin gene. **Biochem Biophys Res Commun**. 1992.

BHANDARI V, PALFREE RG, BATEMAN A. Isolation and sequence of the granulin precursor cDNA from human bone marrow reveals tandem cysteine-rich granulin domains. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1992.

BECERRA-CALIXTO, A.; CARDONA-GÓMEZ, G. P. The role of astrocytes in neuroprotection after brain stroke: potential in cell therapy. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, n. 88, p. 1–12, 2017.

BENDEL O, BUETERS T, von EULER M, OGREN SO, SANDIN J, von EULER G. Reappearance of hippocampal CA1 neurons after ischemia is associated with recovery of learning and memory. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**. 2005.

BENSENOR, I. M. et al. Prevalence of stroke and associated disability in Brazil: National Health Survey - 2013. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 73, n. 9, p. 746–750, 2015.

BORA KS, ARORA S, SHRI R. Role of *Ocimum basilicum* L. in prevention of ischemia and reperfusion-induced cerebral damage, and motor dysfunctions in mice brain. **J of Ethn**. 2011; 137:1360– 1365.

BORUCKI D. M., TOUTONJI A., COUCH C., MALLAH K., ROHRER B., TOMLINSON S. Complement-mediated Microglial Phagocytosis and Pathological Changes in the Development and Degeneration of the Visual System. **Front. Immunol**. 11.2020.



BUCKMASTER, CINDY A. et al. Entorhinal cortex lesions disrupt the relational organization of memory in monkeys. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 44, p. 9811-9825, 2004.

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

CAMPBELL, B. C. V. et al. Ischaemic stroke. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 70, 2019.

CAMPBELL, B. C. V; KHATRI, P. Stroke. **The Lancet**, v. 396, n. 10244, p. 129–142, 2020.

CARMICHAEL, S. T. Rodent models of focal stroke: Size, mechanism, and purpose. **NeuroRX**, v. 2, n. 3, p. 396–409, 2005.

CHEN-PLOTKIN AS, XIAO J, GESER F, MARTINEZ-LAGE M, GROSSMAN M, UNGER T, WOOD EM, VAN DEERLIN VM, TROJANOWSKI JQ, LEE VM. Brain progranulin expression in GRN-associated frontotemporal lobar degeneration. **Acta Neuropathol**. 2010.

CHOI, D. W. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. **Trends in neurosciences**, v. 18, n. 2, p. 58–60, 1995.

CHOI, D. W. Excitotoxicity: Still Hammering the Ischemic Brain in 2020. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, p. 1–27, 2020.

CUI Y, HETTINGHOUSE A, LIU CJ. Progranulin: A conductor of receptors orchestra, a chaperone of lysosomal enzymes and a therapeutic target for multiple diseases. **Cytokine Growth Factor Rev**. 2019.

CULMSEE C, ZHU C, LANDSHAMER S, BECATTINI B, WAGNER E, PELLECCIA M, BLOMGREN K, PLESNILA N. Apoptosis-inducing factor triggered by poly (ADP-

ribose) polymerase and Bid mediates neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation and focal cerebral ischemia. **J Neurosci**. 2005.

CRUTS M, GIJSELINCK I, VAN DER ZEE J, ENGELBORGH S, WILS H, PIRICI D, et al. Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. **Nature**. 2006.

DEACON, ROBERT MJ; RAWLINS, J. NICHOLAS P. T-maze alternation in the rodent. **Nature protocols**, v. 1, n. 1, p. 7, 2006.

DIAZ-CUETO L, STEIN P, JACOBS A, SCHULTZ RM, GERTON GL. Modulation of mouse preimplantation embryo development by acrogranin (epithelin/granulin precursor). **Developmental biology**. 2000.

EGASHIRA Y, SUZUKI Y, AZUMA Y, TAKAGI T, MISHIRO K, SUGITANI S, et al. The growth factor progranulin attenuates neuronal injury induced by cerebral ischemia-reperfusion through the suppression of neutrophil recruitment. **J Neuroinflammation** 2013.

ESCOBAR, I. et al. Altered Neural Networks in the Papez Circuit: Implications for Cognitive Dysfunction after Cerebral Ischemia. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 67, n. 2, p. 425–446, 2019.

FARKAS E, LUITEN PG, BARI F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. **Brain Res Rev**.2007.

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

FU Y, SUN Y, ZHOU M, WANG X, WANG Z, WEI X, ZHANG Y, SU Z, LIANG K, TANG W, YI F. Therapeutic Potential of Progranulin in Hyperhomocysteinemia-Induced Cardiorenal Dysfunction. **Hypertension**. 2017.

GEORGE, P. M.; STEINBERG, G. K. Novel Stroke Therapeutics: Unraveling Stroke Pathophysiology and Its Impact on Clinical Treatments. **Neuron**, v. 87, n. 2, p. 297–309, 2015.

GONÇALVES, L. V. et al. Environmental enrichment cognitive neuroprotection in an experimental model of cerebral ischemia: biochemical and molecular aspects. **Behavioural Brain Research**, v. 348, p. 171–183, 2018.

GOTZL JK, MORI K, DAMME M, FELLERER K, TAHIROVIC S, KLEINBERGER G, et al. Common pathobiochemical hallmarks of progranulin-associated frontotemporal lobar degeneration and neuronal ceroid lipofuscinosis. **Acta Neuropathol**. 2014.

GUMINA V, ONESTO E, COLOMBRITA C, MARASCHI A, SILANI V, RATTI A. Inter-Species Differences in Regulation of the Progranulin-Sortilin Axis in TDP-43 Cell Models of Neurodegeneration. **Int J Mol Sci**. 2019.

GUPTA R, SINGH M, SHARMA A. Neuroprotective effect of antioxidants on ischaemia and reperfusion-induced cerebral injury. **Pharm. Res**. 2003.

GRAVES, J. R. et al. Survivors of out of hospital cardiac arrest: Their prognosis, longevity and functional status. **Resuscitation**, v. 35, n. 2, p. 117–121, 1997.

HEISS, W. D. Ischemic penumbra: Evidence from functional imaging in man. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 20, n. 9, p. 1276–1293, 2000.

HOLLER CJ, TAYLOR G, DENG Q, KUKAR T. Intracellular Proteolysis of Progranulin Generates Stable, Lysosomal Granulins that Are Haploinsufficient in Patients with Frontotemporal Dementia Caused by GRN Mutations. **eNeuro**. 2017.

HUANG M, MODESTE E, DAMMER E, MERINO P, TAYLOR G, DUONG DM, DENG Q, HOLLER CJ, GEARING M, DICKSON D, SEYFRIED NT, KUKAR T. Network

analysis of the progranulin-deficient mouse brain proteome reveals pathogenic mechanisms shared in human frontotemporal dementia caused by GRN mutations.

**Acta Neuropathol Commun.** 2020.

HUMMEL, R., LANG, M., WALDERBACH, S., WANG, Y., TEGEDER, I., GÖLZ, C., & SCHÄFER, M. K. E. Single intracerebroventricular progranulin injection adversely affects the blood–brain barrier in experimental traumatic brain injury. **Journal of Neurochemistry**, p. 342–357. 2021.

IADECOLA C, ANRATHER J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. **Nat Med.** 2011.

ISINGRINI, ELSA et al. Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. **PLoS One**, v. 5, n. 4, 2010.

JACKMAN K., KAHLES T., LANE D., GARCIA-BONILLA L., ABE T., CAPONE C., HOCHRAINER K., VOSS H., ZHOU P., DING A., ANRATHER J., IADECOLA C. Progranulin deficiency promotes post-ischemic bloodbrain barrier disruption. **J. Neuroscience.**, 2013.

JIANG X, ANDJELKOVIC AV, ZHU L, YANG T, BENNETT MVL, CHEN J, KEEP RF, SHI Y. Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke. **Prog Neurobiol.** 2018.

KAYASUGA Y, CHIBA S, SUZUKI M, KIKUSUI T, MATSUWAKI T, YAMANOUCHI K, et al. Alteration of behavioural phenotype in mice by targeted disruption of the progranulin gene. **Behav Brain Res** 2007.

KIEWERT, C. et al. Metabolic and transmitter changes in core and penumbra after middle cerebral artery occlusion in mice. **Brain Research**, v. 1312, p. 101–107, 2010.

KIM, J. Y. et al. Inflammation after Ischemic stroke: The role of leukocytes and glial cells. **Experimental Neurobiology**, v. 25, n. 5, p. 241–251, 2016.

KIM DH, KIM S, JUNG WY, PARK SJ, PARK DH, KIM JM, CHEONG JH, RYU JH. The neuroprotective effects of the seeds of *Cassia obtusifolia* on transient cerebral global ischemia in mice. **Food and Chem. Tox.** 2009.

KIRINO T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. **Brain Res** 1982.

KÖRTVELYESSY P, HUCHTEMANN T, HEINZE HJ, BITTNER DM. Progranulin and Its Related MicroRNAs after Status Epilepticus: Possible Mechanisms of Neuroprotection. **Int J Mol Sci.** 2017.

KUMARAN D, UDAYABANU M, NAIR RU, ANEJA R, KATYAL A. Benzamide protects delayed neuronal death and behavioural impairment in amousemodel of global cerebral ischemia. **Behav. Brain Res.** 2008.

LANDSHAMER S, HOEHN M, BARTH N, DUVEZIN-CAUBET S, SCHWAKE G, TOBABEN S, KAZHDAN I, BECATTINI B, ZAHLER S, VOLLMAR A, PELLECCIA M, REICHERT A, PLESNILA N, WAGNER E, CULMSEE C. Bid-induced release of AIF from mitochondria causes immediate neuronal cell death. **Cell Death Differ.** 2008

LEE, D. H. et al. Imaging of the ischemic penumbra in acute stroke. **Korean Journal of Radiology**, v. 6, n. 2, p. 64–74, 2005.

LEE J-H, LEE S-R. The effect of baicalein on hippocampal neuronal damage and metalloproteinase activity following transient global cerebral ischaemia. **Phytother. Res.** 2012.

LEPPÄVUORI, A. et al. Generalized anxiety disorders three to four months after ischemic stroke. **Cerebrovascular Diseases**, v. 16, n. 3, p. 257–264, 2003.

LEGER, M. et al. Object recognition test in mice. **Nature Protocols**, v. 8, n. 12, p. 2531–2537, 2013.

LI, W. et al. Anxiety in patients with acute ischemic stroke: Risk factors and effects on functional status. **Frontiers in Psychiatry**, v. 10, n. APR, 2019.

LINPTON P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiol Rev** 1999; 79: p.1431-568.

LIU LF, DUANN P, LIN CT, D'ARPA P, WU J. Mechanism of action of camptothecin. **Ann N Y Acad Sci.** 1996.

LIU C, LI J, SHI W, ZHANG L, LIU S, LIAN Y, LIANG S, WANG H. Progranulin Regulates Inflammation and Tumor. **Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.** 2020.

LIU Y, REN J, KANG M, ZHAI C, CHENG Q, LI J, WU Y, RUAN X, ZHOU J, FAN J, TIAN Y. Progranulin promotes functional recovery and neurogenesis in the subventricular zone of adult mice after cerebral ischemia. **Brain Res.** 2021.

LO, E. H.; DALKARA, T.; MOSKOWITZ, M. A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 5, p. 399–415, 2003.

MABUCHI T, KITAGAWA K, OHTSUKI T, KUWABARA K, YAGITA Y, YANAGIHARA T, et al. Contribution of microglia/macrophages to expansion of infarction and response of oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rats. **Stroke.** 2000.

MARTINS-SILVA, C. ET AL. POLYGALA SABULOSA A.W. Bennett extract mitigates motor and cognitive deficits in a mouse model of acute ischemia. **Metabolic Brain Disease**, v. 36, n. 3, p. 453–462, 2021.

MESULAM M. Primary progressive aphasia: A dementia of the language network. **Dement Neuropsychol.** 2013.

MIEDEL, CHRISTIAN J. et al. Assessment of spontaneous alternation, novel object recognition and limb clasping in transgenic mouse models of amyloid- $\beta$  and tau neuropathology. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 123, p. e55523, 2017.

MILAJERDI A, MAGHBOOLI Z, MOHAMMADI F, HOSSEINI B, MIRZAEI K. Progranulin concentration in relation to bone mineral density among obese individuals. **Arch Endocrinol Metab.** 2018.

MIYAKAWA S, SAKUMA H, WARUDE D, ASANUMA S, ARIMURA N, YOSHIHARA T, TAVARES D, HATA A, IDA K, HORI Y, OKUZONO Y, YAMAMOTO S, IIDA K, SHIMIZU H, KONDO S, SATO S. Anti-sortilin1 Antibody Up-Regulates Progranulin via Sortilin1 Down-Regulation. **Front Neurosci.** 2020.

MINAMI SS, MIN SW, KRABBE G, WANG C, ZHOU Y, ASGAROV R, et al. Progranulin protects against amyloid beta deposition and toxicity in Alzheimer's disease mouse models. **Nature medicine.** 2014.

MORETTI, MORGANA et al. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **Journal of psychiatric research**, v. 46, n. 3, p. 331-340, 2012.

MORAES, L. S. et al. Medicinal plant *Combretum leprosum* Mart ameliorates motor, biochemical and molecular alterations in a Parkinson's disease model induced by MPTP. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 185, p. 68–76, 2016.

MURPHY AN. Ca<sup>2+</sup>-mediated mitochondrial dysfunction and the protective effects of Bcl-2. **Ann N Y Acad Sci.** 1999.

NAPHADE SB, KIGERL KA, JAKEMAN LB, KOSTYK SK, POPOVICH PG, KURET J. Progranulin expression is upregulated after spinal contusion in mice. **Acta Neuropathol.** 2010.

NAKASHIMA, M. N. et al. Possible Role of Nitric Oxide in Anxiety Following Transient Cerebral Ischemia in Mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 91, n. 1, p. 47–52, 2003.

NEIGH, G. N. et al. Anxiety After Cardiac Arrest/Cardiopulmonary Resuscitation. **Stroke**, v. 40, n. 11, p. 3601–3607, 2009.

NISWENDER, C. M.; CONN, P. J. Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 50, n. 1, p. 295–322, 2010.

NIKONENKO AG, RADENOVIC L, ANDJUS PR, SKIBO GG. Structural features of ischemic damage in the hippocampus. **The Anat. Rec.** 2009.

PALFREE RGE, BENNETT HPJ, BATEMAN A. The evolution of the secreted regulatory protein Progranulin. **PLoS One**. 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). The top 10 causes of death. **Geneva: WHO**, 2020.

PAUSHTER DH, DU H, FENG T, HU F. The lysosomal function of progranulin, a guardian against neurodegeneration. **Acta neuropathologica**. 2018.

PAXINOS G., FRANKLIN K.B.J. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2<sup>o</sup> ed. **Academic Press**, 2001.

PETKAU TL, NEAL SJ, ORBAN PC, MACDONALD JL, HILL AM, LU G, et al. Progranulin expression in the developing and adult murine brain. **J Comp Neurol**. 2010.

PULSINELLI WA, BRIERLEY JB, PLUM F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. **Ann. Neurol**. 1982.

RAJAH GB, DING Y. Experimental neuroprotection in ischemic stroke: a concise review. **Neurosurg Focus**. 2017.

ROCHA, S. I. M. Doença Cerebrovascular Isquêmica Aguda: Avaliação de Protocolo de Trombólise. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) – Faculdade e Ciências da Saúde, **Universidade da Beira Interior**. Covilhã, 2008.



RODGERS RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neurosci Biobehav Rev.** 1997.

RYAN C.L., BARANOWSKI D.C., CHITRAMUTHU B.P., MALIK S., LI Z., CAO M., MINOTTI S., DURHAM H.D., KAY D.G., SHAW C.A., BENNETT H.P., BATEMAN A. Progranulin is expressed within motor neurons and promotes neuronal cell survival. **BMC Neurosci.**, 2009.

SHEN J, BAI X-Y, QIN Y, JIN W-W, ZHOU J-Y, ZHOU J-P, YAN Y-G, WANG Q, BRUCE IC, CHEN J-H, XIA Q. Interrupted reperfusion reduces the activation of NADPH oxidase after cerebral I/R injury. **Free Rad. Biol. & Med.** 2011.

SOARES, L. M. et al. Cognitive impairment and persistent anxiety-related responses following bilateral common carotid artery occlusion in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 249, p. 28–37, 2013.

SOMMER, C. J. Ischemic stroke: experimental models and reality. **Acta Neuropathologica**, v. 133, n. 2, p. 245–261, 2017.

STAIR. Recommendations for Standards Regarding Preclinical Neuroprotective and Restorative Drug Development Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR). **Stroke**, v. 30, p. 2752–2758, 1999.

STAMENOVA, V. et al. Long-term effects of brief hypoxia due to cardiac arrest: Hippocampal reductions and memory deficits. **Resuscitation**, v. 126, p. 65–71, 2018.

TAO J, JI F, WANG F, LIU B, ZHU Y. Neuroprotective effects of progranulin in ischemic mice. **Brain Res.** 2012.

TANAKA Y, MATSUWAKI T, YAMANOUCHI K, NISHIHARA M. Exacerbated inflammatory responses related to activated microglia after traumatic brain injury in progranulin-deficient mice. **Neuroscience.** 2013.

TANG, W. K. et al. Frontal Infarcts and Anxiety in Stroke. **Stroke**, v. 43, n. 5, 2012.

TAUFFENBERGER A, CHITRAMUTHU BP, BATEMAN A, BENNETT HP, PARKER JA. Reduction of polyglutamine toxicity by TDP-43, FUS and progranulin in Huntington's disease models. **Human molecular genetics**. 2013.

TIAN Q, ZHAO S, LIU C. A solid-phase assay for studying direct binding of progranulin to TNFR and progranulin antagonism of TNF/TNFR interactions. **Methods in molecular biology** (Clifton, NJ). 2014.

TIAN Q, ZHAO Y, MUNDRA JJ, GONZALEZ-GUGEL E, JIAN J, UDDIN SM, et al. Three TNFR-binding domains of PGRN act independently in inhibition of TNF-alpha binding and activity. **Front Biosci** (Landmark Ed). 2014.

TOH H, CHITRAMUTHU BP, BENNETT HP, BATEMAN A. Structure, function, and mechanism of progranulin; the brain and beyond. **J Mol Neurosci**. 2011.

VAN DEERLIN V.M., SLEIMAN P.M., MARTINEZ-LAGE M., CHEN-PLOTKIN A., WANG L.S., GRAFF-RADFORD N.R., DICKSON D.W., RADEMAKERS R., BOEVE B.F., GROSSMAN M., ARNOLD S.E., MANN D.M., PICKERING-BROWN S.M., SEELAAR H., HEUTINK P. I WSP. Common variants at 7p21 are associated with frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions. **Nat. Genet.**, 2010.

VAN KAMPEN JM, BARANOWSKI D, KAY DG. Progranulin gene delivery protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. **PLoS One**. 2014.

VICENTINI, J. E. et al. Depression and anxiety symptoms are associated to disruption of default mode network in subacute ischemic stroke. **Brain Imaging and Behavior**, v. 11, n. 6, p. 1571–1580, 2017.

WAHUL, A. B. et al. Transient global cerebral ischemia differentially affects cortex, striatum and hippocampus in Bilateral Common Carotid Arterial occlusion (BCCAo) mouse model. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 92, n. 1, p. 1–15, 2018.

WANG-FISCHER, Y. Manual of stroke models in rats. [s.l.] **CRC Press**, 2008.

WANG J, MINEMOTO Y, LIN A, LI Y, SHEN B, ZHANG J. IKK antagonizes CD95 ligation mediated apoptosis by regulating NF-kappaB activity. **Mol Immunol**. 2007.

WEILINGER, N. L. et al. Ionotropic receptors and ion channels in ischemic neuronal death and dysfunction. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 1, p. 39–48, 2013.

XU K, ZHANG Y, ILALOV K, CARLSON CS, FENG JQ, DI CESARE PE, et al. Cartilage oligomeric matrix protein associates with granulin-epithelin precursor (GEP) and potentiates GEP-stimulated chondrocyte proliferation. **J Biol Chem**. 2007

XU, S. et al. Glial Cells: Role of the Immune Response in Ischemic Stroke. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. February, p. 1–16, 2020.

YENARI MA, KAUPPINEN TM, SWANSON RA. Microglial activation in stroke: therapeutic targets. **Neurotherapeutics** 2010.

YIN F, BANERJEE R, THOMAS B, ZHOU P, QIAN L, JIA T, et al. Exaggerated inflammation, impaired host defense, and neuropathology in progranulin-deficient mice. **J Exp Med** 2010.

ZHANG J, MOATS-STAATS BM, YE P, D'ERCOLE AJ. Expression of insulin-like growth factor system genes during the early postnatal neurogenesis in the mouse hippocampus. **J Neurosci Res**. 2007.

ZHANG H-P, YUAN LB, ZHAO RN, TONG L, MA R, DONG HL, XIONG L. Isoflurane preconditioning induces neuroprotection by attenuating ubiquitin-conjugated protein aggregation in a mouse model of transient global cerebral ischemia. **Anesth. Analg**. 2010.

ZHANG L, FU L, ZHANG X, ZHU M, WANG T, FAN H. Escin attenuates cognitive deficits and hippocampal injury after transient global cerebral ischemia in mice via regulating certain inflammatory genes. **Neur. Intern**. 2010.

ZHU J, NATHAN C, JIN W, SIM D, ASHCROFT GS, WAHL SM, et al. Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. **Cell**. 2002.