

EFEITOS DA UTILIZAÇÃO A CURTO PRAZO DO HORMÔNIO ESTRÓGENO EM ISQUEMIA FOCAL NO CÓRTEX SENSORIO-MOTOR

Wanzeler W.C.; Valentino W.P.; Bahia G.M.C.; Luz-Ramos R.S.; Bahia C.P.

RESUMO

Introdução: O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é uma das doenças cerebrovasculares de maior desafio clínico, principalmente pela sua alta incidência na população mundial e pela complexa etiologia multifatorial envolvida em seu processo patológico. Os fatores de risco envolvidos são classificados em extrínsecos e intrínsecos, por exemplo os contraceptivos hormonais são classificados como fatores de riscos extrínsecos. A utilização dos contraceptivos hormonais remonta aos anos 60, quando teve sua capacidade contraceptiva reconhecida e aprovada pelo FDA: *Food and Drugs Administration* - agência federal americana para registro e uso de medicamentos. Em paralelo, diversos estudos verificam a capacidade neuroprotetiva dos hormônios utilizados em contraceptivos, tornando esses hormônios como importantes objetos de estudo para possíveis alvos terapêuticos. **Objetivo:** Portanto, o objetivo deste estudo foi a análise da correlação entre a utilização prévia a curto prazo do estrógeno com os eventos histopatológicos após isquemia focal (AVEi) experimental no córtex sensorio-motor de ratos. **Métodos:** Após a utilização prévia do hormônio contraceptivo estrógeno por 8 dias foi realizada a indução isquêmica e focal da representação sensorio-motora da pata anterior (S1/M1). No sétimo dia pós indução da lesão isquêmica focal, foi realizado procedimento de perfusão intracárdica do animal e após foi realizado processamento histológico e contagem celular. **Resultados:** Nossos resultados demonstraram que houve diferença significativa na densidade de corpúsculos de Nissl entre os grupos tratamento a curto prazo com anticoncepcional a base de estrógeno (GT8) e o grupo controle (GC). As análises de contagem de células marcadas após protocolo de imunofluorescência não apresentam diferença significativa entre os grupos tratamento (curto prazo) ao que se refere ao número de neurônios (NeuN) e de astrócitos (GFAP). **Conclusão:** Concluímos que o uso a curto prazo de contraceptivo hormonal a base de estrógeno induz neuroproteção e não age como um fator de risco cerebrovascular.

PALAVRAS CHAVES: Acidente Vascular Encefálico; Estrógeno; Neuroproteção.

INTRODUÇÃO

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é uma das doenças cerebrovasculares de maior desafio clínico, principalmente pela sua alta incidência na população mundial e pela complexa etiologia multifatorial envolvida em seu processo patológico (Hankey, 2017). Suas consequências envolvem aspectos motores, sensoriais e/ou cognitivos. Dessa forma, é estimado que o AVE seja uma das principais patologias que levam à mais incapacidades funcionais no mundo todo afetando, conseqüentemente, a qualidade de vida dos pacientes acometidos por essa doença (Azizi et al., 2020; Hankey, 2017).

O desafio no entendimento do AVE compreende alguns aspectos e, dentre eles, encontra-se a sua complexa fisiopatologia que pode ser caracterizada por isquemia a qual é determinada por diminuição do fluxo sanguíneo ao tecido nervoso ou por hemorragia que se caracteriza pelo extravasamento de sangue em espaços extravasculares do encéfalo

(Collins, 2007). A isquemia leva à uma privação de oxigênio e glicose, necessários para a homeostase referente às funções desempenhadas pelas células nervosas, consequentemente levando a lesões temporárias ou permanentes da região/área afetada do encéfalo. A extensão dessa lesão depende principalmente de três fatores: 1) localização, 2) duração da hipoperfusão e 3) capacidade de vasos periféricos da área lesionada em suprir a perfusão em desequilíbrio (Campbell et al., 2019). Já o AVE hemorrágico danifica o tecido nervoso por meio do sangramento que corta as vias de conexões pelo aumento da pressão no tecido afetado ou por meio da ação de agentes bioquímicos que são liberados durante e após o evento hemorrágico (Xiao et al., 2017). A estimativa é que 9.6 milhões dos AVE que ocorrem por ano sejam do tipo isquêmico e 4.1 milhões sejam do tipo hemorrágico, correspondendo a 80-85% e 15-20% dos casos, respectivamente (Campbell and Khatri, 2020).

A incidência do AVE apresenta diversas variáveis que vão desde o país que está sendo levado em consideração até a fatores socioeconômicos da população do país considerado. Estima-se incidência 1.1 milhões de ocorrências de AVE por ano na Europa (Bejot et al., 2016) com ocorrência de cerca de 15 milhões por ano em todo mundo, resultando em 5 milhões de mortes e outros 5 milhões de pessoas com sequelas neurológicas permanentes como consequência de AVE (Toman et al., 2019). A característica populacional é uma importante variável envolvida na disparidade dos números relacionados à incidência dessa patologia, principalmente levando em consideração a identidade multifatorial do desenvolvimento da doença (Alhazzani et al., 2021; Kalaria et al., 2016). Um dos principais fatores de risco populacional está associado com a idade, pois muitos estudos já demonstraram aumento de incidência de casos de AVE com o passar da idade (Egger et al., 2018). Por exemplo, pessoas acima de 60 anos formam o grupo mais atingido pela doença, entretanto esse cenário vem sendo remodelado com o aumento de cerca de 40% no acometimento de jovens adultos nas últimas décadas (Egger et al., 2018). Outro fator associado é a alta taxa de mortalidade de mulheres acometidas quando comparadas aos homens. Sabe-se que as mulheres apresentam particularidades anatômicas, de fatores neuroprotetores, riscos vasculares, perfis hormonais, dentre outros, e todos esses fatores podem influenciar de forma direta no risco e prognóstico de mulheres acometidas (Roy-O'Reilly and McCullough, 2018).

Os fatores de risco cerebrovasculares envolvidos neste processo patológico são diversos, por exemplo encontrando-se fatores extrínsecos e intrínsecos. A genética encontra-se como um dos principais fatores intrínsecos relacionadas a causalidade do AVE como, por exemplo, variações cromossômicas que já foram identificadas como fatores associados com aumento do risco cerebrovascular específico, além de mutações genéticas que predisõem condições indiretamente ligadas ao aumento desse risco (Chauhan and Debette, 2016). Já relacionado aos fatores extrínsecos encontram-se o uso do cigarro, consumo excessivo de álcool, obesidade e inatividade física. Além disso, algumas comorbidades como hipertensão arterial e hipercolesterolemia são evidenciados como condições clínicas apresentadas como fatores de risco extrínsecos e modificáveis (Sirsat et al., 2020). Alguns dos fatores de risco cerebrovasculares apresentam uma interrelação com o gênero feminino como, por exemplo, as taxas de hipertensão arterial e fibrilação atrial, ambas sendo condições clínicas associadas ao aumento do risco cerebrovascular, são maiores e mais frequentes nas mulheres (Roy-O'Reilly and McCullough, 2018). Além disso, distúrbios hipertensivos na gravidez e menopausa são fatores de risco específicos do gênero feminino, nesse mesmo contexto encontra-se a utilização de contraceptivos hormonais (Roy-O'Reilly and McCullough, 2018).

A utilização dos contraceptivos hormonais remonta aos anos 60, quando teve sua capacidade contraceptiva reconhecida e aprovada pelo FDA: *Food and Drugs*

Administration - agência federal americana para registro e uso de medicamentos (Casado-Espada et al., 2019). Atualmente, com os avanços nos estudos relacionados à potencialização da utilização dos contraceptivos hormonais, seu uso foi amplamente aceito, apresentando indicações contraceptivas e não contraceptivas, sendo utilizado com diversos propósitos como: 1) prevenir gravidez, 2) diminuir os sintomas do ciclo menstrual (assim como regulá-lo), 3) benefícios estéticos, dentre outros (De Leo et al., 2016).

Os anticoncepcionais hormonais podem ser utilizados por diversas vias de utilização (oral, injetável, transdérmico, dentre outros), dosagens variáveis e tipos hormonais específicos. Essas variáveis são dependentes do motivo da utilização (De Leo et al., 2016). Atualmente, existem dois tipos de contraceptivo hormonal: 1) os contraceptivos que apresentam apenas a progesterona como hormônio ativo (progestágenos) e 2) os contraceptivos constituídos tanto de progesterona quanto de estrogênio como agentes ativos (estroprogestativos) (Azoulay, 2004).

Em consonância com a popularização do uso dos contraceptivos hormonais em suas mais variadas formas, tornou-se imperativa a realização de estudos que buscavam verificar os potenciais riscos de sua utilização. Diante disso, estudos verificaram o aumento no risco de desenvolver câncer de mama, trombose e/ou doenças cardiovasculares com a utilização dos contraceptivos hormonais (De Leo et al., 2016). Em paralelo, diversos estudos verificam capacidade neuroprotetiva dos hormônios utilizados em contraceptivos, tornando esses hormônios como importantes objetos de estudo para possíveis alvos terapêuticos (Su et al., 2016).

Nessa perspectiva, estudos com modelos experimentais que visam verificar as vias fisiopatológicas do acidente vascular encefálico e a ação de hormônios contraceptivos na prevenção e/ou atenuação das consequências desta patologia tornou-se essencial. O AVE apresenta grande diversidade ao que se refere às manifestações, fatores de risco cerebrovasculares e localização da patologia, refletindo na necessidade do controle dessas variáveis sendo, dessa forma, os modelos experimentais animais um caminho essencial para o controle desses aspectos, permitindo uma investigação genética, fisiológica, molecular e bioquímica.

Muitos estudos estudaram as vias de ação dos hormônios sexuais femininos e suas influências no acidente vascular encefálico - AVE (Roy-O'Reilly and McCullough, 2018). De acordo com a revisão sistemática de Gibson *et al* (2006) é possível observar que a maioria dos estudos identificados trabalharam com ratas ovariectomizadas ou senescentes, atribuindo um caráter de investigação do hormônio utilizado para reposição hormonal havendo, dessa forma, uma lacuna no conhecimento científico ao que se refere aos efeitos hormonais em animais na idade reprodutiva, buscando simular a utilização de contraceptivos hormonais e sua possível correlação positiva ou negativa com o AVE (Gibson et al., 2006). Perfis similares de estudos foram encontrados na metá-análise de Wong *et al* (2013), a qual buscou verificar os efeitos da progesterona em modelos experimentais (Wong et al., 2013).

Dessa forma, estudos que buscam simular a utilização de contraceptivos hormonais são frequentes na literatura, porém sua correlação com AVE resultando em uma lacuna ao que se refere aos seus efeitos em ratas adultas reprodutivas e sua associação com aspectos histopatológicos pós-evento cerebrovascular. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo é a análise da correlação entre a utilização prévia a curto prazo do estrogênio com os eventos histopatológicos após isquemia focal (AVEi) experimental no córtex sensorio-motor de ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

CARACTERÍSTICAS DOS ANIMAIS E TRATAMENTO HORMONAL:

Foram utilizadas 10 fêmeas da espécie *Rattus norvegicus* (da linhagem Wistar), na idade reprodutiva (aproximadamente três meses de idade), com massa corporal entre 250g e 300g, provenientes do Biotério Central da UFPa. Os animais foram mantidos em grupos de quatro em gaiolas plásticas padrão, temperatura e luminosidade controladas (ciclo 12 horas claro e 12 horas escuro), com acesso à água e ração *ad libitum*. Para os experimentos, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: 1) Grupo controle (GC) com n= 5, o qual os animais passaram apenas por indução isquêmica e focal da representação sensorio-motora da pata anterior (S1/M1) e 2) grupo tratamento curto-prazo (GT8) com n= 5, o qual os animais passaram por tratamento prévio (antes da cirurgia de indução isquêmica) de 8 dias com aplicações subcutâneas diárias de estrógeno (0,2 ml/kg). Os animais passaram por tratamento hormonal (GT8) foram pesados todos os dias antes da aplicação com o objetivo de manter a dosagem de acordo com o peso do animal. Todos os protocolos incluídos neste estudo obtiveram aprovação prévia do comitê de ética para o uso de animais (CEUA 2329040418) da Universidade Federal do Pará (Fig. 1).

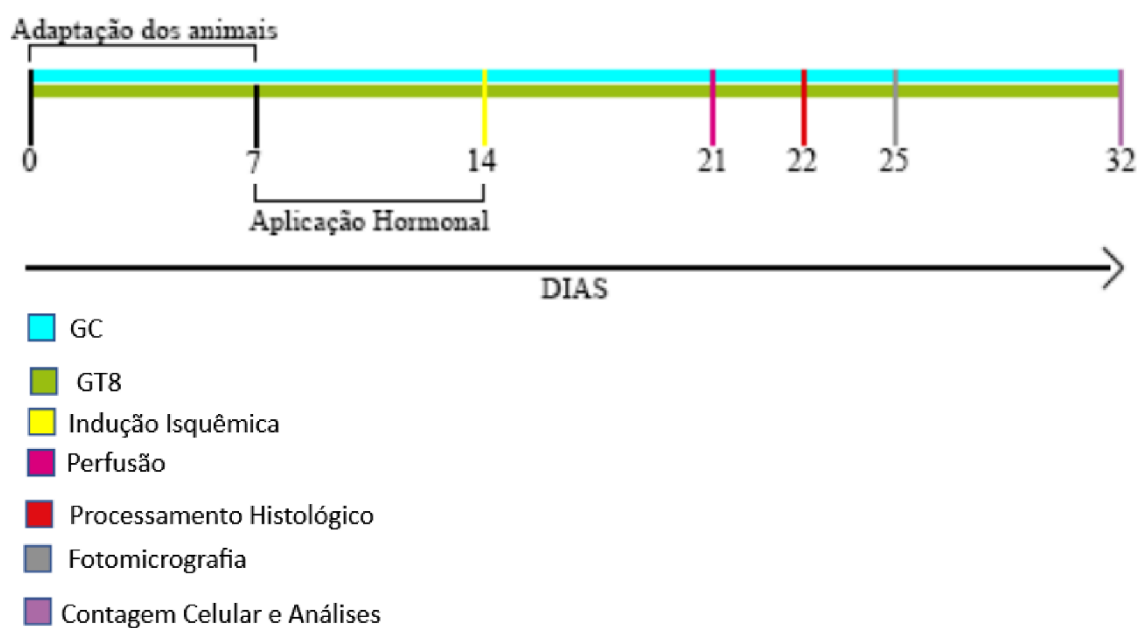


Fig. 1 – Desenho esquemático dos procedimentos experimentais realizados ao longo do tempo.

PROTOCOLO CIRÚRGICO:

Os animais passaram por protocolo cirúrgico de indução de lesão isquêmica focal na representação da pata anterior em S1/M1. A anestesia foi induzida por aplicação via intraperitoneal de Cloridrato de Cetamina (Vetanarcol®, König. 72mg/kg) e de Cloridrato de Xilazina (Kensol®, König. 9mg/kg). Após a ausência de reflexos dolorosos, foi realizada a tricotomia e higienização da área de incisão, em seguida os animais foram posicionados em aparelho estereotáxico (Insight®, EFF-336).

A craniotomia foi realizada com auxílio de broca cirúrgica odontológica (Carbide ½ de 25mm) para acesso à superfície cortical referente a área sensorio-motora (S1/M1), foram utilizadas coordenadas estereotáxicas para localização da representação sensorio-motora

da pata anterior para realização das microinjeções do indutor de isquemia (Fig. 2). As coordenadas tiveram o Bregma como referência inicial e foram delimitados em três pontos: (-3,0mm Médio-Lateral (ML), -0,5mm Ântero-Posterior (AP)), (-3,0mm ML, +0,5mm AP) e (-3,0mm ML e +1,5mm AP), respectivamente.

As microinjeções foram realizadas utilizando-se micropipeta de vidro calibrada (SIGMA), preenchida com um microlitro (1 μ l) de solução contendo: endotelina-1 (ET-1 - SIGMA) com concentração à oitenta picoMols (80pMol) diluída em PBS. A ET-1 foi utilizada por ser um potente vasoconstritor de longa duração, suas propriedades fazem com que ela apresente papel importante no sistema cardiovascular de mamíferos e que possa ser utilizada em modelos de lesão isquêmica focal experimental do sistema nervoso central (Guo, Li et al. 2015, Herbert, Powell et al. 2015, Boychuk, Schwerin et al. 2016). Por fim, a incisão cirúrgica foi suturada, higienizada e o animal foi devolvido para a gaiola.

Todos os animais tiveram um período de sobrevida de sete dias após a indução isquêmica focal em S1/M1. No sétimo dia pós indução da lesão isquêmica focal, foi realizado procedimento de perfusão intracárdica do animal para a qual foram utilizados 500ml de solução salina (pH 7,2 - 7,4) heparinizada (0,1ml/L), seguida de 500ml de paraformaldeído (4%) em tampão fosfato (PB 0,1M; pH 7,2 - 7,4). Logo após, o encéfalo de cada animal foi retirado e pós-fixado por 24 horas em solução de paraformaldeído (4%).

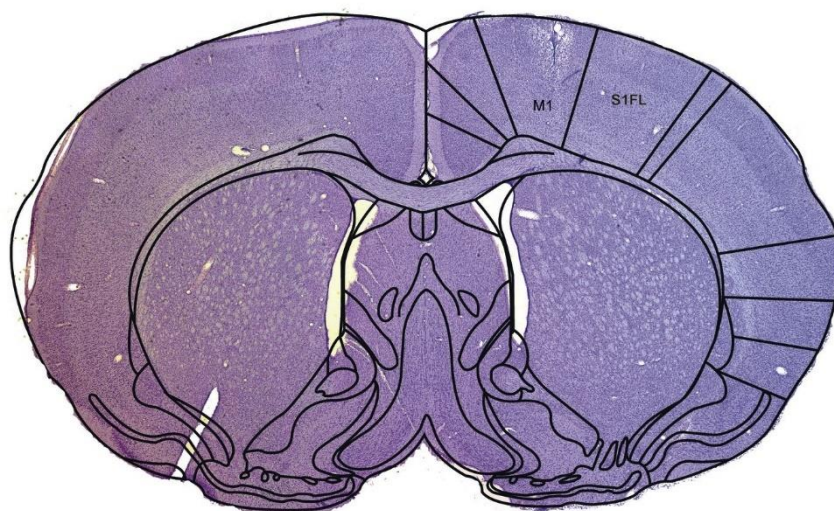


Fig. 2- Fotomontagem da secção histológica do encéfalo de rata após microseccionamento e coloração de Nissl na área de interesse (Representação sensorio motora da pata anterior) de acordo com o atlas “*The rat brain in stereotaxic coordinates*” Adaptado de Paxinos, 2007. Note que a lesão isquêmica está restrita à representação da pata anterior (M1).

PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E CONTAGEM CELULAR:

As secções histológicas foram obtidas com o auxílio de um vibrátomo (Leica-VT1000S) em plano coronal com espessura de 50 μ m. Para quantificar o volume da perda celular na área de lesão, utilizamos a técnica de coloração com cresyl violeta (técnica de Nissl), a qual permite colorir os corpos celulares de neurônios e de células gliais. Três secções da área sensorio-motora de interesse foram montadas em lâminas para análise

microscópica previamente gelatinizadas. A seleção das secções para análises histológicas foi realizada de forma sistemática, a partir da primeira secção na qual era possível identificar a área de lesão e os cortes subsequentes foram selecionados com um espaçamento alternado de três em três secções contadas a partir do primeiro selecionado.

Realizamos imunohistoquímica para quantificação do número total de neurônios (Anti-NeuN), ver Fig. 3, e da ativação de astrócitos (Anti-GFAP), ver Fig. 4. Por meio do método *free floating*, as secções passaram por sucessivas lavagens em PB 0,1M e Triton 0,5%, seguido por uma hora de incubação em solução bloqueio 3% (Leite em pó 3%, Triton 0,5% em PB 0,1M). Logo após, as secções foram incubadas por 16 horas ininterruptas em solução contendo os anticorpos primários Anti Neuronal Nuclei (NeuN) e Anti Glial Fibrillary Astrocytes Protein (GFAP), nas concentrações 1:100 e 1:200, respectivamente. Após a incubação, as secções foram lavadas com PB 0,1M e seguidas de incubação, em ambiente com pouca luminosidade, com anticorpos secundários Anti-Mouse, com concentração 1:100 em ambos.

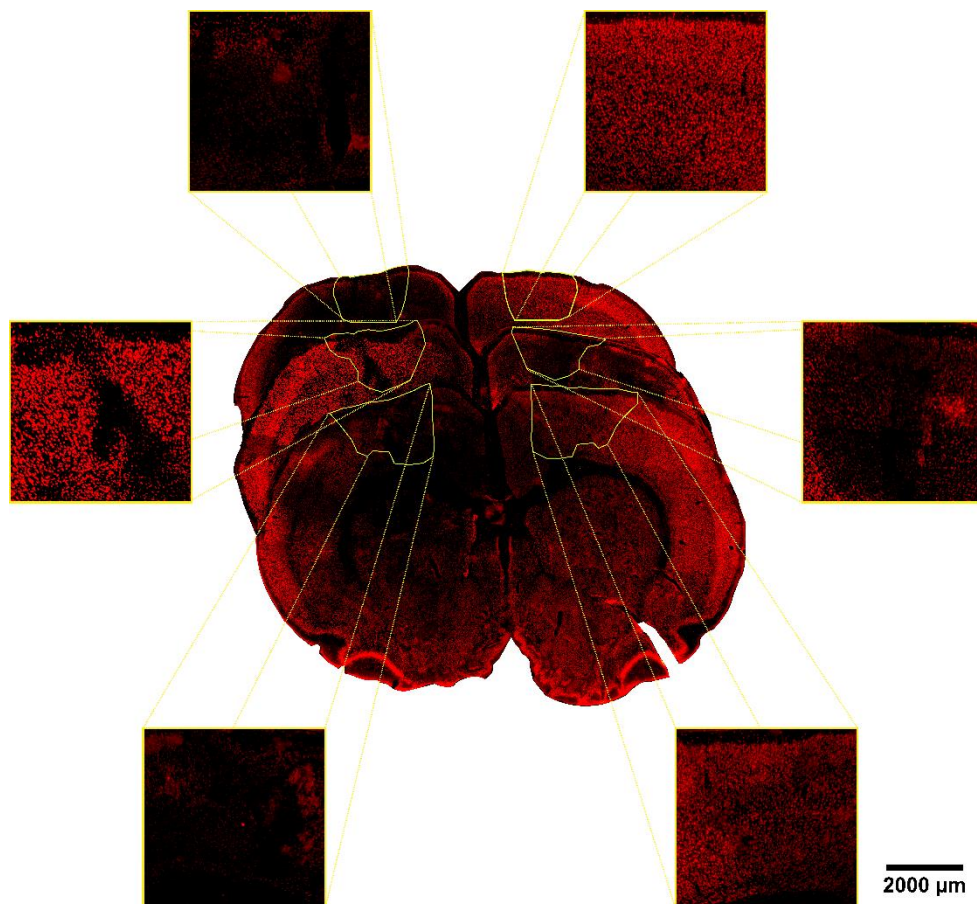


Fig. 3 - Sequência de microsecc es histológica representando a área total de lesão após imunimarca o pelo anticorpo anti-NeuN.

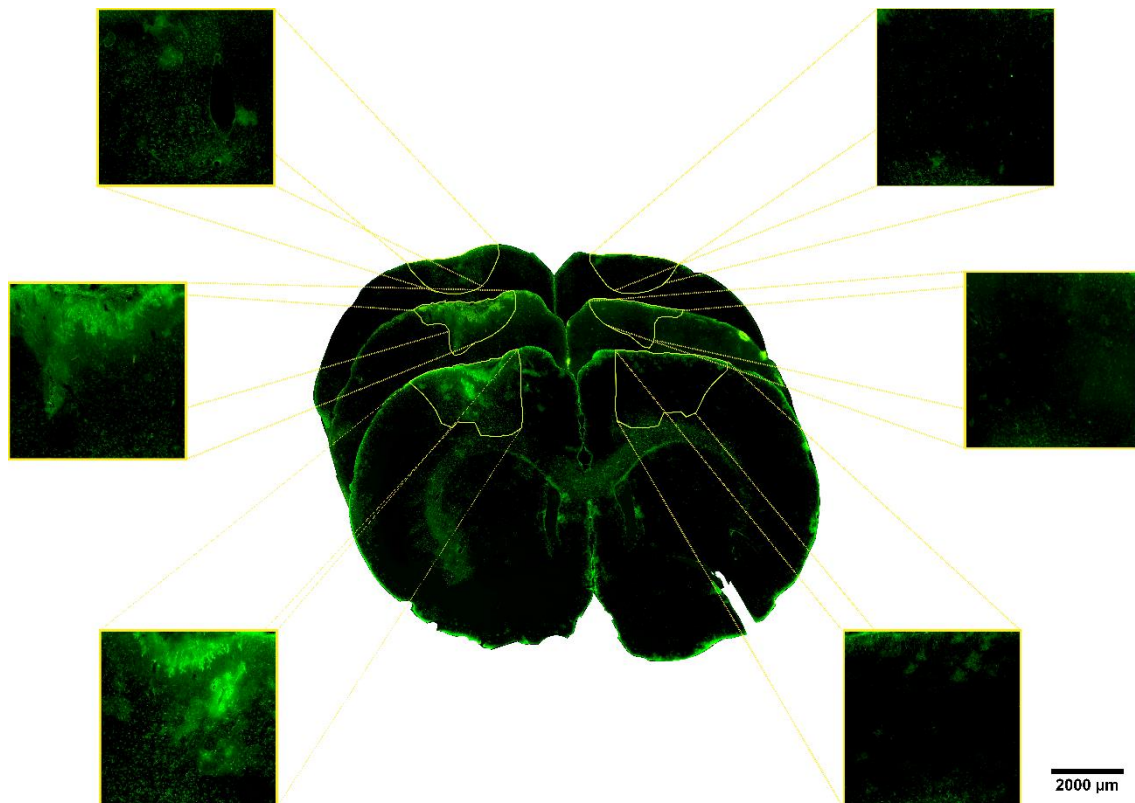


Fig. 4 - Sequência de microsecções histológica representando a área total de lesão após imunomarcagem pelo anticorpo anti-GFAP.

Após a realização do protocolo de imunohistoquímica, as secções foram montadas em lâminas para análises microscópicas e as fotomicrografias dos tecidos foram realizadas com o auxílio de microscópio de luz transmitida (AxioScope Zeiss®). As fotomicrografias foram capturadas com lente de aumento 20x e, posteriormente, foram realizadas as análises de densidade de células com o auxílio do *software Image Processing and Analysis in Java (ImageJ® - NIH, USA)*. Os resultados obtidos tiveram como base a quantificação das células na área de interesse, os quais definiram a densidade celular (Células/mm²) das secções selecionadas.

ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Após as análises e contagens das células imunomarcadas, os resultados numéricos foram expressos em média (\pm desvio padrão) e foram tabulados com auxílio do *software Excel®*. Os resultados foram analisados e comparados estatisticamente com o auxílio do *software GraphpadPrism® 8.0* através da análise de variância de duas vias (ANOVA) com pareamento intergrupos e pós-teste de Turkey. A significância dos dados foi pré-estabelecida em 95% com $p > 0$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo buscou determinar se o tratamento prévio a curto prazo com o hormônio estrógeno, o qual faz parte da composição de grande parte dos contraceptivos hormonais, apresenta efeito protetor ou deletério após isquemia experimental em ratas em

idade reprodutiva. Nossos resultados demonstram que o tratamento prévio com hormônio estrógeno a curto prazo mostrou efeito neuroprotetor com significância estatística, resultado em maior densidade de células no grupo de animais que usou o hormônio.

As alterações morfológicas e celulares induzidas pela injeção de ET-1 foram observadas e analisadas quantitativamente por meio da coloração de Nissl na área de lesão dos animais que passaram por indução isquêmica (Fig. 5).

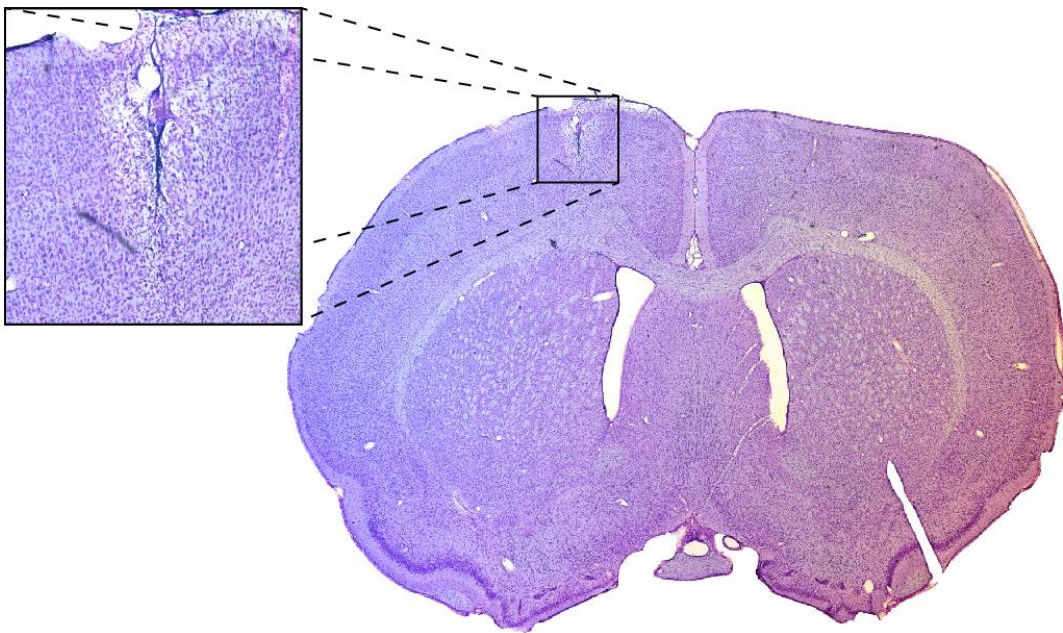


Fig. 5 - Fotomicrografia da área de lesão analisada com auxílio da coloração de Nissl.

A contagem automatizada de corpúsculos de Nissl realizadas com auxílio do programa de computação ImageJ (Fig. 6), nas seções coradas pela técnica de Nissil obteve como resultado Média±DP de $3.786,24 \pm 1512,1$ células/mm² para o grupo controle (GC) e $6.778 \pm 2157,6$ células/mm² no grupo que recebeu tratamento hormonal por 8 dias (GTE8). O teste de ANOVA com pós-teste de Tuckey demonstrou diferença estatística entre os grupos ($P=0,0239$) (Fig. 7).

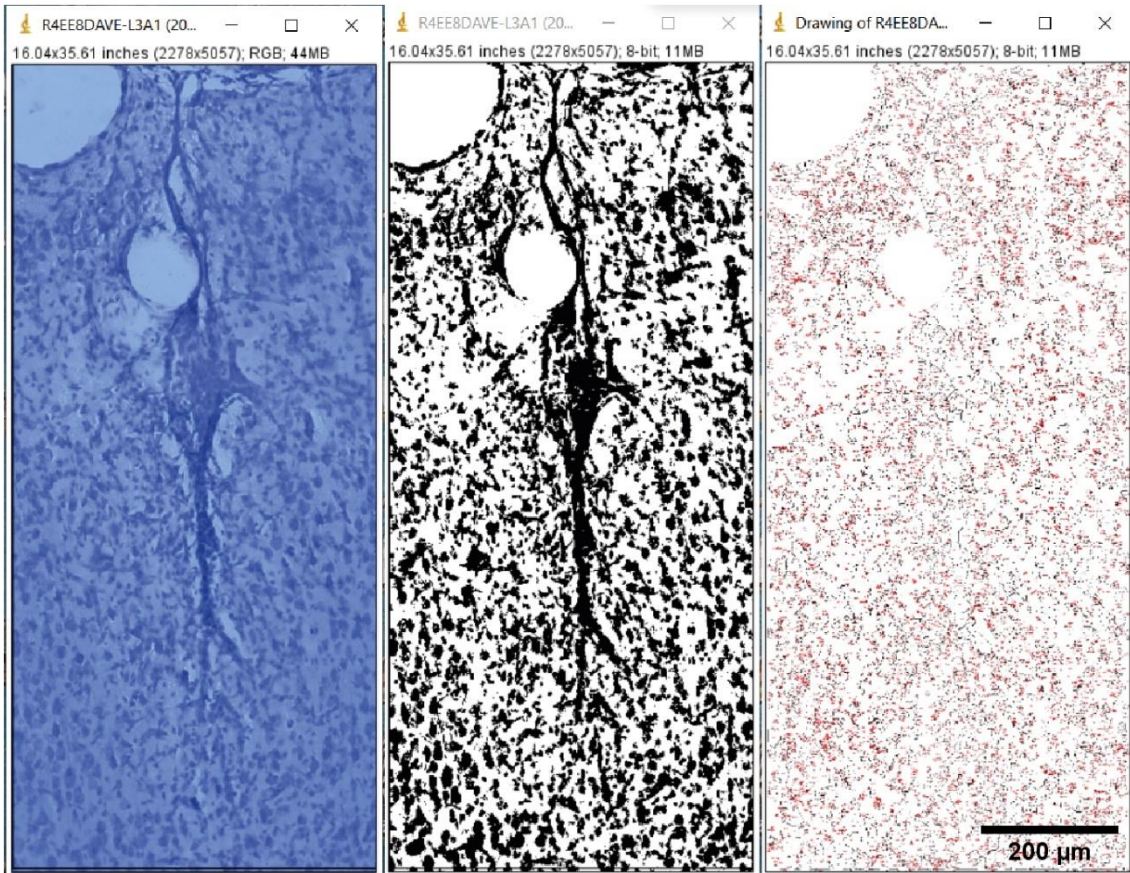


Fig. 6 – Protocolo de contagem de células usando o programa de computador *ImageJ*

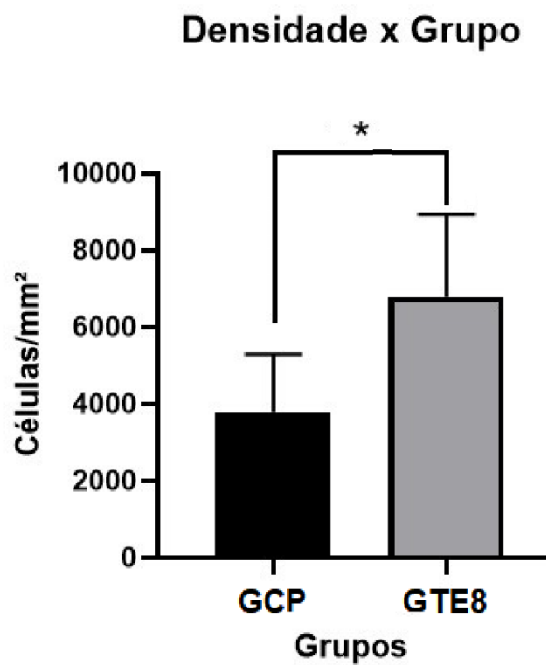


Fig. 7 - Gráfico representativo da média \pm DP do número total de células/mm² coradas pela técnica de Nissl em cada grupo experimental.

Os estudos que buscaram identificar a ação de hormônios em modelos de isquemia experimental utilizam, principalmente, modelos de animais machos, senescentes ou fêmeas ovariectomizadas. Além disso, são muitas as variáveis associadas aos diferentes modelos experimentais como tempo e vias de aplicação do hormônio, tipo de modelo isquêmico, hormônio utilizado e métodos de mensuração da lesão induzida (Gibson et al., 2006; Wong et al., 2013).

A idade reprodutiva em animais mostra-se como uma importante variável capaz de modular os efeitos da isquemia e do tratamento hormonal, logo utilizar modelos de animais em diferentes janelas de idade reprodutiva pode refletir em diferentes resultados referentes a ação do tratamento hormonal (Selvamani and Sohrabji, 2010; Sohrabji et al., 2019). De acordo com o estudo de Selvamani & Sohrabji (2010), o volume da lesão isquêmica foi maior em fêmeas senescentes quando comparados em animais em idade reprodutiva, assim como também houve aumento no volume da lesão pós-isquemia em animais senescentes ovariectomizados tratados com estrógeno, enquanto em animais na idade reprodutiva ovariectomizados nas mesmas condições de tratamento hormonal foi observado diminuição do volume da lesão isquêmica. Portanto, o estado reprodutivo é um ponto crítico para o efeito do tratamento hormonal (Selvamani and Sohrabji, 2010).

A ação do hormônio estrógeno é ampla e sua influência no sistema nervoso central é objeto de estudo desde a década de 1990 (Hall et al., 1991; Simpkins et al., 1997). Nesse sentido, entende-se a vasta influência desse hormônio em diferentes processos no sistema nervoso central (SNC) como, por exemplo, plasticidade sináptica, excitabilidade neuronal e mecanismos de neuroproteção (Brann et al., 2007; Cersosimo and Benarroch, 2015; Raghava et al., 2017). A síntese estrogênica perpassa por vias metabólicas periféricas e no próprio SNC, utilizando-se de vias interconectada de síntese a qual sofre influência de diversas variáveis como, por exemplo, do estado reprodutivo e da integralidade do SNC (Cui et al., 2013). Além disso, essa interdependência entre variáveis relacionadas à ação do estrógeno influenciam de maneiras diferentes a biogênese e remodelamento de circuitos sinápticos assim como pode ser observada na capacidade de modulação de morte celular e neurogênese no hipocampo, podendo apresentar diferentes desfechos de acordo com o gênero (Cersosimo and Benarroch, 2015).

A imunomarcção com anticorpo primário NeuN possibilitou quantificar o número de neurônios imunomarcados (Fig. 8A) (média \pm DP) $886,2 \pm 92,1$ de células/mm² no grupo tratado por 8 dias. A quantificação do número de neurônios imunomarcados no GC ainda está sendo realizada.

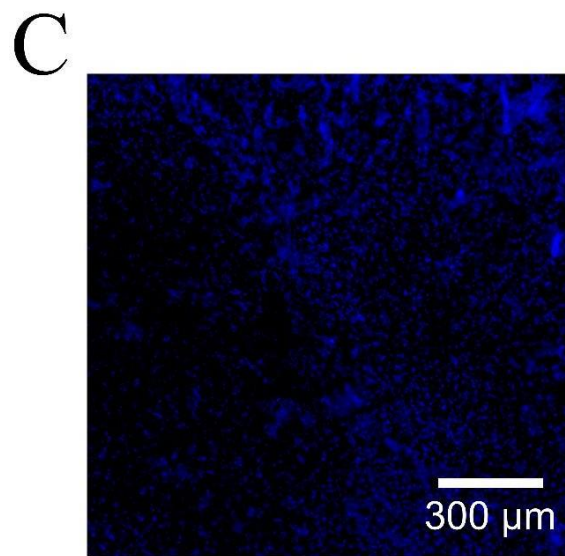
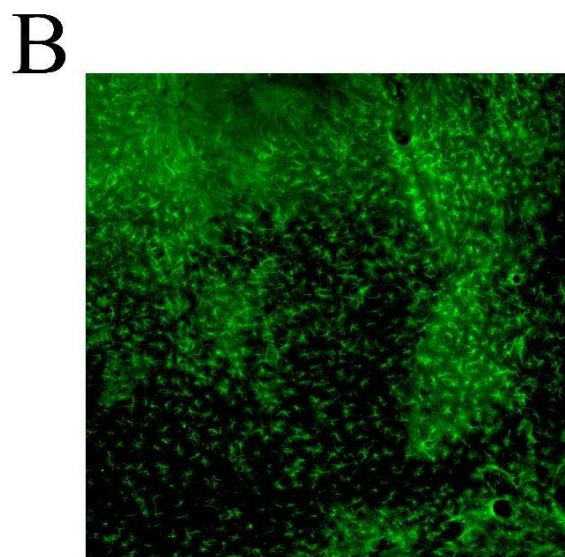
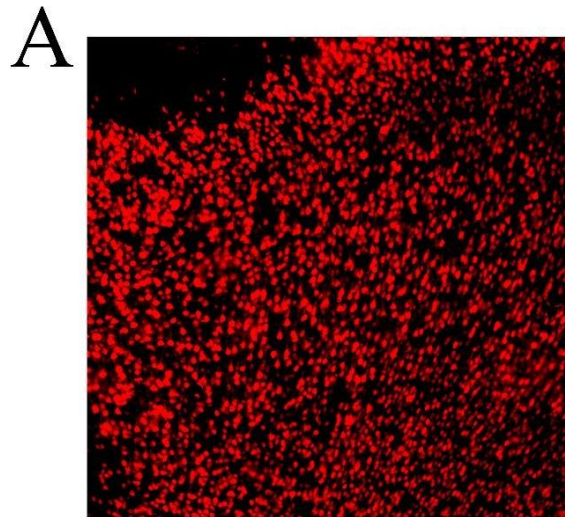


Fig. 8 - Fotomicrografia de neurônios (A), Astrócitos (B) e Núcleos (C) pós marcação pelos anticorpos antiNeu-N (A), anti-GFAP (B) e coloração de DAPI (C).

Nesse contexto, há evidências que mostram diferentes mecanismos e sinalizações relacionadas à capacidade neuroprotetiva do estrógeno (Brann et al., 2007; Cersosimo and Benarroch, 2015; Raghava et al., 2017; Strom et al., 2011). Esse desfecho de neuroproteção encontra-se associado à ação direta desse hormônio no SNC e também de forma indireta por meio da regulação de mediadores inflamatórios, os quais apresentam vias genéticas e epigenéticas (Strom et al., 2011). Além da regulação gênica, o estrógeno apresenta capacidade regulatória não gênica, assim como o observado no estudo de Wang *et al* (2006), no qual foi possível identificar que o estrógeno possibilita a interação entre o receptor de estrógeno alfa e a via de ativação da enzima AKT1, a qual quando ativada, possibilita a inativação de sinalizações pró-apoptóticas, prevenindo a perda de neurônios (Wang et al; 2006).

Um dos mecanismos que se mostra associado à capacidade neuroprotetiva do estrógeno está relacionado com a modulação da proteína transmembrana que é canal de água Aquaporina 4 (AQP4) que tem capacidade reguladora do fluxo de água para dentro ou para fora das células nervosas, uma ação importante para a diminuição de edema pós-isquemia do SNC (Papadopoulos and Verkman, 2007; Shin et al., 2011). Logo, quanto maior expressão de Aquaporina 4, menores danos pós-lesão isquêmica no encéfalo (Papadopoulos and Verkman, 2007; Shin et al., 2011). Segundo o estudo de Shin *et al* (2011), em modelo animal de isquemia experimental, as fêmeas apresentam menor área de lesão cortical cerebral e menor formação de edema quando comparadas a machos. Em consonância com esse resultado, foi observada uma preservação na expressão de AQP4 nas fêmeas após indução isquêmica, enquanto em machos houve diminuição (Shin *et al*; 2011). Esse efeito de preservação da AQP4 em fêmeas foi perdido após ovariectomia e recuperado após tratamento de reposição hormonal com estrógeno, sugerindo ação importante desse hormônio na manutenção da expressão da AQP4 e, conseqüentemente, na neuroproteção (Shin et al., 2011).

Outras vias importantes dão suporte aos resultados de neuroproteção. Dentre essas vias, encontra-se a ação do estrógeno nos mediadores centrais apoptóticos (Cersosimo and Benarroch, 2015; Strom et al., 2011). A apoptose é um importante fator associado ao mecanismo de lesões encefálicas isquêmicas o qual pode ser regulado, estimulando agentes pró e/ou anti apoptóticos (Naito et al., 2020; Radak et al., 2017). Dentre a ação do estrógeno na regulação da apoptose se destaca a regulação de fatores genéticos como, por exemplo, a manutenção da expressão do gene Bcl-2 pós indução isquêmica em modelo experimental, o qual apresenta ação anti-apoptótica e, conseqüentemente, a manutenção de sua expressão nessas circunstâncias refletem em uma menor área de lesão (Dubal et al., 1999; Strom et al., 2011).

Além disso, outro achado importante na pesquisa relaciona-se ao aumento do recrutamento astrocítico (Fig. 9). Nas secções imunomarcadas com o anticorpo anti-GFAP (Fig. 8B), a densidade média de astrócitos no GTE8 foi de $1006,62 \pm 29,458$ astrócitos/mm². A quantificação do controle ainda está sendo realizada.



Fig. 9 - Sobreposição de fotomicrografias (10x) após imunomarcação com os anticorpos anti-NeuN (Vermelho), anti-GFAP (Verde) e coloração de DAPI (Azul), respectivamente.

A ativação de astrócitos é observada como um fator atuante das vias de neuroproteção, pois a expressão dos receptores de estrógeno (alfa e beta) na composição dessa célula glial faz com que o estrógeno apresente papel evidenciado na indução de neuroproteção (Acáz-Fonseca et al., 2014; Ma et al., 2016). Dessa forma, diversos estudos identificam papel importante dos astrócitos na biogênese local de estrógeno, fato este identificado pelo aumento da enzima aromatase, conversora de andrógenos em estrogênios, após indução isquêmica experimental (Brann et al., 2007; Cersosimo and Benarroch, 2015; Wang et al., 2014).

Considerando todas essas evidências, o tratamento hormonal com estrógeno mostrou associação com a liberação de diferentes moléculas de ação neuroprotetoras como, por exemplo, aumento na liberação da proteína de fator de transformação do crescimento beta (TGF-Beta), a qual é liberada pelos astrócitos e desempenha importante papel neuroprotetor, mediando ação anti-inflamatória por meio de sua característica imunossupressora, amenizando os danos causados pelo sistema imune durante lesões do tecido nervoso, além de desempenhar papel anti-apoptótico por meio do aumento da fosforilação da proteína Bad - pró-apoptótica (Acáz-Fonseca et al., 2014; Dobolyi et al., 2012).

E, finalmente, o estrógeno apresenta papel importante na potencialização da enzima glutamina sintase, a qual é específica dos astrócitos e é importante na produção de glutamina, assim como esse hormônio é importante para a expressão de transportadores de glutamato astrocíticos que juntos formam um conjunto de evidências da importante ação neuroprotetora associado aos astrócitos e ao estrógeno (Brann et al., 2007). Por fim, entende-se que por diferentes vias, o estrógeno apresenta importante papel durante as condições que perturbam a homeostasia do SNC, apresentando variadas interações com as células desse sistema para promover proteção durante eventos cerebrovasculares. Juntos, essas evidências científicas corroboram os resultados de ação neuroprotetora do contraceptivo hormonal estrogênico usado a curto prazo em modelo de lesão focal experimental de S1/M1. Entretanto, mais análises precisam ser realizadas para ratificar nossas conclusões.

CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que houve diferença significativa na quantidade total de corpúsculos de Nissl entre os grupos GT8 e o GC. As análises após protocolo de imunofluorescência entre os grupos tratamento (curto e longo prazo) ao que se refere aos neurônios (NeuN) e astrócitos (GFAP) anda estão sendo finalizados.

Os nossos resultados estão em consonância com os encontrados em outros estudos, os quais observam diferentes mecanismos de neuroproteção com a utilização de tratamento hormonal com o estrógeno. Os mecanismos associados aos contraceptivos hormonais a base de estrógeno apresentam interdependência com outros fatores com, por exemplo, dosagem, tempo de aplicação e idade do animal utilizado no modelo experimental. Logo, mais pesquisas precisam ser realizadas para suprirem as necessidades das diferentes variáveis associadas à temática.

REFERÊNCIAS

- Acaz-Fonseca, E., Sanchez-Gonzalez, R., Azcoitia, I., Arevalo, M.A., Garcia-Segura, L.M., 2014. Role of astrocytes in the neuroprotective actions of 17beta-estradiol and selective estrogen receptor modulators. *Mol Cell Endocrinol* 389, 48-57.
- Alhazzani, A., Venkatachalapathy, P., Padhilahouse, S., Sellappan, M., Munisamy, M., Sekaran, M., Kumar, A., 2021. Biomarkers for Antiplatelet Therapies in Acute Ischemic Stroke: A Clinical Review. *Front Neurol* 12, 667234.
- Azizi, A., Khatiban, M., Mollai, Z., Mohammadi, Y., 2020. Effect of Informational Support on Anxiety in Family Caregivers of Patients with Hemiplegic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 29, 105020.
- Azoulay, C., 2004. [Menopause in 2004: "hormone replacement therapy" is not what it used to be anymore]. *Rev Med Interne* 25, 806-815.
- Bejot, Y., Bailly, H., Durier, J., Giroud, M., 2016. Epidemiology of stroke in Europe and trends for the 21st century. *Presse Med* 45, e391-e398.
- Brann, D.W., Dhandapani, K., Wakade, C., Mahesh, V.B., Khan, M.M., 2007. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. *Steroids* 72, 381-405.
- Campbell, B.C.V., De Silva, D.A., Macleod, M.R., Coutts, S.B., Schwamm, L.H., Davis, S.M., Donnan, G.A., 2019. Ischaemic stroke. *Nat Rev Dis Primers* 5, 70.
- Campbell, B.C.V., Khatri, P., 2020. Stroke. *Lancet* 396, 129-142.
- Casado-Espada, N.M., de Alarcon, R., de la Iglesia-Larrad, J.I., Bote-Bonaecha, B., Montejo, A.L., 2019. Hormonal Contraceptives, Female Sexual Dysfunction, and Managing Strategies: A Review. *J Clin Med* 8.
- Cersosimo, M.G., Benarroch, E.E., 2015. Estrogen actions in the nervous system: Complexity and clinical implications. *Neurology* 85, 263-273.
- Chauhan, G., Debette, S., 2016. Genetic Risk Factors for Ischemic and Hemorrhagic Stroke. *Curr Cardiol Rep* 18, 124.
- Collins, C., 2007. Pathophysiology and classification of stroke. *Nurs Stand* 21, 35-39.
- Cui, J., Shen, Y., Li, R., 2013. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol Med* 19, 197-209.
- De Leo, V., Musacchio, M.C., Cappelli, V., Piomboni, P., Morgante, G., 2016. Hormonal contraceptives: pharmacology tailored to women's health. *Hum Reprod Update* 22, 634-646.
- Dobolyi, A., Vincze, C., Pal, G., Lovas, G., 2012. The neuroprotective functions of transforming growth factor beta proteins. *Int J Mol Sci* 13, 8219-8258.
- Dubal, D.B., Shughrue, P.J., Wilson, M.E., Merchenthaler, I., Wise, P.M., 1999. Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *J Neurosci* 19, 6385-6393.
- Ekker, M.S., Boot, E.M., Singhal, A.B., Tan, K.S., Debette, S., Tuladhar, A.M., de Leeuw, F.E., 2018. Epidemiology, aetiology, and management of ischaemic stroke in young adults. *Lancet Neurol* 17, 790-801.
- Gibson, C.L., Gray, L.J., Murphy, S.P., Bath, P.M., 2006. Estrogens and experimental ischemic stroke: a systematic review. *J Cereb Blood Flow Metab* 26, 1103-1113.
- Hall, E.D., Pazara, K.E., Linseman, K.L., 1991. Sex differences in postischemic neuronal necrosis in gerbils. *J Cereb Blood Flow Metab* 11, 292-298.
- Hankey, G.J., 2017. Stroke. *Lancet* 389, 641-654.
- Kalaria, R.N., Akinyemi, R., Ihara, M., 2016. Stroke injury, cognitive impairment and vascular dementia. *Biochim Biophys Acta* 1862, 915-925.

Ma, Y., Guo, H., Zhang, L., Tao, L., Yin, A., Liu, Z., Li, Y., Dong, H., Xiong, L., Hou, W., 2016. Estrogen replacement therapy-induced neuroprotection against brain ischemia-reperfusion injury involves the activation of astrocytes via estrogen receptor beta. *Sci Rep* 6, 21467.

Naito, M.G., Xu, D., Amin, P., Lee, J., Wang, H., Li, W., Kelliher, M., Pasparakis, M., Yuan, J., 2020. Sequential activation of necroptosis and apoptosis cooperates to mediate vascular and neural pathology in stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 4959-4970.

Papadopoulos, M.C., Verkman, A.S., 2007. Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatr Nephrol* 22, 778-784.

Radak, D., Katsiki, N., Resanovic, I., Jovanovic, A., Sudar-Milovanovic, E., Zafirovic, S., Mousad, S.A., Isenovic, E.R., 2017. Apoptosis and Acute Brain Ischemia in Ischemic Stroke. *Curr Vasc Pharmacol* 15, 115-122.

Raghava, N., Das, B.C., Ray, S.K., 2017. Neuroprotective effects of estrogen in CNS injuries: insights from animal models. *Neurosci Neuroecon* 6, 15-29.

Roy-O'Reilly, M., McCullough, L.D., 2018. Age and Sex Are Critical Factors in Ischemic Stroke Pathology. *Endocrinology* 159, 3120-3131.

Selvamani, A., Sohrabji, F., 2010. Reproductive age modulates the impact of focal ischemia on the forebrain as well as the effects of estrogen treatment in female rats. *Neurobiol Aging* 31, 1618-1628.

Shin, J.A., Choi, J.H., Choi, Y.H., Park, E.M., 2011. Conserved aquaporin 4 levels associated with reduction of brain edema are mediated by estrogen in the ischemic brain after experimental stroke. *Biochim Biophys Acta* 1812, 1154-1163.

Simpkins, J.W., Rajakumar, G., Zhang, Y.Q., Simpkins, C.E., Greenwald, D., Yu, C.J., Bodor, N., Day, A.L., 1997. Estrogens may reduce mortality and ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the female rat. *J Neurosurg* 87, 724-730.

Sirsat, M.S., Ferme, E., Camara, J., 2020. Machine Learning for Brain Stroke: A Review. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 29, 105162.

Sohrabji, F., Okoreeh, A., Panta, A., 2019. Sex hormones and stroke: Beyond estrogens. *Horm Behav* 111, 87-95.

Strom, J.O., Theodorsson, A., Theodorsson, E., 2011. Mechanisms of estrogens' dose-dependent neuroprotective and neurodamaging effects in experimental models of cerebral ischemia. *Int J Mol Sci* 12, 1533-1562.

Toman, N.G., Grande, A.W., Low, W.C., 2019. Neural Repair in Stroke. *Cell Transplant* 28, 1123-1126.

Wang, C., Jie, C., Dai, X., 2014. Possible roles of astrocytes in estrogen neuroprotection during cerebral ischemia. *Rev Neurosci* 25, 255-268.

Wang, R., Zhang, Q.G., Han, D., Xu, J., Lu, Q., Zhang, G.Y., 2006. Inhibition of MLK3-MKK4/7-JNK1/2 pathway by Akt1 in exogenous estrogen-induced neuroprotection against transient global cerebral ischemia by a non-genomic mechanism in male rats. *J Neurochem* 99, 1543-1554.

Wong, R., Renton, C., Gibson, C.L., Murphy, S.J., Kendall, D.A., Bath, P.M., Progesterone Pre-Clinical Stroke Pooling Project, C., 2013. Progesterone treatment for experimental stroke: an individual animal meta-analysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 33, 1362-1372.

Xiao, M., Li, Q., Feng, H., Zhang, L., Chen, Y., 2017. Neural Vascular Mechanism for the Cerebral Blood Flow Autoregulation after Hemorrhagic Stroke. *Neural Plast* 2017, 5819514.

Su, Q., Cheng, Y., Jin, K., Cheng, J., Lin, Y., Lin, Z., Wang, L., Shao, B., 2016. Estrogen Therapy Increases BDNF Expression and Improves Post-Stroke Depression in Ovariectomy-Treated Rats. *Exp Ther Med* 2016 Sep; 12(3): 1843-1848.