



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**JULIANA FERNANDES PEREIRA**

**PALMATINA DIMINUI A NEUROINFLAMAÇÃO EM CAMUNDONGOS**  
**SUBMETIDOS À ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL PERMANENTE**

**FORTALEZA**

**2017**

**JULIANA FERNANDES PEREIRA**

**PALMATINA DIMINUI A NEUROINFLAMAÇÃO EM CAMUNDONGOS  
SUBMETIDOS À ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL PERMANENTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciências Médicas. Área de concentração: doenças crônico degenerativas.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Geanne Matos de Andrade.

**FORTALEZA**

**2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- P492p Pereira, Juliana Fernandes.  
PALMATINA DIMINUI A NEUROINFLAMAÇÃO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À  
ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL PERMANENTE / Juliana Fernandes Pereira. – 2017.  
137 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Médicas, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade.
1. Isquemia cerebral. 2. palmatina. 3. neuroinflamação. I. Título.

CDD 610

---

**JULIANA FERNANDES PEREIRA**

**PALMATINA DIMINUI A NEUROINFLAMAÇÃO EM CAMUNDONGOS  
SUBMETIDOS À ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL PERMANENTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciências Médicas. Área de concentração: Doenças crônico-degenerativas.

Aprovada em: 05/12/2017.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Geanne Matos de Andrade  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Carlos Campos Camara  
Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA)

---

Prof. Dr. Gislei Frota Aragão  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Carla Lima Nunes  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Silvania Maria Mendes Vasconcelos  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À Deus e à meus pais,

Alina e José

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por todo o caminho percorrido e luz na minha vida.

A minha família por todo o apoio e compreensão, meus irmãos Alexandre Fernandes, Mariana Fernandes e Adriana Fernandes e minha sobrinha Ana Clara Fernandes.

As minhas amigas de laboratório que estiveram ao meu lado em todo o trajeto, Analu Fonteles, Julliana Catharina, Ana Paula Fontenele, Patrícia Araújo, Kelly Rose, Carolina Melo e Ana Thaís. Minhas amigas de graduação que mesmo longe sei que torcem por mim, Cecília Rocha, Lívia Gurgel, Anaiara Machado e Maria Isabel. As da época de colégio que sempre estão por perto, Patrícia Monteiro, Lorena Dias, Elys Bezerra, Juliana Neri, Cecília Vasconcelos, Samara Monteiro e Rafaelle Vasconcelos.

A todo o laboratório de Neurociências e Comportamento, em especial a professora Geanne Matos de Andrade por ter me recebido tão bem no laboratório, por toda orientação, e ao Arnaldo Viana que sempre me ajudou quando precisei.

Aos membros da minha banca de doutorado, prof<sup>a</sup> Ana Carla, prof<sup>o</sup> Gislei Frota, prof<sup>o</sup> Carlos Camara, prof<sup>a</sup> Silvania Vasconcelos.

Ao programa de pós-graduação em Ciências Médicas por mais uma vez ter me ajudado, em especial a Ivone e a Rita.

A FUNCAP pelo apoio financeiro.

Obrigada a todos que me ajudaram nessa jornada.

## RESUMO

O Acidente Vascular cerebral (AVC) é caracterizado por um déficit neurológico súbito, originado por processos isquêmicos ou hemorrágicos no sistema nervoso central, representando a segunda maior causa de morte e a maior de deficiências em adultos no mundo. A isquemia cerebral é uma condição fisiopatológica em que ocorre uma diminuição na perfusão de sangue oxigenado para o cérebro, como uma consequente diminuição de fornecimento de nutrientes necessários para o seu funcionamento. A palmatina é um alcaloide protoberberínico extraído de plantas medicinais com atividade antioxidante e anti-inflamatória. O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos da palmatina sobre o dano neuronal, déficits de memória, resposta inflamatória e estresse oxidativo de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente induzida por oclusão da artéria cerebral média (pMCAO). Foram utilizados 96 camundongos Swiss, machos, pesando entre 30-35g, divididos em 6 grupos, sendo falso-operado (FO), FO tratado com palmatina (20 mg/kg, via oral), pMCAO e pMCAO tratados com palmatina nas doses de 0,2, 2 e 20 mg/kg. A palmatina foi administrada via oral 2 h após a pMCAO e/ou uma vez ao dia durante 3 dias a depender do desenho experimental. O dano isquêmico foi avaliado 24 horas após a cirurgia através da coloração com TTC e da avaliação neurológica. A palmatina diminuiu a área de infarto e melhorou o desempenho sensorio-motor dos animais submetidos à pMCAO. A atividade locomotora foi avaliada 72 horas após a pMCAO através do teste de campo aberto, onde não foram observadas diferenças na capacidade de exploração horizontal e vertical entre os animais isquemiados e os animais isquemiados tratados com palmatina. Os déficits de memória foram avaliados pelos testes do labirinto em Y (memória de trabalho) e esquiva passiva (memória aversiva) e observamos que os animais isquemiados apresentaram déficits na memória de trabalho e na aversiva e o tratamento com a palmatina reverteu esses déficits de memória (trabalho e aversiva tardia). A neuroinflamação foi avaliada através da imunomarcagem para GFAP, Iba-1, iNOS, COX-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B e a palmatina diminuiu a imunomarcagem para todos esses parâmetros. Além disso, também foram avaliados o estresse oxidativo, através da imunomarcagem para SOD-2, e a sinaptogênese, através da avaliação da expressão de sinaptofisina. E não foram observadas alterações significativas nos animais isquemiados e nem nos animais tratados com palmatina. Concluímos que a palmatina apresentou atividade neuroprotetora provavelmente devido a sua ação anti-inflamatória, nos fornecendo evidências experimentais acerca de sua utilização como adjuvante no tratamento da isquemia cerebral.

Palavras-chave: Isquemia cerebral, palmatina, neuroinflamação.

## ABSTRACT

Stroke is chiefly characterized by a sudden neurological deficit formerly by ischemic and hemorrhagic processes in the central nervous system. Stroke is the second cause of death and the first cause of disability worldwide. Cerebral ischemia is a pathophysiologic condition triggered by blood supply decrease in the brain that leads to metabolic demand decrease required to its functioning. Palmatine is an alkaloid extracted from Chinese medicinal plants with known antioxidant and anti-inflammatory activity. The aim of this study was to evaluate the palmatine effect against neuronal death, memory deficits, inflammatory response and oxidative stress in mice subjected to focal cerebral ischemia induced by permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO). Ninety-six Swiss male mice, weighting 30-35g, were divided into 6 groups: 1. sham-operated, 2. sham-operated treated with palmatine (20 mg/kg p.o.), 3. subjected to pMCAO and treated with vehicle, 4. subjected to pMCAO and treated with palmatine (0.2 mg/kg, p.o.), 5. subjected to PMCAO and treated with palmatine (2 mg/kg, p.o.) and 6. subjected to pMCAO and treated with palmatine (20 mg/kg, p.o.). Palmatine treatment was initiated 2 h after pMCAO induction and daily over a period of 4 days depending of the experimental design. Ischemic damage was assessed by TTC staining and neurological evaluation 24 h after pMCAO induction. Palmatine diminished ischemic area and enhanced neurological performance in mice subjected to pMCAO. Locomotor activity was assessed by open field test 72 h after PMCAO induction. Memory deficits were evaluated by Y maze test (working memory) and passive avoidance test (aversive memory). PMCAO induced memory deficits in mice and palmatine treatment reversed these deficits. Neuroinflammation was assessed through the measurement of GFAP/Iba-1/iNOS/COX-2/IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B-immunohistochemistry with PMCAO significantly increasing neuroinflammatory and palmatine treatment reestablished it. Furthermore, oxidative stress was evaluated through the measurement of SOD-2-immunohistochemistry and synaptogenesis through the measurement of synaptophysin expression. However, no alteration was found between the groups. Our results suggest that palmatine has a remarkable neuroprotective effect probably by its neuroinflammatory activity, providing experimental evidence regarding the possible palmatine use as an adjuvant treatment to stroke.

**Keywords:** Cerebral ischemia. Palmatine. Neuroinflammation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Etiologia da Isquemia cerebral.....	18
Figura 2	Cascata da isquemia cerebral.....	24
Figura 3	Neuroinflamação pós-isquêmica.....	28
Figura 4	Estrutura química da berberina e da palmatina.....	36
Figura 5	Protocolo experimental.....	42
Figura 6	Eletrocauterização da artéria cerebral média.....	43
Figura 7	Arena do Campo Aberto.....	45
Figura 8	Labirinto em Y.....	46
Figura 9	Aparelho de Esquiva Passiva.....	47
Figura 10	A Palmatina melhora os déficits sensório-motores em camundongos submetidos à pMCAO.....	51
Figura 11	Fotografia das fatias cerebrais submetidas à coloração com TTC 1%.....	52
Figura 12	A Palmatina diminui a área de infarto isquêmico em camundongos submetidos à pMCAO.....	53
Figura 13	A Palmatina não altera o número de cruzamentos no teste do campo aberto de camundongos submetidos à pMCAO.....	54
Figura 14	A Palmatina não altera o número de “ <i>rearings</i> ” no teste do campo aberto de camundongos submetidos à pMCAO.....	55
Figura 15	A Palmatina protege contra os déficits de memória de trabalho induzidos pela pMCAO.....	56
Figura 16	Efeito da Palmatina sobre a memória aversiva de camundongos submetidos à pMCAO.....	57
Figura 17	A Palmatina diminui a ativação da micróglia córtex de camundongos 96 horas após a pMCAO.....	59
Figura 18	A Palmatina não diminui ativação da micróglia no estriado de camundongos 96 horas após a pMCAO.....	60
Figura 19	A palmatina não altera a ativação da micróglia no hipocampo de camundongos 96 horas após a pMCAO.....	61
Figura 20	A Palmatina diminuiu a ativação de astrócitos no córtex de camundongos 96 horas após a pMCAO.....	63
Figura 21	A palmatina diminuiu a ativação de astrócitos no estriado de camundongos 96 horas após a pMCAO.....	64

Figura 22	A palmatina não altera a ativação de astrócitos no hipocampo de camundongos 96 horas após a pMCAO.....	65
Figura 23	A Palmatina diminui a expressão de iNOS no córtex de camundongos 24 horas após a pMCAO.....	67
Figura 24	A Palmatina não diminui a expressão de iNOS no estriado de camundongos 24 horas após a pMCAO.....	68
Figura 25	A Palmatina não altera a expressão de iNOS no hipocampo de camundongos 24 horas após a pMCAO.....	69
Figura 26	A Palmatina não altera a expressão de iNOS no córtex de camundongos 96 horas após a pMCAO.....	70
Figura 27	A Palmatina não altera a expressão de iNOS no estriado de camundongos 96 horas após a pMCAO.....	71
Figura 28	A Palmatina não altera a expressão de iNOS no hipocampo de camundongos 96 horas após a pMCAO.....	72
Figura 29	A Palmatina não altera a expressão de COX-2 no córtex de camundongos 24 horas após a pMCAO.....	74
Figura 30	A Palmatina diminuiu a expressão de COX-2 no estriado de camundongos 24 horas após a pMCAO.....	75
Figura 31	A Palmatina diminuiu a expressão de COX-2 no hipocampo de camundongos 24 horas após a pMCAO.....	76
Figura 32	A Palmatina diminuiu a expressão de COX-2 no córtex de camundongos 96 horas após a pMCAO.....	77
Figura 33	A Palmatina diminuiu a expressão de COX-2 no estriado de camundongos 96 horas após a pMCAO.....	78
Figura 34	A Palmatina não altera a expressão de COX-2 no hipocampo de camundongos 96 horas após a pMCAO.....	79
Figura 35	A Palmatina diminuiu expressão de TNF- $\alpha$ no córtex de camundongos 24 horas após a pMCAO.....	81
Figura 36	A Palmatina diminui a expressão de TNF- $\alpha$ no estriado de camundongos 24 horas após a pMCAO.....	82
Figura 37	A Palmatina diminui a expressão de TNF- $\alpha$ no hipocampo de camundongos 24 horas após a pMCAO.....	83
Figura 38	A Palmatina diminui a expressão de IL-1 $\beta$ no córtex de camundongos 24 horas após a pMCAO.....	85

Figura 39	A Palmatina diminui a expressão de IL-1 $\beta$ no estriado de camundongos 24 horas após a pMCAO.....	86
Figura 40	A Palmatina não altera expressão de IL-1 $\beta$ no hipocampo de camundongos 24 horas após a pMCAO.....	87
Figura 41	A Palmatina diminuiu a expressão de NF- $\kappa$ B no córtex de camundongos 24 horas após a pMCAO.....	89
Figura 42	A Palmatina diminuiu a expressão de NF- $\kappa$ B no estriado de camundongos 24 horas após a pMCAO.....	90
Figura 43	A Palmatina não altera a expressão de NF- $\kappa$ B no hipocampo de camundongos 24 horas após a pMCAO.....	91
Figura 44	A Palmatina não altera a expressão de SOD-2 no córtex de camundongos 24 horas após a pMCAO.....	93
Figura 45	A Palmatina não altera a expressão de SOD-2 no estriado de camundongos 24 horas após a pMCAO.....	94
Figura 46	A Palmatina não altera a expressão de SOD-2 no hipocampo de camundongos 24 horas após a pMCAO.....	95
Figura 47	A palmatina não altera a expressão de sinaptofisina no córtex de camundongos 96 horas após a pMCAO.....	96
Figura 48	A Palmatina não altera a expressão de sinaptofisina no estriado de camundongos 96 horas após à pMCAO.....	97
Figura 49	Modelo hipotético proposto para sítio de ação da palmatina no modelo de isquemia cerebral focal permanente.....	110

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Grupos de tratamento.....	41
Tabela 2 -	Escala utilizada para a avaliação neurológica.....	44
Tabela 3 -	Anticorpos primários utilizados para imunofluorescência e imunohistoquímica.....	49
Tabela 4 -	Anticorpos secundários utilizados para imunofluorescência e imunohistoquímica.....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.N	Avaliação Neurológica
ACE	<i>angiotensin I converting enzyme</i> / enzima conversora de angiotensina I
ACM	Artéria cerebral média
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
APOE	<i>apolipoprotein E</i> / apoproteína E
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
BHE	Barreira hematoencefálica
CEUA	Comitê de Ética para uso de animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX	Ciclooxigenase
EROs	EROs
F5	<i>coagulation factor V</i> / fator de coagulação 5
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FGB	<i>Fibrinogen beta chain</i> / cadeia de fibrinogênio beta
FO	Falso-operado
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> / proteína ácida fibrilar glial
i.p	Intraperitonal
Iba-1	<i>Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1</i> / proteína ligante de cálcio ionizada-1
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule</i> / Moléculas de adesão intercelular -1
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i> / óxido nítrico sintase induzível
LPS	Lipopolisacarídeo
M.R	Memória recente
M.T	Memória tardia
MAO-A	Monoamina oxidase A
MCAO	<i>middle cerebral artery occlusion</i> / oclusão da artéria cerebral média
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i> / proteína inflamatória de macrófagos

MPC	<i>Monocyte chemoattractant protein</i> / proteína quimiotática de monócito
MTC	Medicina Tradicional Chinesa
MTHFR	<i>methylenetetrahydrofolate reductase</i> / Metileno tetrahidrofolato redutase
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i> / fator nuclear – $\kappa$ B
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	<i>Nitric oxide</i> / óxido nítrico
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i> / óxido nítrico sintase
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
PAL	Palmatina
pMCAO	<i>Permanent middle cerebral artery occlusion</i> / oclusão permanente da artéria cerebral média
rt-PA	Ativador de plasminogênio tecidual
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido desmutase
STZ	<i>Streptozotocin</i> / estreptozotocina
TGF	<i>Transforming growth factor</i> / Fator de crescimento transformador
TNF- $\alpha$	<i>Tumour necrosis factor</i> / fator de necrose tumoral
TTC	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazol
UFC	Universidade Federal do Ceará
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule</i> /Molécula de adesão celular vascular-1
v.o	Via oral

## LISTA DE SÍMBOLOS

® Marca Registrada

% Porcentagem

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1</b>	<b>EPIDEMIOLOGIA.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2</b>	<b>FATORES DE RISCO.....</b>	<b>19</b>
<b>1.3</b>	<b>MODELOS DE ISQUEMIA CEREBRAL.....</b>	<b>20</b>
<b>1.4</b>	<b>PATOGÊNESE DA ISQUEMIA.....</b>	<b>22</b>
<b>1.5</b>	<b>NEUROINFLAMAÇÃO ISQUÊMICA.....</b>	<b>27</b>
<b>1.6</b>	<b>ISQUEMIA CEREBRAL E MEMÓRIA.....</b>	<b>30</b>
<b>1.7</b>	<b>TRATAMENTO.....</b>	<b>31</b>
<b>1.8</b>	<b>PLANTAS MEDICINAIS E ISQUEMIA.....</b>	<b>33</b>
<b>1.9</b>	<b>PALMATINA.....</b>	<b>35</b>
<b>1.10</b>	<b>RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>37</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>39</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivo Específico.....</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Animais.....</b>	<b>40</b>
<b>3.2</b>	<b>Drogas.....</b>	<b>40</b>
<b>3.3</b>	<b>Protocolo experimental.....</b>	<b>40</b>
<b>3.4</b>	<b>Isquemia cerebral focal por oclusão da artéria cerebral média.....</b>	<b>42</b>
<b>3.5</b>	<b>Avaliação Neurológica.....</b>	<b>43</b>
<b>3.6</b>	<b>Avaliação do infarto isquêmico - Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol.....</b>	<b>44</b>
<b>3.7</b>	<b>Avaliação da atividade locomotora - Teste do Campo Aberto.....</b>	<b>45</b>
<b>3.8</b>	<b>Avaliação da memória de trabalho - Teste do labirinto em Y.....</b>	<b>45</b>
<b>3.9</b>	<b>Avaliação da memória aversiva – Teste da Esquiva Passiva.....</b>	<b>46</b>
<b>3.10</b>	<b>Análise imunohistoquímica.....</b>	<b>47</b>
<b>3.11</b>	<b>Avaliação da expressão de Iba-1, GFAP e iNOS.....</b>	<b>47</b>
<b>3.12</b>	<b>Avaliação da imunoreatividade para COX-2, TNF-<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math>, NF-<math>\kappa</math>B e SOD-2.....</b>	<b>48</b>
<b>3.13</b>	<b>Avaliação da expressão de sinaptofisina através da técnica de Western-blot.....</b>	<b>49</b>
<b>3.14</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>50</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>

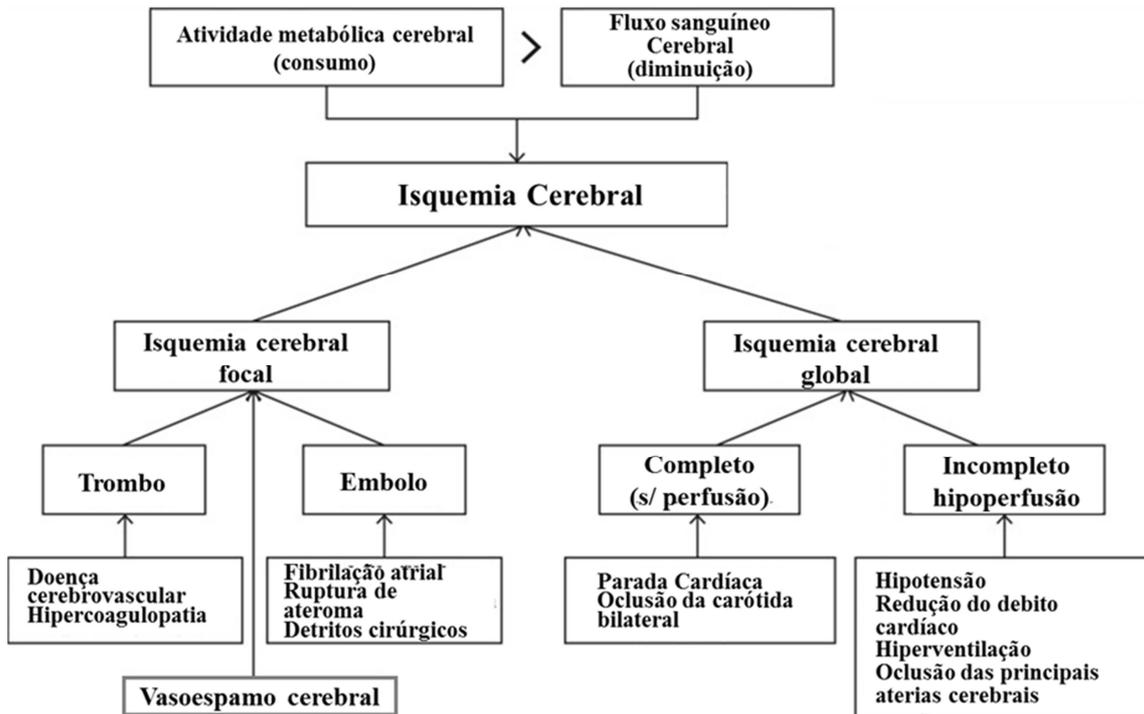
4.1	Avaliação sensório-motora dos animais submetidos à pMCAO e tratados com a palmatina.....	51
4.2	Efeito da palmatina sobre a área de infarto isquêmico de animais submetidos à pMCAO.....	52
4.3	Efeito da Palmatina sobre a atividade locomotora de camundongos submetidos à pMCAO.....	54
4.4	Efeito da Palmatina sobre a memória de trabalho de camundongos submetidos à pMCAO.....	56
4.5	Efeito da Palmatina sobre a memória aversiva de camundongos submetidos à pMCAO.....	57
4.6	Efeito da Palmatina sobre a ativação de microglia no córtex temporal, estriado e hipocampo de camundongos submetidos à pMCAO.....	58
4.7	Efeito da Palmatina sobre ativação de astrócitos no córtex, estriado e hipocampo de camundongos submetidos à pMCAO.....	62
4.8	Efeito da Palmatina sobre a expressão de iNOS no córtex, estriado e hipocampo de camundongos submetidos à pMCAO.....	66
4.9	Efeito da Palmatina sobre a expressão de COX-2 no córtex, estriado e hipocampo de camundongos submetidos à pMCAO.....	73
4.10	Efeito da Palmatina sobre a expressão de TNF- $\alpha$ no córtex, estriado e hipocampo de camundongos submetidos à pMCAO.....	80
4.11	Efeito da Palmatina sobre a expressão de IL-1 $\beta$ no córtex, estriado e hipocampo de camundongos submetidos à pMCAO.....	84
4.12	Efeito da Palmatina sobre a expressão de NF- $\kappa$ B no córtex, estriado e hipocampo de camundongos submetidos à pMCAO.....	88
4.13	Efeito da Palmatina sobre o estresse oxidativo avaliada através da expressão de SOD-2 no córtex, estriado e hipocampo de camundongos submetidos à pMCAO.....	92
4.14	Efeito da Palmatina sobre a expressão de sinaptofisina no córtex e estriado de camundongos submetidos à pMCAO.....	96
5	DISCUSSÃO.....	98
6	CONCLUSÃO.....	111
	REFERÊNCIAS.....	112

## 1 ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL

O Acidente Vascular cerebral (AVC) é caracterizado por um déficit neurológico súbito, originado por processos isquêmicos ou hemorrágicos no sistema nervoso central (SNC), e é a segunda maior causa de morte e a maior de deficiências em adultos no mundo (KOTLEGA *et al.*, 2016). O AVC pode ser do tipo hemorrágico, cerca de 15% dos casos, e ocorre quando há um sangramento intracerebral, ou do tipo isquêmico, também denominado isquemia cerebral, cerca de 85% dos casos, que acontece quando há uma oclusão dos vasos sanguíneos cerebrais (WOODRUFF *et al.*, 2011). Neste caso tem-se uma diminuição na perfusão de sangue oxigenado para o cérebro, com uma conseqüente diminuição de nutrientes e oxigênio necessários para o seu funcionamento adequado, podendo causar lesão cerebral irreversível (RAICHLE, 1983; ZHOU *et al.*, 2016).

A isquemia cerebral pode ser categorizada em dois tipos de acordo com a extensão da área isquêmica: isquemia focal e isquemia global (SIESJÖ *et al.*, 1995; CAPLAN *et al.*, 2006; MELONI; ZHU; KNUCKEY, 2006; SVEINSSON; KJARTANSSON; VALDIMARSSON, 2014). A isquemia focal envolve uma pequena área cerebral que é perfundida por um ramo de uma artéria cerebral, sendo, geralmente, causada por um trombo ou um êmbolo em uma artéria cerebral distal (ZHOU *et al.*, 2016). Em contraste, a isquemia global afeta todo o cérebro, resultando em uma redução generalizada do fluxo sanguíneo cerebral e é secundária a graves alterações fisiológicas, como hipotensão ou redução do débito cardíaco. A isquemia cerebral global pode ainda ser classificada como completa, se não houver fluxo sanguíneo, como em parada cardíaca, ou incompleta, quando há um fluxo sanguíneo, como em hipotensão profunda (Figura 01) (ZHOU *et al.*, 2016).

Figura 01. Etiologia da Isquemia cerebral



Fonte: Zhou e colaboradores, 2016

## 1.1 EPIDEMIOLOGIA

A Organização Mundial da Saúde estima que 15 milhões de pessoas no mundo sofrem com AVC a cada ano (HOU *et al.*, 2017). E com o aumento da expectativa de vida ocorrido nos últimos anos em todo mundo, trazendo mudanças no panorama da saúde da população, espera-se um aumento da prevalência do AVC. Acredita-se que até 2050 mais de 1,5 bilhões de pessoas com 65 anos ou mais serão acometidas pelo AVC (FEIGIN *et al.*, 2009; CAROD-ARTAL *et al.*, 2014).

Dados apontam que o AVC é a 2º maior causa de morte no mundo, em adultos de meia-idade e idosos. Quando nos referimos a população pediátrica o AVC está entre as 10 principais causas de morte. O AVC é a principal causa de incapacidade no trabalho em adultos. Informações mostram que cerca de 30 a 60% dos pacientes acometidos pelo AVC apresentam alguma incapacidade física após o evento, ocasionando efeitos negativos na saúde e na economia, por gerar elevados custos econômicos (MALLMANN *et al.*, 2012; GREENHAM *et al.*, 2016; GONZÁLEZ-GIRALDO *et al.*, 2016; KOTLEGA *et al.*, 2016).

No Brasil, o AVC é a principal causa de morte, com taxas de mortalidade maiores que em outros países da América do Sul, principalmente nas regiões do país menos favorecidas economicamente, constituindo um importante problema de saúde pública (DE PADUA *et al.*, 2003; LAVADOS *et al.*, 2007). Em 2009, segundo dados de domínio público

do Sistema Único de Saúde (DATASUS), do Ministério da Saúde, foram registradas 160.621 internações por doenças cerebrovasculares no Brasil. A taxa de mortalidade foi de 51,8 a cada grupo de 100.000 habitantes. O grupo acima de 80 anos representou quase 35% dos 99.174 óbitos (ALMEIDA, 2012). Segundo a Pesquisa Nacional de Saúde, em 2015, 1,5% da população teve o diagnóstico de AVC, representando, aproximadamente 2,2 milhões de pessoas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Os estudos que relatam dados epidemiológicos em nosso país trazem, em sua maioria, dados de regiões específicas, embora algumas regiões compartilhem da mesma epidemiologia, o que não reflete a realidade de nosso País, por ser um País de grandes disparidades (CARVALHO *et al.*, 2011). Pesquisa realizada por Fernandes e colaboradores (2012) avaliou o perfil de letalidade causada pelo AVC em São Paulo, Natal e João Pessoa e demonstrou que a maioria dos pacientes era homens e com idade média de 68 anos, sendo a maioria acometida pelo AVC isquêmico. Já a pesquisa realizada por Carvalho e colaboradores (2011) entre os anos de 2009 e 2010 em hospitais de Fortaleza, mostrou que maioria dos pacientes diagnosticados era mulheres e a média de idade era de 67 anos, e dentre os tipos de AVC a maioria foi acometido com o AVC isquêmico. Outra pesquisa realizada por Carvalho e colaboradores, em 2015, em João Pessoa demonstrou que dentre os pacientes estudados a maioria era mulheres e com uma idade média de 70 a 80 anos.

Os resultados encontrados por Carvalho e colaboradores em 2011 e em 2015 demonstraram que o AVC atinge mais mulheres do que homens, o que vai à contramão dos resultados encontrados na literatura, que relatam que o AVC é uma patologia mais comum em homens, esses achados só reforçam a diversidade epidemiológica com relação ao AVC no nosso País (PARK *et al.*, 2014; CARVALHO *et al.*, 2015).

## **1.2 FATORES DE RISCO**

Os fatores de riscos mais comuns associados ao AVC são diabetes *mellitus*, hipertensão, dislipidemias, obesidade, inatividade física, tabagismo, coronariopatia (SARWAR *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2016; OLAMOYEGUN *et al.*, 2016). Estudo mais recentes estão associando outras patologias ao risco aumentado do AVC, um deles associa a enxaqueca ao risco aumentado do AVC isquêmico em adultos jovens, principalmente fumantes e mulheres que fazem uso de contraceptivos orais (ABANOZ *et al.*, 2017).

Outros fatores de risco, como os psicossociais, são pouco investigados em comparação com os fatores biológicos e fisiopatológicos, alguns estudos também associam as condições socioeconômicas, o estresse psicossocial, sendo os estressores causados por estímulos relacionais, ocupacionais ou financeiros, e o estresse emocional, agudo e crônico,

com o risco de AVC em adultos (BOOTH *et al.*, 2015; BECHER *et al.*, 2016; KOTLEGA *et al.*, 2016). O estresse pode aumentar o risco de doenças cerebrovasculares por modular a atividade simpaticomimética, afetando a pressão arterial, o endotélio cerebral, a coagulação ou o ritmo cardíaco, porém mais estudos precisam ser realizados para que se possa compreender a complexidade desse problema e sua associação com o AVC (KOTLEGA *et al.*, 2016).

A hereditariedade para o AVC isquêmico é estimada em cerca de 35-40%, estudos tentam identificar as variedades genéticas associadas ao risco de AVC. Alterações no mecanismo de coagulação e inflamação estão envolvidos no AVC, possivelmente, uma disfunção nesses processos pode ser provocada por alterações genéticas em moléculas que participam desses mecanismos, como polimorfismos em genes que codificam proteínas envolvidas na coagulação (WANG *et al.*, 2009; GONZÁLEZ-GIRALDO *et al.*, 2016). Os genes comumente estudados são F5, ACE, APOE, MTHFR e FGB. Entretanto, estudos que investiguem melhor os fatores genéticos associados ao AVC precisam ser realizados (GONZÁLEZ-GIRALDO *et al.*, 2016).

Já os fatores de risco para o AVC infantil estão relacionados a arteriopatas, a doenças cardíacas, por exemplo a doença cardíaca congênita, a trombofilias congênicas ou adquiridas, a doenças reumatológicas, dentre outros (FELLING *et al.*, 2017). O AVC isquêmico pediátrico é uma causa incomum, mas importante, de morbidade neurológica em neonatos e crianças, com consequências como hemiparesia, deficiências sensório-motora, deficiência de linguagem, deficiência intelectual, problemas comportamentais e epilepsia (FELLING *et al.*, 2017).

### **1.3 MODELOS DE ISQUEMIA CEREBRAL**

O AVC pode desencadear um estado clínico altamente variável, onde o tamanho da área afetada e o desfecho neurológico dependem de múltiplos fatores, como a duração e a gravidade da isquemia, a etiologia e a localização, mas, também, a idade, o sexo, as comorbidades e os fatores genéticos, podem contribuir para a variabilidade nas manifestações clínicas (JICKLING; SHARP, 2015; WIEBERS; ADAMS; WHISNANT, 1990; PULSINELLI, 1992). O AVC isquêmico é um transtorno altamente complexo e heterogêneo, diante disso é difícil um modelo experimental que abranja todos os aspectos desta doença multifacetada, conseguindo, assim, reproduzir apenas aspectos específicos, onde é possível uma compreensão básica das principais vias moleculares induzidas por condições semelhantes à isquemia em humanos (SOMMER, 2017).

Os roedores são muitas vezes a primeira escolha para esses modelos devido ao fato de ratos e camundongos possuírem uma vasculatura semelhante aos humanos, além de um vasto repertório de testes de comportamento bem descritos que avaliam movimentos de membros similares aos usados pelos humanos (HOWELLS *et al.*, 2010; STRÖM *et al.*, 2013). Para tentar mimetizar isso existem vários modelos animais de isquemia, especialmente em roedores, predominantemente agrupados em globais e focais. Os modelos globais são frequentemente designados como modelos de parada cardíaca e ocorre quando o fluxo sanguíneo é reduzido em quase todo o cérebro, enquanto que os modelos focais apresentam maior relevância para o acidente vascular isquêmico e ocorre uma diminuição do fluxo em uma única região do cérebro (HUNTER; GREEN; CROSS, 1995; COLLI; NUNES; CARLOTTI, 1998; BACIGALUPPI; COMI; HERMANN, 2010).

Os modelos experimentais de isquemia cerebral focal são utilizados para se entender os mecanismos envolvidos na evolução do processo isquêmico e, também, podem levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o AVC (SICARD; FISHER, 2009). E podem ser categorizados em dois grupos: isquemia permanente e isquemia transitória. A maioria dos AVCs isquêmicos em humanos são causados pela oclusão da artéria cerebral média (DEL ZOPPO *et al.*, 1992). Portanto, os modelos mais utilizados para estudar isquemia focal cerebral são modelos que ocluem essa artéria, essa oclusão pode ser permanente, ocorrendo de 1 hora até o final do experimento, podendo durar dias, ou transitória, geralmente com uma oclusão de até 3 horas seguida de extensa reperfusão (LIPTON; ROSENBERG, 1994; DURUKAN; TATLISUMAK, 2007; SICARD; FISHER, 2009).

A isquemia permanente resulta em uma região de dano isquêmico grave (núcleo da lesão) circundada por uma área menos danificada, e o objetivo desse modelo é tentar reduzir a propagação do dano, protegendo a área de penumbra (HUNTER; GREEN; CROSS, 1995). A isquemia focal transitória produz diferentes graus de dano isquêmico a depender da duração da isquemia e esse dano resulta tanto da isquemia quanto dos efeitos da reperfusão (lesão por reperfusão) e mimetiza melhor as condições que acontecem nos humanos (LI *et al.*, 1999).

Os modelos de oclusão da artéria cerebral média (MCAO) de forma permanente ou transitória são modelos animais mais comumente usados para mimetizar o AVC isquêmico em humanos (LONGA *et al.*, 1989; CHEATWOOD *et al.*, 2008; MICHALSKI *et al.*, 2011, LIU *et al.*, 2017). Estes modelos são divididos em modelos que não necessitam de craniotomia, por exemplo, embolismo, introdução de fio intraluminal, e modelos que

necessitam, realizados através de técnicas cirúrgicas como eletrocoagulação e ligadura da artéria (DURUKAN; TATLISUMAK, 2007; SICARD; FISHER, 2009; LIU; MCCULLOUGH, 2011). O modelo utilizado nesse trabalho foi o de oclusão permanente por eletrocoagulação, que leva a interrupção permanente do fluxo sanguíneo cerebral e foi proposto por Tamura e colaboradores (1981). Esse modelo produz uma lesão isquêmica cerebral semelhante à causada pela introdução do fio intraluminal e envolve as regiões cerebrais do córtex e corpo estriado (LIPTON, 1999; TRAYSTMAN, 2003; DURUKAN; TATLISUMAK, 2007).

O modelo da oclusão permanente já padronizado, confiável e que leva a alterações neuroquímicas, histológicas, comportamentais, e, ainda, a ativação de astrócito e de micróglia e a redução de proteínas sinápticas em camundongos (TÜREYEN *et al.*, 2004; FONTELES *et al.*, 2016). Diante disso, é um modelo bastante utilizado para mimetizar experimentalmente os eventos que ocorrem após o AVC isquêmico em humanos e é importante compreender as diferentes alterações fisiopatológicas e características desse modelo para avaliar novos agentes terapêuticos para tratar o AVC.

#### **1.4 PATOGÊNESE DA ISQUEMIA**

O AVC isquêmico pode ser causado por um êmbolo ou trombo em um vaso sanguíneo cerebral, tal oclusão induz múltiplos e concomitantes processos fisiopatológicos que podem levar à morte neuronal, principalmente através de necrose ou apoptose (LIU *et al.*, 2012; VIDALE *et al.*, 2017).

A lesão isquêmica é dividida em duas áreas, core e penumbra, o core ou centro da lesão é a região que é irrigada prioritariamente pelo vaso que foi ocluído, e a penumbra é a região que circunda o core. O fluxo sanguíneo diminui de forma crucial no core e gradativamente na região de penumbra, onde os neurônios perdem a capacidade de exercer suas funções, porém, permanecem estruturalmente intactos, pelo fato de ainda haver uma perfusão residual proveniente dos vasos sanguíneos colaterais (LIPTON; ROSENBERG, 1994; DURUKAN; TATLISUMAK, 2007; BROUNS; DEYN, 2009).

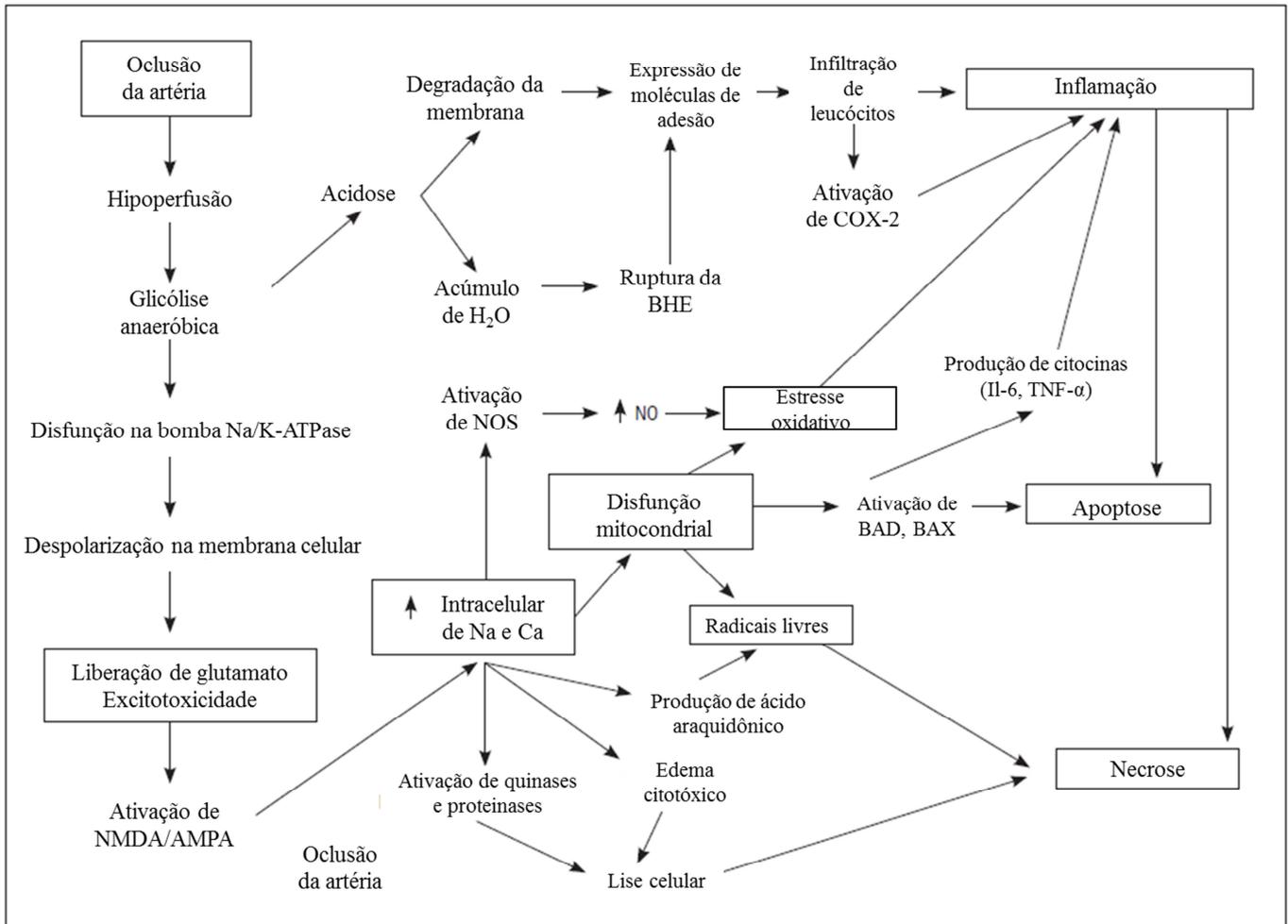
A região do core de humanos que sofreram isquemia cerebral focal é facilmente visualizada por métodos de imagem, pois a área sofre rapidamente um “infarto” (KELLY *et al.*, 2001). O fluxo sanguíneo nessa região se reduz a 15% do normal e os níveis de adenosina trifosfato (ATP) a 25% do basal. Após um insulto permanente ou transitório longo tanto o core quanto a penumbra se tornam regiões de infarto, enquanto a região extra-penumbra apresenta somente morte de neurônios isolados, com densidade insuficiente para causar infarto (LIPTON; ROSENBERG, 1994).

O fluxo sanguíneo na região da penumbra se reduz a 20 a 40% do normal e o nível de ATP fica mantido em torno de 50 a 70% do normal, não caindo o suficiente para permitir despolarizações anóxicas. Contudo, essa região contém neurônios eletricamente silenciosos, que não respondem ao estímulo elétrico, com seus gradientes iônicos intactos. A lesão nesta região é essencialmente reversível, entretanto o sucesso desta reversão é limitado pelo tempo. O modo de preservar e evitar o progresso da destruição neuronal nessa região é foco da maioria das pesquisas (LIPTON; ROSENBERG, 1994; GREEN *et al.*, 2003; HOSSMANN, 2009).

A oclusão da artéria cerebral média de forma transitória ou permanente desencadeia uma série de processos neuroquímicos e moleculares que são conhecidos como cascata isquêmica, incluindo falência bioenergética celular devido à hipoperfusão cerebral, toxicidade excitatória pelo glutamato, desequilíbrio iônico, estresse oxidativo, liberação de citocinas inflamatórias e a morte de neurônios, glia e células endoteliais, processos que levam a ruptura da barreira hematoencefálica (BHE) com infiltração de leucócitos e a danos nos tecidos cerebrais (Figura 02) (SADANA *et al.*, 2015; ABOUTALEB *et al.*, 2015).

A cascata isquêmica pode continuar por horas ou dias, mesmo após o restabelecimento da circulação sanguínea (ZIVIN, 1998). Os mecanismos prejudiciais podem prosseguir através da rápida lise celular (necrose) ou por morte celular programada (apoptose), a depender da gravidade e da duração do insulto (MEHTA; MANHAS; RAGHUBIR, 2007). Uma compreensão sistemática desses mecanismos moleculares com perspectiva de modulação nas cadeias dos eventos que levam ao balanço entre a sobrevivência e a morte neuronal pode ajudar a gerar estratégias potenciais de neuroproteção (MEHTA; MANHAS; RAGHUBIR, 2007).

Figura 02. Cascata da isquemia cerebral.



Fonte: VIDALE *et al.*, 2017. Legenda: NOS: óxido nítrico sintase, NO: óxido nítrico, COX: ciclooxigenase, BAD: Antagonista de BCL-2 de morte celular, BAX: Proteína X associada BCL-2

O insulto primário após a oclusão arterial é a hipoperfusão, uma diminuição abrupta da circulação sanguínea para uma área do cérebro, o que resulta em perda correspondente da função neurológica (DONNAN *et al.*, 2008). A hipoperfusão reduz drasticamente a disponibilidade de glicose e oxigênio no cérebro, diminuindo, assim, a disponibilidade de substratos essenciais, o que leva a uma falha energética por uma diminuição da produção de adenosina trifosfato (ATP), causando rapidamente uma disfunção nas bombas de transporte de íons dependentes de energia, levando a um desequilíbrio iônico com o influxo de  $\text{Na}^+$  e efluxo de  $\text{K}^+$ , e à despolarização de neurônios e de células da glia (MARTIN; LLOYD; COWAN, 1994; KATSURA; KRISTIÁN; SIESJÖ, 1994). Conseqüentemente, os canais dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  tornam-se ativados e glutamato é liberado no meio extracelular. Ao mesmo tempo, os processos dependentes de energia são afetados o que contribui, por exemplo, para reduzir a recaptção de glutamato, que é o principal neurotransmissor excitatório (NICHOLLS; ATTWELL, 1990). Essa condição superestimula

os receptores de glutamato de modo a influenciar o influxo de sódio e cálcio, produzindo, assim, uma série de eventos nucleares e citoplasmáticos, excitotoxicidade, levando à falência mitocondrial e a apoptose (LI *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2006). Além disso, a baixa disponibilidade de oxigênio resulta na glicólise anaeróbica e a um conseqüente acúmulo de lactato, que pode ser uma possível causa de danos secundários que levam a expansão do infarto (BROUNS *et al.*, 2008). O estado de acidose aumenta a necrose e a morte celular por meio de um mecanismo denominado acidotoxicidade que leva a outros efeitos deletérios, como a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e disfunção mitocondrial (SHERWOOD *et al.*, 2011; ANDERSON; TAN; MEYER, 1999).

O acúmulo de glutamato no meio extracelular resulta no aumento da estimulação de seus receptores do tipo AMPA e NMDA em outros neurônios, com um conseqüente influxo de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , esses neurônios tornam-se despolarizados, causando mais influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e mais liberação de glutamato levando a uma amplificação do insulto isquêmico inicial. Além disso, o influxo de íons provoca o transporte osmótico de água nas células, resultando em um edema citotóxico, lise celular e necrose (CHEN *et al.*, 2008; FURUKAWA *et al.*, 1997). O aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  inicia uma série de eventos citoplasmáticos e nucleares, entre os quais a geração de radicais livres e ativação de enzimas dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , incluindo fosfolipase A2, endonucleases, ciclooxigenase e óxido nítrico sintetase, resultando em danos celulares (LOVE, 1999). A ativação de enzimas degradativas e a produção de radicais livres levam a morte celular imediata por necrose, entretanto os mecanismos excitatórios iniciam eventos moleculares que levam a morte por apoptose. Além dos fatos relatados, a excitotoxicidade ativa vias de sinalização intracelulares que desencadeiam processos inflamatórios (BROUNS; DEYN, 2009).

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de radicais livres supera a capacidade endógena das defesas antioxidantes celulares, ou seja, os níveis de enzimas antioxidantes endógenas, como a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona, e as vitaminas antioxidantes, como  $\alpha$ -tocoferol e ácido ascórbico, não são suficientes para combater o excesso de radicais livres (MAKAR *et al.*, 1994). Durante a isquemia cerebral e após a reperfusão, uma cascata de eventos bioquímicos e moleculares leva a geração de radicais livres de oxigênio e nitrogênio que são neurotóxicos, sendo mediadores importantes de lesão tecidual em AVC isquêmico (CHAN, 1994; CHAN, 1996; LOVE, 1999). Além disso, o influxo de cálcio e de sódio em células isquêmicas estimula a produção excessiva de radicais livres de oxigênio mitocondrial (MATTSON; SCHEFF, 1994; MURPHY; FISKUM; BEAL, 1999). Os radicais livres de oxigênio também são gerados durante conversões

enzimáticas, como a conversão de ácido araquidônico em prostanóides pela ciclooxigenase e durante a resposta inflamatória pós- isquêmica. Então, o estresse oxidativo, a excitotoxicidade, a falha energética e o desequilíbrio iônico estão extremamente relacionados e contribuem para a morte celular isquêmica (LO; DALKARA; MOSKOWITZ, 2003). A isquemia cerebral gera o radical superóxido ( $O^{2-}$ ) como produto da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e pela xantina oxidase, esse radical gera peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que por sua vez é fonte do radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ). Já o óxido nítrico (NO) é sintetizado a partir da L-arginina e é capaz de reagir com o radical superóxido ( $O^{2-}$ ) levando à danos nitrosativos (BECKMAN; KOPPENOL, 1996). Todos esses radicais livres apresentam um espectro de efeitos celulares, incluindo desnaturação de proteínas, peroxidação lipídica, dano ao citoesqueleto e DNA e quimiotaxia (ESPEY *et al.*, 2000). Fora os danos celulares cerebrais, o estresse oxidativo também aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica através da ativação de metaloproteinases de matriz e pelo dano celular endotelial (MONTANER *et al.*, 2003; SIESJÖ; AGARDH; BENGTSSON, 1989). Os estresses oxidativo e nitrosativos são modulados por sistemas enzimáticos, como a SOD, a glutatona e a família do óxido nítrico sintase (NOS).

A SOD, em particular, tem sido amplamente relacionada a redução do dano cerebral isquêmico associado ao radical superóxido, estudos já mostraram que animais com um aumento na expressão de SOD tiveram uma diminuição na lesão isquêmica, enquanto animais com deficiência de SOD tiveram sua lesão aumentada, mostrando que a produção excessiva de EROs afeta a lesão isquêmica (FUJIMURA *et al.*, 1999; SHENG *et al.*, 1999). Com base nos requisitos de íons metálicos utilizados como co-fatores de suas reações e na sua localização as enzimas SOD são classificadas em três tipos, sendo SOD 1, 2 e 3 (CHAN, 1996). A SOD-1 ou SOD-CuZn (superóxido desmutase de cobre-zinco) é citosólica e requer íons de cobre e zinco como cofatores, a SOD-2 ou SOD-Mn (superóxido desmutase de manganês) é uma enzima mitocondrial que requer  $Mn^{2+}$ , e a SOD-3 ou SOD-Cu (superóxido desmutase de cobre) foi identificada no espaço extracelular e ambas apresentam atividade neuroprotetora (CHAN, 1996; GUÉGAN *et al.*, 1998).

Outro evento que ocorre após o AVC isquêmico é a ruptura da BHE, após a isquemia a integridade da BHE é destruída, levando a infiltração de células inflamatórias e proteínas de alto peso molecular no cérebro, resultando em infarto cerebral e edema, que podem causar danos secundários através da hipertensão intracraniana (LIU *et al.*, 2012; DEL ZOPPO; HALLENBECK, 2000).

Em adição aos eventos citotóxicos que ocorrem durante e após a isquemia tem-se as reações inflamatórias que são mediadas por moléculas de sinalização, células inflamatórias, moléculas de adesão e reguladores transcricionais, onde vários tipos celulares contribuem para a inflamação pós-isquemia e essa resposta se inicia horas e persiste por dias após a isquemia e, também, contribuem para a morte neuronal (BARONE; FEUERSTEIN, 1999; DANTON; DIETRICH, 2003; BECKER, 1998).

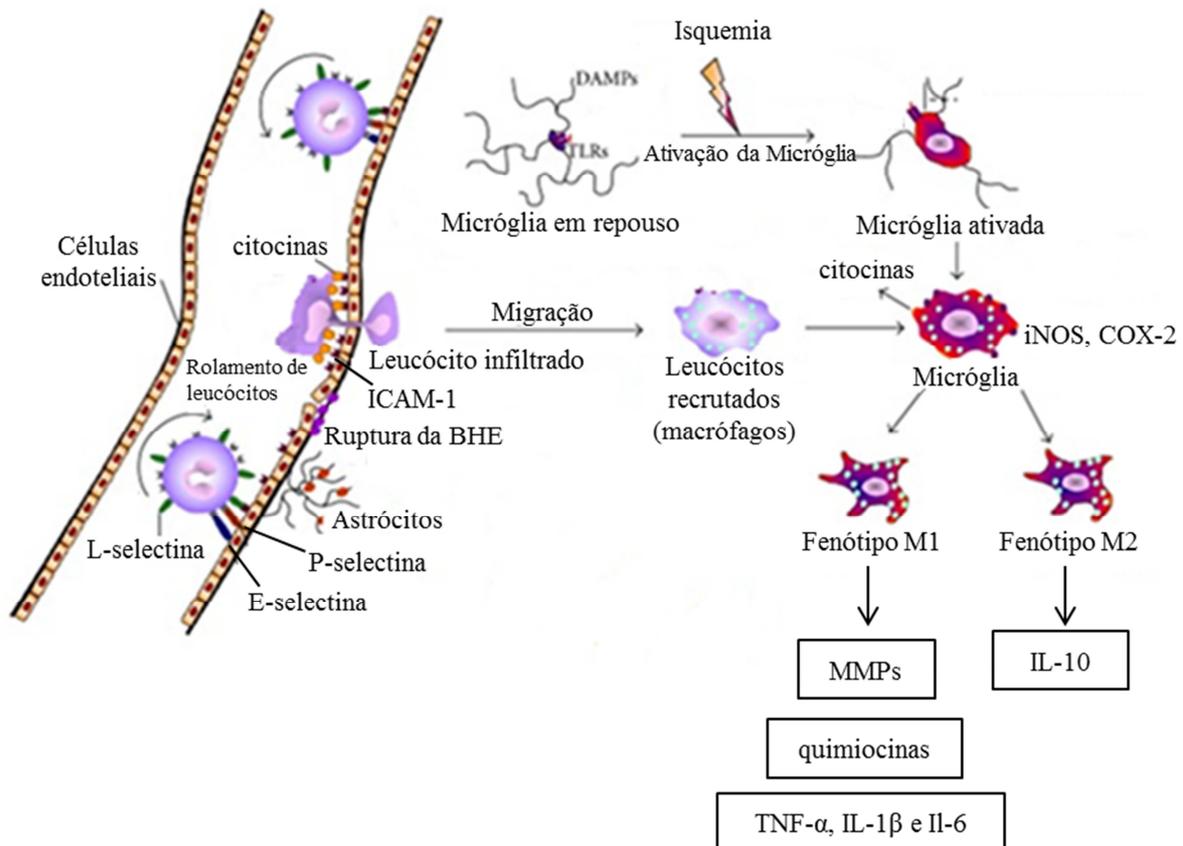
### **1.5 NEUROINFLAMAÇÃO ISQUÊMICA**

A neuroinflamação se inicia com a ativação da micróglia e dos astrócitos por espécies reativas de oxigênio. Os astrócitos são capazes de secretar fatores inflamatórios como citocinas, quimiocinas e óxido nítrico sintase induzível (iNOS ou NOS-2), desempenhando, desta forma um papel importante na neuroinflamação (YAMAGAMI *et al.*, 1999; CHE *et al.*, 2001). Após a isquemia cerebral os astrócitos são ativados, fenômeno conhecido como astrogliose reativa que pode ser destrutivo ao cérebro, levando a um aumento da expressão de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (CHE *et al.*, 2001; PEKNY; NILSSON, 2005). A resposta astrogliosa começa no centro da lesão isquêmica começando 4-24 horas após a insulto, atingindo um pico cerca de 4 dias depois (KAWABORI; YENARI, 2015). Evidências mostram que a iNOS é um efetor crítico e amplificador do dano tecidual relacionado com a inflamação pós-isquêmica, em animais o iNOS é expresso de 12 horas a alguns dias após a oclusão da artéria cerebral média (GARCIA-BONILLA *et al.*, 2014; IADECOLA *et al.*, 1995).

A micróglia representa as células imunes residentes do cérebro e desempenha um papel importante como célula imunocompetente e fagocítica no sistema nervoso central, estando envolvida na modulação da resposta inflamatória do cérebro (GINHOUX *et al.*, 2013). A micróglia é imediatamente ativada após a isquemia e modifica sua morfologia de um estado de repouso (ramificado) para um estado ativado (ameboide), e quando ativada podem se transformar em fagócitos e liberar uma gama de substâncias, das quais podem ser citotóxicas (STOLL; JANDER; SCHROETER, 1998; MORIOKA; KALEHUA; STREIT, 1993; TAYLOR; SANSING, 2013). Curiosamente, acreditava-se que a micróglia ativada piorava o dano isquêmico (LALANCETTE-HÉBERT *et al.*, 2007; BANATI *et al.*, 1993), entretanto evidências mostram que também contribuem para a neuroproteção (STREIT, 2002). Estudos têm mostrado que a micróglia ativada é classificada em duas subpopulações: M1 (pró-inflamatória) e M2 (anti-inflamatória) (CHERRY; OLSCHOWKA; O'BANION, 2014; PEREGO; FUMAGALLI; DE SIMONI, 2013). M1 é o tipo pró-inflamatório e é capaz de liberar TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, sendo encontrada nas primeiras 24 horas no núcleo isquêmico

e aumenta nas primeiras 2 semanas após a lesão. Por outro lado, a M2 é uma de célula de cicatrização envolvida na neuroproteção e reparo, produzindo, por exemplo, fator de crescimento transformador (TGF) e IL-10, e é encontrado no final das primeiras 24 horas após a isquemia, permanecendo ativada durante a primeira semana antes de diminuir seu número (TAYLOR; SANSING, 2013) (Figura 03).

Figura 03. Neuroinflamação pós-isquêmica.



Fonte: Adaptado de CHENG; LEE, 2016

Legenda: DAMPs: padrão molecular associado a danos, MMP: metaloproteinases, BHE: barreira hematoencefálica, TLR: receptor toll-like

Dentro de 4 a 6 horas após o início da isquemia, os leucócitos circulantes aderem a parede dos vasos e migram para o cérebro com liberação subsequente de mais mediadores pró-inflamatórios (DANTON; DIETRICH, 2003; HALLENBECK, 1996). A interação entre leucócitos e o endotélio vascular é mediada por moléculas de adesão, que, desta forma, desempenham papel fundamental na infiltração de leucócitos no parênquima cerebral, e após a isquemia essas células liberam rapidamente mediadores pró-inflamatórios na área, promovendo a lesão isquêmica (DEGRABA, 1998). São exemplos de moléculas de adesão: selectinas, imunoglobulinas, como as moléculas de adesão intercelular – 1 (ICAM-1) e molécula de adesão de celular vascular -1 (VCAM-1), e integrinas (HUANG *et al.*, 2000).

Em particular, durante a fase aguda da isquemia cerebral células imunes e células cerebrais liberam citocinas, que são importantes mediadores pró- inflamatórios, como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-6 e quimiocinas, como a proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1) e a proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1 $\alpha$ ) (ALLAN; ROTHWELL, 2001; LIU *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 1994; KIM *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 1995; KAPADIA *et al.*, 2006) (Figura 03).

A IL-1 é constituída de 2 isoformas, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , e contribuem para a inflamação aguda após a isquemia, após a astrogliose ocorre a liberação de IL-1 que libera substâncias tóxicas, como quimiocinas, moléculas de adesão, e ativa metaloproteinases (HERX; YONG, 2001; BOUTIN *et al.*, 2001). Estudos já demonstraram que a IL-1 $\beta$  contribui mais na patologia da isquemia que a IL-1 $\alpha$  e é detectada dentro de 1-6 horas após a isquemia com um pico até 24 horas (BOUTIN *et al.*, 2001; HAQQANI *et al.*, 2005). Assim como a IL-1 $\beta$ , os níveis de TNF- $\alpha$  também aumentam logo após a isquemia, estando elevado 3 horas após o insulto, e permanece em níveis altos até 5 dias depois (LIU *et al.*, 1994; ARVIN *et al.*, 1996).

A cascata inflamatória também inclui a regulação de várias enzimas. A cascata do ácido araquidônico é iniciada pela ativação de fosfolipase A2 que é secundária aos elevados níveis de cálcio intracelular (ADIBHATLA *et al.*, 2006). Esta enzima hidrolisa os glicerofosfolipídeos para liberar ácido araquidônico, que é metabolizado em prostaglandinas ou lecotrienos, respectivamente por ciclooxigenase ou lipoxigenase. Existem duas isoformas de ciclooxigenase (COX), tipo 1 e tipo 2. A tipo 1 é expressa por várias células, incluindo micróglia e leucócitos, e subsistem em funções fisiológicas normais e a tipo 2 é regulada após a isquemia, sua expressão pode ser induzida por endotoxinas e citocinas, onde os produtos de sua reação são EROs e prostanóides que são responsáveis por efeitos citotóxicos da inflamação, o que leva ao dano tecidual (SMITH; DEWITT, 1995; SCHWAB; SCHLUESENER, 2003; NOGAWA *et al.*, 1997; KAWANO *et al.*, 2006; HURLEY; OLSCHOWKA; O'BANION, 2002).

Estudos já mostraram que animais nocaute para genes pró-inflamatórios, como iNOS, COX-2 e IL-1, tem uma diminuição no infarto cerebral, sugerindo que esses fatores estão envolvidos na isquemia (IADECOLA *et al.*, 1997; IADECOLA *et al.*, 2001; BOUTIN *et al.*, 2001).

Outro fato já estabelecido é que a isquemia cerebral induz a expressão gênica (TANG *et al.*, 2006; XU *et al.*, 2008), sabe-se que durante o AVC ocorre a ativação de vários fatores de transcrição envolvidos na regulação da inflamação, como o fator nuclear -  $\kappa$ B (NF-

κB) (CECHETTO, 2001; O'NEILL; KALTSCHMIDT, 1997). O NF-κB regula expressão de genes pró-inflamatórios, como TNF-α, iNOS e COX-2, e genes relacionados com a apoptose, onde no geral estudos sugerem que a sua ativação aumenta a morte neuronal isquêmica (SCHNEIDER *et al.*, 1999; MATTSON; CAMANDOLA, 2001). Entretanto, pesquisas mostram que seus efeitos diferem entre os tipos de células, enquanto a ativação de NF-κB na micróglia promove a degeneração neuronal isquêmica, a ativação de NF-κB nos neurônios pode aumentar a sua sobrevivência após o acidente vascular cerebral (MATTSON; CAMANDOLA, 2001).

## 1.6 ISQUEMIA CEREBRAL E MEMÓRIA

A memória é caracterizada como a aprendizagem, ou aquisição, a conservação e a evocação (recordação, lembrança e recuperação) de informações (IZQUIERDO *et al.*, 2002). O processo de formação da memória é complexo e muito dinâmico, por exemplo, durante a aprendizagem a informação recém-adquirida se encontra em um estágio frágil e fraco. Através da consolidação o rastreamento da memória é armazenado e estabelecido, a consolidação é um processo que requer mecanismos específicos, como a síntese proteica, e que ocorre principalmente, mas não exclusivamente, no hipocampo (SCHMIDT *et al.*, 2017; IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016; IZQUIERDO; MEDINA, 1997). Para que seja mantida, esta memória deve ser submetida a um mecanismo adicional de reestabilização, que é chamado de reconsolidação, que requer outra fase de síntese proteica (SCHMIDT *et al.*, 2017).

A memória pode ser classificada quanto a sua natureza em declarativa ou explícita, quando descrita por meio de palavras, e em implícita ou não declarativa, quando não pode ser descrita por meio de palavras (DEW; CABEZA, 2011). No tipo de memória implícita a capacidade, de habilidades motoras ou sensoriais, é inconsciente e necessita de mais tempo e treinamento para se formar, entretanto perdura por mais tempo e as áreas cerebrais, possivelmente, envolvidas são núcleo estriado e/ou diencéfalo (IZQUIERDO *et al.*, 2002; DEW; CABEZA, 2011). A memória explícita é dividida em memória semântica (memória por fatos) e memória episódica (memória de eventos), que é subdividida em dois processos, lembrança e familiaridade e o hipocampo tem sido a área cerebral mais envolvida nesse tipo de memória (JACOBY; LINDSAY; TOTH, 1992).

A memória explícita pode ser, ainda, classificada quanto ao tempo de duração em memória recente, ou de curto prazo, quando está relacionada a acontecimentos que ocorrerem em um período de horas ou dias antes e representa o armazenamento temporário de informações, e em memória tardia, ou de longo prazo, que se refere a eventos de um passado

distante (KANDEL; ABEL, 1995; SQUIRE; ZOLA, 1996). A memória explícita de curto prazo representa o armazenamento temporário de informações utilizado para planejar uma ação futura e é processada principalmente no córtex pré-frontal, podendo também ser chamada de memória de trabalho, que é definida como um sistema não arquivístico localizado, principalmente, e que opera on-line ou no máximo durante alguns segundos ou minutos após a experiência de treinamento (GOLDMAN-RAKIC, 1996; IZQUIERDO *et al.*, 1998; RUCHKIN *et al.*, 2003). A memória de curta duração pode ser esquecida ou transformada em longa duração (GOLDMAN-RAKIC, 1992).

Déficits de memória e dificuldades na execução de tarefas diárias são componentes significativos de doenças neurológicas, como o AVC, e estudos mostram que a perda de memória pós-acidente vascular cerebral é mais comum em idosos (CROXSON; KYRIAZIS; BAXYER, 2011; HATTORI *et al.*, 2000; MAUD, 2006). O córtex pré-frontal tem sido implicado em muitas dessas funções, estudos mostram que déficits na função colinérgica pré-frontal estão implicados no comprometimento cognitivo de doenças neuropsiquiátricas e mostram que a acetilcolina desempenha um papel central na aprendizagem e memória (CROXSON; KYRIAZIS; BAXYER, 2011; ROSS; MCGAUGHY; EICHENBAUM, 2005).

Na isquemia cerebral focal permanente ocorre um infarto focal na região cortical que se estende ao estriado e, também, ao hipocampo, o que leva a uma perda da memória, já que estas são áreas cerebrais relacionadas com a memória (MENNITI *et al.*, 2009; WATTANATHORN *et al.*, 2011). Alguns testes comportamentais de animais são utilizados para avaliar os déficits de memória após a isquemia, como o teste da esQUIVA passiva que avalia a memória de curta e longa duração, analisando resposta de alerta e ansiedade relacionadas a um estímulo aversivo e as principais áreas cerebrais associadas a essa tarefa são amígdala e hipocampo (IZQUIERDO *et al.*, 1992). Outro teste utilizado é o labirinto em Y que avalia a memória de trabalho, analisando as alterações espontâneas dos animais e o córtex pré-frontal é conhecido por participar desse tipo de memória e por ser uma área afetada na pMCAO ocorre um déficit nesse tipo de memória (OSAKA *et al.*, 2004).

## **1.7 TRATAMENTO**

A terapia trombolítica projetada para restaurar a perfusão cerebral em tempo hábil é considerada a principal estratégia terapêutica racional para lesão cerebral isquêmica (STOLL; KLEINSCHNITZ; NIESWANDT, 2008). A terapia padrão atual para o AVC isquêmico é a administração intravenosa de ativador de plasminogênio tecidual (rt-PA), sendo o único tratamento aprovado pelo órgão regulador sanitário dos Estados Unidos, o FDA,

embora esse tratamento melhore a sobrevivência dos pacientes os resultados só são funcionais quando administrado o mais cedo possível após o aparecimento dos sintomas, seu uso é limitado por sua janela terapêutica curta (< 4,5 horas) e por algumas contraindicações, como coagulopatia (BADHIWALA *et al.*, 2015). O espaço de tempo entre o surgimento dos sintomas e o início do tratamento emergiu como um dos fatores categóricos para o sucesso terapêutico (VIANA-BAPTISTA, 2016). Um estudo de meta-análise realizado por De Los Ríos la Rosa e colaboradores (2012) demonstrou que apenas 10% dos pacientes com AVC isquêmico podem ser elegidos para o tratamento intravenoso com o rt-PA.

As diretrizes de prática clínica para os pacientes que tiveram AVC recomendam que algumas medidas sejam tomadas para se evitar uma reincidência do evento, pois se sabe que pacientes que sofreram AVC apresentam alto risco de recorrência ou de ocorrência de outros eventos cardiovasculares. Avalia-se que esse fato pode ser prevenido por modificação no estilo de vida (dieta e exercício), controle da pressão arterial, utilização de inibidores da agregação plaquetária, por exemplo, aspirina, e de estatinas (ARMARIO *et al.*, 2015). Estão sendo implementadas, também, no cenário clínico terapias endovasculares (trombolítica intra-arterial e tromboctomia mecânica) após o AVC isquêmico, protocolos clínicos estão sendo desenvolvidos com o intuito de incluir as indicações e contraindicações dos métodos (LECIÑANA *et al.*, 2013).

Algumas possíveis terapias têm sido estudadas com o intuito de reduzir os déficits cognitivos e a mortalidade em pacientes com AVC (GINSBERG, 2008). Estudos clínicos já foram desenvolvidos recrutando pacientes para avaliação de novos métodos terapêuticos para tratar o AVC isquêmico, onde a maioria deles baseiam-se em mecanismos bioquímicos e moleculares fundamentais subjacentes à isquemia cerebral focal, incluindo melhora do fluxo sanguíneo focal, intervenções em processos deletérios como excitotoxicidade glutamatérgica, estresse oxidativo, lesão microvascular, inflamação e, ainda, prevenção da morte neuronal ou suporte na regeneração cerebral (BROUNS; DE DEYN, 2009).

As classes de fármacos já testados incluem antagonistas de canais de cálcio, fármacos que inibem a liberação de glutamato, que potencializam os efeitos do GABA e antioxidantes (JICKLING; SHARP, 2015; MADDEN; CLARCK; LESSOV, 2003). Entretanto, a translação de terapias isquêmicas agudas de AVC isquêmico de animais para humanos tem sido desafiadora e apesar de já se ter testado diversas estratégias terapêuticas em modelos animais de AVC isquêmico o arsenal terapêutico real para o seu tratamento no homem é altamente limitado, pois nenhum tratamento novo demonstrou ser eficaz e seguro em ensaios clínicos randomizados (BAYÉS; RABASSEDA, 2008; JICKLING; SHARP,

2015). Para que se consiga melhorar essa tradução as recomendações propostas incluem avaliação dos fármacos na janela terapêutica do AVC isquêmico, avaliar a dose-resposta, avaliar animais idosos de ambos os sexos e com fatores de riscos vasculares, avaliar a terapia em múltiplos modelos animais de AVC e, ainda, que essas pesquisas sejam feitas de forma randomizada e cega (JICKLING; SHARP, 2015).

Diante dos fatos relatados, existe uma grande necessidade de se encontrar uma terapia eficaz que estenda a janela de tempo de tratamento, que seja adjuvante na terapia ou que substitua a terapia com rt-PA. A isquemia cerebral é um processo patológico bastante complexo e que envolve uma série de mecanismo, como citamos anteriormente, e compostos naturais com efeito antioxidante, anti-inflamatório, antiapoptóticos e que regulem a função neuronal apresentam efeitos preventivos ou terapêuticos frente a lesões isquêmicas experimentais (WU *et al.*, 2010). Então, a restauração precoce do fluxo sanguíneo é importante para salvar as células de penumbra e diminuir o acúmulo de radicais livres e a inflamação.

Nas últimas décadas centenas de compostos isolados de plantas medicinais ou de alimentos foram identificados para combater a inflamação e proteger os neurônios dos danos provocados pelo AVC isquêmico, sendo, desta forma, os produtos naturais extraídos de plantas fontes promissoras no tratamento da isquemia cerebral (GU, CHEN; SHEN, 2014).

### **1.8 PLANTAS MEDICINAIS E ISQUEMIA**

Diversas plantas vêm sendo estudadas em todo o mundo com o objetivo de tratar diversas doenças. As com perfil antioxidante e anti-inflamatório, no geral, podem oferecer estratégias promissoras frente à degradação das células neuronais, o que desencadeou o interesse de se buscar substâncias que possuíssem atividade antioxidante anti-inflamatória e que, assim, pudessem ser utilizadas como novas estratégias terapêuticas e preventivas das doenças neurodegenerativas (RAO; BALACHANDRAN, 2002; MYTHRI; BHARATH, 2012).

A Medicina Tradicional Chinesa (MTC) tem sido praticada na China a mais de 2.000 anos e vem sendo utilizada para tratar os seres humanos frente a diversas doenças e seus componentes veem sendo relacionados como fontes importantes para a descoberta de novas drogas (GU, CHEN; SHEN, 2014). O uso clínico de plantas da MTC para tratar doenças crônicas e relacionadas com o envelhecimento vem ganhando impulso nos últimos anos, pois suas múltiplas propriedades farmacológicas, decorrentes dos componentes bioativos, já foram demonstradas (CHEUNG *et al.*, 2017). Algumas plantas vêm sendo relatadas por melhorar a função neurológica e são consideradas eficazes para tratar pacientes com AVC. Embora sejam

necessários estudos clínicos para analisar a eficácia dessas plantas elas apresentam valor para as pesquisas (CHEN, 2012). Muitos compostos extraídos de plantas da MTC já demonstraram apresentar uma neuroproteção frente à lesão isquêmica em estudos experimentais (WU *et al.*, 2010). Nas últimas décadas, diversas pesquisas têm identificado os compostos ativos dessas plantas e relacionado com sua propriedade neuroprotetora por modular a inflamação pós-isquêmica (GU, CHEN; SHEN, 2014). Então, a utilização de plantas com potencial anti-inflamatório tem sido estudada e uma estratégia terapêutica se encontra na medicina tradicional chinesa, que fornecem compostos ativos capazes de prevenir a neuroinflamação e proteger as células neuronais da lesão isquêmica (GU, CHEN; SHEN, 2014). Por exemplo, o flavonoide Wogonina, extraído da raiz da planta *Scutellaria baicalensis* Georgi, que demonstrou diminuir a atividade anti-inflamatória mediada por micróglia após a isquemia cerebral (CHO; LEE, 2004).

Uma das prescrições bastante utilizada na MTC é decocção Huang-Lian-Jie-Du e é utilizada para tratar Hepatite, úlcera gástricas, dermatite, sintomas clínicos associados à hipertensão (LIN *et al.*, 1996; ITOH, 2001). Relatos, também, demonstram ação frente à inflamação (OHTA *et al.*, 1999) e a doenças cerebrovasculares (SEKIYA *et al.*, 2005; KAWASHIMA; HARUO; KOGURE, 1998). Ultimamente, as pesquisas farmacológicas com esse conjunto de plantas têm sido focadas no seu efeito terapêutico no AVC (WANG *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2014a) e evidências demonstraram que essa combinação pode atenuar a lesão isquêmica pela inibição de reações inflamatórias mediadas por neutrófilos no cérebro de ratos (HWANG *et al.*, 2002) e por promover a plasticidade neuronal (YE *et al.*, 2012).

A decocção de Huang-Lian-Jie-Du é composta por quatro plantas, sendo *Rhizome coptidis*, *Radix scutellariae*, *Cortex phellodendri* e *Frutius gardênia* e têm como constituintes ativos alcaloides (berberina, palmatina e coptisina), flavonoides (wogonina, baicaleína) e iridoides (genipósido) (DENG *et al.*, 2006; LU *et al.*, 2006; ZHU *et al.*, 2012). Esses alcaloides são classificados como isoquinolínicos pertencentes à classe estrutural dos alcaloides protoberberínicos e são encontrados em diversas plantas utilizadas na medicina tradicional chinesa e são utilizados por seus efeitos imunomoduladores, anti-inflamatórios e antibacterianos (IMENSHAHIDI; HOSSEINZADEH, 2016; BREZOVÁ; DVORANOVÁ; KOST'ÁLOVÁ, 2004; JANTAN *et al.*, 2006).

Outro exemplo de uma planta utilizada na medicina tradicional chinesa é *Coptidis rhizoma*, conhecida popularmente por “Huang Lian”, e tem sido utilizada há bastante tempo para tratar diversas doenças, como gastroenterites, úlcera, diabetes *mellitus* e doenças

inflamatórias, estudos mostraram que essa planta apresenta efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, hipoglicemiante e esses efeitos farmacológicos são devido a presença dos alcaloides do tipo protoberberínicos presentes nessa planta, sendo eles berberina, palmatina, epiberberina, coptisina e jaterozina, sendo a berberina encontrada em maior abundância (TAN *et al.*, 2017; XUE *et al.*, 2013).

Pro exemplo, a berberina desempenha um papel importante na neuroproteção contra respostas pró-inflamatórias e pró-apoptóticas (REFAAT *et al.*, 2013). Outras ações farmacológicas da berberina já foram identificadas, incluindo efeitos anti-carcinogênicos (LU *et al.*, 2016), anti-inflamatórios (GUO *et al.*, 2016; WOO *et al.*, 2016), antimicrobiana (WEN *et al.*, 2016), anti-hipertensivos (SAKI *et al.*, 2016), redução do colesterol (WANG *et al.*, 2014b) e efeito protetor frente ao dano neuronal induzido pela isquemia cerebral focal permanente (NEVES, 2012). Maleki, Aboutaleb e Souri (2017) demonstraram que a berberina diminui a área de infarto, a formação de edema cerebral, melhora a função motora, por inibir citocinas pró-inflamatórias em modelo de isquemia cerebral focal, esses achados mostram que os alcaloides protoberberínicos apresentam efeitos frente a modelos de isquemia cerebral.

Estudo realizado por nosso grupo já demonstrou os efeitos da berberina frente à isquemia cerebral focal permanente, onde Neves (2012) concluiu que a berberina preveniu o déficit de memória, sensorio motor e o dano neuronal em camundongos submetidos à pMCAO, reduzindo, ainda, a atividade da mieloperoxidase no córtex dos animais, esse efeito observado provavelmente se deve a atividade anti-inflamatória da berberina.

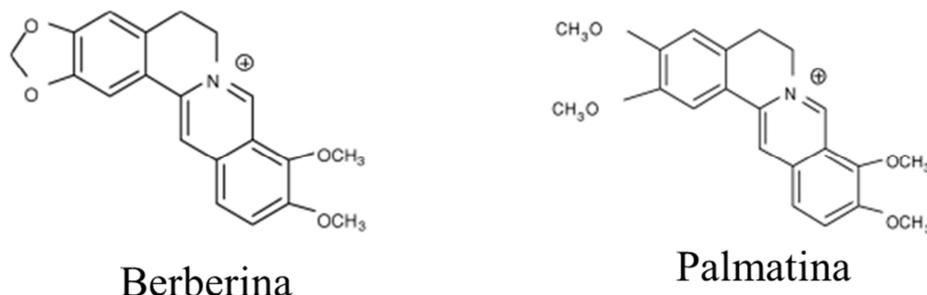
As pesquisas indicam que o extrato do rizoma da planta *Coptidis rhizoma* exibe bio-atividade superior a da berberina isolada, como atividade antimicrobiana frente ao *Helicobacter pylori* (MA *et al.*, 2010) e atividade hipolipemiante (HE *et al.*, 2016), indicando que os outros componentes do extrato também desempenham um papel importante nas atividades biológicas da planta, demonstrando, assim, que os outros alcaloides protoberberínicos, como a palmatina que é um análogo estrutural da berberina, podem apresentar atividade farmacológica quando utilizados de forma isolada (IIZUKA *et al.*, 2003; TAN *et al.*, 2017).

## 1.9 PALMATINA

Palmatina é um alcaloide isoquinolinico do tipo protoberberínico quaternário, tipicamente de cor amarela, é um análogo estrutural semelhante à berberina possuindo uma estrutura tetracíclica e diferindo somente nos substituintes de um dos anéis benzênicos, sendo metileno-dioxi para a berberina e dimetoxi para a palmatina (FIGURA 04). É encontrada em

todas as famílias de plantas onde a berberina ocorre, mas em uma quantidade bem menor que a berberina (BHADRA; KUMAR, 2011).

Figura 04. Estrutura química da berberina e da palmatina



Fonte: LU *et al.*, 2006

A palmatina é um constituinte ativo importante extraído de diversas plantas medicinais da família *Berberidaceae*, como *Coptidis rhizoma*, *Cortex phellodendri*, *Radix tinosporae* e *Enantia chlorantha*, (MI *et al.*, 2015; JUNG *et al.*, 2009; OU-YANG *et al.*, 2012). E apresenta diferentes atividades farmacológicas, como atividade sedativa (HSIEH *et al.*, 1993), antioxidante (JUNG *et al.*, 2009). Diversas outras atividades farmacológicas da palmatina já foram determinadas, como atividade antibacteriana frente ao *Helicobacter pylori* (ZHOU *et al.*, 2017), atividade antifúngica frente ao *Microsporium canis* (XIAO *et al.*, 2015) e a *Candida* spp. resistentes a antifúngicos (CAMPOS, 2017), atividade antiviral (JIA *et al.*, 2010), atividade antiparasitária frente a *Trypanosoma cruzi* e a *Leishmania infantum* (NKWENGOUA *et al.*, 2009), efeito gastroprotetor (WANG *et al.*, 2017), efeito hipolipemiante (NING *et al.*, 2015), atividade antitumoral por inibir citocinas inflamatórias (WU *et al.*, 2016; MA *et al.*, 2016), inibição da reabsorção óssea da osteoporose *in vitro* (ISHIKAWA *et al.*, 2016), efeito protetor frente a lesão de isquemia-reperfusão em miocárdio, onde essa ação se deve a sua atividade antioxidante e anti-inflamatória (KIM *et al.*, 2009).

Outra atividade farmacológica já caracterizada da palmatina foi a sua ação antidepressiva em animais estressados e não estressados e os resultados mostraram que essa atividade pode se dever a inibição da atividade da MAO-A, diminuição dos níveis de nitrito e sua atividade antioxidante (DHINGRA; BHANKHER, 2014). Pesquisa realizada por Dhingar e Kumar (2012) já demonstrou que a palmatina melhorou a memória de camundongos em modelo de amnésia induzida por escopolamina, por inibir a atividade da acetilcolinesterase e apresentar atividade antioxidante, outros autores também já demonstraram que a palmatina é

um potente inibidor da acetilcolinesterase, sendo, promissor para tratar Doença de Alzheimer por melhorar a memória (MAK *et al.*, 2014).

Os efeitos protetores da palmatina sobre a inflamação aguda e crônica já foram determinados em modelos animais experimentais, como edema de orelha, teste da permeabilidade capilar induzido por ácido acético e inflamação induzida por *pellets* de algodão (KÜPELI *et al.*, 2002; PARK *et al.*, 2007). YAN e colaboradores (2017) demonstraram que a palmatina apresenta efeito anti-inflamatório *in vitro* frente à inflamação induzida por LPS em células epiteliais de cabra, e esse efeito se deve a diminuição de fatores pró-inflamatórios, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e NO.

### **1.10 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA**

A Organização Mundial da Saúde estima que 15 milhões de pessoas no mundo sofrem acidente vascular cerebral a cada ano, sendo a 2º maior causa de morte no mundo, em adultos de meia-idade e idosos. No Brasil, o AVC se encontra como a principal causa de morte e é uma das principais causas de internações, ocasionando em grande parte dos pacientes algum tipo de deficiência, seja parcial ou completa.

A isquemia cerebral é um processo patológico bastante complexo e que envolve uma série de mecanismo, como inflamação e estresse oxidativo, e a única terapia padrão atualmente utilizada para o AVC isquêmico é a administração intravenosa de ativador de plasminogênio tecidual. Entretanto seus resultados só são funcionais quando administrado o mais cedo possível após o aparecimento dos sintomas, pois apresenta uma janela terapêutica curta e, ainda, algumas contraindicações, como coagulopatia. Diante disso, existe uma grande necessidade de se encontrar uma terapia eficaz que estenda a janela de tempo de tratamento, que seja adjuvante na terapia ou que substitua a terapia com rt-PA.

Estudos tem mostrado que compostos naturais com efeito antioxidante, anti-inflamatório, antiapoptóticos e que regulem a função neuronal apresentam efeitos preventivos ou terapêuticos frente a lesões isquêmicas experimentais. Desta forma, os produtos naturais extraídos de plantas da MTC são fontes promissoras no tratamento da isquemia cerebral. Muitos compostos extraídos dessas plantas já demonstraram apresentar uma neuroproteção frente à lesão isquêmica em estudos experimentais, diversas pesquisas têm identificado os compostos ativos dessas plantas e relacionado com sua propriedade neuroprotetora por modular a inflamação pós-isquêmica.

A palmatina, um desses componentes de plantas da MTC, possui atividade anti-inflamatória comprovada frente a modelos animais experimentais de inflamação, como edema de orelha, teste da permeabilidade capilar induzido por ácido acético e inflamação induzida

por pellets de algodão. Além disso, a palmatina já foi utilizada em um modelo de Doença de Alzheimer induzido por D-galactose, sugerindo que a palmatina atravessa a Barreira hematoencefálica.

Até o momento nenhum trabalho foi realizado relacionando a atividade da palmatina com a isquemia cerebral, sendo o nosso estudo um pioneiro com essa relação. Com isso, nossa pesquisa visa investigar o efeito de neuroprotetor da palmatina sobre o dano induzido por isquemia cerebral focal permanente em camundongos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Estudar o efeito neuroprotetor da palmatina em camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente sobre o dano neuronal e memória, e seus possíveis mecanismos de neuroproteção.

### 2.2 Objetivos Específicos

Em animais submetidos à oclusão da artéria cerebral média (pMCAO) e tratados com a palmatina, avaliar:

- A área de infarto isquêmico e os déficits sensório-motores
- Os déficits de memória trabalho e aversiva
- A resposta inflamatória por meio da imunomarcção do GFAP, Iba-1, iNOS, COX-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B
- O estresse oxidativo por meio da imunomarcção para SOD-2
- A expressão da sinaptofisina, um marcador sináptico, por *Western Blotting*.

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados camundongos albinos adultos *Swiss*, machos, pesando entre 30 e 35g, provenientes do biotério central do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos no biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, UFC. Os animais foram mantidos em diferentes gaiolas plásticas, forradas com maravalhas, com ciclo de claro/escuro de 12h/12h e alimentados com ração padrão e água à vontade.

Em relação aos cuidados com os animais, este estudo seguiu os princípios éticos da experimentação animal estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para uso de animais (CEUA) da UFC sob o número de registro 109/2015.

#### **3.2 Drogas**

Palmatina (SIGMA, EUA); Cloridrato de xilazina 2% (Kensol® Laboratórios König S.A, Argentina); Cloridrato de ketamina 5% (Vetanarcol®, Laboratórios König S.A, Argentina). Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico.

#### **3.3 Protocolo experimental**

Foram utilizados 96 animais divididos em 6 grupos, sendo os grupos falso-operados, tratados com veículo (Tween 3% + salina) ou Palmatina (PAL) na dose de 20 mg/kg, isquemiados tratados com veículo e isquemiados tratados com PAL nas doses de 0,2, 2 e 20 mg/kg por via oral.

Os animais foram tratados com a Palmatina 2 horas depois da eletrocauterização da artéria cerebral média. Nos dias que se seguiram a cirurgia, as doses de 0,2, 2 e 20 mg/kg foram administradas 1 vez ao dia até o penúltimo dia de teste. As concentrações da Palmatina foram escolhidas baseadas em estudos anteriores (DHINGRA; KUMAR, 2012).

Quanto ao esquema de tratamento os animais foram divididos em 6 grupos, sendo eles descritos na tabela 01:

Tabela 01: Grupos de tratamento

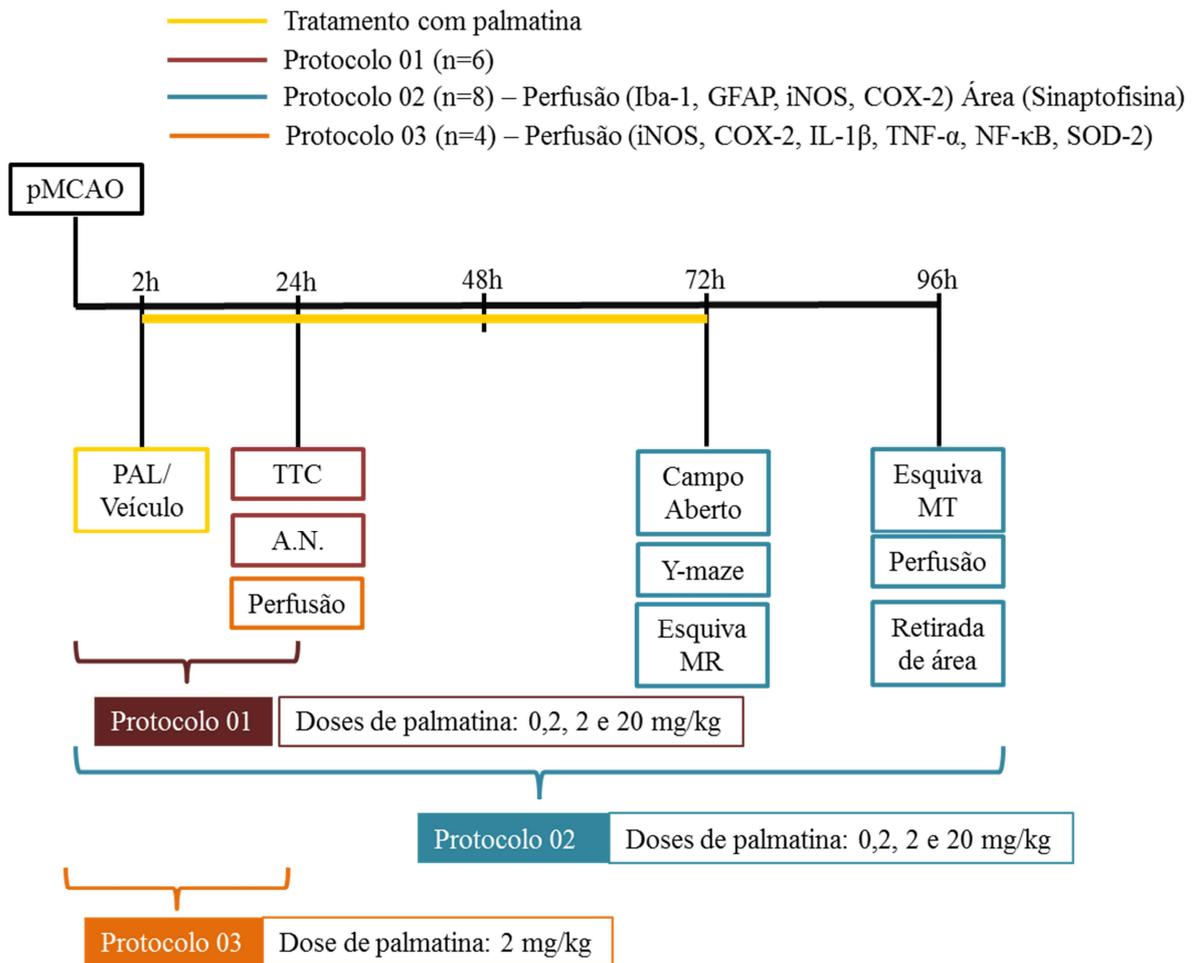
Grupo	Dose	Tratamento	Número de animais
1 – FO + V	-	FO tratado com veículo (tween 3% + salina) v.o	18
2 - FO + PAL 20	20 mg/kg	FO tratado com palmatina 20 mg/kg v.o	14
3 - pMCAO + V	-	pMCAO tratado com veículo v.o	18
4- pMCAO + PAL 0,2	0,2 mg/kg	pMCAO tratado com palmatina 0,2 mg/kg v.o	14
5 - pMCAO + PAL 2	2 mg/kg	pMCAO tratado com palmatina 2 mg/kg v.o	18
6 - pMCAO + PAL 20	20 mg/kg	pMCAO tratado com palmatina 20mg/kg v.o	14

Para a realização dos desenhos experimentais (comportamentais, *western blotting* e imunohistoquímica) os animais foram divididos em três protocolos experimentais (Figura 05):

- Protocolo 01: Os animais foram tratados com o veículo ou com a palmatina, nas doses de 0,2, 2 e 20 mg/kg, 2 horas após a cirurgia. A avaliação neurológica (A.N.) e a análise da área do infarto isquêmico foram realizadas 24 horas após a cirurgia (n=6/grupo).
- Protocolo 02: Os animais foram tratados com o veículo ou com a palmatina, nas doses de 0,2, 2 e 20 mg/kg, 2, 24, 48 e 72 horas após a cirurgia. Os testes de campo aberto, labirinto em Y e esQUIVA passiva (M.R - memória recente) foram realizados 72 horas depois da isquemia e 96 horas após a pMCAO foi realizado o teste da esQUIVA passiva (M.T - memória tardia) (n=8/grupo). A sequência dos testes foi: campo aberto, labirinto em Y e esQUIVA passiva. Ao final dos testes de comportamento os animais foram subdivididos onde 4 animais foram eutanasiados e as áreas cerebrais (córtex e estriado) retiradas para a realização do *western blotting* (sinaptofisina) e 4 animais foram perfundidos com paraformaldeído a 4% e seus cérebros fixados com formol tamponado. Os cérebros foram cortados em criostato na espessura de 50 µm e as fatias foram incubadas “*free floating*” e foram utilizadas para as técnicas de imunohistoquímica (Iba-1, GFAP, iNOS e COX-2).
- Protocolo 03: Diante dos resultados dos protocolos 1 e 2 que mostraram não haver diferença entre o efeito nas doses de 2 e 20 mg/kg nos testes da avaliação neurológica, da área de infarto e na memória de trabalho, a dose de 2 mg/kg foi escolhida para o

estudo do mecanismo de ação neuroprotetor. Então, os animais foram tratados com o veículo ou com a palmatina, na dose de 2 mg/kg. Vinte quatro horas após a isquemia os animais foram perfundidos com paraformaldeído a 4% e seus cérebros fixados com formol tamponado. Após a realização dos cortes, as fatias foram incubadas “*free floating*” e foram utilizadas para as técnicas de imunohistoquímica (iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B e SOD-2) (n=4/grupo).

Figura 05: Protocolo experimental



Legenda: PAL: palmatina; TTC: Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol; A.N: Avaliação neurológica; MR: memória recente; MT memória tardia

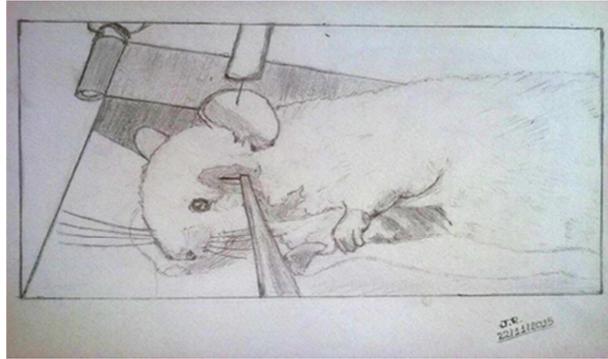
### 3.4 Isquemia cerebral focal por oclusão da artéria cerebral média (pMCAO)

Os animais foram anestesiados com xilazina (10mg/kg) e ketamina (90mg/kg) administrados por via intraperitoneal para o procedimento cirúrgico. A temperatura foi mantida entre 36,5 e 37° C com o auxílio de uma lâmpada incandescente.

Inicialmente foi realizada uma incisão na linha entre o olho esquerdo e a orelha, o músculo temporal foi rebatido e, posteriormente, realizada uma craniectomia com uma broca odontológica de 1 mm, seguido da exposição e eletrocauterização da artéria cerebral média.

Em seguida a incisão foi suturada com fio de seda agulhado 4.0, e os animais foram colocados em gaiolas para recuperação da cirurgia com livre acesso a água e comida. Os animais falso-operados (FO) foram submetidos aos procedimentos descritos para isquemia, exceto a eletrocauterização da artéria cerebral média (Figura 06) (TAMURA *et al.*, 1981).

Figura 06: Eletrocauterização da artéria cerebral média



Arte: Jéssica Rabelo, 2015

### 3.5 Avaliação Neurológica

Para a avaliação sensório-motora foi realizada a avaliação neurológica 24 horas após da isquemia. Os achados neurológicos foram pontuados utilizando uma escala previamente descrita por Garcia e colaboradores (1995) (Tabela 02).

Os parâmetros avaliados foram: a atividade espontânea, que analisa a habilidade do animal de se aproximar das paredes de uma arena circular de polipropileno (30cm de diâmetro), explorando o ambiente; a simetria do movimento das quatro patas, que analisa se o animal ao ser segurado pela cauda e suspenso no ar possui simetria dos quatro membros; o estiramento das patas dianteiras, que avalia se o animal caminha sobre as patas dianteiras na borda de uma mesa; a escalada, que analisa a capacidade do animal de subir e agarrar firmemente uma grade de ferro ou de fazer movimentos circulares; a propriocepção corpórea na qual o animal é tocado com uma pinça em ambos os lados do corpo, que avalia a resposta sensorial; e a resposta ao toque da vibrissa, no qual a pinça toca as vibrissas em ambos os lados do animal que analisa a resposta sensorial.

O total de escores dado a cada animal ao fim da avaliação (escore neurológico) vai de 3 a 18 pontos, representando o somatório dos escores obtido pelo animal em cada parâmetro analisado. Onde o animal falso-operado recebe a maior pontuação (18 pontos), ou seja, melhor o desempenho sensório-motor.

Tabela 02 – Escala utilizada para a avaliação neurológica.

Teste	Score			
	0	1	2	3
Atividade espontânea	Sem movimento	Animal não se ergue e raramente se movimenta	Animal se movimenta, mas não se aproxima de pelo menos três lados da caixa	Animal se movimenta, e se aproxima de pelo menos três lados da caixa
Simetria do movimento das quatro patas	Contralateral: sem movimento	Contralateral: raros movimentos	Contralateral: movimentos lentos	Ambos os lados se movem simetricamente
Estiramento das patas dianteiras	Contralateral: sem movimento	Contralateral: movimentos lentos	Contralateral: movimento e alcance inferior ao lado ipsilateral	Ambos os lados se movem simetricamente
Escalada/preensão	....	Animal falha ao escalar e exhibe movimentos circulares	Animal com dificuldade de subir e a garrar a grade no lado contralateral	Animal escala normalmente e agarra a grade
Propriocepção corpórea	...	Sem resposta no lado contralateral	Resposta fraca no lado contralateral	Resposta simétrica
Resposta ao toque da vibrissa	...	Sem resposta no lado contralateral	Resposta fraca no lado contralateral	Resposta simétrica

Fonte: Adaptado de Garcia *et al.*, 1995.

### 3.6 Avaliação do infarto isquêmico - Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol

A coloração com o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazol (TTC) foi utilizada para identificar e quantificar as regiões de infarto decorrentes da isquemia cerebral focal. O TTC é um sal que recebe um próton da succinato desidrogenase na membrana interna da mitocôndria, o que o reduz para uma forma insolúvel, o formazam, com coloração vermelho escuro que se deposita nas células viáveis. As células da região de infarto não possuem mitocôndrias viáveis, não havendo a formação da coloração vermelha e, portanto, sem cor (BEDERSON *et al.*, 1986).

Vinte e quatro horas após a isquemia os animais foram eutanasiados, decapitados e seus cérebros foram removidos, conservados em salina gelada até o momento da coloração, e foram fatiados totalmente em 4 fatias na espessura de 2 mm e imersos em solução de 1% de TTC à 37°C por 30 minutos. Em seguida, as fatias tiveram suas imagens digitalizadas em alta resolução, sendo analisadas as áreas de infarto e as áreas totais para os cálculos das respectivas percentagens utilizando-se o software ImageJ®

### 3.7 Avaliação da atividade locomotora - Teste do Campo Aberto

O teste do campo aberto foi originalmente descrito por Hall (1934), para analisar o estado emocional em ratos. O teste utilizado nesse trabalho foi baseado no modelo de Broadhurst (1957) e foi utilizado com o intuito de aferir a capacidade locomotora dos animais. O campo aberto consiste de uma arena quadrada (30 x 30 x 15 cm) de acrílico preto com o piso dividido em nove quadrantes iguais (Figura 07). No teste o animal foi colocado na arena e deixado para explorar o ambiente por 5 minutos, durante este período foi registrado o número de quadrantes atravessados pelo animal (número de cruzamentos), número de vezes que o animal se levantou para explorar o ambiente, mantendo-se suspenso apenas pelas patas traseiras, caracterizando o comportamento exploratório do tipo “*rearing*”. A arena foi limpa com álcool a 20% após cada animal ser retirado, para evitar interferência do cheiro de urina e fezes no teste.

Figura 07 – Arena do Campo Aberto



Fonte: LNC

### 3.8 Avaliação da memória de trabalho - Teste do labirinto em Y

A memória operacional ou de trabalho foi avaliada através do teste do labirinto em Y. O labirinto em Y é composto por 3 braços de madeira com 16 cm de altura, 5 cm de largura e 40 cm de comprimento (Figura 08). Nesse teste, o animal é colocado no labirinto e deixado explorar por 8 minutos (SARTER; BODEWITZ; STEPHENS, 1988). Os animais apresentam forte tendência de alternar a entrada nos diferentes ambientes.

Figura 08 - Labirinto em Y.



Fonte: LNC.

Para a avaliação da memória os braços foram numerados. O animal foi colocado no aparelho, no braço 1, e durante 8 minutos o número do braço que o animal entrou foi anotado em sequência. Foi considerado acerto cada vez que o animal entrou em 3 diferentes braços sem repetição. O resultado foi expresso em porcentagem e obtido através da seguinte fórmula matemática:

$$\text{Alternações espontâneas (\%)} = \frac{\text{Número de acertos}}{\text{Número total de entradas} - 2} \times 100$$

O sucesso do teste é indicado pela alta taxa de alternância nos grupos controle, indicando que os animais podem se lembrar em qual braço eles entraram por último (STONE *et al.*, 1991). Entre cada sessão, o labirinto foi higienizado com uma solução de álcool a 20% e secado com toalhas de papel.

### 3.9 Avaliação da memória aversiva – Teste da Esquiva Passiva

O teste de esquiva passiva envolve a inibição da tendência natural do animal de explorar além da plataforma e envolve o aprendizado de evitar o choque, um componente aversivo que constitui uma resposta condicionada (GOLD, 1986).

O aparelho consiste de uma caixa de acrílico (48 x 22 x 22), com o piso constituído por uma plataforma e uma grade eletrificada (Figura 09). O animal foi colocado na plataforma e deixado para ambientação no aparelho durante um 1 minuto, e depois retirado. Após 30 segundos, o animal foi colocado novamente na plataforma. O animal ao descer da plataforma recebeu um choque de 0,5 mA, durante 1 segundo, com o tempo de latência para descer sendo registrado, até um máximo de 5 minutos (treino). Retirou-se o animal e após 15 minutos este foi colocado novamente na plataforma e registrou-se a latência de descida (avaliação da memória recente). A retenção do aprendizado (avaliação da memória tardia) foi testada após

24 h, quando o animal foi colocado na plataforma e o tempo de latência para a descida da plataforma foi registrada, nessa etapa o animal não recebe o choque.

Figura 09: Aparelho de Esquiva Passiva



Fonte: Insight LTDA.

### 3.10 Análise imunohistoquímica

Vinte quatro ou noventa e seis horas após pMCAO os animais (n=4/grupo) foram anestesiados com xilazina (10mg/kg) e ketamina (90mg/kg) por via intraperitoneal e perfundidos transcardiacamente com salina, seguido por paraformaldeído a 4% em PBS. Os cérebros foram removidos e pós-fixados com formol tamponado durante 24 h e armazenados em sacarose a 30% (4°C) até a realização dos cortes. Os cortes coronais do córtex, estriado e hipocampo foram feitos em um criostato (Leica CM3050 S, Heidelberg, Alemanha) a -21°C, e armazenados *free floating* em PBS e azida sódica (4°C) numa série de “um em seis” 50µm (300 mm de intervalo). Nas análises foram utilizadas 12 fatias representativas de cada grupo (3 fatias por animal, n=4).

### 3.11 Avaliação da expressão de Iba-1, GFAP e iNOS

As fatias foram lavadas três vezes em PBS por 5 min e depois simultaneamente permeabilizadas e bloqueadas com PBS (pH 7,4) contendo 1% Triton X-100 e 10% de soro de cavalo, por 2 hora à temperatura ambiente (TA). Em seguida, foram incubadas, *free-floating*, com o anticorpo primário preparado em solução de bloqueio (tabela 03) *overnight* a 4°C e depois lavadas 3 vezes por 10 min cada em PBS. Posteriormente, foi realizada a incubação por 2 horas em TA com o anticorpo secundário, conjugado com o fluorocromo Alexa Fluor (tabela 04) diluído em solução de bloqueio. Após serem lavadas mais 3 vezes em PBS, as fatias foram montadas em lâminas gelatinizadas usando o meio de montagem fluoromont (Sigma) e deixadas secar protegidas da luz. A visualização foi realizada no microscópio Confocal (Plataforma Zeiss 710, Zeiss). Para iNOS as células foram consideradas positivas quando apresentaram-se arredondadas e com uma fluorescência verde e foram contadas em

todo o campo da imagem utilizado o programa ImageJ<sup>®</sup>, os resultados foram expressos pelo número de células iNOS positivas. Para Iba-1 e GFAP a quantificação se deu por medida da intensidade de fluorescência (IF) e foi calculada através do programa ImageJ<sup>®</sup>.

### **3.12 Avaliação da imunoreatividade para COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B e SOD-2**

Para a realização da técnica de imunohistoquímica, as fatias cerebrais foram lavadas três vezes durante 5 min (cada) com PBS e incubadas com tampão citrato pH 6,0, 90°C, para a exposição dos epítomos, em seguidas foram lavadas por 5 min com PBS e incubada com uma solução de bloqueio (PBS + 10% de metanol e 3% de peróxido de hidrogênio), durante 60 minutos à temperatura ambiente, para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Depois de lavar 3 vezes durante 5 min (cada) com PBS, fez-se o bloqueio das ligações inespecíficas com soro normal de cabra ou cavalo (a depender do anticorpo secundário) em PBS a 10% suplementado com Triton X-100 (solução de bloqueio) durante duas horas à temperatura ambiente, depois as secções foram incubadas com os anticorpos primários (tabela 03) diluída em solução de bloqueio a 4°C *overnight*. As secções foram então lavadas três vezes durante 10 min, em PBS. Após a lavagem, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário, diluído 1:200 em solução de bloqueio (tabela 04), foi realizada uma nova lavagem nas fatias com PBS por 5 min, e subsequentemente incubadas com conjugado de avidina-biotina-peroxidase (coloração Sistema ABC, VECTOR), durante 30 min. Como revelador foi utilizado o DAB (VECTOR). As fatias foram montadas em entellan (Merck, Alemanha), e visualizadas sob um microscópio (Nikon Elipse E200) com aumento de 100x. Foram selecionadas três fatias de cada animal, aleatoriamente, ao longo da área da lesão e a quantificação das células foi realizada utilizando o software Image J<sup>®</sup> (NIH, Bethesda, MD, EUA). As células foram consideradas positivas para as respectivas marcações quando se apresentaram arredondas e com uma coloração acastanhada e foram contadas em todo o campo da imagem. Os resultados foram expressos pelo número de células positivas.

Tabela 03 Anticorpos primários utilizados para imunofluorescência e imunohistoquímica

<b>Anticorpos primários</b>	<b>Diluição</b>	<b>Marca</b>
Anti-Iba-1	1:1000	Wako
Anti-GFAP	1:1000	Abcam
Anti-NOS-2	1:400	Santa Cruz
Anti-COX-2	1:200	Santa Cruz
Anti-TNF $\alpha$	1:200	Sigma
Anti – IL-1 $\beta$	1:200	Santa Cruz
Anti - NF- $\kappa$ B	1:200	Santa Cruz
Anti-SOD2	1:300	Abcam

Tabela 04 Anticorpos secundários utilizados para imunofluorescência e imunohistoquímica

<b>Anticorpos Secundários</b>	<b>Diluição</b>	<b>Marca</b>
Alexia Fluor anti-rabbit 488	1:500	Life technology
Anti-Rabbit	1:200	Abcam
Anti-goat	1:200	Abcam

### 3.13 Avaliação da expressão de sinaptofisina através da técnica de Western-blot

Amostras de Tecidos do corpo estriado e do córtex (n=4/grupo) foram homogeneizadas separadamente em 3 mL de tampão de sacarose 32 mM, EDTA 1 mM, Hepes 10 mM e BSA 1 mg/mL, usando um homogeneizador de tecidos. Os homogenatos foram centrifugados a 3.000g durante 10 min a 4°C, para remoção de debris. O sobrenadante foi submetido a uma nova centrifugação de 14.000g durante 1 hora a 4°C. os *pellets* resultantes foram ressuspensos em SDS 5% com coquetel inibidor de protease (SIGMA), e a concentração de proteínas determinada pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951).

O hipocampo não foi utilizado na avaliação da expressão de sinaptofisina, pois um trabalho prévio realizado por nosso grupo utilizando esse mesmo modelo, não observou diferença entre os grupos testados para esse marcador no hipocampo (FONTELES, 2013).

As amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos e as proteínas (20 $\mu$ g) foram separadas em SDS-PAGE (gel a 12,5 %), utilizando-se o sistema Mini Protean®3Cell (Bio-Rad, EUA), e foi eletricamente transferidas para as membranas de PVDF (Bio-Rad, EUA). As membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 5% em TBS-T (Tampão Tris-salina com 0,1% de Tween 20) por 1 hora e incubadas *overnight* os anticorpos anti-sinaptofisina (Rabbit,

1:200; Santa Cruz Biotechnology, CA) e anti- $\alpha$ -tubulina (mouse, 1:4000; Sigma, MO). Após lavagens em TBS-T, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários goat anti-rabbit e goat anti-mouse (horseradish-peroxidase-conjugated, 1:3000; Bio-Rad) por 1 hora.

Após a incubação com os anticorpos secundários as membranas foram lavadas duas vezes com o TBS-T e incubadas com ECL (*Enhanced Chemiluminescent substrate*, Bio Rad) por cerca de 5 minutos, sendo finalmente detectadas e analisadas pelos *softwares* Molecular Imager VersaDoc e Quantity One (Bio Rad), respectivamente. O valor final foi expresso pela razão da sinaptofisina pela  $\alpha$ -tubulina.

### **3.14 Análise estatística**

Antes da realização dos testes estatísticos foi feito o teste de normalidade para a verificação da distribuição de frequência de dados. No caso de distribuição normal foram usados os testes paramétricos (ANOVA, Bonferroni e Tukey), em caso negativo foram feitos os testes não paramétricos (Mann-Whitney). Os valores foram expressos por média  $\pm$ EPM ou mediana (mín-máx).

Para a análise do dano isquêmico, dos parâmetros sensório-motores, da memória de trabalho e da memória aversiva foi utilizado teste de Mann-Whitney. Para as análises de imunofluorescência e imunomarcção foi utilizado ANOVA seguido de teste de Bonferroni e a para a análise de western-blot foi utilizado ANOVA seguido de Tukey.

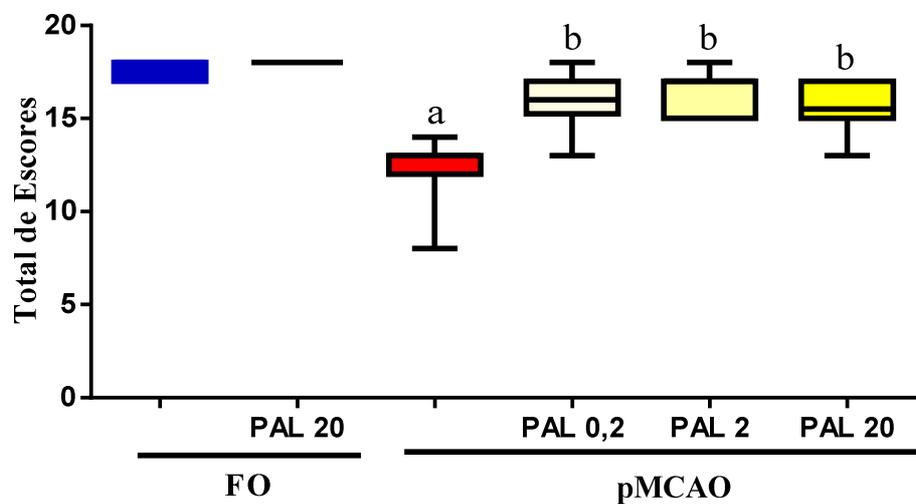
O critério de significância utilizado foi de  $p < 0,05$ . O software de análise usado foi Graph Pad InStat® 5.0.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação sensório-motora dos animais submetidos à pMCAO e tratados com a palmatina.

Na avaliação neurológica, realizada 24h após a cirurgia, os parâmetros avaliados foram a atividade espontânea, simetria no movimento das quatro patas, estiramento das patas dianteiras, escalada e preensão, proporção corpórea e resposta ao toque da vibrissa. Nossos resultados mostraram que os animais isquemiados apresentaram déficit sensório-motor significativo (escores - FO: 18 (17-18); FO+PAL 20: 18 (18-18); pMCAO: 13 (8-15)). Os animais tratados com a palmatina, nas doses de 0,2, 2 e 20mg/kg, obtiveram melhora significativa no desempenho sensório-motor em relação aos animais isquemiados (escores - pMCAO+PAL 0,2: 16 (13-18); pMCAO+PAL 2: 17 (15-18); pMCAO+PAL 20: 15,5 (13-17)) (Figura 10).

Figura 10. A Palmatina melhora os déficits sensório-motores em camundongos submetidos à pMCAO.

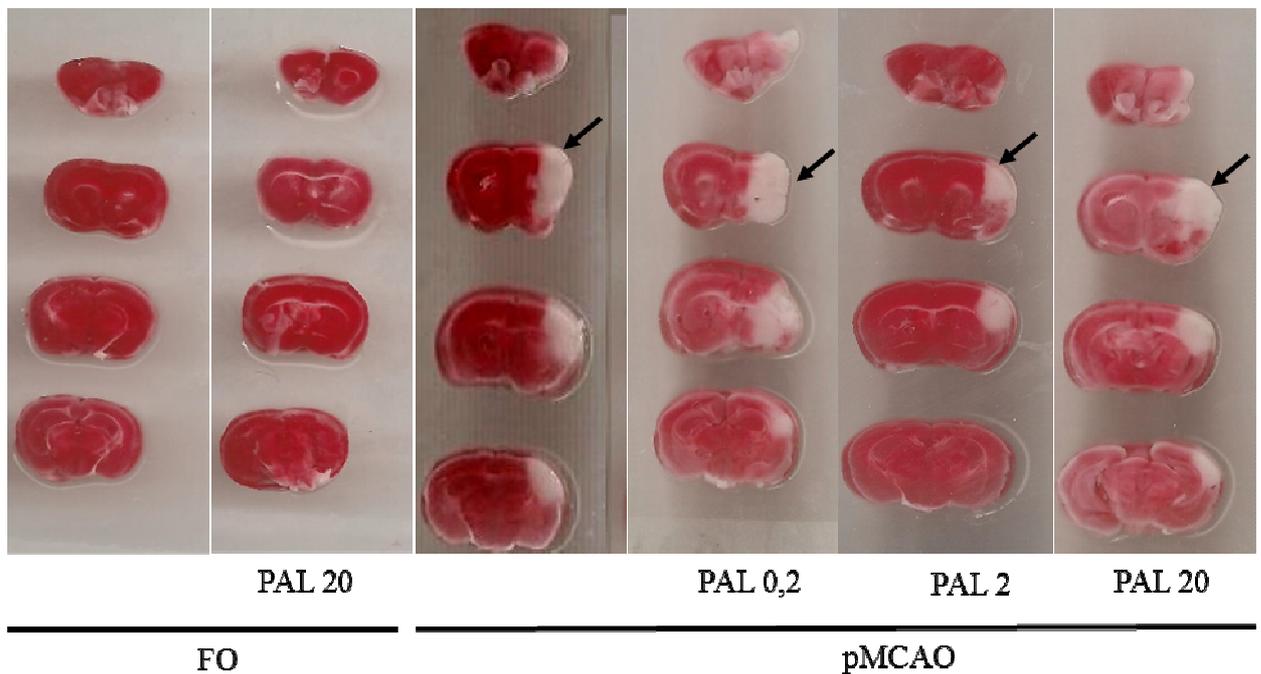


Os animais foram isquemiados por pMCAO e foram tratados 2 horas depois com a palmatina, nas doses de 0,2, 2 e 20 mg/kg, e após 24 horas da pMCAO foi realizada a avaliação neurológica. Os valores representam a mediana (MIN-MAX).  $p < 0,05$  <sup>a</sup>vs FO, <sup>b</sup>vs pMCAO,  $n = 8$ . Teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos.

#### 4.2 Efeito da palmatina sobre o dano isquêmico de animais submetidos à pMCAO.

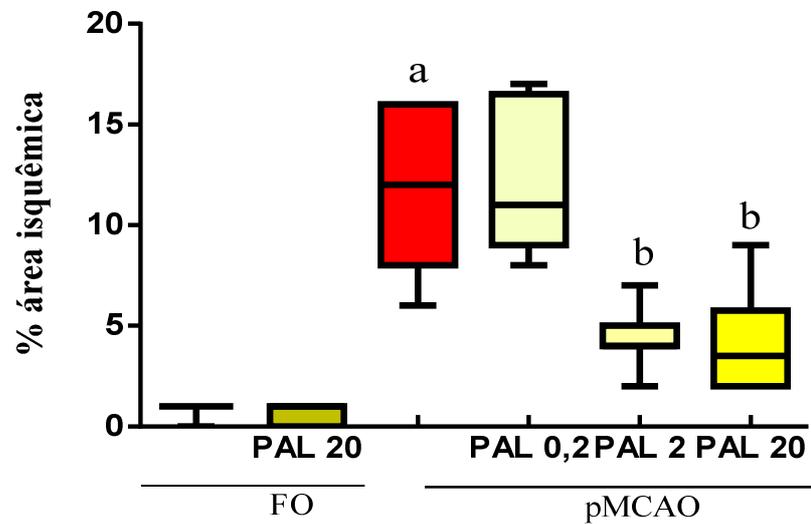
Os animais submetidos à pMCAO apresentaram uma área de infarto isquêmico observado através da medida da porcentagem da área sem atividade mitocondrial 24 horas após a isquemia (Figura 11). Os animais isquemiados apresentaram uma área isquêmica significativamente maior (FO: 1,0 (0,0-1,0)%; FO+PAL 20: 1,0 (1,0-1,0)%; pMCAO: 12,0 (6,0-16,0)%). O tratamento com a Palmatina nas doses de 2 e 20 mg/kg conseguiu diminuir significativamente a área isquêmica quando comparamos com os animais isquemiados (pMCAO+PAL 0,2: 11,0 (8,0- 17,0) %; pMCAO+PAL 2: 4,0 (2,0-7,0) %; pMCAO+PAL20: 3,5 (2,0-9,0%)) (Figura 12). Os dados também demonstram que a palmatina quando administrada em animais falso-operados não exerce efeito, já que não observamos diferença estatística entre os animais falso-operados tratados com veículo e os tratados com a palmatina na dose de 20mg/kg.

Figura 11. Fotografia das fatias cerebrais submetidas à coloração com TTC 1%



As áreas isquêmicas, nas quais as células não são mais viáveis (com enzimas inativas) correspondem às regiões pálidas, sem coloração, demarcadas pelas setas.

Figura 12. A Palmatina diminui a área de infarto isquêmico em camundongos submetidos à pMCAO.

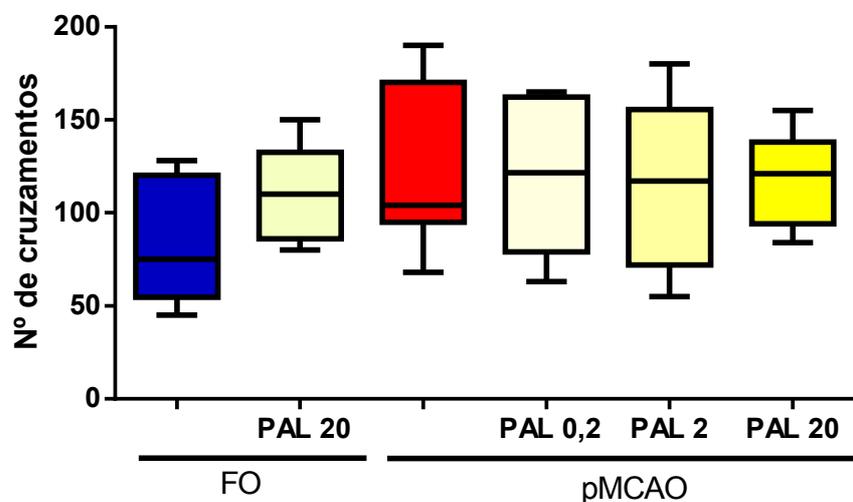


Os animais foram isquemiados por pMCAO e foram tratados 2 horas depois com palmatina, nas doses de 0,2, 2 e 20 mg/kg. A área do infarto isquêmico foi avaliada 24 horas depois da pMCAO. Os valores representam a mediana (MIN-MÁX).  $p < 0,05$ , <sup>a</sup>vs FO, <sup>b</sup>vs pMCAO,  $n=8$ . Teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos.

### 4.3 Efeito da Palmatina sobre a atividade locomotora de camundongos submetidos à pMCAO.

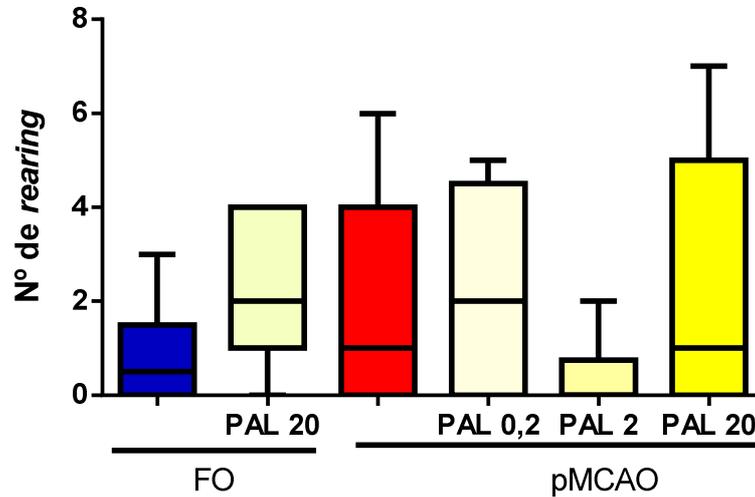
O teste de campo aberto, realizado 72 horas após a indução de pMCAO, avalia a atividade locomotora. Não foram observadas alterações motoras na capacidade de exploração horizontal dos animais, avaliada através da observação do número de cruzamentos, como podemos observar na figura 13 (número de cruzamentos - FO: 75 (45-128); FO+PAL 20: 111(80-150); pMCAO: 104 (68-190); pMCAO+PAL 0,2: 121,5 (63-165); pMCAO+PAL 2: 117 (55-180); pMCAO+PAL 20: 121 (84-155)). Também, não foi observada alteração motora na capacidade de exploração vertical dos animais (número de *rearings* - FO: 0,5 (0-3); FO+PAL 20: 2 (0-4); pMCAO: 1 (0-6)) (pMCAO+PAL 0,2: 2 (0-5); pMCAO+PAL 2: 0 (0-2); pMCAO+PAL 20: 1 (0-7)) (Figura 14).

Figura 13. A Palmatina não altera o número de cruzamentos no teste do campo aberto de camundongos submetidos à pMCAO.



Os animais foram isquemiados por pMCAO e foram tratados com a palmatina, nas doses de 0,2, 2 e 20 mg/kg, 2, 24, 48 e 72 horas depois da isquemia, e após 72 horas da pMCAO foi realizado o teste que avalia a atividade locomotora. Os valores representam à mediana (MIN-MAX). n=8. Teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos.

Figura 14. A Palmatina não altera o número de “rearing” no teste do campo aberto de camundongos submetidos à pMCAO.

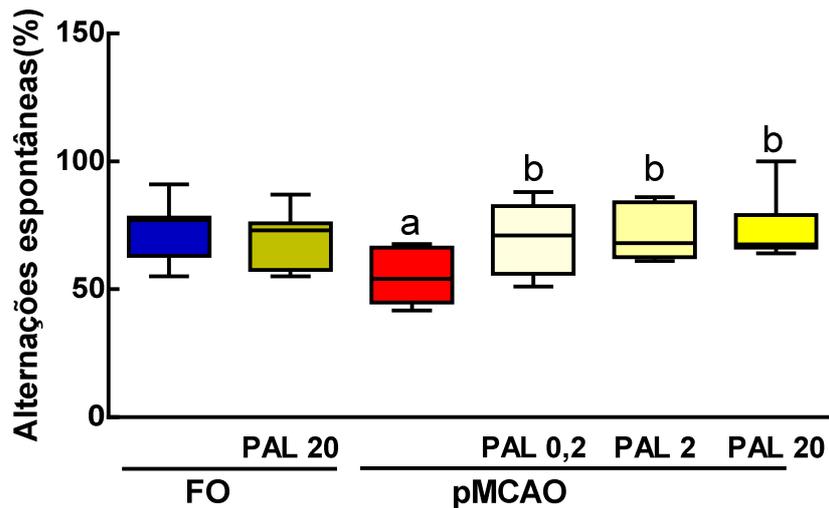


Os animais foram isquemiados por pMCAO e foram tratados com a palmatina, nas doses de 0,2, 2 e 20 mg/kg, 2, 24, 48 e 72 horas depois da isquemia, e após 72 horas após a pMCAO foi realizado o teste que avalia a atividade locomotora. Os valores representam à mediana (MIN-MAX). n=8, Teste de Mann-Whitney para comparação entre dois.

#### 4.4 Efeito da Palmatina sobre a memória de trabalho de camundongos submetidos à pMCAO.

Na memória de trabalho, avaliada pelo teste do Labirinto em Y, realizado 72 horas após a cirurgia, os animais isquemiados apresentaram um déficit de memória em relação aos animais falso-operados (FO: 77.5 (55-91)%; FO + PAL 20: 73 (55-87)%; pMCAO: 54 (41.66-67,72) %). Esse déficit foi inibido pelo tratamento com a palmatina em todos as doses testadas 0,2, 2 e 20 mg/kg (pMCAO+PAL 0,2: 71 (51-88)%; pMCAO+PAL 2: 68 (61-86)%; PAL 20: 67,5 (64-100)%) (Figura 15).

Figura 15. A Palmatina protege contra os déficits de memória de trabalho induzidos pela pMCAO.

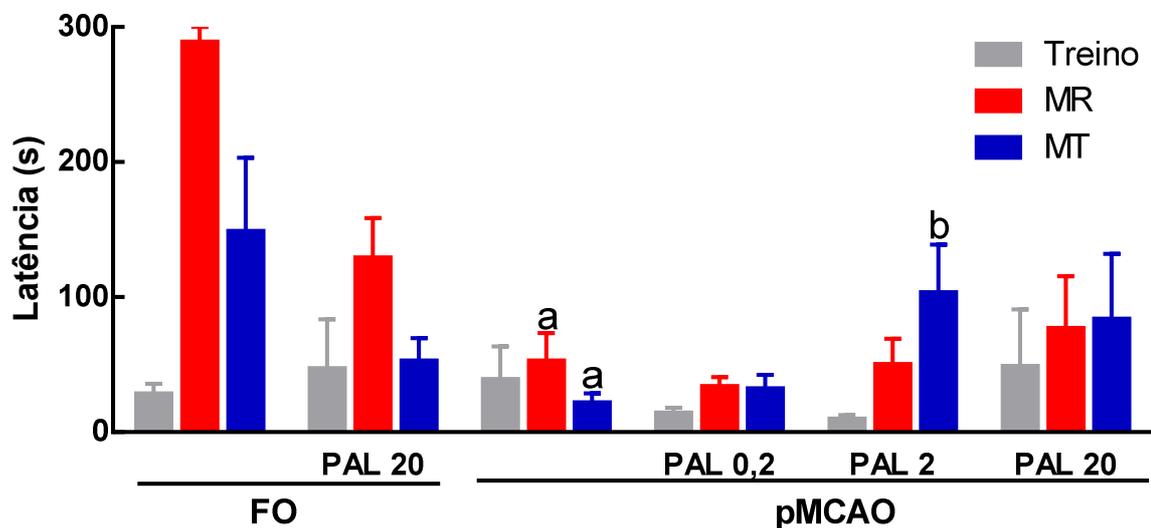


Os animais foram isquemiados por pMCAO e foram tratados com a palmatina, nas doses de 0,2, 2 e 20 mg/kg, 2, 24, 48 e 72 horas depois da isquemia, e após 72 horas da pMCAO foi realizado o teste que avalia a memória de trabalho. Os valores representam à mediana (MIN-MAX).  $p < 0,05$ , <sup>a</sup>vs FO, <sup>b</sup>vs pMCAO,  $n=8$ . Teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos.

#### 4.5 Efeito da Palmatina sobre a memória aversiva de camundongos submetidos à pMCAO.

As memórias aversivas, recente e tardia, foram avaliadas através do teste da esQUIVA passiva, 72 e 96 h após a cirurgia, respectivamente. Os animais submetidos à pMCAO apresentaram um déficit da memória aversiva recente - latência (FO: 242,4±48,18s; FO+PAL20: 129,9±29,97s; pMCAO: 78,00±18,01s) e tardia (FO: 205,8±57,7s; FO+PAL20: 53,00±20,45s; pMCAO: 30,7±10,51s) em comparação aos animais falso-operados. A palmatina reverteu o déficit de memória tardia na dose de 2 mg/kg, apesar de não ter protegido contra os déficits de memória aversiva recente em nenhuma das doses ((MR: pMCAO+PAL 0,2: 27,38±6,68s; pMCAO+PAL 2: 50,44±18,58s; pMCAO+PAL 20: 77±38,33s) (MT: pMCAO+PAL 0,2: 32,38±9,968s; pMCAO+PAL 2: 103,6±35,38s; pMCAO+PAL 20: 84,14±48,10s) (Figura 16).

Figura 16. Efeito da Palmatina sobre a memória aversiva de camundongos submetidos à pMCAO.



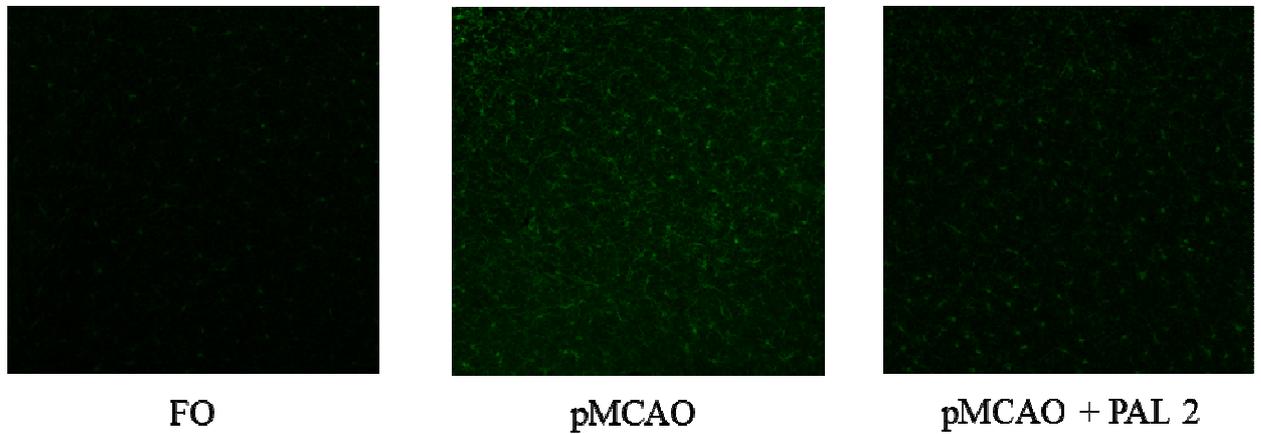
Os animais foram isquemiados por pMCAO, foram tratados com a palmatina, nas doses de 0,2, 2 e 20 mg/kg, 2, 24, 48 e 72 horas. 72 horas depois da pMCAO a memória recente foi avaliada e a tardia 96 horas após a isquemia. Os valores representam a média ± EPM.  $p < 0,05$ , <sup>a</sup>vs FO, <sup>b</sup>vs pMCAO. Teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos.

#### **4.6 Efeito da Palmatina sobre a ativação de microglia no córtex temporal, estriado e hipocampo de camundongos submetidos à pMCAO.**

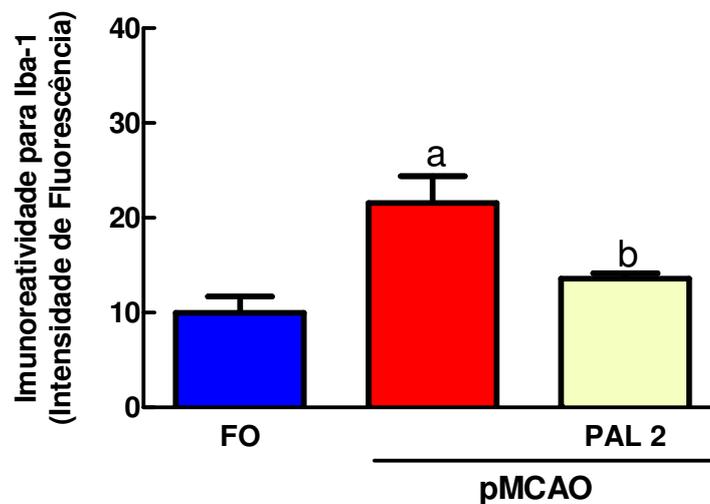
Os animais isquemiados apresentaram aumento significativo na ativação da micróglia evidenciada pela imunofluorescência para Iba-1 no córtex (Intensidade de fluorescência - FO:  $9,98 \pm 1,69$ ; pMCAO:  $21,57 \pm 2,81$ ) (Figura 17) e no estriado (Intensidade de fluorescência FO:  $9,71 \pm 1,64$ ; pMCAO:  $25,46 \pm 4,02$ ) (Figura 18) avaliada 96 horas após a isquemia, o mesmo não ocorreu no hipocampo (Intensidade de fluorescência - FO:  $10,64 \pm 0,94$ ; pMCAO:  $20,69 \pm 4,60$ ; pMCAO+PAL 2:  $13,22 \pm 1,99$ ) (Figura 19). O tratamento com a Palmatina na dose de 2 mg/kg diminuiu significativamente essa imunofluorescência no córtex (Intensidade de fluorescência – pMCAO+PAL 2:  $13,57 \pm 0,58$ ), no estriado não foi observado uma diferença significativa quando comparado com o FO (Intensidade de fluorescência - pMCAO+PAL 2:  $14,93 \pm 1,04$ ).

Figura 17. A Palmatina diminui a ativação da micróglia córtex de camundongos 96 horas após a pMCAO.

A.



B.

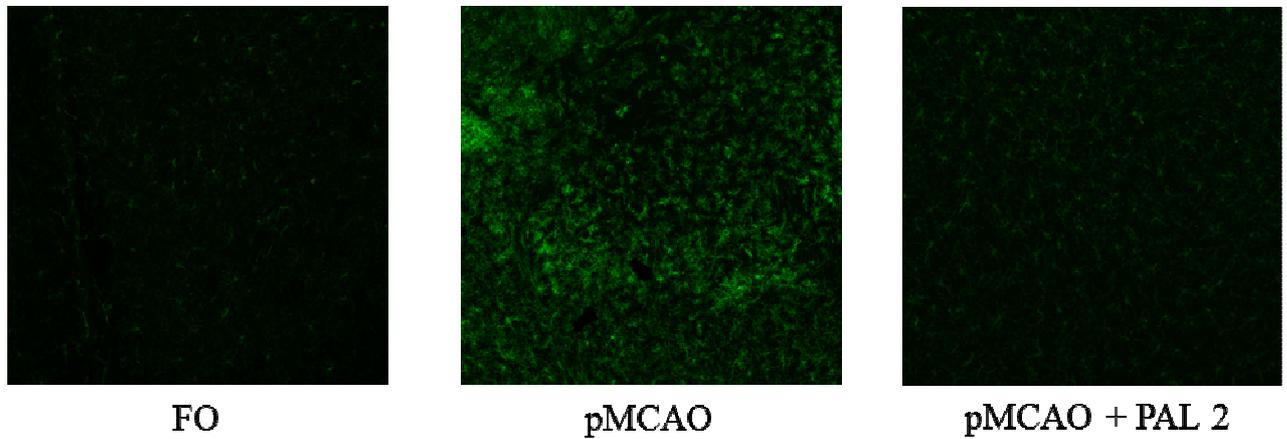


A. Microfotografias (aumento de 100x) representativas da imunomarcção para Iba-1 em secções coronais do córtex. B. Intensidade de fluorescência para Iba-1 no córtex de camundongos submetidos à pMCAO.

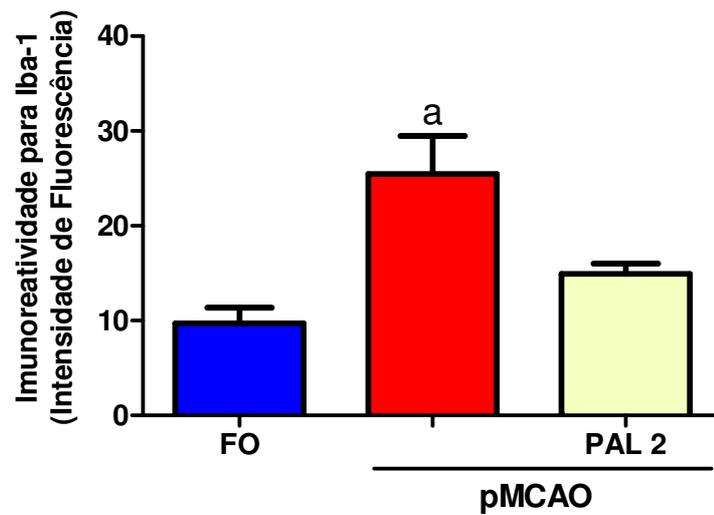
Os animais foram isquemiados por pMCAO e foram tratado com a palmatina 2mg/kg 2, 24, 48 e 72 horas depois. A imunoreatividade foi avaliada 96 horas após a pMCAO. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.  $p < 0,05$  <sup>a</sup>vs FO, <sup>b</sup>vs pMCAO, n=4. ANOVA, seguida do teste Bonferroni.

Figura 18. A Palmatina não diminui ativação da micróglia no estriado de camundongos 96 horas após a pMCAO.

A.



B.

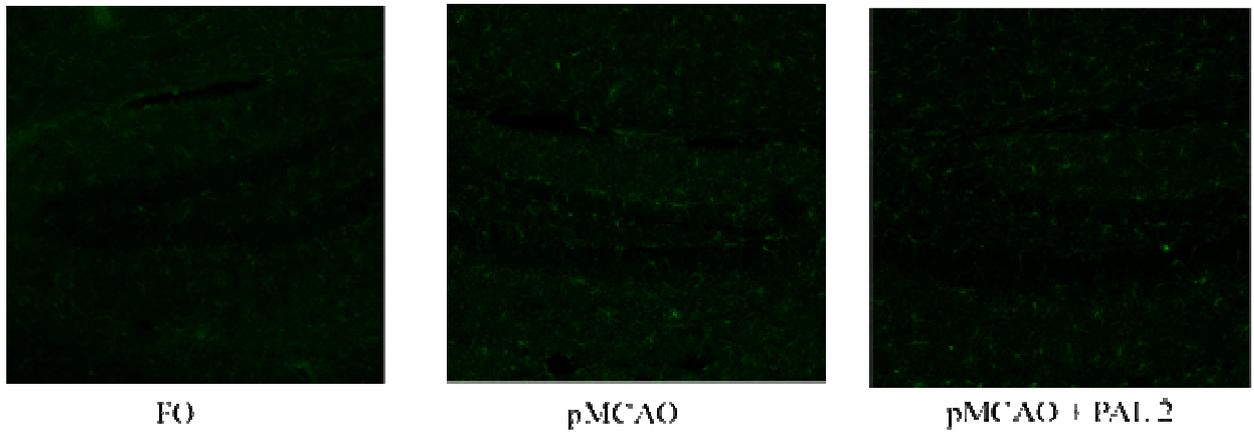


A. Microfotografias (aumento de 100x) representativas da imunomarcção para Iba-1 em secções do estriado. B. Intensidade de fluorescência para Iba-1 no estriado de camundongos submetidos à pMCAO.

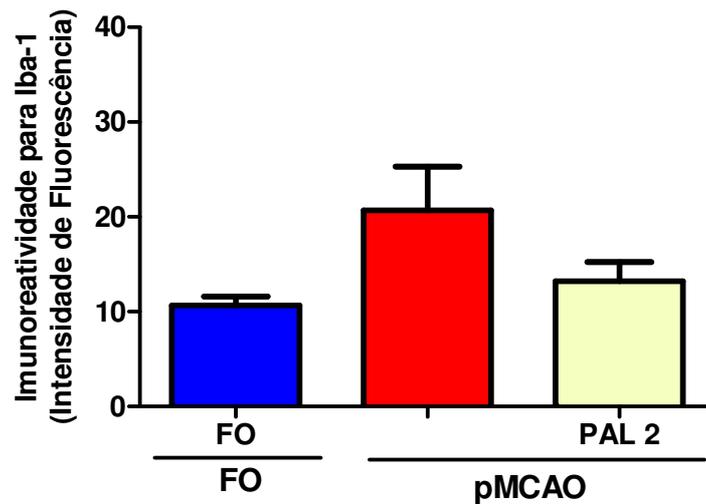
Os animais foram isquemiados por pMCAO e foram tratado com a palmatina 2mg/kg 2, 24, 48 e 72 horas depois. A imunoreatividade foi avaliada 96 horas após a pMCAO. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.  $p < 0,05$ , <sup>a</sup>vs FO, n=4. ANOVA, seguida do teste Bonferroni.

Figura 19. A palmatina não altera a ativação da micróglia no hipocampo de camundongos 96 horas após a pMCAO.

A.



B.



A. Microfotografias (aumento de 100x) representativas da imunomarcagem para Iba-1 em secções coronais do hipocampo. B. Intensidade de fluorescência para Iba-1 no hipocampo de camundongos submetidos à pMCAO.

Os animais foram isquemiados por pMCAO e foram tratado com a palmatina 2mg/kg 2, 24, 48 e 72 horas depois. A imunoreatividade foi avaliada 96 horas após a pMCAO. Os valores representam a média  $\pm$  EPM, n=4. ANOVA, seguida do teste Bonferroni.

#### **4.7 Efeito da Palmatina sobre ativação de astrócitos no córtex, estriado e hipocampo de camundongos submetidos à pMCAO.**

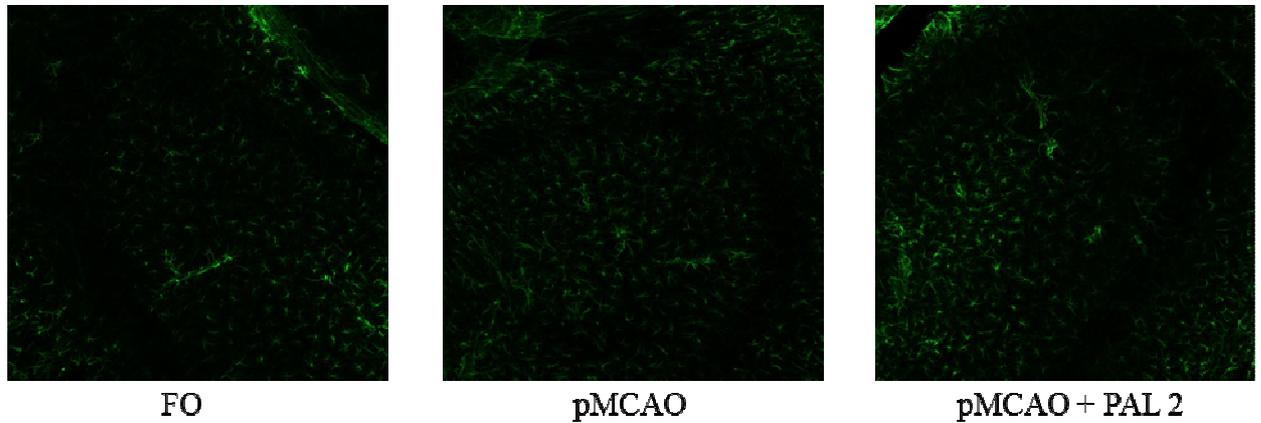
Os animais isquemiados apresentaram aumento significativo na ativação da astrócito evidenciada pela imunofluorescência para GFAP, marcador dessas células, no córtex e no estriado (Intensidade de fluorescência – Córtex: FO:  $4,48 \pm 0,69$ ; pMCAO:  $29,72 \pm 5,74$ ; Estriado: FO:  $4,29 \pm 0,72$ ; pMCAO:  $34,82 \pm 5,17$ ) (Figura 20 e 21) 96 horas após a isquemia, o mesmo não ocorreu no hipocampo (Intensidade de fluorescência - FO:  $12,95 \pm 1,04$ ; pMCAO:  $16,18 \pm 2,65$ ; pMCAO+PAL 2:  $13,70 \pm 0,87$ ) (Figura 22), e o tratamento com a Palmatina na dose de 2 mg/kg diminuiu significativamente essa imunofluorescência para GFAP no córtex (Intensidade de fluorescência – pMCAO+PAL 2:  $13,18 \pm 1,98$ ) e no estriado (Intensidade de fluorescência - pMCAO+PAL 2:  $18,58 \pm 3,76$ ), demonstrando a ação da palmatina em diminuir a ativação de astrócito.



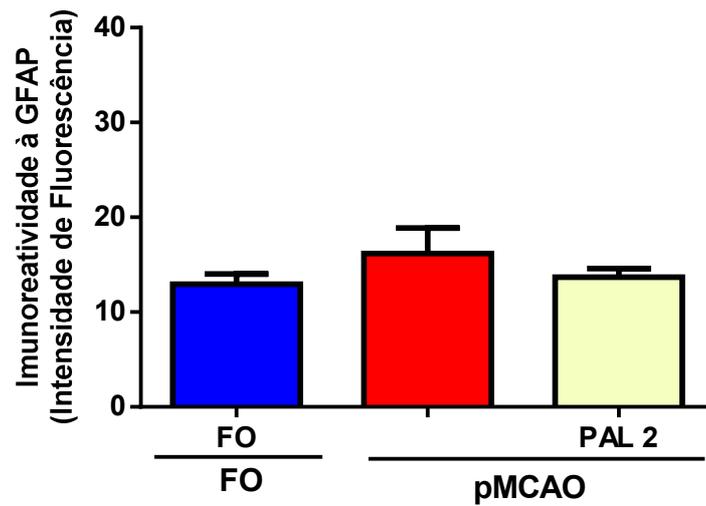


Figura 22. A palmatina não altera a ativação de astrócitos no hipocampo de camundongos 96 horas após a pMCAO.

A.



B.



A. Microfotografias (aumento de 100x) representativas da imunomarcção para GFAP em secções coronais do hipocampo. B. Intensidade de fluorescência para GFAP no hipocampo de camundongos submetidos à pMCAO.

Os animais foram isquemiados por pMCAO e foram tratado com a palmatina 2mg/kg 2, 24, 48 e 72 horas depois. A imunoreatividade foi avaliada 96 horas após a pMCAO. Os valores representam a média  $\pm$  EPM, n=4. ANOVA, seguida do teste Bonferroni.

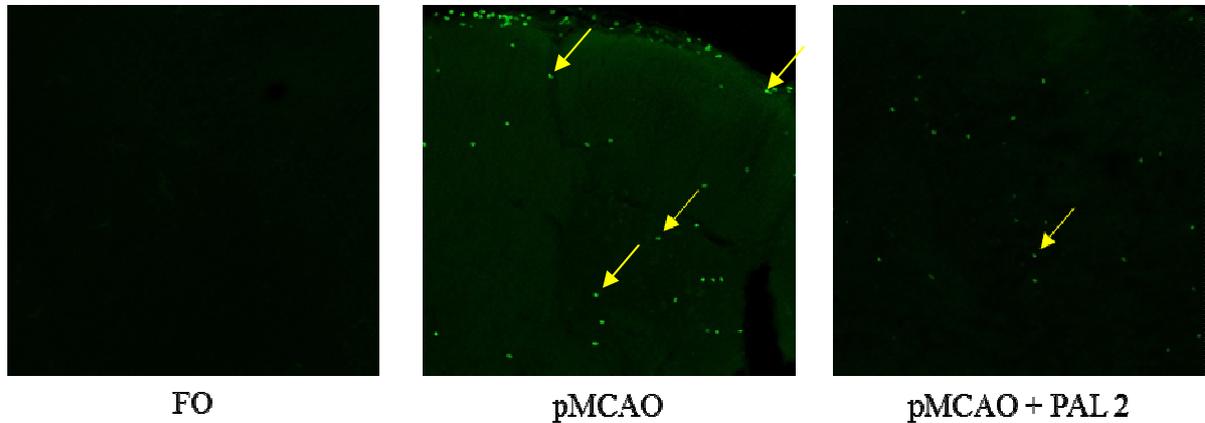
#### **4.8 Efeito da Palmatina sobre a expressão de iNOS no córtex, estriado e hipocampo de camundongos submetidos à pMCAO.**

A imunofluorescência para iNOS foi realizada em dois momentos diferentes, 24 e 96 horas após a indução da isquemia cerebral. Na avaliação realizada 24 horas após a isquemia verificou-se um aumento significativo no número de células iNOS positivas, quando comparados aos animais falso-operados, tanto no córtex (cél. iNOS positivas - Córtex: FO:  $1 \pm 0,40$ ; pMCAO:  $62 \pm 11,31$ ) (Figura 23) quanto no estriado dos animais (cél. iNOS positivas - Estriado: FO:  $1,25 \pm 0,25$ ; pMCAO:  $46,25 \pm 10,63$ ) (Figura 24), o mesmo não aconteceu no hipocampo (cél. iNOS positivas - Hipocampo: FO:  $0,5 \pm 0,28$ ; pMCAO:  $0,75 \pm 0,47$ ) (Figura 25). O tratamento com a Palmatina na dose 2 mg/kg diminui significativamente o número de células iNOS positivas apenas no córtex dos animais, no estriado essa diminuição não foi significativa (cél. iNOS positivas - córtex: pMCAO+PAL 2:  $27 \pm 8,91$ ; Estriado: pMCAO+PAL 2:  $21 \pm 5,24$ ; Hipocampo: pMCAO+PAL 2:  $1 \pm 0,57$ ).

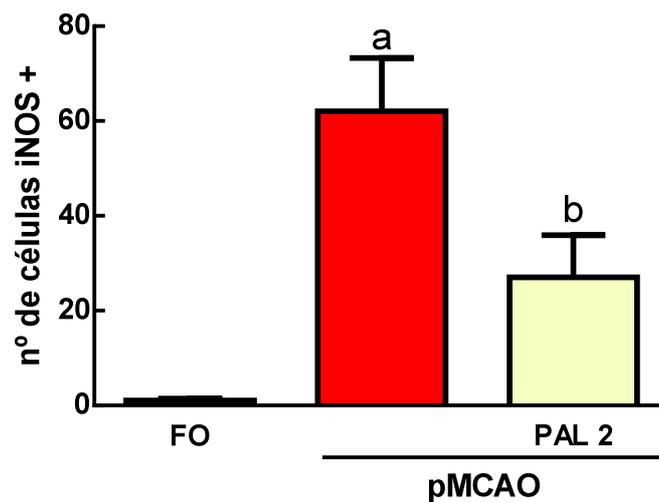
Na avaliação realizada 96 horas após a isquemia verificou-se que não houve diferença significativa entre os grupos falso operado, isquemiado e isquemiado tratado com palmatina na dose de 2mg/kg no córtex (Figura 26), no estriado (Figura 27) e nem no hipocampo (Figura 28) (cél. iNOS positivas - Córtex: FO:  $0,75 \pm 0,47$ ; pMCAO:  $9,5 \pm 2,39$ ; pMCAO+PAL 2:  $10,5 \pm 3,52$ ; Estriado: FO:  $0,5 \pm 0,5$ ; pMCAO:  $27 \pm 6,72$ ; pMCAO+PAL 2:  $20,5 \pm 9,53$ ; Hipocampo: FO:  $0,25 \pm 0,25$ ; pMCAO:  $2,25 \pm 1,3$ ; pMCAO+PAL 2:  $0,25 \pm 0,25$ ).

Figura 23. A Palmatina diminui a expressão de iNOS no córtex de camundongos 24 horas após a pMCAO.

A.



B.

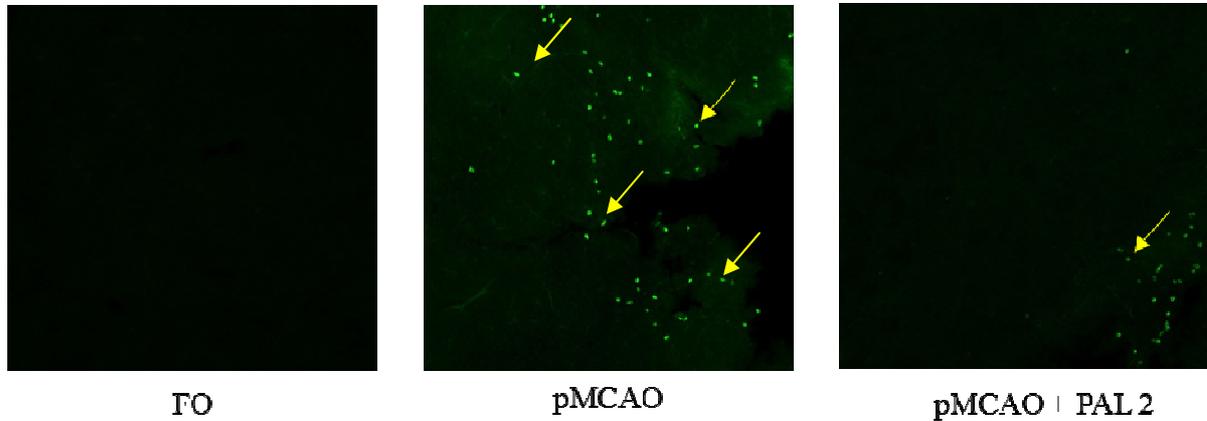


A. Microfotografias (aumento de 100x) representativas da imunomarcção para iNOS em secções coronais do córtex 24 horas após a cirurgia. As setas indicam células iNOS positivas. B. Número de células iNOS positivas no córtex de camundongos 24 horas após a pMCAO

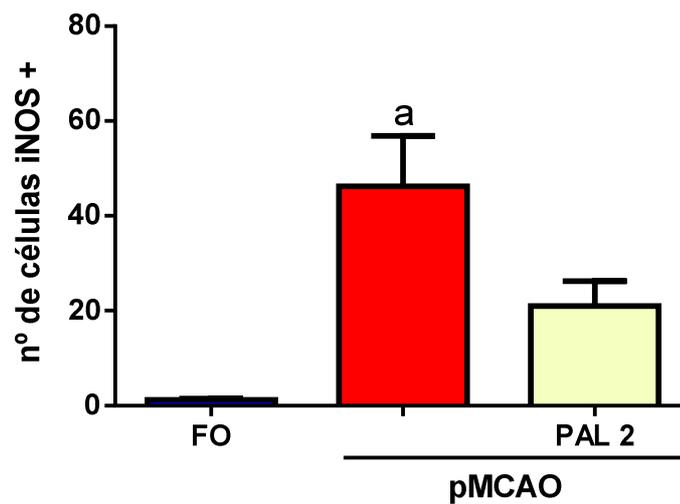
Os animais foram isquemiados por pMCAO, foram tratados com a palmatina 2mg/kg após 2 horas, e 24 horas depois da pMCAO a imunoreatividade foi avaliada. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.  $p < 0,05$ , <sup>a</sup>vs FO, <sup>b</sup>vs pMCAO, n=4. ANOVA, seguida do teste Bonferroni.

Figura 24. A Palmatina não diminui a expressão de iNOS no estriado de camundongos 24 horas após a pMCAO.

A.



B.

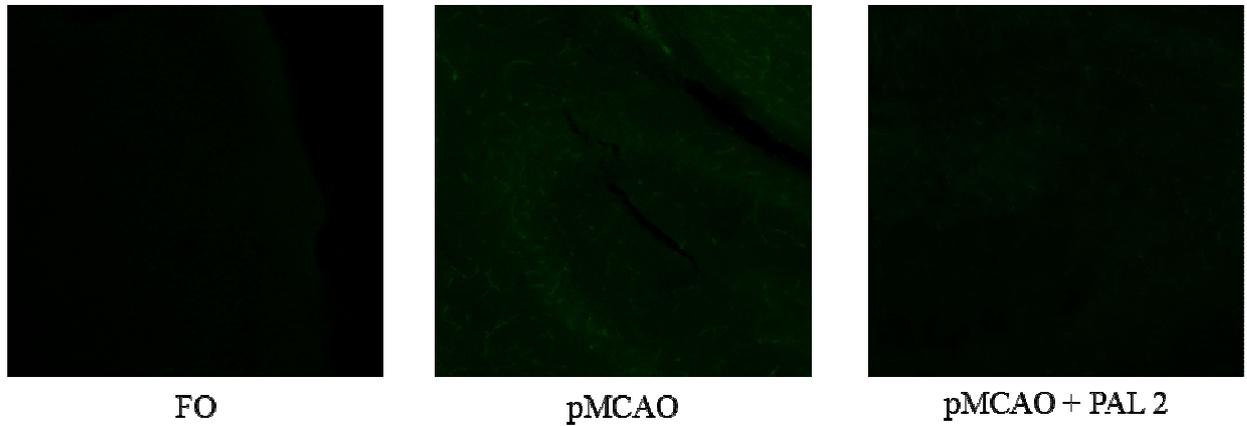


A. Microfotografias (aumento de 100x) representativas da imunomarcação para iNOS em secções coronais do estriado 24 horas após a cirurgia. As setas indicam células iNOS positivas. B. Número de células iNOS positivas no estriado de camundongos 24 horas após a pMCAO.

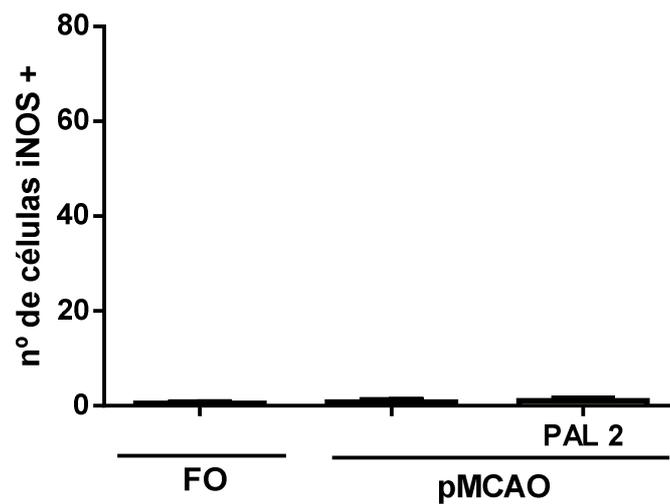
Os animais foram isquemiados por pMCAO, foram tratados com a palmatina 2mg/kg após 2 horas, 24 horas depois da pMCAO a imunoreatividade foi avaliada. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.  $p < 0,05$ , <sup>a</sup>vs FO, <sup>b</sup>vs pMCAO, n=4. ANOVA, seguida do teste Bonferroni.

Figura 25. A Palmatina não altera a expressão de iNOS no hipocampo de camundongos 24 horas após a pMCAO.

A.



B.



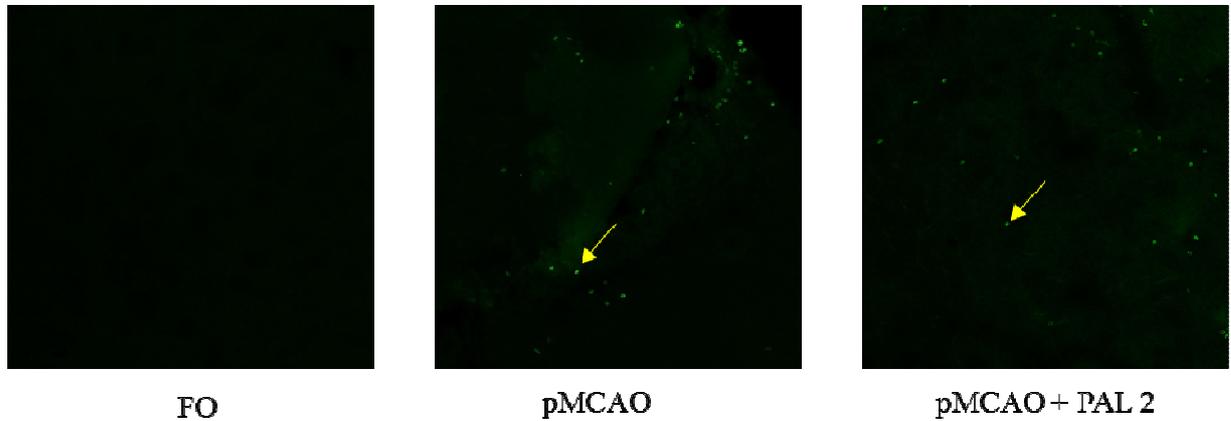
A. Microfotografias (aumento de 100x) representativas da imunomarcção para iNOS em secções coronais do hipocampo 24 horas após a cirurgia. B. Número de células iNOS positivas no hipocampo de animais 24 horas após a pMCAO.

Os animais foram isquemiados por pMCAO, foram tratados com a palmatina 2mg/kg após 2 horas, e 24 horas depois da pMCAO a imunoreatividade foi avaliada. Os valores representam a média  $\pm$  EPM, n=4. ANOVA, seguida do teste Bonferroni.

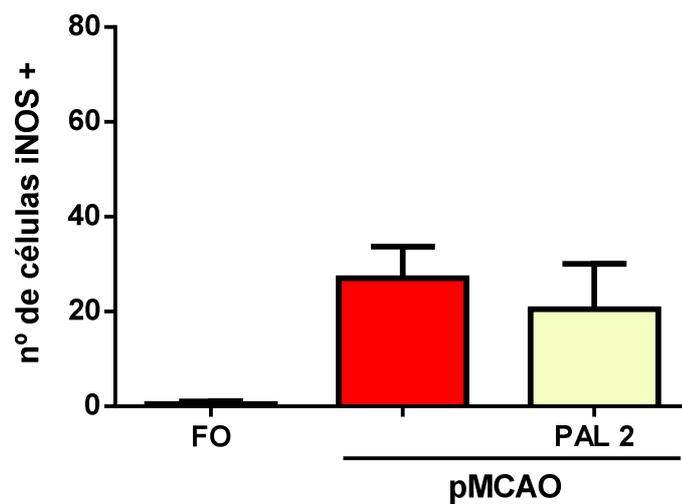


Figura 27. A Palmatina não altera a expressão de iNOS no estriado de camundongos 96 horas após a pMCAO.

A.



B.

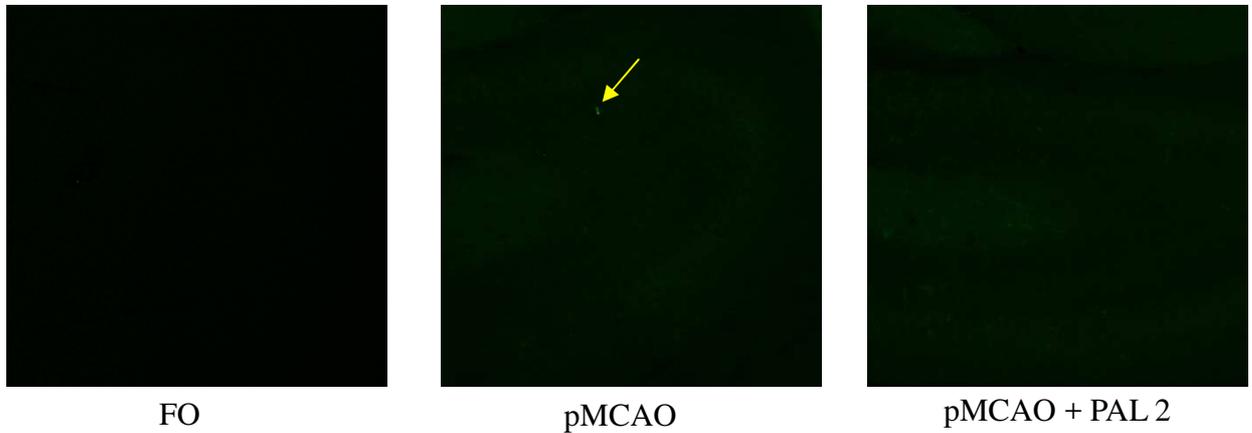


A. Microfotografias (aumento de 100x) representativas da imunomarcção para iNOS em secções coronais do estriado 96 horas após a cirurgia. As setas indicam células iNOS positivas. B. Número de células iNOS positivas no estriado de camundongos 96 horas após a pMCAO

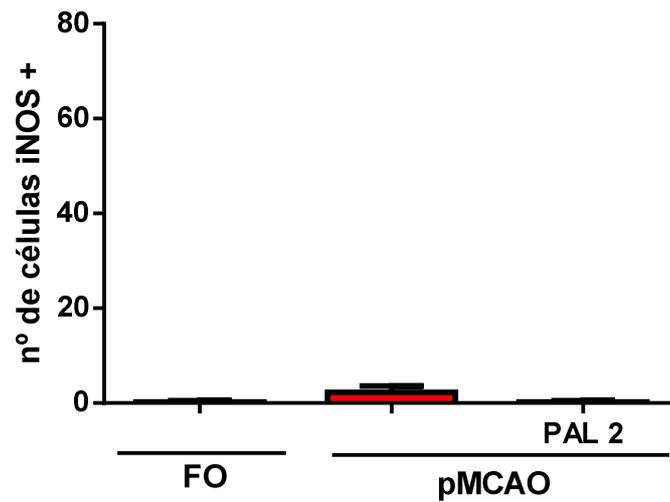
Os animais foram isquemiados por pMCAO, foram tratados com a palmatina 2mg/kg após 2, 24, 48 e 72 horas depois, e a imunoreatividade foi avaliada 96 horas após a pMCAO. Os valores representam a média  $\pm$  EPM, n=4. ANOVA, seguida do teste Bonferroni.

Figura 28. A Palmatina não altera a expressão de iNOS no hipocampo de camundongos 96 horas após a pMCAO.

A.



B.



A. Microfotografias (aumento de 100x) representativas da imunomarcção para iNOS em secções coronais do hipocampo 96 horas após a cirurgia. A seta indica célula iNOS positiva. B. Número de células iNOS positivas no hipocampo de animais 96 horas após a pMCAO.

Os animais foram isquemiados por pMCAO, foram tratados com a palmatina 2mg/kg após 2, 24, 48 e 72 horas depois, e a imunoreatividade foi avaliada 96 horas após a pMCAO. Os valores representam a média  $\pm$  EPM, n=4. ANOVA, seguida do teste Bonferroni.

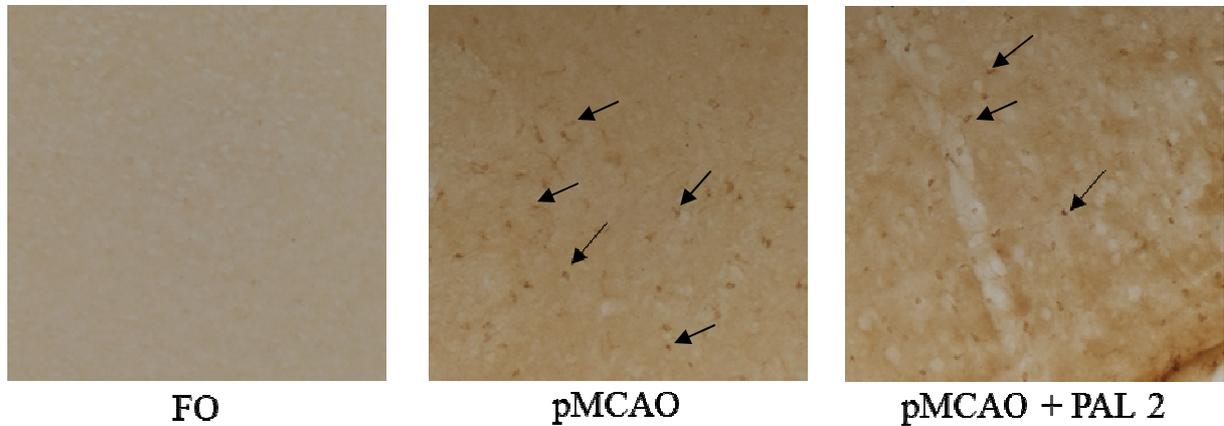
#### **4.9 Efeito da Palmatina sobre a expressão de COX-2 no córtex, estriado e hipocampo de camundongos submetidos à pMCAO.**

A imunomarcção para a COX-2 foi realizada em dois momentos diferentes, 24 e 96 horas após a indução da isquemia cerebral. Na avaliação realizada 24 horas após a isquemia verificou-se que a isquemia aumenta significativamente o número de células COX-2 positivas, quando comparado aos animais falso-operados, no córtex (Figura 29), estriado (Figura 30) e hipocampo (Figura 31) (cél. COX-2 positivas - Córtex: FO:  $16,25 \pm 2,32$ ; pMCAO:  $50 \pm 5,55$ ; Estriado: FO:  $16,5 \pm 4,71$ ; pMCAO:  $56,75 \pm 2,59$ ; Hipocampo: FO:  $11 \pm 0,70$ ; pMCAO:  $41,25 \pm 3,03$ ). O tratamento com a Palmatina na dose 2 mg/kg diminui significativamente o número de células COX-2 positivas no estriado e no hipocampo (cél. COX-2 positivas - estriado: pMCAO+PAL 2:  $28 \pm 3,08$ ; Hipocampo: pMCAO+PAL 2:  $28,5 \pm 2,66$ ), mas não no córtex (cél. COX-2 positivas - pMCAO+PAL 2:  $38,25 \pm 2,59$ ).

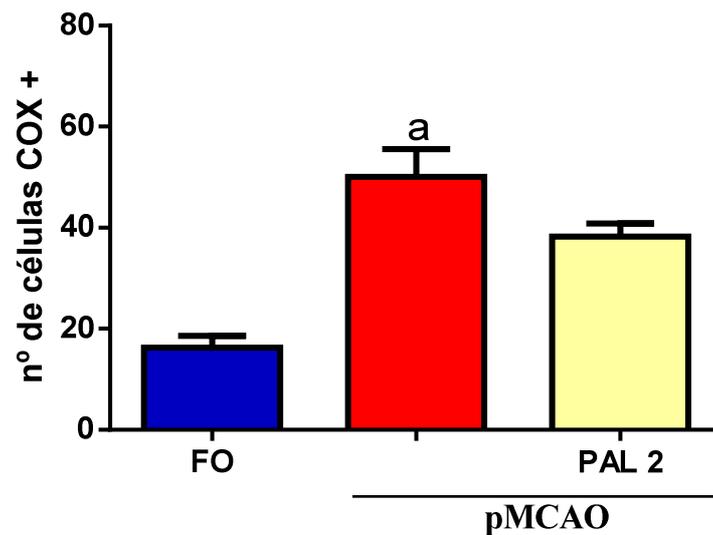
Na avaliação realizada 96 horas após a isquemia verificou-se um aumento significativo no número de células COX-2 positivas, quando comparados aos animais falso-operados, no córtex (Figura 32), no estriado dos animais (Figura 33), mas não no hipocampo (Figura 34) (cél. COX-2 positivas - Córtex: FO:  $19 \pm 3,93$ ; pMCAO:  $44 \pm 3,10$ ; Estriado: FO:  $17,75 \pm 5,92$ ; pMCAO:  $57 \pm 11,45$ ; Hipocampo: FO:  $11,50 \pm 1,19$ ; pMCAO:  $10,75 \pm 1,79$ ). O tratamento com a Palmatina na dose 2 mg/kg diminui significativamente o número de células COX-2 positivas no córtex e no estriado (cél. COX-2 positivas - córtex: pMCAO+PAL 2:  $12 \pm 2,79$ ; Estriado: pMCAO+PAL 2:  $12,25 \pm 6,21$ ), mas não no hipocampo (cél. COX-2 positivas - pMCAO+PAL 2:  $6,25 \pm 1,10$ ).

Figura 29. A Palmatina não altera a expressão de COX-2 no córtex de camundongos 24 horas após a pMCAO.

A.



B.



A. Microfotografias (aumento de 100x) representativas da imunomarcção para COX-2 em secções coronais do córtex 24 horas após a cirurgia. As setas indicam células COX-2 positivas. B. Número de células COX-2 positivas no córtex de camundongos 24 horas após a pMCAO.

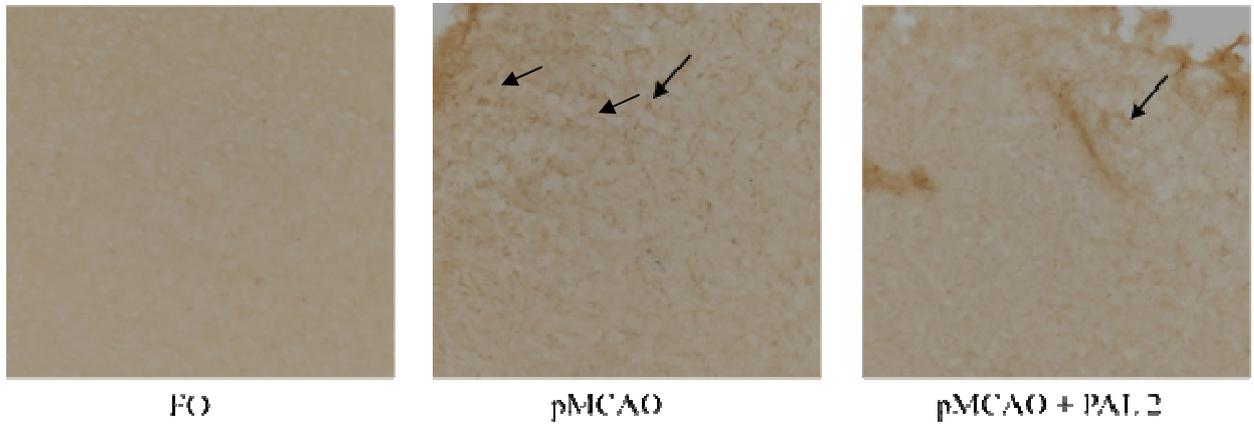
Os animais foram isquemiados por pMCAO, foram tratados com a palmatina 2mg/kg 2 horas depois, e a imunoreatividade foi avaliada 24 horas após a pMCAO. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.  $p < 0,05$ , <sup>a</sup>vs FO, n=4. ANOVA, seguida do teste Bonferroni.



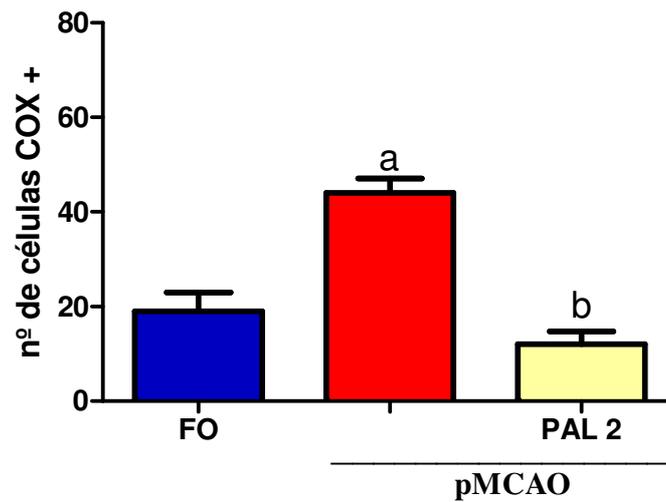


Figura 32. A Palmatina diminuiu a expressão de COX-2 no córtex de camundongos 96 horas após a pMCAO.

A.



B.



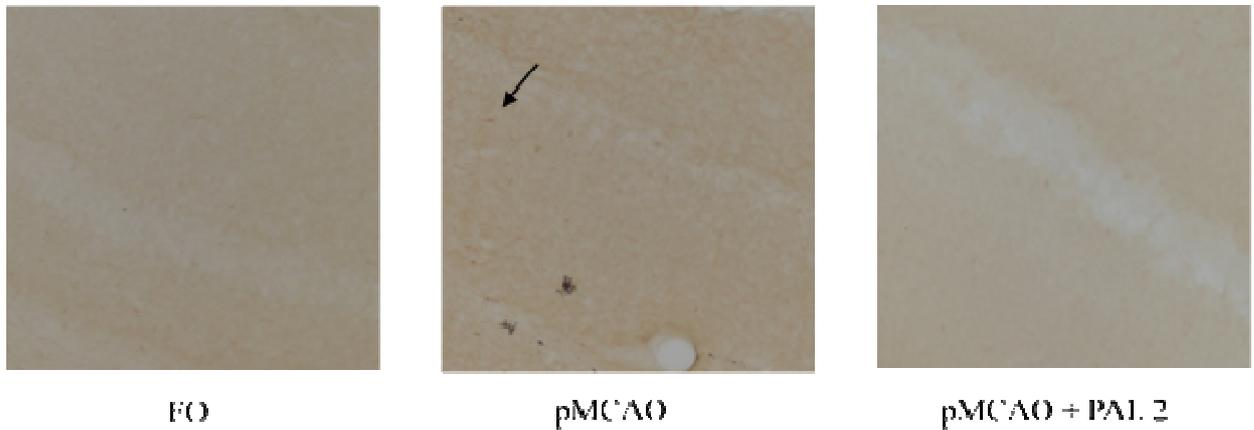
A. Microfotografias (aumento de 100x) representativas da imunomarcção para COX-2 em secções coronais do córtex 96 horas após a cirurgia. As setas indicam células COX-2 positivas. B. Número de células COX-2 positivas no córtex de camundongos 96 horas após a pMCAO.

Os animais foram isquemiados por pMCAO, foram tratados com a palmatina 2mg/kg após 2, 24, 48 e 72 horas depois, e a imunoreatividade foi avaliada 96 horas após a pMCAO. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.  $p < 0,05$ , <sup>a</sup>vs FO, <sup>b</sup>vs pMCAO,  $n=4$ . ANOVA, seguida do teste Bonferroni.

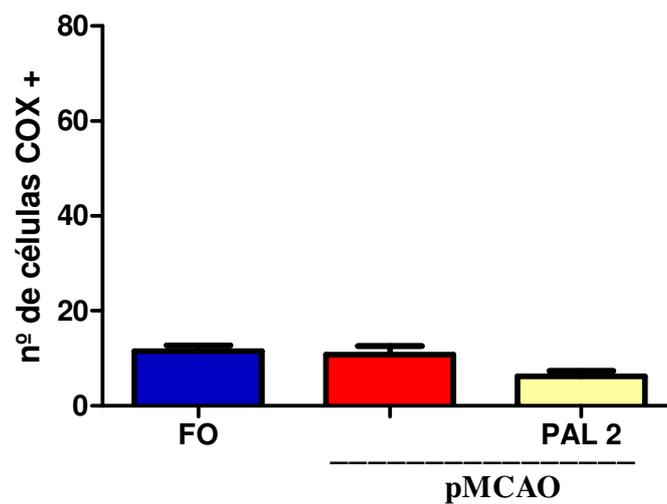


Figura 34. A Palmatina não altera a expressão de COX-2 no hipocampo de camundongos 96 horas após a pMCAO.

A.



B.



A. Microfotografias (aumento de 100x) representativas da imunomarcção para COX-2 em secções coronais do hipocampo 96 horas após a cirurgia. A seta indica uma célula COX-2 positiva. B. Número de células COX-2 positivas no hipocampo de animais 96 horas após a pMCAO

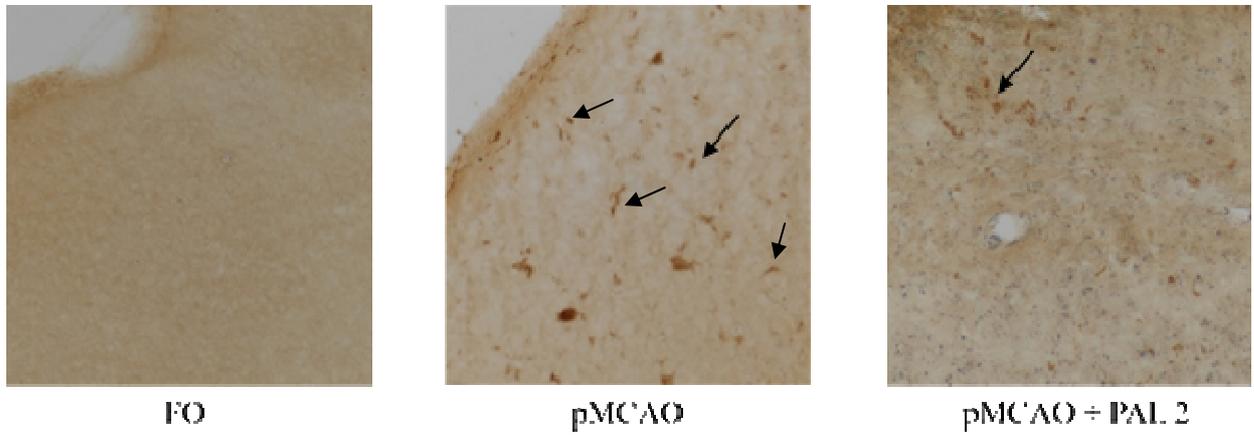
Os animais foram isquemiados por pMCAO, foram tratados com a palmatina 2mg/kg após 2, 24, 48 e 72 horas depois, e a imunoreatividade foi avaliada 96 horas após a pMCAO. Os valores representam a média  $\pm$  EPM, n=4. ANOVA, seguida do teste Bonferroni.

#### **4.10 Efeito da Palmatina sobre a expressão de TNF- $\alpha$ no córtex, estriado e hipocampo de camundongos submetidos à pMCAO.**

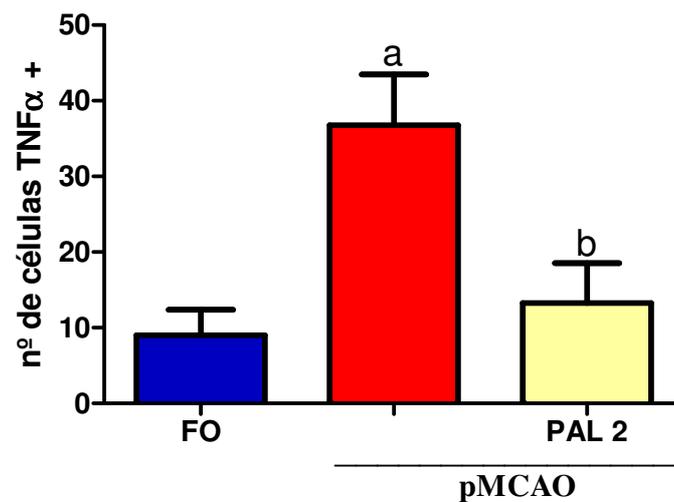
A imunomarcção para TNF- $\alpha$  foi realizada 24 horas após a indução da isquemia cerebral, e foi observado um aumento significativo no número de células TNF- $\alpha$  positivas, quando comparados aos animais falso-operados, tanto no córtex (Figura 35) quanto no estriado (Figura 36) e hipocampo dos animais (Figura 37) (cél. TNF- $\alpha$  positivas Córtex: FO:  $9\pm 3,41$ ; pMCAO:  $36,75\pm 6,71$ ; Estriado: FO:  $4,5\pm 2,53$ ; pMCAO:  $40\pm 1,81$ ; Hipocampo: FO:  $4,75\pm 1,32$ ; pMCAO:  $25,33\pm 1,45$ ). O tratamento com a Palmatina na dose 2 mg/kg diminuiu significativamente o número de células TNF- $\alpha$  positivas no córtex, no estriado e no hipocampo (cél. TNF- $\alpha$  positivas - córtex: pMCAO+PAL 2:  $13,25\pm 5,29$ ; Estriado: pMCAO+PAL 2:  $7,5\pm 3,40$ ; Hipocampo: pMCAO+PAL 2:  $12,25\pm 3,22$ ).

Figura 35. A Palmatina diminuiu expressão de TNF- $\alpha$  no córtex de camundongos 24 horas após a pMCAO.

A.



B.

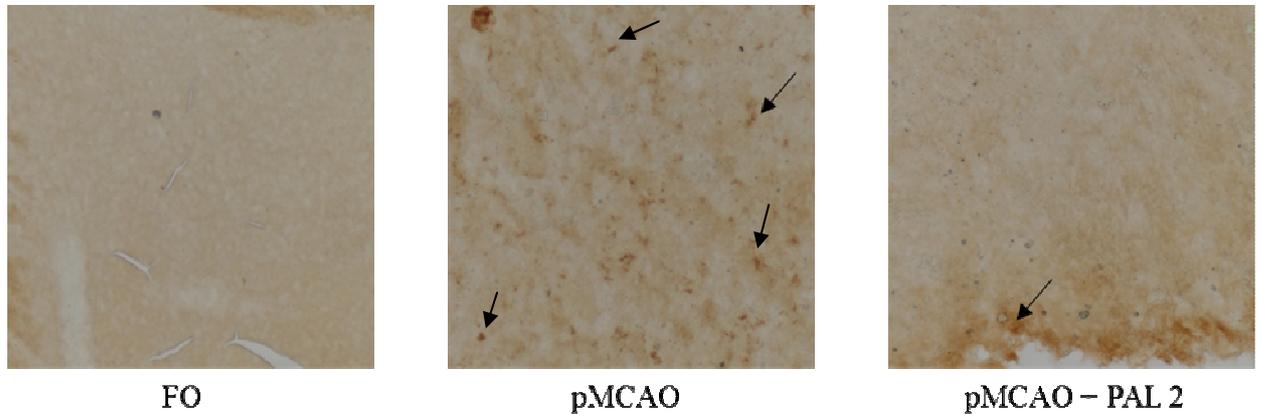


A. Microfotografias (aumento de 100x) representativas da imunomarcção para TNF- $\alpha$  em secções coronais do córtex 24 horas após a cirurgia. As setas indicam células TNF- $\alpha$  positivas. B. Número de células TNF- $\alpha$  positivas no córtex de camundongos 24 horas após a pMCAO.

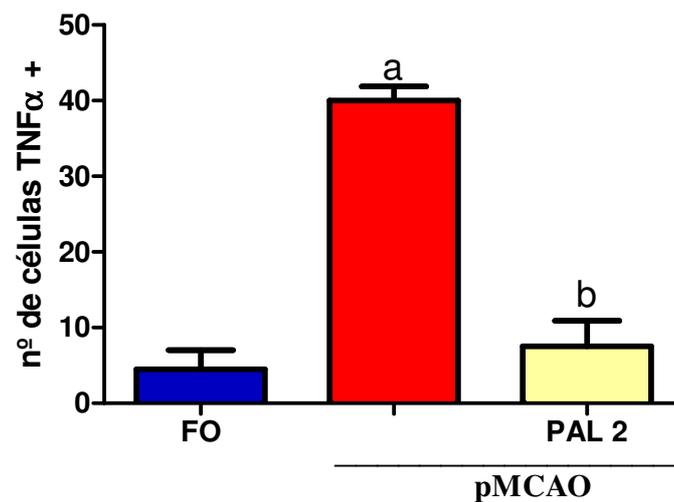
Os animais foram isquemiados por pMCAO, foram tratados com a palmatina 2mg/kg 2 horas depois, e a imunoreatividade foi avaliada 24 horas após a pMCAO. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.  $p < 0,05$ , <sup>a</sup>vs FO, <sup>b</sup>vs pMCAO, n=4. ANOVA, seguida do teste Bonferroni.

Figura 36. A Palmatina diminui a expressão de TNF- $\alpha$  no estriado de camundongos 24 horas após a pMCAO.

A.



B.

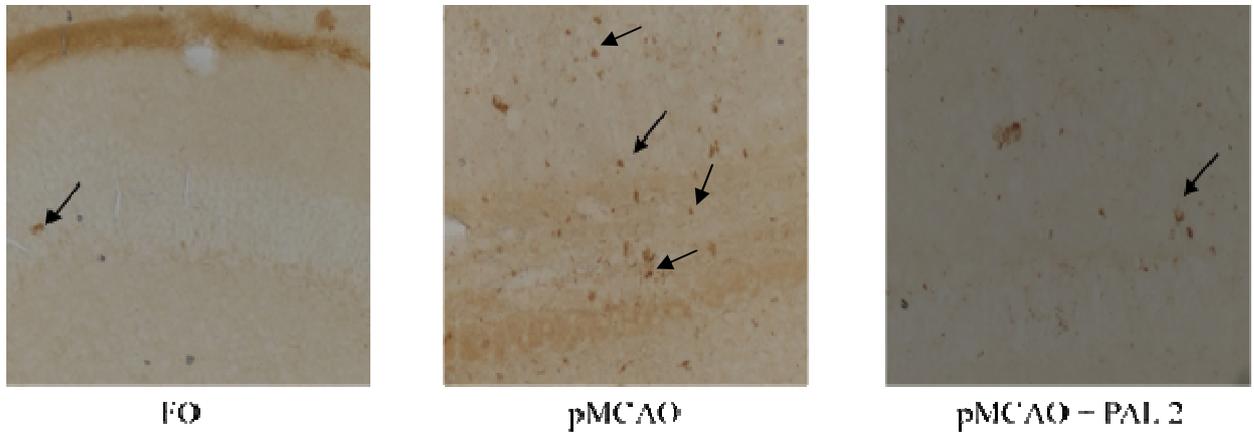


A. Microfotografias (aumento de 100x) representativas da imunomarcção para TNF- $\alpha$  em secções coronais do estriado 24 horas após a cirurgia. As setas indicam células TNF- $\alpha$  positivas. B. Número de células TNF- $\alpha$  positivas no estriado de camundongos 24 horas após a pMCAO

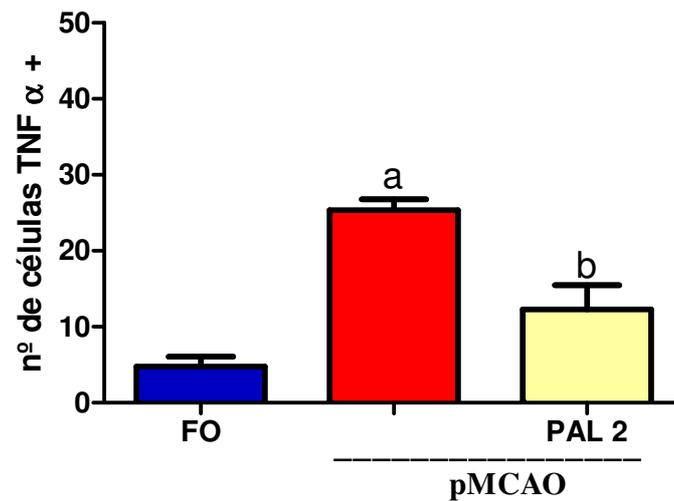
Os animais foram isquemiados por pMCAO, foram tratados com a palmatina 2mg/kg 2 horas depois, e a imunoreatividade foi avaliada 24 horas após a pMCAO. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.  $p < 0,05$ , <sup>a</sup>vs FO, <sup>b</sup>vs pMCAO, n=4. ANOVA, seguida do teste Bonferroni.

Figura 37. A Palmatina diminui a expressão de TNF- $\alpha$  no hipocampo de camundongos 24 horas após a pMCAO.

A.



B.



A. Microfotografias (aumento de 100x) representativas da imunomarcção para TNF- $\alpha$  em secções coronais do hipocampo 24 horas após a cirurgia. As setas indicam células TNF- $\alpha$  positivas. B. Número de células TNF- $\alpha$  positivas no hipocampo de camundongos 24 horas após a pMCAO

Os animais foram isquemiados por pMCAO, foram tratados com a palmatina 2mg/kg 2 horas depois, e a imunoreatividade foi avaliada 24 horas após a pMCAO. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.  $p < 0,05$ , <sup>a</sup>vs FO, <sup>b</sup>vs pMCAO, n=4. ANOVA, seguida do teste Bonferroni.

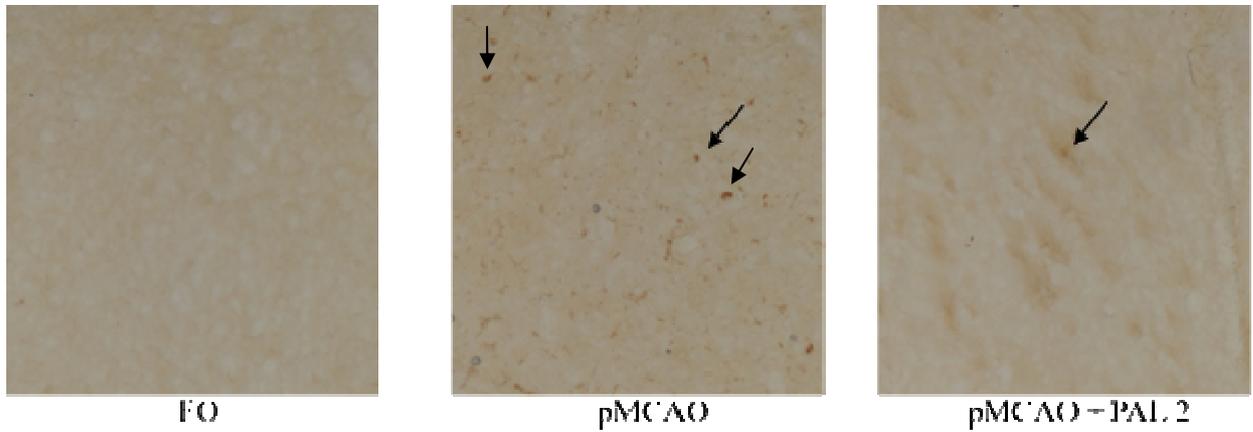
#### **4.11 Efeito da Palmatina sobre a expressão de IL-1 $\beta$ no córtex, estriado e hipocampo de camundongos submetidos à pMCAO.**

A imunomarcção para IL-1 $\beta$  foi realizada 24 horas após a indução da isquemia cerebral, e foi observado um aumento significativo no número de células IL-1 $\beta$  positivas, quando comparados com os animais falso-operados, tanto no córtex (Figura 38) quanto no estriado dos animais (Figura 39), no hipocampo este aumento não foi significativo (Figura 40) (cél. IL-1 $\beta$  positivas - Córtex: FO: 1,75 $\pm$ 0,25; pMCAO: 13 $\pm$ 3,61; Estriado: FO: 1 $\pm$ 0; pMCAO: 28,75 $\pm$ 8,37; Hipocampo: FO: 4,5 $\pm$ 2,28; pMCAO: 19,75 $\pm$ 12,05). O tratamento com a Palmatina na dose 2 mg/kg diminuiu significativamente o número de células IL-1 $\beta$  positivas no córtex e no estriado (cél. IL-1 $\beta$  positivas - córtex: pMCAO+PAL 2: 4,75 $\pm$ 1,10; Estriado: pMCAO+PAL 2: 7,25 $\pm$ 2,28; Hipocampo: pMCAO+PAL 2: 3,25  $\pm$ 0,25).

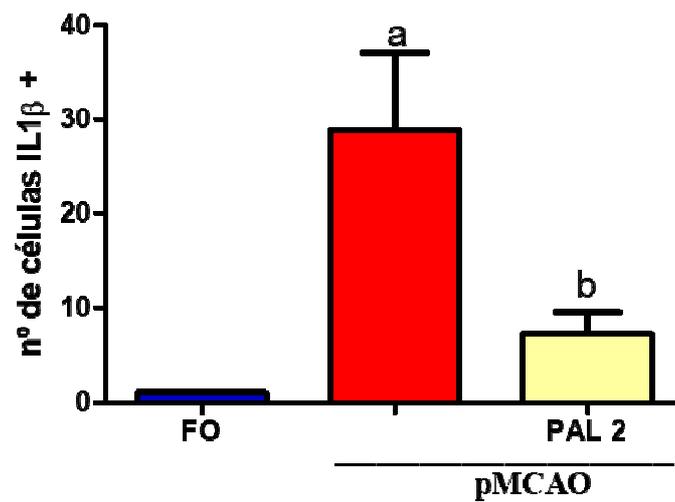


Figura 39. A Palmatina diminui a expressão de IL-1 $\beta$  no estriado de camundongos 24 horas após a pMCAO.

A.



B.

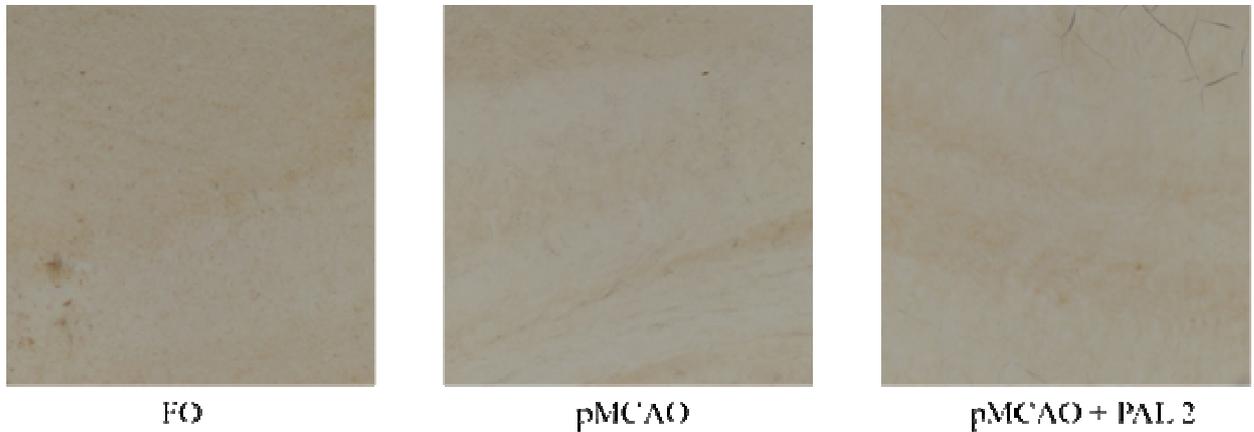


A. Microfotografias (aumento de 100x) representativas da imunomarcação para IL-1 $\beta$  em secções coronais do estriado 24 horas após a cirurgia. As setas indicam células IL-1 $\beta$  positivas. B. Número de células IL-1 $\beta$  positivas no estriado de camundongos 24 horas após a pMCAO.

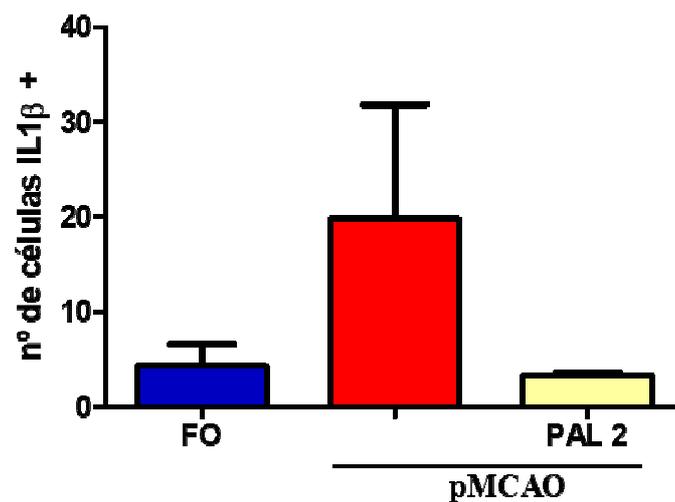
Os animais foram isquemiados por pMCAO, foram tratado com a palmatina 2mg/kg 2 horas depois, e a imunoreatividade foi avaliada 24 horas após a pMCAO. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.  $p < 0,05$ , <sup>a</sup>vs FO, <sup>b</sup>vs pMCAO, n=4. ANOVA, seguida do teste Bonferroni.

Figura 40. A Palmatina não altera expressão de IL-1 $\beta$  no hipocampo de camundongos 24 horas após a pMCAO.

A.



B.



A. Microfotografias (aumento de 100x) representativas da imunomarcção para IL-1 $\beta$  em secções coronais do hipocampo 24 horas após a cirurgia. B. Número de células IL-1 $\beta$  positivas no hipocampo de camundongos 24 horas após a pMCAO.

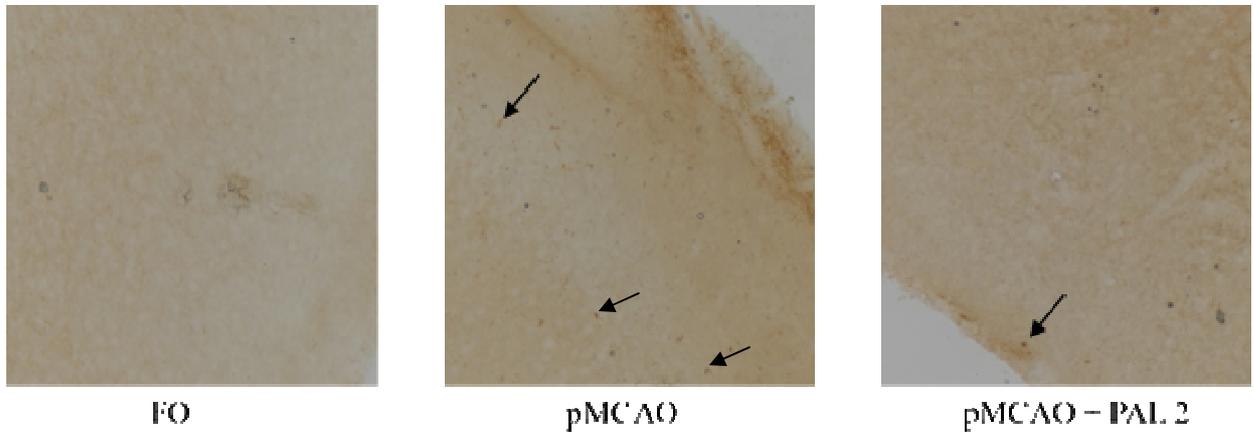
Os animais foram isquemiados por pMCAO, foram tratado com a palmatina 2mg/kg 2 horas depois, e a imunoreatividade foi avaliada 24 horas após a pMCAO. Os valores representam a média  $\pm$  EPM, n=4. ANOVA, seguida do teste Bonferroni.

#### **4.12 Efeito da Palmatina sobre a expressão de NF- $\kappa$ B no córtex, estriado e hipocampo de camundongos submetidos à pMCAO.**

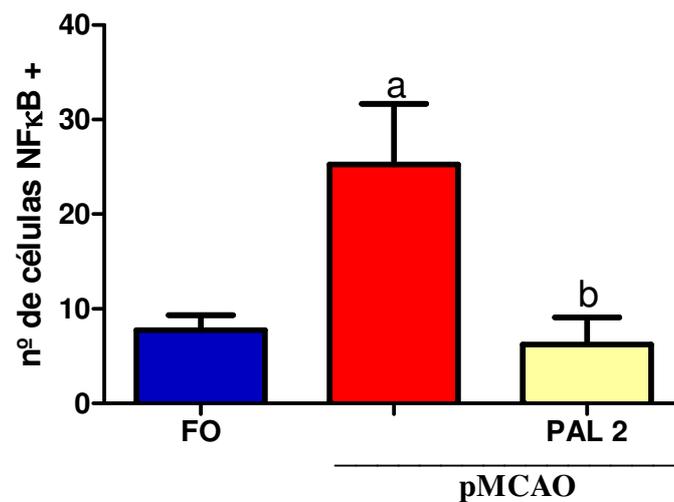
A imunomarcção para NF- $\kappa$ B foi realizada 24 horas após a indução da isquemia cerebral, e foi observado um aumento significativo no número de células NF- $\kappa$ B positivas, quando comparados aos animais falso-operados, tanto no córtex (Figura 41) quanto no estriado (Figura 42), no hipocampo não foi significativo (Figura 43) (cél. NF- $\kappa$ B positivas - Córtex: FO:  $7,75 \pm 1,60$ ; pMCAO:  $25,25 \pm 6,42$ ; Estriado: FO:  $8,5 \pm 2,10$ ; pMCAO:  $25,75 \pm 1,31$ ; Hipocampo: FO:  $3,25 \pm 0,75$ ; pMCAO:  $15,5 \pm 5,66$ ). O tratamento com a Palmatina na dose 2 mg/kg diminuiu significativamente o número de células NF- $\kappa$ B positivas no córtex e no estriado (cél. NF- $\kappa$ B positivas - córtex: pMCAO+PAL 2:  $6,25 \pm 2,86$ ; Estriado: pMCAO+PAL 2:  $10,25 \pm 2,83$ ; Hipocampo: pMCAO+PAL 2:  $3,5 \pm 0,5$ ).

Figura 41. A Palmatina diminuiu a expressão de NF- $\kappa$ B no córtex de camundongos 24 horas após a pMCAO.

A.



B.



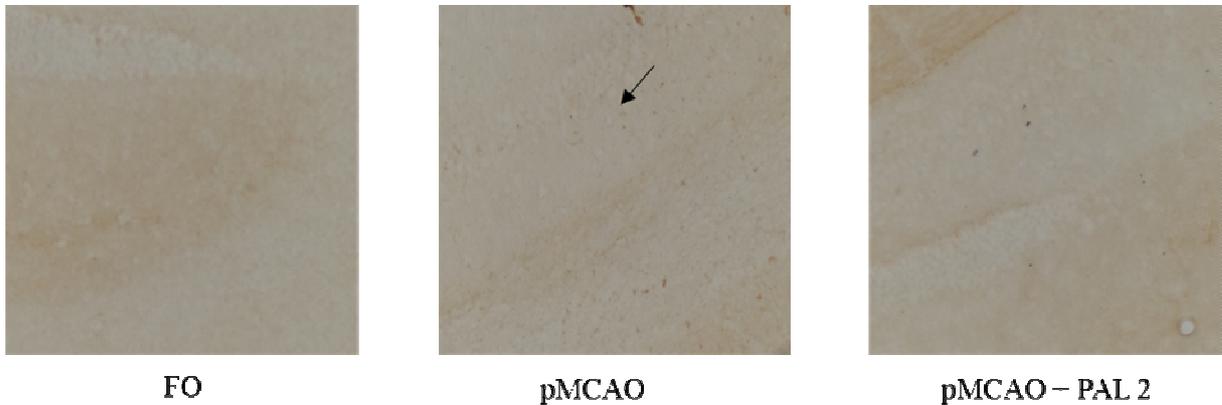
A. Microfotografias (aumento de 100x) representativas da imunomarcção para NF- $\kappa$ B em secções coronais do córtex 24 horas após a cirurgia. As setas indicam células NF- $\kappa$ B positivas. B. Número de células NF- $\kappa$ B positivas no córtex de camundongos 24 horas após a pMCAO

Os animais foram isquemiados por pMCAO, foram tratado com a palmatina 2mg/kg 2 horas depois, e a imunoreatividade foi avaliada 24 horas após a pMCAO. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.  $p < 0,05$ , <sup>a</sup>vs FO, <sup>b</sup>vs pMCAO, , n=4. ANOVA, seguida do teste Bonferroni.

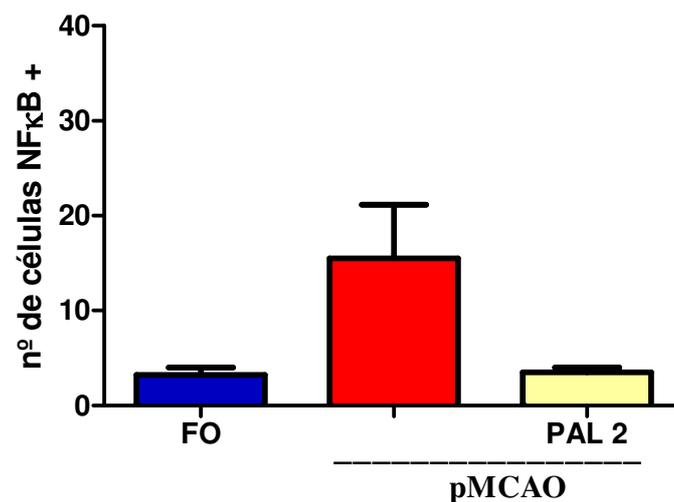


Figura 43. A Palmatina não altera a expressão de NF- $\kappa$ B no hipocampo de camundongos 24 horas após a pMCAO.

A.



B.



A. Microfotografias (aumento de 100x) representativas da imunomarcção para NF- $\kappa$ B em secções coronais do hipocampo 24 horas após a cirurgia. As setas indicam células NF- $\kappa$ B positivas. B. Número de células NF- $\kappa$ B positivas no hipocampo de camundongos 24 horas após a pMCAO

Os animais foram isquemiados por pMCAO, foram tratado com a palmatina 2mg/kg 2 horas depois, e a imunoreatividade foi avaliada 24 horas após a pMCAO. Os valores representam a média  $\pm$  EPM, n=4. ANOVA, seguida do teste Bonferroni.

#### **4.13 Efeito da Palmatina sobre o estresse oxidativo avaliada através da expressão de SOD-2 no córtex, estriado e hipocampo de camundongos submetidos à pMCAO.**

A imunomarcção para superóxido desmutase 2 (SOD-2) foi realizada 24 horas após a indução da isquemia cerebral, e foi observado que não houve diferença estatística entre os grupos FO, pMCAO e pMCAO tratados com a palmatina em nenhuma área testada (cél. SOD2 positivas: Córtex: FO:  $63,00 \pm 6,97$ ; pMCAO:  $47,25 \pm 3,22$ ; pMCAO+PAL 2:  $49,50 \pm 2,72$ ; Estriado: FO:  $57,50 \pm 8,74$ ; pMCAO:  $50,25 \pm 5,48$ ; pMCAO+PAL 2:  $49,00 \pm 2,67$ ; Hipocampo: FO:  $57,00 \pm 10,50$ ; pMCAO:  $36,50 \pm 6,11$ ; pMCAO+PAL 2:  $39,50 \pm 3,86$ ) (Figura 44, 45 e 46).



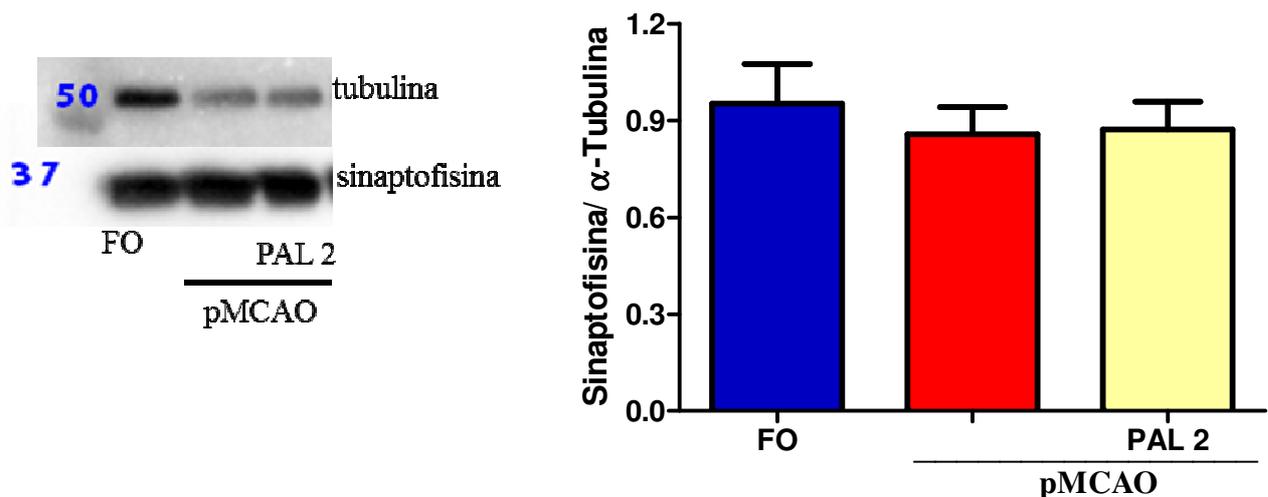




#### 4.14 Efeito da Palmatina sobre a expressão de sinaptofisina no córtex e estriado de camundongos submetidos à pMCAO.

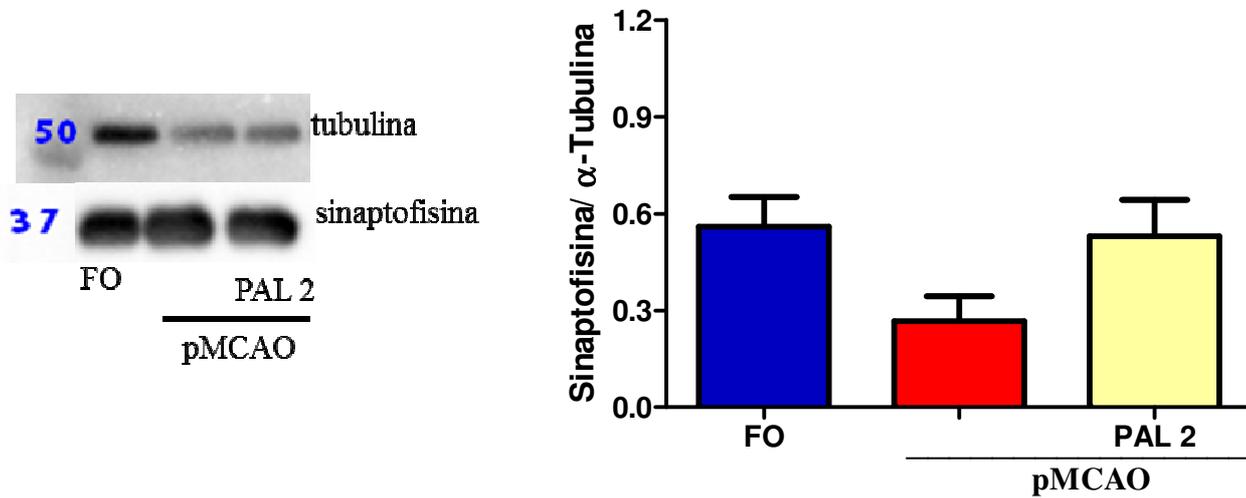
A expressão de sinaptofisina foi avaliada 96 horas após a indução da pMCAO e não foram observadas alterações significativas no córtex dos animais quanto a expressão de sinaptofisina (sinaptofisina/ $\alpha$ -tubulina: FO:  $0,95\pm 0,12$ ; pMCAO:  $0,85\pm 0,08$ ; pMCAO +PAL2:  $0,87\pm 0,08$ ). Apesar de observamos uma diminuição da expressão de sinaptofisina no estriado nos animais isquemiados esta não foi significativamente diferente dos animais falso operados (sinaptofisina/ $\alpha$ -tubulina: FO:  $0,56\pm 0,09$ ; pMCAO:  $0,26\pm 0,07$ ; pMCAO +PAL2:  $0,53\pm 0,11$ ) (Figura 47 e 48).

Figura 47. A palmatina não altera a expressão de sinaptofisina no córtex de camundongos 96 horas após a pMCAO



Os animais foram isquemiados por pMCAO, foram tratados com a palmatina 2mg/kg 2, 24, 48 e 72 horas depois, e após 96 horas suas áreas foram retiradas para a realização do Western Blot. Valores expressos em média  $\pm$  EPM, n=4. ANOVA, seguida do teste Tukey.

Figura 48. A Palmatina não altera a expressão de sinaptofisina no estriado de camundongos 96 horas após à pMCAO



Os animais foram isquemiados por pMCAO, foram tratados com a palmatina 2mg/kg 2, 24, 48 e 72 horas depois, e após 96 horas suas áreas foram retiradas para a realização do Western Blot. Valores expressos em média  $\pm$  EPM, n=4. ANOVA, seguida do teste Tukey.

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a palmatina reduziu significativamente os déficits neurológicos, melhorou a memória de trabalho e apresentou efeito anti-inflamatório por diminuir a resposta inflamatória e a ativação glial, esses resultados sugerem o efeito benéfico da palmatina na isquemia cerebral.

No nosso trabalho a palmatina foi administrada 2 horas após a isquemia, por via oral, sendo estudado seu efeito na memória, inflamação, estresse oxidativo e sinaptogênese. Inicialmente, foram testadas três doses diferentes de palmatina, sendo 0,2, 2 e 20 mg/kg, sobre o tamanho da área de infarto isquêmico, as alterações neurológicas e alterações de memória induzidas pela isquemia cerebral focal permanente em camundongos. Os resultados nos mostraram que tanto a dose de 2 mg/kg como a dose de 20 mg/kg diminuíram a área de infarto, diminuíram os déficits neurológico e na memória de trabalho. Assim, como não houve diferença entre o efeito das duas doses, a dose de 2 mg/kg foi escolhida para o estudo do mecanismo de ação neuroprotetora. Estudos anteriores já demonstraram o efeito de doses baixas de palmatina, como o realizado por Dhingra e Kumar (2012) que utilizou doses de 0,1 e 1 mg/kg de palmatina, por 10 dias, frente aos déficits de memória induzidos pela escopolamina, onde a dose de 1mg/kg reverteu os déficits de memória em animais e o realizado por Dhingra e Bhankher (2014) que demonstrou que a palmatina nas doses 0,5 e 1 mg/kg apresentou atividade antidepressiva em camundongos.

Nesse estudo a administração da palmatina demonstrou efetividade duas horas depois da isquemia, estudos já relataram que a administração de alcaloides presentes na decocção de quatro plantas da medicina tradicional chinesa, Huang-Lian-Jie-Du (*Coptis chinensis* Franch, *Scutellaria baicalensis* Georgi, *Phellodendron chinense* C. K.Schneid, *Gardenia jasminoides* Ellis), administrados 2 horas depois da oclusão permanente da artéria cerebral média apresentaram efeito protetor, dentre esses alcaloides encontra-se a palmatina e berberina (ZOU *et al.*, 2016). Zhu e colaboradores (2012) verificaram em um estudo de farmacocinética o perfil plasmático em relação ao tempo dos principais componentes ativos da decocção da Huang-Lian-Jie-Du-Tang (*Radix scutellariae*, *Rhizoma coptidis*, *Cortex phellodendri*, *Fructus gardênia*), um conjunto de plantas da medicina tradicional chinesa, após a administração oral em ratos submetidos à oclusão da artéria cerebral média e seus resultados indicaram que a palmatina está rapidamente disponível no plasma. Outro estudo realizado por esses mesmos pesquisadores com as mesmas plantas demonstrou que após a administração oral da decocção, também em animais isquemiados, a palmatina distribui-se rapidamente e se acumula em níveis elevados no pulmão (ZHU *et al.*, 2013).

No acidente vascular cerebral a inflamação, o estresse oxidativo e a apoptose desempenham um papel importante na patogênese isquêmica cerebral (QIAO *et al.*, 2012). Poucos minutos após o início da isquemia ocorre uma resposta citotóxica que envolve estresse oxidativo, resposta inflamatória, morte celular e lesão neurológica (JI *et al.*, 2012a; LIU *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2009). Logo, a inibição das respostas inflamatórias no estágio inicial da isquemia proporciona uma estratégia terapêutica atrativa, pois apesar dos avanços consideráveis na compreensão da fisiopatologia da isquemia cerebral, as opções terapêuticas para o AVC agudo são, ainda, limitadas (QIAO *et al.*, 2012). Kim e colaboradores (2009) demonstraram que a palmatina reduziu os danos causados pela isquemia/reperfusão do miocárdio em ratos, e isso pode estar relacionado ao seu efeito antioxidante e modulação dos mediadores inflamatórios, apresentando, assim, efeito protetor.

As áreas cerebrais atingidas na isquemia cerebral focal permanente são, principalmente, córtex, estriado e hipocampo, que são áreas relacionadas com a cognição, sendo então, importante se pesquisar opções terapêuticas que melhorem os déficits de memória ocasionados pela isquemia (GU *et al.*, 2010). Estudo anterior sugeriu que a palmatina melhora a memória de animais que tiveram sua memória comprometida pela administração de escopolamina (DHINGRA; KUMAR, 2012).

Inicialmente a avaliação neurológica foi realizada com a finalidade de mimetizar em animais com isquemia os sinais e sintomas neurológicos clínicos apresentados por pacientes após o AVC isquêmico. Nossos resultados mostraram que os animais isquemiados apresentaram déficits neurológicos, quando avaliado 24 horas após a isquemia, outros estudos já demonstraram que o modelo de pMCAO provoca alterações sensório-motoras em animais quando avaliada pela escala de Garcia, por apresentarem um desempenho motor reduzido e uma diminuição da capacidade de responder a estímulos no lado do corpo contralateral a isquemia quando comparados aos animais falso-operados (FERNANDES *et al.*, 2014; FONTELES *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2016). O infarto no córtex cerebral, como foi observado no presente estudo, causa déficits na função neurológica de animais, por ser responsável pela simetria motora e estabilidade postural, embora já se saiba que alguns dias após a isquemia os animais apresentam grande melhora da função neurológica, indicando que essa função pode ser restaurada naturalmente, mas é possível visualizar esse déficit 24 horas após a indução da pMCAO (LI *et al.*, 2008).

Neste trabalho o tratamento com a palmatina foi capaz de reverter os déficits neurológicos induzidos pela pMCAO em todas as doses testadas. Trabalho realizado por Zou e colaboradores (2016) testou três grupos de componentes ativos (alcaloides, flavonoides e

iridoides) extraídos por decocção da combinação de quatro plantas da medicina tradicional chinesa Huang-Lian-Jie-Du (*Coptis chinensis* Franch, *Scutellaria baicalensis* Georgi, *Phellodendron chinense* C. K. Schneid, *Gardenia jasminoides* Ellis). O grupo dos alcaloides correspondia ao total de 48,5% do extrato da planta e era composto pelos alcaloides coptisina, epiberberina, berberina e palmatina, e o resultado apontou que os alcaloides foram capazes de diminuir os déficits neurológicos e isso pode se dever ao fato dos alcaloides fortalecerem a neurogênese cortical, o que pode ajudar a promover a restauração de regiões cerebrais danificadas pela isquemia e a subsequente melhora da função neurológica. Neves (2012) demonstrou que a berberina diminuiu os déficits sensório-motores induzidos pela pMCAO, 24 horas após a cirurgia. Esses resultados apontam que alcaloides protoberberínicos são capazes de melhorar os déficits neurológicos causados pela pMCAO, corroborando com nossos resultados.

Avaliamos a capacidade de a palmatina diminuir o tamanho da área isquêmica cerebral, verificado através da quantificação pelo TTC. No presente trabalho a análise do tamanho da área de infarto foi realizada 24 horas após a indução da isquemia e os resultados demonstraram que o grupo dos animais submetidos à pMCAO tiveram uma grande percentagem de área de dano isquêmico, em torno de 12%, e as áreas de infarto estavam localizadas no córtex, estriado e hipocampo ipsilateral a cirurgia. Estudos já comprovaram que o volume da área de infarto cerebral do tipo isquêmico atinge um pico máximo 24 horas após a indução da isquemia cerebral focal permanente (TU *et al.*, 2010) e outros trabalhos realizados por nosso grupo também já demonstraram que ocorre um grande aumento no percentual de área isquêmica, cerca de 8% e 12%, e que as áreas atingidas foram córtex, estriado e hipocampo corroborando com nossos achados (FERREIRA *et al.*, 2016; DE LIMA *et al.*, 2017).

O tratamento com a palmatina nas doses de 2 e 20 mg/kg foi capaz de diminuir a área isquêmica. Um estudo realizado por Neves (2012) demonstrou que a berberina, um alcaloide protoberberínico da mesma classe da palmatina e extraído de plantas como *Coptidis rhizoma*, diminui o percentual de área isquêmica em um modelo de isquemia focal permanente. Maleki, Aboutaleb e Souri (2017) demonstraram que a berberina diminuiu a área isquêmica e também os déficits neurológicos em um modelo de isquemia cerebral transitória e esses efeitos ocorreram por sua atividade antiinflamatória, pois diminuiu citocinas pro-inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . No trabalho realizado por Zhang e colaboradores (2012) foi evidenciado que a berberina diminui a área isquêmica imediatamente após a indução do modelo de isquemia focal permanente e observou que a berberina diminuiu o

comprometimento neuronal e a lesão cerebral nesse modelo e esses efeitos podem ocorrer pela ativação da via AKT/GSK, uma via essencialmente antiapoptótica, sendo relevante na regulação da sobrevivência celular. Kim e colaboradores (2009) comprovaram que a palmatina reduziu a área de infarto do miocárdio causada por isquemia e reperfusão, e esse efeito protetor ocorreu por sua ação antioxidante e anti-inflamatória. Esses estudos mostram que alcaloides protoberberínicos diminuem a lesão tecidual e essa diminuição se deve a seus efeitos antiapoptóticos e anti-inflamatórios.

A oclusão da artéria cerebral média leva a um infarto focal na região cortical e se estende ao estriado lateral. Esse infarto cortico-estriatal é conhecido por estar envolvido nos déficits de memória e motores (MENNITI *et al.*, 2009; WATTANATHORN *et al.*, 2011).

A atividade locomotora dos animais foi avaliada 72 horas após a indução da pMCAO, e os resultados encontrados demonstraram que os animais submetidos a isquemia não apresentaram déficit locomotor, pois não foi observado comprometimento significativo na exploração horizontal (*crossing*) e nem de exploração vertical (*rearings*). Outros trabalhos realizados por nosso grupo demonstraram que a isquemia não promoveu alterações na atividade locomotora, na exploração vertical (FERNANDES *et al.*, 2014; SILVA, 2016) e nem na horizontal (FONTELES *et al.*, 2016), corroborando com nosso resultado. Deste modo os testes de memória que foram realizados posteriormente não foram comprometidos já que dependiam de uma atividade motora não comprometida (HATTORI *et al.*, 2000). A palmatina não provocou alterações significativas na atividade locomotora vertical e horizontal em nenhuma dose testada.

No estudo realizado por Dhingra e Kumar (2012) para analisar o efeito da palmatina (0,1, 0,5 e 1 mg/kg, i.p) sobre a memória de camundongos foi observado que a palmatina não apresentou efeito significativo na atividade locomotora dos camundongos, confirmando os nossos resultados.

Visando analisar o efeito da palmatina na memória dos animais isquemiados, dois testes de memória foram utilizados em nosso trabalho, labirinto em Y (Y-maze), que avalia a memória de trabalho, e o teste da esQUIVA passiva, que avalia a memória aversiva.

Estudos têm demonstrado que o modelo de isquemia cerebral focal permanente leva a déficits na memória de trabalho (FERNANDES *et al.*, 2014; FONTELES *et al.*, 2016). As áreas envolvidas nesse tipo de memória são o córtex e o hipocampo, e são vulneráveis aos danos causados pela isquemia. Os neurônios piramidais do córtex pré-frontal estão envolvidos no planejamento das respostas motoras e demandam do hipocampo a capacidade de organizá-las e expressá-las (FUSTER, 1999; JOHANSSON; BELINCHENKO, 2002). Neurônios pré-

frontais podem codificar informações associadas à acontecimentos de curto prazo e a componentes específicos de tarefas espaciais (JUNG *et al.*, 1998). Neste estudo foi observado um déficit de memória de trabalho 72 horas após a indução da pMCAO, corroborando com Ferreira e colaboradores (2015) e De Lima e colaboradores (2017), que também observaram déficits na memória de trabalho 72 horas após a indução da pMCAO.

A palmatina reverteu esses déficits de memória de trabalho em todas as doses testadas. Trabalho realizado por Neves (2012) demonstrou que a berberina administrada 2 hora antes da cirurgia preveniu contra déficits de memória de trabalho no teste de labirinto em Y nos animais isquemiados, demonstrando que alcaloides protoberberínicos, como a palmatina, melhoram os déficits na memória de trabalho ocasionados pela pMCAO.

Uma das formas de avaliar a função cognitiva em modelos experimentais é através do teste da esquiwa passiva, que avalia déficits de memória aversiva (DEVRIES *et al.*, 2001). A esquiwa passiva utilizada em nosso trabalho foi a do tipo “step-down”, que significa “descer um degrau”, e é baseada no comportamento natural que os animais têm de explorar além da plataforma, mas também de evitar o choque causado pela grade, o que pode ser chamado de memória aversiva (IZQUIERDO, MEDINA, 1997). Neste estudo, os animais isquemiados apresentaram déficit de memória aversiva quando comparados aos animais falso-operados, corroborando com outros trabalhos que também demonstraram que o modelo da pMCAO induz déficits no aprendizado e na retenção da memória aversiva dos animais isquemiados, avaliados 72 e 96 horas após a isquemia, respectivamente (FONTELES *et al.*, 2016; DE LIMA *et al.*, 2017). O nosso trabalho demonstrou que a palmatina foi capaz de melhorar o dano na retenção da memória aversiva tardia, mas não na avaliação da memória recente, aprendizagem. Neves (2012) mostrou que a berberina preveniu os déficits na retenção da memória aversiva, também 96 horas após a pMCAO, na tarefa da esquiwa passiva, isso nos mostra que alcaloides protoberberínicos melhoram o dano na retenção da memória causado pela pMCAO.

O hipocampo é considerado o centro do processo de memória (WAHL *et al.*, 1992), os neurônios colinérgicos que inervam o córtex cerebral, amígdala e o hipocampo são essenciais para a aprendizagem e formação da memória. A memória de trabalho não está centrada apenas em uma região cerebral, abrange interações funcionais entre o córtex pré-frontal e outras regiões, como o hipocampo (BADDELEY *et al.*, 1986). Déficits na transmissão colinérgica dessas regiões provocam déficits cognitivos interferindo na memória de trabalho. Estudo realizado por Croxson, Kyriazis e Baxyer (2011), utilizando macacos *Rhesus* com depleção colinérgica induzida por uma imunotoxina seletiva no córtex pré-

frontal, demonstrou que ocorreu um atraso na resposta relacionada à memória de trabalho espacial nesses animais, concluindo que a acetilcolina cortical pré-frontal tem papel fundamental na memória de trabalho, mesmo que essa não seja necessária para outras atividades cognitivas mediadas pelo córtex pré-frontal.

Plantas utilizadas pela medicina tradicional chinesa, como a *Coptidis Rhizoma* (Huanglian) e a *Corydalis Rhizoma* (Yanhusuo), que apresentam como componentes a berberina e a palmatina, são usadas de forma segura para melhorar memória (XIAO *et al.*, 2011), devido à inibição da acetilcolinesterase. Estudos já demonstraram que a palmatina e a berberina reduzem a atividade dessa enzima (MAK *et al.*, 2014; DHINGRA; KUMAR, 2012). Qu e colaboradores (2017) demonstraram que a tetrahidropalmatina, um alcaloide protoberberínico cuja diferença para a palmatina se encontra em duas ligações duplas em um dos anéis heterocíclicos, melhorou a memória de ratos tratados com D-galactose, substância que leva a déficits de memória causados pela senescência e mimetiza a Doença de Alzheimer em animais. O estudo realizado por esses autores atribui a melhora na memória dos animais à diminuição dos níveis de malondialdeído e óxido nítrico, bem como ao aumento das atividades de glutatona, SOD, e catalase e, além do aumento nos níveis de acetilcolinesterase, e por diminuir a expressão de NF- $\kappa$ B e GFAP, diminuindo a neuroinflamação. Com isso, podemos atribuir a melhora na memória dos animais tratadas com palmatina observada em nosso trabalho à inibição da atividade da acetilcolinesterase cerebral e ao aumento de acetilcolina nas áreas cerebrais afetadas pela pMCAO e, ainda, por inibir a neuroinflamação.

A resposta inflamatória após o acidente vascular cerebral ocorre minutos após o início da isquemia cerebral e contribui para as alterações patológicas que culminam no dano neuronal. Essa resposta é complexa e tem propriedades de reparar e ou lesar prejudicar o tecido, onde se pode observar por uma flutuação de mediadores inflamatórios (ZHAO *et al.*, 2014; GRUPKE *et al.*, 2015). Pesquisas tem evidenciado o efeito anti-inflamatório da palmatina, como a realizada por Yan e colaboradores (2017) que mostrou que a palmatina é capaz de inibir o efeito inflamatório causado pelo LPS em células epiteliais do endométrio de cabra, por inibir a liberação de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e o óxido nítrico (NO). Além disso, a palmatina exerceu efeito protetor sobre o dano causado por isquemia/reperfusão no coração por inibir a inflamação (KIM *et al.*, 2009). Essas observações levantam a possibilidade de que a palmatina pode exercer efeitos protetores sobre lesões cerebrais isquêmicas por inibir a resposta inflamatória. Desta forma, avaliamos o efeito protetor da palmatina, 24 e 96 horas após a indução da pMCAO, na neuroinflamação associada à isquemia, para isso testamos a sua ação frente a células inflamatórias, como micróglia e astrócitos, e mediadores pró-

inflamatórias, como iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e NF- $\kappa$ B.

As células do parênquima cerebral ativam mecanismos auto-protetores endógenos quando ocorre algum insulto cerebral, sendo a interação entre a micróglia e os astrócitos um fator determinante para construir uma resposta fisiológica a estímulos danosos decorrentes de lesões ou estresse (ROSITO *et al.*, 2014). A micróglia e os astrócitos são células residentes, fagocíticas do sistema nervoso central e que são recrutadas após a isquemia cerebral, a glia quando ativada sintetiza e libera algumas citocinas, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , que são acumuladas e exacerbam o dano neurovascular durante a isquemia (LAI; TODD, 2006; LAMBERTSEN; BIBER; FINSEN, 2012).

A micróglia quando ativada expressa a proteína ligante de cálcio ionizada Iba-1, e essa proteína foi identificada 12 horas após a reperfusão, com um contínuo aumento desta proteína até 7 dias na área de penumbra dos animais isquemiados (ITO *et al.*, 2001). Os astrócitos são células da glia que são ativadas no processo inflamatório envolvido na isquemia, levando a expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), episódio caracterizado como astrogliose reativa (PEKNEY; NILSSON, 2005; O'CALLAGHAN; SRIRAM, 2005). Pesquisas já evidenciaram, através de imunohistoquímica, que na fase aguda pós- isquemia ocorre ativação glial pelo aumento da imunomarcacão para Iba-1 e da proliferaçã astrocitária pelo aumento da imunomarcacão do GFAP (RUAN *et al.*, 2015).

Pérez-Álvarez e colaboradores (2012) demonstraram que 54 horas após a pMCAO ocorre um aumento da microgliose e da astrogliose no córtex e hipocampo de ratos. O presente trabalho evidenciou um aumento na ativação microglial, pelo aumento da imunomarcacão para Iba-1, 96 horas após a pMCAO, tanto no córtex como no estriado dos animais. Zarruk, Greenhalgh e David (2017) demonstraram que 72 horas após a pMCAO ocorre um aumento da microgliose e um aumento na expressã de TNF- $\alpha$ , mostrando, assim, um aumento da ativação de micróglia, fato que corrobora com nosso achados. A palmatina conseguiu reverter o aumento da imunomarcacão para Iba-1 no córtex dos animais, Zhang e colaboradores (2016) mostraram que a berberina diminui a ativação microglial no córtex e hipocampo de animais com disfunção cognitiva pós-operatória, uma morbidade que ocorre após cirurgia bem comum em idosos e se caracteriza por prejuízos na memória, e evidências já mostraram que a neuroinflamação desempenha papel fundamental na sua patogênese. Chen e colaboradores (2014) observaram que a berberina diminui a ativação microglial em animais submetidos a lesão cerebral traumática. Estudos mostram que a ativação da micróglia está associada a morte neuronal, portanto inibir a microgliose atenua a morte neuronal induzida por isquemia cerebral (HWANG *et al.*, 2006; SUNG *et al.*, 2012). Estudo realizado por Kim e

colaboradores (2014) demonstrou que a berberina diminuiu a lesão isquêmica, por diminuir a microgliose e a apoptose. Esses achados nos mostram que alcaloides protoberberínicos levam a uma diminuição da ativação da micróglia.

Os resultados desse trabalho nos mostraram que ocorre um aumento da ativação de astrócitos, no córtex e estriado, nos animais isquemiados 96 horas após a pMCAO. Estudos realizadas por nosso grupo já demonstraram que a pMCAO aumenta a ativação de astrócitos, tanto no córtex como no estriado, 96 horas após a isquemia, esses trabalhos corroboram com nossos achados (FERREIRA *et al.*, 2015; DE LIMA *et al.*, 2017). A palmatina diminuiu a astrogliose no córtex e estriado dos animais isquemiados, Qu e colaboradores (2016) mostraram que a tetrahidropalmatina, inibiu a ativação de astrócito no córtex de ratos tratados com D-galactose e, assim, diminui o comprometimento na memória desses animais, por inibir estresse oxidativo. Pesquisa realizada por Moghaddam e colaboradores (2014) demonstrou que a berberina diminui a ativação de astrócito no hipocampo de animais diabéticos, onde a diabetes foi induzida pela estreptozotocina (STZ) e seu efeito protetor nesse modelo pode estar associado à diminuição do estresse oxidativo, pois os astrócitos são conhecidos por ter uma capacidade antioxidante maior que a dos neurônios, pois apresentam níveis elevados de glutathione, sendo essencial manter os níveis de glutathione na glia para a proteção do cérebro quando ocorrem insultos oxidativos (FERNANDEZ-FERNANDEZ; ALMEIDA; BOLAÑOS, 2012; DRINGEN; GUTTERER; HIRRLINGER, 2000; MOGHADDAM *et al.*, 2014). Esses trabalhos demonstram um efeito desses alcaloides, pertencentes à mesma classe da palmatina como já citado, na diminuição da ativação astrocitária.

Durante a fase aguda da isquemia cerebral células imunes, micróglia e astrócitos, e células cerebrais liberam citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e a cascata inflamatória também aumenta a atividade de várias enzimas, tais como COX-2 e iNOS. Estudo realizado por Kostulas e colaboradores (2002) avaliou o processo inflamatório envolvido na isquemia em tempos diferentes após a indução da pMCAO, os resultados mostraram que ocorre uma flutuação de citocinas, onde a IL-1 $\beta$  aparece já na primeira hora, se eleva 6 e 12 horas e diminui 24 horas após a pMCAO. Já a IL-6 aumenta na primeira hora e permanece elevada até o segundo dia após a pMCAO, não sendo mais detectada no sexto dia. Quanto ao TNF- $\alpha$ , na primeira hora depois da isquemia é detectável, se eleva 6 horas depois e atinge seu pico com 12 e 24 horas. Outra pesquisa, também utilizando o modelo de pMCAO, avaliou no córtex dos animais o envolvimento IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  em 12, 48 e 72 horas após a indução da isquemia, os resultados demonstraram que ocorre um aumento de todas as citocinas nos tempos analisados (YANG *et al.*, 2015). Diante disso, avaliamos a expressão de iNOS e a

COX-2 24 horas e 96 horas após a pMCAO, e a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e NF- $\kappa$ B 24 horas após a isquemia.

Nossos resultados mostraram que a expressão de iNOS aumentou significativamente no córtex e no estriado dos animais isquemiados apenas 24 horas após pMCAO. Tu e colaboradores (2009) demonstraram que o iNOS está aumentado nos animais isquemiados 24 horas após a isquemia. Outros autores também já demonstraram que ocorre um maior aumento na expressão de iNOS, no córtex dos animais, 24 horas após a isquemia transitória e essa expressão começa a diminuir 48 horas após a isquemia (NOGAWA *et al.*, 1998). Esses achados corroboram com nossos resultados. A palmatina diminuiu significativamente este aumento, Chao e colaboradores (2009) evidenciaram que o extrato alcoólico da planta *Mahonia oiwakensis*, uma planta que contém os alcaloides berberina e palmatina, diminuiu a expressão de iNOS em tecido de pata nas quais foram injetadas carragenina. Estudo realizado por Kim e colaboradores (2009) demonstrou que a palmatina reduziu a expressão de iNOS em tecido de lesão miocárdica aguda mediada por isquemia-reperfusão no rato. Esses achados indicam que a palmatina inibe iNOS, sugerindo que apresenta uma ação antiinflamatória. Pode-se sugerir que o efeito protetor seja em parte por essa ação.

A COX-2 é liberada por micróglia e leucócitos rapidamente em resposta à liberação maciça de glutamato que ocorre imediatamente após o evento isquêmico, posteriormente a micróglia, os astrócito e os leucócitos infiltrados participam da resposta inflamatória pós-isquêmica (BARONE; FEUERSTEIN, 1999). Foi observado um aumento no número de células COX-2 nos animais isquemiados no córtex, estriado e hipocampo. Estudo realizado por Yoo e colaboradores (2008) evidenciou que ocorreu um aumento na imunorreatividade para COX-2 no hipocampo 24 horas após a isquemia/reperfusão, o que também foi evidenciado por Colangelo e colaboradores (2004). Jiang e colaboradores (2012) demonstraram um aumento na expressão de COX-2 na zona peri-infarto nos animais isquemiados 24 horas depois da pMCAO, corroborando com nossos resultados.

A palmatina diminuiu o número de células COX-2 positivas tanto 24 como 96 horas após a pMCAO, Chao e colaboradores (2009) evidenciaram que o extrato alcoólico da planta *Mahonia oiwakensis*, que possui palmatina e berberina em sua composição, diminuiu a expressão de COX-2 em tecido de pata nas quais foram injetadas carragenina, Kim e colaboradores (2009) observaram que a palmatina reduz a expressão de COX-2 na zona isquêmica de tecido do miocárdio com isquemia/reperfusão.

O TNF- $\alpha$  é um citocina relacionada com a resposta inflamatória no AVC e que

pode agravar o dano isquêmico, sabe-se que seus níveis elevam-se rapidamente após o AVC e diminuir a expressão de TNF- $\alpha$  parece reduzir a lesão isquêmica (YANG *et al.*, 1998). No presente trabalho foi observado um aumento do número de células marcadas para TNF- $\alpha$  no córtex, estriado e hipocampo dos animais isquemiados. Chan e colaboradores (2010) avaliaram o nível de TNF- $\alpha$  no hemisfério ipsilateral a lesão isquêmica 24 horas após a indução da pMCAO e observaram um aumento de seu nível nos animais isquemiados quando comparados com os animais falso operados, corroborando com nosso estudo. De Lima e colaboradores mostrou que 120 horas após a pMCAO ainda se tem um aumento na expressão de TNF- $\alpha$  no córtex e no estriado dos animais.

A palmatina diminuiu a imunomarcção para TNF- $\alpha$  no córtex, estriado e hipocampo dos animais isquemiados, Yan e colaboradores (2017) comprovaram que a palmatina inibiu a liberação de TNF- $\alpha$  induzida por lipopolisacarídeo (LPS) em células epiteliais endometriais de cabra. Zhang e colaboradores (2013) mostraram que os extratos da *Sanhuang Xiexin Tang*, uma planta utilizada na medicina tradicional chinesa e que tem em sua composição alcaloides protoberberínicos como a palmatina, diminuíram os níveis de TNF- $\alpha$ , e isso nos mostra que plantas que contem a palmatina e que a palmatina de forma isolada diminui os níveis de TNF- $\alpha$ .

O TNF- $\alpha$  é capaz de ativar outras citocinas inflamatórias como IL-1 $\beta$  e induzir a expressão de moléculas de adesão (JACCA *et al.*, 2013). Neste trabalho foi observado que houve um aumento no número de células IL-1 $\beta$  positivas no córtex e no estriado dos animais 24 horas após a pMCAO, corroborando com nossos achados Liu e colaboradores (1993) demonstraram um aumento na expressão de IL-1 $\beta$  3 a 6 horas após a pMCAO que atinge um pico 12 horas e retorna aos valores basais aos 5 dias e seu aumento foi marcadamente maior no córtex isquêmico. A palmatina reduziu a imunomarcção para IL-1 $\beta$  tanto no córtex como no estriado dos animais. Yan e colaboradores (2017) mostraram que a palmatina, também, inibiu a liberação de IL-1 $\beta$  induzida por LPS em células epiteliais endometriais de cabra.

Nossos resultados mostraram um aumento na imunomarcção NF- $\kappa$ B 24 horas após a pMCAO, tanto no córtex como no estriado. Corroborando com nossos resultados Zhang e colaboradores (2012) demonstraram que ocorre um aumento da expressão de NF- $\kappa$ B no córtex dos animais 24 horas após a pMCAO. A inibição da ativação de NF- $\kappa$ B atenua a liberação de citocinas e a ativação microglial (CHAN *et al.*, 2010). Evidencias demonstram que o NF- $\kappa$ B é regulador crucial da resposta inflamatória, desempenhando um papel fundamental na sobrevivência neuronal no SNC (JI *et al.*, 2012b, DUCKWORTH *et al.*, 2006). Na pMCAO já foi demonstrado que o NF- $\kappa$ B é prejudicial, seus níveis elevados

contribuem para a lesão neuronal induzida por isquemia, assim a inibição da ativação de NF- $\kappa$ B pode diminuir o dano neuronal no estágio agudo da isquemia (BI *et al.*, 2009). Particularmente no cérebro o NF- $\kappa$ B regula a expressão de genes pró-inflamatórios, como IL-1 $\beta$ , iNOS, COX-2 e TNF- $\alpha$ , onde estas proteínas desempenham um papel importante no dano neuronal, e ainda regula genes relacionados com o estresse oxidativo como SOD-2 (Superóxido desmutase dependente de manganês) (MATTSON; CAMANDOLA, 2001; NURMI *et al.*, 2004).

O presente trabalho mostrou que a palmatina diminui a imunomarcagem para NF- $\kappa$ B após a isquemia. Wu e colaboradores (2014) demonstraram que a decoção de três plantas da MTC, *Rhizoma Coptidis* alkaloids, *Radix et Rhizoma Rhei* polysaccharides e *Radix Scutellaria* flavones, que possuem alcaloides protoberberínicos em sua composição, diminuiu a expressão de NF- $\kappa$ B em animais com nefropatia diabética, além do NF- $\kappa$ B, também reduziu os níveis de IL-6 e de TNF- $\alpha$ , mostrando que seus componentes inibem a inflamação. Yan e colaboradores (2017) comprovaram que a palmatina diminuiu a expressão de NF- $\kappa$ B induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em células epiteliais endometriais de cabra. Esses dados corroboram com nossos achados, demonstrando que alcaloides protoberberínicos inibem o NF- $\kappa$ B, indicando que a diminuição da expressão de NF- $\kappa$ B pode explicar o mecanismo de neuroproteção da palmatina no estágio agudo do AVC isquêmico. Em vista do que foi apresentado em relação à diminuição destas citocinas podemos sugerir que a palmatina apresenta um efeito anti-inflamatório significativo diante de eventos cerebrais isquêmicos.

Relacionando o efeito protetor da palmatina com sua ação antioxidante foi investigado sua ação diante da enzima SOD-2 (SOD-Mn), uma enzima antioxidante mitocondrial. Nossos resultados demonstraram que não houve uma diminuição significativa no número de células SOD-2 positivas nos animais isquemiados, deste modo não foi possível comprovar o efeito antioxidante da palmatina que outros autores já comprovaram. Guégan e Sola (2000) observaram que não houve alteração na atividade enzimática e nem na expressão de SOD-2 em animais isquemiados, sugerindo que a SOD-2 não é recrutada após a isquemia focal permanente. Guégan e colaboradores (1998) demonstraram que 24 horas após a pMCAO ocorre uma diminuição dos níveis de GSH nos córtex ipsilateral dos animais quando comparado com o lado contralateral a lesão, o mesmo autor não observou diferença de atividade enzimáticas de SOD-2 e de SOD-1 (SOD-CuZn) entre os córtex ipsi e contralateral dos animais isquemiados, nos tempos 3, 6 e 24 horas após a isquemia, corroborando com nossos achados.

Apesar de não ter sido evidenciado neste modelo uma ação antioxidante da

palmatina, outros autores já demonstraram, em outros modelos animais, que plantas que contem a palmatina apresentam atividade antioxidante por aumentar a atividade de SOD, como o estudo realizado por Cheung e colaboradores (2017) que demonstrou que extratos de plantas, que contem a palmatina como constituinte, aumentaram a expressão de SOD-1 em fígado de animais. Outro estudo realizado por Kwon e colaboradores (2016) mostrou que o extrato de plantas contendo palmatina aumentou a expressão de SOD em modelo animais de esofagite de refluxo agudo, demonstrado assim que a palmatina apresentam efeito antioxidante.

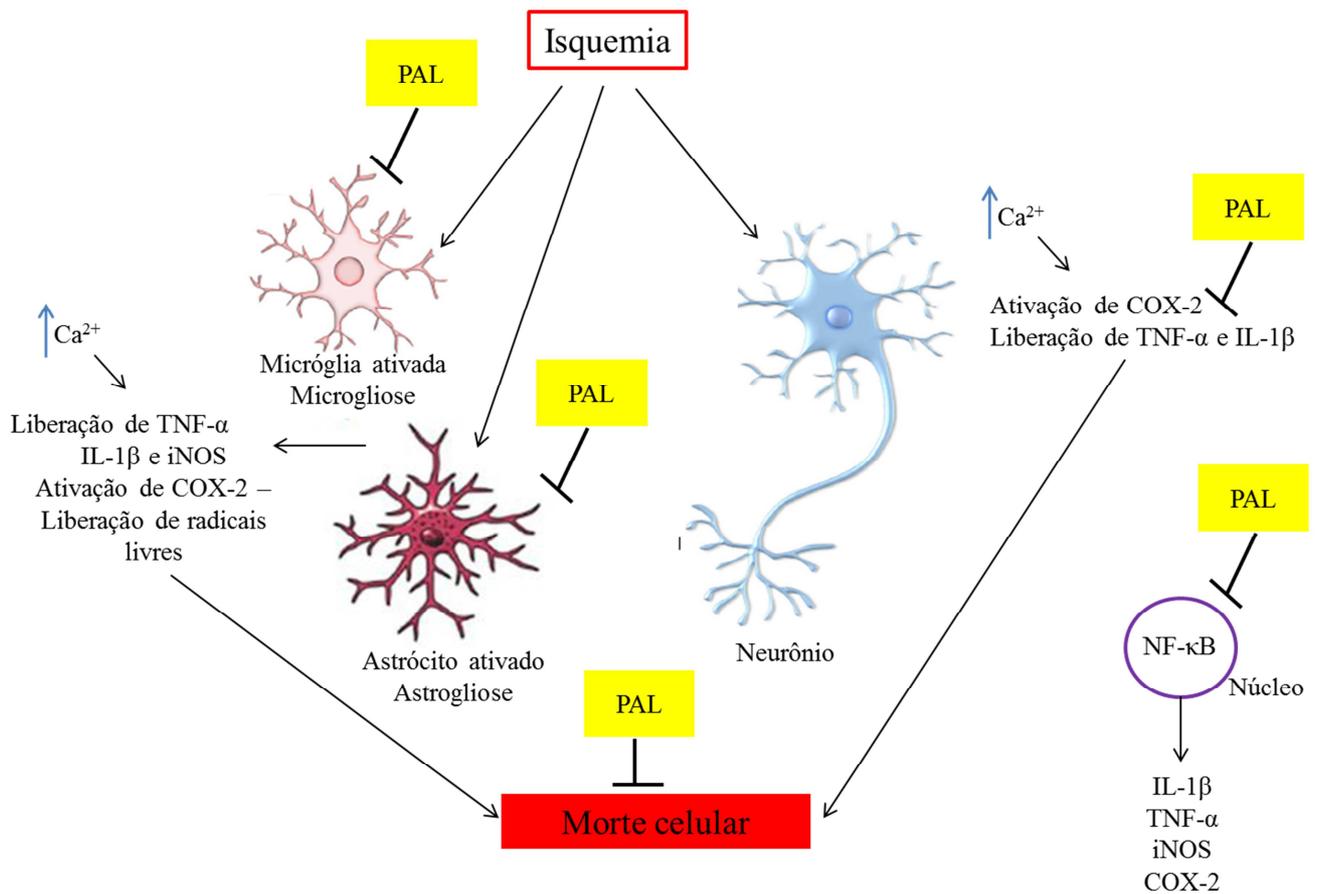
A sinaptofisina é uma proteína associada à membrana que pode ser encontrada em terminações nervosas centrais e periféricas e o aumento de sua expressão está relacionado com aumento da sinaptogênese, sendo um importante marcador de sinaptogênese, desenvolvimento neural e densidade sináptica (NAVONE *et al.*, 1986; STROEMER; KENT; HULSEBOSCH, 1998). Pacientes isquêmicos mostram recuperação motora e cognitiva após o AVC e os mecanismos envolvidos nesse processo são sinaptogênese, crescimento axônico e geração de novas células e de novos vasos sanguíneos (MALLER, 2014). A sinaptofisina colabora para estrutura e função das sinapses, e a sua superregulação pode estar atrelada a plasticidade sináptica (LAN *et al.*, 2014).

Estudo realizado por Liu e colaboradores (2017) avaliou a expressão de sinaptofisina em diferentes tempos após a isquemia e perceberam que entre 8 e 120 horas ocorreu uma diminuição na expressão de sinaptofisina. Fonteles e colaboradores (2016) demonstraram que 120 horas após a pMCAO ocorreu uma diminuição na expressão de sinaptofisina no estriado dos animais isquemiados. No presente trabalho não foi evidenciado uma diminuição de sinaptofisina no estriado, possivelmente pelo pequeno número de animais no estudado (n=4). Também não evidenciamos um aumento de sinaptofisina pela palmatina. Li e colaboradores (2017) demonstrou que a utilização da berberina em um modelo de encefalite diabética em camundongos aumentou a expressão de proteínas relacionadas à sinapse, como a sinaptofisina e PSD95, uma proteína pós-sináptica, evidenciando, assim, que alcaloides protoberberínicos podem aumentar a sinaptogênese.

Este estudo é o primeiro que evidencia o efeito neuroprotetor da palmatina em modelos animais de AVC isquêmico. A administração oral da palmatina, 2mg/kg 2 horas após a indução da pMCAO, diminui o comprometimento neurológico e a lesão tecidual em condições isquêmicas cerebrais e esses efeitos ocorrem através da inibição da neuroinflamação (FIGURA 49), mostrando que a palmatina pode ser um candidato a coadjuvante para o tratamento da isquemia cerebral, esses achados são importantes para

entendermos o mecanismos de proteção da palmatina em modelo de isquemia. Entretanto, necessitamos de investigações mais profundas e o estudo em outros modelos animais de isquemia cerebral para entendermos o mecanismo neuroprotetor da palmatina, pois sabemos que o AVC isquêmico em humanos é heterogêneo e que um único modelo animal abrange apenas aspectos individuais desta doença multifacetada e não reproduz toda sua complexidade (JICKLING; SHARP, 2015).

Figura 49. Modelo hipotético proposto para sítio de ação da palmatina no modelo de isquemia cerebral focal permanente



A isquemia promove a astrogliose e a microgliose, aumenta os níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$  e com isso ativa iNOS, COX-2 e aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . O NF- $\kappa$ B regula a expressão de genes pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , iNOS e COX-2, onde tudo isso culmina com a morte celular. A palmatina inibe a microgliose, astrogliose e a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , iNOS, COX-2 e NF- $\kappa$ B, diminuindo, desta forma, a neuroinflamação.

## 6 CONCLUSÃO

- A palmatina diminuiu os déficits sensório-motores e de memória causados pela pMCAO.
- A palmatina diminuiu a área de infarto isquêmico ocasionado pela pMCAO
- O mecanismo de neuroproteção da palmatina pode está relacionado com sua ação anti-inflamatória, sendo evidenciada pela diminuição da astrogliose, microgliose e das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e da expressão de iNOS, COX-2 e NF- $\kappa$ B.
- Não foi evidenciada uma alteração da expressão de sinaptofisina e de SOD-2 nos animais isquemiados e nem o efeito da palmatina.

## REFERÊNCIAS

ABANOZ, Y.; GÜLEN ABANOZ, Y.; GÜNDÜZ, A.; ULUDÜZ, D.; İNCE, B.; YAVUZ, B.; GÖKSAN, B. Migraine as a risk factor for young patients with ischemic stroke: a case-control study. **Neurol Sci.**, v. 38, n. 4, p. 611-617, 2017.

ABOUTALEB, N.; SHAMSAEI, N.; KHAKSARI, M.; ERFANI, S.; RAJABI, H.; NIKBAKHT, F. Pre-ischemic exercise reduces apoptosis in hippocampal CA3 cells after cerebral ischemia by modulation of the Bax/Bcl-2 proteins ratio and prevention of caspase-3 activation. **J Physiol Sci.**, v. 65, n. 5, p. 435-443, 2015.

ADIBHATLA, R.M.; HATCHER, J.F.; LARSEN, E.C.; CHEN, X.; SUN, D.; TSAO, F.H. CDP-choline significantly restores phosphatidylcholine levels by differentially affecting phospholipase A2 and CTP: phosphocholine cytidyltransferase after stroke. **J Biol Chem.**, v. 281, n. 10, p. 6718-25, 2006.

ALLAN, S.M.; ROTHWELL, N.J. Cytokines and acute neurodegeneration. **Nat Rev Neurosci.**, v. 2, n. 10, p. 734-44, 2001.

ALMEIDA S. R.M, Análise epidemiológica do Acidente Vascular Cerebral no Brasil. **Rev Neurocienc**, v. 20, n.4, p. 481-482, 2012.

ANDERSON, R.E.; TAN, W.K.; MEYER, F.B. Brain acidosis, cerebral blood flow, capillary bed density, and mitochondrial function in the ischemic penumbra. **J Stroke Cerebrovasc Dis.**, v. 8, n. 6, p. 368-79, 1999.

ARMARIO, P.; PINTO, X.; SOLER, C.; CARDONA, P. Secondary prevention of ischemic non cardioembolic stroke. **Clin Investig Arterioscler.**, v. 27, n. 6, p. 287-300, 2015.

ARVIN, B.; NEVILLE, L.F.; BARONE, F.C.; FEUERSTEIN, G.Z. The role of inflammation and cytokines in brain injury. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 20, n. 3, p. 445-52, 1996.

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

BADDELEY, A.; LOGIE, R.; BRESSI, S.; DELLA, S.S.; SPINNLER, H. Dementia and working memory. **Q J Exp Psychol A.**, v. 38, n. 4, p. 603-618, 1986.

BADHIWALA, J.H *et al.* Endovascular Thrombectomy for Acute Ischemic Stroke: A Meta-analysis. **JAMA.**, v. 314, n. 17, p. 1832-1843, 2015.

BANATI, R.B.; GEHRMANN, J.; SCHUBERT, P.; KREUTZBERG, G.W. Cytotoxicity of microglia. **Glia.**, v. 7, n. 1, p. 111-8, 1993.

BARONE, F.C.; FEUERSTEIN, G.Z. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 19, n. 8, p. 819-834, 1999.

BAYÉS, M.; RABASSEDA, X. Gateways to clinical trials. **Methods Find Exp Clin Pharmacol.**, v. 30, n. 1, p. 67-99, 2008.

BECHER, H.; PALM, F.; AIGNER, A.; SAFER, A.; URBANEK, C.; BUGGLE, F.; GROND-GINSBACH, C.; GRAU, A.J. Socioeconomic Conditions in Childhood, Adolescence, and Adulthood and the Risk of Ischemic Stroke. **Stroke**, v. 47, n. 1, p. 173-179, 2016.

BECKER, K.J. Inflammation and acute stroke. **Curr Opin Neurol.**, v. 11, n. 1, p. 45-49, 1998.

BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am J Physiol.**, v. 271, n. 5, p. C1424-37, 1996.

BEDERSON, J.B.; PITTS, L.H.; GERMANO, S.M.; NISHIMURA, M.C.; DAVIS, R.L.; BARTKOWSKI, H. Evaluation of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. **Stroke**, v. 17, n. 6, p. 1304-1308, 1986.

BHADRA, K.; KUMAR, G.S. Therapeutic potential of nucleic acid-binding isoquinoline alkaloids: binding aspects and implications for drug design. **Med Res Rev.**, v. 31, n. 6, p. 821-862, 2011.

BI, X.; YAN, B.; FANG, S.; YANG, Y.; HE, J.; LI, X.M.; KONG, J. Quetiapine regulates neurogenesis in ischemic mice by inhibiting NF-kappaB p65/p50 expression. **Neurol Res.**, v. 31, n 2, p. 159-166, 2009.

BOOTH, J.; CONNELLY, L.; LAWRENCE, M.; CHALMERS, C.; JOICE, S.; BECKER, C.; DOUGALL, N. Evidence of perceived psychosocial stress as a risk factor for stroke in adults: a meta-analysis. **BMC Neurol.**, v. 12, n.15, p. 1-12, 2015.

BOUTIN, H.; LEFEUVRE, R.A.; HORAI, R.; ASANO, M.; IWAKURA, Y.; ROTHWELL, N.J. Role of IL-1alpha and IL-1beta in ischemic brain damage. **J Neurosci.**, v. 21, n. 15, p. 5528-34, 2001.

BREZOVÁ, V.; DVORANOVÁ, D.; KOST'ÁLOVÁ, D. Oxygen activation by photoexcited protoberberinium alkaloids from *Mahonia aquifolium*. **Phytother Res.**, v. 18, n. 8, p. 640-646, 2004.

BROADHURST, P. L. Determinants of emotionality in the rat: I situational factors. **Brit J Psychol**, v. 48, n. 1, p. 1-12, 1957.

BROUNS, R.; DE DEYN, P.P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. **Clin Neurol Neurosurg.**, v. 111, n. 6, p. 483-495, 2009.

BROUNS, R.; SHEORAJPANDAY, R.; WAUTERS, A.; DE SURGELOOSE, D.; MARIËN, P.; DE DEYN, P.P. Evaluation of lactate as a marker of metabolic stress and cause of secondary damage in acute ischemic stroke or TIA. **Clin Chim Acta.**, v. 397, n. 1-2, p. 27-31, 2008.

CAMPOS, Rosana de Sousa. Atividade antifúngica da palmatina frente a isolados de *candida* spp. resistentes a azólicos e sua atividade contra biofilme formado e em formação. 2017.104 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Médica) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2017.

- CAPLAN, L.R.; WONG, K.S.; GAO, S.; HENNERICI, M.G. Is hypoperfusion an important cause of strokes? If so, how? **Cerebrovasc Dis.**, v. 21, n. 3, p. 145-153, 2006.
- CARMICHAEL, S.T.; ARCHIBEQUE, I.; LUKE, L.; NOLAN, T.; MOMIY, J.; LI, S. Growth-associated gene expression after stroke: evidence for a growth-promoting region in peri-infarct cortex. **Exp Neurol.**, v. 193, n. 2, p. 291-311, 2005.
- CAROD-ARTAL, F.J.; CASANOVA LANCHIPA, J.O.; CRUZ RAMÍREZ, L.M.; PÉREZ, N.S.; SIACARA AGUAYO, F.M.; MORENO, I.G.; ROMERO, L.G.; CORAL, L.F.; TRIZOTTO, D.S.; MOREIRA, C.M. Stroke subtypes and comorbidity among ischemic stroke patients in Brasilia and Cuenca: a Brazilian-Spanish cross-cultural study. **J Stroke Cerebrovasc Dis.**, v. 23, n. 1, p. 140-147, 2014.
- CARVALHO, J.J.; ALVES, M.B.; VIANA, G.Á.; MACHADO, C.B.; DOS SANTOS, B.F.; KANAMURA, A.H.; LOTTENBERG, C.L.; NETO, M.C.; SILVA, G.S. Stroke epidemiology, patterns of management, and outcomes in Fortaleza, Brazil: a hospital-based multicenter prospective study. **Stroke.**, v. 42, n. 12, p. 3341-3346, 2011.
- CARVALHO, M.A.; COUTINHO, A.P.O.; CARVALHO, G.D.A.; QUEIROZ, D.T.G.; SANTOS, S.R. Epidemiologia dos acidentes vasculares encefálicos atendidos por meio do serviço de atendimento móvel de urgência. **Rev enferm UFPE on line**, v. 9, n. 3, p.1015-1021, 2015.
- CECHETTO, D.F. Role of nuclear factor kappa B in neuropathological mechanisms. **Prog Brain Res.**, v. 132, p. 391-404, 2001.
- CHAN, P.H. Oxygen radicals in focal cerebral ischemia. **Brain Pathol.**, v. 4, n. 1, p. 59-65, 1994.
- CHAN, P.H. Role of oxidants in ischemic brain damage. **Stroke.**, v. 27, n. 6, p. 1124-9, 1996.
- CHAN, S.J.; WONG, W.S.; WONG, P.T.; BIAN, J.S. Neuroprotective effects of andrographolide in a rat model of permanent cerebral ischaemia. **Br J Pharmacol.**, v. 161, n. 3, p. 668-679, 2010.
- CHAO, J.; LU, T.C.; LIAO, J.W.; HUANG, T.H.; LEE, M.S.; CHENG, H.Y.; HO, L.K.; KUO, C.L.; PENG, W.H. Analgesic and anti-inflammatory activities of ethanol root extract of *Mahonia oiwakensis* in mice. **J Ethnopharmacol.**, v. 125, n. 2, p. 297-303, 2009.
- CHE, X.; YE, W.; PANGA, L.; WU, D.C.; YANG, G.Y. Monocyte chemoattractant protein-1 expressed in neurons and astrocytes during focal ischemia in mice. **Brain Res.**, v. 902, n. 2, p. 171-177, 2001.
- CHEATWOOD, J.L.; EMERICK, A.J.; SCHWAB, M.E.; KARTJE, G.L. Nogo-A expression after focal ischemic stroke in the adult rat. **Stroke.**, v. 39, n. 7, p. 2091-2098, 2008.
- CHEN, C.C.; HUNG, T.H.; LEE, C.Y.; WANG, L.F.; WU, C.H.; KE, C.H.; CHEN, S.F. Berberine protects against neuronal damage via suppression of glia-mediated inflammation in traumatic brain injury. **PLoS One.**, v. 9, n. 12, p.1-30, 2014.

CHEN, M.; LU, T.J.; CHEN, X.J.; ZHOU, Y.; CHEN, Q.; FENG, X.Y.; XU, L.; DUAN, W.H.; XIONG, Z.Q. Differential roles of NMDA receptor subtypes in ischemic neuronal cell death and ischemic tolerance. **Stroke.**, v. 39, n. 11, p. 3042-8, 2008.

CHEN, Y.F. Traditional Chinese herbal medicine and cerebral ischemia. **Front Biosci (Elite Ed).**, v. 4, p. 809-817, 2012.

CHENG, C.Y.; LEE, Y.C. Anti-Inflammatory Effects of Traditional Chinese Medicines against Ischemic Injury in In Vivo Models of Cerebral Ischemia. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 2016, p.1-16, 2016.

CHERRY, J.D.; OLSCHOWKA, J.A.; O'BANION, M.K. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. **J Neuroinflammation.**, v. 3, p. 11:98, 2014.

CHEUNG, H.P., *et al.* Comparison of chemical profiles and effectiveness between Erxian decoction and mixtures of decoctions of its individual herbs: a novel approach for identification of the standard chemicals. **Chin Med.**, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2017.

CHO, J.; LEE, H.K. Wogonin inhibits ischemic brain injury in a rat model of permanent middle cerebral artery occlusion. **Biol Pharm Bull.**, v. 27, n. 10, p. 1561-1564, 2004.

COLANGELO, V.; GORDON, W.C.; MUKHERJEE, P.K.; TRIVEDI, P.; OTTINO, P. Downregulation of COX-2 and JNK expression after induction of ischemic tolerance in the gerbil brain. **Brain Res.**, v. 1016, n. 2, p. 195-200, 2004.

COLLI, B. O.; NUNES, M.; CARLOTTI, C. G. JR. Isquemia cerebral experimental. Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia. São Paulo: Probel Editora, p. 643-662, 1998.

CROXSON, P.L.; KYRIAZIS, D.A.; BAXTER, M.G. Cholinergic modulation of a specific memory function of prefrontal cortex. **Nat Neurosci.**, v. 14, n. 12, p. 1510-1512, 2011.

DANTON, G.H.; DIETRICH, W.D. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. **J Neuropathol Exp Neurol.**, v. 62, n. 2, p. 127-136, 2003.

DE LIMA, N.M.; FERREIRA, E.O.; FERNANDES, M.Y.; LIMA, F.A.; NEVES, K.R.; DO CARMO, M.R.; DE ANDRADE, G.M. Neuroinflammatory response to experimental stroke is inhibited by boldine. **Behav Pharmacol.**, v. 28, n. 2 and 3 - Special Issue, p. 223-237, 2017.

DE LOS RÍOS LA ROSA, F *et al.* Eligibility for Intravenous Recombinant Tissue-Type Plasminogen Activator Within a Population: The Effect of the European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS) III Trial. **Stroke.**, v. 43, n. 6, p. 1591-1595, 2012.

DE PADUA, M. A.; DE FÁTIMA, M. S. M.; FAVARATO, D.; AVAKIAN, S.D.; MACHADO, C.L.A.; MENDES, A.J.; FRANCHINI, R.J.A. Stroke and ischemic heart disease mortality trends in Brazil from 1979 to 1996. **Neuroepidemiology**, v. 22, n.3, p. 179-198, 2003.

DEGRABA, T.J. The role of inflammation after acute stroke: utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy. **Neurology.**, v. 51, n. 3 Suppl 3, p. S62-8, 1998.

DEL ZOPPO, G.J.; HALLENBECK, J.M. Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. **Thromb Res.**, v. 98, n. 3, p. 73-81, 2000.

DEL ZOPPO, G.J.; POECK, K.; PESSIN, M.S.; WOLPERT, S.M.; FURLAN, A.J.; FERBERT, A.; ALBERTS, M.J.; ZIVIN, J.A.; WECHSLER, L. Recombinant tissue plasminogen activator in acute thrombotic and embolic stroke. **Ann Neurol.**, v. 32, n. 1, p. 78-86, 1992.

DELLU, F.; MAYO, W.; CHERKAOUI, J.; LE MOAL, M.; SIMON, H. A two-trial memory task with automated recording: study in young and aged rats. **Brain Res.**, v. 588, n. 1, p. 132-139, 1992.

DELLU, F.; MAYO, W.; VALLÉE, M.; LE MOAL, M.; SIMON, H. Reactivity to novelty during youth as a predictive factor of cognitive impairment in the elderly: a longitudinal study in rats. **Brain Res.**, v. 653, n. 1-2, p. 51-56, 1994.

DENG, Y.X.; LU, T.; XIE, L.; LIU, X.D. High-performance liquid chromatographic method for the determination and pharmacokinetic study of wogonoside in rat serum after oral administration of traditional Chinese medicinal preparation Huang-Lian-Jie-Du decoction. **Biomed Chromatogr.**, v. 20, n. 10, p. 1098-102, 2006.

DEVRIES, A.C.; NELSON, R.J.; TRAYSTMAN, R.J.; HURN, P.D. Cognitive and behavioral assessment in experimental stroke research: will it prove useful? **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 25, n. 4, p. 325-342, 2001.

DEW, I.T.Z.; CABEZA, R. The porous boundaries between explicit and implicit memory: behavioral and neural evidence. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1224, p. 174-190, 2011.

DHINGRA, D.; BHANKHER, A. Behavioral and biochemical evidences for antidepressant-like activity of palmatine in mice subjected to chronic unpredictable mild stress. **Pharmacol Rep.**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2014.

DHINGRA, D.; KUMAR, V. Memory-enhancing activity of palmatine in mice using elevated plus maze and morris water maze. **Adv Pharmacol Sci.**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

DONNAN, G.A.; FISHER, M.; MACLEOD, M.; DAVIS, S.M. Stroke. **Lancet.**, v. 371, n. 9624, p.1612-23, 2008.

DRINGEN, R.; GUTTERER, J.M.; HIRRLINGER, J. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. **Eur J Biochem.**, v. 267, n. 16, p. 4912-6, 2000.

DUCKWORTH, E.A.; BUTLER, T.; COLLIER, L.; COLLIER, S.; PENNYPACKER, K.R. NF-kappaB protects neurons from ischemic injury after middle cerebral artery occlusion in mice. **Brain Res.**, v. 1088, n. 1, p. 167-175, 2006.

DURUKAN, A.; TATLISUMAK, T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 87, p. 179-197, 2007.

ESPEY, M.G.; MIRANDA, K.M.; PLUTA, R.M.; WINK, D.A. Nitrosative capacity of macrophages is dependent on nitric-oxide synthase induction signals. *J Biol Chem.*, v. 275, n. 15, p. 11341-7, 2000.

FEIGIN, V. L.; LAWES, C. M.; BENNETT, D. A.; BARKER-COLLO, S. L.; PARAG, V. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *Lancet Neurol.*, v.8, n. 4, p. 355-369, 2009.

FELLING, R.J.; SUN, L.R.; MAXWELL, E.C.; GOLDENBERG, N.; BERNARD, T. Pediatric arterial ischemic stroke: Epidemiology, risk factors, and management. *Blood Cells Mol Dis.*, 2017. doi: 10.1016/j.bcmd.2017.03.003.

FERNANDES, F.D.P.; MENEZES, A.P. F.; NEVES, J.C.S.; FONTELES, A.A.; DA SILVA, A.T.; RODRIGUES, P.A.; DO CARMO M.R.S, DE SOUZA, C.M.; DE ANDRADE, G.M. Caffeic acid protects mice from memory deficits induced by focal cerebral ischemia. *Behav Pharmacol.*, v. 25, n. 7, p. 637-647, 2014.

FERNANDES, T.G.; GOULART, A.C.; CAMPOS, T.F.; LUCENA, N.M.; FREITAS, K.L.; TREVISAN, C.M.; BENSEÑOR, I.M.; LOTUFO, P.A. Early stroke case-fatality rates in three hospital registries in the Northeast and Southeast of Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*, v. 70, n. 11, p. 869-873, 2012.

FERNANDEZ-FERNANDEZ, S.; ALMEIDA, A.; BOLAÑOS, J.P. Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. *Biochem J.*, v. 443, n. 1, p. 3-11, 2012.

FERREIRA, E DE. O.; FERNANDES, M.Y.; LIMA, N.M.; NEVES, K.R.; CARMO, M.R.; LIMA, F.A.; FONTELES, A.A.; MENEZES, A.P.; ANDRADE, G.M. Neuroinflammatory response to experimental stroke is inhibited by eriodictyol. *Behav Brain Res.*, v. 1, n. 312, p.321-32, 2016.

FONTELES, A.A.; DE SOUZA, C.M.; DE SOUSA NEVES, J.C.; MENEZES, A.P.; SANTOS DO CARMO, M.R.; FERNANDES, F.D.; DE ARAÚJO, P.R.; DE ANDRADE, G.M. Rosmarinic acid prevents against memory deficits in ischemic mice. *Behav Brain Res.*, v. 15, n. 297, p. 91-103, 2016.

FUSTER, J.M. Synopsis of function and dysfunction of the frontal lobe. *Acta Psychiatr. Scand. Suppl.*, v. 395, p. 51-57, 1999.

FUJIMURA, M.; MORITA-FUJIMURA, Y.; KAWASE, M.; COPIN, J.C.; CALAGUI, B.; EPSTEIN, C.J.; CHAN, P.H. Manganese superoxide dismutase mediates the early release of mitochondrial cytochrome C and subsequent DNA fragmentation after permanent focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci.*, v. 19, n. 9, p. 3414-22, 1999.

FURUKAWA, K.; FU, W.; LI, Y.; WITKE, W.; KWIATKOWSKI, D.J.; MATTSON, M.P. THE actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor

activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. **J Neurosci.**, v. 17, n. 21, p. 8178-8186, 1997.

GARCIA, J. G.; WAGNER, S.; LIU, K.F.; HU, X.J. Neurological Deficit and Extent of Neuronal Necrosis Attributable to Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. **Stroke**, v. 26, n. 4, p. 627-635, 1995.

GARCIA-BONILLA, L.; MOORE, J.M.; RACCHUMI, G.; ZHOU, P.; BUTLER, J.M.; IADECOLA, C.; ANRATHER, J. Inducible nitric oxide synthase in neutrophils and endothelium contributes to ischemic brain injury in mice. **J Immunol.**, v. 193, n. 5, p. 2531-7, 2014.

GINHOUX, F.; LIM, S.; HOEFFEL, G.; LOW, D.; HUBER, T. Origin and differentiation of microglia. **Front Cell Neurosci.**, v. 7, p.1-14, 2013.

GINSBERG, M.D. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. **Neuropharmacology.**, v. 55, n. 3, p. 363-389, 2008.

GOLD, P.E. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. **Behav. Neural Biol.** v. 46, n.1, p. 87-98, 1986.

GOLDLUST, E.J.; PACZYNSKI, R.P.; HE, Y.Y.; HSU, C.Y.; GOLDBERG, M.P. Automated measurement of infarct size with scanned images of triphenyltetrazolium chloride-stained rat brains. **Stroke.**, v. 27, n. 9, p. 1657-1662, 1996.

GOLDMAN-RAKIC, P.S. Regional and cellular fractionation of working memory. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 93, n. 24, p. 13473-80, 1996.

GONZÁLEZ-GIRALDO, Y.; BARRETO, G.E.; FAVA, C.; FORERO, D.A. Ischemic Stroke and Six Genetic Variants in CRP, EPHX2, FGA, and NOTCH3 Genes: A Meta-Analysis. **J Stroke Cerebrovasc Dis.**, v. 25, n. 9, p. 2284-2289, 2016.

GREEN, A.R.; ASHWOOD, T.; ODERGREN, T.; JACKSON, D.M. Nitrones as neuroprotective agents in cerebral ischemia, with particular reference to NXY-059. **Pharmacol Ther.**, v. 100, n. 3, p. 195-214, 2003.

GREENHAM, M.; GORDON, A.; ANDERSON, V.; MACKAY, M.T. Outcome in Childhood Stroke. **Stroke**, v. 47, n. 4, p. 1159-1164, 2016.

GRUPKE, S.; HALL, J.; DOBBS, M.; BIX, G.J.; FRASER, J.F. Understanding history, and not repeating it. Neuroprotection for acute ischemic stroke: from review to preview. **Clin Neurol Neurosurg.**, v. 129, p. 1-9, 2015.

GU, Y.; CHEN, J.; SHEN, J. Herbal medicines for ischemic stroke: combating inflammation as therapeutic targets. **J Neuroimmune Pharmacol.**, v. 9, n. 3, p. 313-339, 2014.

GU, Y.; HUANG, C.S.; INOUE, T.; YAMASHITA, T.; ISHIDA, T.; KANG, K.M.; NAKAO, A. Drinking hydrogen water ameliorated cognitive impairment in senescence-accelerated mice. **J Clin Biochem Nutr.**, v. 46, n. 3, p. 269-276, 2010.

GUÉGAN, C.; CEBALLOS-PICOT, I.; NICOLE, A.; KATO, H.; ONTÉNIENTE, B.; SOLA, B. Recruitment of several neuroprotective pathways after permanent focal ischemia in mice. **Exp Neurol.**, v. 154, n. 2, p. 371-380, 1998.

GUÉGAN, C.; SOLA, B. Early and sequential recruitment of apoptotic effectors after focal permanent ischemia in mice. **Brain Res.**, v. 856, n. 1-2, p. 93-100, 2000.

GUO, T.; *et al.* Berberine Ameliorates Hepatic Steatosis and Suppresses Liver and Adipose Tissue Inflammation in Mice with Diet-induced Obesity. **Sci Rep.**, v. 6, p. 1-11, 2016.  
Hall (1934)

HALLENBECK, J.M. Significance of the inflammatory response in brain ischemia. **Acta Neurochir Suppl.**, v. 66, p. 27-31, 1996.

HAQQANI, A.S.; NESIC, M.; PRESTON, E.; BAUMANN, E.; KELLY, J.; STANIMIROVIC, D. Characterization of vascular protein expression patterns in cerebral ischemia/reperfusion using laser capture microdissection and ICAT-nanoLC-MS/MS. **FASEB J.**, v. 19, n. 13, p. 1809-21, 2005.

HATTORI, K.; LEE, H.; HURN, P.D.; CRAIN, B.J.; TRAYSTMAN, R.J.; DEVRIES, A.C. Cognitive deficits after focal cerebral ischemia in mice. **Stroke.**, v. 31, n. 8, p. 1939-1944, 2000.

HE, K.; KOU, S.; ZOU, Z.; HU, Y.; FENG, M.; HAN, B.; LI, X.; YE, X. Hypolipidemic Effects of Alkaloids from Rhizoma Coptidis in Diet-Induced Hyperlipidemic Hamsters. **Planta Med.**, v. 82, n. 8, p. 690-697, 2016.

HENNESSY, E.; GRIFFIN, É.W.; CUNNINGHAM, C. Astrocytes Are Primed by Chronic Neurodegeneration to Produce Exaggerated Chemokine and Cell Infiltration Responses to Acute Stimulation with the Cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . **J Neurosci.**, v. 35, n. 22, p. 8411-22, 2015.

HERX, L.M.; YONG, V.W. Interleukin-1 beta is required for the early evolution of reactive astrogliosis following CNS lesion. **J Neuropathol Exp Neurol.**, v. 60, n. 10, p. 961-71, 2001.

HOSSMANN, K. A. Pathophysiological basis of translational stroke research. **Folia Neuropathol**, v. 47, p. 213-227, 2009.

HOU, L.; HAN, W.; JIANG, J., *et al.* Passive smoking and stroke in men and women: a national population-based case-control study in China. **Sci Rep.**, v. 31, n.7, p. 1-9, 2017.

HOWELLS, D.W.; *et al.* Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 30, n. 8, p. 1412-31, 2010.

HSIEH, M.T.; SU, S.H.; TSAI, H.Y.; PENG, W.H.; HSIEH, C.C.; CHEN, C.F. Effects of palmatine on motor activity and the concentration of central monoamines and its metabolites in rats. **Jpn J Pharmacol.**, v. 61, n. 1, p. 1-5, 1993.

HU, D.; CAO, Y.; HE, R.; HAN, N.; LIU, Z.; MIAO, L.; YIN, J. Schizandrin, an antioxidant lignan from *Schisandra chinensis*, ameliorates A $\beta$ 1-42-induced memory impairment in mice. **Oxid Med Cell Longev.**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

HUANG, J.; *et al.* Postischemic cerebrovascular E-selectin expression mediates tissue injury in murine stroke. **Stroke.**, v. 31, n. 12, p. 3047-3053, 2000.

HUNTER, A.J.; GREEN, A.R.; CROSS, A.J. Animal models of acute ischaemic stroke: can they predict clinically successful neuroprotective drugs? **Trends Pharmacol Sci.**, v. 16, n. 4, p. 123-8, 1995.

HURLEY, S.D.; OLSCHOWKA, J.A.; O'BANION, M.K. Cyclooxygenase inhibition as a strategy to ameliorate brain injury. **J Neurotrauma.**, v. 19, n. 1, p. 1-15, 2002.

HWANG, Y.S.; SHIN, C.Y.; HUH, Y.; RYU, J.H. Hwangryun-Hae-Dok-tang (Huanglian-Jie-Du-Tang) extract and its constituents reduce ischemia-reperfusion brain injury and neutrophil infiltration in rats. **Life Sci.**, v. 71, n. 18, p. 2105-17, 2002.

HWANG, I.K.; YOO, K.Y.; KIM, D.W.; CHOI, S.Y.; KANG, T.C.; KIM, Y.S.; WON, M.H. Ionized calcium-binding adapter molecule 1 immunoreactive cells change in the gerbil hippocampal CA1 region after ischemia/reperfusion. **Neurochem Res.**, v. 31, n. 7, p. 957-65, 2006.

IADECOLA, C.; NIWA, K.; NOGAWA, S.; ZHAO, X.; NAGAYAMA, M.; ARAKI, E.; MORHAM, S.; ROSS, M.E. Reduced susceptibility to ischemic brain injury and N-methyl-D-aspartate-mediated neurotoxicity in cyclooxygenase-2-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 98, n. 3, p. 1294-9, 2001.

IADECOLA, C.; ZHANG, F.; CASEY, R.; NAGAYAMA, M.; ROSS, M.E. Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. **J Neurosci.**, v. 17, n. 23, p. 9157-64, 1997.

IADECOLA, C.; ZHANG, F.; XU, S.; CASEY, R.; ROSS, M.E. Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 15, n. 3, p. 378-84, 1995.

IIZUKA, N.; OKA, M.; YAMAMOTO, K.; TANGOKU, A.; MIYAMOTO, K.; MIYAMOTO, T.; UCHIMURA, S.; HAMAMOTO, Y.; OKITA, K. Identification of common or distinct genes related to antitumor activities of a medicinal herb and its major component by oligonucleotide microarray. **Int J Cancer.**, v. 107, n. 4, p. 666-672, 2003.

IMENSHAHIDI, M.; HOSSEINZADEH, H. Berberis Vulgaris and Berberine: An Update Review. **Phytother Res.**, v. 30, n. 11, p. 1745-1764, 2016.

ISHIBASHI, S.; KUROIWA, T.; KATSUMATA, N.; YUAN, S.L.; ENDO, S.; MIZUSAWA, H. Extrapyramidal motor symptoms versus striatal infarction volume after focal ischemia in mongolian gerbils. **Neuroscience.**, v. 127, n. 2, p. 269-275, 2004.

ISHIKAWA, S.; TAMAKI, M.; OGAWA, Y.; KANEKI, K.; ZHANG, M.; SUNAGAWA, M.; HISAMITSU, T. Inductive Effect of Palmatine on Apoptosis in RAW 264.7 Cells. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 2016, p. 1-9, 2016.

ITO, D.; TANAKA, K.; SUZUKI, S.; DEMBO, T.; FUKUUCHI, Y. Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. **Stroke.**, v. 32, n. 5, p. 1208-15, 2001.

ITOH, T. Application of Oren-gedoku-to to many illnesses in Japanese oriental medicine. **Kampo Newest Therapy**, v. 10, p. 243-246, 2001.

IZQUIERDO, I.; et al. Memory retrieval and its lasting consequences. **Neurotox Res.**, v. 4, n. 5-6, p. 573-593, 2002.

IZQUIERDO, I.; FURINI, C.R.; MYSKIW, J.C. Fear Memory. **Physiol Rev.**, v. 96, n. 2, p. 695-750, 2016.

IZQUIERDO, I.; IZQUIERDO, L.A.; BARROS, D.M.; MELLO E SOUZA, T.; DE SOUZA, M.M.; QUEVEDO, J.; RODRIGUES, C.; SANT'ANNA, M.K.; MADRUGA, M.; MEDINA, J.H. Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. **Behav Pharmacol.**, v. 9, n. 5-6, p. 421-7, 1998.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory Formation: The Sequence of Biochemical Events in the Hippocampus and Its Connection to Activity in Other Brain Structures. **Neurobiol. Learning Memory**, v. 68, p. 285–316, 1997.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiol Learn Mem.**, v. 68, n. 3, p. 285-316, 1997.

IZQUIERDO, I.; DA CUNHA, C.; ROSAT, R.; JERUSALINSKY, D.; FERREIRA, M.B.; MEDINA, J.H. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. **Behav Neural Biol.**, v. 58, n. 1, p. 16-26, 1992.

JACCA, S.; FRANCESCHI, V.; COLAGIORGI, A.; SHELDON, M.; DONOFRIO, G. Bovine endometrial stromal cells support tumor necrosis factor alpha-induced bovine herpesvirus type 4 enhanced replication. **Biol Reprod.**, v. 88, n. 5, p. 1-11, 2013.

JACOBY, L.L.; LINDSAY, D.S.; TOTH, J.P. Unconscious influences revealed. Attention, awareness, and control. **Am Psychol.**, v. 47, n. 6, p. 802-9, 1992.

JANTAN, I.; RAWEH, S.M.; YASIN, Y.H.; MURAD, S. Antiplatelet activity of aporphine and phenanthrenoid alkaloids from *Aromadendron elegans* Blume. **Phytother Res.**, v. 20, n. 6, p. 493-496, 2006.

Jl, H.; MIAO, J.; ZHANG, X.; DU, Y.; LIU, H.; LI, S.; LI, L. Inhibition of sonic hedgehog signaling aggravates brain damage associated with the down-regulation of Gli1, Ptch1 and SOD1 expression in acute ischemic stroke. **Neurosci Lett.**, v. 506, n. 1, p. 1-6, 2012a.

- Ji, H.; Zhang, X.; Du, Y.; Liu, H.; Li, S.; Li, L. Polydatin modulates inflammation by decreasing NF- $\kappa$ B activation and oxidative stress by increasing Gli1, Ptch1, SOD1 expression and ameliorates blood-brain barrier permeability for its neuroprotective effect in pMCAO rat brain. **Brain Res Bull.**, v. 87, n. 1, p. 50-59, 2012b.
- Jia, F.; Zou, G.; Fan, J.; Yuan, Z. Identification of palmatine as an inhibitor of West Nile virus. **Arch Virol.**, v. 155, n. 8, p. 1325-1359, 2010.
- Jiang, T.; Gao, L.; Guo, J.; Lu, J.; Wang, Y.; Zhang, Y. Suppressing inflammation by inhibiting the NF- $\kappa$ B pathway contributes to the neuroprotective effect of angiotensin-(1-7) in rats with permanent cerebral ischaemia. **Br J Pharmacol.**, v. 167, n. 7, p. 1520-1532, 2012.
- Jickling, G.C.; Sharp, F.R. Improving the translation of animal ischemic stroke studies to humans. **Metab Brain Dis.**, v. 30, n. 2, p. 461-7, 2015.
- Johansson, B.B.; Belinchenco, P.V. Neuronal plasticity and dendritic spines: effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 22, p. 89-96, 2002.
- Jung, M.W.; Qin, Y.; Naughton, B.L.; Barnes, C.A. Firing characteristics of deep layer neurons in prefrontal cortex in rats performing spatial working memory tasks. **Cereb. Cortex**, v. 8, p. 437-450, 1998.
- Jung, H.A.; Min, B.S.; Yokozaawa, T.; Lee, J.H.; Kim, Y.S.; Choi, J.S. Anti-Alzheimer and antioxidant activities of Coptidis Rhizoma alkaloids. **Biol Pharm Bull.**, v. 32, n. 8, p. 1433-1438, 2009.
- Kandel, E.; Abel, T. Neuropeptides, adenylyl cyclase, and memory storage. **Science.**, v. 268, n. 5212, p. 825-6, 1995.
- Kapadia, R.; Tureyen, K.; Bowen, K. K.; Kalluri, H.; Johnson, P. F.; Vemuganti, R. Decreased brain damage and curtailed inflammation in transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta knockout mice following transient focal cerebral ischemia. **J. Neurochem.**, v. 98, p. 1718-1731, 2006.
- Katsura, K.; Kristián, T.; Siesjö, B.K. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. **Biochem Soc Trans.**, v. 22, n. 4, p. 991-996, 1994.
- Kawabori, M.; Yenari, M.A. Inflammatory responses in brain ischemia. **Curr Med Chem.**, v. 22, n. 10, p. 1258-77, 2015.
- Kawano, T.; Anrather, J.; Zhou, P.; Park, L.; Wang, G.; Frys, K.A.; Kunz, A.; Cho, S.; Orío, M.; Iadecola, C. Prostaglandin E2 EP1 receptors: downstream effectors of COX-2 neurotoxicity. **Nat Med.**, v. 12, n. 2, p. 225-9, 2006.
- Kawashima, K.; Haruo, N.; Kogure, K. Effect of Oren-gedoku-toon cerebral vascular accident. **Pharm.Med.**, v. 6, p. 33-36, 1988.
- Kelly, J.; Hunt, B.J.; Lewis, R.R.; Rudd, A. Transient ischaemic attacks: under-reported, over-diagnosed, under-treated. **Age Ageing.**, v. 30, n. 5, p. 379-381, 2001.

KIM, J. S.; GAUTAM, S. C.; CHOPP, M.; ZALOGA, C.; JONES, M. L.; WARD, P. A.; WELCH, K. M. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 after focal cerebral ischemia in the rat. **J. Neuroimmunol.**, v. 56, p. 127-34, 1995.

KIM, Y.M *et al.* Palmatine from *Coptidis rhizoma* reduces ischemia-reperfusion-mediated acute myocardial injury in the rat. **Food Chem Toxicol.**, v. 47, n. 8, p. 2097-2102, 2009.

KIM, M.; SHIN, M.S.; LEE, J.M.; CHO, H.S.; KIM, C.J.; KIM, Y.J.; CHOI, H.R.; JEON, J.W. Inhibitory Effects of Isoquinoline Alkaloid Berberine on Ischemia-Induced Apoptosis via Activation of Phosphoinositide 3-Kinase/Protein Kinase B Signaling Pathway. **Int Neurorol J.**, v. 18, n. 3, p. 115-25, 2014.

KOSTULAS, N.; LI, H.L.; XIAO, B.G.; HUANG, Y.M.; KOSTULAS, V.; LINK, H. Dendritic cells are present in ischemic brain after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. **Stroke.**, v. 33, n. 4, p. 1129-1134, 2002.

KOTLEGA, D. ; GOŁĄB-JANOWSKA, M.; MASZTALEWICZ, M.; CIEĆWIEŻ, S.; NOWACKI, P. The emotional stress and risk of ischemic stroke. **Neurol Neurochir Pol.**, v. 50, n. 4, p. 265-270, 2016.

KÜPELI, E.; KOŞAR, M.; YEŞİLADA, E.; HÜSNÜ, K.; BAŞER, C. A comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish *Berberis* species. **Life Sci.**, v. 72, n. 6, p. 645-657, 2002.

KWON, O.J.; *et al.* Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of *Rhei Rhizoma* and *Coptidis Rhizoma* Mixture on Reflux Esophagitis in Rats. **Evid Based Complement Alternat Med.**,v. 2016, p. 1-13, 2016.

LAI, A.Y.; TODD, K.G. Microglia in cerebral ischemia: molecular actions and interactions. **Can J Physiol Pharmacol.**, v. 84, n. 1, p. 49-59, 2006.

LALANCETTE-HÉBERT, M.; GOWING, G.; SIMARD, A.; WENG, Y.C.; KRIZ, J. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. **J Neurosci.**, v. 27, n. 10, p. 2596-605, 2007.

LAMBERTSEN, K.L.; BIBER, K.; FINSEN, B. Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 32, n. 9, p. 1677-1698, 2012.

LAN, X.; ZHANG,M.; YANG, W.; ZHENG, Z.; WU, Y.; ZENG, Q.; LIU, S.; LIU, K.; LI, G. Effect of treadmill exercise on 5-HT, 5-HT1A receptor and brain derived neurophic factor in rats after permanent middle cerebral artery occlusion. **Neurol Sci.**, v. 35, n. 5, p. 761-766, 2014.

LAVADOS, P.M.; HENNIS, A.J.; FERNANDES, J.G.; MEDINA, M.T.; LEGETIC, B.; HOPPE, A.; SACKS, C.; JADUE, L.; SALINAS, R. Stroke epidemiology, prevention, and management strategies at a regional level: Latin America and the Caribbean. **Lancet Neurol.**, v. 6, n. 4, p. 362-372, 2007.

- LECIÑANA, A.M.; DÍAZ-GUZMÁN, J.; EGIDO, J.A.; GARCÍA PASTOR, A.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, P.; VIVANCOS, J.; DÍEZ-TEJEDOR, E.; Comité ad hoc del Foro de Ictus de la Asociación Madrileña de Neurología. Endovascular treatment in acute ischaemic stroke. A stroke care plan for the region of Madrid. **Neurologia.**, v. 28, n. 7, p. 425-434, 2013.
- LI, L.; LI, Y.; JI, X.; ZHANG, B.; WEI, H.; LUO, Y. The effects of retinoic acid on the expression of neurogranin after experimental cerebral ischemia. **Brain Res.**, v.1226, p. 234-40, 2008.
- LI, C.; SUN, H.; ARRICK, D.M.; MAYHAN, W.G. Chronic nicotine exposure exacerbates transient focal cerebral ischemia-induced brain injury. **J Appl Physiol.**, v. 120, n. 3, p. 328-333, 2016.
- LI, F.; HAN, S.S.; TATLISUMAK, T.; LIU, K.F.; GARCIA, J.H.; SOTAK, C.H.; FISHER, M. Reversal of acute apparent diffusion coefficient abnormalities and delayed neuronal death following transient focal cerebral ischemia in rats. *Ann Neurol.*, v. 46, n. 3, p. 333-42, 1999.
- LI, H.Y.; WANG, X.C.; XU, Y.M.; LUO, N.C.; LUO, S.; HAO, X.Y.; CHENG, S.Y.; FANG, J.S.; WANG, Q.; ZHANG, S.J.; CHEN, Y.B. Berberine Improves Diabetic Encephalopathy through SIRT1/ER Stress Pathway in db/db Mice. **Rejuvenation Res.**, 2017. doi: 10.1089/rej.2017.1972, 2017.
- LI, L.; ZHANG, X.; CUI, L.; WANG, L.; LIU, H.; JI, H.; DU, Y. Ursolic acid promotes the neuroprotection by activating Nrf2 pathway after cerebral ischemia in mice. **Brain Res.**, v. 1497, p. 32-9, 2013.
- LI, X.M.; YANG, J.M.; HU, D.H.; HOU, F.Q.; ZHAO, M.; ZHU, X.H.; WANG, Y.; LI, J.G.; HU, P.; CHEN, L.; QIN, L.N.; GAO, T.M. Contribution of downregulation of L-type calcium currents to delayed neuronal death in rat hippocampus after global cerebral ischemia and reperfusion. **J Neurosci.**, v. 27, n. 19, p. 5249-59, 2007.
- LI, Y.; ZHU, J.; LIU, Y.; CHEN, X.; LEI, S.; LI, L.; JIANG, B.; TAN, L.; YU, S.; ZHAO, Y. Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  Influences Injury Following Cerebral Ischemia/Reperfusion in Rats. **Int J Biol Sci.**, v. 12, n. 5, p. 518-531, 2016.
- LIN, S.C.; LIN, C.C.; LU, F.J.; LIN, Y.H.; CHEN, C.H. Protective and therapeutic effects of huanglian-jie-du-tang on hepatotoxin-induced liver injuries. **Am J Chin Med.**, v. 24, n. 3-4, p. 219-229, 1996.
- LIPTON, P. Ischemic Cell Death in Brain Neurons. **Physiol Rev.**, v. 79, p. 1431-1568, 1999.
- LIPTON, S.A.; ROSENBERG, P.A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **N Engl J Med.**, v. 330, n. 9, p. 613-622, 1994.
- LIU, F.; MCCULLOUGH, L. D. Middle Cerebral Artery Occlusion Model in Rodents: Methods and Potential Pitfalls. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p.1 -9, 2011.

- LIU, J.P.; FENG, L.; ZHANG, M.H.; MA, D.Y.; WANG, S.Y.; GU, J.; FU, Q.; QU, R.; MA, S.P. Neuroprotective effect of Liuwei Dihuang decoction on cognition deficits of diabetic encephalopathy in streptozotocin-induced diabetic rat. **J Ethnopharmacol.**, v. 150, n. 1, p. 371-381, 2013.
- LIU, P.; ZHANG, R.; LIU, D.; WANG, J.; YUAN, C.; ZHAO, X.; LI, Y.; JI, X.; CHI, T.; ZOU, L. Time-course investigation of blood-brain barrier permeability and tight junction protein changes in a rat model of permanent focal ischemia. **J Physiol Sci.**, 2017. doi: 10.1007/s12576-016-0516-6, 2017.
- LIU, R.; YUAN, H.; YUAN, F.; YANG, S.H. Neuroprotection targeting ischemic penumbra and beyond for the treatment of ischemic stroke. **Neurol Res.**, v. 34, n. 4, p. 331-337, 2012.
- LIU, T.; CLARK, R. K.; MCDONNELL, P. C.; YOUNG, P. R.; WHITE, R. F.; BARONE, F. C.; FEUERSTEIN, G. Z. Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. **Stroke.**, v. 25, p. 1481-1488, 1994.
- LIU, T.; MCDONNELL, P.C.; YOUNG, P.R.; WHITE, R.F.; SIREN, A.L.; HALLENBECK, J.M.; BARONE, F.C.; FEURESTEIN, G.Z. Interleukin-1 beta mRNA expression in ischemic rat cortex. **Stroke.**, v. 24, n. 11, p. 1746-1750, 1993.
- LIU, Y.; ZHANG, X.J.; YANG, C.H.; FAN, H.G. Oxymatrine protects rat brains against permanent focal ischemia and downregulates NF-kappaB expression. **Brain Res.**, v. 1268, p. 174-180, 2009.
- LO, E.H.; DALKARA, T.; MOSKOWITZ, M.A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. **Nat Rev Neurosci.**, v. 4, n. 5, p. 399-415, 2003.
- LONGA, E.Z.; WEINSTEIN, P.R.; CARLSON, S.; CUMMINS, R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. **Stroke.**, v. 20, n. 1, p. 84-91, 1989.
- LOVE, S. Oxidative stress in brain ischemia. **Brain Pathol.**, v. 9, n. 1, p. 119-131, 1999.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- LU, J.J.; FU, L.; TANG, Z.; ZHANG, C.; QIN, L.; WANG, J.; YU, Z.; SHI, D.; XIAO, X.; XIE, F.; HUANG, W.; DENG, W. Melatonin inhibits AP-2 $\beta$ /hTERT, NF- $\kappa$ B/COX-2 and Akt/ERK and activates caspase/Cyto C signaling to enhance the antitumor activity of berberine in lung cancer cells. **Oncotarget.**, v. 7, n. 3, p. 2985-3001, 2016.
- LU, T.; LIANG, Y.; SONG, J.; XIE, L.; WANG, G.J.; LIU, X.D. Simultaneous determination of berberine and palmatine in rat plasma by HPLC-ESI-MS after oral administration of traditional Chinese medicinal preparation Huang-Lian-Jie-Du decoction and the pharmacokinetic application of the method. **J Pharm Biomed Anal.**, v. 40, n. 5, p. 1218-1224, 2006.
- MA, F.; CHEN, Y.; LI, J.; QING, H.P.; WANG, J.D.; ZHANG, Y.L.; LONG, B.G.; BAI, Y. Screening test for anti-Helicobacter pylori activity of traditional Chinese herbal medicines. **World J Gastroenterol.**, v. 16, n. 44, p. 5629-5634, 2010.

- MA, W.K.; LI, H.; DONG, C.L.; HE, X.; GUO, C.R.; ZHANG, C.F.; YU, C.H.; WANG, C.Z.; YUAN, C.S. Palmatine from *Mahonia bealei* attenuates gut tumorigenesis in ApcMin/+ mice via inhibition of inflammatory cytokines. **Mol Med Rep.**, v. 14, n. 1, p. 491-8, 2016.
- MADDEN, K.; CLARK, W.; LESSOV, N. Failure of ischemic neuroprotection by potentiators of gamma-aminobutyric acid. **Clin Med Res.**, v. 1, n. 2, p. 119-124, 2003.
- MAK, S.; LUK, W.W.; CUI, W.; HU, S.; TSIM, K.W.; HAN, Y. Synergistic inhibition on acetylcholinesterase by the combination of berberine and palmatine originally isolated from Chinese medicinal herbs. **J Mol Neurosci.**, v. 53, n. 3, p. 511-516, 2014.
- MAKAR, T.K.; NEDERGAARD, M.; PREUSS, A.; GELBARD, A.S.; PERUMAL, A.S.; COOPER, A.J. Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. **J Neurochem.**, v. 62, n. 1, p. 45-53, 1994.
- MALEKI, S.N.; ABOUTALEB, N.; SOURI, F. Berberine confers neuroprotection in coping with focal cerebral ischemia by targeting inflammatory cytokines. **J Chem Neuroanat.**, 2017. doi: 10.1016/j.jchemneu.2017.04.008
- MALLER, J.J. Neuroplasticity in normal and brain injured patients: potential relevance of ear wiggling locus of control and cortical projections. **Med Hypotheses.**, v. 83, n. 6, p. 838-843, 2014.
- MALLMANN, A.B.; FUCHS, S.C.; GUS, M.; FUCHS, F.D.; MOREIRA, L.B. Population-attributable risks for ischemic stroke in a community in South Brazil: a case-control study. **PLoS One.**, v. 7, n. 4, p. e35680, 2012.
- MANSOORALI, K.P.; PRAKASH, T.; KOTRESHA, D.; PRABHU, K.; RAMA RAO, N. Cerebroprotective effect of *Eclipta alba* against global model of cerebral ischemia induced oxidative stress in rats. **Phytomedicine.**, v. 19, n. 12, p. 1108-1116, 2012.
- MARTIN, R.L.; LLOYD, H.G.; COWAN, A.I. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? **Trends Neurosci.**, v. 17, n. 6, p. 251-7, 1994.
- MATTSON, M.P.; CAMANDOLA, S. NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. **J Clin Invest.**, v. 107, n. 3, p. 247-254, 2001.
- MATTSON, M.P.; SCHEFF, S.W. Endogenous neuroprotection factors and traumatic brain injury: mechanisms of action and implications for therapy. **J Neurotrauma.**, v. 11, n. 1, p. 3-33, 1994.
- MAUD, A. Patient page. Memory loss after stroke. **Am. Acad. Neurol.**, v.24, n. 8, p. 67, 2006.
- MEHTA, S.L.; MANHAS, N.; RAGHUBIR, R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. **Brain Res Rev.**, v. 54, n. 1, p. 34-66, 2007.

MELONI, B.P.; ZHU, H.; KNUCKEY, N.W. Is magnesium neuroprotective following global and focal cerebral ischaemia? A review of published studies. **Magnes Res**, v. 19, n. 2, p. 123-137, 2006.

MENNITI, F.S.; REN, J.; COSKRAN, T.M.; LIU, J.; MORTON, D.; SIETSMA, D.K.; SOM, A.; STEPHENSON, D.T.; TATE, B.A.; FINKLESTEIN, S.P. Phosphodiesterase 5A inhibitors improve functional recovery after stroke in rats: optimized dosing regimen with implications for mechanism. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 331, n. 3, p. 842-850, 2009.

MI, R.; TU, B.; BAI, X.T.; CHEN, J.; OUYANG, Y.; HU, Y.J. Binding properties of palmatine to DNA: spectroscopic and molecular modeling investigations. **Luminescence.**, v. 30, n. 8, p. 1344-1351, 2015.

MICHALSKI, D.; HARTIG, W.; SCHNEIDER, D.; HOBOM, C. Use of normobaric and hyperbaric oxygen in acute focal cerebral ischemia: a preclinical and clinical review. **Acta Neurol Scand**, v. 123, n. 2, p. 85-97, 2011.

MIMISTÉRIO DA SAÚDE, 2015 disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio#61>. Acesso: Abril, 2017.

MOGHADDAM, H.K.; BALUCHNEJADMOJARAD, T.; ROGHANI, M.; KHAKSARI, M.; NOROUZI, P.; AHOOIE, M.; MAHBOOBI, F. Berberine ameliorate oxidative stress and astrogliosis in the hippocampus of STZ-induced diabetic rats. **Mol Neurobiol.**, v. 49, n.2, p. 820-826, 2014.

MONTANER, J.; MOLINA, C.A.; MONASTERIO, J.; ABILLEIRA, S.; ARENILLAS, J.F.; RIBÓ, M.; QUINTANA, M.; ALVAREZ-SABÍN, J. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. **Circulation.**, v. 107, n. 4, p. 598-603, 2003.

MORIOKA, T.; KALEHUA, A.N.; STREIT, W.J. Characterization of microglial reaction after middle cerebral artery occlusion in rat brain. **J Comp Neurol.**, v. 327, n. 1, p. 123-132, 1993.

MURPHY, A.N.; FISKUM, G.; BEAL, M.F. Mitochondria in neurodegeneration: bioenergetic function in cell life and death. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 19, n. 3, p. 231-45, 1999.

MYTHRI, R.B., BHARATH, S. Curcumin: A Potential Neuroprotective Agent in Parkinson's Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v 18, p. 91-99, 2012.

NAVONE, F.; JAHN, R.; DI GIOIA, G.; STUKENBROK, H.; GREENGARD, P.; DE CAMILLI, P. Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. **Cell Biol.**, v. 103, n. 6 Pt 1, p. 2511-27, 1986.

NEVES, Julliana Catharina de Sousa. Efeito protetor da berberina no dano cerebral, déficit de memória, estresse oxidativo e inflamação de camundongos submetidos a isquemia cerebral focal permanente. 2016. 95f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

NICHOLLS, D.; ATTWELL, D. The release and uptake of excitatory amino acids. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 11, n. 11, p. 462-468, 1990.

NING, N.; HE, K.; WANG, Y.; ZOU, Z.; WU, H.; LI, X.; YE, X. Hypolipidemic Effect and Mechanism of Palmatine from *Coptis chinensis* in Hamsters Fed High-Fat diet. **Phytother Res.**, v. 29, n. 5, p. 668-673, 2015.

NKWENGOUA, E.T.; NGANTCHOU, I.; NYASSE, B.; DENIER, C.; BLONSKI, C.; SCHNEIDER, B. In vitro inhibitory effects of palmatine from *Enantia chlorantha* on *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum*. **Nat Prod Res.**, v. 23, n. 12, p. 1144-1150, 2009.

NOGAWA, S.; FORSTER, C.; ZHANG, F.; NAGAYAMA, M.; ROSS, M.E.; IADECOLA, C. Interaction between inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 after cerebral ischemia. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 95, n. 18, p. 10966-10971, 1998.

NOGAWA, S.; ZHANG, F.; ROSS, M.E.; IADECOLA, C. Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. **J Neurosci.**, v. 17, n. 8, p. 2746-55, 1997.

NURMI, A.; *et al.* Nuclear factor-kappaB contributes to infarction after permanent focal ischemia. **Stroke.**, v. 35, n. 4, p. 987-991, 2004.

O'CALLAGHAN, J.P.; SRIRAM, K. Glial fibrillary acidic protein and related glial proteins as biomarkers of neurotoxicity. **Exp. Opin. Drug Saf.**, p. 433-442, 2005.

OHTA, Y.; KOBAYASHI, T.; NISHIDA, K.; SASAKI, E.; ISHIGURO, I. Preventive effect of Oren-gedoku-to (Huanglian-Jie-Du-Tang) extract on the development of stress-induced acute gastric mucosal lesions in rats. **J Ethnopharmacol.**, v. 67, n. 3, p. 377-384, 1999.

OLAMOYEGUN, M.A.; AKINLADE, A.T.; FAWALE, M.B.; OGBERA, A.O. Dyslipidaemia as a risk factor in the occurrence of stroke in Nigeria: prevalence and patterns. **Pan Afr Med J.**, v. 25, n. 72, p. 1-7, 2016.

O'NEILL, L.A.; KALTSCHMIDT, C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. **Trends Neurosci.**, v. 20, n. 6, p. 252-8, 1997.

OSAKA, N.; OSAKA, M.; KONDO, H.; MORISHITA, M.; FUKUYAMA, H.; SHIBASAKI, H. The neural basis of executive function in working memory: an fMRI study based on individual differences. **Neuroimage.**, v. 21, n. 2, p. 623-31, 2004.

OU-YANG, Y.; LI, X.L.; WANG, H.; FANG, M.; HU, Y.J. Determination of the specific interaction between palmatine and bovine serum albumin. **Mol Biol Rep.**, v. 39, n. 5, p. 5495-5501, 2012.

PANDOLFO, P.; MACHADO, N.J.; KÖFALVI, A.; TAKAHASHI, R.N.; CUNHA, R.A. Caffeine regulates frontocortico-striatal dopamine transporter density and improves attention and cognitive deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. **Eur Neuropsychopharmacol.**, v. 23, n. 4, p. 317-328, 2013.

PARK, E.K.; RHEE, H.I.; JUNG, H.S.; JU, S.M.; LEE, Y.A.; LEE, S.H.; HONG, S.J.; YANG, H.I.; YOO, M.C.; KIM, K.S. Antiinflammatory effects of a combined herbal preparation (RAH13) of *Phellodendron amurense* and *Coptis chinensis* in animal models of inflammation. **Phytother Res.**, v. 21, n. 8, p. 746-50, 2007.

PARK, W.B.; CHO, J.S.; SHIN, S.D.; KONG, S.Y.; KIM, J.J.; LIM, Y.S.; YANG, H.J.; LEE, G. Comparison of epidemiology, emergency care, and outcomes of acute ischemic stroke between young adults and elderly in Korean population: a multicenter observational study. **J Korean Med Sci.**, v. 29, n. 7, p. 985-991, 2014.

PEKKNY, M.; NILSSON, M. Astrocyte activation and reactive gliosis. **Glia.**, v. 50, n. 4, p. 427-34, 2005.

PEREGO, C.; FUMAGALLI, S.; DE SIMONI, M.G. Three-dimensional confocal analysis of microglia/macrophage markers of polarization in experimental brain injury. **J Vis Exp.**, v. 4, n. 79, p. 1-7, 2013.

PÉREZ-ÁLVAREZ, M.J.; MAZA, M.DEL C.; ANTON, M.; ORDOÑEZ, L.; WANDOSELL, F. Post-ischemic estradiol treatment reduced glial response and triggers distinct cortical and hippocampal signaling in a rat model of cerebral ischemia. **J Neuroinflammation.**, v. 9, p. 1-13, 2012.

PULSINELLI, W. Pathophysiology of acute ischaemic stroke. **Lancet.**, v. 339, n. 8792, p. 533-6, 1992.

QIAO, H.; DONG, L.; ZHANG, X.; ZHU, C.; ZHANG, X.; WANG, L.; LIU, Z.; CHEN, L.; XING, Y.; WANG, C.; LI, Y. Protective effect of luteolin in experimental ischemic stroke: upregulated SOD1, CAT, Bcl-2 and claudin-5, down-regulated MDA and Bax expression. **Neurochem Res.**, v. 37, n. 9, p. 2014-2024, 2012.

QIN-WEI, Z.; YONG-GUANG, L.I. Berberine attenuates myocardial ischemia reperfusion injury by suppressing the activation of PI3K/AKT signaling. **Exp Ther Med.**, v. 11, n. 3, p. 978-984, 2016.

QU, Z.; ZHANG, J.; YANG, H.; HUO, L.; GAO, J.; CHEN, H.; GAO, W. Protective effect of tetrahydropalmatine against d-galactose induced memory impairment in rat. **Physiol Behav.**, v. 154, p. 114-125, 2016.

RAICHLE, M.E. The pathophysiology of brain ischemia. **Ann Neurol**, v. 12, n 1, p.2-10, 1983.

RAO, A.V., BALACHANDRAN, B. Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Neurwodegenerative Diseases. **Nutritional Neuroscience**, v. 5, p. 291–309, 2002.

REFAAT, A.; ABDELHAMED, S.; YAGITA, H.; INOUE, H.; YOKOYAMA, S.; HAYAKAWA, Y.; SAIKI, I. Berberine enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in breast cancer. **Oncol Lett.**, v. 6, n. 3, p. 840-844, 2013.

RICE, J.E.; VANNUCCI, R.C.; BRIERLEY, J.B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. **Ann Neurol.**, v. 9, n. 2, p. 131-141, 1981.

ROSITO, M., LAURO, C.; CHECE, G.; PORZIA, A.; MONACO, L.; MAINIERO, F.; CATALANO, M.; LIMATOLA, C.; TRETTEL, F. Transmembrane chemokines CX3CL1 and CXCL16 drive interplay between neurons, microglia and astrocytes to counteract pMCAO and excitotoxic neuronal death. **Front Cell Neurosci.**, v. 8, p.1-10, 2014.

ROSS, R.S.; MCGAUGHY, J.; EICHENBAUM, H. Acetylcholine in the orbitofrontal cortex is necessary for the acquisition of a socially transmitted food preference. **Learn Mem.**, v. 12, n. 3, p. 302-306, 2005.

RUAN, Z.; WANG, H.M.; HUANG, X.T.; FU, Y.; WU, J.; YE, C.Y.; LI, J.L.; WU, L.; GONG, Q.; ZHAO, W.M.; ZHANG, H.Y. A novel caffeoyl triterpene attenuates cerebral ischemic injury with potent anti-inflammatory and hypothermic effects. **J Neurochem.**, v. 133, n. 1, p. 93-103, 2015.

RUCHKIN, D.S.; GRAFMAN, J.; CAMERON, K.; BERNDT, R.S. Working memory retention systems: a state of activated long-term memory. **Behav Brain Sci.**, v. 26, n. 6, p. 709-28, 2003.

SADANA, P.; COUGHLIN, L.; BURKE, J.; WOODS, R.; MDZINARISHVILI, A. Anti-edema action of thyroid hormone in MCAO model of ischemic brain stroke: Possible association with AQP4 modulation. **J Neurol Sci.**, v. 354, n. 1-2, p. 37-45, 2015.

SAKI, K.; EFTEKHARI, Z.; NAGHDI, N.; BAHMANI, M. Berberis vulgaris as an antihypertensive drug; berbamine and oxycontin antihypertensive active ingredients. **Journal of Preventive Epidemiology**, v. 1, n.2, p. e18, 2016.

SARTER, M.; BODEWITZ, G.; STEPHENS, D. N. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. **Psychopharmacology**, v. 94, n.8, p. 491-495, 1988.

SARWAR, N.; GAO, P.; SESHASAI, S.R., et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. **Lancet.**, v. 375, n. 9733, p. 2215-2222, 2010.

SCHMIDT, S.D.; FURINI, C.R.G.; ZINN, C.G.; CAVALCANTE, L.E.; FERREIRA, F.F.; BEHLING, J.A.K.; MYSKIW, J.C.; IZQUIERDO, I. Modulation of the consolidation and reconsolidation of fear memory by three different serotonin receptors in hippocampus. **Neurobiol Learn Mem.**, v. 142, p. 48-54, 2017.

SCHNEIDER, A.; MARTIN-VILLALBA, A.; WEIH, F.; VOGEL, J.; WIRTH, T.; SCHWANINGER, M. NF-kappaB is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia. **Nat Med.**, v. 5, n. 5, p. 554-9, 1999.

SCHWAB, J.M.; SCHLUESENER, H.J. Cyclooxygenases and central nervous system inflammation: conceptual neglect of cyclooxygenase 1. **Arch Neurol.**, v. 60, n. 4, p. 630-2, 2003.

SEKIYA, N.; KAINUMA, M.; HIKIAMI, H.; NAKAGAWA, T.; KOUTA, K.; SHIBAHARA, N.; SHIMADA, Y.; TERASAWA, K. Oren-gedoku-to and Keishi-bukuryo-gan-ryo inhibit the progression of atherosclerosis in diet-induced hypercholesterolemic rabbits. **Biol Pharm Bull.**, v. 28, n. 2, p. 294-298, 2005.

SHENG, H.; BART, R.D.; OURY, T.D.; PEARLSTEIN, R.D.; CRAPO, J.D.; WARNER, D.S. Mice overexpressing extracellular superoxide dismutase have increased resistance to focal cerebral ischemia. **Neuroscience.**, v. 88, n. 1, p. 185-91, 1999.

SHERWOOD, T.W.; LEE, K.G.; GORMLEY, M.G.; ASKWITH, C.C. Heteromeric acid-sensing ion channels (ASICs) composed of ASIC2b and ASIC1a display novel channel properties and contribute to acidosis-induced neuronal death. **J Neurosci.**, v. 31, n. 26, p. 9723-34, 2011.

SICARD, K. M.; FICHER, M. Animal models of focal brain ischemia. **Experimental & Translational Stroke Medicine**, v. 1, p. 7, 2009.

SIESJÖ, B.K.; AGARDH, C.D.; BENGTSSON, F. Free radicals and brain damage. **Cerebrovasc Brain Metab Rev.**, v. 1, n. 3, p. 165-211, 1989.

SIESJÖ, B.K.; KATSURA, K.; ZHAO, Q.; FOLBERGROVÁ, J.; PAHLMARK, K.; SIESJÖ, P.; SMITH, M.L. Mechanisms of secondary brain damage in global and focal ischemia: a speculative synthesis. **J Neurotrauma.**, v. 12, n. 5, p. 943-956, 1995.

SILVA, Ana Thaís Araújo da Fisetina, um flavonoide, que protege camundongos do dano neuronal e déficits de memória induzido por isquemia cerebral focal permanente. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

SINGH, D.P.; CHOPRA, K. Verapamil augments the neuroprotectant action of berberine in rat model of transient global cerebral ischemia. **Eur J Pharmacol.**, v. 720, n. 1-3, p. 98-106, 2013.

SMITH, W.L.; DEWITT, D.L. Biochemistry of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and synthase-2 and their differential susceptibility to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Semin Nephrol.**, v. 15, n. 3, p. 179-94, 1995.

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

SQUIRE, L. R.; ZOLA, S. M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 24, p. 13515-13522, 1996.

STOLL, G.; JANDER, S.; SCHROETER, M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. **Prog Neurobiol.**, v. 56, n. 2, p. 149-71, 1998.

STOLL, G.; KLEINSCHNITZ, C.; NIESWANDT, B. Molecular mechanisms of thrombus formation in ischemic stroke: novel insights and targets for treatment. **Blood.**, v. 112, n. 9, p. 3555-62, 2008.

STONE, W.S.; WALSER, B.; GOLD, S.D.; GOLD, P.E. Scopolamine- and morphine-induced impairments of spontaneous alternation performance in mice: reversal with glucose and with cholinergic and adrenergic agonists. **Behav Neurosci.**, v. 105, n. 2, p 264-271, 1991.

STREIT, W.J. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. **Glia.**, v. 40, n. 2, p. 133-9, 2002.

STROEMER, R.P.; KENT, T.A.; HULSEBOSCH, C.E. Enhanced neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery with D-amphetamine therapy after neocortical infarction in rats. **Stroke.**, v. 29, n. 11, p. 2381-2393, 1998.

STRÖM, J.O.; INGBERG, E.; THEODORSSON, A.; THEODORSSON, E. Method parameters' impact on mortality and variability in rat stroke experiments: a meta-analysis. **BMC Neurosci.**, v. 14, n. 41, p. 1-24, 2013.

SUN, Z.K.; YANG, H.Q.; SHENG, S.D. Traditional Chinese medicine: a promising candidate for the treatment of Alzheimer's disease. **Transl Neurodegener.**, v. 2, n .1, p. 1-7, 2013.

SUNG, Y.H.; KIM, S.C.; HONG, H.P; PARK, C.Y.; SHIN, M.S.; KIM, C.J.; SEO, J.H.; KIM, D.Y.; KIM, D.J.; CHO, H.J. Treadmill exercise ameliorates dopaminergic neuronal loss through suppressing microglial activation in Parkinson's disease mice. **Life Sci.**, v. 91, n. 25-26, p. 1309-16, 2012.

SVEINSSON, O. A.; KJARTANSSON, O.; VALDIMARSSON, E. M. Cerebral ischemia/infarction - diagnosis and treatment. **Laeknabladid**, v. 100, n. 7-8, p.393-401, 2014.

TAMURA, A.; GRAHAM, D. I.; MCCULLOCH, J.; TEASDALE, G. M. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 1, n. 1, p. 53-60, 1981.

TAN, L.; LI, C.; CHEN, H.; MO, Z.; ZHOU, J.; LIU, Y.; MA, Z.; XU, Y.; YANG, X.; XIE, J.; SU, Z. Epiberberine, a natural protoberberine alkaloid, inhibits urease of *Helicobacter pylori* and jack bean: Susceptibility and mechanism. **Eur J Pharm Sci.**, 2017. doi: 10.1016/j.ejps.2017.02.004.

TANG, Y.; *et al.* Gene expression in blood changes rapidly in neutrophils and monocytes after ischemic stroke in humans: a microarray study. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 26, n. 8, p. 1089-102, 2006.

TAYLOR, R.A.; SANSING, L.H. Microglial responses after ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. **Clin Dev Immunol.**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

TRAYSTMAN, R. J. Animal model of focal and global cerebral ischemia. **ILAR Journal.**, v. 44, n. 2, 2003.

TU, X.K.; YANG, W.Z.; SHI, S.S.; WANG, C.H.; CHEN, C.M. Neuroprotective effect of baicalin in a rat model of permanent focal cerebral ischemia. **Neurochem Res.**, v. 34, n. 9, p. 1626-1634, 2009.

TU, X.K.; YANG, W.Z.; SHI, S.S.; WANG, C.H.; ZHANG, G.L.; NI, T.R.; CHEN, C.M.; WANG, R.; JIA, J.W.; SONG, Q.M. Spatio-temporal distribution of inflammatory reaction and expression of TLR2/4 signaling pathway in rat brain following permanent focal cerebral ischemia. **Neurochem Res.**, v. 35, n. 8, p. 1147-1155, 2010.

TÜREYEN, K.; VEMUGANTI, R.; SAILOR, K.A.; DEMPSEY, R.J. Infarct volume quantification in mouse focal cerebral ischemia: a comparison of triphenyltetrazolium chloride and cresyl violet staining techniques. **J Neurosci Methods.**, v. 139, n. 2, p. 203-207, 2004.

VIANA-BAPTISTA, M. Ischemic Stroke: Increasing the Number of Patients Submitted to Acute Specific Therapy and Estimating the Individual Benefits. **Acta Med Port.**, v. 29, n. 11, p. 683, 2016.

VIDALE, S.; CONSOLI, A.; ARNABOLDI, M.; CONSOLI, D. Postischemic Inflammation in Acute Stroke. **J Clin Neurol.**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2017.

WAHL, F.; ALLIX, M.; PLOTKINE, M.; BOULU, R.G. Neurological and behavioral outcomes of focal cerebral ischemia in rats. **Stroke.**, v. 23, n. 2, p. 267-272, 1992.

WANG, L., *et al.* Gastroprotective effect of palmatine against acetic acid-induced gastric ulcers in rats. **J Nat Med.**, v. 71, n. 1, p. 257-264, 2017.

WANG, P.R.; WANG, J.S.; YANG, M.H.; KONG, L.Y. Neuroprotective effects of Huang-Lian-Jie-Du-Decoction on ischemic stroke rats revealed by (1)H NMR metabolomics approach. **J Pharm Biomed Anal.**, v. 88, p. 106-16, 2014a.

WANG, P.R.; WANG, J.S.; ZHANG, C.; SONG, X.F.; TIAN, N.; KONG, L.Y. Huang-Lian-Jie-Du-Decoction induced protective autophagy against the injury of cerebral ischemia/reperfusion via MAPK-mTOR signaling pathway. **J Ethnopharmacol.**, v. 149, n. 1, p. 270-280, 2013.

WANG, W.; MA, X.; HAN, J.; ZHOU, M.; REN, H.; PAN, Q.; ZHENG, C.; ZHENG, Q. Correction: Neuroprotective Effect of Scutellarin on Ischemic Cerebral Injury by Down-Regulating the Expression of Angiotensin-Converting Enzyme and AT1 Receptor. **PLoS One.**, v. 11, p. e0147780, 2016.

WANG, X.; CHENG, S.; BROPHY, V.H., *et al.* A meta-analysis of candidate gene polymorphisms and ischemic stroke in 6 study populations: association of lymphotoxin-alpha in nonhypertensive patients. **Stroke.**, v. 40, n. 3, p. 683-695, 2009.

WANG, X.; YUE, T. L.; BARONE, F. C.; FEUERSTEIN, G. Z. Monocyte chemoattractant protein-1 messenger RNA expression in rat ischemic cortex. **Stroke.**, v. 26, p. 661-666, 1995.

WANG, X.; YUE, T. L.; BARONE, F. C.; WHITE, R. F.; GAGNON, R. C.; FEUERSTEIN, G. Z. Concomitant cortical expression of TNF-alpha and IL-1 beta mRNAs follows early response gene expression in transient focal ischemia. **Mol. Chem. Neuropathol.**, v. 23, p. 103-114, 1994.

WANG, Y.; YI, X.; GHANAM, K.; ZHANG, S.; ZHAO, T.; ZHU, X. Berberine decreases cholesterol levels in rats through multiple mechanisms, including inhibition of cholesterol absorption. **Metabolism.**, v. 63, n. 9, p. 1167-1177, 2014b.

WATTANATHORN, J.; JITTIWAT, J.; TONGUN, T.; MUCHIMAPURA, S.; INGGANINAN, K. Zingiber officinale Mitigates Brain Damage and Improves Memory Impairment in Focal Cerebral Ischemic Rat. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 2011, p. 1-8, 2011.

WEN, S.Q.; JEYAKKUMAR, P.; AVULA, S.R.; ZHANG, L.; ZHOU, C.H. Discovery of novel berberine imidazoles as safe antimicrobial agents by down regulating ROS generation. **Bioorg Med Chem Lett.**, v. 26, n. 12, p. 2768-2773, 2016.

WIEBERS, D.O.; ADAMS, H.P.JR.; WHISNANT, J.P. Animal models of stroke: are they relevant to human disease? **Stroke.**, v. 21, n. 1, p. 1-3, 1990.

WOO.; *et al.* Berberine Ameliorates Hepatic Steatosis and Suppresses Liver and Adipose Tissue Inflammation in Obesity Mice Independent of AMPK. **The FASEB Journal**, v. 30, n. 1, p. 1-10, 2016.

WOODRUFF, T.M.; THUNDYIL, J.; TANG, S.C.; SOBEY, C.G.; TAYLOR, S.M.; ARUMUGAM, T.V. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. **Mol Neurodegener.**, v. 6, n. 1, p. 1-19, 2011.

WU, J.; XIAO, Q.; ZHANG, N.; XUE, C.; LEUNG, A.W.; ZHANG, H.; TANG, Q.J.; XU, C. Palmatine hydrochloride mediated photodynamic inactivation of breast cancer MCF-7 cells: Effectiveness and mechanism of action. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, v. 15, p. 133-138, 2016.

WU, J.S.; LIU, Y.; SHI, R.; LU, X.; MA, Y.M.; CHENG, N.N. Effects of combinations of Xiexin decoction constituents on diabetic nephropathy in rats. **J Ethnopharmacol.**, v. 157, p. 126-133, 2014.

WU, P.F.; ZHANG, Z.; WANG, F.; CHEN, J.G. Natural compounds from traditional medicinal herbs in the treatment of cerebral ischemia/reperfusion injury. **Acta Pharmacol Sin.**, v. 31, n. 12, p. 1523-1531, 2010.

XIAO, C.W.; JI, Q.A.; WEI, Q.; LIU, Y.; BAO, G.L. Antifungal activity of berberine hydrochloride and palmatine hydrochloride against *Microsporum canis* -induced dermatitis in rabbits and underlying mechanism. **BMC Complement Altern Med.**, v. 15, p. 1-15, 2015.

XIAO, H.T.; PENG, J.; LIANG, Y.; YANG, J.; BAI, X.; HAO, X.Y.; YANG, F.M.; SUN, Q.Y. Acetylcholinesterase inhibitors from *Corydalis yanhusuo*. **Nat Prod Res.**, v. 25, n. 15, p. 1418-1422, 2011.

XU, H.; *et al.* Gene expression in peripheral blood differs after cardioembolic compared with large-vessel atherosclerotic stroke: biomarkers for the etiology of ischemic stroke. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 28, n. 7, p. 1320-8, 2008.

XU, J.; MURAKAMI, Y.; MATSUMOTO, K.; TOHDA, M.; WATANABE, H.; ZHANG, S.; YU, Q.; SHEN, J. Protective effect of Oren-gedoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang) against impairment of learning and memory induced by transient cerebral ischemia in mice. **J Ethnopharmacol.**, v. 73, n. 3, p. 405-413, 2000.

XUE, Y.; XIONG, J.; SHI, H.L.; LIU, Y.M.; QING, L.S.; LIAO, X. In vitro metabolic study of Rhizoma coptidis extract using liver microsomes immobilized on magnetic nanoparticles. **Anal Bioanal Chem.**, v. 405, n. 27, p. 8807-8817, 2013.

YAMAGAMI, S.; TAMURA, M.; HAYASHI, M.; ENDO, N.; TANABE, H.; KATSUURA, Y.; KOMORIYA, K. Differential production of MCP-1 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant in the ischemic brain after transient focal ischemia in rats. **J Leukoc Biol.**, v. 65, n. 6, p. 744-749, 1999.

YAN, B.; WANG, D.; DONG, S.; CHENG, Z.; NA, L.; SANG, M.; YANG, H.; YANG, Z.; ZHANG, S.; YAN, Z. Palmatine inhibits TRIF-dependent NF- $\kappa$ B pathway against inflammation induced by LPS in goat endometrial epithelial cells. **Int Immunopharmacol.**, v. 45, p. 194-200, 2017.

YANG, C.; ZHANG, X.; FAN, H.; LIU, Y. Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia. **Brain Res.**, v. 1282, p. 133-141, 2009.

YANG, G.Y.; GONG, C.; QIN, Z.; YE, W.; MAO, Y.; BERTZ, A.L. Inhibition of TNF $\alpha$  attenuates infarct volume and ICAM-1 expression in ischemic mouse brain. **Neuroreport.**, v. 9, n. 9, p. 2131-2314, 1998.

YANG, Z.; ZHONG, L.; ZHONG, S.; XIAN, R.; YUAN, B. Hypoxia induces microglia autophagy and neural inflammation injury in focal cerebral ischemia model. **Exp Mol Pathol.**, v. 98, n. 2, p. 219-224, 2015.

YE, Y.; HUANG, C.; JIANG, L.; SHEN, X.; ZHU, S.; RAO, Y.; WANG, J.; ZHANG, Q. Huanglian-Jie-Du-Tang extract protects against chronic brain injury after focal cerebral ischemia via hypoxia-inducible-factor-1 $\alpha$ -regulated vascular endothelial growth factor signaling in mice. **Biol Pharm Bull.**, v. 35, n. 3, p. 355-361, 2012.

YOO, K.Y.; HWANG, I.K.; KIM, J.D.; KANG, I.J.; PARK, J.; YI, J.S.; KIM, J.K.; BAE, Y.S.; WON, M.H. Antiinflammatory effect of the ethanol extract of *Berberis koreana* in a gerbil model of cerebral ischemia/reperfusion. **Phytother Res.**, v. 22, n.11, p. 1527-1532, 2008.

ZARRUK, J.G.; GREENHALGH, A.D.; DAVID, S. Microglia and macrophages differ in their inflammatory profile after permanent brain ischemia. **Exp Neurol.**, 2017. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.08.011, 2017.

ZHANG, Q.; MA, Y.M.; WANG, Z.T.; WANG, C.H. Differences in pharmacokinetics and anti-inflammatory effects between decoction and maceration of Sanhuang Xiexin Tang in rats and mice. **Planta Med.**, v. 79, n. 17, p. 1666-1673, 2013.

ZHANG, Q.G.; XU, Y.L.; LI, H.C.; HAN, D.; ZHANG, G.Y. NMDA receptor/L-VGCC-dependent expression and AMPA/KA receptor-dependent activation of c-Jun induced by cerebral ischemia in rat hippocampus. **Neurosci Lett.**, v. 398, n. 3, p. 268-73, 2006.

ZHANG, X *et al.* Neuroprotection of early and short-time applying berberine in the acute phase of cerebral ischemia: up-regulated pAkt, pGSK and pCREB, down-regulated NF- $\kappa$ B expression, ameliorated BBB permeability. **Brain Res.**, v. 1459, p. 61-70, 2012.

ZHANG, Z.; LI, X.; LI, F.; AN, L. Berberine alleviates postoperative cognitive dysfunction by suppressing neuroinflammation in aged mice. **Int Immunopharmacol.**, v. 38, p.426-433, 2016.

ZHAO, T.; ZHANG, X.; ZHAO, Y.; ZHANG, L.; BAI, X.; ZHANG, J.; ZHAO, X.; CHEN, L.; WANG, L.; CUI, L. Pretreatment by evodiamine is neuroprotective in cerebral ischemia: up-regulated pAkt, pGSK3 $\beta$ , down-regulated NF- $\kappa$ B expression, and ameliorated BBB permeability. **Neurochem Res.**, v. 39, n. 8, p. 1612-1620, 2014.

ZHOU, J.T.; LI, C.L.; TAN, L.H.; XU, Y.F.; LIU, Y.H.; MO, Z.Z.; DOU, Y.X.; SU, R.; SU, Z.R.; HUANG, P.; XIE, J.H. Inhibition of Helicobacter pylori and Its Associated Urease by Palmatine: Investigation on the Potential Mechanism. **PLoS One.**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2017.

ZHOU, Z.B.; MENG, L.; GELB, A.W.; LEE, R.; HUANG, W.Q. Cerebral ischemia during surgery: an overview. **The Journal of Biomedical Research.**, v. 30, n. 2, p. 83-87, 2016.

ZHU, H.; QIAN, Z.; HE, F.; LIU, M.; PAN, L.; ZHANG, Q.; TANG, Y. Novel pharmacokinetic studies of the Chinese formula Huang-Lian-Jie-Du-Tang in MCAO rats. **Phytomedicine.**, v. 20, n. 10, p. 767-774, 2013.

ZHU, H.; QIAN, Z.; LI, H.; GUO, L.; PAN, L.; ZHANG, Q.; TANG, Y. Integrated pharmacokinetics of major bioactive components in MCAO rats after oral administration of Huang-Lian-Jie-Du-Tang. **J Ethnopharmacol.**, v. 141, n. 1, p. 158-169, 2012.

ZIVIN, J.A. Factors determining the therapeutic window for stroke. **Neurology.**, v. 50, n. 3, p. 599-603, 1998.

ZOU, H *et al.* Induced cortical neurogenesis after focal cerebral ischemia--Three active components from Huang-Lian-Jie-Du Decoction. **J Ethnopharmacol.**, v. 178, p. 115-124, 2016.



Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
CEP: 60430-970 Fortaleza-CE

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "ESTUDO DO EFEITO E MECANISMO DA PALMATINA SOBRE O DANO ISQUÊMICO E MEMÓRIA DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À CEREBRAL FOCAL PERMANENTE", protocolo nº109/2015, sob responsabilidade da Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 09 de dezembro de 2015.

Vigência do projeto	01/10/2015 a 31/07/2017
Espécie/Linhagem	Camundongo Swiss
Nº de Animais	168
Peso/Idade	25-30g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 10 de dezembro de 2015

Prof. Dr. Rodrigo Siqueira  
Coordenador do CEUA - UFC

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA  
COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM  
ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Siapa: 1520734