



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**JULLIANA CATHARINA DE SOUSA NEVES**

**EFEITO PROTETOR DA BERBERINA NO DANO CEREBRAL,  
DEFICIT DE MEMÓRIA, ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO  
DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA CEREBRAL  
FOCAL PERMANENTE.**

**FORTALEZA  
2012**

**JULLIANA CATHARINA DE SOUSA NEVES**

**EFEITO PROTETOR DA BERBERINA NO DANO CEREBRAL,  
DEFICIT DE MEMÓRIA, ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO  
DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA CEREBRAL  
FOCAL PERMANENTE.**

Dissertação apresentada à Coordenação do programa de Pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora:

Profa. Dr<sup>a</sup>. Geanne Matos de Andrade

**FORTALEZA-CE  
JULHO, 2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

- 
- N425e      Neves, Julliana Catharina de Sousa.  
              Efeito protetor da berberina no dano cerebral, déficit de memória, estresse oxidativo e  
              inflamação de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente / Julliana Catharina  
              de Sousa Neves. – 2012.  
              96 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde,  
              Faculdade de Medicina. Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2012.  
              Área de concentração: Farmacologia.  
              Orientação: Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade.

1. Isquemia Encefálica. 2. Berberina . 3. Memória. 4. Inflamação I. Título.

**JULLIANA CATHARINA DE SOUSA NEVES**

**EFEITO DA BERBERINA SOBRE O DANO NEURONAL, MEMÓRIA, ESTRESSE  
OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA  
FOCAL PERMANENTE.**

Dissertação apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

---

Aprovada em / /

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade (Orientadora)**  
**Universidade Federal do Ceará**

---

**Prof. Dr. Roberto Cesar Pereira Lima Júnior**  
**Universidade Federal do Ceará**

---

**Prof. Dr Reinaldo Barreto Oriá**  
**Universidade Federal do Ceará**

À Deus, por toda a força.  
Aos meus pais pelo amor incondicional.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por colocar sua graça sobre meu caminho;

Aos meus pais, José Vilmar e Maria Socorro, por sempre colocarem a minha felicidade acima de todas as coisas, por fazerem de mim a pessoa que sou e por me mostrarem o maior amor do mundo;

Ao meu noivo Leandro pela paciência, apoio, companheirismo e torcida nessa trajetória de felicidade e abnegações, por todos os planos que fazemos e que nos completam;

À minha Orientadora Geanne Matos de Andrade (Gê), por quem tenho muita admiração, carinho e gratidão, por tudo que me ensinou, ensina e ainda ensinará, em todos os anos desta especial convivência;

Aos meus primos Bruno, Ana Paula e Klesia, que, mesmo longe, torcem pelo meu sucesso e minha felicidade;

À minha família e meus “cocunhados” que tanto demonstram carinho e cuidado por mim;

“Tenho amigos que não sabem o quanto são meus amigos. Não percebem o amor que lhes devoto e a absoluta necessidade que tenho deles... E eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos! Até mesmo aqueles que não percebem o quanto são meus amigos e o quanto minha vida depende de suas existências... A alguns deles não procuro, basta-me saber que eles existem... **A gente não faz amigos, reconhece-os**” (Vinícius de Moraes);

À Analu, amiga de todas horas e muito especial, a quem devo muito por sua colaboração nesse trabalho;

À Maria Isabel (Bel), amiga irmã, a pessoa que melhor me conhece no mundo;

À Cecília (Cecys), pela força e companheirismo;

À Lívia (Livinha), por ser um exemplo de sucesso pra minha vida;

À Anaiara (Nana), que tem minha torcida por todo sempre;

À Juliana Pereira (Pererinha), que sempre me ajuda em tudo, por quem torço como torço pela minha felicidade;

À Carol (Cururu), pelo grato prazer de conhecê-la e fazer das minhas dificuldades as suas;

À Kelly Rose (Cabeça), Lucas e Igor, que tem toda minha admiração e carinho;

À Olga, doce Olga, que sempre está disponível para me ajudar e sempre com todo carinho;

À Marta, por dividir seu tempo em ajudar na conclusão deste trabalho;

À Ana Paula, por ser minha alegria constante no laboratório;

Ao Diego Fernandes, por perder várias horas em me ajudar nos experimentos;

Aos demais do laboratório, Ana Carla, Júlia, Priscila, Diego e Thales, por tornar mais feliz nossa convivência nesse ambiente.

À Ana Livia, meu porto de segurança, com quem posso desabafar e receber força;

À Yelena, por a enorme cumplicidade que é nossa amizade;

À Katia, que com sua dedicação em agradar a todos, ensina-me todos os dias como é bom fazer o bem;

À Liliane, que sempre consegue me acalmar;

Ao Carlos Eduardo (Dudu), meu amigo que sempre está disposto a me ouvir e ajudar;

Ao Marcelo, por ser esse amigo brincalhão e sério de todos os dias;

À Cristiane Feijó, por me dar continuamente exemplos de generosidade e apoio, sem a qual não poderia ser possível esse progresso;

Aos professores da pós graduação, por contribuírem com meu progresso;

Ao CNPQ, FUNCAP E INCT;

Enfim,

À todos que contribuíram direta ou indiretamente com esse trabalho, com quem divido um pouco dessa conquista, o meu muito obrigada.

“Todo mundo quer viver em cima da montanha,  
sem saber que a verdadeira felicidade está  
na forma de subir à escarpada.”  
(Gabriel Garcia Marques)

## RESUMO

O acidente vascular cerebral é a segunda principal causa de morte nos países industrializados, sendo comumente dividido em duas categorias: isquêmico e hemorrágico. O mecanismo da lesão isquêmica envolve estresse oxidativo, excitotoxicidade, disfunção mitocondrial, inflamação e apoptose. A Berberina (BE) é um alcalóide derivado do *Coptidis rhizom* que possui um potente efeito anti-inflamatório e anti-apoptótico. No presente estudo, foi investigado o efeito neuroprotetor da berberina sobre a isquemia cerebral focal (ICF) por oclusão permanente da artéria cerebral média (induzida por eletrocoagulação). Foram utilizados camundongos *Swiss* machos divididos em cinco grupos (n = 8), dentre eles: Falso operado (FO), ICF e ICF tratados com BE 50 ou 100 mg/kg/dia. BE ou veículo (água destilada) foram administrados por via intragástrica 30 min antes da ICF e diariamente durante 3 dias. Os parâmetros estudados foram função sensorio-motora, área de infarto isquêmico, memória de trabalho, reconhecimento de objetos, memória espacial e aversiva, mieloperoxidase (MPO) e glutatona reduzida (GSH), assim como neurodegeneração, através da coloração com FluoroJade C. Os animais submetidos à ICF apresentaram uma diminuição significativa do desempenho motor e função sensorial, no entanto, o tratamento com berberina não diminuiu o déficit neurológico induzido pela isquemia. Verificou-se um aumento significativo da área de infarto nos animais isquemiados, com um aumento de cerca de 70% em relação aos animais falso-operados, sendo esse aumento reduzido pelo tratamento com BE (50 e 100 mg/kg/dia). Observou-se uma diminuição da atividade exploratória vertical (*rearings*) no grupo submetido à ICF em relação ao grupo FO e uma prevenção desta diminuição pelo tratamento com BE100. O tratamento com BE100 melhorou também os déficits na memória tardia causados pela isquemia, avaliados pelo teste da esQUIVA passiva (latência - FO:  $235,0 \pm 33,3s$ ; ICF:  $84,7 \pm 23,3s$ ; ICF + BE100:  $300,0 \pm 0,0s$ ,  $p < 0,05$ ) e os déficits de memória espacial, avaliados pelo teste labirinto aquático (latência - FO:  $10,8 \pm 2,4\%$ ; ICF:  $23,4 \pm 3,9\%$ ; ICF + BE100:  $12,8 \pm 2,0$ ,  $p < 0,05$ ). O tratamento com BE 50 e 100 reduziu de forma significativa os déficits na memória de trabalho, avaliados pelo Y-maze (alternações espontâneas - FO:  $73,8 \pm 1,9\%$ ; ICF:  $57,2 \pm 2,7\%$ ; ICF + BE50:  $69,3 \pm 3,5$ ; ICF + BE100:  $71,9 \pm 3,97\%$ ,  $p < 0,05$ ), assim como os déficits na memória de reconhecimento de objetos (índice de reconhecimento - FO:  $0,51 \pm 0,09\%$ ; ICF:  $0,068 \pm 0,12\%$ ; ICF + BE50:  $0,42 \pm 0,09\%$ ; ICF+ BE100:  $0,58 \pm 0,16\%$ ,  $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis, Mann-Whitney). A degeneração neuronal nos grupos tratados com berberina foi significativamente menor que nos animais submetidos à ICF. Os animais submetidos à ICF mostraram um aumento nos níveis de GSH e MPO, sendo o tratamento com BE100 capaz de impedir o aumento da atividade da MPO no estriado (FO:  $1,53 \pm 0,48$ ; ICF:  $4,89 \pm 0,89$ ; ICF + BE100:  $2,52 \pm 0,47$ ;  $p < 0,05$ , ANOVA, Newman-Keuls). A Berberina mostrou um significativo efeito neuroprotetor, estando esse efeito relacionado, pelo menos em parte, à atividade anti-inflamatória desse composto.

**Palavras-chave:** Berberina. Isquemia cerebral focal. Memória. Neuroproteção. Inflamação. Estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Stroke is the second leading cause death in industrialized countries and can be subdivided into 2 categories, ischemic and hemorrhagic. The mechanisms of ischemic brain damage involve oxidative stress, excitotoxicity, mitochondrial dysfunction, inflammation and apoptosis. Berberine (BE) is an alkaloid derived from *Coptidis rhizom* which has potent anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. In present study, the neuroprotector effect of berberine after permanent middle cerebral artery occlusion (MCAO) was investigated. Male Swiss mice were divided into five groups (n=8): Sham operated (SO), MCAO, BE 50 and 100mg/kg/day plus MCAO. BE or vehicle (distilled water) were administrated intragastrically 30 min before MCAO (induced by electrocoagulation) and daily during 3 days. The parameters studied were sensorimotor function, working, object recognition, spatial and aversive memory, cerebral infarct area, myeloperoxidase (MPO) and reduced glutathione (GSH) levels and neurodegeneration through FluoroJade C staining. After MCAO a significant decrease of motor performance and sensory function was found after a neurological evaluation. However, berberine did not improve this neurological deficit. Ischemia caused a 70% increase of infarct area in MCAO group compared with SO, that was decreased by treatment with BE 50 and 100. We observed an increase of vertical exploratory activity (rearings) in the BE 100 group compared to the MCAO. BE 100 treatment also improved MCAO-induced late memory deficits in passive avoidance test (latency - SO: 235.0 ± 33.3s; MCAO: 84.7 ± 23.3s; MCAO + BE100: 300.0 ± 0.0s, p<0.05) and MCAO-induced spatial memory deficits evaluated by water maze test (latency - SO: 10.8 ± 2.4%; MCAO: 23.4 ± 3.9%; MCAO + BE100: 12.8 ± 2.0; p<0.05). BE 50 and 100 treatment significantly prevented the MCAO-induced working memory deficits in y-maze test (spontaneous alternations - SO: 73.8 ± 1.9%; MCAO: 57.2 ± 2.7%; MCAO + BE50: 69.3 ± 3.5; MCAO + BE100: 71.9 ± 3.97%; p<0.05) and object recognition memory deficits (recognition index - SO: 0.51 ± 0.09%; MCAO: 0.068 ± 0.12%; MCAO + BE50: 0.42 ± 0.09%; MCAO + BE100: 0.58 ± 0.16%; p<0.05, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney). Neuronal degeneration on berberine-treated groups was significantly less than those submitted to MCAO. Mice submitted to MCAO showed an increase in GSH and MPO levels. BE 100 treatment prevented the increase in MPO activity on striatum (SO: 1.53 ± 0.48; MCAO: 4.89 ± 0.89; MCAO + BE100: 2.52 ± 0.47; p<0.05, ANOVA, Newman-Keuls). Berberine showed a significant protective effect against cerebral ischemia, at least by an anti-inflammatory effect.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 1</b> – Esquema mostrando as artérias cerebrais anteriores e posteriores, artérias comunicantes anteriores e posteriores e a carótida interna que formam o polígono de Willis. ....                    | <b>21</b> |
| <b>Figura 2</b> – Mecanismos potenciais de dano neuronal após isquemia. ....   | <b>25</b> |
| <b>Figura 3</b> - Isquemia cerebral e a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio resultando em dano tecidual. ....   | <b>29</b> |
| <b>Figura 4</b> – Resposta inflamatória após isquemia cerebral focal. ....   | <b>31</b> |
| <b>Figura 5</b> – Estrutura Química da berberina. ....   | <b>37</b> |
| <b>Figura 6</b> – Foto mostrando a cirurgia de isquemia cerebral focal em um camundongo no momento da aproximação do bisturi elétrico para coagulação da artéria cerebral média                                  | <b>43</b> |
| <b>Figura 7</b> – Protocolo experimental. ....   | <b>44</b> |
| <b>Quadro 1</b> – Avaliação neurológica. ....  | <b>47</b> |
| <b>Figura 8</b> - Arena do Campo Aberto. ....  | <b>48</b> |
| <b>Figura 9</b> - Labirinto em Y. ....   | <b>49</b> |
| <b>Figura 10</b> – Aparelho de Esquiva Passiva. ....   | <b>50</b> |
| <b>Figura 11</b> – Labirinto aquático. ....  | <b>51</b> |
| <b>Figura 12</b> - Arena com objetos. ....   | <b>52</b> |
| <b>Figura 13</b> – Efeito da berberina (25, 50 e 100mg/kg/dia) sobre o número de total de escores obtidos na avaliação neurológica de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente por oACM. .... | <b>55</b> |
| <b>Figura 14</b> - Efeito da berberina (25, 50 e 100mg/kg/dia por dia) sobre o dano neuronal isquêmico de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente por oACM. ....                             | <b>56</b> |
| <b>Figura 15</b> - Visualização do dano neuronal isquêmico através da coloração de TTC entre os grupos. ....   | <b>57</b> |
| <b>Figura 16</b> - Efeito da berberina (50 e 100mg/kg/dia) sobre o número de cruzamentos no t este do campo aberto de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente por oACM. ....                 | <b>58</b> |

- Figura 17** - Efeito da berberina (50 e 100mg/kg/dia) sobre o número de *rearings* no teste do campo aberto de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente por oACM. .... **59**
- Figura 18** - Efeito da berberina (50 e 100mg/kg/dia) sobre a memória de trabalho de camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oACM. .... **60**
- Figura 19** – Efeito da berberina (50 e 100mg/kg/dia) sobre a memória aversiva recente de camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oACM. .... **61**
- Figura 20** – Efeito da berberina (50 e 100mg/kg/dia) sobre a memória aversiva tardia de camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oACM. .... **62**
- Figura 21** – Efeito da berberina (50 e 100mg/kg/dia) sobre a memória espacial, avaliada através do parâmetro latência para alcançar a plataforma, de camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oACM..... **63**
- Figura 22** – Efeito da berberina (50 e 100mg/kg/dia) sobre a memória espacial, avaliada através do parâmetro tempo de permanência no quadrante, de camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oACM. .... **64**
- Figura 23** – Efeito da berberina (50 e 100mg/kg/dia) sobre a memória espacial, avaliada através do parâmetro número de cruzamentos, de camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oACM. .... **65**
- Figura 24** – Efeito da berberina (50 e 100mg/kg/dia) sobre a memória episódica avaliada através do teste de reconhecimento de objetos de camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oACM. .... **66**
- Figura 25** – Efeito da berberina (100mg/kg/dia) sobre os níveis de GSH no córtex temporal de camundongos 24h após a oACM. .... **67**
- Figura 26** – Efeito da berberina (100mg/kg/dia) sobre os níveis de MPO em córtex temporal de camundongos 24h após a oACM. .... **68**
- Figura 27** – Efeito da berberina (100mg/kg/dia) sobre os níveis de MPO em corpo estriado de camundongos 24h após a oACM. .... **69**
- Figura 28** – Efeito da berberina (100mg/kg/dia) sobre os níveis de MPO em hipocampo camundongos 24h após a oACM. .... **69**
- Figura 29** – Imagens representativas do efeito da berberina (50 e 100mg/kg/dia) sobre a degeneração neuronal (coloração por Fluoro Jade C) em camundongos submetidos à por isquemia cerebral focal permanente por oACM..... **70**
- Figura 30** – Efeito da berberina (50 e 100mg/kg/dia) sobre a degeneração neuronal avaliada através da coloração com Fluoro Jade em camundongos 5d após a oACM..... **71**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| AA                            | Ácido araquidônico                                 |
| ACM                           | Artéria cerebral média                             |
| AIT                           | Ataque Isquêmico Transitório                       |
| AMPA                          | Ácido amino-3-hidroxi-5-metil-isoxasole-propiónico |
| ANOVA                         | Análise de variância                               |
| ATP                           | Adenosina trifosfato                               |
| AVC                           | Acidente Vascular Cerebral                         |
| CA1                           | Cornus Ammonis                                     |
| CAT                           | Catalase   |
| COX-2                         | Ciclooxigenase 2                                   |
| DTNB                          | Ácido 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico)        |
| EDTA                          | Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético                 |
| EPM                           | Erro padrão da média                               |
| ERNs                          | Espécies reativas de nitrogênio                    |
| EROs                          | Espécies reativas de oxigênio                      |
| FO                            | Falso-operados                                     |
| GD                            | Giro denteado                                      |
| GPX                           | Glutathione peroxidase                             |
| GSH                           | Glutathione reduzida                               |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de hidrogênio                             |
| HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>  | Radical peroxila                                   |
| ICAD                          | Inibidor de endonuclease                           |
| ICAM-1                        | Moléculas de adesão intercelular-1                 |
| IL-1 $\beta$                  | Interleucina-1 beta                                |

|                   |   |
|-------------------|---|
| iNOS              | Óxido nítrico sintase induzida              |
| LOX               | Lipooxigenase                               |
| LTP               | Potenciação de longa duração                |
| MCP-1             | Proteína quimiotática de monócito-1         |
| MDA               | Malondialdeído                              |
| MPO               | Mieloperoxidase                             |
| NBT               | Azul de nitro-tetrazolio                    |
| NMDA              | N-Metil-D-Aspartato                         |
| nNOS              | Óxido nítrico sintase neuronal              |
| NO                | Óxido nítrico                               |
| NOS               | Óxido nítrico sintase                       |
| O°                | radical oxigênio                            |
| O <sub>2</sub> -• | Ânion superóxido                            |
| OH•               | Radical hidroxil                            |
| OH•               | Radical hidroxila                           |
| ONOO              | Peroxinitrito                               |
| PBS               | Tampão salina-fosfato                       |
| PLA2              | Fosfolipase A                               |
| PLC               | Fosfolipase C                               |
| R •               | Radical lipídico alquila                    |
| RH-               | Lipídios                                    |
| RLs               | Radicais livres                             |
| ROO •             | Radical lipídico peroxil                    |
| ROOH              | Lipídio hidroperóxido                       |
| SMAC              | Ativador de caspase derivado da mitocôndria |

|               |  |
|---------------|--|
| SNC           | Sistema Nervoso Central                      |
| SOD           | Superóxido dismutase                         |
| TBARS         | Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico |
| TCA           | Ácido tricloro acético                       |
| TNF- $\alpha$ | Fator de necrose tumoral- $\alpha$           |
| t-PA          | Ativador plasminogênio tecidual              |

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>18</b> |
| <b>1.1 Definição e Classificação do AVC.....</b>                                     | <b>18</b> |
| <b>1.2 Epidemiologia do AVC.....</b>   | <b>18</b> |
| <b>1.3 Mecanismo de lesão cerebral isquêmica.....</b>                                | <b>19</b> |
| <b>1.4 Core e penumbra.....</b>  | <b>23</b> |
| <b>1.5 Depleção de oxigênio e ATP.....</b>   | <b>24</b> |
| <b>1.6 Excitotoxicidade e o cálcio.....</b>  | <b>25</b> |
| <b>1.7 Estresse oxidativo e isquemia.....</b>  | <b>26</b> |
| <b>1.8 Inflamação.....</b>   | <b>29</b> |
| <b>1.9 Apoptose.....</b>   | <b>32</b> |
| <b>1.10 Memória.....</b>   | <b>33</b> |
| <b>1.11 Terapias de reparo.....</b>  | <b>36</b> |
| <b>1.12 Berberina.....</b>   | <b>37</b> |
| <b>1.13 Relevância e justificativa.....</b>  | <b>40</b> |
| <b>2 OBJETIVOS.....</b>  | <b>41</b> |
| <b>2.1 Objetivo Geral.....</b>   | <b>41</b> |
| <b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>  | <b>41</b> |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>   | <b>42</b> |
| <b>3.1 Animais.....</b>  | <b>42</b> |
| <b>3.2 Drogas.....</b>   | <b>42</b> |
| <b>3.3 Isquemia cerebral focal por oclusão da artéria cerebral média (oACM).....</b> | <b>42</b> |
| <b>3.4 Protocolo experimental.....</b>   | <b>43</b> |
| <b>3.5 Avaliação Neurológica.....</b>  | <b>45</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3.6 Avaliação do infarto isquêmico.....</b>   | <b>46</b> |
| <b>3.7 Avaliação da atividade locomotora – Teste do campo aberto .....</b>   | <b>47</b> |
| <b>3.8 Avaliação da memória de trabalho – Teste do labirinto em Y.....</b>   | <b>48</b> |
| <b>3.9 Avaliação da memória aversiva- Teste da esQUIVA passiva.....</b>  | <b>49</b> |
| <b>3.10 Avaliação da memória espacial – Teste do labirinto aquático.....</b>   | <b>50</b> |
| <b>3.11 Avaliação da memória declarativa – Teste do reconhecimento de objetos.....</b>   | <b>51</b> |
| <b>3.12 Ensaio para mieloperoxidase (MPO).....</b>   | <b>52</b> |
| <b>3.13 Determinação da concentração de grupos sulfidrílicos não proteicos.....</b>  | <b>53</b> |
| <b>3.14 Avaliação da degeneração neuronal através do FluoroJade C.....</b>   | <b>53</b> |
| <b>3.15 Análise estatística.....</b>   | <b>54</b> |
| <b>4 RESULTADOS.....</b>   | <b>55</b> |
| <b>4.1 Efeito da berberina (25, 50 e 100mg/kg/dia) sobre a avaliação neurológica de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente por oACM.....</b>  | <b>55</b> |
| <b>4.2 Efeito da berberina (25, 50 e 100mg/kg/dia) sobre a disfunção mitocondrial de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente por oACM.....</b>   | <b>56</b> |
| <b>4.3 Efeito da berberina (50 e 100mg/kg/dia) sobre a atividade locomotora de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente por oACM.....</b>   | <b>58</b> |
| <b>4.4 Efeito da berberina (50 e 100mg/kg/dia) sobre a memória de trabalho de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente por oACM.....</b>  | <b>60</b> |
| <b>4.5 Efeito da berberina (50 e 100mg/kg/dia) sobre a memória aversiva de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente por oACM.....</b>   | <b>61</b> |
| <b>4.6 Efeito da berberina (50 e 100mg/kg/dia) sobre a memória espacial de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente por oACM.....</b>   | <b>63</b> |
| <b>4.7 Efeito da berberina (50 e 100mg/kg/dia) sobre a memória episódica avaliada através do teste de reconhecimento de objetos em camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oclusão da artéria cerebral média.....</b> | <b>66</b> |
| <b>4.8 Efeito da berberina (100mg/kg/dia) sobre a concentração de glutatona reduzida (GSH) no córtex temporal de camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oclusão da artéria cerebral média.....</b>                   | <b>67</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4.9 Efeito da berberina (100mg/kg/dia) sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) no córtex temporal, corpo estriado e hipocampo de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente por oclusão da artéria cerebral média.....</b> | <b>68</b> |
| <b>4.10 Efeito da berberina (50 e 100mg/kg/dia) sobre a degeneração neuronal evidenciada através da coloração com Fluoro Jade no córtex temporal de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente por oACM.....</b>                 | <b>70</b> |
| <b>5 DISCUSSÃO.....</b>   | <b>72</b> |
| <b>6 CONCLUSÃO.....</b>   | <b>86</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>87</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Definição e Classificação do AVC

É o infarto do tecido do sistema nervoso central (SOCIEDADE AMERICANA DE CARDIOLOGIA, 2009). É causado pela redução do suprimento sanguíneo, resultando no decréscimo da tensão de oxigênio e nos metabólitos de alta energia em uma área do cérebro (ATP, Glicose, principalmente).

O AVC é comumente dividido em duas maiores categorias. A primeira e mais comum é o AVC isquêmico ou tromboembólico (cerca de 80% dos casos), este é devido a uma interrupção do suprimento sanguíneo como resultado da oclusão de uma artéria (BROUNS; DE DEYN, 2009). A segunda categoria é o AVC hemorrágico, que envolve sangramento no parênquima cerebral ou no espaço subaracnóideo.

### 1.2 Epidemiologia do AVC

O AVC é a segunda maior causa de morte e a principal causa de incapacidade no mundo (SALINAS *et al.*, 2007). Entre todos os países da América Latina, o Brasil apresenta uma das maiores taxas de mortalidade (FEIGIN *et al.*, 2009).

A maior parte do atendimento de pacientes com AVC no Brasil é realizada em hospitais secundários. Hospitais deste porte muitas vezes não dispõem de uma infraestrutura adequada para o atendimento completo deste tipo de doente (RADANOVIC, 2000). A mortalidade por acidente vascular encefálico é maior nas regiões mais pobres do Brasil, como a Norte, a Nordeste e a Centro-Oeste, e em grande parte, a ocorrência dessa elevada mortalidade é atribuída aos fatores sociais desfavoráveis. Entre estes fatores destacam-se a idade avançada, baixa escolaridade e renda familiar (CAVALCANTE *et al.*, 2004).

O custo anual do tratamento agudo e crônico dos pacientes que sofrem acidente vascular cerebral (AVC) é de aproximadamente trinta bilhões de dólares somente nos Estados Unidos, sendo dezessete bilhões com custos médicos e treze milhões com custos indiretos (YAMASHITA *et al.*, 2004). A maioria dos casos de AVC está relacionado ao aparecimento

de doenças cardiovasculares ou arterioesclerose (AMARENCO *et al.*, 2009). O AVC tem sido considerado como importante causa de incapacidade em adultos (CARMICHAEL *et al.*, 2012). Apresenta pico de incidência entre a 7ª e 8ª década de vida principalmente por nesse período somar-se as alterações cardiovasculares e metabólicas relacionadas à idade (ZETOLA *et al.*, 2001).

A letalidade precoce por acidente vascular cerebral está diminuindo tanto nos países de alta, como nos de média ou baixa renda, mas, em geral, essa taxa de letalidade em países de baixa ou média renda na última década é de 25%, superior às taxas em países de alta renda (FEIGIN *et al.*, 2009).

### **1.3 Mecanismo da lesão cerebral isquêmica**

A isquemia cerebral pode ser definida como a interrupção do fluxo sanguíneo para o tecido cerebral suficiente para alterar as funções cerebrais. (SMITH, 2004).

A isquemia cerebral pode ser desencadeada através da oclusão de vasos cervico-cranianos ou por hipoperfusão sistêmica que leva a uma redução drástica do fluxo sanguíneo para o cérebro, podendo ser causada por arterotrombose, embolia ou anormalidades hemodinâmicas (KAPOSZTA *et al.*, 1999). A arterotrombose ocorre nas artérias cervico-cranianas e nas pequenas artérias penetrantes intracranianas. Nesta condição, um trombo é formado *in situ* em um estreitamento arterial aterosclerótico que impede o fluxo sanguíneo distal e causa isquemia e conseqüente infarto do tecido cerebral suprido pelo vaso ocluído. Na embolia cerebral, a artéria cerebral é subitamente bloqueada pelo material embólico que é geralmente um trombo originado do coração e grandes vasos (aorta, carótidas e artérias cerebrais) (KAPOSZTA *et al.*, 1999).

O infarto embólico é responsável por cerca de 30% dos casos de isquemia, a perda súbita de perfusão arterial para uma determinada área do cérebro gera sinais clínicos abruptos. A embolia, geralmente, ocorre devido a alterações cardíacas, sendo as mais comuns as valvulopatias cardíacas, o aneurisma ventricular e as miocardiopatias (ROWLAND; MERRI, 2002). Outra anormalidade associada à isquemia cerebral é a hipoperfusão sistêmica que é caracterizada por fluxo sanguíneo cerebral criticamente diminuído causado por falência

cardíaca ou hipovolemia que leva a uma redução global no fluxo sanguíneo. No SNC podem ocorrer lesões isquêmicas globais ou focais e em ambos os casos foram desenvolvidos modelos experimentais que se assemelham as situações citadas (COLLI; NUNES; CARLOTTI, 1998).

A maioria dos casos de AVC em humanos acontece devido ao aparecimento de doenças cardiovasculares ou arterioesclerose (AMARENCO *et al.*, 2009). O AVC tem sido considerado como importante causa de incapacidade em adultos, pois reduz a capacidade do cérebro de reparar-se (CARMICHAEL, 2012).

A terapia utilizada atualmente para isquemia cerebral é o ativador de plasminogênio tecidual (t-PA). É o único tratamento aprovado pelo órgão regulador sanitário dos Estados Unidos, o FDA, porém possui baixa efetividade, pois a janela terapêutica de utilização é muito curta. Para que tenha eficácia deve ser utilizado até 3 horas depois do aparecimento dos primeiros sintomas do AVC. Em alguns países da Europa e no Canadá a janela terapêutica preconizada é estendida para até 6 horas após os primeiros sintomas. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza que a janela terapêutica deve ser de 2 até 3 horas após o aparecimento dos sintomas. Além disso, para utilizar o t-PA o médico deve ter segurança do tipo de AVC que está ocorrendo no paciente, pois é contra-indicado nos casos de pacientes com AVC hemorrágico (GINSBERG, 2008; BROUNS, DEYNN, 2009).

Os pacientes que sofrem um AVC apresentam seqüelas relacionadas à dificuldade na linguagem, de conectar pensamentos, memória e nos movimentos. Podem apresentar também uma paralisia parcial. Esses déficits neurológicos tanto podem ter sido causados por oclusão como por hemorragia de um vaso que irriga o cérebro (KRIZ, HÉBERT, 2009).

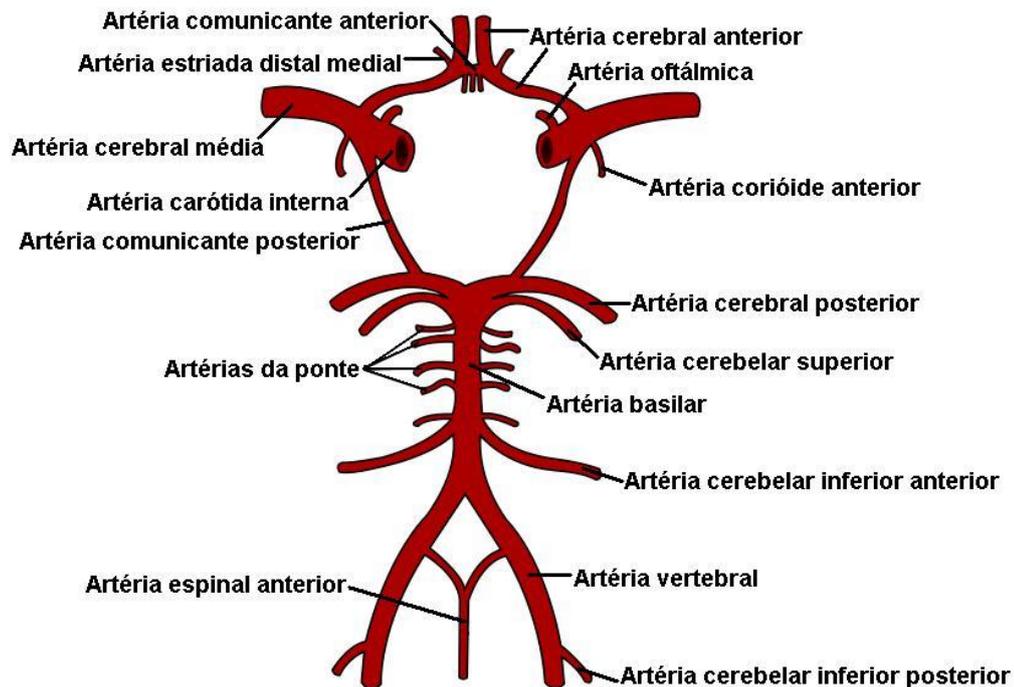
Os estudos em humanos ou em animais revelam uma recuperação ou uma reestruturação cerebral após o evento isquêmico. A neuroplasticidade é a capacidade do cérebro de alterar a sua estrutura e função em resposta a eventos traumáticos (LLEDO; ALONSO; GRUBB, 2006).

O sangue chega ao cérebro através das artérias vertebrais e das artérias carótidas internas, que se comunicam através do polígono de Willis, uma anastomose arterial que fornece o suprimento sanguíneo para os hemisférios cerebrais. Este é formado pelas artérias

cerebral anteriores e posteriores, artérias comunicante anterior e posterior e pela carótida interna (Figura 1). Estas artérias possuem paredes muito finas, o que as tornam mais vulneráveis a eventos hemorrágicos.

De acordo com a classificação experimental de isquemia cerebral através da distribuição da região de infarto, conhecem-se dois tipos de modelo de isquemia: a global e a focal. A isquemia global ocorre quando há falência circulatória generalizada e a isquemia focal ocorre quando o fluxo sanguíneo cerebral é limitado em uma região específica, geralmente resultado da oclusão de uma artéria cerebral. Existe ainda o modelo multifocal, onde várias pequenas regiões são atingidas (LIPTON, 1999).

**Figura 1.** Esquema mostrando as artérias cerebrais anteriores e posteriores, artérias comunicantes anteriores e posteriores e a carótida interna que formam o polígono de Willis



Fonte: WIKIMIDIA COMMONS, 2008.

A artéria cerebral mais comumente acometida no AVC em humanos é a artéria cerebral média (ACM), que irriga a região lateral do hemisfério e estruturas subcorticais.

Portanto, os modelos mais utilizados de isquemia focal cerebral são modelos de oclusão da ACM. A oclusão da ACM (OACM) pode ser feita através do uso de um fio intraluminal ou através de técnicas cirúrgicas como eletrocauterização, clampeamento e ligadura da artéria. O modelo utilizado no presente trabalho foi a eletrocauterização, que leva a interrupção permanente do fluxo sanguíneo. Enquanto que a ligadura e o clampeamento permitem a reperfusão. Existe ainda o modelo de fototrombose, onde uma lesão cortical do cérebro é induzida por injeção sistêmica de um corante fotossensível, como Rosa de Bengala, e posterior irradiação focal do crânio (LIPTON, 1999).

A oclusão da ACM resulta em redução do fluxo sanguíneo cerebral tanto no núcleo estriado quanto no córtex, mas a severidade da lesão depende da duração do insulto e do sítio de oclusão (proximal ou distal) ao longo da ACM, assim como da quantidade de fluxo sanguíneo colateral à região de oclusão (TRAYSTMAN, 2003). Na oclusão proximal, a ACM é ocluída próxima a sua ramificação da carótida interna, pode produzir lesão com tamanhos que variam em menos de 20%, e a oclusão distal pode ser feita através de uma abordagem transtemporal da ACM, método no qual a duramáter é aberta em toda a extensão da craniectomia, rebatida sobre o teto da órbita e a ACM é ocluída por eletrocauterização. (LIPTON, 1999; DURUKAN, 2007).

Os modelos experimentais de isquemia focal têm sido desenvolvidos para mimetizar o AVC em humanos de maneira que os tornam indispensáveis para a evolução das pesquisas nesse campo (DURUKAN, TATLISUMAK, 2007).

A isquemia focal permanente, o  $Ca^{2+}$  total na região do *core* da lesão aumenta gradualmente em uma relação maior que na penumbra, subindo cerca de 1,0 mM / h do início do insulto até 24 horas depois deste (KIM; VAUGHAN; GHOSH, 1998). Em situações isquêmicas os astrócitos localizados na região CA1 do hipocampo demonstram redução no transporte de glutamato, aumento na geração EROS (Espécies reativas de oxigênio) na mitocôndria e a redução do potencial de membrana da mitocôndria (WANG, MICHAELIS, 2010).

Foi observado em modelos de isquemia cerebral global a susceptibilidade dos neurônios na região CA1 do hipocampo está relacionado à uma grande concentração de receptores glutamatérgicos nessa região (WALKER, 2009).

#### 1.4 Core e Penumbra

A lesão isquêmica pode ser dividida em duas regiões, o *core*, também chamado de centro da lesão, e a penumbra, região que circunda o centro da lesão. No *core* isquêmico encontram-se neurônios em processo de morte por necrose devido à falência da membrana e na região de penumbra encontram-se neurônios com perda de suas funções, porém ainda com maquinaria protéica intacta, daí a morte nesta região ocorrer principalmente por apoptose (SMITH, 2004).

A região do *core* em humanos que sofreram isquemia focal cerebral é facilmente visualizada por métodos de imagem, pois a área sofre rapidamente um “infarto” (KELLY *et al.*, 2001). O fluxo sanguíneo nessa região reduz a 15% do normal e os níveis de adenosina trifosfato (ATP) a 25% do basal. Depois de um insulto longo, ou um insulto permanente, 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, 1999).

Na penumbra, o nível de ATP é mantido em torno de 50 a 70% do normal, não caindo o suficiente para permitir despolarizações anóxicas. Entretanto, essa região contém neurônios eletricamente silenciosos (que não respondem ao estímulo elétrico), com seus gradientes iônicos intactos e com neurônios que podem ter suas membranas despolarizadas se o fluxo não for restaurado rapidamente.

O fluxo sanguíneo na região da penumbra reduz de 20 a 40% do normal (HOSSMANN, 1996). A maneira de preservar e evitar o progresso da destruição neuronal nessa região é foco de inúmeras pesquisas. Uma importante descoberta foi que o bloqueio de receptores NMDA evitava o progresso do dano na região da penumbra e também reduz a área de infarto. (SIMON *et al.*, 1984).

Os neurônios perifocais na zona de penumbra são os de mais alto risco e, com o tempo, a zona de infarto pode crescer em tamanho, com mais células da penumbra sendo recrutadas para a zona central. O período de tempo deste processo de recrutamento constitui um período crítico, em que a onda de tecido necrótico pode ser bloqueada pela intervenção farmacológica. Esta janela terapêutica corresponde as primeiras 2 a 4 horas que se segue o

derrame, após as quais a eficácia da terapêutica decresce rapidamente (GILGUN-SHERKI *et al.*, 2002; WEINSTEIN; HONG; SHARP, 2004).

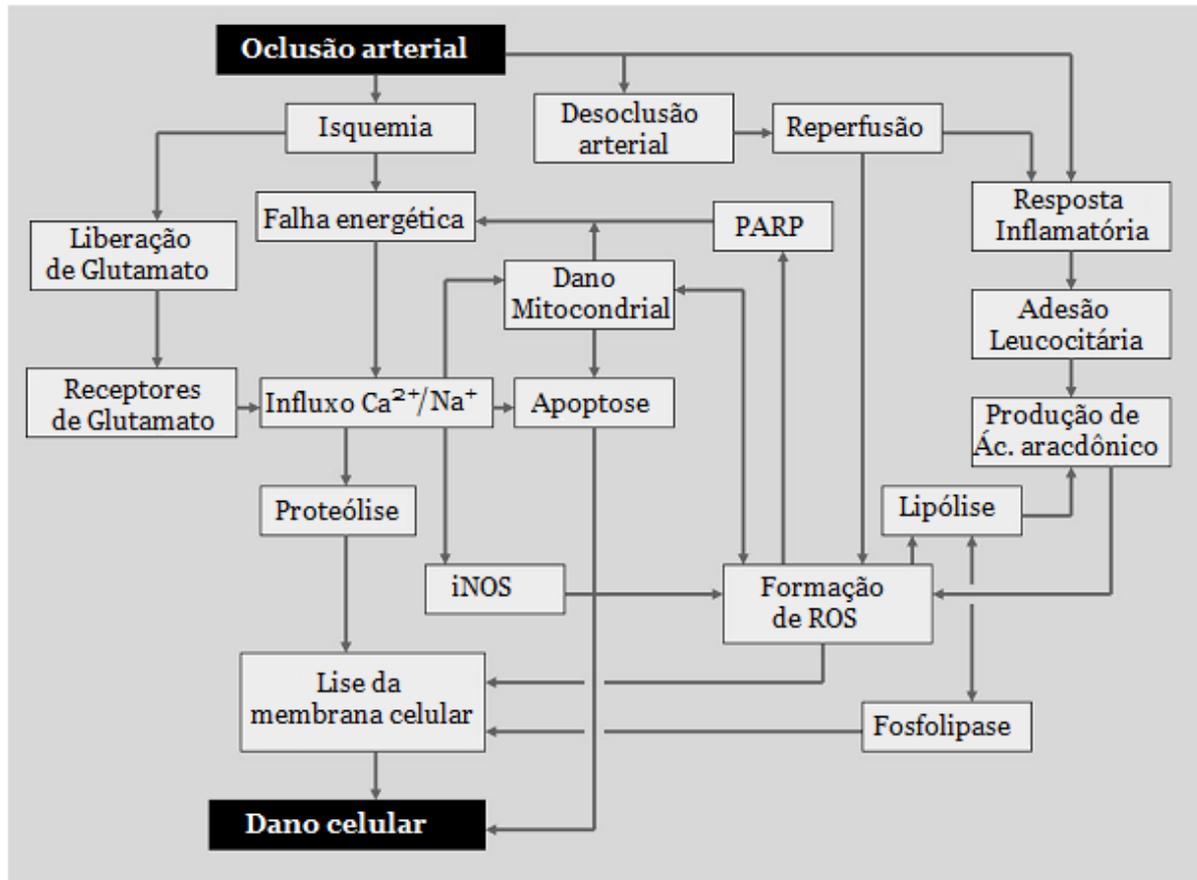
Yoo e colaboradores (2006) verificaram que a isquemia transitória global, por 5 minutos em gerbil, diminui a densidade de células na região CA1 do hipocampo, quando avaliada pelo método do cresil violeta.

### **1.5 Depleção de oxigênio e ATP**

O cérebro necessita de um contínuo suporte de glicose e oxigênio para manter suas funções normais e sua viabilidade. Quando este processo é interrompido, uma série de eventos acontecem, chamada de cascata isquêmica, que podem ser resumidos como falência bioenergética celular, seguida de excitotoxicidade, estresse oxidativo, inflamação pós-isquêmica, culminando em morte celular dos neurônios, glia e células endoteliais (BROUNS, DEYNN, 2009). A isquemia cerebral focal provoca também acúmulo de metabólitos ácidos desencadeando uma sequência de eventos responsáveis pelo dano neuronal (SMITH, 2004) (Figura 2).

Em condições isquêmicas a oferta de oxigênio diminui limitando a fosforilação oxidativa, que é a principal via de geração ATP na célula. (MIES *et al.*, 1993). O forte declínio na concentração de ATP provoca falência da bomba de sódio-potássio ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) ATPase com consequente aumento na concentração de sódio intracelular. Esse evento resulta em uma despolarização persistente o que permite a entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  na célula (SMITH, 2004).

**Figura 2.** Mecanismos potenciais de dano neuronal após isquemia (SMITH, 2004).



## 1.6 Excitotoxicidade e o cálcio

A excitotoxicidade é o processo no qual acontece um aumento da liberação de glutamato com conseqüente super-estimulação dos receptores glutamatérgicos. (SATTLETER *et al.*, 2001). Esse fenômeno foi descrito pela primeira vez por John Olney em 1970 (DOBREK, THOR, 2011). A excitotoxicidade está envolvida em diversas patologias como AVC e doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson (DOBREK, THOR, 2011).

O glutamato está presente em vesículas sinápticas de neurônios presentes no sistema nervoso central dos mamíferos em elevadas concentrações (SATTLETER *et al.*, 2001). Devido às despolarizações da membrana neuronal, os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependente de voltagem tornam-se ativados, levando à entrada desse íon e a liberação de glutamato para o meio extracelular. O glutamato é liberado através das vesículas e se difunde através da fenda sináptica e exerce sua ação ligando-se em receptores específicos.

Os receptores de glutamato podem ser do tipo ionotrópicos ou metabotrópicos. Os ionotrópicos são o NMDA (N-metil-D-aspartato), que é permeável ao  $\text{Ca}^{2+}$  e em situações fisiológicas seu canal é bloqueado pelo  $\text{Mg}^{2+}$ , e o AMPA/Cainato (ácido  $\alpha$ -amino-hidróxi-5-metil-4-isoxazolpropionico) que é permeável ao  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Zn}^+$  e eventualmente ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Os metabotrópicos são receptores acoplados a proteína G (WANG, QIN, 2010). Os receptores citados estão localizados nas membranas pré e pós-sinápticas dos neurônios (CARMICHAEL, 2012).

Receptores AMPA não são normalmente permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  em virtude da expressão da subunidade GluR2, contudo, essa subunidade está reduzida durante a isquemia, aumentando em cerca de 18 vezes a permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$ , mostrando também a relação do receptores AMPA e a excitotoxicidade (LIU *et al.*, 2006; PENG *et al.*, 2006).

Outra consequência da falência energética durante a isquemia é a falha da  $\text{Ca}^{+2}$  ATPase uma das responsáveis pela baixa concentração de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular (DOYLE; SIMON; STENZEL-POORE, 2008). O acúmulo de cálcio intracelular em consequência da deficiência no simporte de  $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ , das repetidas despolarizações e da falha da  $\text{Ca}^{+2}$ ATPase desencadeia uma cascata de eventos que incluem a ativação de calpaínas, afetando a integridade estrutural intra e extracelular, e a ativação de fosfolipases que degradam a membrana celular. Assim como a formação de EROS, a ativação de caspases e ativação de NOS dependente de  $\text{Ca}^{+2}$  (LIPTON, 2007). Esses eventos contribuem para morte neuronal que pode ser tanto por necrose quanto por apoptose (KEMP *et al.*, 2002).

## 1.7 Estresse oxidativo e isquemia

O estresse oxidativo está presente em diversas patologias que envolvem neurodegeneração, inclusive na isquemia focal (CHEN *et al.*, 2011). O estresse oxidativo tem sido definido como um distúrbio no balanço pró-oxidante e antioxidante em favor do primeiro, levando a reações potencialmente deletérias em lipídios, proteínas, RNA e DNA. Essas reações podem incluir peroxidação dos ácidos graxos das membranas celulares, oxidação dos grupos sulfidril e inativação enzimática (WARNER; SHENG; HABERLE, 2004).

Os radicais livres (RLs) são moléculas que apresentam um ou mais elétrons não pareados, nos orbitais externos. Entre as várias espécies de radicais livres estão principalmente às derivadas do oxigênio e os metais de transição (VANNUCHIN *et al.*, 1998).

O cérebro é muito susceptível ao estresse oxidativo em virtude da alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados, pela alta atividade metabólica, pela baixa capacidade antioxidante e pela incapacidade de reparo das células neuronais. Por esse motivo, modificações farmacológicas que exerçam controle do estresse oxidativo podem ser úteis ao tratamento do AVC (ASSHAFQA *et al.*, 2011).

A formação de compostos oxidantes durante o transporte de elétrons na mitocôndria ou devido à auto-oxidação de alguns neurotransmissores como dopamina e norepinefrina, e eventos isquêmicos podem resultar em dano no tecido e subsequente estresse oxidativo. Podemos rastrear a ocorrência do estresse oxidativo pela formação de ânion superóxido ( $O_2 \rightarrow \bullet$ ) e óxido nítrico (NO) (WARNER; SHENG; HABERLE, 2004).

O ânion superóxido ( $O_2 \rightarrow \bullet$ ) está envolvido em diversos processos deletérios para a célula, mesmo não sendo uma biomolécula super reativa. Através da formação de EROs secundárias, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical peroxila ( $HO_2 \bullet$ ) e o radical hidroxil ( $OH \bullet$ ) ou reagir com o NO originando o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (LU *et al.*, 2010).

O cérebro tem importantes defesas contra o superóxido incluindo anti-oxidantes presentes na dieta como o  $\alpha$ -tocoferol, glutatona e sistemas enzimáticos antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), presente no citosol, na mitocôndria e no meio extracelular (MARKLUND, 1990). A SOD atua metabolizando o ânion superóxido e formando o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (MCCORD; FRIDOVICH, 1969) que é convertido em água  $H_2O$  por enzimas peroxidases como a glutatona peroxidase (GPX) ou dismutado em água e oxigênio pela catalase (CAT) (WARNER; SHENG; HABERLE, 2004). A catalase tem como principal função eliminar peróxido formado no peroxissoma, diminuindo o risco da formação de radical hidroxil (NORDEBERG; ARNER, 2001).

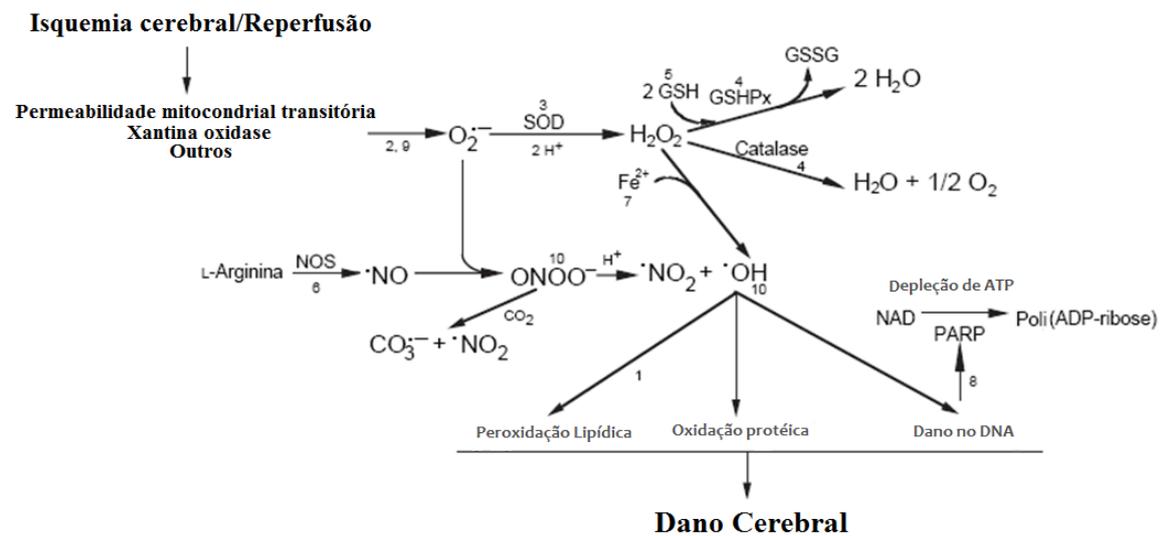
O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) formado a partir da metabolização do ânion superóxido ( $O_2 \rightarrow \bullet$ ) pela SOD é importante, pois participa das reações que produzem o radical hidroxil ( $OH \bullet$ ), seja via reação de Fenton ou de Haber-Weiss. O radical hidroxil ( $\bullet OH$ ) é

extremamente reativo, mas tem meia vida *in vivo* muito curta, em torno de  $10^{-9}$  s (VALKO *et al.*, 2006). O radical hidroxil também pode atacar o DNA levando a alterações na expressão genética que podem causar mutação ou apoptose. Outro aspecto importante é a reação com proteínas e lipídios causando carbonilação e peroxidação lipídica (LU *et al.*, 2010) (Figura 3).

Durante a isquemia cerebral, o influxo de  $Ca^{2+}$  e a falência de energia provocam a liberação de ácidos graxos livres que apresentam vários efeitos deletérios, dentre eles a peroxidação lipídica. Apesar desse fator, ainda é difícil atribuir que a peroxidação lipídica é fator crucial na morte celular por isquemia, mas com base nessas observações inibidores da peroxidação lipídica tem sido testados farmacologicamente (WARNER; SHENG; HABERLE, 2004). Dentre eles, podemos citar o tirilazad que em estudos pré-clínicos demonstrou excelente resultado como inibidor da peroxidação lipídica, mas não apresentou efeito quando utilizados em humanos, vítimas de AVC (HALEY, 1998).

Em eventos isquêmicos, o aumento de concentração de  $Ca^{2+}$  citoplasmático mediada pelo glutamato leva ao aumento da síntese NO, que é sintetizado a partir da L-arginina. O NO atua dilatando vasos e dessa maneira aumentando a oferta de glicose e oxigênio, sendo positivo nesse sentido, mas também é capaz de reagir com o radical superóxido ( $O_2 \rightarrow \bullet$ ) levando a danos nitrosativos. O estresse nitrosativo promovido pelo peroxinitrito danifica proteínas, lipídeos de membrana e DNA (ESPEY *et al.*, 2000).

**Figura 3.** Isquemia cerebral e a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio resultando em dano tecidual (WARNER; SHENG; HABERLE, 2004).



## 1.8 Inflamação

Após um evento isquêmico ocorre uma reação inflamatória que se caracteriza pela presença de sinalização molecular como citocinas, quimiocinas dentre outras, moléculas de adesão e células inflamatórias (BROUNS, DEYNN, 2009).

Os mediadores inflamatórios presentes no evento isquêmico incluem moléculas de adesão (selectinas, integrinas e imunoglobulinas), citocinas (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , e TGF- $\beta$ ), e quimiocinas (CINC e MCP-1) que são produzidos imediatamente após o início da isquemia, estes irão contribuir para que o infarto isquêmico seja irreversível (HUANG *et al.*, 2006).

Micróglia e astrócitos contribuem para a inflamação pós-isquêmica sendo ativados pelas EROS. Os astrócitos liberam fatores inflamatórios como citocinas, quimiocinas e ativam a iNOS (BROUNS, DEYNN, 2009). A micróglia ativada representa a resposta primária ao dano no cérebro, precedendo a infiltração de macrófagos (SCHILLING *et al.*, 2003; GÜNTHER *et al.*, 2005). Entretanto alguns estudos revelam que em certas condições a micróglia pode exercer ação neuroprotetora pela produção de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (BATECHELOR; LIBERATORE; WONG, 1999) (Figura 4).

A COX-2 é liberada rapidamente após a isquemia cerebral em resposta a quantidade exacerbada de glutamato, que é liberada no evento isquêmico. Essa liberação

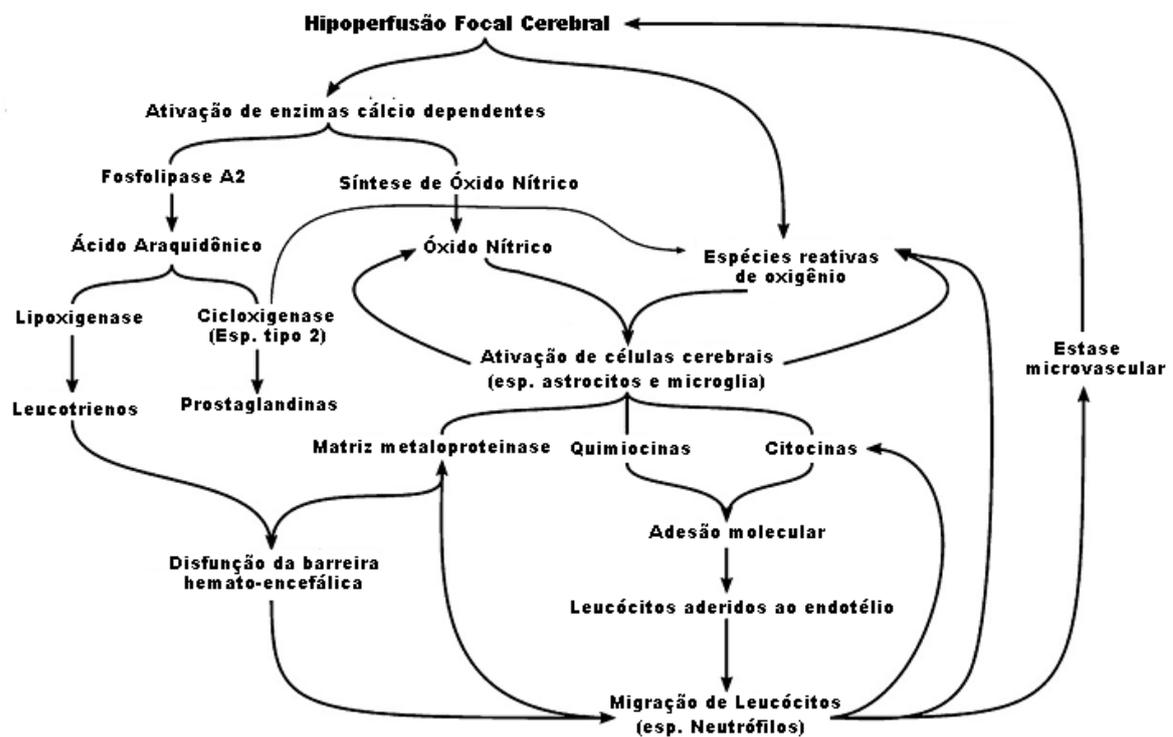
acentuada de glutamato também desencadeia outras respostas inflamatórias, como ativação de microglia, astrócitos e infiltração de leucócitos (BARONE, FEUERSTEIN, 1999).

Após 4 a 6 horas do evento isquêmico, os leucócitos circulantes aderem à parede do vaso e seguem até o cérebro para posterior liberação de mediadores pró-inflamatórios (BROUNS, DEYNN, 2009). Essa interação entre os leucócitos e o endotélio vascular é mediada por 3 grupos de molécula de adesão: as selectinas, especialmente a E-selectina e a P-selectina que estão super expressas na isquemia e medeiam o rolamento e o recrutamento de leucócitos em estágio inicial da isquemia, as integrinas que são necessárias para a firme adesão dos leucócitos ao endotélio, mas para esses evento é necessária a expressão de ICAM-1 com as integrinas CD11b/CD18 (HUANG *et al.*, 2006) (ZHANG *et al.*, 1998) (SOBEL *et al.*, 1990), e as imunoglobulinas como a ICAM-1 e ICAM-2. Foi demonstrado que em ratos submetidos a MCAO e reperfusão houve um aumento na expressão de mRNA ICAM-1 nas áreas onde foi detectada a isquemia cerebral (ZHANG *et al.*, 1995).

A formação do edema, necrose celular e área de infarto do tecido são mediados pela infiltração de leucócitos (HUANG *et al.*, 2006). O acúmulo de leucócitos pode ser visualizado 30 minutos após MCAO permanente em ratos, enquanto neurônios em necrose somente podem ser detectáveis após 72 horas da isquemia (DERESKI *et al.*, 1993).

A cascata de inflamação também inclui a ativação da via fosfolipase A<sub>2</sub> que ocorre em consequência da elevação da concentração do cálcio intracelular. O ácido aracdônico presente nessa via pode ser metabolizado a prostaglandinas pela cicloxigenase (COX). A COX do tipo 2 está super expressa após a isquemia e exerce efeitos tóxicos (NOGAWA *et al.*, 1997).

**Figura 4.** Resposta inflamatória após isquemia cerebral focal adaptada de (BROUNS, DEYNN, 2009).



O tratamento com anti-inflamatórios não esteroidais seletivos a COX2 apresentaram neuroproteção em modelo experimental de isquemia (SUGIMOTO; IADECOLA, 2003). Drogas anti-inflamatórias como minociclina e indometacina são neuroprotetoras por prevenir a ativação microglial (YRJANHEIKKI *et al.*, 1998; TIKKA *et al.*, 2001; TIKKA; KOISTINAHO, 2001; MONJE; TODA; PALMER, 2003; SASAKI *et al.*, 2003a). A utilização do tenoxicam, um tipo de inibidor da COX-2, preveniu a formação de eicosanóides e diminuição do dano causado por isquemia transitória global (ICT) (GALVÃO *et al.*, 2005).

Alguns estudos revelam que citocinas pró-inflamatórias podem afetar a plasticidade sináptica. O aumento da expressão de IL-1 $\beta$  e ICAM-1, assim como da migração de neutrófilos para o hipocampo, foram documentados em modelo de isquemia global (GALVÃO *et al.*, 2005; ZHUANG *et al.*, 2009; MINAMI *et al.*, 1992) (YOSHIOKA *et al.*, 1999).

## 1.9 Apoptose

Existem três tipos de morte celular necrose, autofagia e apoptose. Em 1964 foi proposto o termo "morte celular programada" para designar um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental. Em 1972, Kerr, Wyllie e Currie sugeriram o termo apoptose para indicar esse tipo de morte (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

A apoptose pode ser induzida por um grande número de estímulos e muitas das condições que prevalecem durante a isquemia são capazes de induzir apoptose em um ou mais tipos de células (LIPTON, 1999). A apoptose tem como características condensação da cromatina e intensa fragmentação do DNA em segmentos de tamanho proporcional à perda de volume celular, formação de protuberâncias na membrana plasmática e formação de corpos apoptóticos que serão fagocitados por macrófagos (LOVE, 2003).

A indução da apoptose se dá com ativação das caspases. As caspases são sintetizadas como pró-enzimas inativas (pró-caspase) e, quando ativadas, clivam diversos substratos proteicos que podem ser outras pró-caspases, proteínas do citoesqueleto, como a actina, proteínas reparadoras de DNA, como a PARP, proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2 e diversas quinases que participam da regulação da transcrição gênica (LOVE, 2003). Podemos citar duas vias de ativação da caspase: a via intrínseca (mitocondrial) e a via extrínseca (citoplasmática) (GRIVICICH; REGNE; ROCHA, 2007). A via extrínseca depende de sinais externos para ligar-se a receptores (Fas, TNF) disparando uma sinalização mediada por esses receptores. Já a via intrínseca é disparada por sinais que vem do interior da célula (CAO *et al.*, 2001).

As mitocôndrias exercem papel central na tradução de sinais apoptóticos nos neurônios. É o centro da via intrínseca da apoptose, além disso, também pode amplificar e mediar a via extrínseca (SCHMITT *et al.*, 2002). A isquemia cerebral pode desencadear o sinal no interior da célula que provoca a liberação do citocromo c, dando início à via intrínseca. Este é liberado no citosol formando um complexo com a APAF- 1 (fator ativador de proteases pró-apoptóticas 1) e a caspase-9, chamado de apoptossomo. Esse complexo promove a clivagem da pró-caspase-9 liberando a caspase-9 ativa. Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 (PETROS; OLEJNICZAK; FESIK, 2004; RUPNARAIN *et al.*, 2004).

Além de promover a ativação da cascata de caspases, a caspase 3 afeta o DNA através de dois mecanismos, clivando o inibidor de endonuclease ICAD promovendo, dessa

maneira, a liberação da CAD (DNAse ativada por caspase) com conseqüente quebra do DNA ou inativando a PARP, uma enzima reparadora de DNA. Dessa forma a caspase-3 garante a quebra do DNA e, conseqüentemente, impede a sobrevivência celular (SUGAWARA *et al.*, 2004).

Durante a isquemia a expressão de p53, regulador da morte celular induzida por apoptose, está aumentada, com isso pode-se ativar aBax, uma proteína pro-apoptótica com função de auxiliar na despolarização da membrana da mitocôndria e na liberação do citocromo c, desencadeando a cascata já mencionada (LOVE, 2003; CAO *et al.*,2001).

A ativação da via extrínseca se dá, por exemplo, com a ligação da molécula de Fas ligante presente no meio extracelular ao seu receptor, desencadeando a clivagem da pró-caspase-8. A caspase-8 ativa a caspase-3 que por sua vez age em diversos alvos. Outra ação da caspase-8 é a ativação da proteína pró-apoptótica BID. Com tudo que foi descrito podemos observar que a clivagem da proteína Bid, uma proteína pró-apoptótica, as duas vias se encontram reforçando e amplificando o sinal. A super expressão de Fas é verificada após isquemia cerebral focal (SUGAWARA *et al.*, 2004).

É importante salientar que existem mecanismos que controlam ativação da cascata apoptótica, onde temos como principais proteínas bcl-2 e a bcl-xl que evitam a despolarização da membrana, ou a Akt que consegue inibir proteínas como a Bad, proteína esta que consegue despolarizar a mitocôndria (CAO *et al.*,2001). A despolarização é crucial para liberação de proteínas que são pro-apoptóticas como o citocromo c. Na região de infarto isquêmico, após isquemia focal observa-se baixa expressão da Bcl-2 (SUGAWARA *et al.*, 2004).

## **1.10 Memória**

Memória é a habilidade de se guardar uma informação aprendida previamente dentro de um sistema interno de armazenagem de tal forma que este possa ser acessado e usado posteriormente (LUCAS, 2002). Assim, a memória não é uma construção unitária e sim um sistema que reflete inúmeras habilidades cognitivas distintas que podem ser categorizadas ao longo de diferentes dimensões (LUCAS, 2002).

Levando em consideração os tipos de memória de longa duração eles podem ser diferenciados como memória implícita ou não declarativa e explícita ou declarativa (DEW; CABEZA, 2011). A memória não declarativa apresenta-se com tipos “simples” de memória que podemos caracterizar como habituação, sensibilização e condicionamento clássico. A habituação é aprender a reconhecer e a ignorar, como um ruído que não representa importância e permite que você consiga dormir mesmo com barulho de carros. A sensibilização é um aprendizado não associativo, tanto pessoas quanto animais aprendem a melhorar seus reflexos em preparação para retirada e fuga (BAYLE; CHEN, 1993). E o condicionamento clássico refere-se à capacidade de associação entre dois eventos como o estudado pelo fisiologista russo no fim do século XIX, Ivan Pavlov que identificou que o cão salivava ao ver o funcionário que o alimentou no passado (KANDEL, 1995).

A memória implícita refere-se a situações inconscientes, não intencionais que são independentes do lobo temporal medial. O cerebelo, estriado e a amígdala são regiões do cérebro relacionadas à memória de procedimento ou implícita. Esta memória está envolvida com a percepção, habilidade motora e outras formas de memória não declarativa (KANDEL, 2009). Acredita-se que a memória implícita seja processada pelo núcleo estriado e/ou diencéfalo.

A memória declarativa é apresentada como episódica ou semântica (KANDEL, 1995). A memória episódica está relacionada a fatos datados e é individual – cada pessoa possui suas próprias lembranças. A memória semântica está relacionada com a cultura e envolve conhecimentos gerais de um povo (SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1996). A memória explícita é dependente do lobo temporal medial (DEW; CABEZA, 2011). O lobo temporal medial engloba o hipocampo e regiões anatomicamente próximas como o córtex entorrinal, peririnal e córtex parahipocampal. É um sistema rápido, de capacidade limitada, que desempenha papel fundamental na memória de longo-prazo declarativa (SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1996). A memória declarativa está relacionada a objetos, pessoas e lugares. É uma memória para fatos e eventos que requer a ação do lobo temporal medial em conexão com córtex. Estudos demonstram que é característico da memória explícita a codificação da informação, o armazenamento de modo que se torne memória e evocação quando necessário (KANDEL, 2009). Estas categorias de memória não são excludentes, quando um organismo aprende alguma coisa importante, vários destes sistemas de memória podem ser empregados.

A memória operacional ou memória de trabalho é de curta duração, englobando processos de memória retidos temporariamente que podem ser esquecidos ou transformados em longa duração (GOLDMAN-RAKIC, 1992) representa o armazenamento temporário de informação utilizado para planejar uma ação futura e é processada principalmente no córtex pré-frontal (RUCHKIN *et al.*, 2003).

Alguns estudos mostram que hipocampo não tem uma função simples de registrar informações, mas sim de usar diversos sentidos de modo a concentrar informações espaciais ao redor do animal, como se contivesse um mapa de interação com o meio ambiente que o guiasse de responsabilidade de células localizadoras chamadas de “place cells” (O’KEFFE; DOSTRVSKY, 1971). Em 1973, os fisiologistas Timoty Bliss e Terje Lomo fizeram uma notável descoberta quando baseados nas observações de Brenda Miller sobre o papel do hipocampo no armazenamento da memória. Eles tentaram verificar as características das sinapses no hipocampo e demonstraram que um período breve de atividade elétrica de alta frequência na via das colaterais de schaffer, onde as células piramidais de CA3 enviam axônios para região CA1 do hipocampo, produzia um aumento na magnitude da resposta pós-sináptica. Esse aumento pode perdurar algumas horas em animais anestesiados ou vários dias ou mesmo meses em animais acordados. Este fenômeno foi denominado pelos pesquisadores de potenciação de longa duração ou *long-term potentiation* (LTP). O LTP é o forte candidato para explicar o mecanismo de armazenamento (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993).

Em situações em que ocorre falência energética no cérebro, pode haver uma falha no processo de memória podendo comprometer as atividades diárias. Estima-se que um terço das vítimas de AVC apresentarão problemas graves de memória (MAUD, 2006). Pacientes com doença cerebrovascular ocasionalmente exibem distúrbios cognitivos, como amnésia e desorientação topográfica (CAPLAN *et al.*, 1985; CAPLAN *et al.*, 1990).

A isquemia cerebral focal em animais leva a déficits cognitivos e sensorio motor (STEM *et al.*, 2008) principalmente na memória operacional, acessada através de tarefas de reconhecimentos de objetos e lugares (WOOD *et al.*, 1993; MUMBY *et al.*, 1996; GULINELLO *et al.*, 2006; PLAMONDON; MORIN; CHARRON, 2006) e na memória espacial (SANDSTROM; ROWAN, 2007). Estudos demonstraram déficit na memória de curta duração em ratos no labirinto em Y seguido de hipóxia-isquemia e subsequente injúria hipocampal (FAN *et al.*, 2005; MATCHETT *et al.*, 2007).

### 1.11 Terapias de reparo

Algumas terapias tem sido estudadas a fim de reduzir os déficits cognitivos e a mortalidade em casos de AVC. Antes dos anos 90 não haviam praticamente publicações que abordassem terapias para isquemia cerebral, no entanto nos últimos desde de 2002 até 2008 mais de 1000 artigos pré clínicos e mais de 400 artigos na área clínica foram publicados (GINSBERG, 2008).

As classes de drogas já testadas incluem antagonistas de canais de cálcio, fármacos que inibem a liberação de glutamato, fármacos que potencializam os efeitos do GABA e fármacos antioxidantes (MADDEN; CLARCK; LESSOV, 2003). Mais de 250 estudos pré-clínicos foram desenvolvidos com a nimodipina na isquemia cerebral. Destes 250, 20 estudos foram desenvolvidos com animais e a nimodipina administrada após a indução da isquemia. Apenas 10 destes estudos encontraram resultados positivos, assim como 10 não encontraram. Nos 7 estudos que quantificaram o tamanho exato da área de infarto todos mostraram efeitos favoráveis da nimodipina. Os estudos mais robustos obtiveram resultados indefinidos em sua maioria, onde o uso de nimodipina não trouxe melhora nos parâmetros de mortalidade e escalas de evolução neurológica (GINSBERG, 2008).

O uso clínico de antagonistas NMDA foi associado a efeitos colaterais neuropsiquiátricos e cardiovasculares provavelmente relacionados à interferência com a função glutamatérgica cerebral (SMITH, 2004). O representante do grupo dos antagonistas competitivos, o selfotel, foi testado em ensaio pré-clínico e clínico. Nos estudos pré-clínicos mostrou reduzir a área isquêmica. Nos estudos clínicos de segurança e torelabilidade mostrou diversas reações adversas como alucinações, agitação, confusão mental, delírio e paranóia em todos os pacientes tratados com a dose de 2mg/kg (GINSBERG, 2008).

Um dos fármacos antioxidantes utilizado em teste pré-clínicos trilazade é um inibidor de peroxidação lipídica dependente de ferro não glicocorticoide. Os estudos pré-clínicos mostraram que o trilazade foi capaz de diminuir o tamanho da lesão isquêmica e melhorar o desempenho neurológico, sendo maior sua eficácia em modelos de oclusão temporária do que em modelos permanentes ou trombóticos. Além disso, sua eficácia parece ser maior quando administrado antes da isquemia, ou apenas 10 minutos depois da isquemia.

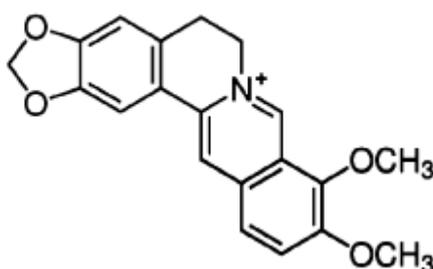
A janela terapêutica pequena também é um dos problemas de várias terapias já estudadas e por todo o exposto é necessário o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento do AVC.

### 1.12 Berberina

Os alcalóides são substâncias isoladas de plantas de vários gêneros caracterizados por apresentar um nitrogênio heterocíclico. Tais substâncias constituem uma das mais importantes classes de fármacos antitumorais (GRANADA *et al.*, 2007). Diversos alcalóides apresentam ação neuroprotetora comprovada. A matrine, alcalóide isolado da *Saphora flavecensces*, apresenta efeito neuroprotetor em modelo de isquemia focal cerebral permanente em ratos (XU *et al.*, 2012). A nicotina, principal alcalóide do tabaco, protege neurônios dopaminérgicos em modelo de doença de Parkinson (QUIK *et al.*, 2012).

A berberina (C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub>) é um alcalóide isoquinolínico com uma longa história de uso na medicina chinesa e ayurvédica. A berberina pode ser encontrada em raízes e cascas de diversas espécies de plantas, dentre elas *Hydrastis canadensis*, *Coptidis chineses*, *Berberis aquifolium*, *Beberis vulgaris* e *Berberis aristata* (WANG *et al.*, 2003).

**Figura 5.** Estrutura Química da berberina



A berberina possui intensa coloração amarelada, com ponto de fusão em torno de 145°C, e nas aplicações clínicas é administrada na forma de cloreto ou sulfato. (KULKARNI; DHIR, 2009).

A berberina não é considerada tóxica quando usada nas doses de 200-1.000 mg, duas a três vezes ao dia. (RABBANI *et al.*, 1987). A DL 50 encontrada em camundongos Swiss é de 500 mg/kg, quando administrada agudamente, já na administração crônica durante 10 dias é de 150 mg/kg (ANIS *et al.*, 2001). Estudos também observaram que quando administrada na dosagem de 100 mg/kg, v.o., em ratos, a biotransformação observada foi semelhante a dos humanos quando estes eram submetidos a uma dosagem de 300 mg/kg., v.o, três vezes ao dia, por duas semanas (QUIU *et al.*, 2008).

Ainda serão necessários mais estudos para garantir a segurança do uso da berberina em grávidas. Contudo, em um estudo em que foi avaliada a toxicidade da berberina em camundongos e ratas grávidas, na dose de 7.000 e 14.500 ppm, respectivamente, não foi verificada morte fetal. (KULKARNI, DHIR, 2009).

A berberina age aumentando a expressão do receptor de LDL, lipoproteína de baixa densidade, (LDLR) e inibindo a síntese do lipídeo (KONG *et al.*, 2004). A berberina demonstra-se promissora no tratamento de diabetes, hiperlipidemia, AVC, doenças cardíacas e doenças inflamatórias crônicas (ZHU; QIAN, 2006), além de possuir potente atividade antiarrítmica comprovada em modelos animais (WANG *et al.*, 2003). Na medicina indiana e chinesa a berberina têm sido utilizada no tratamento de infecções e parasitoses intestinais (BIRDSALL, KELLY, 1997).

Também foi verificado que a berberina tem propriedades anti-inflamatórias, agindo na redução do metabolismo do ácido aracdônico e na diminuição da expressão da cicloxigenase-2 (COX-2), demonstrando que essa droga possui potencial para o tratamento de em doenças inflamatórias crônicas (LEE *et al.*, 2006).

A Berberina possui ação inibidora da acetilcolinesterase, semelhante à galactamina, droga utilizada no tratamento de doença de Alzheimer (INGKANINAN *et al.*, 2006). ZHU e colaboradores (2006) mostraram que a administração, por v.o., de berberina 50 mg/kg, durante 14 dias, em modelo experimental de Alzheimer em ratos, é eficaz na reversão do dano na memória espacial causado pelo peptídeo  $\alpha$ , $\beta$ -amilóide. As propriedades antiinflamatórias da berberina também podem ser relacionadas com a sua ação neuroproteção na doença de Alzheimer (YOO *et al.*, 2008).

Já foi demonstrado que a berberina reverte o dano cerebral isquêmico causado pela oclusão das carótidas (WU *et al.*, 1995). Em contrapartida, sob aplicação do extrato de *berberry* na isquemia cerebral, tanto no pré quanto no pós tratamento, constatou-se a preservação da densidade semelhantemente ao controle não isquemiado (YOO *et al.*, 2006). Entretanto, o mecanismo pelo qual a berberina exerce sua neuroproteção em situações isquêmicas ainda não está totalmente desvendado, mas já é sabido que a berberina inibe a geração de ROS e, conseqüentemente, a liberação de fatores pró-apoptóticos, como citocromo c e fator indutor de apoptose (AIF) (ZHOU *et al.*, 2008).

Outro estudo para avaliar ação antiinflamatória da berberina demonstrou que após isquemia transitória global a administração de berberina reduziu a morte neuronal (NAKAYAMA *et al.*, 1998).

### 1.13 Relevância e Justificativa

O estudo do AVC é importante principalmente pelo impacto socio-econômico que pode causar ao afetar a população economicamente ativa (ZETOLA *et al.*, 2001). A prevenção secundária do AVC é inadequada em países de baixa e média renda, nos quais as taxas de controle da pressão arterial, do uso de estatinas e do fim do hábito de fumar são geralmente mais baixas após um AVC quando comparamos as mesmas taxas em países de alta renda (JOHNSTON *et al.*, 2009). Cerca de 15 a 30% dos pacientes que apresentam AVC isquêmico têm história prévia de ataque isquêmico transitório, muitas vezes em um curto intervalo de tempo (MASSARO, 2006). Por isso, há necessidade de drogas que também possam trabalhar na neuroproteção de pacientes de risco.

Devido à pequena janela terapêutica do tratamento preconizado e visto que a fisiopatologia da isquemia cerebral é complexa e envolve múltiplas vias iônicas, enzimáticas e genéticas, que variam em função do tempo e extensão da isquemia (SMITH, W., 2004), se faz necessário o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento do AVC, principalmente no sentido de neuroproteção.

A berberina apresenta ações antiinflamatórias, o que a torna uma promessa no tratamento desse modelo, por isso ela foi escolhida por objeto deste estudo (NAKAYAMA *et al.*, 1998) (ZHOU *et al.*, 2008) (WU, LIU, 1995).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Estudar os efeitos da berberina sobre o dano neuronal, motor, comportamento, memória e inflamação de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal (ICF).

### **2.2 Objetivos Específicos**

Produzir dano neuronal, déficit de memória e alteração comportamental e motora usando modelo de isquemia cerebral focal permanente por oclusão da artéria cerebral média em camundongos.

Estudar o efeito neuroprotetor da berberina no modelo avaliando os seguintes aspectos:

- O dano neuronal;
- A alteração comportamentais e déficits de memória;
- Resposta inflamatória através da atividade da mieloperoxidase no hipocampo, estriado e córtex temporal;
- O estresse oxidativo através dos níveis de GSH no córtex.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos adultos *Swiss*, machos, com peso entre 25 e 30g, provenientes do biotério central do *Campus* do Pici, da Universidade Federal do Ceará (UFC) e Mantidos no o biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, UFC. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas apropriadas, forradas com raspas de madeira, com ciclo de claro/escuro de 12h/12h e alimentados com ração padrão e água à vontade.

No que se refere aos cuidados com os animais, este estudo seguiu os princípios éticos da experimentação animal, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O estudo foi submetido ao comitê de ética em pesquisa animal da Universidade Federal do Ceará sob o número de registro 074/11.

#### 3.2 Drogas

Berberina (SIGMA, EUA); Cloridrato de Xilazina 2% (Kensol<sup>®</sup> Laboratórios König S.A, Argentina); Cloridrato de Ketamina 5% (Vetanarcol<sup>®</sup>, Laboratórios König S.A, Argentina). Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico.

#### 3.3 Isquemia cerebral focal (ICF) por oclusão da artéria cerebral média (Tamura *et al.*, 1981)

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.

Inicialmente foi realizada uma incisão na linha entre o olho direito e a orelha, o músculo temporal foi dissecado e, posteriormente, realizada uma craniectomia com uma broca de 1 (mm), seguido da exposição e cauterização da artéria cerebral média. Em seguida a incisão foi suturada com fio de nylon 3.0, e os animais foram colocados em gaiolas individuais 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 cauterização da artéria cerebral média (Figura 6).

**Figura 6** - Foto mostrando a cirurgia de isquemia cerebral focal em um camundongo no momento da aproximação do bisturi elétrico para coagulação da artéria cerebral média.



Fonte: arquivo pessoal.

### 3.4 Protocolo experimental

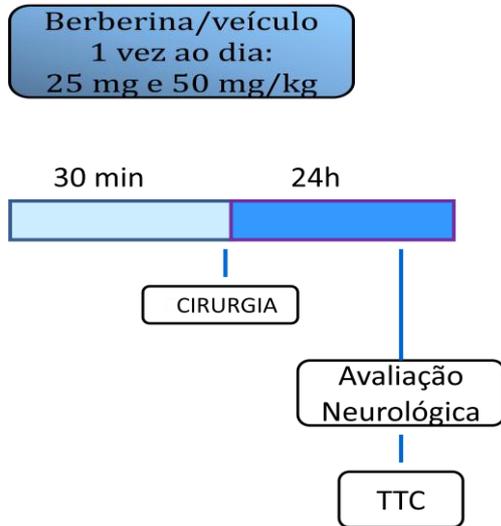
O início do desenho experimental foi realizado com a administração de berberina e veículo apenas uma vez ao dia, como apresentado no protocolo 1. Após a realização do protocolo 1 demos continuidade as demais avaliações utilizando o protocolo 2 onde a berberina ou veículo era administrado duas vezes ao dia. A berberina ou o veículo (água destilada) foram administrados por via oral

Os animais foram divididos em grupos e subgrupos para as análises bioquímicas e comportamentais. O grupo A era composto pelo subgrupo 1 (N=6) onde foi avaliado o TTC e avaliação neurológica, subgrupo 2 (N=8) foi realizado o campo aberto, labirinto em y e esquiva passiva e o subgrupo 3 (N=8) labirinto aquático e reconhecimento de objetos. O grupo B possuía o subgrupo 4 (N=6) onde foi feita a dosagem de mieloperoxidase, subgrupo 5 (N=5) avaliação dos níveis de glutathiona e subgrupo 6 (N=4) que foi realizada o fluorojade.

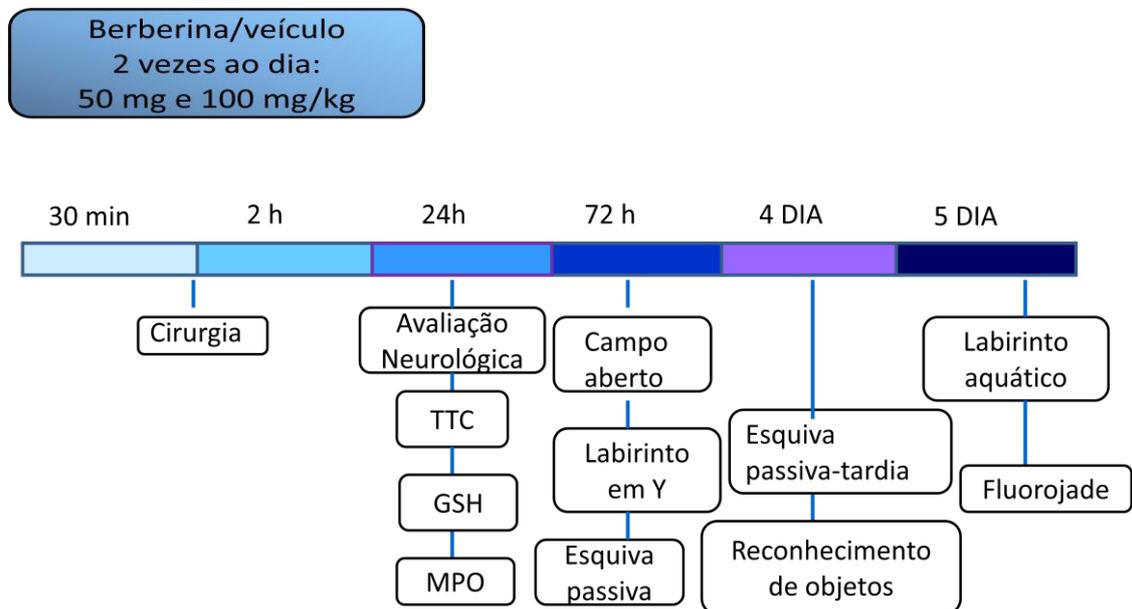
Os testes de comportamento eram realizados nos horários entre 10:00 e 16:00 horas, sendo os animais tratados com duas doses também no mesmo intervalo de tempo entre as doses. Os protocolos experimentais utilizados foram (Figura 7):

**Figura 7:** Protocolos experimentais

## Protocolo 1



## Protocolo 2



Os animais foram divididos em seis grupos de acordo com o seguinte esquema de tratamento:

| <b>Grupo</b>  | <b>Dose diária de Berberina</b> | <b>Administração Berberina ou veículo</b>                             |
|---------------|---------------------------------|---|
| FO            | -----                           | 30 min antes, 2 h após ICF e uma vez ao dia, nos dias subsequentes    |
| FO BE 100     | 100 mg/kg                       | 30 min antes, 2 h após ICF e duas vezes ao dia, nos dias subsequentes |
| ICF           | -----                           | 30 min antes. 2 h após ICF e nos dias subsequentes                    |
| ICF BE 25     | 25 mg/kg                        | 30 min antes de ICF e uma vez ao dia nos dias subsequentes            |
| ICF BE 50     | 50 mg/kg                        | 30 min antes de ICF e uma vez ao dia nos dias subsequentes            |
| ICF BE 25(2x) | 50 mg/kg                        | 30 min antes e 2 h após ICF e duas vezes ao dia nos dias subsequentes |
| ICF BE50(2x)  | 100 mg/kg                       | 30 min antes e 2 h após ICF e duas vezes ao dia nos dias subsequentes |

### **3.5 Avaliação Neurológica (Garcia *et al.*, 1995)**

A avaliação neurológica foi realizada 24 h após da isquemia. Os achados neurológicos são pontuados utilizando uma escala previamente descrita por Garcia e colaboradores (1995).

Os parâmetros avaliados foram: 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; simetria do movimento das quatro patas, que analisa se o animal ao ser segurado pela cauda e suspenso no ar mostra simetria nos membros; estiramento

das patas dianteiras, que avalia se o animal caminha sobre as patas dianteiras na borda de uma mesa; “gripping”, que analisa a capacidade do animal de agarrar firmemente uma grade de ferro ou de fazer movimentos circulares; propriocepção corpórea na qual o animal é tocado com uma pinça em ambos os lados do corpo e sua reação é observada, que avalia a resposta sensorial; e 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 (Quadro 1).

### **3.6 Avaliação do infarto isquêmico – Teste do Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol (TTC) (Goldlust *et al.*, 1996)**

A coloração com o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazol (TTC) é utilizada para identificar e quantificar as regiões de infarto decorrentes da isquemia cerebral focal. O TTC recebe um próton da succinato desidrogenase na membrana interna da mitocôndria, o que o reduz para uma forma insolúvel, o formazan, com coloração avermelhada que se deposita nas células viáveis. As células da região de infarto não possuem mitocôndrias viáveis, não havendo a formação do formazan e sem a coloração vermelha e, portanto, apresentando-se como uma região pálida.

Vinte e quatro horas após a isquemia os animais foram mortos por decaptação e seus cérebros foram removidos e conservados em salina gelada até o momento dos cortes, os cérebros foram fatiados na espessura de 2 mm e imersos em solução de 2% de TTC à 37°C por 30 minutos. Em seguida, as fatias tiveram suas imagens digitalizadas em alta resolução, sendo analisadas as áreas de edema e as áreas totais para os cálculos das respectivas percentagens. Tal metragem foi realizada utilizando-se o software Osiris<sup>TM</sup> (*University of Geneva, Switzerland*).

**Quadro 1 - Avaliação neurológica**

| Testes  | Escore                                    |  |   |  |
|---|---|--|---|--|
|   | 0   | 1  | 2   | 3  |
| <b>Atividade Espontânea</b>                   | Animal sem movimento                      | Animal não se ergue e raramente se movimenta | Animal se movimenta, mas não se aproxima de três lados da caixa | Animal se movimenta e se aproxima de três lados da caixa |
| <b>Simetria do movimento das quatro patas</b> | Lado esquerdo: sem movimento              | Lado esquerdo: raros movimentos              | Lado esquerdo: movimentos lentos                                | Ambos os lados: movem simetricamente                     |
| <b>Estiramento das patas dianteiras</b>       | Lado esquerdo: sem movimento, não estende | Lado esquerdo: poucos movimentos de extensão | Lado esquerdo: move-se e estende menos que o lado direito       | Ambos os lados: Extensão simétrica                       |
| <b>“Gripping”</b>                             | ...                                       | Não consegue escalar                         | Consegue escalar, mas o lado esquerdo esta fraco                | Escalada normal  |
| <b>Propiocepção Corpórea</b>                  | ...                                       | Lado esquerdo: sem resposta                  | Lado esquerdo < Lado direito                                    | Resposta Simétrica                                       |
| <b>Resposta ao toque da Vibrissa</b>          | ...                                       | Lado esquerdo: sem resposta                  | Lado esquerdo < Lado direito                                    | Resposta Simétrica                                       |

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

### 3.7 Avaliação da atividade locomotora - Teste do Campo Aberto (Broadhurst, 1957).

O teste da avaliação locomotora utiliza o aparato denominado “Campo aberto” muito popular, pois apresenta fácil manipulação e o animal é observado com comportamentos bem definidos de simples registro (WALSH; CUMMINS, 1976). 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 8). 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). Também foi avaliado o 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 8** – Arena do Campo Aberto.



Fonte: arquivo pessoal

### **3.8 Avaliação da memória de trabalho - Teste do labirinto em Y (Sarter *et al.*, 1988).**

A memória operacional ou de trabalho foi avaliada através do teste do labirinto em Y. Nesse teste o animal é colocado em um labirinto em forma de Y com os três braços iguais (Sarter *et al.*, 1988). Os animais apresentam forte tendência de alternar a entrada nos diferentes ambientes.

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 9).

**Figura 9 - Labirinto em Y.**



Fonte: arquivo pessoal.

Para a avaliação da memória os braços foram numerados. O animal foi colocado no aparelho e durante 8 minutos o número de cada braço que o animal entrou foi anotado. 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:

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

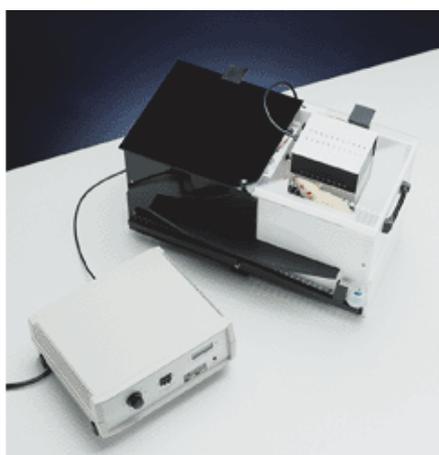
O sucesso do teste é indicado pela alta taxa de alternância nos grupos controle, indicando que os animais podem se lembrar em qual braço entraram por último (Stone *et al.*, 1991). Entre cada sessão, o labirinto foi higienizado com uma solução de álcool a 20% e secado com toalhas de papel.

### **3.9 Avaliação da memória aversiva – Teste da Esquiva Passiva (De Noble, 1986)**

Uma forma de avaliar a resposta condicionada ao medo é através da realização do teste da esquiva passiva (De Noble *et al.*, 1986). Durante o teste, a inibição da tendência natural do animal de entrar no compartimento escuro, devido à presença de um componente aversivo, constitui uma resposta condicionada.

O aparelho consiste de uma caixa de acrílico (48 x 22 x 22), dividida em dois compartimentos separados por uma janela, um branco (iluminado) e um preto (escuro), este tem o piso eletrificado (Figura 10). O animal foi colocado no compartimento iluminado e deixado para ambientação no aparelho durante um 1 min., quando então foi retirado. Após 30 segundos, o animal foi colocado novamente no compartimento iluminado. O animal ao entrar no compartimento escuro, recebeu um choque de 0,5 mA, durante 1 s., com o tempo de latência para entrar sendo registrado, até um máximo de 300 s (treino). Retirou-se o animal (alguns animais retiraram-se espontaneamente após o choque) e após 15 min. este foi colocado novamente no compartimento iluminado e registrou-se a latência de entrada (avaliação da memória recente). A retenção do aprendizado (avaliação da memória tardia) foi testada após 24 h, quando o animal era colocado no compartimento iluminado e o tempo de latência para a entrada no compartimento escuro foi registrado, nessa etapa o animal não recebe o choque.

**Figura 10** - Aparelho de Esquiva Passiva.



Fonte: Ugo Basili.

### **3.10 Avaliação da memória espacial - Teste do Labirinto Aquático (Morris *et al.*, 1984)**

Nesta versão do labirinto aquático os roedores aprendem a nadar a uma distância mais curta possível das bordas de um tanque de água para uma plataforma escondida abaixo da superfície. Eles aprendem guiados por pistas nas paredes ou outros estímulos visuais externos ao tanque. Esta tarefa espacial é dependente do hipocampo.

O animal foi colocado de forma aleatória em uma piscina circular (90 cm de diâmetro e 60 cm de profundidade) contendo água turva (até 30 cm de altura) com tinta branca não tóxica à 26 °C, dividida espacialmente em quatro quadrantes, devendo encontrar uma plataforma (7cm de diâmetro) submersa 2cm (Figura 11). O animal teve 60s para achar a plataforma (que permaneceu no mesmo local em todos os treinos) e lá permaneceu por 10s. Este treino foi realizado quatro vezes por dia com intervalos de 30s entre os treinos, durante dois dias (aprendizagem) e 48h após o último treino, os animais foram submetidos ao teste, agora sem a plataforma, onde foi avaliada a aquisição da memória. Na ocasião, o animal permaneceu na piscina por 60s e foi registrado o tempo em que o animal se posiciona no quadrante em que a plataforma deveria estar, o tempo de latência para encontrar o local da plataforma e o número de vezes em que ele cruzou o local exato da plataforma.

**Figura 11** - Labirinto aquático.



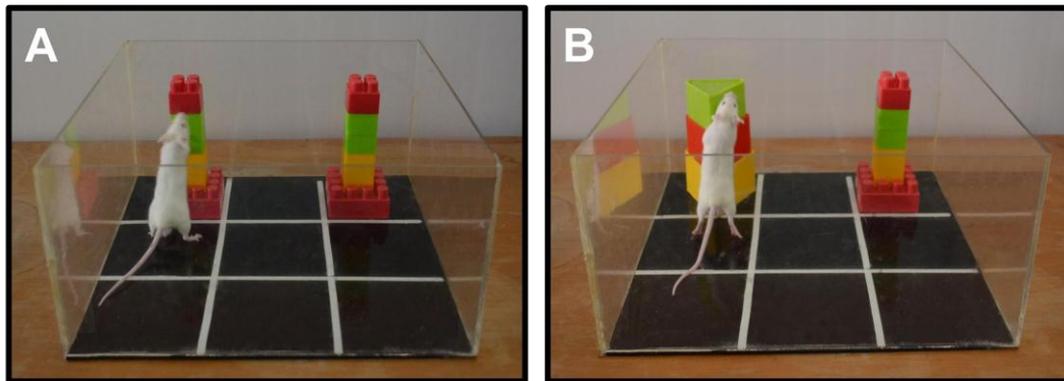
Fonte: Arquivo pessoal.

### **3.11 Avaliação da memória explícita – Teste do Reconhecimento de Objetos (Ennaceur; Delacour, 1988).**

O teste de reconhecimento de objetos é baseado na tendência natural dos animais buscarem o novo. Durante o treino o animal foi colocado numa arena quadrada (30 x 30 x 15 cm) de acrílico preto contendo dois objetos iguais (OI) e, durante 10 min, ele pode explorar o

ambiente e os objetos (Figura 12A). Após 1h, um dos objetos iguais foi substituído pelo objeto novo (ON) e o animal foi colocado novamente na arena (teste) (Figura 12B). Durante 5 min o tempo que o animal gastou explorando cada um dos objetos foi anotado. O resultado foi expresso como índice de reconhecimento e foi obtido através da seguinte fórmula matemática:  $(\text{tempo ON} - \text{tempo OI}) / (\text{tempo ON} + \text{tempo OI})$ .

**Figura 12** – Arena com objetos.



Fonte: Arquivo pessoal.

### 3.12 Ensaio para Mieloperoxidase (MPO) (Bradley *et al.*, 1982)

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente nos grânulos de neutrófilos. Essa enzima é utilizada como indicador de processo inflamatório, mais especificamente, como marcador de migração de neutrófilos dos tecidos. Neste ensaio, a  $\text{H}_2\text{O}_2$  é clivada por meio da MPO presente nas amostras de tecido. O radical oxigênio ( $\text{O}^\bullet$ ) resultante se combina com diidrocloreto de O-dianisidina que é convertido a um composto colorido. O aparecimento deste composto, ao longo do tempo, é medido por espectrofotômetro para determinar o conteúdo de MPO do ensaio.

Vinte e quatro horas após a indução da isquemia os animais foram eutanasiados, seus cérebros rapidamente removidos e amostras do córtex, estriado e hipocampo foram dissecadas e pesadas. As áreas foram homogeneizadas (50mg/mL) em uma solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5 % (HTAB) em tampão fosfato 50 mM, pH 6,0. Em seguida, os homogenatos foram centrifugadas (14000 rpm, 4°C) por 2 minutos. Adicionou-se

30 $\mu$ L do sobrenadante da amostra e 200 $\mu$ L da solução contendo 0,167 mg/ml de hidrócloro de  $\theta$ -dianisidina e 0,0005 % de peróxido de hidrogênio. A absorbância foi medida nos tempos 0,1 e 3 minutos no comprimento de onda 460nm. Os resultados foram dados como unidades de MPO por mg de tecido, sendo uma unidade de MPO equivalente à quantidade que degrada 1 $\mu$ mol/min de peróxido de hidrogênio.

### **3.13 Determinação da concentração de grupos sulfidrilicos não proteicos (NP.SH) (Sedlak & Lindsay, 1968)**

O método utilizado baseia-se na reação do reagente de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) - DTNB) com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico com pico de absorbância em 412 nm. Vinte e quatro horas após a isquemia os animais foram eutanasiados, seus cérebros removidos e amostras do córtex foram dissecadas, pesadas e armazenadas a - 80°C para posterior análise. O preparo das amostras foi feito da seguinte forma: 40  $\mu$ L de cada amostra (homogenato a 10% em tampão fosfato) foi adicionada a 50  $\mu$ L de água destilada e 10  $\mu$ L de TCA (ácido tricloro acético) 50%. O material foi centrifugado a 3000 g por 10 min e retirado 60  $\mu$ L do sobrenadante que foi adicionado à solução de DTNB em tampão Tris. A curva padrão foi obtida mediante leitura de várias concentrações de GSH padrão (1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100  $\mu$ g) e os resultados foram expressos em  $\mu$ g/  $\mu$ g de tecido.

### **3.14 Avaliação da degeneração neuronal através do Fluoro Jade C (Schmued *et al.*, 2005).**

A técnica de coloração pelo Fluoro Jade C identifica neurônios em degeneração com alta sensibilidade. Os animais foram perfundidos através do ventrículo esquerdo com salina gelada, seguido de paraformaldeído a 4% em PBS. Os cérebros foram removidos e pós-fixados com formol tamponado por 24 horas, após esse período foram armazenados em solução crioprotetora de sacarose a 30% em geladeira. O tecido foi cortado no criostato fatias de 40  $\mu$ m e montado em lâminas gelatinizadas.

As lâminas foram imersas durante 5 min numa solução básica de álcool que consiste em: 0,01% NaOH (0,01g para 100 ml) em 80% de etanol, depois em etanol a 70% durante 2 min e água ultrapura durante 2 min. Em seguida, foram incubadas, sob agitação, em 0,06% de Permanganato de Potássio durante 10 min (protegidas da luz), lavadas em água durante 2 min e incubadas, sob agitação, durante 10 min, na solução 0,0001% de Fluoro-Jade C em 0,1% de ácido acético e lavadas novamente com água ultrapura 3x (1 min de cada vez). Após secagem das lâminas (ao ar ou em estufa a 50°C), as lâminas foram mergulhadas em xilol (câmara de exaustão) durante 1 min e montadas com o meio de montagem Entellan.

A marcação com Fluoro Jade C foi quantificada em séries de 8 seções coronais (40 µm de espessura e espaçamento de 300 µm) representativas do estriado e córtex de 3 animais de cada grupo experimental. A quantificação da Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) utilizada para mensuração foi calculada através do programa Image J. Foi feita uma média para os valores MIF obtidos para o grupo controle (FO) e todos os outros foram calculados como percentagem desse valor, sendo representados como média do controle  $\pm$  EPM.

### **3.15 Análise estatística**

Foram realizados testes não paramétricos (Kruskall-Wallis e Mann-Whitney) para a análise estatística dos testes comportamentais, sendo os resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Os escores neurológicos foram expressos em mediana (valores máximo e mínimo), utilizando-se os testes de Kruskall-Wallis e teste de Dunn para comparação entre os grupos. Para o ensaio de MPO e de GSH foram utilizados ANOVA e o teste de Tukey como teste post-hoc. O critério de significância utilizado foi de  $p < 0,05$ . O programa de computador usado foi Graph Pad InStat® 5.0.

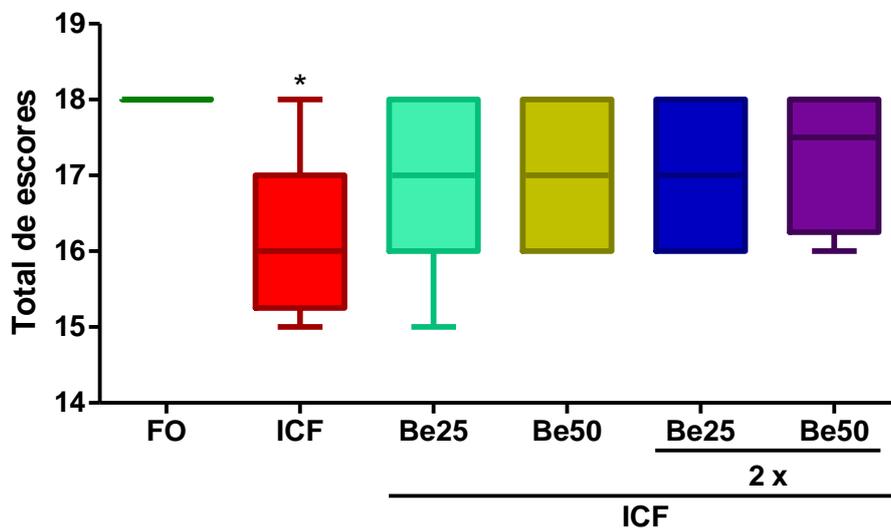
A avaliação dos testes comportamentais foi realizada utilizando os testes de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney. Para avaliação dos demais resultados foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey. Em todos os testes o critério de significância de  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Efeito da berberina (25, 50 e 100mg/kg) sobre a avaliação neurológica de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente (ICF) por oclusão da artéria cerebral média.

Os animais isquemiados apresentaram déficits neurológicos em relação aos animais falso-operados significativos 24 horas após a isquemia (FO: 18 (18-18); ICF: 16 (15-18)) (Figura 13), apresentando principalmente diminuição da habilidade motora, mas também diminuição da capacidade de responder a estímulos no lado contralateral à isquemia. O tratamento com a berberina não apresentou melhora significativa no déficit neurológico induzido pela isquemia (BE25 17 (15-18); BE50: 17 (16-18); BE25 (2X): 17 (16-18); BE50 (2X): 17,5 (16-18)).

**Figura 13.** Avaliação Neurológica dos camundongos tratados com berberina.

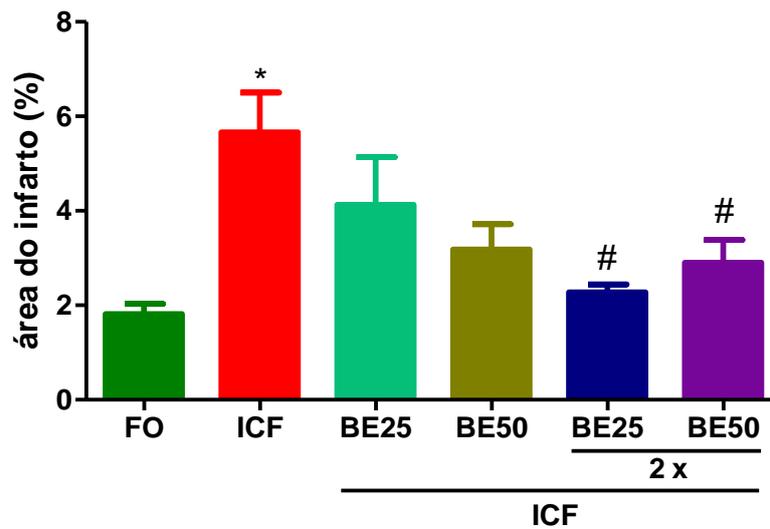


Os grupos Be25 e Be50 receberam uma única dose 30min antes da cirurgia e os grupos Be25 2x (50mg/kg) e Be50 2x (100mg/kg) receberam 30min antes e 2h após a cirurgia. Os valores representam a mediana (mínimo e máximo). \*vs FO,  $p < 0.05$ , Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

#### 4.2 Efeito da berberina (25, 50 e 100mg/kg) sobre o infarto neuronal de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente (ICF) por oclusão da artéria cerebral média.

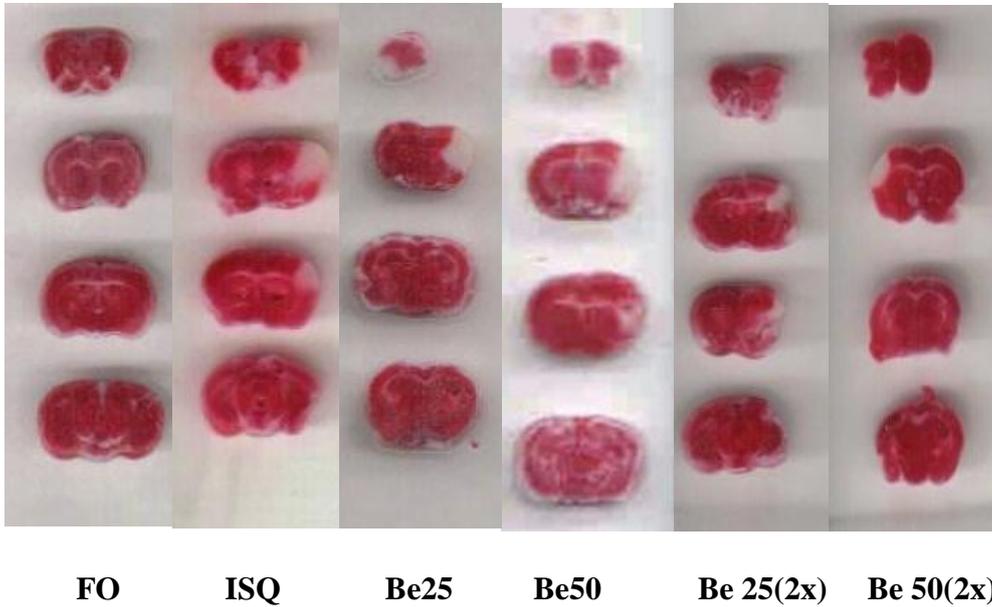
Os animais falsos operado apresentaram menor dano cerebral isquêmico analisado 24 horas após a isquemia em relação aos animais isquemiados (FO:  $1,82 \pm 0,21\%$ ; ICF:  $5,66 \pm 0,84\%$ ), apresentando menores áreas de isquemia. O tratamento com a berberina nas doses de 50 e 100mg/kg diminuíram significativamente o dano neuronal isquêmico (BE25  $4,13 \pm 1,0\%$ ; BE50:  $3,18 \pm 0,53\%$ ; BE25 (2X):  $2,28 \pm 0,16\%$ ; BE50 (2X):  $2,90 \pm 0,48\%$ ) (Figura 14).

**Figura 14.** Avaliação da área do infarto neuronal de camundongos isquemiados tratados com berberina.



Os grupos Be25 e Be50 receberam uma única dose 30min antes da cirurgia e os grupos Be25 2x (50mg/kg/dia) e Be50 2x (100mg/kg/dia) receberam 30min antes e 2h após a cirurgia. Os valores representam a média  $\pm$  EPM. \*vs FO, #vs ICF,  $p < 0.05$ . Teste de Kruskal-Wallis e teste Mann-Whitney.

**Figura 15** – Visualização do dano neuronal isquêmico através da coloração de TTC entre os grupos.

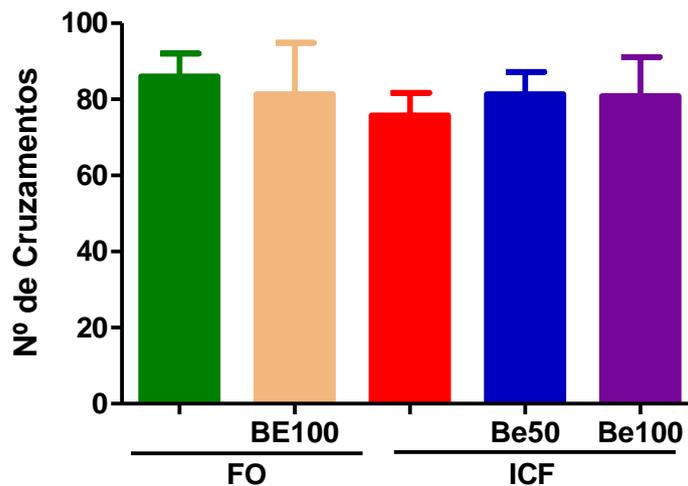


As áreas de infarto isquêmico, nas quais as células não são mais viáveis (com enzimas inativas) correspondem às regiões pálidas, sem coloração.

### 4.3 Efeito da berberina (50 e 100mg/kg/dia) sobre a atividade locomotora de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente (ICF) por oclusão da artéria cerebral média.

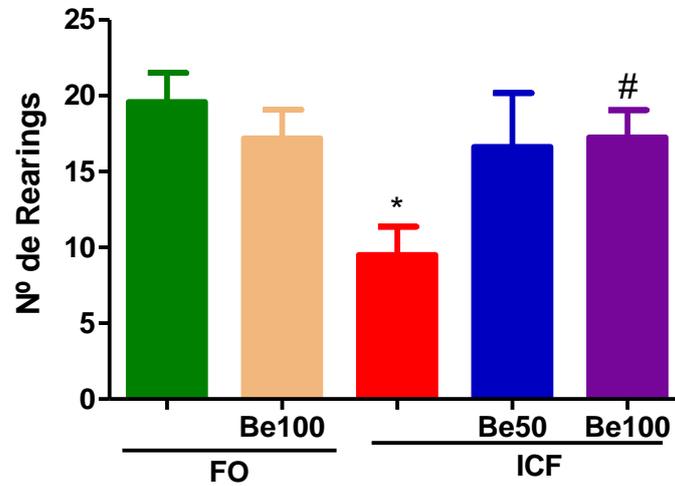
Na avaliação da atividade locomotora não foram observadas alterações significativas no número de cruzamentos entre os grupos (FO:  $86,0 \pm 6,2$ ; FO Be100  $81,40 \pm 13,50$ ; ICF:  $75,8 \pm 5,9$ ; ICF Be50:  $81,4 \pm 5,8$ ; ICF Be100:  $80,9 \pm 10,2$ ) (Figura 16). A isquemia promoveu uma diminuição no número de rearings em relação ao animal falso operado (FO:  $19,6 \pm 1,9$ ; ICF:  $9,5 \pm 1,9$ ). O tratamento com a berberina (100mg/kg/dia) preveniu esse efeito (ICF Be50:  $16,6 \pm 3,6$ ; ICF Be100:  $17,2 \pm 1,8$ ) (Figura 17).

**Figura 16.** Avaliação do número de cruzamentos em camundongos isquemiados tratados com berberina.



Os animais foram tratados 30min antes e 2h após a cirurgia e diariamente por 3 d. Os valores representam a média ± EPM.

**Figura 17.** Avaliação do numero de rearings em camundongos isquemiados tratados com berberina.

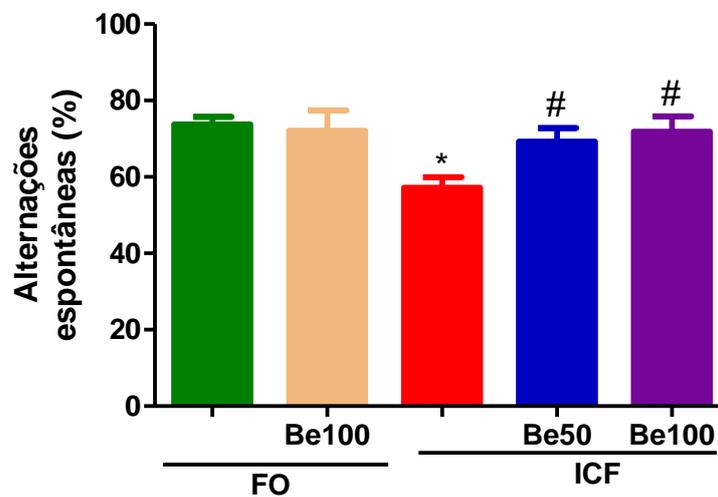


Os animais foram tratados 30min antes e 2h após a cirurgia e diariamente por 3 d. Os valores representam a média  $\pm$  EPM. \* vs FO, # vs ICF,  $p < 0,05$ , testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

#### 4.4 Efeito da berberina (50 e 100mg/kg) sobre a memória de trabalho de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente por oclusão da artéria cerebral média.

Os animais submetidos a isquemia apresentaram déficit na memória de trabalho e esse efeito foi prevenido pela berberina ( $p < 0,05$ ) (50 e 100 mg/kg) (FO:  $73,8 \pm 1,9\%$ ; FO Be100  $72,10 \pm 5,3\%$ ; ICF:  $57,2 \pm 2,7\%$ ; ICF Be50:  $69,3 \pm 3,5\%$ ; ICF Be100:  $71,9 \pm 3,9\%$ ) (Figura 18).

**Figura 18.** Avaliação da memória de trabalho de camundongos isquemiados tratados com berberina.

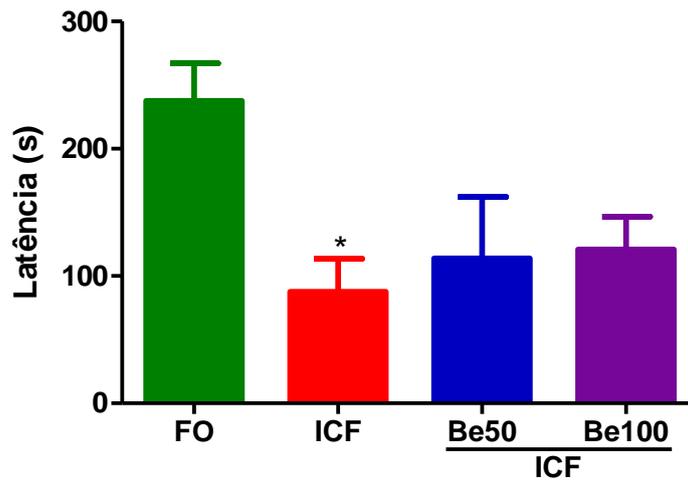


Os animais foram tratados 30min antes e 2h após a cirurgia e diariamente por 3d. Os valores representam a média  $\pm$  EPM. \* vs FO, # vs ISQ,  $p < 0,05$ , testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

#### 4.5 Efeito da berberina (50 e 100mg/kg) sobre a memória aversiva de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente por oclusão da artéria cerebral média.

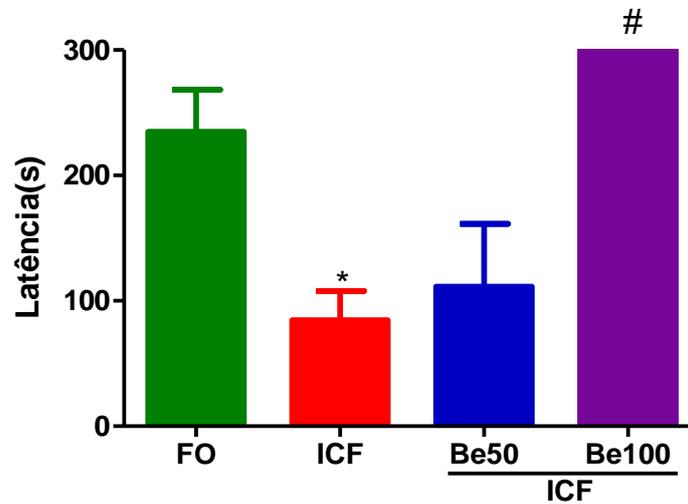
Animais submetidos à isquemia apresentaram déficits significativos de memória recente latência (FO:  $237,5 \pm 29,6$  s; ICF:  $87,2 \pm 25,8$ s). O tratamento com a berberina não preveniu ( $p > 0,05$ ) esse efeito (ICF + Be50:  $114,0 \pm 48,3$ s; ICF + Be100:  $120,9 \pm 25,8$ s) VS grupo ICF (Figura 19). A isquemia também promoveu um déficit na memória tardia e o tratamento com berberina (100 mg/kg) preveniu esse efeito (FO:  $235,0 \pm 33,4$ s; ICF:  $84,7 \pm 23,3$ s; ICF + Be50:  $111,3 \pm 50,2$ s; ICF + Be100:  $300,0 \pm 0$ s) (Figura 20).

**Figura 19.** Avaliação memória recente de camundongos isquemiados tratados com berberina.



Os animais foram tratados 30min antes e 2h após a cirurgia e diariamente por 3d. Os valores representam a média  $\pm$  EPM. \* vs FO,  $p < 0,05$ , testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

**Figura 20.** Avaliação da memória tardia de camundongos isquemiados tratados com berberina.



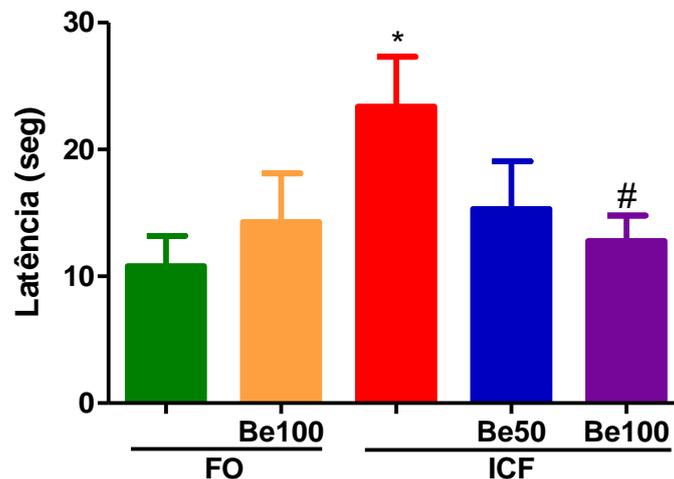
Os animais foram tratados 30min antes e 2h após a cirurgia e diariamente por 4d. Os valores representam a média  $\pm$  EPM. \* vs FO, # vs ICF,  $p < 0,05$ , testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

#### 4.6 Efeito da berberina (50 e 100mg/kg) sobre a memória espacial de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente por oclusão da artéria cerebral média.

Na avaliação da memória espacial a isquemia promoveu um déficit significativo nos parâmetros latência para alcançar a plataforma e tempo no quadrante e uma tendência a diminuir o número de cruzamentos (Latência: FO:  $10,8 \pm 2,4$ s; ICF:  $23,4 \pm 3,9$ s. Tempo de permanência no quadrante: FO:  $26,8 \pm 1,9$ ; ICF:  $17,5 \pm 1,3$ . Número de cruzamentos: FO:  $4,9 \pm 0,7$ s; ICF:  $3,6 \pm 0,4$ s).

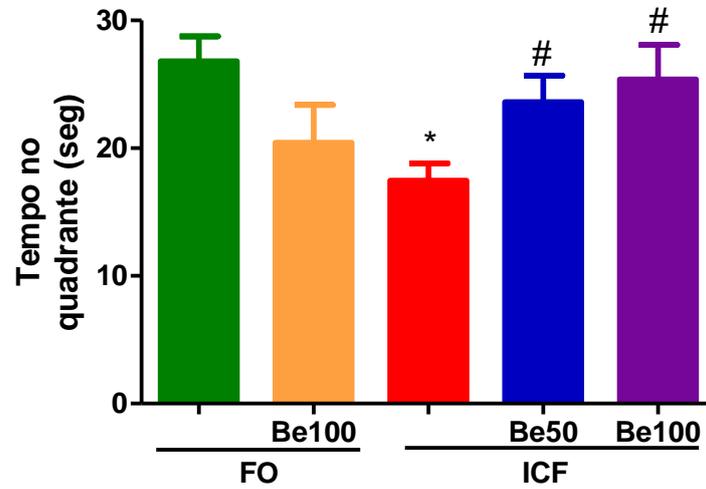
O tratamento com a berberina preveniu o aumento da latência e a diminuição no tempo no quadrante, além de promover uma tendência à aumento no parâmetro número de cruzamentos (Latência: ICF Be50:  $15,3 \pm 3,7$ s; ICF Be100:  $12,8 \pm 2,0$ s. Tempo de permanência no quadrante: ICF Be50:  $20,6 \pm 2,0$ s; ICF Be100:  $25,4 \pm 2,7$ s. Número de cruzamentos: ICF Be50:  $3,9 \pm 0,7$ s; ICF Be100:  $4,7 \pm 0,7$ s). (Figuras 21, 22 e 23).

**Figura 21.** Avaliação da latência de camundongos isquemiados tratados com berberina no teste labirinto aquático.



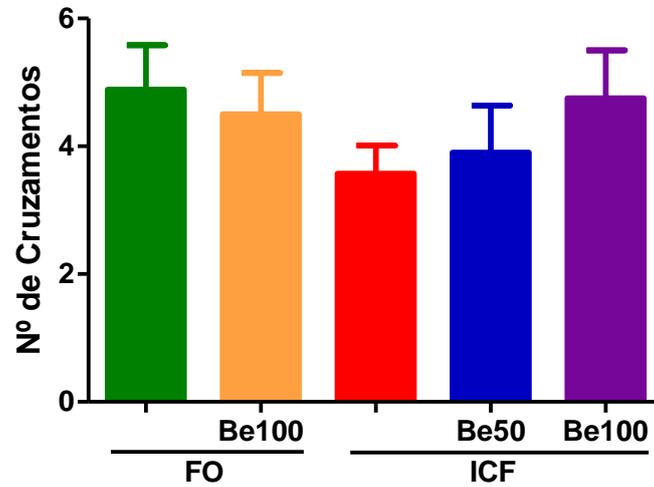
Os animais foram tratados 30min antes e 2h após a cirurgia e diariamente por 5d. Os valores representam a média  $\pm$  EPM. \* vs FO, # vs ICF,  $p < 0,05$ , testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

**Figura 22.** Avaliação do tempo no quadrante de camundongos isquemiados tratados com berberina no teste labirinto aquático.



Os animais foram tratados 30min antes e 2h após a cirurgia e diariamente por 5d. Os valores representam a média  $\pm$  EPM. \*vs FO, #vs ICF,  $p < 0,05$ , testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

**Figura 23.** Avaliação do número de cruzamentos de camundongos isquemiados tratados com berberina no teste labirinto aquático.

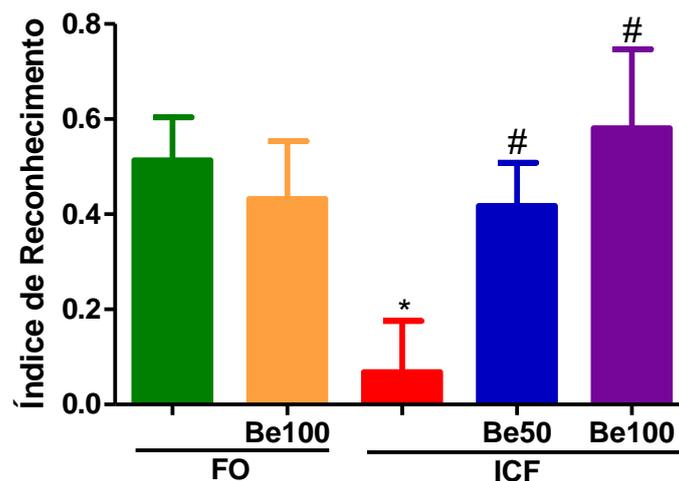


Os animais foram tratados 30min antes e 2h após a cirurgia e diariamente por 5 d. Os valores representam a média  $\pm$  EPM. \* vs FO, # vs ISQ,  $p < 0,05$ , testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

#### 4.7 Efeito da berberina (50 e 100mg/kg) sobre a memória episódica avaliada através do teste de reconhecimento de objetos em camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oclusão da artéria cerebral média.

Os animais submetidos à oclusão da artéria cerebral média apresentaram déficit na habilidade de reconhecer um novo objeto em relação aos animais falso-operados (FO:  $0,51 \pm 0,09$ ; ISQ:  $0,06 \pm 0,12$ ), apresentando menor índice de reconhecimento. O tratamento com a berberina nas doses de 50 e 100mg/kg/dia diminuiu significativamente este déficit (BE50  $0,42 \pm 0,09$ ; BE100:  $0,58 \pm 0,16$ ). (Figura 24).

**Figura 24.** Avaliação do índice de reconhecimento de objetos em camundongos isquemiados tratados com berberina.

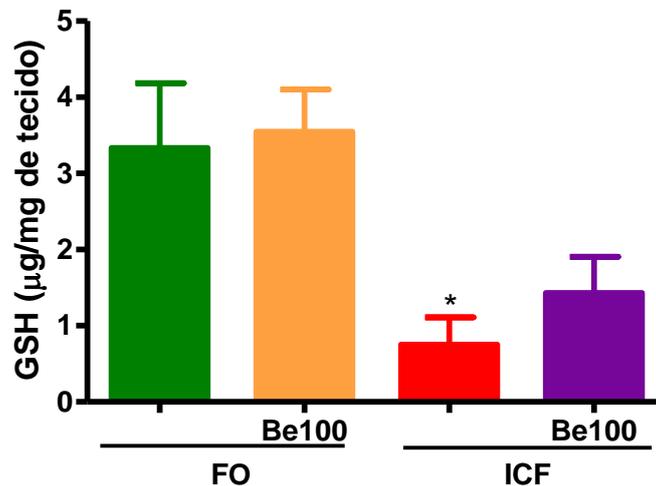


Os animais foram tratados 30min antes e 2h após a cirurgia e diariamente por 4d. Os valores representam a média  $\pm$  EPM. \* vs FO, # vs ISQ,  $p < 0,05$ , testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

#### 4.8 Efeito da berberina (100mg/kg) sobre a concentração de glutathiona reduzida (GSH) no córtex temporal de camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oclusão da artéria cerebral média.

A figura 25 mostra a concentração de GSH do córtex temporal 24 horas após a indução da isquemia. Podemos observar que a isquemia promoveu a depleção dos níveis deste peptídeo VS grupo FO. O tratamento com a berberina não preveniu essa alteração (FO:  $3,34 \pm 0,85$ ; FO Be100:  $3,55 \pm 0,55$ ; ICF:  $0,75 \pm 0,36$ ; ICF Be100:  $1,43 \pm 0,48$ ).

**Figura 25.** Avaliação dos níveis de GSH no córtex de camundongos isquemiados tratados com berberina.

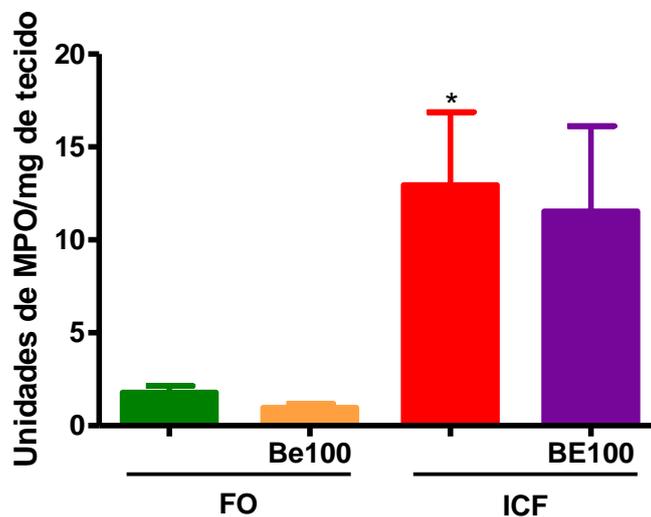


Os animais foram tratados 30min antes e 2h após a cirurgia. Os valores representam a média  $\pm$  EPM. \*vs FO,  $p < 0,05$ , ANOVA e teste de Tukey.

#### 4.9 Efeito da berberina (100mg/kg) sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) no córtex temporal, corpo estriado e hipocampo de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente por oclusão da artéria cerebral média.

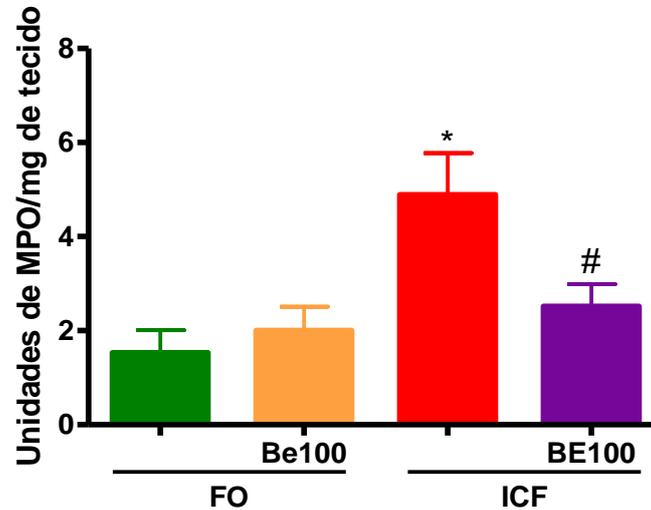
Na avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase, 24h após a indução da isquemia por oclusão da artéria cerebral média, os animais isquemiados apresentaram aumento significativo da MPO no córtex (FO:  $1,78 \pm 0,36$  u/mg de tecido; FO Be100:  $0,97 \pm 0,20$  u/mg de tecido; ICF:  $12,96 \pm 3,92$  u/mg de tecido) e no corpo estriado (FO:  $1,53 \pm 0,48$  u/mg de tecido; FO Be100:  $2,0 \pm 0,50$  u/mg de tecido; ICF:  $4,89 \pm 0,89$  u/mg de tecido), porém no hipocampo não ocorreram alterações significativas entre os grupos (FO:  $1,80 \pm 0,34$  u/mg de tecido; FO Be100:  $1,66 \pm 0,39$  u/mg de tecido; ICF:  $1,75 \pm 0,18$  u/mg de tecido; ICF Be100:  $1,53 \pm 0,43$  u/mg de tecido). O tratamento com a berberina foi capaz prevenir esse aumento no estriado (ISQ Be100:  $2,52 \pm 0,47$  u/mg de tecido), mas não no córtex (ICF Be100:  $11,55 \pm 4,59$  u/mg de tecido) (Figuras 26, 27 e 28).

**Figura 26.** Avaliação dos níveis de MPO no córtex de camundongos isquemiados tratados com berberina.



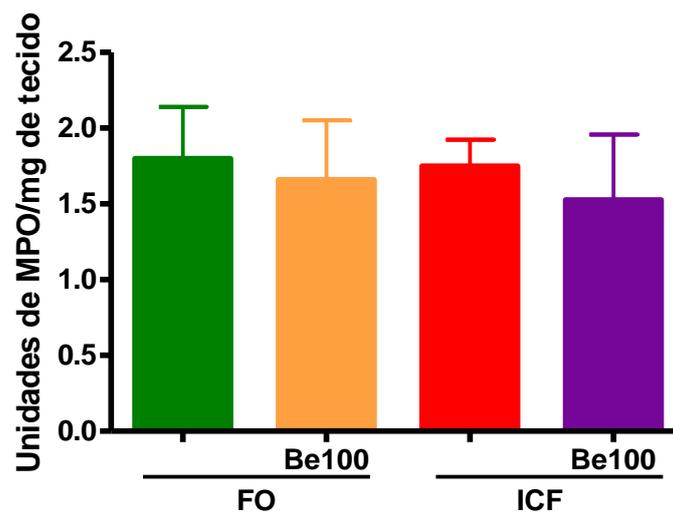
Os animais foram tratados 30min antes e 2h após a cirurgia. Os valores representam a média  $\pm$  EPM. \*vs FO,  $p < 0,05$ . ANOVA e teste de Tukey.

**Figura 27.** Avaliação dos níveis de MPO no estriado de camundongos isquemiados tratados com berberina.



Os animais foram tratados 30min antes e 2h após a cirurgia. Os valores representam a média  $\pm$  EPM. \*vs FO, #vs ISQ,  $p < 0,05$ . ANOVA e teste de Tukey.

**Figura 28.** Avaliação dos níveis de MPO no hipocampo de camundongos isquemiados tratados com berberina.

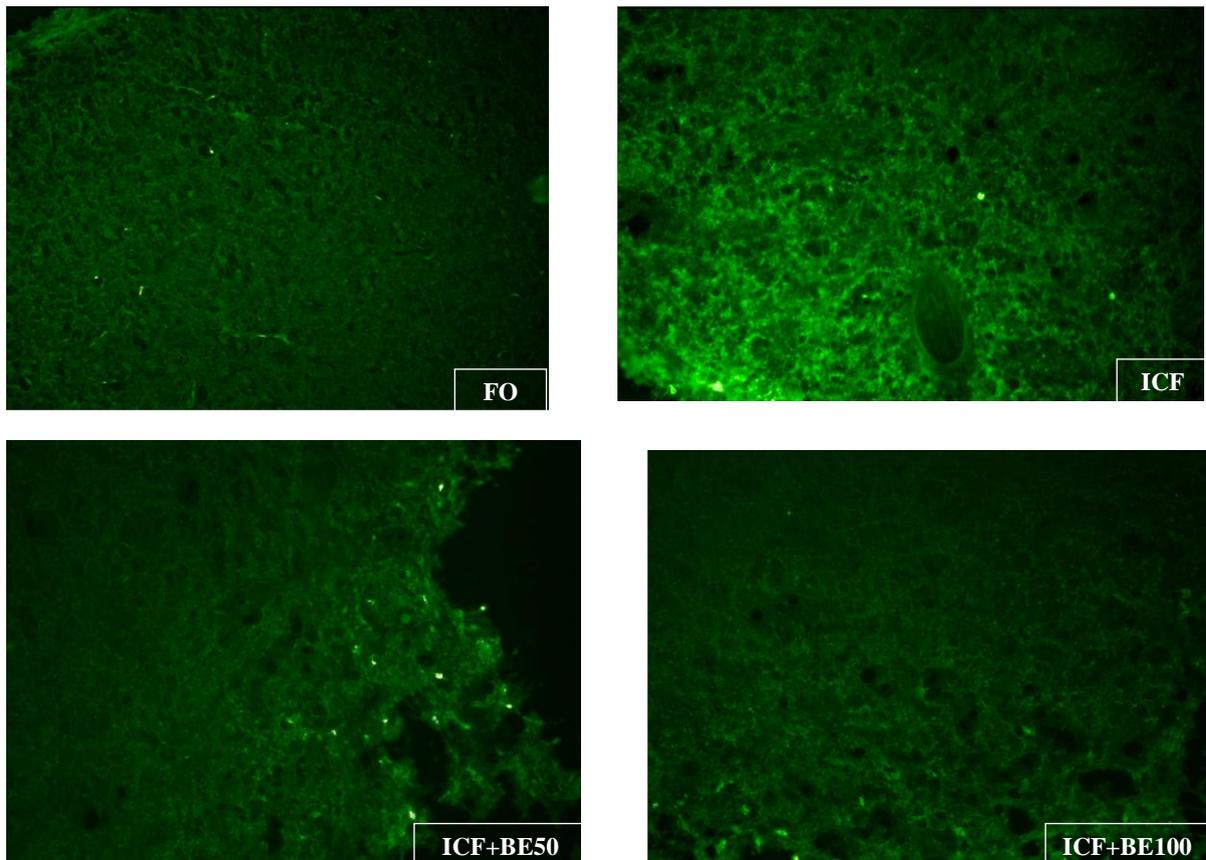


Os animais foram tratados 30min antes e 2h após a cirurgia. Os valores representam a média  $\pm$  EPM. ANOVA e teste de Tukey.

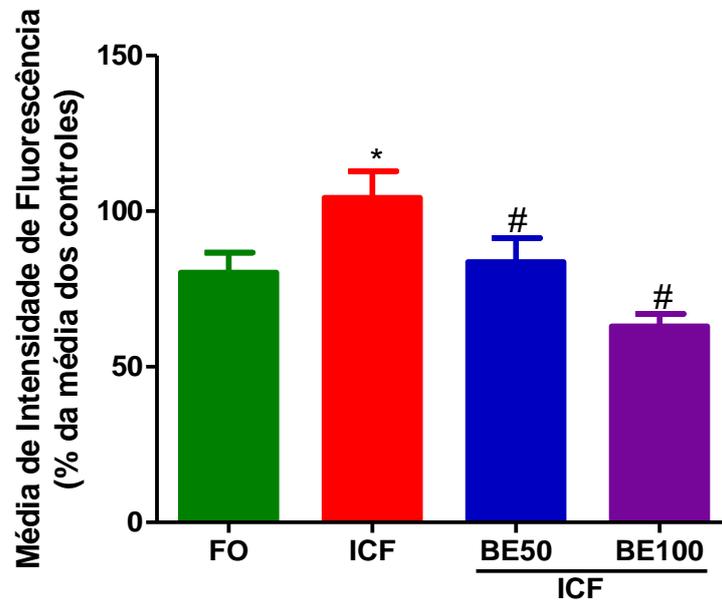
#### 4.10 Efeito da berberina (50 e 100mg/kg/dia) sobre a morte neuronal evidenciada através da coloração com Fluoro Jade no córtex temporal de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente por oclusão da artéria cerebral média.

Na figura 29 observamos uma maior morte neuronal observada pelo aumento da intensidade de fluorescência no córtex de camundongos 5 dias após a indução da isquemia. Os animais isquemiados apresentaram aumento na média de intensidade de fluorescência (FO:  $80,33 \pm 6,4$ ; ICF:  $104,3 \pm 8,45$ ), apresentando maior degeneração neuronal. O tratamento com a berberina reverte esse efeito (ISQ Be50:  $83,67 \pm 7,69$ ; ISQ Be100:  $63,0 \pm 4,0$ ) (Figura 30).

**Figura 29.** Imagens representativas do efeito da berberina (50 e 100mg/kg/dia) sobre a degeneração neuronal (coloração por Fluoro Jade C) em camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente.



**Figura 30.** Avaliação da média da intensidade de fluorescência através da coloração com Fluoro Jade em camundongos 5d após a ICF de camundongos isquemiados tratados com berberina.



Os animais foram tratados 30min antes e 2h após a cirurgia. Os valores representam a média  $\pm$  EPM. \*vs FO, #vs ICF,  $p < 0,05$ . ANOVA de medidas repetidas e teste de Bonferroni.

## 5 DISCUSSÃO

O AVC é a segunda causa de morte em países industrializados e uma importante causa de incapacidade em adultos (LEES *et al.*, 2006). O único tratamento efetivo para o AVC com aprovação da FDA (Administração de Medicamentos e Alimentos do Governo Americano) é a injeção intravenosa de tPA que deve ser aplicada até 3 horas após o evento isquêmico (LEE *et al.*, 2012). Esse tratamento ainda tem uso restrito em casos isquêmicos.

Devemos considerar além das taxas de mortalidade as sérias conseqüências médicas e sociais que podem resultar de um AVC, como: as seqüelas de ordem física, de comunicação, funcionais, emocionais, entre outras (FALCÃO *et al.*, 2004). Estudos relatam serem comuns, em casos de AVC, a ansiedade, a depressão, os distúrbios do sono e da função sexual podendo citar também, distúrbios motores, sensoriais, cognitivos e de comunicação, e alterações fisiológicas durante atividades físicas (dispnéia, angina, hipertensão), que causam limitações para o retorno ao trabalho produtivo (ROCHA *et al.*, 1993; Medina *et al.*, 1998). Por esses fatores, que causam impacto sócio-econômico e tornam o AVC um problema de saúde pública, vivemos uma procura continua por drogas que protejam os neurônios da isquemia e evitem o progresso da cascata bioquímica que leva a morte celular (ZHOU *et al.*, 2008).

O estresse oxidativo é um fator primário na lesão isquêmica cerebral e espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio podem levar à peroxidação lipídica e oxidação de proteínas, assim como causar dano ao DNA (WARNER *et al.*, 2004). A isquemia cerebral também leva à perda neuronal severa devido a reações inflamatórias secundárias que estão associadas com a invasão de leucócitos e a ações da microglia e macrófagos residentes. Pacientes com doença cerebrovascular ocasionalmente exibem distúrbios cognitivos, como amnésia e desorientação topográfica (CAPLAN *et al.*, 1985; CAPLAN *et al.*, 1990).

Diversos alcalóides apresentam ação neuroprotetora como às metilxantinas, um exemplo é a cafeína que possui efeitos no aprendizado e memória. A aminofilina outro alcalóide da classe das metilxantinas também demonstrou ser capaz de proteger o cérebro do efeito deletério da hipóxia/isquemia em ratos recém-nascidos (KUMRAL *et al.*, 2011).

A berberina apresenta inúmeras atividades farmacológicas, em particular ação antiinflamatória (YOO *et al.*, 2008) assim como em recentes estudos foi apontada como antioxidante (ZHANG, 2009).

Dentre os diversos modelos de experimentais de isquemia cerebral podemos citar o modelo de oclusão da artéria cerebral média, seja ele permanente ou transitório. O modelo de isquemia cerebral focal por oclusão da artéria cerebral média (oACM) está padronizado e resultados como as alterações histológicas, neuroquímicas, comportamentais e a geração de radicais livres no cérebro do rato já estão comprovados (ASSHAFAQ *et al.*, 2011) o que faz com que seja bastante utilizado para reproduzir eventos que ocorrem no AVC em humanos.

No presente trabalho avaliamos as alterações referentes ao comportamento neurológico e variação da área do infarto isquêmico produzidas pela isquemia, avaliamos também a ação da berberina nesses parâmetros. Essa avaliação tem o intuito de mensurar o dano neuronal 24 horas após oACM pela escala neurológica descrita por Garcia *et al.*, (1995) e o método de coloração TTC.

O Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol (TTC) normalmente é reduzido por enzimas mitocondriais ativas a um corante, formazam, esse evento não ocorre em áreas infartadas permanecendo pálida (GOLDLUST *et al.*, 1996). Durante a isquemia a hipóxia acarreta às células a inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial, causando dano mitocondrial que pode ser ou não reversível.

No presente trabalho foi observado um aumento na percentagem da área do infarto nos animais submetidos à oACM. O volume do infarto é importante na determinação da extensão da lesão pós isquêmica, das áreas afetadas e das características morfológicas do tecido do infarto (ASSHAFAQ *et al.*, 2011). Foi relatado que a oclusão da artéria cerebral média resulta em redução do fluxo sanguíneo cerebral principalmente em regiões do córtex e estriado representando as áreas com maior volume de infarto (HATTORI *et al.*, 2000; TRAYSTMAN, 2003; MELANI *et al.*, 2006) e estes estudos corroboram com nossos achados.

Na área de penumbra da isquemia, a morte é fundamentalmente apoptótica (GREEN; REED; 1998) e pode ser desencadeada por diversos estímulos como ativação de receptor de TNF, produção exacerbada de EROS, indução de p53 entre outros eventos que

podem produzir lesão mitocôndrial de modo a danificá-la. A mitocôndria tem papel fundamental na regulação da apoptose (MACMANUS; LINNIK; 1997).

A administração de berberina nas doses de 50 e 100mg/kg ao dia, com intervalos de pelo menos 6 horas entre as doses, preveniram o aumento do volume do infarto causado por oACM, mas a mesma dose de 50mg/kg administrada em uma única tomada no dia não foi capaz de prevenir esse aumento. Wang e colaboradores (2005a) demonstraram que a administração intravenosa do extrato de *Coptidis rizoma* equivalente a uma dose de 3mg/kg de berberina apresentou meia vida de 1 hora e 13 minutos no plasma de rato. Esse estudo confirma a meia vida curta da berberina o que pode explicar o melhor resultado obtido quando a administração foi feita duas vezes ao dia.

No estudo apresentado por Zhou e colaboradores (2008) a berberina protegeu células PC12, submetidas à modelo de privação de oxigênio e glicose, ao inibir a apoptose tanto pela via dependente de caspase como pela via independente de caspase. Foi demonstrado que a berberina é capaz de proteger células tronco de medula óssea (MSCs) contra a apoptose induzida por hipóxia (ZHANG *et al.*, 2009). Também foi demonstrado que a berberina reduziu o volume do infarto isquêmico após 24 horas de oACM permanente, neste estudo a berberina nas doses de 10 e 40 mg/kg aumentaram a expressão da Akt, importante proteína para a via de sobrevivência da célula, a Akt fosforilada é neuroprotetora contra o insulto isquêmico (ZHANG *et al.*, 2012).

Tem sido identificada disfunção no comportamento e neurológica após a oACM em camundongos (HATORI, 2000). No presente estudo após 24hr de oACM verificamos uma diminuição no desempenho motor e sensorial dos animais. A avaliação neurológica ocorreu no 1º dia após a isquemia, pois já foi relatado que no 1º dia o déficit neurológico é máximo (WAHL *et al.*, 1992). O trabalho de ASSAFAQ *et al.*, (2011) que utilizou a escala de Masuo (1997) também comprovou o déficit motor de animais isquemiados quando avaliados 24 hrs após a isquemia/reperfusão. Melani e colaboradores (2006) observaram, também utilizando a escala neurológica de Garcia, uma diminuição no número de escores após 24 hr de oACM. A escala de Garcia e colaboradores (1995) analisa o déficit motor que envolve núcleos da base. Lesões envolvendo estriado e regiões adjacentes tem efeito sobre o comportamento motor fino (habilidoso) e sensorio, principalmente o estriado ventro-lateral região a qual recebe inervações dopaminérgicas do neocórtex (KIRIK *et al.*, 1998).

Lang e colaboradores (2011) observaram que após 24 horas de OACM existia um déficit sensorio motor, avaliado pelo teste “corner e chimney”, sendo que esse déficit foi observado concomitantemente com a lesão estriatal identificada pela coloração TTC. No presente trabalho o tratamento com a berberina 50 e 100mg/kg e diminuiu o déficit sensorio motor ocasionado pela lesão isquêmica.

Animais submetidos à oACM apresentam dano no córtex frontal, esta área tem função motora, sendo responsável pela simetria e estabilidade, que envolve às patas dianteiras e traseiras que quase sempre está danificadas pela isquemia (WAHL *et al.*, 1992). A disfunção dopaminérgica no córtex frontal e estriado resulta em alterações cognitivas e motoras (PANDOLFO *et al.*, 2012). Foi aceito que a isquemia cerebral causa danos na área estriatal com subsequente deterioração da função sensorio-motora e funções cognitivas que podem ser mediadas pelo sistema dopaminérgico (BORLONGAN *et al.*, 1995).

A atividade do animal no teste do campo aberto também é reflexo de sua motivação e estado emocional. O número de cruzamentos “crossing” e o número de elevações verticais “rearings” avaliam a capacidade exploratória do animal (KATZ *et al.*, 1981). No presente trabalho a isquemia não promoveu alteração no número de “crossing” na avaliação feita 72 hs após oACM, estando de acordo com a literatura (LE PEILLET *et al.*, 1988). Na avaliação da atividade locomotora não foi identificado diferença entre os grupos quando analisado no dia 1, 5 e 7 após o ACM (YONEMORI *et al.*, 1996). Peng e colaboradores (1997) não observaram alteração no comportamento motor, hiperlocomoção, dos animais sob administração crônica, 14 dias, de berberina por via oral corroborando com nossos dados.

O trabalho de Peng e colaboradores (2007) foi avaliada a ação antidepressiva da berberina na dose de 20mg/kg administrada v.o, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado e da suspensão da cauda sendo a berberina capaz de reduzir o tempo de imobilização nos dois testes. Quando observados os níveis de dopamina no estriado do animal tratado verificou não haver alteração para o animal controle, concluindo que berberina não aumenta os níveis de dopamina no estriado. A berberina reduz a concentração de dopamina em células PC12 (SHIN *et al.*, 2002). Estudos prévios demonstram que a berberina inibe a síntese de dopamina no cérebro (TANG; EISENBRAND, 1992).

O aumento ou diminuição da atividade locomotora depende do modelo a ser utilizado, após 48 hr de oACM foi observada relação existente entre o aumento da área de

infarto isquêmico e a alteração na atividade locomotora vertical e horizontal (SHEN; WANG, 2009). A isquemia promove diminuição no número de “rearings” que pode ocasionar de uma menor estabilidade postural. Segundo Wahl e colaboradores (1992) o dano cortical induzido pela isquemia é responsável pela hemiparesia. A diminuição no número de rearings não parece estar relacionada com aumento de ansiedade, pois animais isquemiados submetidos ao teste do “plus maze” não apresentaram diferença em relação aos falso-operados (dados não mostrados). O trabalho de SHEN & WANG (2009) define o movimento vertical como mais sensível à lesão cortical promovida pela oACM do que o movimento horizontal.

A berberina na dose de 100 mg/kg preveniu a diminuição do número de “rearings”. A ação anti apoptótica da berberina com conseqüente redução do volume do infarto (ZHOU *et al.*, 2008) pode indicar o mecanismo da prevenção na diminuição da atividade exploratória vertical. Foi observado que o pós tratamento com inibidores de p53 foi capaz de aumentar a atividade locomotora até 3 semanas após a oACM (SHEN; WANG 2009). O mecanismo de neuroproteção da berberina provavelmente estaria relacionado com suas funções anti apoptóticas (CUI *et al.*, 2009) e conseqüente redução do infarto isquêmico, assim como modulação direta no sistema dopaminérgico (PENG *et al.*, 2007).

Para avaliar a ação da berberina sobre os déficits cognitivos causados pela oACM submetemos os animais a uma seqüência de testes de memória (memória aversiva, espacial e operacional). O presente estudo não obteve na avaliação neurológica escores menores que 14 sendo constatado a não ocorrência de déficit motor grave ou comprometimento da resposta a estímulos que pudesse comprometer o desempenho dos animais nas tarefas de memória. As alterações na função sensório-motora, particularmente atividade locomotora, são fatores que podem confundir nos testes cognitivos (HATTORI *et al.*, 2000). Avaliação da atividade locomotora ocorreu após 72 horas de oACM.

Para a formação da memória devemos experimentar um evento, alguns aspectos deste evento são codificados, esta codificação inicia uma série de processos, tipicamente rotulado de “consolidação”, que tomam tempo, levando a um traço permanente de memória. A consolidação estudada após um treino de esquiva passiva envolve indução de LTP, ativação de AMPA e NMDA, ativação da cálcio-calmodulina quinase II (CMKII) e aumento da atividade de fosfoquinase C (PKC), além deste evento será necessário também como evento molecular para indução de LTP a ativação da fosfoquinase A (PKA) dependente de

cAMPcíclico, esta é necessária no hipocampo para diversas formas de aprendizado e memória, e ERK. Regiões como córtex entorrinal e amígdala podem estar envolvidas, principalmente em resposta relacionadas ao medo (IZQUIERDO; MEDINA, 1997).

A esQUIVA passiva é um dos modelos mais utilizados para o estudo bioquímico e farmacológico da memória. Um modelo robusto que apenas em um treino pode gerar memórias de longa duração para esta tarefa (IZQUIERDO *et al.*, 2006). No presente estudo verificamos que os animais submetidos à oACM apresentavam déficit tanto na aquisição quanto na retenção da memória. Seren e colaboradores (1994) demonstraram a ocorrência de déficits cognitivos em modelos experimentais de isquemia global e focal. Ratos avaliados na tarefa da “esQUIVA passiva” nos dias 10, 17 e 24 após oACM apresentam déficits tanto na aquisição quanto na retenção da memória atribuindo a um efeito crônico da isquemia focal (YONEMORI *et al.*, 1996).

O hipocampo é considerado o centro do processo de memória (WAHL *et al.*, 1992). Os neurônios colinérgicos que inervam o córtex cerebral, amígdala, hipocampo são essenciais para aprendizagem e formação da memória. Foi descrito o aumento da atividade da acetilcolinesterase (AChE) em ratos diabéticos ocasionava falha cognitiva que era revertida pela berberina, atribuindo a ela a atividade de inibição da AChE (BHUTADA *et al.*, 2011). Verificamos no nosso estudo que a berberina preveniu o déficit na retenção da memória, 96h após oACM, na tarefa da esQUIVA passiva. A berberina apresenta efeito sobre a memória, sendo atribuído a sua ação de estimulação no sistema colinérgico central e periférico (PENG *et al.*, 1997).

O déficit na aquisição e retenção da memória gerado pela administração de escopolamina foi prevenido pela administração crônica de berberina (PENG *et al.*, 1997).

Uma vez que oACM conduz à lesão em regiões límbicas do córtex frontal e córtex temporal, muitos pesquisadores têm incluído um ou mais tarefas cognitivas como parte de sua avaliação comportamental (CORBETT; NURSE, 1997). Algumas tarefas (Y-maze e reconhecimento de objetos) serão foco do nosso estudo para avaliarmos o comprometimento de memória operacional no animal submetido à oACM.

A memória de trabalho não está localizada em uma única região cerebral. Ela envolve interações funcionais entre o córtex pré-frontal (CPF) e diversas regiões cerebrais

(BADDELEY, 1986; DESPOSITO, 2007). O hipocampo e o córtex pré frontal estão envolvidos na memória de trabalho ou memória operacional. O córtex pré frontal anatomicamente está conectado ao hipocampo ventral e indiretamente ao hipocampo dorsal através do tálamo (YOON *et al.*, 2008).

O labirinto em Y é baseado na tendência dos animais de explorar o novo e nesse teste influências como componente emocional ou motivação são minimizadas. Neste teste ocorre uma dissociação entre aprendizagem e memória visto que não é necessário aprender nenhuma regra (DELLU *et al.*, 1992; 1994). As alterações espontâneas no Labirinto em Y são consideradas ainda a reflexão de uma forma primitiva de memória de trabalho espacial (MALM *et al.*, 2006). No presente trabalho verificamos que após 72 horas de oACM os animais apresentam diminuição do desempenho no “Y-maze”. No trabalho de CORBETT & NURSE, (1997) em animais isquemiados foi comprovado déficit na memória de trabalho (CORBETT; NURSE, 1997). Outros trabalhos como a avaliação da suplementação do ácido fólico em animais submetidos à oACM comprova diminuição no desempenho no “Y-maze” quando avaliado 7 dias após oACM (ZHANG *et al.*, 2012).

Déficits na transmissão colinérgica no CPF provocam déficits cognitivos que são consistentes com um papel específico da acetilcolina no CPF interferindo na memória de trabalho. Em um estudo utilizando macacos *Resus* com depleção colinérgica induzida por uma toxina, tanto no CPF temporal quanto no CPF orbital, foi observado um atraso na resposta relacionada à memória de trabalho espacial. O estudo concluiu que a acetilcolina é essencial para memória de trabalho (CROXSON; KYRIAZIS; BAXTER, 2011).

No presente estudo verificamos que o tratamento com berberina preveniu a diminuição do desempenho provocada por oACM. Diversos alcalóides já isolados apresentam atividade comprovada de inibição de AChE como pseudoberberina, epiberberina e berberina (HUNG *et al.*, 2008). Inibidores da AChE produzem melhora cognitiva (CROXSON; KYRIAZIS; BAXTER, 2011). O trabalho de LEE e colaboradores, (2012) sugere que a berberina pode ser útil como agente terapêutico por melhorar o funcionamento cognitivo através da estimulação da atividade da colina acetil transferase (ChAT) e da AChE.

Múltiplos estudos sugerem o importante papel da formação hipocampo para a memória episódica em animais e humanos (NEVES; COOKE; BLISS, 2008). O teste de reconhecimento de objetos é baseado na tendência natural dos animais buscarem o novo, não

havendo necessidade de estímulo aversivo ou privação de comida e água. A tarefa é útil para avaliar em regiões específicas do cérebro as alterações neuroquímicas produzidas após lesões (BEVINS; BESHEER, 2006). A formação hipocampal é a principal região envolvida na memória de reconhecimento de objetos, particularmente o córtex perirrinal (Win - SHWE; FUJIMAKI; 2011). A integridade do hipocampo é essencial para o reconhecimento de objetos. Assim como a ação do córtex perirrinal especificamente contribui na codificação, consolidação e recuperação da memória relacionada a objetos (WINTERS *et al.*, 2008).

Durante a isquemia cerebral ocorre uma super estimulação de receptores NMDA, os neurônios piramidais da camada CA1 hipocampal são particularmente sensíveis a eventos isquêmicos devido à alta densidade de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e AMPA o que deixa a região mais exposta a excitotoxicidade (LIPTON, 1999). Além disso, a região CA1 do hipocampo está correlacionada também à uma memória não espacial.

No presente estudo verificamos que após 96 h de oACM os animais avaliados pelo teste de reconhecimento de objetos têm afetada a sua capacidade de reconhecer o objeto novo. Os estudos demonstram que o dano extra ou intra hipocampal contribuem para os déficits cognitivos causados pela isquemia cerebral (BACHEVALIER; MEUNIER, 1996). Camudongos submetidos à hipóxia/isquemia apresentam baixo desempenho no reconhecimento do objeto novo (MCAULIFFE *et al.*, 2009). Foi observado que os animais não apresentam a memória de reconhecimento de objetos preservada, após 10 dias de oACM e reperfusão em ratos (ESNEAULT *et al.*, 2008).

No presente trabalho os animais isquemiados que foram tratados com berberina apresentaram a capacidade de reconhecimento do objeto novo preservada. A berberina tem um potente efeito inibitório contra o influxo de cálcio durante a isquemia via receptor de NMDA tipo NR1, principalmente na região CA1 do hipocampo, sendo uma ação que reforça seu papel neuroprotetor (YOO *et al.*, 2006). Especulamos que a berberina preserve a formação hipocampal após dano isquêmico. Outro trabalho também demonstrou efeito neuroprotetor de alcalóides como a vinpocetina um derivado sintético do alcalóide vincamina ela foi utilizada para tratar animais submetidos a um modelo demência de induzido por glutamato, esses animais apresentaram lesão no córtex entorrinal que provocou déficit de atenção e prejuízo na memória episódica quando avaliados através do teste de reconhecimento de objetos, a vinpocetina melhorou o desempenho do animal lesionado (NYAKAS *et al.*, 2009). Abreu e

colaboradores (2011) verificaram que o consumo crônico de cafeína, um alcalóide da classe metilxantina, por ratos jovens melhorou o desempenho no reconhecimento do objeto novo, além disso preveniu o déficit de memória relacionado a idade quando avaliados na idade adulta.

O teste do labirinto aquático (water-maze) foi descrito por Morris em 1984 com o objetivo de avaliar a memória espacial. No citado trabalho o autor comprova a necessidade de uma percepção global da localização espacial com referências externas a piscina (MORRIS, 1984). Essa percepção global, o chamado "mapa cognitivo" proposto por O'Keff e Nadel (1978), que refere-se a células hipocampais, "place cells", que disparam para reconhecer a localização espacial de acordo com movimento do animal. A integridade do hipocampo é essencial para a formação do aprendizado espacial, mas o papel do hipocampo nesse aprendizado ainda não está completamente elucidado (D'HOOGE; DE DEYN, 2001).

Os resultados dos experimentos do "water-maze" demonstraram déficit na memória espacial nos animais submetidos à oACM quando avaliamos o tempo de latência e o tempo no quadrante 5 dias após oACM. Esses resultados corroboram com os achados de (GIBSON; MURPHY, 2004). Em 2005 estes mesmos autores encontraram déficit na memória espacial entre 14 e 20 dias após oACM (GIBSON; MURPHY, 2005).

A isquemia cerebral provoca a super estimulação de receptores NMDA e conseqüente liberação de glutamato, o aumento do  $Ca^{2+}$  e as despolarizações na área do perinfarto são considerados em modelos animais a causa secundária para a expansão da área de infarto e conseqüente dano neuronal (TAKANO *et al.*, 1996). Foi demonstrado que pacientes com oclusão de ACM apresentava falhas cognitivas envolvendo o sistema límbico e o córtex frontal e dano hipocampal ipsilateral. O bloqueio da expansão da área do perinfarto reduz a lesão hipocampal com conseqüente melhora cognitiva (XIE *et al.*, 2011). O insulto isquêmico pode ocasionar lesão hipocampal em dois âmbitos tanto funcional quanto estrutural (NIKONENKO *et al.*, 2009).

No presente trabalho após 5 dias de oACM os animais tratados com berberina tiveram uma diminuição no tempo de latência e um aumento no tempo do quadrante na avaliação da memória espacial significando melhora cognitiva. Trabalhos mostram que a administração de crônica de berberina, por 4 meses, melhorou os déficits cognitivos característicos da doença de Alzheimer, como o déficit na retenção da memória espacial

quando avaliado a latência para encontrar a plataforma e o tempo no quadrante, sendo esse resultado atribuído a uma melhora na função hipocampal (DURAIRAJAN *et al.*, 2012). No trabalho de Zhu e Qian (2006) a administração de berberina por v.o foi capaz de diminuir o tempo de latência para encontrar a plataforma de ratos submetidos ao modelo de doença de Alzheimer.

A elevação na concentração de potássio tem sido observada em situações isquêmicas, esse aumento na região CA1 dos neurônios hipocampais não somente contribui para a excitabilidade como também para morte celular. O estudo de Wang e colaboradores (2003) caracterizaram o efeito de berberina em canais de K<sup>+</sup> isolados do hipocampo de ratos, na região CA1, evidenciando que a berberina bloqueia esses canais beneficiando o balanço desse cátion em neurônios que sofreram isquemia, sendo, portanto um mecanismo de neuroproteção da berberina em situação de dano isquêmico neuronal. A administração de berberina aumenta a sobrevivência de neurônios no hipocampo de forma dose- dependente (HAN *et al.*, 2012).

Existem fortes evidências que a inflamação e a apoptose são características do modelo de OACM permanente (LIU *et al.*, 2009). Os neutrófilos se acumulam no cérebro cerca de 30 minutos após a oclusão da artéria cerebral média, esse fator pode ocorrer independentemente da presença de neurônios necróticos, apesar disso, o papel do leucócito na isquemia com ou sem reperusão ainda não está completamente desvendado (GARCIA *et al.*, 2004).

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente nos grânulos de neutrófilos que é utilizada como marcador para o conteúdo dessas células nos tecidos. Essa enzima está expressa também na linhagem mielóide, especialmente nos monócitos e macrófagos/micróglia (BRECKWOLDT *et al.*, 2008). Foi demonstrado que a atividade da mieloperoxidase após 2 e 4 h não apresentava diferença entre os animais controles e isquemiados, no entanto o mesmo estudo demonstrou que o pico da atividade da MPO é 24 h após oACM nos gânglios da base e córtex (WANG *et al.*, 2004). No presente trabalho avaliamos a atividade da MPO após 24 h de oACM e verificamos que os animais submetidos à oACM apresentavam um aumento na atividade de MPO no córtex temporal e estriado. Kawai e colaboradores (2000) correlacionaram o pico de infiltração de neutrófilos com o máximo infarto isquêmico. Diversos estudos demonstram que a infiltração de neutrófilos após a isquemia cerebral leva a

uma expansão da área de infarto verificou-se também que após 24 h de oACM permanente ocorre um aumento da atividade da MPO no cérebro com concomitante aumento na área do infarto (TU *et al.*, 2010), o que está de acordo com nossos achados.

Neste trabalho encontramos no córtex uma concentração de MPO 4 vezes maior que no estriado. O aumento na concentração de MPO perdura até 120 h após oACM córtex, enquanto no estriado a MPO diminuiu com 72 h após oACM (WANG *et al.*, 2004). A administração de berberina preveniu o aumento da atividade da MPO no estriado, mas não no córtex. O que sugere que a concentração de berberina não foi suficiente para a reduzir o grande aumento de MPO.

Sob condições isquêmicas as plaquetas encontram-se ativadas e podem acumular-se nos vasos após 2 h de oclusão. A liberação de mediadores bioquímicos e a interação entre fatores de coagulação contribuem para adesão de leucócitos ao endotélio e a liberação de tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) que pode exacerbar a cascata inflamatória, pois libera quimiotáticos que estimularão a migração de leucócito (BROUNS; DE DEYN, 2009). Tem sido demonstrado também que a berberina, na dose de 20 mg/kg/dia, tanto em 1, 3 ou 5 dias de tratamento, reduz a agregação plaquetária e os níveis de tromboxano em ratos após isquemia, o que, em parte, pode ser responsável pela ação neuroprotetora em modelos de isquemia (WU, LIU, 1995). Koumura e colaboradores (2011) demonstram que a utilização de uma droga inibidora da síntese TXA<sub>2</sub> (Ozagrel) reduz o volume do infarto 24 horas após OACM.

A isquemia resulta em liberação exacerbada de glutamato, aumento da concentração de Ca<sup>2+</sup>, formação de EROS. A liberação exacerbada de glutamato é capaz de induzir a COX-2 (YOO *et al.*, 2008). YOO e colaboradores (2008) demonstraram que a berberina possui ação antiinflamatória após isquemia transitória em gerbil através da redução da expressão de COX-2 e PGE<sub>2</sub> na região CA1 do hipocampo. O estudo comprova que a berberina é um potente inibidor da inflamação após evento isquêmico.

Durante a isquemia a morte celular no *core* da lesão aparece em poucos minutos o que resulta em depleção de energia, levando a um desequilíbrio iônico e uma falha metabólica grave (DURUKAN; TATLISUMAK, 2007). A região da penumbra tem redução no fluxo sanguíneo e a progressão da lesão tecidual leva a déficits cognitivos e morte neuronal. Por isso, é importante conhecer as cascatas bioquímicas que levam a morte celular na zona da

penumbra para que novas drogas sejam utilizadas para evitar o progresso da lesão e a morte celular (YANG *et al.*, 2011).

A técnica de marcação fluorescente pelo fluoro jade é muito utilizada, pois identifica neurônios em degeneração após lesão isquêmica. Evidencia os padrões de degeneração após oACM (DUCKWORTH *et al.*, 2005) essa marcação foi originalmente desenvolvida pela Schmued e mostrou ter uma sensibilidade semelhante com técnicas de coloração a base de prata (SCHMUED *et al.*, 1997). Não existe evidência de que a coloração de fluoro jade possa diferenciar a morte celular por necrose ou apoptose (KUNDROTIENE *et al.*, 2004).

No presente estudo verificamos que a lesão isquêmica aumenta a marcação de pelo fluoro jade quando avaliamos 5 dias após isquemia. Podemos observar que a degeneração ocorreu concomitantemente ao déficit de memória. Hao e colaboradores (2008) identificaram aumento na degeneração celular quando avaliado 3 dias após oACM. O maior número de células fluoro jade positivas foi identificado 24 h após oACM (LIU *et al.*, 2009). A administração de berberina preveniu a degeneração neuronal observada em animais submetidos à oACM. O que pode ser . O efeito de prevenção do dano neuronal da berberina vista por nós pode ser atribuída a uma atividade antagonista de receptores NMDA particularmente nos NR1 demonstrado após uma isquemia transitória em gerbil (YOO *et al.*, 2006).

No estudo de Kundrotiene e colaboradores (2004) observaram nos dias 3 e 5 após oACM uma redução em torno dose 75% no número de células fluoro jade positivas quando administrado um antagonista de receptor AMPA. Com base nas observações de que altas concentrações de glutamato produzem neurotoxicidade e conseqüente dano neuronal, várias classes de antagonistas de receptores de glutamato podem atuar como neuroprotetores eficazes tanto *in vitro* quanto *in vivo* (DOBLE 1999, IKONOMIDOU E TURSKI 1996, SCATTON 1994). Em modelos de isquemia e excitotoxicidade, tem sido demonstrado que a combinação de drogas que bloqueiam os canais de cálcio tipo L com drogas antagonistas de receptor de NMDA resulta em um efeito sinérgico com aplicação terapêutica em casos de isquemia (ROD; AUER, 1992; STUIVER *et al.*, 1996;. UEMATSU *et al.*, 1991). A berberina pode bloquear os canais de  $Ca^{2+}$  tipo L em miócitos de cobaia, tendo um potente efeito inibitório contra o influxo de cálcio durante a isquemia (LAU *et al.*, 2001).

O estresse oxidativo está implicado no dano cerebral e doenças neurodegenerativas, incluindo a isquemia focal. O cérebro é bastante susceptível ao estresse oxidativo por apresentar alta quantidade de lipídios e relativa baixa capacidade antioxidante. O aumento das espécies reativas de oxigênio é uma importante causa de insulto no tecido cerebral após isquemia (NIIZUMA *et al.*, 2009). Nessas situações a inativação de enzimas antioxidantes e o consumo de antioxidantes endógenos é extremamente acentuada, fazendo com o que os mecanismos de defesa não consigam proteger o neurônio do dano oxidativo. A isquemia induz a um desequilíbrio entre as espécies pró-oxidantes e antioxidantes e uma super produção de radicais livres com ação tóxica (AHMAD *et al.*, 2011).

A GSH é um peptídeo antioxidante que é sintetizada no citoplasma e está presente em concentrações mais elevadas na matriz mitocondrial. Os baixos níveis de GSH podem estar diretamente relacionados com o aumento de ROS, peroxidação lipídica e presença de radicais hidroxila. A inibição de GSH durante a isquemia torna o tecido mais susceptível aos ataques do peroxinitrito (ASSHAFAQ *et al.*, 2011). No presente trabalho a oACM promoveu a depleção dos níveis de GSH no córtex temporal. Leonard e colaboradores (2011) evidenciaram a depleção dos níveis de GSH no cérebro dos animais após 24 h de oACM. Foi observado diminuição dos níveis de GSH no córtex frontal após 2 h de oACM e 22h de reperusão (ASSHAFAQ *et al.*, 2011).

Foi demonstrado que a berberina apresenta propriedades antioxidantes (BHUTADA *et al.*, 2011). No presente estudo não verificamos prevenção da redução dos níveis de GSH no córtex após oACM. Após evento isquêmico a formação de radicais livres e o excesso de EROS provocam a indução de apoptose via caspase dependente (HU *et al.*, 2012). A expressão de Bcl2 fosforilada está aumentada em situações de isquemia cerebral (CUI *et al.*, 2009). A berberina possui propriedades anti apoptóticas demonstradas *in vitro* e *in vivo* tanto na via caspase dependente quanto na independente (ZHOU *et al.*, 2008). A berberina demonstra características anti apoptóticas não somente pela inibição de fatores pró apoptóticos como citocromo c, AIF (fator indutor de apoptose) (ZHOU *et al.*, 2008), mas também pela supressão da fosforilação de Bcl2, proteína que protege a célula dos mecanismos apoptóticos, mas quando fosforilada fica inativa. Sugerindo que a o mecanismo de neuroproteção da berberina na isquemia não reflete ação direta sobre os níveis de GSH, mas sim reduzindo o dano apoptótico que ocorre subsequente ao estresse oxidativo ocasionado pela cascata isquêmica.

O presente estudo demonstrou que a berberina é eficaz na prevenção dos déficits neurológicos e de memórias aversiva, de trabalho e episódica, assim como no dano neuronal causados pela isquemia cerebral focal por oclusão permanente da artéria cerebral média, contudo será necessário um maior esclarecimento de seu mecanismo de ação. A berberina possui ação antiinflamatória, antiapoptótica e antioxidante previamente reconhecida, somando-se a essas ações está sua baixa toxicidade e o uso popular na medicina chinesa o que demonstra segurança para uso em humanos. Por todo o explanado a berberina possui um alto potencial terapêutico, sendo um forte candidato a uso em estudos clínicos direcionados ao tratamento do AVC isquêmico. Em estudos clínicos a berberina demonstrou ação regulatória sobre a dislipidemia considerada um dos fatores de risco para a ocorrência de AVC isquêmico. O tratamento profilático também é de grande valia para pacientes que sofreram Ataques Isquêmicos Transitório (AIT).

## 6 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou que a berberina preveniu o déficit de memória, sensório-motor e dano neuronal em camundongo no modelo de oclusão permanente da artéria cerebral média.

A administração de berberina reduziu a atividade da mieloperoxidase no córtex, não sendo capaz de prevenir a depleção dos níveis de glutathiona reduzida.

Os mecanismos de neuroproteção apontam parcialmente para sua atividade antiinflamatória, no entanto outras ações não podem ser descartadas.

O presente trabalho aponta a berberina como uma nova perspectiva de agente neuroprotetor.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, R. V. *et al.* Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and antioxidant system of rat brains. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 99, p. 659-664, 2011.
- ANIS, K.V.; RAJESHKUMAR, N.V.; KUTTAN, R. Inhibition of chemical carcinogenesis by berberine in rats and mice. **J Pharm Pharmacol**, v. 53, p. 768, 2001.
- ASAI, M.; IWATA, N.; YOSHIKAWA, A.; AIZAKI, Y.; ISHIURA, S.; SAIDO, T. C.; MARUYAMA, K. Berberine alters the processing of Alzheimer's amyloid precursor protein to decrease A $\beta$  secretion. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 352, p. 498–502, 2007.
- ASHAFAQ, A. M.; KHANA, M. M.; RAZA, S. S.; AHMADA, A.; KHUWAJA, G.; JAVEDA, H.; KHANA, A.; ISLAM, F.; SIDDIQUIA, M. S.; SAFHIE, M. M.; ISLAM, F. S-allyl cysteine mitigates oxidative damage and improves neurologic deficit in a rat model of focal cerebral ischemia. **Nutr Res**, v. 32, p. 133-143, 2011.
- BADDELEY, A.D. **Working memory**. Clarendon, Oxford. 1986.
- BARONE, F. C.; FEUERSTEIN, G. Z. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. **J. Cereb. Blood Flow Metab**, v. 9, p. 819–834, 1999.
- BARTSCH, D.; GHIRARDI, M.; SKEHEL, P.A.; KARL, K.A.; HERDER, S.P.; CHEN, M.; BAILEY, C.H.; KANDEL, E.R. Aplysia CREB2 represses long-term facilitation: relief of repression converts transient facilitation into long-term functional and structural change. **Cell**. v.83 p. 979-92, 1995.
- BATCHELOR, *et al.* Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. **J Neurosci**, v. 19, p.1708–1716, 1999.
- BHUTADA, P. *et al.* Protection of cholinergic and antioxidant system contributes to the effect of berberine ameliorating memory dysfunction in rat model of streptozotocin-induced diabetes. **Behav. Brain Res**, v. 220, p. 30–41, 2011.
- BIRDSALL, T. C.; KELLY, G. S. Berberine: Therapeutic potential of an alkaloid found in several medicinal plants. **Altern. Med. Rev.**, v. 2, p. 94-103, 1997.
- BLISS, T.V.; LOMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **J Physiol**, v. 232, n. 2, p. 331-56, 1973.
- BORLONGAN, C.V.; CAHILL, D.W.; SANBERG, P.R. Locomotor and passive avoidance deficits following occlusion of the middle cerebral artery. **Physiol Behav**, v. 58, p. 909–917, 1995.
- BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, p. 618–622, 1982

BRAVATA, M. D. A New Definicion for Transient Attack and Stroke. **Sociedade Americana de Cardiologia**, 2009.

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

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

CAO G, MINAMI M, PEI W, YAN C, CHEN D, O'HORO C, GRAHAM SH, CHEN J. Intracellular Bax translocation after transient cerebral ischemia: implications for a role of the mitochondrial apoptotic signaling pathway in ischemic neuronal death. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 21, p.321-33. 2001.

CAPLAN, *et al.* Occlusive disease of the middle cerebral artery. **Neurology**, v. 35, p. 975–982, 1985.

CAPLAN, *et al.* Caudate infarcts. **Arch Neurol**, v. 47, p. 133–143, 1990.

CARMICHAEL, S.T. Brain excitability in stroke: the yin and yang of stroke progression. **Arch Neurol**. v. 69, p.161-167, 2012.

CHEN, S.R.; GUO, F.F.; HUANG, W.G.; CHEN, F.Y.; LIU, P.Q. Berberine ameliorates renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats by suppression of both oxidative stress and aldose reductase. **Chin Med J (Engl)**, v. 121 p. 706–712, 2008.

CHEN, S.D.; YANG, D.I.; LIN, T.K.; SHAW, F.Z.; LIOU, C, W.; CHUANG, Y.C. Roles of Oxidative Stress, Apoptosis, PGC-1<sub>α</sub> and Mitochondrial Biogenesis in Cerebral Ischemia. **Int. J. Mol. Sci**, v. 12, p. 7199-7215, 2011.

CHOI, M.S.; YUK, D.Y.; OH, J.H.; JUNG, H.Y.; HAN, S.B.; MOON, D.C.; HONG, J.T. Berberine inhibits human neuroblastoma cell growth through induction of p53-dependent apoptosis. **Anticancer Res.**, v. 28, p. 3777-3784, 2008.

CKLESS, K.; SCHLOTTFELDT, J. L.; PASQUAL, M.; MOYNA, P.; HENRIQUES, J. A.; WAJNER, M. Inhibition of in-vitro lymphocyte transformation by the isoquinoline alkaloid berberine. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 47, p. 1029–1031, 1995.

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

CORBETT, D.; NURSE, S. The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. **Prog Neurobiol.**, v. 54, p. 531-548, 1998.

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

CUI, H. S.; MATSUMOTO, K.; MURAKAMI, Y.; HORI, H.; ZHAO, Q.; OBI, R. Berberine Exerts Neuroprotective Actions against in Vitro Ischemia-Induced Neuronal Cell Damage in

Organotypic Hippocampal Slice Cultures: Involvement of B-Cell Lymphoma 2 Phosphorylation Suppression. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 32, p. 79-85, 2009.

DELLU, F. *et al.* Reactivity to novelty during youth as a predictive factor of cognitive impairment in the elderly: a longitudinal study in rats. **Brain Res.**, v. 653, p. 51-56, 1994.

DeNOBLE, V.J.; REPETTI, S.J.; GELPKE, L.W.; WOOD, L.M.; KEIM, K.L. Vinpocetine: nootropic effects on scopolamine-induced and hypoxia-induced retrieval deficits of a step-through passive avoidance response in rats. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 24, n.4, p.1123-1128, 1986.

DERESKI, M.O.; CHOPP, M.; KNIGHT, R.A.; RODOLOSI, L.C.; GARCIA, J.H. The heterogeneous temporal evolution of focal ischemic neuronal damage in the rat. **Acta Neuropathol**, v. 85, p. 327-333, 1993.

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

D'HOOGHE, R., DE DEYN, P. P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. **Brain Res Rev.**, v. 36, p. 60-90, 2001.

DOBREK, L.; THOR, P. Glutamate NMDA receptors in pathophysiology and pharmacotherapy of selected nervous system diseases. **Postepy Hig Med Dosw**, v. 65, p. 338-346, 2011.

DOYLE, K. P.; SIMON, R. P.; STENZEL-POORE, M. P. Mechanisms of Ischemic Brain Damage. **Neuropharmacology**, v. 55, p. 310-318, 2008.

DUCKWORTH, E.A.M.; BUTLER, T.L.; MESQUITA, D.; COLLIER, S.N.; COLLIER, L.; PENNYPACKER, K.R. Temporary focal ischemia in the mouse: Technical aspects and patterns of Fluoro-Jade evident neurodegeneration. **Brain Research**, v. 1042, p. 29– 36, 2005.

DURAIRAJAN, S. S. *et al.* Berberine ameliorates  $\beta$ -amyloid pathology, gliosis, and cognitive impairment in an Alzheimer's disease transgenic mouse model. **Neurobiol Aging.**, 2012.

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.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. **Behav. Brain Res.**, v. 31, p. 47-59, 1988.

ESNEAULT, E. *et al.* D-JNKi, a peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase, promotes functional recovery after transient focal cerebral ischemia in rats. **Neuroscience**, v. 152, p. 308-320, 2008.

ESPEY, M. G.; MIRANDA, K. M.; THOMAS, D. D.; XAVIER, S.; CITRIN, D.; VITEK, M. P.; WINK, D. A. Mechanism of cell death governed by the balance between nitrosative and oxidative stress. **Ann NY Acad Sci**, v. 899, p. 209-221, 2000.

FALCÃO, I. V. *et al.* Acidente vascular cerebral precoce: implicações para adultos em idade produtiva atendidos pelo Sistema Único de Saúde. **Rev. Bras. Saude Mater. Infant**, v. 4, p. 95-101, 2004.

FEIGIN, V. L.; LAWES, C. M. 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, p. 355-369, 2009.

GALVÃO, R. I. M.; DIÓGENES, J. P. L.; MAIA, G. C. L.; FILHO, E. A. S.; VASCONCELOS, S. M. M.; MENEZES, D. B.; CUNHA, G. M. A.; VIANA, G. S. B. Tenoxicam Exerts a Neuroprotective Action after Cerebral Ischemia in Rats. **Neurochem Res.**, v. 30, p. 39-46, 2005.

GARCIA, J. G. *et al.* Neurological Deficit and Extent of Neuronal Necrosis Attributable to Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. **Stroke**, v. 26, p. 627-635, 1995.

GIBSON, C. L., BATH, P. M., MURPHY, S. P. G-CSF reduces infarct volume and improves functional outcome after transient focal cerebral ischemia in mice. , v. 25, p. 431-439, 2005.

GILGUN-SHERKI, Y.; ROSENBAUM, Z.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. **Pharmacol Rev.**, v. 54, p. 271-284, 2002.

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

GOLDLUST, E. J. *et al.* Automated measurement of infarct size with scanned images of triphenyltetrazolium chloride-stained rat brains. **Stroke**, v. 27, p. 1657-1662, 1996.

GOLDMAN-RAKIC PS. Working memory and the mind. **Sci Am.**, v. 267, p. 110-7, 1992.

GREEN, D. R., REED, J. C. **Mitochondria and apoptosis.** *Science*, v. 281, p. 1309–1312, 1998.

HAN, A. M.; HEO, H.; KWON, Y. K. Berberine promotes axonal regeneration in injured nerves of the peripheral nervous system. **J Med Food**, v. 15, p. 413-417, 2012.

HATTORI, K. *et al.* Cognitive deficits after focal cerebral ischemia in mice. **Stroke**, v. 31, p. 1939-1944, 2000.

HONG, Y.; HUI, S. C.; CHAN, T. Y.; HOU, J. Y. Effect of berberine on regression of pressure-overload induced cardiac hypertrophy in rats. **Am. J. Chin. Med.**, v. 30, p. 589–599, 2002.

HOSSMANN, K.A. Animal models of cerebral ischemia. Review of literature. **Cerebrovasc Dis**, v. 1, p. 2-15, 1991.

HSIEH, Y.S.; KUO, W.H.; LIN, T.W.; CHANG, H.R.; LIN, T.H.; CHEN, P.N.; CHU, S.C. Protective effects of berberine against low-density lipoprotein (LDL) oxidation and oxidized

LDL-induced cytotoxicity on endothelial cells. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 10437-10445, 2007.

HUANG, J.; UPADHYAY, U. M.; TAMARGO, R. J. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. **Surg Neurol.**, v. 66, p. 232-245, 2006.

HUNG, T. M. *et al.* Cholinesterase inhibitory and anti-amnesic activity of alkaloids from *Corydalis turtschaninovii*. **Ethnopharmacol.**, v. 119, p. 74-80, 2008.

IMANSHAHIDI, M.; HOSSEINZADEH, H. Pharmacological and therapeutic effects of Berberine vulgaris and its active constituent, berberine. **Phytother Res**, v. 22, p.999-1012, 2008.

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L. R. M.; ROSSATO, J. I.; BONINI, J. S.; MEDINA, J. H.; CAMMAROTA, M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends Neurosc**, v. 29, p. 496-505, 2006.

JI, H. F.; SHEN, L. Berberine: A Potential Multipotent Natural Product to Combat Alzheimer's Disease. **Molecules.**, v. 16, p. 6732-6740, 2011.

JOHNSTON, S. C.; MENDIS, S.; MATHERS, C. D. Global variation in stroke burden and mortality: estimates from monitoring, surveillance, and modelling. **Lancet Neurol**, v. 8, p. 345-354, 2009.

JUNG, H.A.; MIN, B.S.; YOKOZAWA, T.; LEE, J.H.; KIM, Y.S.; CHOI, J.S. Anti-Alzheimer and antioxidant activities of *Coptidis Rhizoma* alkaloids. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 32, p. 1433-1438, 2009.

KANDEL, E. R. The Biology of Memory: A Forty-Year Perspective. **J Neurosc**, v. 29, p. 12748 -12756, 2009.

KAPOSZTA, Z.; TOUNG, E.; BATH, P. M. W.; MARKUS, H. S. Clinical application of asymptomatic embolic signal detection in acute stroke : a prospective study. **Stroke**, v. 30, p.1814–1818, 1999.

KATZ, R. J., ROTH, K. A., CARROLL, B. J. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 5, p. 247-251, 1981.

KIM, D. W.; AHAN, S.H.; KIM, T.I. **Enhancement of Arsenic Trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)-Mediated Apoptosis Using Berberine in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells.** J. Korean Neurosurg. Soc., v. 42, p. 392-399, 2007.

KIRIK, D., ROSENBLAD, C., BJORKLUND, A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. **Exp Neurol.**, v. 277, p. 152-259, 1998.

KOUMURA, A.; HAMANAKA, J.; KAWASAKI, K.; TSURUMA, K.; SHIMAZAWA, M.; HOZUMI, I.; HARA, H. Fasudil and Ozagrel in Combination Show Neuroprotective Effects

on Cerebral Infarction after Murine Middle Cerebral Artery Occlusion. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 338, p. 337-344, 2011.

KRIZ, J.; LALANCETTE-HÉBERT, M. Inflammation, plasticity and real-time imaging after cerebral ischemia. **Acta Neuropathol**, v. 117, p. 497-509, 2009.

KULKARNI, S. K.; DHIR, A. On the mechanism of antidepressant-like action of berberine chloride. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 589, p. 163-172, 2008.

KULKARNI, S.K.; DHIR, A. Berberine: A Plant Alkaloid with Therapeutic Potential for Central Nervous System Disorders. **Phytother. Res.**, v. 24, p. 317–324, 2010.

KULKARNI, S.K.; DHIR, A. Possible involvement of L-argininenitric oxide (NO)-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) signaling pathway in the antidepressant activity of berberine chloride. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 569, p. 77–83, 2007.

KUMRAL, A. *et al.* Protective effects of methylxanthines on hypoxia-induced apoptotic neurodegeneration and long-term cognitive functions in the developing rat brain. **Neonatology**, v. 98, p. 128-136, 2010.

KUNDROTIENE, J.; WÄGNER, A.; LILJEQUIST, S. Fluoro-Jade and TUNEL staining as useful tools to identify ischemic brain damage following moderate extradural compression of sensorimotor cortex. **Acta Neurobiol Exp**, v. 64, p. 153-162, 2004.

KWON, I. H.; CHOI, H. S.; SHIN, K. S.; LEE, B. K.; LEE, C. K.; HWANG, B. Y.; LIM, S. C.; LEE, M. K. Effects of berberine on 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in PC12 cells and a rat model of Parkinson's disease. **Neurosci Lett.**, v. 486, p. 29-33, 2010.

LANG, D.; KIEWERT, C.; MDZINARISHVILI, A.; SCHWARZKOPF, T.M.; SUMBRIA, R.; HARTMANN, J.; KLEIN, J. Neuroprotective effects of bilobalide are accompanied by a reduction of ischemia-induced glutamate release in vivo. **Brain research**, v. 1422, p. 155–163, 2011.

LE PEILLET, E. *et al.* Modified open-field test to study the protective activity of drugs in cerebral ischemia in rats ("4 vessel model"). **Pharmacology of Cerebral Ischemia. Krieglstein**, p. 369-373, 1988.

LEE, B. *et al.* Inhibitory Effects of Coptidis rhizoma and Berberine on Cocaine-induced Sensitization. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 6, p. 85-90, 2009.

LEE, M. K.; KIM, H. S. Inhibitory effects of protoberberine alkaloids from the roots of *Coptis japonica* on catecholamine biosynthesis in PC12 cells. **Planta. Med**, v. 62, p. 31–34, 1996.

LEE, T.; HEO, H.; KIM KWON, Y. Effect of Berberine on Cell Survival in the Developing Rat Brain Damaged by MK-801. **Exp. Neurobiol.**, v. 19, p.140-5, 2010.

LEES, K. R. *et al.* NXY-059 for acute ischemic stroke. **N. Engl. J. Med.**, v. 54, p. 588–600, 2006.

LIPTON, P. Ischemic Cell Death in Brain Neurons. **Physiol Rev**, v. 79, p. 1431-1568, 1999.

LLEDO, P. M.; ALONSO, M.; GRUBB, M.S. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. **Nat Rev Neurosc.**, v. 7, p. 179-193, 2006.

LOVE, S. Apoptosis and brain ischemia. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 27, p. 267-282, 2003.

LÜ, J. M.; LIN, P. H.; YAO, Q.; CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. **J Cell Mol Med**, v. 14 (n.4), p. 840-860, 2010.

LUCAS, J. A. Encyclopedia of the Human Brain. **Memory Overview**. v. 1, p. 817 – 833, 2002.

LUO, A.; FAN, Y. Antioxidant activities of berberine hydrochloride. **J. Med. Plant. Res.**, v. 5(16), p. 3702-3707, 2011.

MASSARO, A. R. Triagem do AVC isquêmico agudo. **Rev Soc Cardiol Rio Grande do Sul**, v. 7, 2006.

MATCHETT, G. A. *et al.* The effect of granulocyte-colony stimulating factor in global cerebral ischemia in rats. **Brain Res.**, v. 1136, p. 200–207, 2007.

MAUD, A. Patient page. Memory loss after stroke. **Ameri Academy of Neurl**, v.24, p. 67, 2006.

MCAULIFFE, J. J. *et al.* Desflurane, isoflurane, and sevoflurane provide limited neuroprotection against neonatal hypoxia-ischemia in a delayed preconditioning paradigm. **Anesthesiology.**, v. 111, p. 533-546, 2009.

McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein Hemocuprein. **J Biol Chem**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MELANI, *et al.* The selective A2A receptor antagonist SCH 58261 protects from neurological deficit, brain damage and activation of p38 MAPK in rat focal cerebral ischemia. **Brain reserarch**, v. 1 0 7 3 – 1 0 7 4, p. 4 7 0 – 4 8 0, 2006.

MIURA,N.; YAMAMOTO, M.; UEKI, T.; KITANI, T.; FUKUDA, K.; KOMATSUL, Y. Inhibition of Thymocyte Apoptosis by Berberine. **Biochem. Pharmacol.**, v. 53, p. 1315-1322, 1997.

MONJE, M.L.; TODA, H.; PALMER, T.D. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. **Science**, v. 302, p. 1760–1765, 2003.

MORRIS, R. G. M. *et al.* Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, v. 297, p. 681-683, 1982.

MORRIS, R.G.M.; GARRUD, P.; RAWLIN, J.N.P.; O’KEEF, J.. Place Navigation Impaired in Rats with Hippocampal Lesions. **Nature**, v.297, p. 681-683, 1982.

MUMBY, D. G. *et al.* Ischemia-induced object recognition deficits in rats are attenuated by hippocampal ablation before or soon after ischemia. **Behav Neurosci**, v. 110, p. 266–281, 1996.

NEVES, G., COOKE, S. F., BLISS, T. V. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, p. 65-75, 2008.

NIKONENKO, A. G. *et al.* Structural features of ischemic damage in the hippocampus. **Anat Rec. Hoboken.**, v. 292, p. 1914-1921, 2009.

NYAKAS, C. *et al.* Neuroprotective effects of vinpocetine and its major metabolite cis-apovincaminic acid on NMDA-induced neurotoxicity in a rat entorhinal cortex lesion model. **CNS Neurosci Ther**, v. 15, p. 89-99, 2009.

NYAKAS, C.; FELSZEGHY, K.; SZABO, R.; KEIJSER, J.N.; LUITEN, P.G.M.; SZOMBATHELYI, Z.; TIHANYI, K. Neuroprotective Effects of Vinpocetine and its Major Metabolite *Cis*-apovincaminic Acid on NMDA-Induced Neurotoxicity in a Rat Entorhinal Cortex Lesion Model. **Neuroscience e therapeutics**, v. 15, p. 89-99, 2009.

O'KEEFE, J.; DOSTROVSKY, J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. **Brain Res**, v. 34, p.171–175, 1971.

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**, 2012.

PENG, W.H.; LO, K.L.; LEE, Y.H.; HUNG, T.H.; LIN, Y.C. Berberine produces antidepressant-like effects in the forced swim test and in the tail suspension test in mice. **Life Sci.**, v. 81, p. 933–938, 2007.

PENG, W.H.; WU, C.E.; CHEN, C.S.; CHEN, C.F.; LEU, Z.C.; HSIEH, M.T. Anxiolytic effect of berberine on exploratory activity of the mouse in two experimental anxiety models: Interaction with drugs acting at 5-HT receptors. **Life Sci.**, v. 75, p. 2451-2462, 2004.

PLAMONDON, H.; MORIN, A.; CHARRON, C. Chronic 17-beta-estradiol pretreatment and ischemia-induced hippocampal degeneration and memory impairments: A 6-month survival study. **Horm Behav**, v.30, p.30, 2006.

QUIK M, PEREZ XA, BORDIA T. Nicotine as a potential neuroprotective agent for Parkinson's disease. **Mov Disord**, 2012.

RABBANI GH, BUTLER T, KNIGHT J, SANYAL SC, ALAM K. Randomized controlled trial of berberine sulfate therapy for diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. **J Infect Dis.**, p. 979. 1987.

ROWLAND, L. P.; MERRI, T. T. **Tratado de Neurologia. 10.ed.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SANDSTROM, J.; ROWAN, J. M. Acute pretreatment with estradiol protects against CA1 cell loss and spatial learning impairments resulting from transient global ischemia. **Horm Behav**, v. 51, n. 3, p. 335–345, Mar, 2007.

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, p. 491-5, 1988.

SASAKI, T. *et al.* Implication of cyclooxygenase-2 on enhanced proliferation of neural progenitor cells in the adult mouse hippocampus after ischemia. **J. Neurosci. Res**, v. 72, p. 461–471, 2003.

SATTLER, R.; TYMIANSKI, M. Molecular Mechanisms of Glutamate Receptor-Mediated Excitotoxic Neuronal Cell Death. **Molecular Neurobiol**, v. 4, p. 107-129, 2001.

SCHMITT, C.A.; FRIDMAN, J.S.; YANG, M.; BARANOV, E.; HOFFMAN, R.M.; LOWE, S.W. Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. **Cancer Cell**, v.1, p. 289–298, 2002.

SCHMUED, L.C.; STOWERS, C.C.; SCALLET, A.C.; XU, L. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. **Brain Res**, v. 1035, p. 24–31, 2005.

SEDLAK J.; LINDSAY R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.** v. 25, p. 192-195. 1968.

SHIN, J. S. *et al.* Inhibition of dopamine biosynthesis by protoberberine alkaloids in PC12 cells. **Neurochem. Res**, v. 25, p. 363–368, 2002.

SIMON, J.; WEBB, T. E.; BARNARD, E. A. Distribution of [35S] dATP's binding sites in the adult rat neuraxis. **Neuropharmacology**, v. 36, p. 1243–1251, 1997.

SMITH, W. S. Pathophysiology of Focal Cerebral Ischemia: a Therapeutic Perspective. **J Vasc Interv Radiol**, v. 15, p. S3–S12, 2004.

SOBEL, R.A.; MITCHELL, M.E.; FONDREN, G. Intercellular adhesion molecule–1 in cellular immune reactions in the human central nervous system. **Am J Pathol**, v. 136, p.337-354, 1990.

SQUIRE, L.R.; ZOLA, S.M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. **Proc Natl Acad Sci**, v. 26, n. 93, p. 13515-22, 1996.

SUGAWARA, T.; FUJIMURA, M.; NOSHITA, N.; KIM, G. W.; SAITO, A.; HAYASHI, T.; NARASIMHAN, P.; MAIER, C. M.; CHAN, P. H. Neuronal Death/Survival Signaling Pathways in Cerebral Ischemia. **NeuroRX**, v. 1, p. 17-25, 2004.

SUGIMOTO, K.; IADECOLA, C. Delayed effect of administration of COX-2 inhibitor in mice with acute cerebral ischemia. **Brain Res**, v. 960, p.273–276, 2003.

TANG, W., EISENBRAND, G. Coptids in chinese drugs of plant origin. Berlin, Heidelberg, p. 362–371, 1992.

TIKKA, T. *et al.* Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. **J. Neurosci**, v. 21, p. 2580–2588, 2001.

TIKKA, T.M.; KOISTINAHO, J.E. Minocycline provides neuroprotection against n-methyl-d-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. **J. Immunol**, v. 166, p. 7527–7233, 2001.

TRAYSTMAN, A. Acute and chronic estradiol treatments reduce memory deficits induced by transient global ischemia in female rats. **Horm Behav. Stroke**, v. 31, p. 1939-1944, 2000.

TU, *et al.* Zileuton Reduces Inflammatory Reaction and Brain Damage Following Permanent Cerebral Ischemia in Rats. **Inflammation**, v. 33, p. 344-352, 2010.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, p. 44-84, 2007.

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

WALKER, E. J.; ROSENBERG, G. A. TIMP-3 and MMP-3 contribute to delayed inflammation and hippocampal neuronal death following global ischemia. **Exp Neurol**, v. 216, p. 122–131, 2009.

WANG X, MICHAELIS EK. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. **Aging Neurosci**, v 30, p.12, 2010.

WANG, X.; WANG, F.; XING, D.; SU, H.; MA, C.; DING, Y.; DU, L. Kinetic difference of berberine between hippocampus and plasma in rat after intravenous administration of Coptidis rhizome extract. **Life Sci.**, v. 77, p. 3058-3067, 2005.

WARNER, D.S.; SHENG, H.; BATINIC-HARBELE, I. Oxidants, Antioxidants and the Ischemic Brain. **The Journal of Experimental Biology**. v. 207, p. 3221-3231, 2004.

WEINSTEIN, P. R.; HONG, S.; SHARP, F. R. Molecular identification of the ischemic penumbra. **Stroke**. v.35, p. 2666-70, nov., 2004.

WIN-SHWE, T. T., FUJIMAKI, H. Acute administration of toluene affects memory retention in novel object recognition test and memory function-related gene expression in mice. **J Appl Toxicol**. v. 32, p. 300-304, 2012.

WINTERS, B.D.; SAKSIDA, L.M.; BUSSEY, T.J. Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. **Neurosci. Biobehav Rev**, v. 32, p. 1055–1070, 2008.

WOOD, E. R. *et al.* Impaired object recognition memory in rats following ischemia-induced damage to the hippocampus. **Behav Neurosci.**, v. 107, p. 51–62, 1993.

WU, J.F.; SHI, Y.J.; LIU, T.P. Protective effects of berberine on cerebral ischemia in mice and rats. **Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology**, v.9, p.100–103, 1995.

XIE, M. *et al.* Glial gap junctional communication involvement in hippocampal damage after middle cerebral artery occlusion. **Ann Neurol.**, v. 70, p. 121-132, 2011.

Xu M, YANG L, HONG LZ, ZHAO XY, ZHANG HL. Direct protection of neurons and astrocytes by matrine via inhibition of the NF- $\kappa$ B signaling pathway contributes to neuroprotection against focal cerebral ischemia. **Brain Res**, v. 1454 p.49, 2012.

XU, D.H.; ZHOU, C.H. Antioxidative effects of berberine pre-treatment on hydrogen peroxide-induced PC12 cell toxicity. **Neural. Regen. Res.**, v. 5, p. 1391-1395. 2010.

YANG, L.; SHAH, K.; WANG, H.; KARAMYAN, V.T.; ABBRUSCATO, T.J. Characterization of Neuroprotective Effects of Biphalin, an Opioid Receptor Agonist, in a Model of Focal Brain Ischemia. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 339, p. 499-508, 2011.

YONEMORI, F. *et al.* Spatial memory disturbance after focal cerebral ischemia in rats. **J Cereb Blood Flow Metab.** v. 16, p. 973-980, 1996.

YOO KY, HWANG IK, KIM JD, KANG IJ, PARK J, YI JS, KIM JK, BAE YS, WON MH. Antiinflammatory effect of the ethanol extract of *Berberis koreana* in a gerbil model of cerebral ischemia/reperfusion. **Phytother Res.**, v. 22, p.1527, 2008.

YOO KY, HWANG IK, LIM BO, KANG TC, KIM DW, KIM SM, LEE HY, KIM JD, WON MH. Berberry extract reduces neuronal damage and N-Methyl-D-aspartate receptor 1 immunoreactivity in the gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. **Biol Pharm Bull.**, v. 29, p. 624, 2006.

YOON, T.; OKADA, J.; JUNG, M.W.; KIM, J.J. Prefrontal cortex and hippocampus subserve different components of working memory in rats. **Learning & Memory**, v. 15, p. 97-115, 2008.

YOSHIOKA, M.; ITOH, Y.; MORI, K.; UENO, K.; MATSUMOTO, M.; TOGASHI, H. Effects of an interleukin-1 $\beta$  analogue [Lys-D-Pro-Thr], on incomplete cerebral ischemia-induced inhibition of long-term potentiation in rat hippocampal neurons *in vivo*. **Neurosci Lett**, v. 261, p. 171-174, 1999.

YOUN, M. J.; SO, H. S.; CHO, H. J.; KIM, H. J.; KIM, Y.; LEE, J. H.; SOHN, J. S.; KIM, Y. K.; CHUNG, S. Y.; PARK, R. Berberine, a Natural Product, Combined with Cisplatin Enhanced Apoptosis through a Mitochondria/Caspase-Mediated Pathway in HeLa Cells. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 31, p. 789-795, 2008.

YRJANHEIKKI, J. *et al.* A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 96, p. 13496–13500, 1999.

ZÉTOLA, V. H. F.; NÓVAK, E. M.; CAMARGO, C. H. F.; JÚNIOR, H. C.; CORAL, P.; MUZZIO, J. A.; IWAMOTO, F. M.; COLETA, M. V. D.; WERNECK, L. N. Acidente Vascular Cerebral em pacientes jovens. **Arq Neuro-Psiquiatria**, v. 59, p. 740-745, 2001.

ZHANG, R.; CHOPP, M.; CHANG, Z.; JIANG, N.; POWERS, C. The expression of P- and E-selectins in three models of middle cerebral artery occlusion. **Brain Res**, v. 785, p. 207-214, 1998.

ZHANG, R.L.; CHOPP, M.; JIANG, N.; TANG, W.X.; PROSTAK, J.; MANNING, A.M.; ANDERSON, D.C. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rat. **Stroke**, v. 26, p. 1438-1442, 1995.

ZHANG, W. *et al.* Berberine protects mesenchymal stem cells against hypoxia-induced apoptosis *in vitro*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 32, p. 1335-1342, 2009.

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, Y.; LI, X.; ZOU, D.; LIU, W.; YANG, J.; ZHU, N.; HUO, L.; WANG, M.; HONG, J.; WU, P.; REN, G. NING, G. Treatment of type 2 diabetes and dyslipidemia with the natural plant alkaloid berberine. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 93, p. 2559-2565, 2008.

ZHOU, X. Q. *et al.* Neuroprotective effects of berberine on stroke models *in vitro* and *in vivo*. **Neurosci. Lett.**, v. 447, p. 31-36, 2008.

ZHU, F.; QIAN, C. Berberine chloride can ameliorate the spatial memory impairment and increase the expression of interleukin-1 $\beta$  and inducible nitric oxide synthase in the rat model of Alzheimer's disease. **BMC. Neurosci.**, v. 7, p. 78, 2006.

ZHUANG, R.; LIN, M. X.; SONG, Q. Y.; LI, J. Effects of curcumin on the expression of nuclear factor-kappaB and intercellular adhesion molecular 1 in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury. **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao**, v. 29, p. 1153-1155. 2009.