



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

FRANCISCO DIEGO PINHEIRO FERNANDES

**EFEITO NEUROPROTETOR DO ÁCIDO CAFEICO EM CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS À ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL PERMANENTE**

FORTALEZA

2014

FRANCISCO DIEGO PINHEIRO FERNANDES

EFEITO NEUROPROTETOR DO ÁCIDO CAFEICO EM CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS À ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL PERMANENTE

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Geanne Matos de Andrade

FORTALEZA

2014

FRANCISCO DIEGO PINHEIRO FERNANDES

EFEITO NEUROPROTETOR DO ÁCIDO CAFEICO EM CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS À ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL PERMANENTE

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Aprovada em

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Geanne Matos de Andrade
Universidade Federal do Ceará

Prof^ª. Dr^ª. Sílvia Maria Mendes Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará

Prof^ª. Dr^ª. Grace Schenatto Pereira
Universidade Federal de Minas Gerais

“A melhor herança é o conhecimento, a cultura...

Porque ninguém pode toma-los de você.”

Dedico este trabalho aos meus pais,
que sempre estimularam meus estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Francisco e Ormesinda, por esta conquista. Pelo tempo e paciência dedicados a minha formação, pelos ensinamentos e exemplos, por estarem sempre presentes e pelo apoio nas horas mais difíceis.

Aos meus irmãos, Deborah e Mario, pela cumplicidade e companheirismo desde que eu me entendo por gente.

À minha orientadora, prof.^a Geanne, por quem nutro uma admiração sincera como pessoa e como pesquisadora, por me orientar neste trabalho, pela confiança, ensinamentos, apoio e dedicação.

Às professoras Sylvania e Grace, por aceitarem compor a banca examinadora desta dissertação e pela contribuição na melhora deste trabalho.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Neurociência e Comportamento, com quem tenho a honra e o prazer de trabalhar. Obrigado por compartilhar comigo boa parte do tempo, os conhecimentos, por estarem sempre disponíveis a prestarem uma ajuda e por tornarem o ambiente de trabalho um lugar agradável e harmônico. Seria uma má-fé absurda imaginar este trabalho sem vocês. Sou muito honrado em trabalhar no LNC e acredito que formamos uma grande equipe juntos.

Aos meus professores da graduação e do mestrado, que transmitiram conhecimentos e contribuíram para o meu crescimento.

Aos meus amigos por sempre terem uma mão estendida, pelos bons e maus momentos compartilhados e por me ensinarem a ver o mundo sob outro prisma.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas”

Carl Sagan.

RESUMO

EFEITO NEUROPROTETOR DO ÁCIDO CAFEICO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL PERMANENTE.

O acidente vascular cerebral (AVC) resulta da interrupção aguda do fluxo sanguíneo aos tecidos cerebrais, resultando no decréscimo de oxigênio e glicose para os tecidos e conseqüentemente em perda rápida da função neurológica. É a segunda principal causa de morte no mundo e uma das principais causas de incapacidade física segundo dados da Organização mundial de Saúde. A fisiopatologia do AVC isquêmico envolve uma complexa cascata de eventos como a inflamação e o estresse oxidativo que levarão à morte neuronal e déficits cognitivos. O ácido cafeico é um composto fenólico natural com propriedades anti-oxidantes e antiinflamatórias. Para avaliar o efeito neuroprotetor deste composto em camundongos submetidos à oclusão permanente da artéria cerebral media, os animais foram pré e pos tratados com ácido cafeico nas doses de 2, 20 e 60 mg/kg, i.p., durante 24, 48, 72, 96 ou 120 horas após a isquemia. Os animais foram avaliados 24h após a isquemia para verificar a área de lesão isquêmica e avaliação neurológica. Setenta e duas horas após a oclusão, os testes de atividade locomotora, memória de trabalho e memória aversiva recente foram realizados e a memória aversiva tardia realizou-se 24h depois da memória recente. Finalmente, 120h após a isquemia, avaliou-se a memória espacial e as expressões de sinaptofisina, SNAP25 e caspase 3. O tratamento com o ácido cafeico reduziu a lesão isquêmica e melhorou os escores na avaliação neurológica. Não houve diferença na atividade locomotora entre os grupos. O ácido cafeico mostrou proteção nas memórias de trabalho, espacial e aversiva tardia. Além disso, as análises de western blotting mostraram que expressão de sinaptofisina, que está relacionada com a função e formação sináptica, diminuiu após o insulto isquêmico e que o ácido cafeico inibiu a redução da expressão de sinaptofisina. Observou-se um aumento na expressão de caspase 3 nos animais isquemiados e essa expressão foi diminuída pelo tratamento com o ácido cafeico. Esses resultados sugerem que as propriedades neuroprotetoras e anti-demência do ácido cafeico possui estão relacionadas na prevenção da perda de células neurais e das sinapses no cérebro após a lesão isquêmica.

Palavras-chave: Isquemia cerebral focal, neuroproteção, memória, plantas medicinais, ácido cafeico.

ABSTRACT

STUDY OF THE NEUROPROTECTIVE EFFECT OF CAFFEIC ACID IN MICE AFTER PERMANENT FOCAL CEREBRAL ISCHEMIA

Brain ischemia results from the acute interruption of blood flow to the brain tissue vascular accident resulting in the decrease of glucose and oxygen to the tissues and consequently to a rapid loss of neurological function. It is the second leading cause of death worldwide and a major cause of disability according to the World Health Organization. Brain stroke pathophysiology involves a complex cascade of events such as inflammation and oxidative stress that lead to neuronal loss and cognitive deficits. Caffeic acid is a natural phenolic compound with antioxidant and anti-inflammatory properties. To evaluate the neuroprotective efficacy of this compound in mice subjected to a permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO), animals were pre-and post-treated with caffeic acid 2, 20 and 60mg/kg, i.p. during 24, 48, 72, 96 or 120h after ischemia. Animals were evaluated at 24 h after the pMCAO for brain infarction and neurological deficit score. At 72 h after the occlusion, animals were evaluated for locomotor activity, working memory and short aversive memory; late aversive memory was evaluated 24 h after the evaluation of short aversive memory. Finally, at 120 h after the event, spatial memory and the expression levels of synaptophysin, SNAP 25 and caspase 3 were evaluated. The treatment with caffeic acid reduced the infarcted area and improved neurological deficit scores. There was no difference in locomotor activity between groups. The working, spatial and late aversive memory deficits were improved by caffeic acid. Furthermore, western blotting data showed that the expression of synaptophysin which correlates with synaptic formation and function, decreased after ischemic insult, caffeic acid inhibited the reduction of synaptophysin expression. The treatment also decreased caspase 3 expression. These results suggest that caffeic acid possesses neuroprotective and anti-dementia properties, at least in part, by preventing the loss of neural cells and synapses in ischemic brain injury.

Key-word: Focal cerebral ischemia, neuroprotection, memory, medicinal plants, caffeic acid.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Acidente Vascular Cerebral.....	15
1.2. AVC isquêmico.....	16
1.3. Isquemia Cerebral Focal: Modelos experimentais <i>in vivo</i>	17
1.4. Fisiopatologia do AVC isquêmico.....	18
1.4.1. Conceito de núcleo e penumbra.....	20
1.4.2. Depleção de oxigênio e ATP.....	21
1.4.3. Cálcio e Glutamato.....	22
1.4.4. Inflamação e isquemia.....	24
1.4.5. Estresse oxidativo.....	27
1.4.6. Apoptose.....	28
1.5. Memória.....	30
1.6. Plantas medicinais e neuroproteção.....	34
1.6.1. Ácido Cafeico.....	35
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	38
3. OBJETIVOS.....	39
3.1. Objetivo Geral.....	39
3.2. Objetivos Específicos.....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1. Animais.....	40
4.2. Drogas.....	40
4.3. Protocolo Experimental.....	40
4.4. Isquemia cerebral por oclusão permanente da artéria cerebral média em camundongos.....	42
4.5. Avaliação do infarto isquêmico através da coloração pelo Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol (TTC) (Goldlust <i>et al.</i> , 1996).....	42
4.6. Avaliação Neurológica.....	43
4.7. Avaliação da atividade locomotora (Teste de campo aberto).....	44
4.8. Avaliação da Memória de trabalho.....	45
4.9. Avaliação da Memória espacial.....	46
4.10. Avaliação da Memória aversiva.....	47
4.11. Determinação da atividade da acetilcolinesterase.....	47
4.12. Avaliação da expressão de sinaptofisina, caspase 3 e SNAP25 através da técnica de Western-blot.....	48
4.13. Análise estatística.....	50
5. RESULTADOS.....	51
5.1. Efeito do ácido cafeico sobre a área de infarto cerebral de camundongos submetidos à ICF por oclusão da ACM.....	51
5.2. Efeito do ácido cafeico sobre a avaliação neurológica de camundongos submetidos a ICF por oclusão da ACM.....	52
5.3. Efeito do ácido cafeico sobre a atividade locomotora de camundongos submetidos a ICF por oclusão da ACM.....	53
5.4. Efeito do ácido cafeico sobre a memória de trabalho de camundongos submetidos a ICF por oclusão da ACM.....	55
5.5. Efeito do ácido cafeico sobre a memória espacial de camundongos submetidos a ICF por oclusão da ACM.....	55

5.6.Efeito do ácido cafeico sobre a memória aversiva de camundongos submetidos a ICF por oclusão da ACM.....	59
5.7.Efeito do ácido cafeico sobre a expressão de sinaptofisina, caspase 3 e SNAP25 no corpo estriado e hipocampo de camundongos submetidos a ICF por oclusão da ACM	60
6. DISCUSSÃO.....	63
7. CONCLUSÃO.....	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Cascata isquêmica.

Figura 02 – Mecanismos de injúria neuronal após isquemia.

Figura 03 – Resposta inflamatória após isquemia cerebral focal.

Figura 04 - Taxonomia dos sistemas de memória de longa duração.

Figura 05 – Estrutura química do ácido cafeico.

Figura 06 – Protocolo experimental.

Figura 07 - Cirurgia de isquemia cerebral focal em um camundongo: momento da aproximação do bisturi elétrico para coagulação da artéria cerebral média.

Figura 08 – Arena do Campo Aberto.

Figura 09 - Labirinto em Y.

Figura 10 - Labirinto aquático.

Figura 11 - Aparelho de Esquiva Passiva.

Figura 12 – Reação de hidrólise da ATC pela AChE

Figura 13 – Cálculo da atividade da acetilcolinesterase

Figura 14. Efeito do ácido cafeico (2, 20 e 60 mg/kg/dia) sobre o dano neuronal isquêmico de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM.

Figura 15. Visualização do dano neuronal isquêmico através da coloração de TTC entre os grupos. As áreas de edema, nas quais as células não são mais viáveis (com enzimas inativas) correspondem às regiões pálidas, sem coloração.

Figura 16. Efeito do ácido cafeico (2, 20, 60 mg/kg) sobre o número de total de escores obtidos na avaliação neurológica de camundongos submetidos à ICF.

Figura 17. Efeito do ácido cafeico (2, 20 e 60 mg/kg) sobre o número de cruzamentos no teste do campo aberto de camundongos submetidos à ICF por oclusão da ACM.

Figura 18. Efeito do ácido cafeico (2, 20 e 60mg/kg) sobre o número de “rearings” no teste do campo aberto de camundongos submetidos à ICF por oclusão da ACM.

Figura 19. Efeito do ácido cafeico (20 e 60 mg/kg/dia) sobre a memória de trabalho de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM.

Figura 20. Efeito do ácido cafeico (60 mg/kg/dia) sobre o aprendizado de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM avaliada através da latência nos treinos para alcançar a plataforma.

Figura 21. Efeito do ácido cafeico (2, 20 e 60 mg/kg/dia) sobre a memória espacial, avaliada através do parâmetro latência para alcançar a plataforma, de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM.

Figura 22. Efeito do ácido cafeico (2, 20 e 60 mg/kg/dia) sobre a memória espacial, avaliada através do parâmetro número de cruzamentos, de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM (n = 10/grupo).

Figura 23. Efeito do ácido cafeico (2, 20 e 60 mg/kg/dia) sobre a memória espacial, avaliada através do parâmetro tempo de permanência no quadrante, de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM.

Figura 24. Efeito do ácido cafeico (20 e 60 mg/kg) sobre a memória aversiva recente de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM.

Figura 25. Efeito do ácido cafeico (0,1, 1 e 10 mg/ml) sobre a atividade da acetilcolinesterase no córtex temporal de camundongos.

Figura 26. Efeito do ácido cafeico (60mg/kg) sobre a expressão da sinaptofisina no córtex de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM.

Figura 27. Efeito do ácido cafeico (60mg/kg) sobre a expressão da caspase 3 no córtex de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM..

Figura 28. Efeito do ácido cafeico (60mg/kg) sobre a expressão da SNAP no córtex de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Grupos de tratamento.

Tabela 02 – Escala utilizada para a avaliação neurológica.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Acidente Vascular Cerebral

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o acidente vascular cerebral (AVC) é definido como uma lesão cerebral resultante da interrupção aguda do fluxo sanguíneo arterial que pode surgir por uma obstrução do vaso provocada por um êmbolo ou trombo (coágulo), pela formação de placas ateroscleróticas, pela pressão de perfusão cerebral insuficiente ou pela ruptura da parede da artéria. Ainda segundo a OMS, o AVC pode se apresentar com o desenvolvimento rápido de sinais clínicos de distúrbios focais ou globais da função cerebral, com sintomas que perduram por um período superior a 24 horas ou conduzem à morte, sem outra causa aparente que a de origem vascular (WHO, 2006).

O AVC é a segunda causa de morte mais comum e a primeira causa de incapacitação em adultos (BROUNS, 2009). No Brasil, na década de 1960, a taxa de mortalidade por doenças cardíacas e cerebrovasculares coronárias superaram as para doenças infecciosas, e as taxas de mortalidade por AVC no Brasil são os mais altos da América Latina (LOTUFO, 2005; JOHNSTON *et. al.*, 2009). É principal causa de morte no mundo segundo dados da OMS. Atinge aproximadamente 16 milhões de pessoas por ano, e destas, 6 milhões chegam a óbito. No Brasil, os acidentes vasculares cerebrais foram a causa de 172.298 internações em 2011 e em 2010 causaram a morte de 99.159 indivíduos (GARCIA, 2012; WHO, 2013).

A maioria dos casos de AVC em humanos acontece devido ao aparecimento de doenças cardiovasculares ou arterioesclerose (AMARENCO *et. al.*, 2009). A letalidade precoce por AVC está diminuindo tanto nos países de alta renda, como nos de média e baixa renda, mas, em geral, essa taxa de letalidade precoce por AVC em países de baixa e média renda na última década é de 25% superior às taxas em países de alta renda (FEIGIN *et al.*, 2009). No Brasil a mortalidade devido ao AVC está diminuindo, esta diminuição se deve ao aumento do controle da pressão arterial e diminuição do tabagismo, porém as taxas de mortalidade ainda continuam elevadas e os números absolutos de mortes por AVC no Brasil são maiores que em países desenvolvidos. Esse elevado número de mortalidade provavelmente se deve ao envelhecimento da população (GARRITANO *et al*, 2012).

O AVC é dividido em duas categorias: isquêmico e hemorrágico. O AVC isquêmico é resultante da insuficiência de suprimento sanguíneo cerebral, que pode ser transitório ou permanente, representando, no Brasil, segundo diferentes estatísticas, de 53% a 85% dos casos de AVC, predominando a sua forma permanente (PIRES, 2004). No AVC hemorrágico ocorre sangramento no parênquima cerebral ou no espaço subaracnóideo (FERRO e VERDELHO, 2000; GILGUN-SHERKI *et al.*, 2002).

1.2. AVC Isquemico

O AVC isquemico ou, simplesmente isquemia cerebral, pode ser definido como sendo a interrupção do fluxo sanguíneo para o tecido cerebral (SMITH, 2004). Isquemias são a principal causa de morte nos Estados Unidos, afetando aproximadamente 800.000 pessoas todo ano (ROGER *et al.*, 2011). Também são a causa majoritária de deficiência, em que 20% dos sobreviventes de isquemias necessitam de assistência institucional e 15 a 30% ficam permanentemente deficientes, incapazes de voltar ao trabalho e outras atividades do cotidiano (GOLDSTEIN *et al.*, 2011; ROGER *et al.*, 2011).

A isquemia ocorre devido a oclusão de uma artéria cerebral como resultado de aterosclerose progressiva ou de um êmbolo a partir de vasos do coração ou do pescoço. O fluxo sanguíneo cerebral normal é de 50-60 ml/100g/min. Quando o fluxo diminui para menos que 10 ml/100g/min ocorre rápido dano cerebral com morte celular dentro de poucos minutos, se o fluxo permanecer entre 10 e 20 ml/100g/min os neurônios param de funcionar, porém continuam estruturalmente intactos e podem voltar se o fluxo cerebral for reestabelecido (SHUAIB *et al.*, 2011).

Atualmente, o tratamento para isquemia cerebral está limitado a restaurar o suprimento sanguíneo para a área afetada. A terapia de reperfusão consiste na administração do agente trombolítico fator ativador de plasminogênio tecidual (rtPA) e extração mecânica do coágulo endovascular (NESBIT *et al.*, 2004). Entretanto, rtPA tem uma janela terapêutica estreita de de 3 a 4.5 horas (HACKE *et al.*, 2004; WARDLAW *et al.*, 2012) devido ao elevado risco de hemorragia intracraniana após a trombólise fora da janela terapêutica, especialmente em pacientes com isquemias severas ou idade avançada (VAN DER WORP e VAN DER GIJN, 2007). Assim, apenas cerca de 5% dos pacientes com AVC pode se beneficiar do tratamento rtPA.

Terapias combinadas com agentes neuroprotetores têm sido amplamente estudadas para evitar a morte neuronal em acidente vascular cerebral. Infelizmente, quase todos os agentes neuroprotetores que mostraram uma grande promessa em estudos experimentais pré-clínicos nas últimas três décadas falhou em ensaios clínicos (O'COLLINS *et al.*, 2006). Alguns estudos clínicos demonstraram proteção de AVC isquêmico bloqueando a neurotoxicidade mediada por N-metil-D-aspartato (NMDA), no entanto, o tempo de tratamento necessário precoce limita a sua aplicação clínica (HILL *et al.*, 2012; KASTE, 2012).

A fisiopatologia do AVC tem sido bastante estudada em animais e os mecanismos moleculares envolvidos na isquemia cerebral já estão bem estabelecidos através de modelos *in vivo*. As lesões isquêmicas podem ser globais ou focais e para ambos os casos foram desenvolvidos modelos experimentais (COLLI; NUNES; CARLOTTI, 1998; SHUAIB *et al.*, 2011).

1.3. Isquemia Cerebral Focal: Modelos experimentais *in vivo*

Nos modelos animais de isquemia cerebral ocorre a diminuição do aporte de glicose e oxigênio para o tecido. Este evento mimetiza a ocorrência de diversos mecanismos fisiopatológicos que dependem da severidade, duração e localização da lesão isquêmica. Os modelos de isquemia cerebral são desenhados para lidar com fatores de risco específicos, determinar processos de reparação neural e para testar novas estratégias neuroprotetoras. Existem modelos desenvolvidos nas mais diversas espécies de animais, desde primatas até porcos, cachorros, ovelhas, gatos, esquilos da Mongólia, coelhos, ratos e camundongos (TRAYSTMAN, 2003; BACIGALUPPI, COMI, HERMANN, 2010).

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 que permite o estudo da isquemia cerebral sem o efeito da reperfusão. (LIPTON, 1999; DURUKAN, TATLISUMAK, 2007; SICARD, FISHER, 2009).

Os modelos de oclusão da ACM podem ser divididos em modelos que não necessitam de craniectomia, onde estão os modelos de embolismo, introdução de fio

intraluminal, fototrombose com corante Rosa de Bengala e modelo da endotelina-1; modelos que necessitam de craniectomia, realizados através de técnicas cirúrgicas como eletrocauterização, clampeamento e ligadura da artéria; modelos de oclusão da circulação posterior, onde as artérias vertebrobasilares são ocluídas; e modelos de trombose venosa cerebral, sendo os dois últimos menos utilizados (DURUKAN, TATLISUMAK, 2007; SICARD, FISHER, 2009; LIU, MCCULLOUGH, 2011).

Neste trabalho utilizou-se o modelo de eletrocauterização da ACM, que leva a interrupção permanente do fluxo sanguíneo cerebral. Este modelo foi descrito pela primeira vez por Tamura e colaboradores (1981) e tem sido amplamente utilizado, pois permite o acesso a regiões mais proximais da ACM em comparação com técnicas anteriores. O modelo de Tamura produz uma lesão isquêmica cerebral similar a lesão causada pelo modelo de introdução do fio intraluminal, que envolve as regiões cerebrais do córtex temporal e corpo estriado (LIPTON, 1999; TRAYSTMAN, 2003; DURUKAN, TATLISUMAK, 2007).

1.4. Fisiopatologia do AVC isquêmico

A isquemia cerebral pode ser desencadeada através da oclusão de vasos cervico-cranianos ou por hipoperfusão para o cérebro, causada por variados processos: arterotrombose, embolia ou anormalidades hemodinâmicas. 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 (KAPOSZTA *et al.*, 1999).

O infarto embólico é responsável por cerca de 30% dos casos de derrame isquêmico, 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), apesar de também ocorrerem por problemas cirúrgicos em pulmões ou fraturas ósseas que desenvolvem embolia gordurosa (ROWLAND; MERRI, 2002). A 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. Dessa forma o SNC pode sofrer lesões isquêmicas globais e focais (COLLI; NUNES; CARLOTTI, 1998) e a isquemia global acontece durante situações como parada cardíaca e a isquemia focal durante falência do suprimento sanguíneo a uma parte restrita do cérebro.

Após a isquemia, inicia-se uma complexa cadeia de eventos fisiopatológicos envolvendo diversos mecanismos de dano neuronal. A série de processos neuroquímicos transitórios ou permanentes desencadeados pela isquemia cerebral é chamada de cascata isquêmica, onde os principais mecanismos envolvidos são falência bioenergética, excitotoxicidade, inflamação, estresse oxidativo e morte celular de neurônios, glia e células endoteliais (figura 01) (DIRNAGL, IADECOLA, MOSKOWITZ, 1999; BROUNS, DEYNN, 2009).

A cascata isquêmica pode durar horas e até mesmo dias, mesmo após a restauração do fluxo sanguíneo. O tamanho da lesão isquêmica irá depender de dois fatores principais, do tempo e do grau de interrupção de fluxo sanguíneo (DIRNAGL, IADECOLA, MOSKOWITZ, 1999; DURUKAN, TATLISUMAK, 2007; BROUNS, DEYNN, 2009).

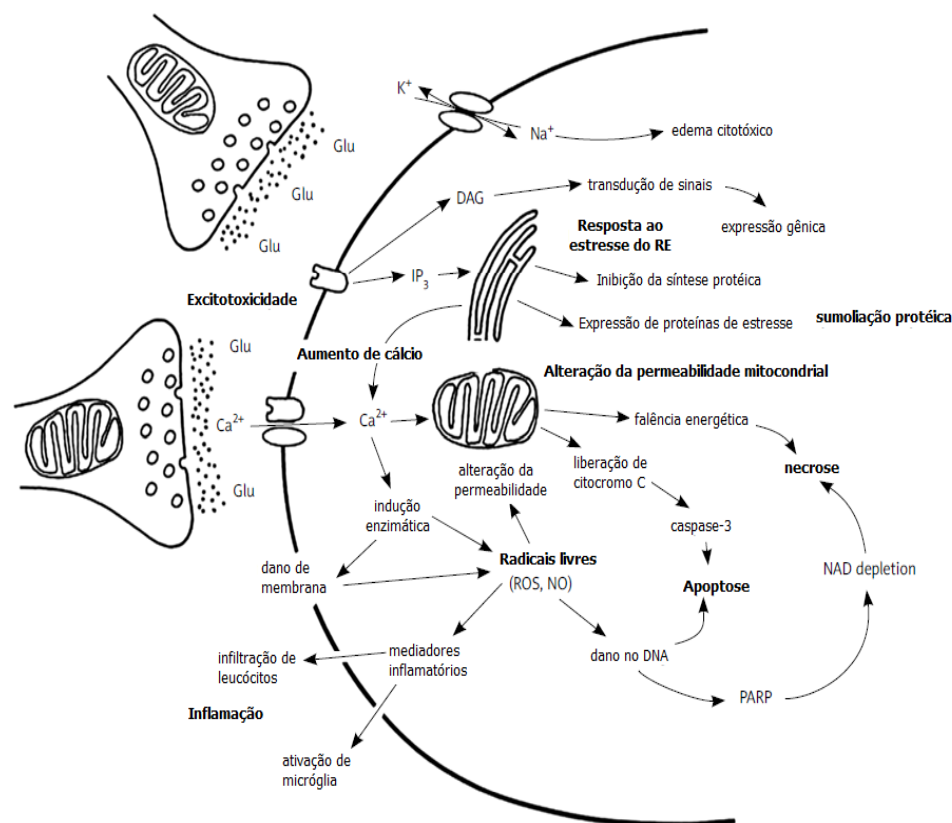


Figura 01 – Cascata isquêmica (Adaptado de HOSSMANN, 2009.)

1.4.1. Conceito de Núcleo e Penumbra

Uma consideração sobre fluxo sanguíneo cerebral (FSC) é importante para se entender a evolução e conseqüências do ataque isquêmico focal. Quando a autoregulação é perdida durante um processo isquêmico, o FSC varia com a pressão de perfusão. Se a taxa do FSC cai a um terço do normal, existe uma perda da excitabilidade elétrica (HOSSMANN, 1994). Entretanto, a homeostase iônica não é perdida até o FSC cair abaixo de um quarto do normal. Esta falência na membrana vai resultar na perda do fluxo de íons e na morte dos neurônios dentro de minutos. O limiar para redução da síntese protéica e o desenvolvimento de edema ou acidose é alcançado mais cedo que o limiar para a falência da excitabilidade elétrica.

Tanto na oclusão distal quanto proximal da artéria cerebral média existem regiões de *core* isquêmico, regiões primariamente irrigadas pela ACM, onde o fluxo sanguíneo é reduzido para menos de 15% e regiões de penumbra isquêmica, zona de tecido adjacente à zona central (*core*) do infarto isquêmico, onde o fluxo é menos de 40%. Depois de um insulto longo o suficiente, 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).

A zona central (*core*) sofre rápida despolarização anóxica dentro de 1 a 3 minutos com um aumento concomitante do K^+ extracelular para aproximadamente 70 mM (GIDO; KRISTIAN; SIESJO, 1997). Há ainda uma diminuição acentuada do Ca^{++} extracelular dentro de 1 a 2 minutos, significando entrada no tecido. Dessa forma o *core* contém neurônios necróticos, como conseqüência da falência da membrana associada a perda da homeostase do Ca^{++} e glutamato.

Os eventos na penumbra são menos drásticos, apesar de também levar ao infarto. Nessa região, a morte celular ocorre menos rapidamente via mecanismos como apoptose e inflamação (GONZALEZ *et al.*, 2006). O nível de ATP é mantido em torno de 50 – 70% do normal, não caindo o suficiente para permitir despolarizações anóxicas. Nesta região há 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.

Os neurônios perifocais na zona de penumbra são os de mais alto risco e com o tempo a zona de infarto vai 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).

1.4.2. Depleção de oxigênio e ATP

A interrupção focal do fluxo sanguíneo cerebral restringe a oferta de substratos metabólicos, particularmente oxigênio e glicose, levando à depleção dos estoques de energia requeridos para manutenção do gradiente iônico das células (MARTIN; LLOYD; COWAN, 1999). A ordem dos eventos a partir daí é constantemente debatida, mas o que se sabe é que as conseqüências desses eventos levam à morte celular por múltiplos processos: excitotoxicidade, desbalanço iônico, despolarizações, estresse oxidativo, inflamação e apoptose (Figura 2).

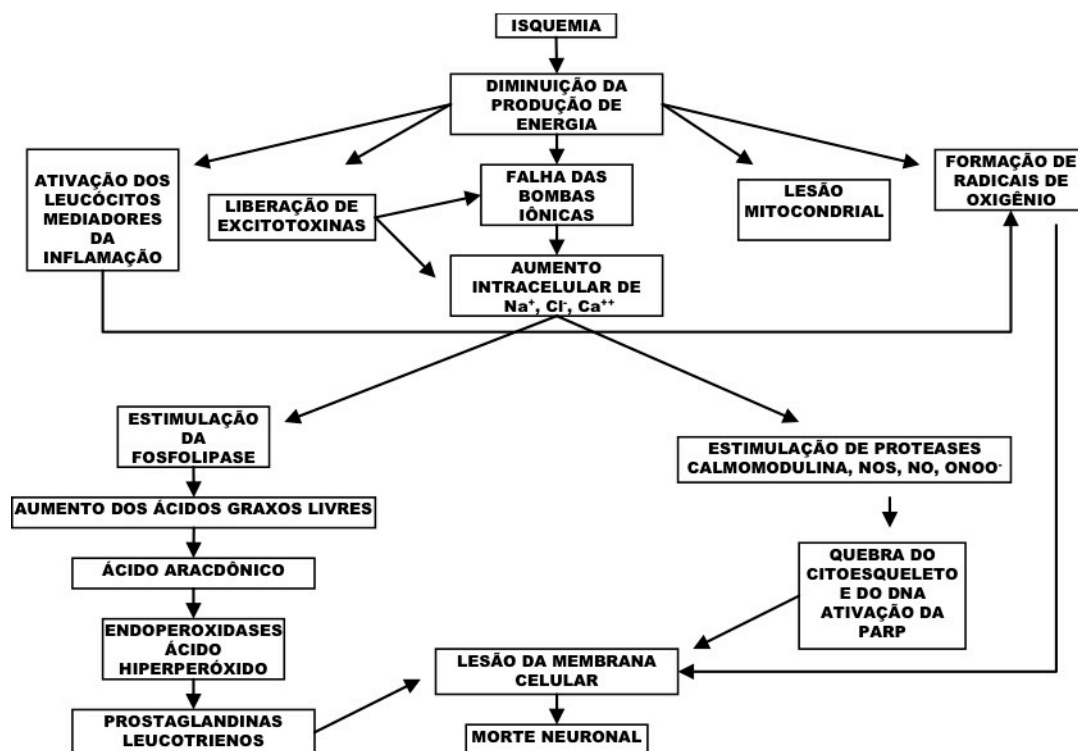


Figura 02 – Mecanismos de injúria neuronal após isquemia. (Adaptado de Traystman, 2003.)

A hipóxia inibe a fosforilação oxidativa mitocondrial e diminui a produção de trifosfato de adenosina (ATP). Por um curto período de tempo, a via metabólica anaeróbica mantém os níveis de ATP, depletando a glicose restante com uma produção bem inferior de energia (YOSHIDA, 2002). A falta de energia celular causa a falência da bomba de sódio-potássio (Na^+/K^+) e, devido à falência da bomba, há um acúmulo de Na^+ intracelular e perda de K^+ , com conseqüente edema da célula e de suas organelas, assim como profundas despolarizações anóxicas. O excesso de Na^+ intracelular reduz a eficiência do simporte de $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ (SMITH, 2004).

1.4.3. Cálcio e Glutamato

A falência energética resultante da diminuição da oferta de oxigênio e glicose durante a isquemia impede o funcionamento da bomba de Ca^{++} ATPase, aumentando a concentração de cálcio intracelular (DOYLE; SIMON; STENZEL-POORE, 2008). A concentração extracelular de Ca^{++} é aproximadamente 1,2 mM e a maioria dos processos regulados pelo Ca^{++} tem valor de Km que varia de 0,1 a 1,0 mM. Durante a isquemia, os níveis de Ca^{++} intracelular aumentam para 50 a 100 mM, ativando muitas, se não todas as proteases, lipases e DNases dependentes de cálcio (EDVINSSON; KRAUSE, 2002). A ativação dessas enzimas leva à morte muitas células do core isquêmico por simples catabolismo. Pois, pelo fato do ATP não está disponível para re-síntese dos constituintes celulares, essas enzimas catabólicas causam a necrose de estruturas celulares essenciais.

Quando analisado em curso temporal, usando um modelo de isquemia focal permanente, o Ca^{++} total na região do core da lesão aumenta gradualmente a uma taxa bem maior que na penumbra, subindo cerca de 1,0 mM/h do início do insulto até 24 horas depois deste (KIM; VAUGHAN; GHOSH, 1998). A despolarização neuronal maciça também abre os canais de Ca^{++} voltagem-dependente e leva ao acúmulo de aminoácidos excitatórios, como o glutamato, que desempenha uma função crítica na patologia isquêmica. Dessa forma, como o influxo de Ca^{++} está fortemente envolvido na morte celular neuronal, bloqueadores de canal de cálcio devem proteger diretamente neurônios do dano isquêmico. Apesar dos canais de cálcio tipo P e Q estarem implicados no influxo de cálcio ao citoplasma, o tipo L é muito mais importante para o dano celular (LUKIC-PANIN, 2007). Bloqueadores do canal tipo L são protetores contra lesões focais transitórias (CAMPBELL; MACKAY; PATEL,

1997) e permanentes (BIELENBERG *et al.*, 1990; JACEWICZ *et al.*, 1990), reduzindo área de infarto.

Um gradiente de concentração elevado de glutamato é mantido através da membrana plasmática por transportadores de glutamato dependente de sódio localizados sobre membranas pré e pós-sinápticas. A concentração sináptica de glutamato se encontra na faixa micromolar, enquanto a concentração citosólica é aproximadamente 10 mM (HSU, 1998). Assim, as despolarizações de membrana e a acumulação de sódio dentro das células durante a isquemia implicam em uma reversão dos transportadores de glutamato e permite que este saia das células através de seu gradiente de concentração. O efeito de um aumento na concentração sináptica de glutamato é a ativação de receptores NMDA e AMPA (ácido α -amino-hidróxi-5-metil-4-isoxazolpropionico). Receptores NMDA são canais iônicos operados por ligantes, que medeiam o influxo de Ca^{++} e contém um sítio de ligação a agonistas, um sítio modulatório de glicina, assim como um sítio de ligação dentro do canal iônico, onde o magnésio exerce um bloqueio voltagem dependente (GINSBERG, 1995). A abertura desses canais causa mais despolarizações da membrana e um aumento ainda maior do influxo de Ca^{++} , exacerbando a sobrecarga intracelular de Ca^{++} (excitotoxicidade). Drogas como MK-801 e Aptiganel, antagonistas não-competitivos dos receptores NMDA, assim como CGS 19755, um antagonista competitivo, são capazes de reduzir significativamente a área de infarto, ou a área significativa de necrose celular, causada por isquemia focal (GINSBERG, 2008).

Receptores AMPA não são normalmente permeáveis ao Ca^{++} em virtude de sua subunidade GluR2, contudo, essa subunidade está reduzida durante a isquemia, aumentando em cerca de 18 vezes a permeabilidade desses receptores ao Ca^{++} , permitindo assim, que receptores AMPA contribuam para morte celular tardia dependente de cálcio (LIU *et al.*, 2006; PENG *et al.*, 2006).

A neurotoxicidade iniciada pela superestimulação dos receptores de glutamato, principalmente receptores NMDA, e subsequente influxo de Ca^{++} livre ativa uma cascata intracelular de eventos citotóxicos que incluem: ativação da NOS, ativação da calpaína, mudanças na expressão gênica e estresse oxidativo, produzindo peroxidação lipídica e dano à membrana.

1.4.4. Inflamação e isquemia

Após a interrupção do fluxo sanguíneo, inicia-se uma reação inflamatória, uma resposta comum do parênquima cerebral à diversas formas de insulto. A inflamação é caracterizada pelo acúmulo de células inflamatórias e mediadores no cérebro isquemiado. Após o início da isquemia, as células inflamatórias, tais como leucócitos e micróglia são ativadas e se acumulam no tecido cerebral subsequentemente levando a lesão inflamatória (figura 03). Evidências mostram que os astrócitos também podem atuar como células inflamatórias em resposta a isquemia (HUANG, UPADHYAY, TAMARGO, 2006; WANG, TANG, YENARI, 2007).

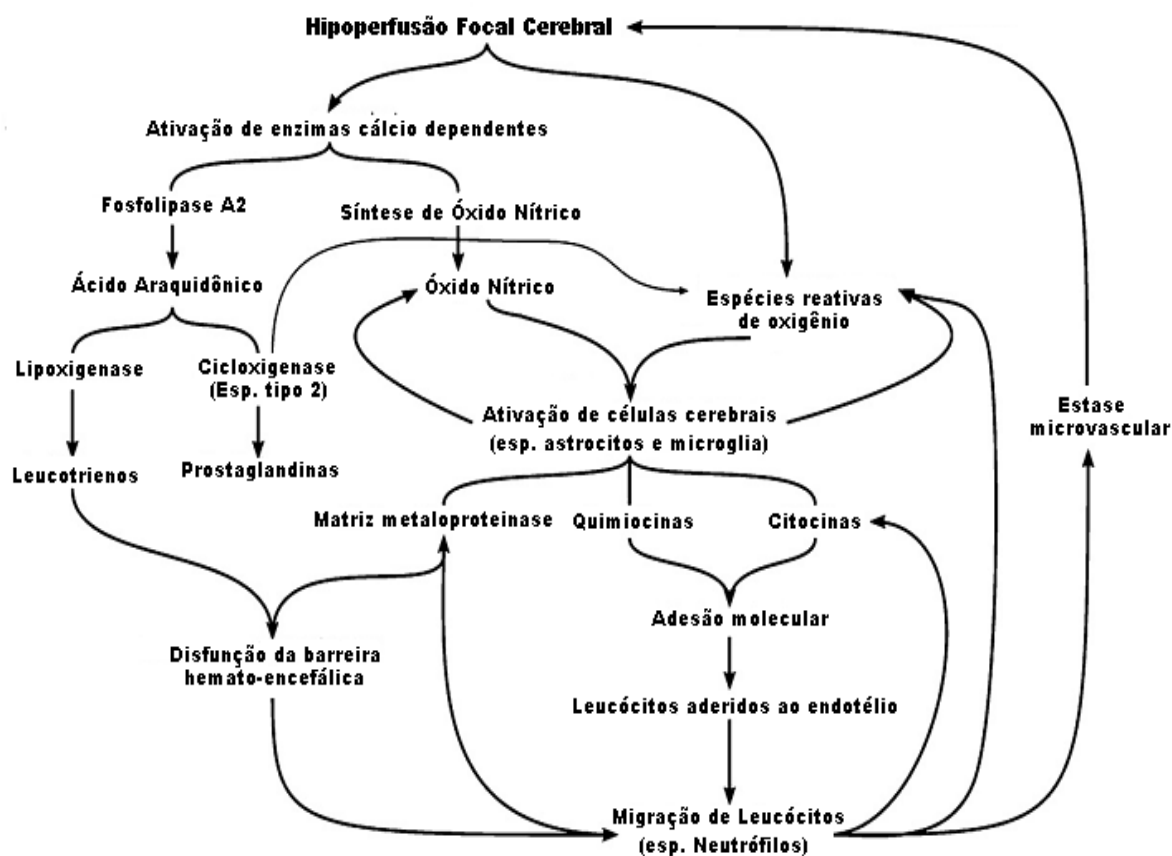


Figura 03 – Resposta inflamatória após isquemia cerebral focal. (Adaptada de BROUNS, DEYNN, 2009.)

A inflamação ocorre no cérebro necrótico após a ruptura da barreira hemato-encefálica e infiltração de células do sistema imunológico. O infiltrado de células imunes é necessário para a limpeza dos debris necróticos e a inflamação diminui após ocorrida essa limpeza (SHICHITA *et al*, 2012).

Após o início da isquemia ocorrem alterações microvasculares que incluem alterações na expressão de moléculas de adesão e aumento da permeabilidade das células endoteliais, liberação de citocinas reguladoras, agregação de leucócitos e plaquetas, que levam a formação de trombo. O recrutamento de leucócitos nas regiões isquêmicas requer uma sequência de eventos que começam com o rolamento de leucócitos ativados no endotélio dos vasos sanguíneos, ativação de neutrófilos, aderência às células endoteliais e transmigração para o parênquima cerebral (HUANG, UPADHYAY, TAMARGO, 2006).

A adesão dos leucócitos ao endotélio se dá através da expressão de moléculas de adesão, que estão distribuídas dentro de três principais classes: selectinas, integrinas e a superfamília de proteínas de imunoglobulinas (CAM's) (HUANG, UPADHYAY, TAMARGO, 2006).

As principais selectinas envolvidas na isquemia são a E-selectina, que promove o rolamento de monócitos e neutrófilos pelo endotélio, assim como a P-selectina que além de promover o rolamento, promove a interação de plaquetas com neutrófilos e monócitos, e a L-selectina que promove a interação de leucócitos não ativados. As interações das selectinas são todas de baixa afinidade. Dentre as principais integrinas envolvidas na isquemia estão a LFA-1, Mac-1 e CD11c que estimulam a adesão celular ao endotélio e modificação conformacional de leucócitos, formando a diapedese. E por último, as principais CAM's envolvidas são ICAM-1 e -2 e VCAM-1, que promovem interações de forte afinidade dos leucócitos com o endotélio e estimulam a diapedese (CELEUMANS *et al*, 2010).

Os neutrófilos ativados que migram para o parênquima cerebral iniciam a liberação de radicais livres de oxigênio e enzimas proteolíticas, aumentando a lesão isquêmica (HUANG, UPADHYAY, TAMARGO, 2006). Muitos estudos mostram que na isquemia cerebral transitória a inibição da infiltração de neutrófilos diminui significativamente o volume de infarto (WANG, TANG, YENARI, 2007).

A mieloperoxidase é uma enzima presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos e de células da linhagem mielóide, principalmente monócitos e macrófagos/micróglia. Quando liberada interage com o peróxido de hidrogênio gerando ânion superóxido, peroxinitrito e outros radicais livres extremamente tóxicos como o hipoclorito (OCl^-). Na isquemia está envolvida com a indução de apoptose e

nitritrosinação de proteínas. É uma molécula chave na inflamação e têm sido descrita em diversos modelos animais de isquemia cerebral (BRECKWOLDT *et al*, 2008).

A micróglia, macrófagos residentes no CNS, têm importante papel como células imunológicas e fagocíticas, servindo como células de limpeza na infecção, inflamação, trauma, isquemia e neurodegeneração. Em ratos hipertensos isquêmicos, através da oACM permanente, observou-se que o tratamento repetitivo com oxigênio hiperbárico reduziu o volume de infarto pela inibição da ativação da micróglia (GUNTHER *et al*, 2005). Em oclusão da ACM transitória, a ativação microglial foi documentada no córtex cerebral do hemisfério isquêmico (YU *et al*, 2005, ZHANG *et al*, 1997). A micróglia pode exercer papel protetor na isquemia através de moléculas neurotróficas como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o fator de crescimento tipo insulina (IGF-1) e efeito deletério pela liberação de citocinas inflamatórias como TNF- α , Il-1 β , além de outras moléculas como IL-6, NO, ROS e prostanoídes (LAKHAN, KIRCHGESSNER, HOFER, 2009).

Os astrócitos, após a isquemia, se tornam ativados, resultando no aumento da expressão de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), também chamada de gliose reativa, caracterizada por mudanças específicas na estrutura e função destas células. Os astrócitos também participam da inflamação cerebral através da liberação de mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas e iNOS. Além disso acredita-se que os astrócitos também tenham papel na expressão de moléculas de adesão, liberação de moléculas estimuladores de resposta inflamatória TH2 e inibição da liberação de IL-12 (WANG, TANG YENARI, 2007).

A cascata de inflamação também inclui a ativação da fosfolipase A2 que ocorre em consequência da elevação da concentração do cálcio intracelular. A fosfolipase A2 produz o ácido aracdônico a partir dos fosfolipídeos de membrana que é metabolizado pela ácido graxo ciclooxygenase (COX), produzindo prostaglandinas e tromboxanos, ou pela lipoxigenase (LOX) que produz lipoxinas. A COX do tipo 2 está super expressa após a isquemia e exerce efeitos tóxicos (NOGAWA *et al.*, 1997).

O tratamento com antiinflamatórios não-esteroidais seletivos a COX-2 apresentaram neuroproteção em modelo experimental de isquemia (SUGIMOTO; IADECOLA, 2003). A utilização do tenoxicam, um inibidor da COX-2, preveniu a

formação de prostaglandinas e diminuiu o dano causado por isquemia cerebral global transitória (GALVÃO *et al.*, 2005).

1.4.5. Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo tem importante papel na fisiopatologia da isquemia devido a grande suscetibilidade do cérebro ao estresse, pois o cérebro consome 20 % do total de oxigênio corporal, além de possuir menores quantidades dos sistemas antioxidantes, possuir grandes quantidades de lipídeos peroxidáveis e grandes quantidades de ferro que age como pró-oxidante em condições patológicas (ALLEN, BAYRAKTUTAN, 2009; PRADEEP *et al.*, 2012). Por esse motivo, modificações farmacológicas que exerçam controle do estresse oxidativo podem ser úteis ao tratamento do AVC.

Na isquemia o estresse oxidativo é mais evidente quando ocorre a reperfusão sanguínea. A reperfusão fornece o oxigênio necessário para a sobrevivência neuronal, mas por outro lado, fornece oxigênio como substrato de inúmeras reações enzimáticas oxidativas que produzem radicais oxidantes (CHAN, 1996).

O primeiro radical livre formado na isquemia cerebral é o ânion superóxido (O_2^-) produzido pela enzima xantina oxidase e liberado da mitocôndria a partir do complexo III da cadeia de transportadora de elétrons. O O_2^- está envolvido em diversos processos deletérios para a célula, mesmo não sendo uma biomolécula muito reativa, através da formação de outros radicais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical peroxila (HO_2^-) e o radical hidroxil (OH^-) que é extremamente reativo e pode atacar o DNA causando alterações genéticas como mutações ou morte celular por apoptose (VALKO *et al.*, 2006, LU *et al.*, 2011). O O_2^- pode ainda reagir com o NO originando o peroxinitrito ($ONOO^-$) (LU *et al.*, 2011).

O estresse causado por radicais livres do óxido nítrico (NO) é chamado de estresse nitrosativo. O principal radical envolvido nesse tipo de estresse é o peroxinitrito, resultado da interação do NO com o O_2^- . O peroxinitrito é extremamente deletério para as células, potente agente oxidante que causa fragmentação do DNA e peroxidação lipídica (ALLEN, BAYRAKTUTAN, 2009).

O NO é produzido pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS) a partir do aminoácido L-arginina. No cérebro existem três isoformas da enzima, nNOS,

produzida pelos neurônios, eNOS, produzida pelas células do endotélio, onde estas duas formas se apresentam de forma constitutiva no citoplasma, e a isoforma induzida por processos patológicos, a iNOS, produzida pelas células da glia (astrócitos e micróglia) e por macrófagos (MORO *et al*, 2004).

A maior parte da produção de NO na isquemia se deve a iNOS, produzindo muitas vezes mais NO que a nNOS. Sua produção independe de cálcio, sendo sua expressão dependente de NF-kb, um fator de transcrição envolvido na resposta inflamatória e estresse oxidativo (MORO *et al*, 2004; PRADEEP, 2012).

O excesso de cálcio intracelular e a ativação dos receptores NMDA levam ao aumento da produção de NO que pode exercer tanto um papel protetor como deletério na isquemia. Pois quando produzido a partir da eNOS se torna protetor devido a vasodilatação que promove, aumentando a oferta de glicose e oxigênio além de inibir a agregação e adesão microvascular, porém quando produzido pela enzimas nNOS e iNOS possui efeito deletério pois reage com O_2^- para produzir $ONOO^-$ no citoplasma celular (MORO *et al*, 2004; PRADEEP *et al*, 2012).

A enzima iNOS é expressa após isquemia e contribuiu para o dano celular associado a esta condição. De fato, foi demonstrado que o mRNA de iNOS, a proteína e a atividade enzimática são expressos no cérebro, após a isquemia transitória ou permanente em roedores e em modelos *in vitro* de isquemia cerebral. A expressão é máxima entre 12 e 48 horas após o início da isquemia *in vivo* e a imunorreatividade de iNOS está localizada em neutrófilos, nos astrócitos e células vasculares no cérebro isquemiado. Além disso, os neurônios também podem expressar iNOS nesta condição, tal como tem sido demonstrada utilizando modelos *in vitro* de isquemia cerebral (MORO *et al*, 2004).

1.4.6. Apoptose

A apoptose é um processo de morte celular programada que envolve mecanismos codificados no genoma das células eucarióticas (BREDESEN, 1996). É uma forma de morte celular programada dependente de energia que tem papel importante em diversos processos vitais e em inúmeras doenças agudas, inclusive no mecanismo envolvido na isquemia e reperfusão de órgãos, além dos eventos mutacionais durante o desenvolvimento de muitos tipos de câncer.

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).

As proteínas da família Bcl-2 e da família das caspases possuem importante papel na ativação, transdução de sinal e execução da apoptose (YUAN, 2009). A família Bcl-2 atua na apoptose através da regulação da permeabilidade da membrana mitocondrial. Evidências sugerem que o citocromo C é liberado pelo poro de transição de permeabilidade (PTP) na mitocôndria e que a família Bcl-2 regula o PTP após a isquemia cerebral. Fazem parte desta família proteínas pró-apoptóticas como Bax, Bcl-Xs, Bak, Bid e Bad, que diminuem o potencial de membrana da mitocôndria através do PTP facilitando a liberação do citocromo C, e também proteínas antiapoptóticas, Bcl-2 e Bcl-Xl, que conservam o potencial de membrana e bloqueiam a liberação de citocromo C (LOVE, 2003; SUGAWARA *et al.*, 2004).

A isquemia cerebral pode desencadear o sinal no interior da célula que provoca a liberação do citocromo C, dando início à via intrínseca de ativação das caspases. As caspases são sintetizadas como pró-enzimas inativas (pró-caspase) e, quando ativadas, clivam diversos substratos protéicos (LOVE, 2003; GRIVICICH; REGNE; ROCHA, 2007). A mitocôndria é o centro da via intrínseca da apoptose, além disso, também pode amplificar e mediar a via extrínseca (SCHMITT *et al.* 2002).

O citocromo C é liberado no citoplasma 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).

A caspase-3 inicia a ativação da cascata de caspases e afeta o DNA promovendo a liberação de DNases e de PARPS. Dessa forma a caspase-3 garante a quebra do DNA e, conseqüentemente, impede a sobrevivência celular (SUGAWARA *et al.*, 2004).

A ativação da via extrínseca se dá, por exemplo, através da ligação da molécula de Fas ligante (Faz-L) presente no meio extracelular ao seu receptor Fas, um receptor de superfície pertencente a família de receptores do TNF. A super expressão de Fas é verificada após isquemia cerebral focal (SUGAWARA *et al.*, 2004). O complexo Faz/Faz-L desencadeia a ativação do domínio de morte associado ao Fas (FADD) e a clivagem da pró-caspase 8. A caspase-8 ativa a caspase-3 que por sua vez age em diversos alvos (FERRER, PLANAS, 2003; SUGAWARA *et al.*, 2004).

As caspases são efetivas em um grande número de substratos, quebrando diversas proteínas estruturais vitais, incluindo PARP-1. Vale ressaltar que a ativação de PARP-1 está envolvida com a necrose, através da depleção de NAD⁺ e ATP, porém sua quebra resulta na produtos de 89 e 28 kDA, característicos da ativação de caspases e morte celular programada (FERRER, PLANAS, 2003).

1.5. 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). Uma das divisões conceituais de memória mais abordadas distingue entre memória “declarativa” e “não declarativa” (ou “de procedimento” - *procedural*), ambas consideradas como memórias de longa duração. (Figura 2).

A memória não declarativa, de procedimento ou implícita – de “como fazer” refere-se a várias formas de memória que não estão diretamente acessíveis à consciência. Estas incluem habilidades e hábitos de aprendizagem, condicionamento clássico, assim como “*priming*” ou pré-ativação que pode ser definido como a habilidade de detectar ou identificar um estímulo como um resultado de uma exposição prévia (ERIKSSON, 2002). Estas categorias de memória não são excludentes, quando um organismo aprende alguma coisa importante, vários destes sistemas de memória podem ser empregados.

A memória declarativa geralmente refere-se à memória explícita – de “o que” - e está relacionada a experiências próprias, reconhecimento de cenas e de

objetos familiares. A memória declarativa envolve a recuperação consciente de eventos ou fatos ocorridos, nos quais está incluída a memória episódica, que se refere a informações que estão relacionadas a um lugar e tempo específicos, assim como a memória semântica que se refere a um conhecimento geral não ligado a contexto espacial ou temporal em particular.

Estudos farmacológicos e clínicos têm mostrado que a memória explícita ou declarativa é processada por estruturas no lobo temporal e suas conexões. Acredita-se que a memória implícita ou de procedimento (*procedural*) seja processada pelo núcleo estriado e/ou diencéfalo (IZQUIERDO, 1993c; SQUIRE, 1987).

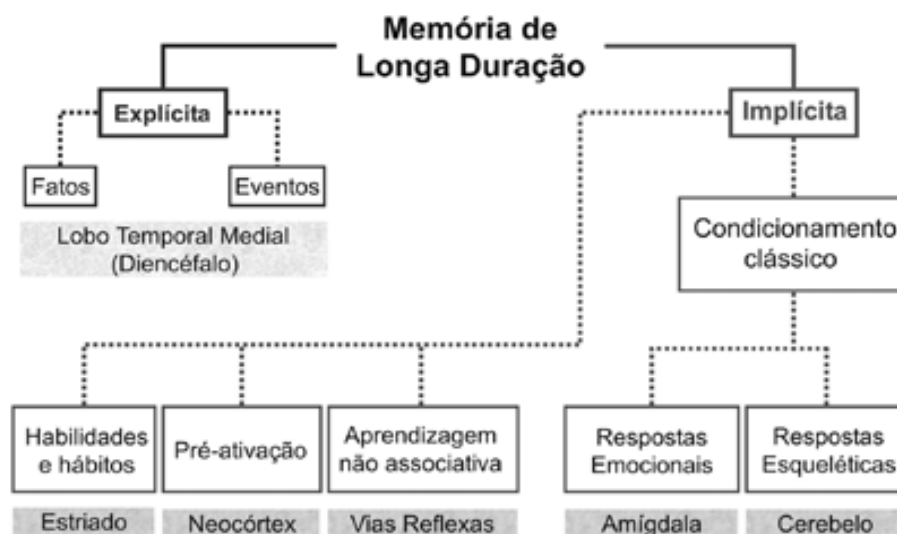


Figura 04 - Taxonomia dos sistemas de memória de longa duração. (Adaptado de Squire e Knowlton, 1995).

No homem a memória declarativa é dividida em recuperação imediata de eventos que ocorrem em curso, memória a curto prazo ou recente de eventos que ocorrem de segundo a horas ou dias antes, e memória remota de eventos do passado distante. Um aspecto da memória de curto prazo é a memória operacional (*working memory*), um armazenamento temporário de informação utilizado para planejar uma ação futura. Pesquisa recente sobre a memória operacional indica o envolvimento de muitas partes diferentes do córtex cerebral.

A memória a curto prazo engloba o tempo durante o qual a memória de eventos em curso está sendo consolidada e convertida à memória remota, de longo prazo. Durante este tempo, a memória a curto prazo é vulnerável e sujeita a desaparecer, ao passo que as memórias remotas são extremamente resistentes e

persistem na presença de grave lesão cerebral (SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1996). O processo de codificação que converte memórias de curto prazo em memórias de longo prazo no homem e em outros primatas envolve o hipocampo e as porções adjacentes entorrinal, perirrinal e para-hipocampal do córtex temporal medial.

No homem, a destruição bilateral do hipocampo ventral ou processos patológicos que destroem seus neurônios na área CA1 causa defeitos acentuados na memória recente. Humanos com esta destruição mantêm intactas a memória imediata e a remota, e não podem constituir novas memórias de longo prazo. As conexões do hipocampo para o diencéfalo também estão envolvidas com a memória. Do tálamo, as fibras projetam-se para o córtex pré-frontal e para o prosencéfalo basal. Deste, há uma projeção colinérgica para todo o neocórtex, amígdala e hipocampo, a partir do núcleo basal de Meynert. Enquanto o processo de decodificação para a memória a curto prazo envolve o hipocampo, as de longo prazo estão armazenadas no neocórtex (SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1996).

Em 1973, os fisiologistas Timothy Bliss e Terje Lomo demonstraram em neurônios localizados no hipocampo que a estimulação elétrica de alta frequência num axônio pré-sináptico durante alguns segundos produz um aumento na magnitude da resposta pós-sináptica. O aumento pode durar 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 (*long-term potentiation*- LTP). Do ponto de vista funcional, a LTP corresponde a um processo de facilitação do sistema nervoso, cujo estabelecimento depende da duração e da frequência do estímulo repetitivo ou numa analogia, depende do “treinamento” e, portanto, de um processo de aprendizagem. A ativação repetitiva dos receptores NMDA causa LTP (*long term potentiation*) (BLISS; LOMO, 1973; CHAPMAN *et al.*, 1990). LTP pode ser definido como uma forma ou mecanismo de memória importante no hipocampo e amígdala (CLUGNET; LE DOUX, 1990), ambas estruturas envolvidas no processamento dos estágios iniciais da memória (consolidação), e também no córtex, onde se acredita ser o sítio de estocagem da memória (IZQUIERDO, 1989; KELLER; PAVLIDES; ASANUMA, 1990).

No teste da esQUIVA passiva, estudos recentes demonstram que a isquemia focal provoca déficit na aquisição e retenção de memória (WAHL *et al.*, 1992; HATTORI *et al.*, 2000). Nesse modelo, que lida com a memória de alerta, ansiedade

ou aversividade associada com cada evento, a amígdala, o hipocampo e septo medial (IZQUIERDO *et al.*, 1992, 1993a) estão envolvidos.

A isquemia também leva a déficits 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).

O septo medial e o hipocampo processam a memória de trabalho e a memória espacial. O hipocampo também processa a informação temporal, contextual e a memória que leva a recordação consciente em humanos (BRIONI, 1993; IZQUIERDO, 1994a; IZQUIERDO *et al.*, 1993c). Pesquisas sobre a memória operacional indicam o envolvimento de muitas partes diferentes do córtex cerebral, principalmente córtex occipital, parietal e frontal direitos (SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1996). O córtex entorrinal (CE) está interconectado com o hipocampo, amígdala e septo medial por caminhos aferentes e eferentes mono e polisinápticos (NIEUWENHUYNS, 1985; WITTER *et al.*, 1989) e participa tanto da memória espacial, quanto do aprendizado da esQUIVA inibitória (IZQUIERDO, 1993; ZOLA-MORGAN *et al.*, 1989).

Pacientes com doença cerebrovascular ocasionalmente exibem distúrbios cognitivos, como amnésia e desorientação topográfica (CAPLAN *et al.*, 1985; CAPLAN *et al.*, 1990). Vários autores têm detectado distúrbios na aquisição da memória após oclusão da artéria cerebral média em animais usando testes como esQUIVA passiva e labirintos.

Os neurônios colinérgicos e suas projeções estão amplamente distribuídos no SNC regulando importantes funções como memória e aprendizado, movimento e controle do fluxo sanguíneo cerebral. A atividade da acetilcolinesterase plasmática está diminuída 2 meses após indução de isquemia cerebral global transitória em ratos e a atividade da AChE está aumentada em quase 76% no hipocampo desses animais (XIAO *et al.*, 2012). Na clínica também já foi observado que pacientes com demência vascular apresentam diminuição da atividade da acetilcolinesterase plasmática, mostrando que a lesão isquêmica leva a alterações no sistema colinérgico que contribuem para o déficit de memória induzido por AVCi. O envolvimento

cerebrovascular moderado ou severo no sistema colinérgico foi identificado em quase dois terços de pacientes com demência vascular (ROMAN'N, KALARIA, 2006).

1.6. Plantas medicinais e neuroproteção

Fortes evidências sugerem que uma dieta rica em alimentos fitoquímicos, principalmente em polifenóis, é capaz de reverter déficits na função cognitiva relacionados a idade, além de prevenir o aparecimento de doenças neurodegenerativas. As plantas medicinais tradicionais utilizadas através da sabedoria popular são fontes em potencial para a procura e desenvolvimento de novas terapêuticas ou suplementos alimentares capazes de reduzir o ataque isquêmico transitório e o AVC isquêmico (CHUN, 2008; RENDEIRO, 2011).

É conhecido indicado que os flavonóides e seus metabólitos são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (KALT *et al.*, 2008; ANDRES-LACUEVA *et al.*, 2005) e podem exercer ações neurofarmacológicas a nível molecular, influenciando vias de sinalização e expressão gênica. (WILLIAMS *et al.*, 2004; SPENCER, 2008). Já foi demonstrado, por exemplo, os efeitos benéficos do chá verde, mirtilo e *Gingko Biloba* na memória espacial estão relacionados com o aumento do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo (WILLIAMS *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2009; HOU *et al.*, 2010). A conversão da memória de curto prazo na memória de longo prazo é regulada a nível molecular nos neurônios (IGAZ *et al.*, 2004; IZQUIERDO, 1997) e envolve a síntese de novas proteínas que controlam a morfologia neuronal e conectividade (MCGAUGH, 2000). Um número cada vez maior de evidências indica que o BDNF desempenha um papel fundamental na regulação da função sináptica durante a formação tanto da memória de curto prazo como da de longo prazo [BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007; POO, 2001]. Ocorre uma diminuição dos níveis de BDNF no hipocampo ocorrem durante o envelhecimento [HWANG *et al.*, 2006; HATTIANGADY, 2005) e isto tem um impacto negativo sobre o desempenho da memória [SCHAAF *et al.*, 2001]. Entretanto, uma dieta rica em flavonóides e exercício físico têm mostrado aumento da expressão de BDNF no hipocampo (BERCHTOLD *et al.*, 2010; RENDEIRO *et al.*, 2012).

Compostos fenólicos ou polifenóis são um dos grupos de metabólitos secundários de plantas mais amplamente distribuídos e numerosos no reino vegetal.

Seu grupo de moléculas é constituído por moléculas simples, como ácidos fenólicos e flavonoides, e por estruturas mais complexas como ligninas, melaninas e taninos (SOOBRAATTEE, 2005). Têm sido largamente estudados em doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer, a Doença de Parkinson e AVC devido às suas propriedades antioxidantes e antiinflamatórias bem descritas na literatura. O resveratrol e a curcumina são exemplos de compostos derivados de plantas medicinais com atividade neuroprotetora na isquemia cerebral (KIZILTEPE *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2005; SIMONYI *et al.*, 2005; SOUZA, 2012).

1.6.1. Ácido Cafeico

A presença dos compostos fenólicos em plantas tem sido muito estudada por apresentarem atividades farmacológica e também por inibirem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos. (NAGEM *et al.*, 1992; GAMACHE *et al.*, 1993; IVANOVA *et al.*, 1997; AZIZ *et al.*, 1998; FERNANDES *et al.*, 1998; HOLLMAN & KATAN, 1998).

Os ácidos fenólicos são algumas das substâncias que constituem o grupo dos compostos fenólicos. Caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes tanto para os alimentos como para o organismo, sendo, por isso, indicados para o tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e outras doenças (KERRY & ABBEY, 1997; BRAVO, 1998; CROFT, 1998; FERGUSSON & HARRIS, 1999).

Antioxidantes fenólicos funcionam como seqüestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais (SHAHIDI *et al.*, 1992), agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (NAWAR, 1985). Os compostos fenólicos e alguns de seus derivados são, portanto, eficazes para prevenir a oxidação lipídica. (SHAHIDI *et al.*, 1992).

O ácido cafeico (3,4-di-hidroxi-cinâmico) é um fenilpropanoide derivado do ácido cinâmico amplamente distribuído nos tecidos vegetais (NARDINI *et al.*, 1998), e é um dos dos compostos fenólicos naturais encontrado mais encontrados em

produtos vegetais, como em legumes, frutas, café e chá (CZOK, 1977; SONDHEIMER, 1958) porque possui um papel fundamental na biossíntese da lignina, um dos principais componentes da biomassa vegetal (BOERJAN et al., 2003).

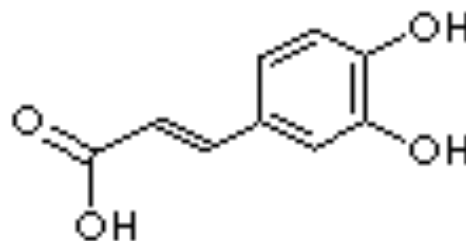


Figura 05 – Estrutura química do ácido cafeico.

Apesar do ácido cafeico ser um composto fenólico abundante no café, ele não é quimicamente relacionado com a cafeína (HIGDON e FREI, 2006; OMAR et al., 2012). É bem conhecido que o ácido cafeico apresenta um grande espectro de atividades farmacológicas, incluindo propriedades antiinflamatórias, anti-oxidante, imunomodulatórias anti-trombose, anti-hipertensivo, anti-fibrose, antiviral, anti-tumorais. (CHALLIS e BARTLETT, 1995; CHAN e HO, 1997; MUNEEB *et al.*, 2011; ROOS *et al.*, 2011; SCAPAGNINI *et al.*, 2011).

O ácido cafeico também mostrou efeitos antiinflamatórios e protetores contra dano oxidativo no fígado induzido por Ni (MICHALUART *et al.*, 1999; PARI, 2008). Estudos realizados com ensaios enibitórios da enzima COX demonstraram que o alguns derivados do ácido cafeico inibiram as enzimas clíco-oxigenases COX-1 e COX-2 (JAYAPRAKASAM *et al.*, 2006)

Alguns estudos da atividade do ácido cafeico no SNC mostraram que este composto foi capaz de reduzir a duração da imobilidade e do *freezing* induzidos pelo nado forçado e estresse condicionado ao medo em camundongo, sugerindo que o ácido cafeico pode ainda apresentar um efeito antidepressivo ou ansiolítico (TAKEDA *et al.*, 2002a&b). Estudos neuroquímicos mostraram que o ácido cafeico não afetou captação de monoaminas tampouco a atividade das monoaminas oxidase (TAKEDA et al., 2002).

Estudos farmacológicos mostraram também que o ácido cafeico exerce um efeito protetor contra danos cerebrais induzidos por peróxido de hidrogênio (PEREIRA *et al.*, 2006), isquemia (ZHOU *et al.*, 2006) e também protege o cérebro,

assim como mudanças bioquímicas e comportamentais causadas por alumínio (YANG e ZHO, 2008). Apesar de muitos desses efeitos estarem parcialmente relacionados com a inibição da 5-lipoxigenase, os mecanismos envolvidos nas atividades protetoras do ácido cafeico ainda não foram completamente elucidados (ANWAR *et al.*, 2012).

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

O AVC é a principal causa de incapacidade neurológica dependente de cuidados de reabilitação nos países em desenvolvimento e estudos dos fenômenos ligados aos mecanismos de isquemia e hipóxia visam à melhoria da qualidade de vida desses pacientes.

O estudo dos mecanismos e de estratégias terapêuticas envolvidos no AVC é importante principalmente pelo impacto socio-econômico que pode causar ao afetar a população economicamente ativa (ZETOLA *et al.*, 2001). E apesar dos esforços das autoridades no controle da pressão arterial, combate ao tabagismo e controle dos níveis de colesterol e da diabetes, o Brasil ainda possui altas taxas de mortalidade devido ao AVC (GARRITANO *et al.*, 2012).

Cerca de 15 a 30% dos pacientes que apresentam AVCi têm história prévia de ataque isquêmico transitório, muitas vezes em um curto intervalo de tempo (MASSARO, 2006). Assim se faz necessária a existência de drogas que possam atuar na neuroproteção de pacientes de risco.

Visto que a fisiopatologia da isquemia cerebral é complexa e envolve múltiplas vias, iônicas, enzimáticas e genéticas, que variam em função da profundidade e duração da isquemia (LIPTON, 1999; SMITH, 2004; HOSSMANN, 2009) torna-se mais difícil de estabelecer uma única terapia capaz de atuar em um conjunto tão variável de fatores responsáveis.

Apesar de muitos estudos buscarem drogas neuroprotetoras para a isquemia cerebral (AHMED, NASMAN, WAHLGREN, 2000; HALEY, 1998), poucos se mostraram realmente efetivos (TAZAKI, SAKAI, OTOMO, 1988). O presente estudo visa investigar uma nova substância que possa vir a ser uma estratégia terapêutica no tratamento do AVC.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Estudar o efeito neuroprotetor do ácido cafeico sobre o dano neuronal, comportamento e memória de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal e possível mecanismo de ação.

3.2. Objetivos Específicos

- Produzir dano neuronal, déficits de memória e alterações comportamentais usando modelo de isquemia cerebral focal permanente por oclusão da artéria cerebral média em camundongos.
- Observar se há proteção contra o dano neuronal, déficits de memória e alterações comportamentais nos animais isquemiados, pelo tratamento com ácido cafeico.
- Avaliar o efeito *ex vivo* do ácido cafeico sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase em córtex temporal de camundongos saudáveis.
- Avaliar o efeito do ácido cafeico sobre a sinapses através da quantificação de sinaptofisina no córtex de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente por oclusão da artéria cerebral média.
- Avaliar a ação do ácido cafeico na morte celular por apoptose através da quantificação de caspase3 no córtex de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente por oclusão da artéria cerebral média.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos albinos adultos *Swiss*, machos, pesando entre 30 e 35g, provenientes do biotério central do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC) e transferidos para o biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, UFC. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas apropriadas, forradas com raspa 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 aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC sob o número de registro 76/2010.

4.2. Drogas

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

4.3. Protocolo experimental

Foram utilizados cerca de 200 animais divididos entre os grupos falso-operados tratados com veículo ou ácido cafeico (AC) na dose de 60 mg/kg, isquemiados tratados com veículo e isquemiados tratados com AC nas doses de 2, 20 e 60 mg/kg intraperitoneal.

O veículo utilizado para a diluição da droga foi o DMSO a 20%. O ácido cafeico foi pesado, diluído em DMSO e o restante do volume foi completado com solução salina.

Todos os animais foram tratados com ácido cafeico ou com o veículo 30 minutos antes da eletrocauterização da artéria cerebral média e 1 hora depois. Os animais receberam duas doses diárias de 1, 10 e 30 mg/kg, totalizando 2, 20 e 60 mg/kg/dia e o tempo do tratamento durou de acordo com o protocolo experimental; os

animais do Grupo 1 foram tratados somente no dia da cirurgia, os animais do grupo 2 foram tratados durante 4 dias e os animais do grupo 3, durante 5 dias. (Tabela 01).

Para a realização dos testes comportamentais foram seguidos três protocolos experimentais. Protocolo 1: 24 horas após a cirurgia foi realizada a avaliação neurológica e em seguida os animais foram eutanasiados e tiveram os cérebros dissecados para a análise da área do infarto isquêmico pelo método do TTC (n=6/grupo). Protocolo 2: 72 horas após a cirurgia foram realizados os testes de campo aberto, labirinto em Y e esquiva passiva (memória recente) e 96 horas após o teste da esquiva passiva (memória tardia) (n=10/grupo). Protocolo 3: 48 horas após a cirurgia foi realizado o primeiro treino da labirinto aquático, 72 horas após foi realizado o segundo treino da labirinto aquático e 120 após foi realizada a retenção do labirinto aquático. Ao final do protocolo 3 os animais foram eutanasiados, tiveram os cérebros dissecados e preparados para o western-blot (figura 06). Os animais utilizados no ensaio da AChE eram todos *naïve*, não passaram por nenhum protocolo experimental ou tratamento, uma vez que este é um ensaio *ex vivo*.

Tabela 01 – Grupos de tratamento.

Grupo	Tratamento
FO	Animais falso operados e tratados com veículo (salina) i. p.
FO + AC 60	Animais falso operados e tratados com AC na dose de 60 mg/kg i. p.
ICFp	Animais submetidos a ICFp tratados com veículo i.p.
ICFp + AC 2	Animais submetidos a ICFp tratados com 2 mg/kg de AC i. p.
ICFp + AC 20	Animais submetidos a ICFp tratados com 20 mg/kg de AC i. p.
ICFp + AC 60	Animais submetidos a ICFp tratados com 60 mg/kg de AC i. p.

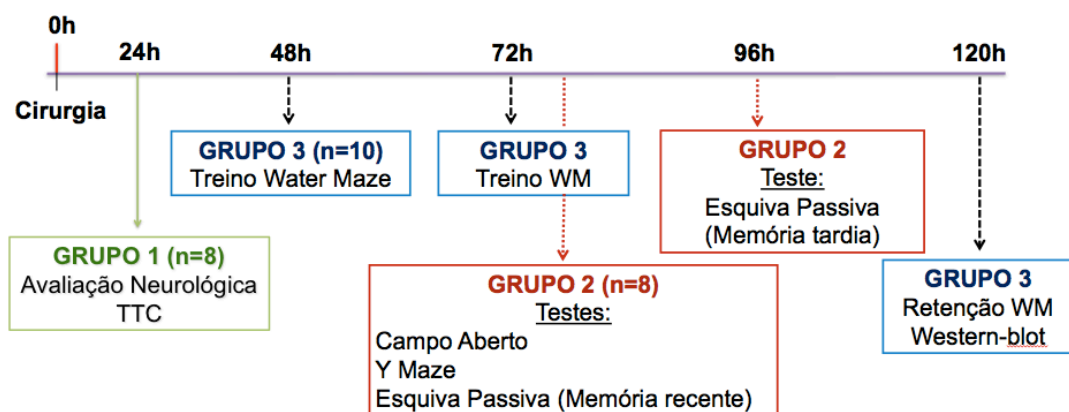


Figura 06 – Protocolo experimental.

4.4. Isquemia cerebral focal por oclusão da artéria cerebral média (ACM) (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 com o auxílio de uma lâmpada.

Inicialmente foi realizada uma incisão na linha entre o olho esquerdo e a orelha, o músculo temporal foi rebatido e, posteriormente, realizada uma craniectomia com uma broca de 1 (mm), seguido da exposição e cauterização da artéria cerebral média. Em seguida a incisão foi suturada com fio de seda agulhado 4.0, e os animais foram colocados em gaiolas para recuperação da cirurgia com livre acesso a água e comida. Os animais falso-operados (FO) foram submetidos aos procedimentos descritos para isquemia, exceto a cauterização da artéria cerebral média (Figura 07).

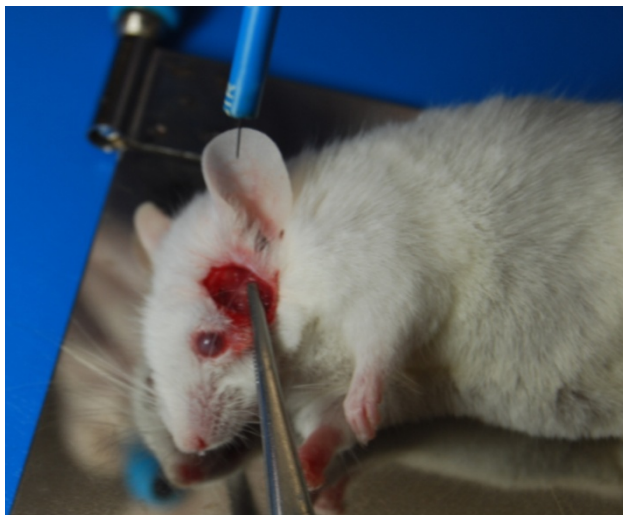


Figura 07 - Cirurgia de isquemia cerebral focal em um camundongo: momento da aproximação do bisturi elétrico para coagulação da artéria cerebral média. (Arquivo pessoal).

4.5. Avaliação do infarto isquêmico - Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol (TTC) (Bederson, *et al.*, 1986)

A coloração com o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazol (TTC) foi descrita primeiramente por Jestaedt e Sandritter (1959) para quantificação da área de infarto do miocárdio. E neste trabalho foi utilizada para identificar e quantificar as regiões de infarto decorrentes da isquemia cerebral focal. O TTC é um sal que recebe um próton da succinato desidrogenase na membrana interna da mitocôndria, o que o reduz para

uma forma insolúvel, o formazam, com coloração avermelhada que se deposita nas células viáveis. As células da região de infarto não possuem mitocôndrias viáveis, não havendo a formação da coloração vermelha e, portanto, apresentando-se como uma região pálida.

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

4.6. Avaliação Neurológica (Garcia *et al.*, 1995)

Para a avaliação sensório-motora foi realizada a avaliação neurológica 24 h após da isquemia. Os achados neurológicos são pontuados utilizando uma escala previamente descrita por Garcia e colaboradores (1995) (Tabela 2).

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

Testes	Escores			
	0	1	2	3
Atividade Espontânea	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
Simetria do movimento das quatro patas	Lado esquerdo: sem movimento	Lado esquerdo: raros movimentos	Lado esquerdo: movimentos lentos	Ambos os lados: movem simetricamente
Estiramento das patas dianteiras	Lado esquerdo: sem movimento	Lado esquerdo: raros movimentos	Lado esquerdo: movimentos lentos	Ambos os lados: movem simetricamente
Escalada/ Prensão	...	Animal falhou em escalar e exibiu movimentos circulares	Lado esquerdo com dificuldade de subir e agarrar a grade	Animal escalou normalmente e agarra a grade
Propiocepção Corpórea	...	Lado esquerdo: sem resposta	Lado esquerdo < Lado direito	Resposta Simétrica
Resposta ao toque da Vibrissa	...	Lado esquerdo: sem resposta	Lado esquerdo < Lado direito	Resposta Simétrica

Tabela 02 – Escala utilizada para a avaliação neurológica. (Adaptado de Garcia *et al.*, 1995.)

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

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 08). No teste o animal foi colocado na arena e deixado para explorar o ambiente por 5 minutos, durante este período foi registrado o número de quadrantes atravessados pelo animal (número de cruzamentos), número de vezes que o animal se levantou para explorar o ambiente, mantendo-se suspenso apenas pelas patas traseiras, caracterizando o comportamento exploratório do tipo *rearing*, e número de vezes que o animal realizou o comportamento de limpeza prolongada da pelagem (auto-limpeza), caracterizando o comportamento de *grooming*. A arena foi limpa com álcool a 20% após cada animal ser retirado, para evitar interferência do cheiro de urina e fezes no teste.

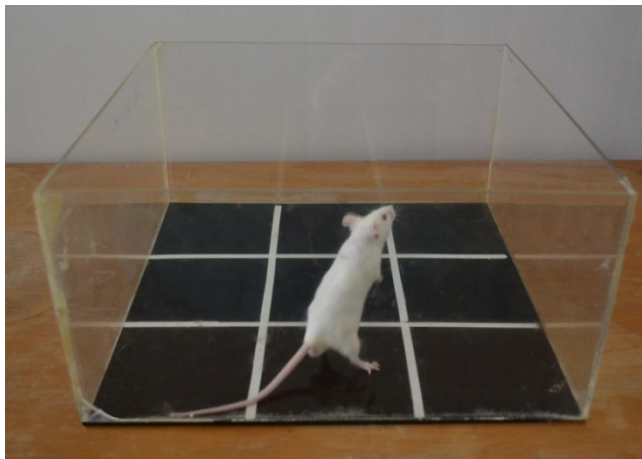


Figura 08 – Arena do Campo Aberto (Arquivo pessoal)

4.8. 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 09).



Figura 09 - Labirinto em Y. (Arquivo pessoal)

Para a avaliação da memória os braços foram numerados. O animal foi colocado no aparelho, no braço 1, 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:

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

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

Nesta versão do labirinto aquático os roedores aprendem a nadar a 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 (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 10). O animal teve 60s para achar a plataforma e lá permaneceu por 10s. Este treino foi realizado quatro vezes por dia com intervalos de 30s entre os treinos, durante dois dias 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 permanece 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 10 - Labirinto aquático. (Arquivo pessoal.)

4.10. Avaliação da memória aversiva – Teste da Esquiva Passiva (Gold, 1986)

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

O aparelho consiste de uma caixa de acrílico (48 x 22 x 22), com o piso constituído por uma plataforma e uma grade eletrificada (Figura 11). O animal foi colocado na plataforma e deixado para ambientação no aparelho durante um 1 minuto, e depois retirado. Após 30 segundos, o animal foi colocado novamente na plataforma. O animal ao descer da plataforma recebeu um choque de 0,5 mA, durante 1 segundo, com o tempo de latência para entrar sendo registrado, até um máximo de 5 minutos (treino). Retirou-se o animal e após 15 minutos este foi colocado novamente na plataforma e registrou-se a latência de descida (avaliação da memória recente). A retenção do aprendizado (avaliação da memória tardia) foi testada após 24 h, quando o animal foi colocado na plataforma e o tempo de latência para a descida da plataforma foi registrada, nessa etapa o animal não recebeu o choque.



Figura 11 - Aparelho de Esquiva Passiva. (Insight LTDA.)

4.11. Determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE)

A atividade acetilcolinesterásica foi determinada segundo Ellman e colaboradores (1961), tendo como princípio a medida da velocidade de produção de tiocolina, à proporção que a acetiltiocolina (ATC), utilizada como substrato, é hidrolisada pela acetilcolinesterase, de acordo com a reação representada na Figura 12.

A atividade enzimática é medida através da leitura da variação da absorbância no comprimento de onda de 412 nm, por minuto, durante 4 minutos,

sendo a reação linear durante pelo menos 10 minutos. A atividade específica foi expressa em nanomoles de ATC hidrolisados por miligrama de tecido por minuto (nmoles/mg de tecido/min).

O córtex cerebral foi homogeneizado em tampão fosfato 10%, centrifugado na velocidade de 1500 rpm durante 5 minutos. Foi retirada uma alíquota de 10 µl do sobrenadante e adicionado a uma cubeta contendo 495 µL de água destilada e 890 µl de tampão fosfato. Depois adicionado 15 µl de AC nas concentrações de 25, 10, 1, 0,1 e 0,01 mg/ml. Após 30 min, foram adicionados 50 µl de ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB) 0,01M. Esta solução foi utilizada como branco da reação.

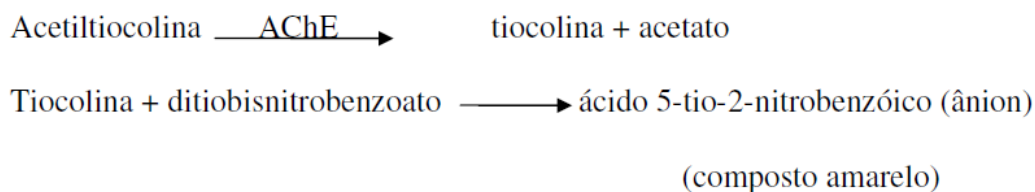


Figura 12 – Reação de hidrólise da ATC pela AChE

Então foi acrescentado a cubeta 50µL de iodeto de acetiotiocolina (ATC) e as absorbâncias foram registradas a cada 1 min. A atividade da enzima foi calculada como modificações na absorbância do minuto 0 para o minuto 4, de acordo com a fórmula descrita na Figura 13.

$$\frac{\Delta \text{abs}/4}{0,0136} \times 1,5$$

Figura 13 – Cálculo da atividade da acetilcolinesterase

4.12. Avaliação da expressão de sinaptofisina, caspase 3 e SNAP25 através da técnica de Western-blot

As amostras do tecido do córtex para a quantificação protéica de sinaptofisina, caspase 3 e SNAP25 foram homogeneizadas separadamente em *potter* com 5 mL de tampão de sacarose 32 mM, EDTA 1 mM, Hepes 10 mM e BSA 1 mg/mL. As amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 3.000xg durante 10 min a 4°C, para remoção de debris. O sobrenadante foi submetido a uma nova centrifugação a 25.000xg durante 60 min a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspensão em 100µL de uma solução de SDS a 5%. A

quantidade de proteína total presente na amostra foi determinada usando o método de Lowry, e a albumina sérica bovina utilizada como padrão.

As amostras foram desnaturadas por adição de um tampão contendo – Tris 125 mM, glicerol 20%, DTT 100 mM, SDS 4%, e de Azul de Bromofenol 0,02% - seguida de aquecimento a 90°C durante 5 min. Quantidades iguais de proteínas totais (25 µg) foram aplicadas em cada poço de gel de poliacrilamida-SDS 12,5 %, utilizando-se o sistema *Mini Protean®3Cell* (Bio-Rad, EUA). Adicionou-se tampão de corrida (Tris 25 mM; Glicina 192 mM e SDS 0,1%) e em seguida iniciou-se a corrida em condições constantes de voltagem (120 V) e variável de miliamperagem (80 mA) por 1 hora e 45 min. Após a separação protéica deu-se início a transferência (por 3 horas, 100 V, 395 mA) para a membrana de difluoreto de polivinildieno (PVDF-Bio-Rad), previamente ativada por imersão em metanol durante 5 seg, seguida de uma imersão de 5 min em água, e finalmente em tampão de eletrotransferência (Tris 25mM; Glicina 192mM e Metanol 20%) durante 5 min.

A transferência foi verificada corando-se as membranas com solução de Ponceau S,. Logo em seguida as membranas foram lavadas (descoradas) com água destilada e bloqueadas com leite desnatado a 5% em TBS-T por uma hora sob agitação à temperatura ambiente. Em seguida as membranas foram incubadas por um período de 1 hora em TBS-T contendo os seguintes anticorpos: camundongo anti- α tubulina (1:4000; Sigma), coelho anti-sinaptofisina (1:2000; Santa Cruz Biotechnology), coelho anti-caspase 3 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Cruz, CA) e camundongo anti-SNAP 25 (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Cruz, CA).

A seguir, as membranas foram lavadas com TBS-T (3 lavagens) e incubadas com os anticorpos secundários marcados com peroxidase: anti-IgG de rato (1:2000; Millipore) e anti- IgG de coelho (1:3300; Bio-Rad) por 1 hora.

Após a incubação por 1 h, a membrana foi novamente lavada com TBS-T (3 lavagens) e a reação de desenvolvimento da cor se processou com a mistura de 5mg do cromógeno DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride -Sigma) em 15 mL de TBS-T e 50 µL de peróxido de hidrogênio por 5 min. Para interrupção da reação de degradação enzimática, a membrana foi lavada com água deionizada e posteriormente secada em temperatura ambiente e, no final, guardada ao abrigo da luz.

Para a análise densitométrica, as bandas foram quantificadas por análise computadorizada de imagem (com auxílio do *software ImageJ* versão 1.32j de domínio público <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) onde a densidade ótica de cada banda foi detectada. Inicialmente o sistema de análise calcula a média dos valores de densidade ótica para a região delimitada pelo operador. Esta região deve ter uma área suficiente para abrigar todas as bandas (uma de cada vez) visíveis no filme, não devendo ser alterada, quando se passa a analisar outra banda. Foi feita a relação snaptofisina/tubulina, caspase 3/tubulina e SNAP-25/tubulina e o valor final de intensidade relativa foi expresso em porcentagem em relação ao grupo FO + veículo de todos os experimentos realizados.

4.13. Análise estatística

Antes da realização dos testes estatísticos foi realizado o teste de normalidade para todos os dados. Para a análise estatística dos testes comportamentais foram realizados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, sendo os resultados expressos como média \pm erro padrão da média. O teste de Bonferroni foi realizado para análise dentro do grupo na avaliação da memória aversiva e aprendizado da memória espacial. Para avaliação dos escores neurológicos foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e teste de Dunn e os valores expressos em mediana (mínimo e máximo). Para a avaliação da atividade anticolinesterásica utilizou-se os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, sendo os resultados expressos como média \pm erro padrão da média. Para a análise da expressão de sinaptofisina foi realizado ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls. O critério de significância utilizado foi de $p < 0,05$. O programa de computador usado foi Graph Pad Instat® 5.0.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito do ácido cafeico (2, 20, 60mg/kg) sobre o dano isquêmico de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM.

Os animais submetidos à oclusão da artéria cerebral média apresentaram um dano cerebral isquêmico analisado 24 horas após a isquemia em relação aos animais falso-operados (FO: $0.89 \pm 0.18\%$; ICFp: $9.06 \pm 1.2\%$). Os animais tratados com ácido cafeico nas doses de 20 e 60 mg/kg/dia apresentaram dano neuronal isquêmico significativamente menor ($p < 0.05$) que os animais isquemiados (AC 20 mg/kg/dia: $5,25 \pm 0,35\%$; AC 60 mg/kg/dia: $2,45 \pm 0,22\%$) (Figura 14 e 15).

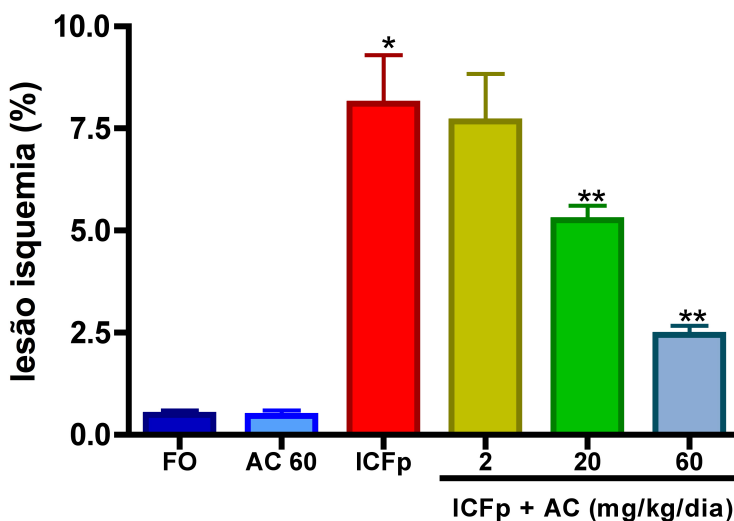


Figura 14. Efeito do ácido cafeico (2, 20 e 60 mg/kg/dia) sobre o dano neuronal isquêmico de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM (n=8/grupo). Os valores representam média \pm EPM. *vs FO, **vs ISQ, $p < 0.05$. Teste de Kruskal-Wallis e teste Mann-Whitney.

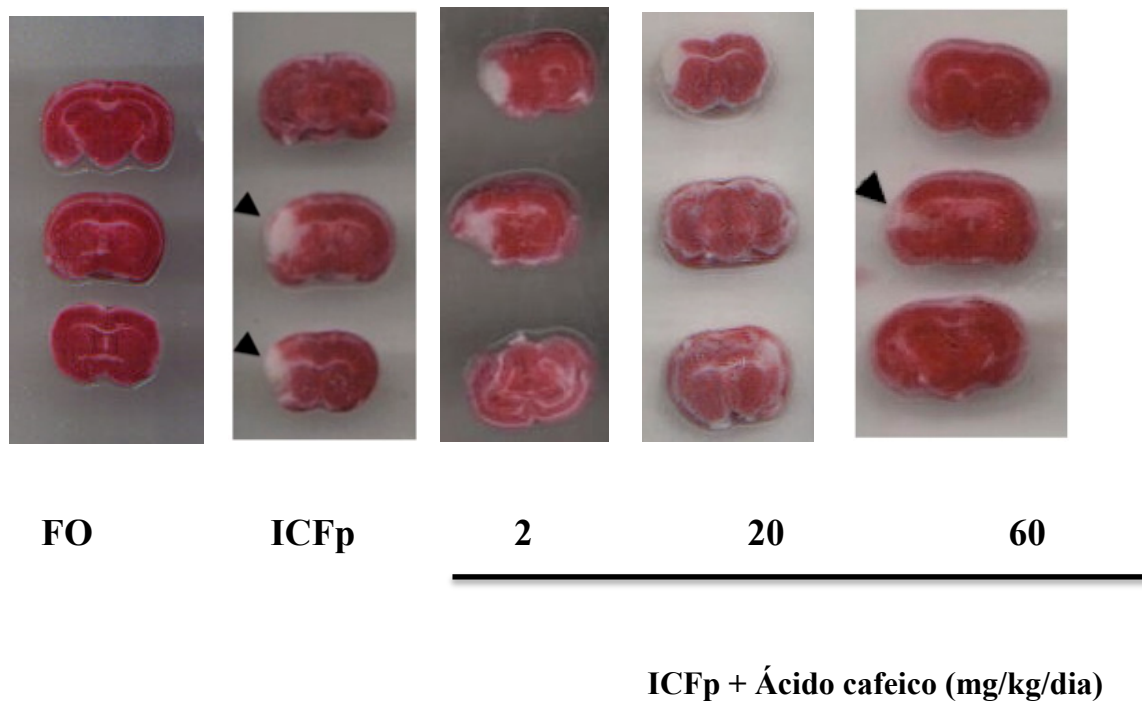


Figura 15. Visualização do dano neuronal isquêmico através da coloração de TTC entre os grupos. As áreas isquêmicas, nas quais as células não são mais viáveis (com enzimas inativas) correspondem às regiões pálidas, sem coloração.

5.2. Efeito do ácido cafeico (2, 20 e 60mg/kg/dia) sobre a avaliação neurológica de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM.

Os animais submetidos à oclusão da artéria cerebral média apresentaram déficits neurológicos significativos 24 horas após a isquemia em relação aos animais falso-operados (FO: 18 (17-18); ICFp: 13,5 (12-16)) (Figura 16), apresentando principalmente diminuição da habilidade motora, mas também diminuição da capacidade de responder a estímulos no lado contralateral à isquemia. Os animais tratados com o ácido cafeico apresentaram uma melhora no déficit neurológico induzido por ICFp (AC 2 mg/kg: 13 (12-17); AC 20 mg/kg: 15 (13-17); AC 60 mg/kg: 16,5 (16-17)).

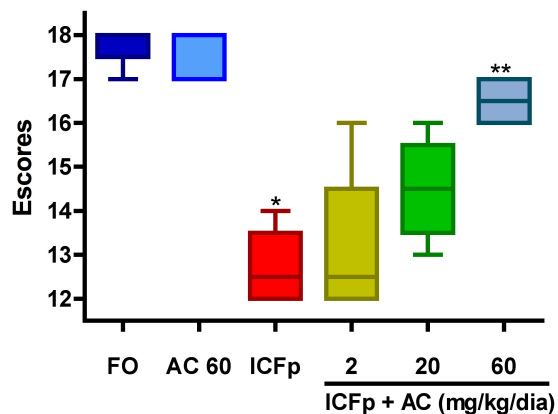


Figura 16. Efeito do ácido cafeico (2, 20, 60 mg/kg) sobre o número de total de escores obtidos na avaliação neurológica de camundongos submetidos à ICFp (n = 8 / grupo). Os valores representam a mediana (mínimo e máximo). * vs FO, $p < 0.05$. Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

5.3. Efeito do ácido cafeico (20 e 60 mg/kg) sobre a atividade locomotora de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM.

Na avaliação da atividade locomotora 72 horas após a isquemia não foram observadas alterações significativas no número de cruzamentos (FO: $78,5 \pm 3,33$; FO + AC 60: $50,17 \pm 4,63$; ICFp: $71 \pm 6,2$; ICF + AC 20: $76,14 \pm 6,49$; ICFp + AC 60: $78,57 \pm 4,42$) (Figura 17). Entretanto, observou-se uma diminuição no número de “rearings” nos animais isquemiados em relação aos falso-operados e os animais tratados com ácido cafeico na dose de 60mg/kg/dia mostraram uma melhora significativa no desempenho dessa atividade. (FO: $19,6 \pm 1,91$; FO + AC 60: $11,71 \pm 1,14$; ICFp: $9,5 \pm 1,86$; ICFp + AC 20: $11,29 \pm 1,65$; ICFp + AC 60: $15,86 \pm 0,50$) (Figura 18).

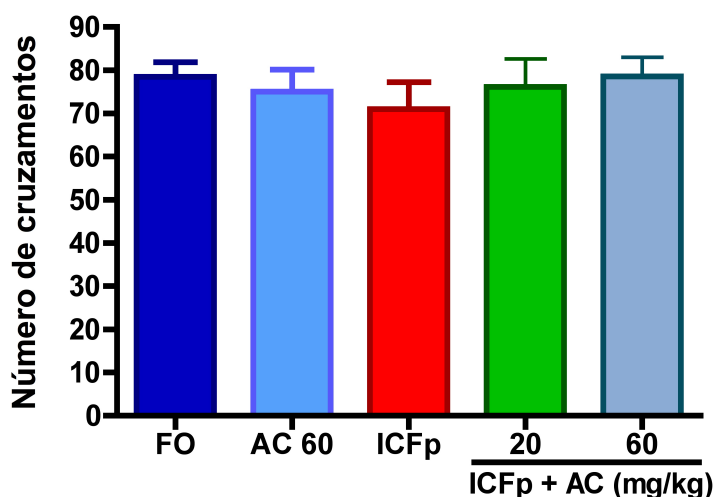


Figura 17. Efeito do ácido cafeico (20 e 60 mg/kg/dia) sobre o número de cruzamentos no teste do campo aberto de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM (n = 8/grupo). Os valores representam a média ± EPM.

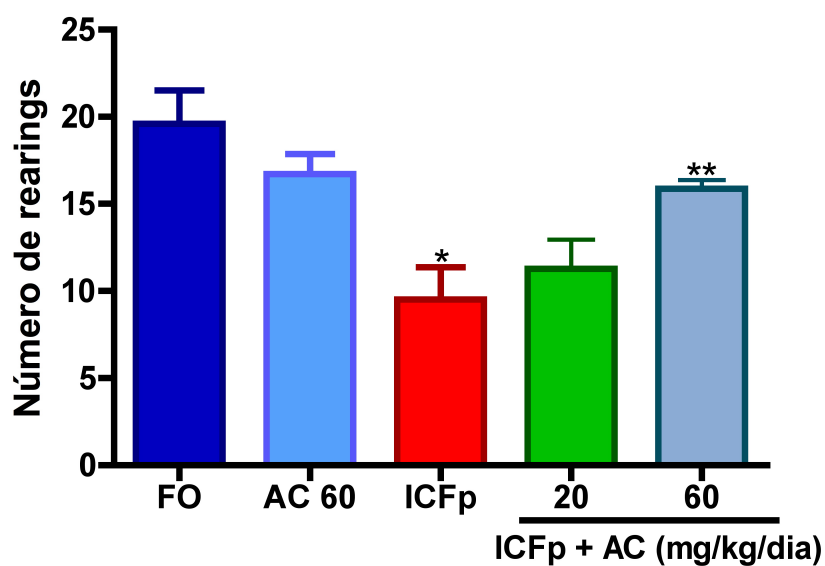


Figura 18. Efeito do ácido cafeico (20 e 60 mg/kg/dia) sobre o número de “rearings” no teste do campo aberto de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM (n = 8/grupo). *vs FO; **vs ICFp, $p > 0,05$. Teste de Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney. Os valores representam a média ± EPM.

5.4. Efeito do ácido cafeico (20 e 60 mg/kg/dia) sobre a memória de trabalho de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM.

Os animais submetidos à isquemia apresentaram déficit na memória de trabalho, avaliada 72 horas após a isquemia, e esse efeito foi prevenido pelo ácido cafeico na dose de 60/mg/kg/dia (FO: $73,8 \pm 1,94\%$; FO + AC60: $74,14 \pm 1,99\%$; ICFp: $56,8 \pm 3,15\%$; ICF + AC 20: $61,57 \pm 2,23\%$; ICFp + AC 60: $70,71 \pm 3,65\%$) (Figura 19).

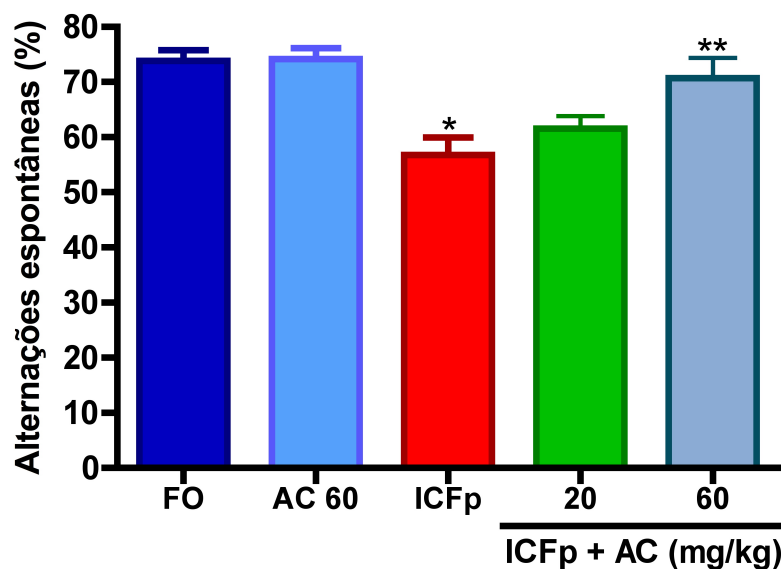


Figura 19. Efeito do ácido cafeico (20 e 60 mg/kg/dia) sobre a memória de trabalho de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM (n = 8/grupo). Os valores representam a média ± EPM. *vs FO, **vs ISQ, $p < 0,05$, testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

5.5. Efeito do ácido cafeico (2, 20 e 60 mg/kg/dia) sobre a memória espacial de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM.

Na avaliação do aprendizado na memória espacial realizado 48 e 72 horas após a isquemia, os animais isquemiados apresentaram maior dificuldade de retenção de memória, ou seja, de aprendizado, nos treinos 6 e 8 em relação aos animais falso-operados (Treino 6: FO: $12,20 \pm 4,73s$; ICFp: $28,89 \pm 7,97s$; Treino 8: FO: $15,9 \pm 5,83s$; ICFp: $38,9 \pm 7,92s$). O ácido cafeico (60 mg/kg) diminuiu o déficit de aprendizado

induzido pela isquemia no treino 8 (ICFp + AC 60: $19,5 \pm 7,42$). Verificou-se que os animais falso-operados iniciam o aprendizado a partir do quinto treino, os animais isquemiados não apresentam aprendizado significativo em nenhum dos treinos e que os animais tratados com ácido cafeico na dose de 60 mg/kg/dia apresentam aprendizado significativo no treino 8 (Figura 20).

Na avaliação da retenção da memória espacial, 120 horas após a isquemia, os animais isquemiados apresentaram déficits significativos nos parâmetros latência para alcançar a plataforma, número de cruzamentos e tempo de permanência no quadrante (Latência: FO: $10,9 \pm 1,98$ s; FO + AC 60: $16,5 \pm 6,27$ s; ICFp: $40,5 \pm 4,55$ s. Número de cruzamentos: FO: $4,3 \pm 0,33$; FO + AC 60: $4,66 \pm 0,55$; ICFp: $1,60 \pm 0,37$. Tempo de permanência no quadrante: FO: $17,40 \pm 2,60$ s; FO + AC 60: $15,33 \pm 1,82$ s; ICFp: $8,90 \pm 1,21$ s).

O tratamento com o ácido cafeico nas doses de 20 e 60 mg/kg/dia preveniu o aumento da latência. Entretanto, o aumento no número de cruzamentos e o tempo de permanência no quadrante só ocorreram nos animais tratados com a dose de 60 mg/kg/dia. (Latência: ICF + AC 2: $38,7 \pm 6,17$ s; ICFp + AC 20: $23,5 \pm 3,51$ s; ICFp + AC 60: $10,10 \pm 1,6$ s. Número de cruzamentos: ICFp + AC 2: $1,70 \pm 0,44$; ICFp + AC 20: $3,60 \pm 0,54$; ICFp + AC 60: $4,40 \pm 0,33$. Tempo de permanência no quadrante: ICFp + AC 2: $11,40 \pm 1,06$ s; ICFp + AC 20: $16,9 \pm 2,65$ s; ICF + AC 60: $13,89 \pm 0,84$ s). (Figuras 21, 22 e 23).

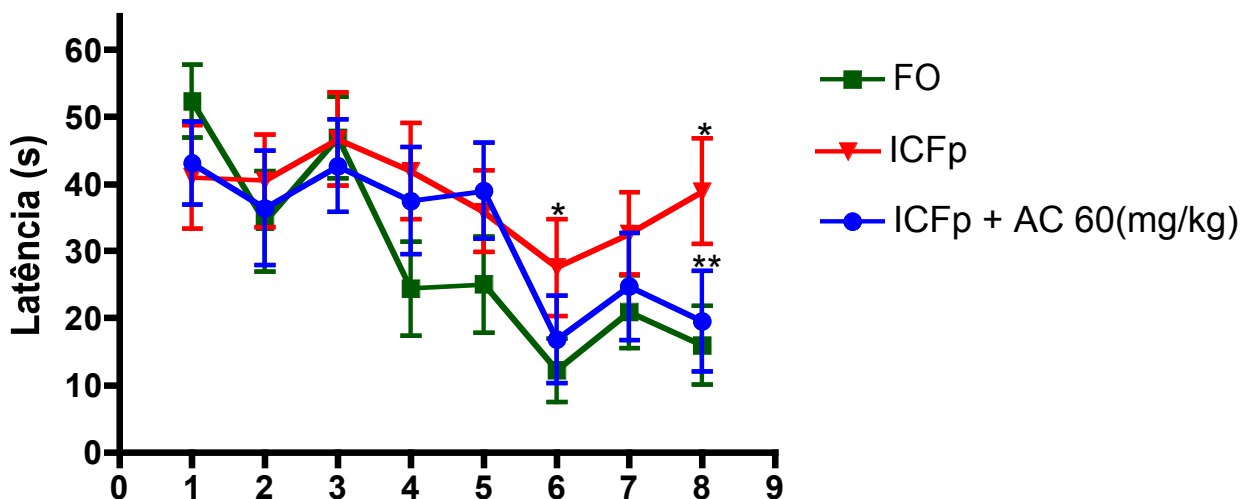


Figura 20. Efeito do ácido cafeico (60 mg/kg/dia) sobre o aprendizado de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM (n = 10/grupo) avaliada através da latência nos treinos para alcançar a plataforma. Os valores representam a média \pm EPM. *vs FO, **vs ICFp, $p < 0,05$, testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, teste de Bonferroni.

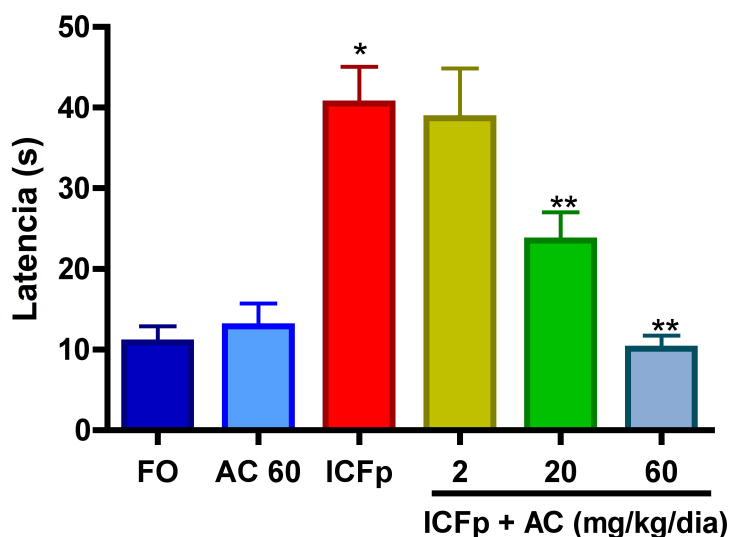


Figura 21. Efeito do ácido cafeico (2, 20 e 60 mg/kg/dia) sobre a memória espacial, avaliada através do parâmetro latência para alcançar a plataforma, de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM (n = 10/grupo). Os valores representam a média \pm EPM. *vs FO, **vs ICFp, $p < 0,05$, testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

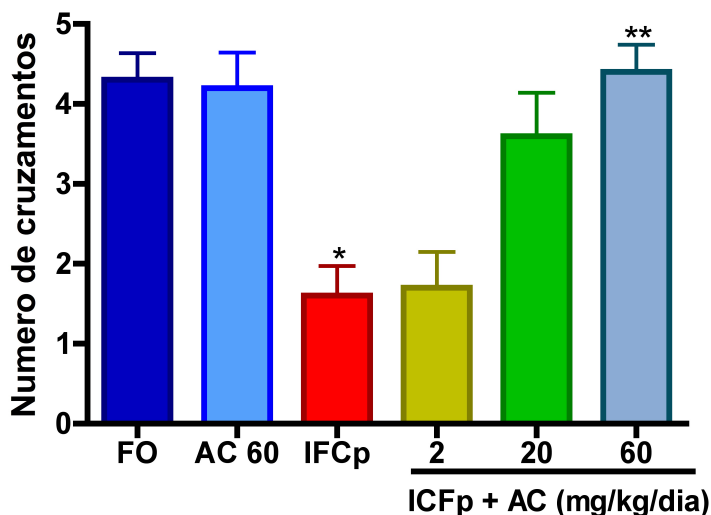


Figura 22. Efeito do ácido cafeico (2, 20 e 60 mg/kg/dia) sobre a memória espacial, avaliada através do parâmetro número de cruzamentos, de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM (n = 10/grupo). Os valores representam a média ± EPM. *vs FO $p < 0,05$, testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

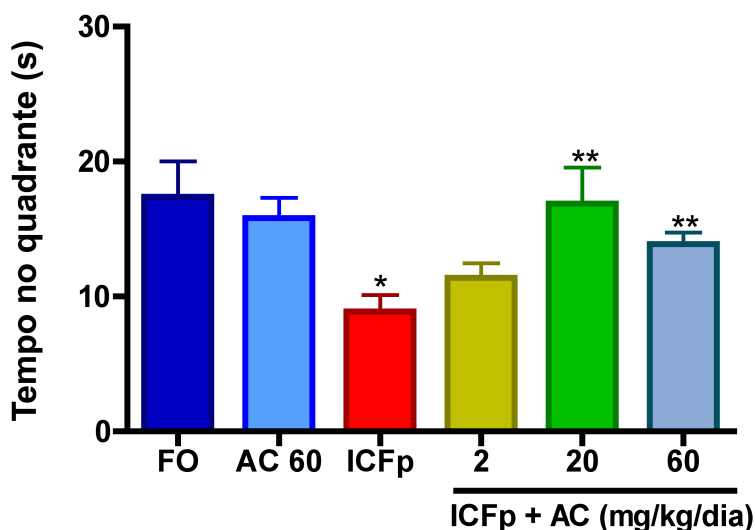


Figura 23. Efeito do ácido cafeico (2, 20 e 60 mg/kg/dia) sobre a memória espacial, avaliada através do parâmetro tempo de permanência no quadrante, de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM (n = 10/grupo). Os valores representam a média ± EPM. *vs FO, **vs ICFp, $p < 0,05$, testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

5.6. Efeito do ácido cafeico (20 e 60mg/kg) sobre a memória aversiva de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM.

Animais submetidos à isquemia apresentaram déficits significativos de memória recente e tardia, respectivamente 72 e 96 horas após a indução da isquemia, quando comparado com o controle (Mem. Recente: FO: $237,5 \pm 29,63s$; FO + AC 60: $284 \pm 8,56s$; ICFp: $97,63 \pm 26,94s$; Mem. Tardia: FO: $235 \pm 33,32s$; FO + AC 60: $264,3 \pm 35,75s$; ICFp: $92,25 \pm 24,87s$). O tratamento com o ácido cafeico não preveniu esse efeito na memória recente (ICFp + AC 20: $144,5 \pm 25,19s$; ICFp + AC 60: $151,9 \pm 16,89s$) mas observou-se proteção na memória tardia: ICFp + AC 20: $156 \pm 37,38s$; ICFp + AC 60: $295,7 \pm 1,83s$). Os animais tratados com o ácido cafeico obtiveram melhora significativa no desempenho na dose de 60 mg/kg na memória tardia. (Figura 24).

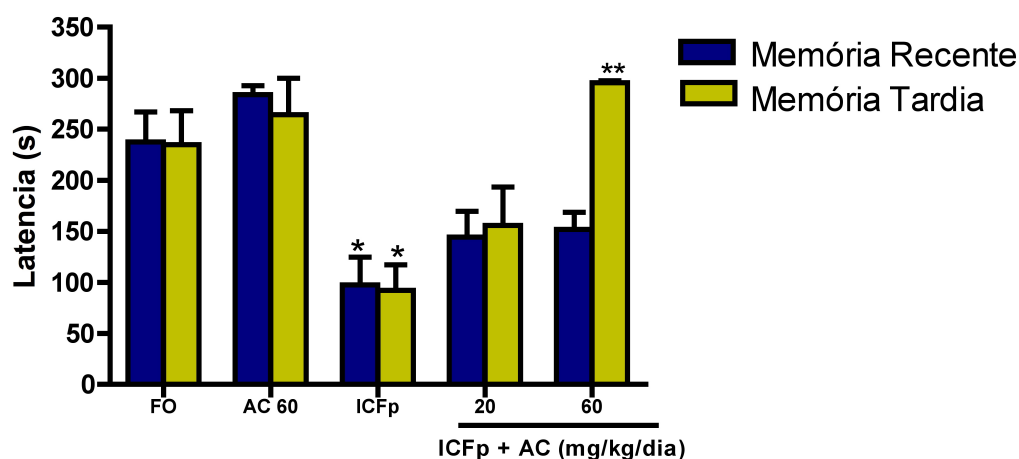


Figura 24. Efeito do ácido cafeico (20 e 60 mg/kg) sobre a memória aversiva recente de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM (n = 8/grupo). Os valores representam a média±EPM. *vs FO, **vs ICFp $p < 0,05$, testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

5.7. Efeito do ácido cafeico (0,1 , 1 e 10 mg/ml) sobre a atividade da acetilcolinesterase no córtex temporal de camundongos.

O ácido cafeico não apresentou efeito significativo sobre a atividade da acetilcolinesterase no córtex cerebral de camundongo em nenhuma das concentrações

testadas. (controle: $1,63 \pm 0,02$ AC 0,1mg/ml: $1,68 \pm 0,02$ AC 1mg/ml: $1,64 \pm 0,03$ AC 10mg/ml: $1,75 \pm 0,04$) (Figura 25).

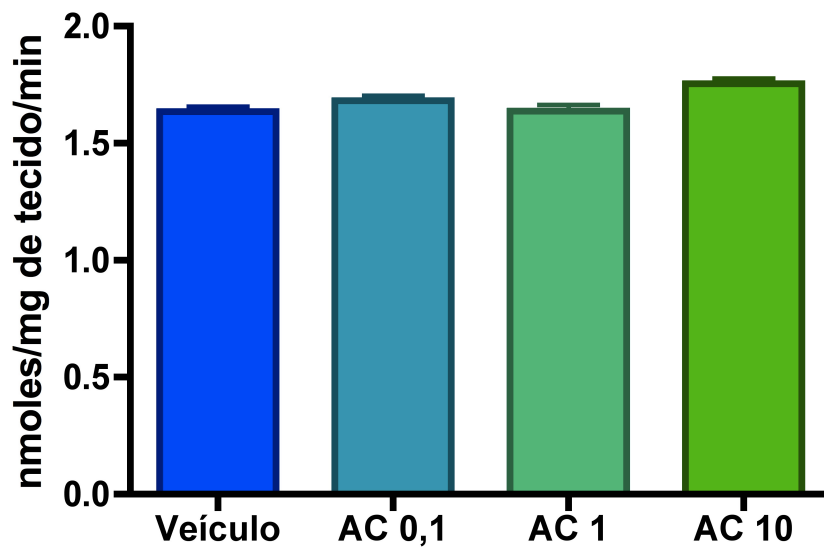


Figura 25. Efeito do ácido cafeico (0,1, 1 e 10 mg/ml) sobre a atividade da acetilcolinesterase no córtex temporal de camundongos. Os valores representam a média \pm EPM. Teste de Kruskal-Wallis, teste de Mann-Whitney.

5.8. Efeito do ácido cafeico (20 mg/kg) sobre a expressão de sinaptofisina, caspase 3 e SNAP 25 no córtex de camundongos submetidos a ICFp através da oclusão da ACM.

Os animais isquemiados apresentaram menor expressão de sinaptofisina no córtex 4 dias após ICFp (figura 26), o tratamento com o ácido cafeico inibiu significativamente a diminuição da sinaptofisina nos animais isquemiados (FO: $124,1 \pm 7,49\%$; ICFp: $87,03 \pm 7,9\%$; ICFp + AC 60: $117,4 \pm 6,65\%$). Observou-se também uma maior expressão da Caspase 3 nos animais isquemiados, tendo esta sido diminuída nos animais tratados com ácido cafeico. (figura 27) (FO: $100,4 \pm 2,31\%$; ICFp: $132,5 \pm 3,89\%$; ICFp + AC 60: $83,79 \pm 1,71\%$) Não foram observadas alterações significativas na expressão da SNAP 25 (figura 28) (FO: $106,7 \pm 8,67\%$; ICFp: $110,3 \pm 7,61\%$; ICFp + AC 60: $107,4 \pm 4,07\%$).

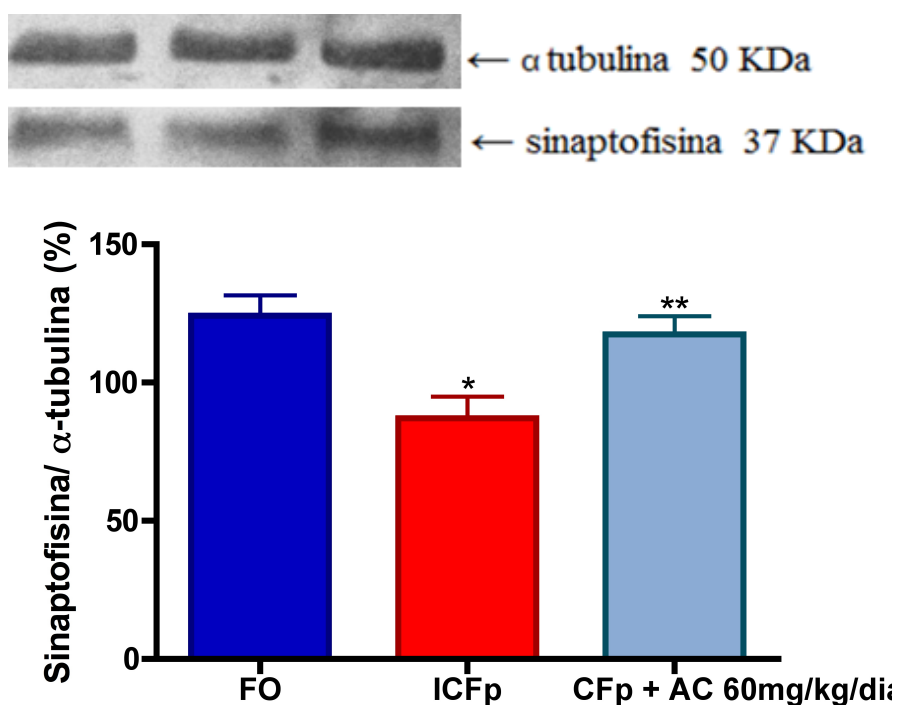


Figura 26. Efeito do ácido cafeico (60mg/kg) sobre a expressão da sinaptofisina no córtex de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM. Os valores representam a média \pm EPM. *vs FO, **vs ICFp, $p < 0,05$. ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls.

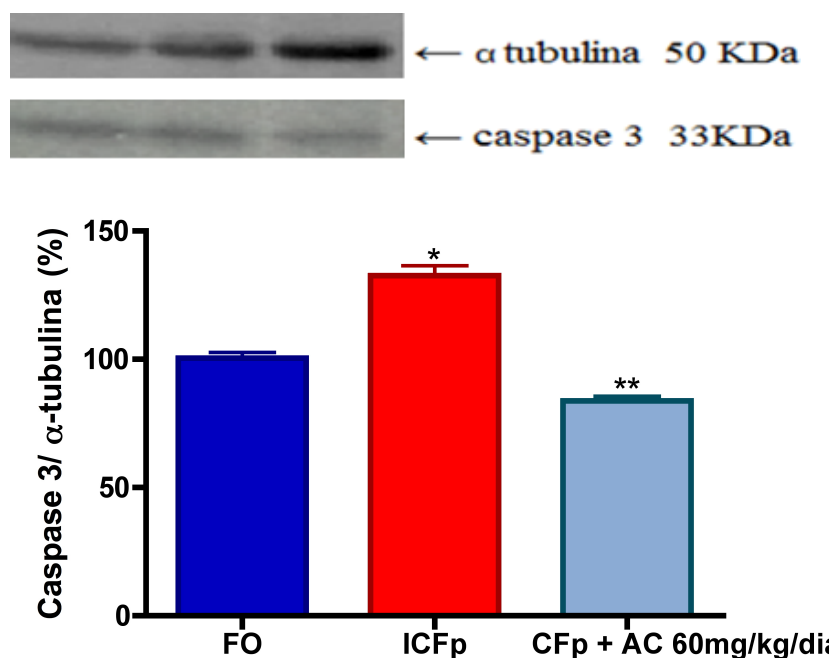


Figura 27. Efeito do ácido cafeico (20mg/kg) sobre a expressão da Caspase 3 no córtex de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM. Os valores representam a média \pm S.E.M. ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls.

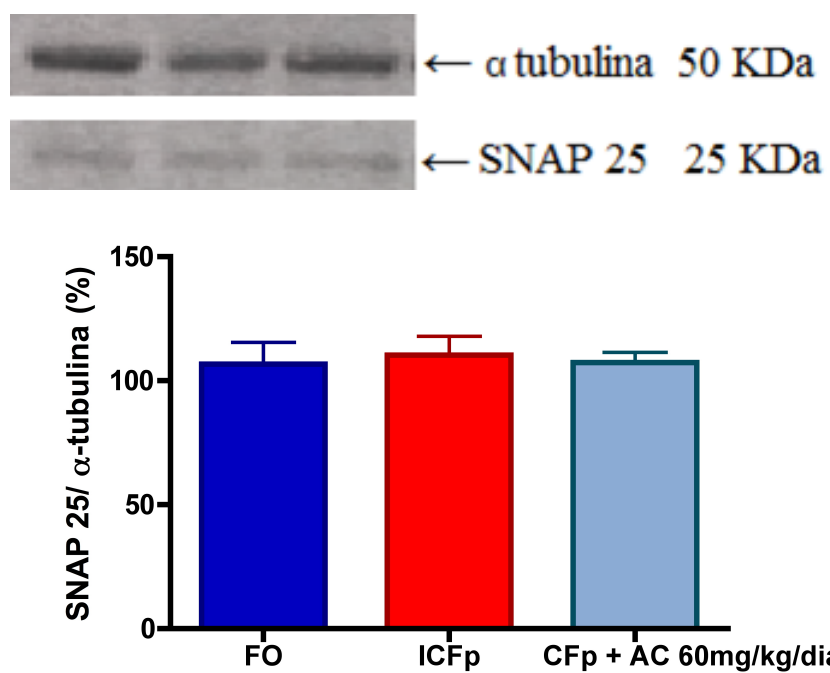


Figura 28. Efeito do ácido cafeico (20mg/kg) sobre a expressão da SNAP 25 no córtex de camundongos submetidos à ICFp por oclusão da ACM. Os valores representam a média \pm S.E.M. ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls.

6. DISCUSSÃO

O AVC afeta cerca de 15 milhões de pessoas no mundo inteiro, sendo a segunda principal causa de morte do mundo e uma das principais causas de incapacidade (GINSBERG, 2008; SHUAIB e HUSSAIN, 2008). Trinta a sessenta por cento de todos os pacientes apresentam algum grau de incapacidade física após o evento agudo (MALMANN, 2012). Só no Brasil, os acidentes vasculares cerebrais foram a causa de 172.298 internações em 2011 e em 2010 causaram a morte de 99.159 indivíduos (GARCIA, 2012). Considerando este cenário, torna-se assim evidente a necessidade de estudos que pesquisem novas terapias capazes de melhorar a qualidade de vida desses pacientes.

A melhora das funções cognitivas por compostos naturais em pacientes com AVC são comprovadas em diversos trabalhos. Um estudo clínico de 13 anos indicou que uma maior ingestão de antioxidantes, incluindo os polifenóis flavonóides e ácidos fenólicos, ajuda a melhorar a memória e tem o potencial para inibir o envelhecimento do cérebro (KESSE-GUYOT *et al.*, 2012). Alguns estudos indicam que o consumo de alimentos ricos em polifenóis de plantas e podem também ser capaz de induzir melhorias na performance cognitiva (LETENNEUR *et al.*, 2007, WILLIAMS e SPENCER, 2012; PITOZZI *et al.*, 2012; BHULLAR e RUPASINGHE, 2013). Os mirtilos, por exemplo, são eficazes para reverter os déficits relacionados com a idade na memória de trabalho espacial. Os efeitos dos mirtilos e amoras aparecem com mais evidência em memória de curto prazo, sugerindo que estas melhorias são, em parte, dependente das conexões excitatórias CA3 no hipocampo (SHUKITT-HALE *et al.*, 2009; GOYARZU *et al.*, 2004; JOSÉ *et al.*, 2003). Apesar de historicamente o efeito neuroprotetor destas substâncias, ser atribuído à sua ação antioxidante, hoje se sabe que a ação antioxidante não é a única responsável pela habilidade de prevenir ou reverter disfunções neuronais e déficits cognitivos. Estudos recentes apontam para diversos outros mecanismos em potencial como ação antiinflamatória, anti-apoptótica, regulação de fatores de transcrição e inibição de proteínas (RENDEIRO *et al.*, 2012).

O envolvimento dos mecanismos citados acima na etiologia e progressão de doenças neurodegenerativas leva a se considerar que compostos fenólicos possuem benefícios à saúde como agentes profiláticos (SOOBRAATTEE *et al.*, 2005).

Muitos estudos já demonstraram os efeitos neuroprotetores do ácido cafeico. Bors mostrou em 2004 que ocorria uma diminuição na área do infarto cerebral após isquemia em animais tratados com o ácido cafeico. A diminuição da morte neuronal pode se dar por várias atuações do ácido cafeico. Alguns estudos provaram que o ácido cafeico é capaz de bloquear a morte neuronal induzida pela diminuição de potássio (AMODIO *et. al.*, 2003; IRMAK *et. al.*, 2003; WEI *et. al.*, 2004). Além disso, foi demonstrado que o ácido cafeico inibe potencialmente e especificamente a peroxidação lipídica (SUD'INA *et. al.*, 1993) e atividades de lipoxigenase (LARANJINHA *et. al.*, 1995). Além disso, também impede a ativação do óxido nítrico (NO) e outros radicais (ALADAG *et. al.*, 2006).

Como Sud'ina afirmou em 1993, o ácido cafeico foi capaz de inibir em uma concentração de 10 μmol a produção de espécies reativas de oxigênio e bloquear o sistema xantina oxidase em neutrófilos humanos *in vitro*. O ácido cafeico também demonstrou atividade antiinflamatória (DE CUNHA *et. al.*, 2004) uma vez que é um inibidor da 5-lipoxigenase, o que pode impedir a biossíntese de leucotrienos pro-inflamatórios (MACCARRONE *et. al.*, 2003).

Como a disfunção do sistema nervoso central e os déficits cognitivos são consequências consistentes da isquemia/hipóxia em humanos e outros mamíferos (HATTORI *et al.*, 2000; MAUD, 2006) e, sendo o principal objetivo das pesquisas experimentais sobre isquemia, a melhora do resultado funcional da recuperação em humanos, o presente trabalho avaliou o efeito do ácido cafeico sobre a extensão da lesão neuronal, disfunções neurológicas, os déficits sensório-motor bem como as alterações na memória dos animais submetidos à isquemia cerebral focal permanente por oclusão da artéria cerebral média. Este é um modelo robusto, está padronizado e os resultados como as alterações histológicas, neuroquímicas, comportamentais já estão comprovados (ASSHAFQA *et al.*, 2011) o que faz com que seja amplamente utilizado para reproduzir eventos que ocorrem no AVC em humanos.

A oclusão da artéria cerebral média primeiramente descrita por Tamura e colaboradores (1981) é um modelo animal amplamente utilizado para mimetizar a isquemia cerebral focal em humanos (NEDEERGARD, 1987). Assim, as consequências patológicas desse modelo têm sido extensivamente estudadas.

É amplamente reconhecido que a área de infarto chega ao seu tamanho máximo, incluindo core e penumbra, de 6 a 24 horas após o início da isquemia focal permanente (GARCIA *et al.*, 1995; CARMICHAEL, 2005; LIU *et al.*, 2011). Sabendo disto, neste trabalho, realizou-se a avaliação neurológica e a análise da área de infarto 24 horas após a isquemia.

Primeiramente avaliou-se as alterações neurológicas através da escala descrita por Garcia e colaboradores (1995) que avalia o dano neuronal 24 h após a isquemia cerebral permanente, e nos dias 2, 3, 4 e 5 que se seguiam a cirurgia, onde observaram que o dano neurológico foi maior 24 h após a isquemia. Esta escala analisa o déficit motor que envolve principalmente os núcleos da base

Na determinação da extensão do dano cerebral foi utilizada a técnica de coloração com TTC, que baseia-se na deposição de um complexo vermelho insolúvel resultante da metabolização do TTC pela mitocôndria. Portanto nas regiões onde há dano mitocondrial não ocorre o depósito de corante nas células, deixando a região pálida, sem coloração vermelha (GOLDLUST, 1996; TUREYEN, 2004). Esta técnica tem ampla utilidade em experimentos com modelos de isquemia e na avaliação do potencial neuroprotetor de drogas para a isquemia cerebral (GOLDLUST *et al.*, 1996). A marcação pelo TTC demonstra as lesões da isquemia que podem ser avaliadas visualmente mesmo sem exame por microscópio. A estabilidade desta técnica permite avaliação do tamanho da lesão com pequena quantidade de preparação de tecido.

O modelo de isquemia focal permanente leva a danos nas células neuronais culminando com a morte neuronal. Entre diversos mecanismos de dano neuronal, está a disfunção da mitocôndria, que ocorre devido à falência do metabolismo de energia e do aumento de Ca^{2+} intracelular (DURUKAN, 2007; STARKOV, 2004).

Os resultados deste trabalho mostraram que os animais isquemiados apresentaram extensa área de infarto isquêmico no córtex e no estriado e déficit neurológico 24 horas após a isquemia, mostrando a relação direta entre o tamanho da área de infarto isquêmico e o déficit neurológico, corroborando com os resultados de outros autores, que também observaram grande extensão da área de infarto e déficits neurológicos nos animais 24 h após a isquemia por oclusão permanente da ACM

(MELANI *et al.*, 2003, 2006). O tratamento com ácido cafeico na dose de 60 mg/kg diminuiu a extensão da área de infarto e o déficit neurológico, evidenciando o efeito neuroprotetor deste composto e corroborando com os resultados de ZHOU (2006) que tratou ratos com 50/mg/kg de ácido cafeico em um modelo de isquemia transitória.

O dano neuronal isquêmico foi analisado através de avaliação neurológica e da extensão da lesão cerebral pela coloração com TTC. A isquemia diminuiu a performance motora e função sensorial dos animais, diminuindo principalmente a capacidade de extensão das patas e de resposta a estímulos do lado contralateral à isquemia. Já é bem estabelecido que a lesão isquêmica resultante da oclusão permanente da artéria cerebral média envolve o córtex e o estriado, principalmente na região dos núcleos caudado e putâmen (DEVRIES, 2011). A disfunção dopaminérgica no estriado e no córtex frontal resulta em alterações motoras e cognitivas (PANDOLFO *et. al.*, 2012). Desta forma, pode-se relacionar os déficits neurológicos observados nos animais após a isquemia com os danos nessas regiões. A área motora do animal, o córtex anterior dorsal, inclui áreas que correspondem às patas dianteiras e traseiras que são quase sempre lesadas pela isquemia (WAHL *et al.*, 1992).

O teste da atividade locomotora é utilizado para avaliar a função mesocorticoestriatal (KALIVAS, DUFFY, DuMARS, SKINNER, 1988). A lesão isquêmica focal apresenta-se principalmente no córtex e corpo estriado, assim o dano cerebral permanente aos neurônios corticoespinhais pode levar a uma redução da função motora (SHENG, 2010). Neste trabalho não foi observado comprometimento significativo da atividade locomotora horizontal dos animais isquemiados, corroborando com outros autores (YONEMORI, 1996; ZHANG, 2013). Pereira e colaboradores (2006) observaram que a administração i.p. de ácido cafeico nas doses de 0,5, 1, 2, 4 e 8mg/kg em ratos não apresentou nenhuma alteração na atividade locomotora no campo aberto. No entanto, em relação aos *rearings*, que mede a atividade exploratória vertical, observou-se uma diminuição deste comportamento nos animais isquemiados e uma proteção contra esta diminuição pelo tratamento com ácido cafeico. Kalonia e colaboradores (2009) demonstraram efeito protetor do ácido cafeico no contra a lesão intraestriatal de ácido quinolínico em ratos, podendo sugerir que a proteção contra a diminuição no número de *rearings* deu-se através da ação do ácido cafeico no estriado.

As alterações na função sensoriomotora, particularmente atividade locomotora, são fatores que comumente podem confundir os resultados nos testes cognitivos (HATTORI *et al.*, 2000). Assim o teste de campo aberto, como a avaliação neurológica, objetivam também analisar se o animal não adquiriu nenhuma disfunção motora grave como consequência da cirurgia o que prejudicaria a realização dos testes de memória. Dessa forma, apesar da diminuição da atividade exploratória vertical do animal devido à isquemia, os animais não apresentaram um déficit motor severo, o que não prejudicou a realização dos testes cognitivos.

O modelo de memória operacional é baseado na tendência dos animais de explorar novos ambientes e neste teste influências como componente emocional ou motivação são minimizadas e ocorre uma dissociação entre aprendizagem e memória visto que não é necessário aprender nenhuma regra (DELLU *et al.*, 1992; 1994). O hipocampo e o córtex pré-frontal estão envolvidos neste tipo de memória. O córtex pré-frontal anatomicamente está conectado ao hipocampo ventral e indiretamente ao hipocampo dorsal através do tálamo (YOO *et al.*, 2008). A exploração de um novo ambiente nos animais depende da integridade de sistemas límbicos e não límbicos como prosencéfalo basal, o hipocampo, o tálamo, o córtex pré-frontal, o corpo estriado dorsal, além do sistema vestibular e cerebelo (LALOND, 2002).

A alternância espontânea é um comportamento utilizado para avaliar a memória operacional de animais colocados em um novo ambiente (OADES *et al.*, 1985). A memória operacional é um aspecto da memória de curta duração e significa um armazenamento temporário de informação utilizado para planejar uma ação futura. Pesquisas sobre a memória operacional indicam o envolvimento de muitas partes diferentes do córtex cerebral, principalmente córtex occipital, parietal e frontal direitos (SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1996).

As alternâncias espontâneas no Labirinto em Y são consideradas ainda a reflexão de uma forma primitiva de memória de trabalho espacial (MALM *et al.*, 2006), visto que o animal tenta utilizar locais específicos da caixa para se localizar é um tipo de memória que pode ser localizada no hipocampo, uma área especialmente vulnerável ao dano isquêmico. O hipocampo é um sítio de ação de influências modulatórias em muitos tipos de memória ou componentes de memória: espacial, verbal e contextual, entre outros (BECHARA *et al.*, 1995; IZQUIERDO; MEDINA, 1995). A exploração de um novo ambiente nos animais depende da integridade de

sistemas límbicos e não límbicos como prosencéfalo basal, o hipocampo, o tálamo, o córtex pré-frontal, o corpo estriado dorsal, o sistema vestibular e cerebelo (LALOND, 2002).

É conhecido que a isquemia cerebral leva a déficits na memória de trabalho (CORBETT & NURSE, 1997). Kim (2011) observou que a isquemia global em gerbils induzia déficits na memória de trabalho avaliada pelo teste do labirinto em Y. Lu (2007) observou déficit na memória de trabalho 24 h após a indução de isquemia cerebral focal transitória. Neste estudo, a memória de trabalho foi avaliada 72 h após a isquemia cerebral através do labirinto em Y e observou-se que os animais isquemiados apresentavam déficits neste tipo de memória e o tratamento com o ácido cafeico na dose de 60 mg/kg protegeu os animais deste efeito. Encontra-se na literatura trabalhos que mostram que compostos fenólicos, como os flavonoides, são capazes de melhorar o desempenho de animais isquemiados no labirinto em Y, como o flavonóide oroxilina A, que pode estar associado com a redução do número de micróglia ativada e aumento da expressão do BDNF através da fosforilação de CREB (KIM *et al*, 2006).

Para avaliar as alterações na memória espacial foi utilizado o teste do labirinto aquático previamente descrito por Morris (1984), que mostrou a necessidade de referências externas à piscina para a formar uma percepção global de localização, dependente principalmente do hipocampo. Porém, além do hipocampo, a memória espacial avaliada no labirinto aquático também depende de outras regiões cerebrais como o corpo estriado, como foi demonstrado por Block, Kunkel, Schwarz (1993), onde a injeção de ácido quinolínico no corpo estriado induziu alterações no desempenho de ratos no labirinto aquático de plataforma submersa (D'HOOGHE, DE DEYNN, 2001).

Neste trabalho mostrou-se que os animais isquemiados apresentaram déficit na memória espacial quando avaliou-se os parâmetros de latência, número de cruzamentos e tempo de permanência no quadrante, corroborando com outros trabalhos (YONEMORI *et al*, 1996). E o tratamento com ácido cafeico na dose de 60mg/kg foi capaz de prevenir esse efeito em todos os parâmetros avaliados, corroborando com estudos disponíveis na literatura. Yang (2009) mostrou que o tratamento com o ácido cafeico (10 e 30mg/kg) foi capaz de melhorar a memória espacial em camundongos com danos cerebrais induzidos pelo alumínio. Kumar

(2012) apresentou em seu trabalho que o ácido cafeico (5 e 10mg/kg) mostrou uma melhora no desempenho no labirinto aquático em ratos com disfunções cognitivas induzidas pelo ácido caínico. Em 2013, Rendeiro e colaboradores observaram que uma dieta rica em flavonoides melhorou a memória espacial e aumentou os níveis de BDNF hipocampal no cérebro de ratos envelhecidos.

A esquiva passiva é uma das formas mais comuns de medir a função cognitiva em modelos experimentais (DEVRIES, 2001). Neste modelo, que lida com a memória emocional envolvida com a memória de alerta, ansiedade ou adversidade associada a um evento, o sistema límbico, do qual fazem parte, o hipocampo, amígdala, septo medial, bulbo olfatório e áreas talâmicas anteriores estão envolvidos (BRIONI, 1993; IZQUIERDO *et al.*, 1993).

Já foi demonstrado que a isquemia induz alterações na memória aversiva (DEVRIES, 2001). Os modelos de isquemia cerebral através da oclusão da ACM produzem prejuízos na memória aversiva de camundongos (YAMAMOTO *et al.*, 1989; YONEMORI *et al.*, 1999; HATTORI, 2000).

Observou-se neste trabalho que os animais submetidos à isquemia apresentaram déficit na memória aversiva recente e tardia e o tratamento com o ácido cafeico não foi capaz de inibir esse déficit na memória recente, mas mostrou-se capaz de proteger a memória aversiva tardia na dose de 60 mg/kg. Anwar (2012) mostrou que 30 dias de tratamento com 100mg/kg do ácido cafeico aumentou a latência da esquiva passiva em ratos que não haviam sofrido nenhuma injúria cerebral, sugerindo que este composto melhora a memória aversiva de ratos. O tratamento com ácido cafeico durante 15 dias nas doses de 10 e 30 mg/kg reverteram as alterações de memória na esquiva passiva induzidas por alumínio (YANG *et al.*, 2008).

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). Existem consideráveis evidências de que o hipocampo está relacionado tanto na consolidação quanto na extinção, ou seja, perda da memória na tarefa de esquiva inibitória (CAMMAROTA *et al.*, 2003; Szapiro *et al.*, 2003). Antagonista de mGLU1 contribuem para atenuar o processo de extinção da memória na resposta da esquiva inibitória, porém o mesmo efeito não é observado quando

analisado antagonista de mGLU5 (MYERS, DAVIS, 2002) mostrando que dependendo do mecanismo pelo qual o composto age, pode induzir processos de ativação da extinção de memória. No estudo de Buzzi (2009) observou-se as propriedades antinociceptivas dos derivados do ácido cafeico em camundongos. Este efeito pode estar relacionado à sua interação com o sistema glutamatérgico (FERREIRA *et al.*, 1999). No entanto, o mecanismo de ação do ácido cafeico com o sistema glutamatérgico no SNC ainda não foi completamente elucidado (HUNG *et al.*, 2005).

Sabendo-se que o sistema colinérgico está intimamente ligado com a formação e retenção de memória dependente de hipocampo, que esta região cerebral está envolvida nos principais testes de memória realizados neste trabalho e que o ácido cafeico mostrou-se capaz de prevenir os déficits de memória induzidos pela isquemia cerebral focal permanente, foi avaliado o efeito *ex vivo* do ácido cafeico sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) cerebral de camundongos. Esta enzima é responsável pela degradação da acetilcolina na fenda sináptica. Foi observado que o ácido cafeico não modificou a atividade desta enzima em nenhuma das doses testadas.

ANWAR e colaboradores (2012) observaram que o ácido cafeico aumentou a atividade da AChE no córtex cerebral, cerebelo e hipotálamo em concentrações que variam entre 1,0 e 2,0 mM, enquanto que no corpo estriado e hipocampo este composto não alterou a atividade da enzima. No mesmo trabalho, observou-se que, por outro lado, o tratamento durante 30 dias com ácido cafeico nas doses de 10, 50 e 100 mg/kg, inibiu significativamente a atividade da AChE no córtex cerebral e corpo estriado e aumentou a atividade da enzima no hipocampo, hipotálamo e na ponte.

Uma possível explicação para as diferenças em relação à atividade da AChE em regiões do cérebro é o fato de que esta enzima existe numa grande variedade de formas moleculares que diferem na solubilidade e do tipo de ligação à membrana, em vez de atividade catalítica. No cérebro, AChE ocorre principalmente como forma tetramérica G4 (ligada à membrana), juntamente com a forma monomérica G1 (citosólica) (DAS *et al.*, 2001). A literatura mostra que muitas drogas, incluindo as de uso terapêutico, não afetou qualquer forma de AChE igualmente e às vezes essas drogas se comportaram de forma diferente, com a mesma

isoforma, em diferentes áreas do cérebro (ZHAO e TANG, 2002). Com base nisto, pode-se sugerir que o ácido cafeico, também pode ter a forma específica da seletividade em relação à AChE a partir de regiões do cérebro.

A sinaptofisina é uma proteína associada à membrana que pode ser encontrada em todas as terminações nervosas do sistema nervoso central e periférico (NAYONE *et al.*, 1986). Esta proteína é um marcador importante da sinaptogênese, desenvolvimento neural e densidade sináptica. A quantificação da sinaptofisina proporciona um novo método para monitorar a densidade sináptica e está relacionada com a plasticidade sináptica. Como um marcador proteico de vesículas sinápticas, a sinaptofisina não é necessária para a entrega do transmissor, mas é um requisito indispensável para a plasticidade sináptica (BECHER *et al.*, 1999) e é um importante componente de proteína pré-sináptica envolvida na aprendizagem e memória (RUNE e FROTSCHER, 2005). Estudos demonstram uma diminuição significativa na densidade sináptica nas áreas de associação neocorticais e do hipocampo na demência (STEPHEN e DOUGLAS, 2003.)

Na avaliação da integridade da sinapse neuronal através da quantificação de sinaptofisina, constatou-se que os animais isquemiados apresentaram diminuição da expressão de sinaptofisina no córtex temporal, corroborando com resultados de outros autores que haviam mostrado a diminuição da expressão de sinaptofisina em modelo de isquemia global (SAYAN-OZACMAK *et al.*, 2011) e em modelo de isquemia focal permanente (GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2012). O ácido cafeico aumentou significamente a expressão da sinaptofisina no córtex temporal, mostrando que este possui ação sinaptogênica. Outros estudos já haviam demonstrado o efeito sinaptogênico de outros polifenóis, como o ácido lipóico, em modelo de isquemia cerebral transitória em ratos (GONZALEZ-PEREZ *et al.*, 2002). Sabe-se que o BDNF é um importante regulador da sinaptogênese e dos mecanismos de plasticidade sináptica envolvidos no aprendizado e na memória no SNC adulto (CUNHA, 2010). Takeda e colaboradores (2006) mostraram que o ácido cafeico (4 mg/kg) foi capaz de inibir a diminuição na expressão do BDNF mRNA em camundongos submetidos a estresse. Os resultados deste trabalho sugerem que o efeito neuroprotetor do ácido cafeico no modelo de isquemia cerebral focal permanente está provavelmente relacionado com sua ação sinaptogênica.

As caspases pertencem à família das cisteínas proteases que têm a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato (NICHOLSON e THORNBERRY, 1997). As caspases sinalizam para a apoptose e clivam esses substratos levando à condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolipídios de membrana que irão sinalizar para estas células serem fagocitadas por macrófagos (NICHOLSON, 1997; BOATRRIGHT, 2003). São conhecidas 14 caspases humanas, sendo que seis (caspases -3, -6, -7, -8, -9, -10) participam da apoptose (BOATRRIGHT *et. al.*, 2003).

Para investigar o processo de morte celular por apoptose, realizou-se uma quantificação da caspase-3, que é a enzima executora mais importante no cérebro, a qual é ativada precocemente após a isquemia, particularmente em regiões próximas ao infarto (KUNZ *et al.*, 2010) e observou-se um aumento da atividade desta nos animais isquemiados, corroborando com diversos estudos que já haviam demonstrado um aumento de transcrição das caspases, inclusive a caspase-3, em diferentes modelos de isquemia (ASAHI, 1997; BHAT, 1996; NI, 1998). O ácido cafeico foi capaz de diminuir significativamente a caspase-3 no córtex temporal dos animais, mostrando a atividade anti-apoptótica deste composto. Outros estudos já haviam demonstrados a diminuição de atividade anti-apoptótica através da ação de drogas anti-inflamatórias e anti-oxidantes. (KHAN *et. al.*, 2004, 2005). Um composto derivado do ácido cafeico, o fenetil ester do ácido cafeico, já havia demonstrado atividade anti-apoptótica em modelo de isquemia cerebral permanente em ratos (KHAN *et. al.*, 2007). Com este resultado, pode-se sugerir que o efeito neuroprotetor do ácido cafeico no modelo de isquemia cerebral focal permanente está relacionando também com sua propriedade anti-apoptótica.

A lesão decorrente da isquemia cerebral permanente ou transitória desenvolve-se a partir de uma série de eventos fisiopatológicos que progridem com o tempo e em regiões cerebrais específicas. A redução do fluxo sanguíneo cerebral em 20% a 30% abaixo do normal é suficiente para iniciar esses eventos (OHTAKI *et al.*, 2005). Além disso, as consequências da isquemia, em diferentes tecidos, dependem de sua duração e das lesões que se desenvolvem durante o estágio de reperfusão tecidual (SILVA Jr *et al.*, 2002).

Quando trata-se de um modelo isquemia/reperfusão, após a reoxigenação, a produção de radicais de oxigênio implica em danos teciduais e inicia uma cascata de

respostas celulares deletérias precedendo a inflamação, morte celular, e por último, falência do órgão (FONDEVILA *et al.*, 2003). Em condições fisiológicas, os efeitos tóxicos das espécies reativas de oxigênio podem ser prevenidos por algumas enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalases, e também por outros antioxidantes não enzimáticos. No entanto, quando a produção se torna excessiva, o estresse oxidativo pode ter um efeito deletério na função e integridade estrutural de tecidos biológicos (SILVA Jr. *et al.*, 2002).

Sabe-se que o ácido cafeico é um potente anti-oxidante (VIEIRA, 1998; BORS, 2004) e ZHOU (2006) relatou esta ação no modelo de isquemia transitória em ratos. Devido ao grande aumento na produção de radicais de oxigênio após a reperfusão, o estresse oxidativo é melhor observado neste modelo de isquemia, não sendo tão perceptível no modelo de isquemia cerebral focal permanente utilizado neste trabalho, por isso não foi realizada nenhuma avaliação para investigar o efeito do estresse oxidativo neste trabalho. Entretanto, não deve-se descartar o efeito anti-oxidante do ácido cafeico como mecanismo de neuroproteção.

Neste trabalho, foi demonstrado que camundongos submetidos à isquemia focal permanente apresentaram déficits na memória devidos provavelmente à lesões nas áreas envolvidas com os tipos de memória avaliados no modelo de isquemia utilizado, principalmente no estriado e córtex e demonstrou-se também, pela primeira vez, o efeito neuroprotetor do ácido cafeico administrado via intraperitoneal sobre os déficits de memória induzidos por este modelo. Os resultados também demonstram a ação neuroprotetora do ácido cafeico na lesão neuronal, alterações comportamentais, cognitivas e sensorial. Também foi investigado o mecanismo neuroprotetor do ácido cafeico e observou-se atividade sinaptogênica e anti-apoptótica, o que pode-se inferir que o efeito neuroprotetor da-se também através destes mecanismos. Com estes resultados, pode-se concluir que este composto tem o potencial de ser uma nova terapia adjuvante para o AVC, visto que é capaz de atuar em mais de um fato envolvido na fisiopatologia da isquemia cerebral, melhorando, possivelmente, não só aspectos bioquímicos, mas também cognitivos dos pacientes. É uma substância que pode ser testada em humanos, pois possui baixa toxicidade e é amplamente distribuída em vegetais.

Desta forma, o ácido cafeico pode tornar-se uma importante nova ferramenta farmacológica por sua capacidade de proteção sináptica e atividade anti-

apoptótica, pois se for administrado dentro da janela terapêutica do AVC isquêmico, poderá reduzir a recrutação de células para a região da penumbra. Além de ter potencial para o tratamento da isquemia cerebral, há também perspectivas para diversas patologias que envolvem a morte celular por apoptose e o comprometimento da integridade das sinapses.

7. CONCLUSÃO

Neste estudo foi discutido o efeito do ácido cafeico em camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente e foi mostrado que o ácido cafeico diminuiu a extensão da área de infarto isquêmico, preveniu os déficits neurológicos, déficits na memória de trabalho, memória espacial e memória aversiva, aumento da expressão de sinaptofisina no córtex e diminuição da caspase 3. Esses resultados demonstram que o ácido cafeico possui ação neuroprotetora provavelmente por sua atividade antiapoptótica e por proteção sináptica.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED N, NASMAN P, WAHLGREN NG. Effect of intravenous nimodipine on blood pressure and outcome after acute stroke. **Stroke**, v. 31, p. 1250–1255, 2000.

ALADAG, M.A., Turkoz, Y., Ozcan, C., Sahna, E., Parlakpınar, H., Akpolat, N., Cigremis, Y., 2006. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) attenuates cerebral vasospasm after experimental subarachnoidal haemorrhage by increasing brain nitric oxide levels. *Int. J. Devl. Neurosci.* 24, 9–14.

AMODIO, R., Ruvo, C.D., Matteo, V.D., Poggi, A., Santo, A.D., Martelli, N., Lorenzet, R., Rotilio, D., Cacchio, M., Esposito, E., 2003. Caffeic acid phenethyl ester blocks apoptosis induced by low potassium in cerebellar granule cells. *Int. J. Devl. Neurosci.* 21, 379–389.

ALLEN, C. L.; BAYRAKTUTAN, U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. **International Journal of Stroke**, v. 4, p. 461–470, 2009.

AZIZ, N.H., FARAG, S.E., MOUSA, L.A., ABO-ZAID, M.A. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. **Microbios**, Cambridge, v.93, n.374, p.43-54, 1998.

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

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

BLOCK, F.; KUNKEL, M.; SCHWARZ, M. Quinolinic acid lesion of the striatum induces impairment in spatial learning and motor performance in rats. **Neurosci. Lett**, v. 149, p. 126–128, 1993.

BRECKWOLDT, M. O.; CHEN, J.W.; STANGENBERG, L.; AIKAWA, E.; RODRIGUEZ, E.; QIU, S. Tracking the inflammatory response in stroke in vivo by sensing the enzyme myeloperoxidase. **Proc Natl Acad Sci**, v. 105, p. 18584–9, 2008.

BRIONI, J. D. Role of GABA during the multiple consolidation of memory. **Drug Development Research**, v. 28, p. 3–27, 1993.

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

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

CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L. R.; KERR, D.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstatement of a conditioned fear response. **J. Neurosci.**, v. 23, p.737-41, 2003.

CAPLAN, L. R.; SCHMAHMANN, J. D.; KASE, C. S.; FELDMAN, E.; BASQUIS, G.; GREENBERG, J. P.; GORELICK, P. B.; HELGASON, C.; HIER, D. B. Caudate infarcts. **Arch Neurol**, Vol. 47, p. 133-143, 1990.

CARMICHAEL, S. T. Rodent Models of Focal Stroke: Size, Mechanism, and Purpose. **The Jour. of the American Society for Exp. NeuroTherap**, v. 2, p. 396–409, 2005.

CELEUMANS, A.; ZGAVC, T.; KOOIJMAN, R.; IDRISSE, S.; SARRE, S.; MICHOTTE, Y. The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia. **Journal of neuroinflammation**, 7:74, 2010.

CHAN, P. H. Role of Oxidants in Ischemic Brain Damage. **Stroke**, v. 27, p. 1124-1129, 1996.

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

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

CUNHA C, BRAMBILLA, R and THOMAS KL (2010) A simple role for BDNF in learning and memory? **Front. Mol. Neurosci.** 3:1. doi: 10.3389/neuro.02.001.2010

CZOK, G. Coffee and health. **Z Ernährungswiss** 1977; 16: 248–55.

DA CUNHA FM, Duma D, Assreuy J, Buzzi FC, Niero R, Campos MM, *et al.* Caffeic acid derivatives: *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory properties. **Free Radic Res** 2004; 38: 1241–53.

DAS, A; DISKSHIT M; NATH C; Profile of acetylcholinesterase in brain areas and female rats of adult and old age. **Life Sci** 2001;68:1545–55.

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

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

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

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

DIRNAGL, U.; ISADECOLA, C.; MOSKOWITZ M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, v. 22, p. 391–397, 1999.

DURUKAN, A.; TATLISUMAK, T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 87, p. 179–197, 2007.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRÉS, J. V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

FEIGIN, V. L.; LAWES, C. M.; BENNETT, D. A.; BARKER-COLLO, S. L.; PARAG, V. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. **Lancet Neurol**, v.8(4), p. 355-69, 2009.

FERGUSON, L.R., HARRIS, P.J. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. **European Journal of Cancer Prevention**, Oxford, v.8, n.1, p.17-25, 1999

FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. The role of systemic, spinal and supraspinal L-argininenitricoxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. **Neuropharmacology**, v. 38, p. 835–42, 1999.

FERRER, I.; PLANAS, A. M. Signaling of Cell Death and Cell Survival Following Focal Cerebral Ischemia: Life and Death Struggle in the Penumbra. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 62(4), p. 329-339, 2003.

FERRO, J. M.; VERDELHO, A. Epidemiologia, fatores de risco e prevenção primária do AVC. **Pathos**, p. 7-15, 2000.

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(1), p. 39-46, 2005.

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

GARRITANO, C. R.; LUZ, P. M.; PIRES, M. L. E.; BARBOSA, M. T. S.; BATISTA, K. M. Análise da tendência da mortalidade por Acidente Vascular Cerebral no Brasil no século XXI. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, 2012.

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.

GOLD, P. E. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. **Behavioral and Neural Biology**, v. 46, p. 87-98, 1986.

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

GOLDSTEIN, L.B., BUSHNELL, C.D., ADAMS, R.J., APELL, L.J., BRAUN, L.T., CHATUVERDI, S., CREAGER, M.A., CULEBRAS, A., ECKEL, R.H., HART, R.G., HINCHEY, J.A., HOWARD, V.J., JAUCH, E.C., LEVINE, S.R., MESCHIA, J.F., MOORE, W.S., NIXON, J.V., PEARSON, T.A., 2011. Guidelines for the primary prevention of stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke**. 42, 517 – 584.

GONZALEZ-PEREZ, O., GONZALEZ-CASTANEDA, R.E., HUERTA, M., LUQUINE, S., GOMEZ-PINEDO, U., SANCHEZ-ALMARAZ, E., NAVARRO-RUIZ, A., GARCIA-ESTRADA, J. Beneficial effects of α -lipoic acid plus vitamin E on neurological deficit, reactive gliosis and neuronal remodeling in the penumbra of the ischemic rat brain. **Neuroscience Letters**, v. 321, p. 100-104, 2002.

GUNTHER, A.; KUPPERS-TIEDT, L.; SCHNEIDER, P. M.; KUNERT, I.; BERROUSCHOT, J.; SCHNEIDER, D.; ROSSNER, S. Reduced infarct volume and differential effects on glial cell activation after hyperbaric oxygen treatment in rat permanent focal cerebral ischaemia. **Eur J Neurosci**, v. 21, p. 3189-3194, 2005.

GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, M., RODRÍGUEZ-FRUTOS, B., FUENTES, B., VALLEJO-CREMADES, M. T., ÁLVAREZ-GRECH, J., EXPÓSITO-ALCAIDE, M., DÍEZ-TEJEDOR, E. CDP-choline treatment induces brain plasticity markers expression in experimental animal stroke. **Neurochemistry International**, v. 60, p. 310-317, 2012.

HACK, W. et al., 2004. Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS and NINDS rt-PA stroke trials. **Lancet**. 363, 768 – 774.

HALEY EC JR. High-dose tirilazad for acute stroke (RANTTAS II). RANTTAS I **Investigators. Stroke**, v. 29, p. 1256-1257, 1998.

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

HILL, M.D., et al., 2012. Safety and efficacy of NA-1 in patients with iatrogenic stroke after endovascular aneurysms repair (ENACT): a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet Neurol.**, 11, 942 – 950. HOSSMANN, K. A. Pathophysiology and Therapy of Experimental Stroke. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 26, p. 7-8, 2006.

HOSSMANN, K. A. Pathophysiological basis of translational stroke research. **Folia Neuropathol**, v. 47(3), p. 213-227, 2009.

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

IZQUIERDO, I.; DA CUNHA, C.; ROSAT, R.; JERUSALINSKY, D.; FERREIRA, M. B. C.; MEDINA, J. H. Neurotransmitter receptors involved in memory processing by the amygdala, medial septum and hippocampus of rats. **Behavioral and Neural Biology**, v. 58, p. 16–25, 1992.

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

JAYAPRAKASAM, B.; VANISREE, M.; ZHANG, A.; DEWITT, D.L.; NAIR, M.G; **J. Agric. Food Chem.** 54 (2006) 5375–5381.

KALIVAS, P. W.; DUFFY, P.; DuMARS, L. A.; SKINNER, C. Behavioral and Neurochemical Effects of Acute and Daily Cocaine Administration in Rats. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 245(2), p. 485-492, 1988.

KASTE, M., 2012. Is the door open again for neuroprotection trials in stroke? **Lancet Neurol**. 11, 930-931.

KIM, D.H.; JEON, S. J.; SON, K. H.; JUNQ, J. W.; LEE, S.; YOON, B. H.; CHOI, J. W.; CHEONG, J. H.; KO, K. H.; RYU, J. H. Effect of the flavonoid, oroxylin A, on transient cerebral hypoperfusion induced memory impairment in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 85, p. 658–668, 2006.

KIM, J.M.; KIM, S.; KIM, D. H.; LEE, C. H.; PARK, S. J.; JUNG, J. W.; KO, K. H.; CHEONG, J. H.; LEE, S. H.; RYU, J. H. Neuroprotective effect of forsythiaside against transient cerebral global ischemia in gerbil. **European Journal of Pharmacology**, v. 660, p. 326–333, 2011.

KIZILTEPE, U.; TURAN, N. N.; HAN, U.; ULUS, A. T.; AKAR, F. Resveratrol, a red wine polyphenol, protects spinal cord from ischemia-reperfusion injury. **J Vasc Surg**, v. 40(1), p. 138-45, 2004.

LAKHAN, S. E.; KIRCHGESSNER, A.; HOFER, M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, p. 97, 2009.

LALOND, R. The neurobiological basis of spontaneous alternation. **Neuroscience and behavioural reviews**, v. 26, p. 91-104, 2002.

LARANJINHA, J., Vieira, O., Madeira, V., Almeida, L., 1995. Two related phenolic antioxidants with opposite effects on vitamin E content in low density lipoproteins oxidized by ferrylmyoglobin: consumption vs. regeneration. **Arch. Biochem. Biophys.** 323, 373–381.

LEE, E. J.; CHEN, H. Y.; WU, T. S.; CHEN, T. Y.; AYOUB, I. A.; MAYNARD, K. I. Acute Administration of Ginkgo biloba Extract (EGb 761) Affords Neuroprotection Against Permanent and Transient Focal Cerebral Ischemia in Sprague-Dawley Rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 68, p. 636–645, 2002.

LI, X.; YU, C.; LU, Y.; GU, Y.; LU, J.; XU, W.; XUAN, L.; WANG, Y. Pharmacokinetics, Tissue Distribution, Metabolism, and Excretion of Depside Salts from *Salvia miltiorrhiza* in Rats. **Drug metabolism and disposition**, v. 35(02), p. 234-239, 2007.

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

LIU, F.; LANG, J.; LI, J.; SHARON E BENASHSKI.; SIEGEL, M.; XU, Y.; MCCULLOUGH, L. D. Sex differences in the response to PARP-1 deletion and caspase inhibition after stroke. **Stroke**, v. 42(4), p. 1090–1096, 2011.

LIU, F.; MCCULLOUGH, L. D. Middle Cerebral Artery Occlusion Model in Rodents: Methods and Potential Pitfalls. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2011.

LOTUFO, P. A. Stroke in Brazil: a neglected disease. **São Paulo Med J.**, v. 123(1), p. 3-4, 2005.

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

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAL, R. J. Protein measurement with follin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LU, N. et al. Effect of hypoxic preconditioning on the learning and memory ability and expressions of surviving and HSP-70 proteins in rats with focal cerebral ischemia/reperfusion injury. **J. South Med. Univ.**, v. 27(12), 2007.

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

MACCARRONE M, Battista N, Meloni M, Bari M, Galleri G, Pippia P, *et al.* Creating conditions similar to those that occur during exposure of cells to microgravity induces apoptosis in human lymphocytes by 5-lipoxygenase-mediated mitochondrial uncoupling and cytochrome c release. **J Leukoc Biol** 2003; 73: 472–81.

MALMANN, A. B.; FUCHS, S. C.; GUS, M.; FUCHS, F. D.; MOREIRA, L. B. Population-Attributable Risks for Ischemic Stroke in a Community in South Brazil: A Case-Control Study. **PLoS ONE**, v. 7(4), p. 35680, 2012.

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

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

MELANI, A.; PANTONI, L.; BORDONI, F.; GIANFRIDDO, M.; BIANCHI, L.; VANNUCCHI, M. G.; BERTORELLI, R.; MONOPOLI, A.; PEDATA, F. The selective A receptor antagonist SCH 58261 reduces striatal 2A transmitter outflow, turning behavior and ischemic brain damage induced by permanent focal ischemia in the rat. **Brain Research**, v. 959, p. 243–250, 2003.

MELANI, A.; GIANFRIDDO, M.; VANNUCCHI, M. G.; CIPRIANI, S.; BARALDI, P. G.; GIOVANNINI, M. G.; PEDATA, F. The selective A2A receptor antagonist SCH 58261 protects from neurological deficit, brain damage and activation of p38 MAPK in rat focal cerebral ischemia. **Brain Research**, p. 1073–1074, 2006.

MICHALUART, P.; MASFERRER, J.L.; CAROTHERS, A.M.; SUBBARAMAIAH, K.; ZWEIFEL, B.S.; KOBOLDT, C.; MESTRE, J.R.; GRUNBERGER, D.; SACKS, P.G.; TANABE, T.; DANNENBERG, A.J. **Cancer Res.** 59 (1999) 2347–2352.

MORO, M. A.; ALMEIDA, A.; BOLANOS, J. P.; LIZASOAIN, I. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 39(10), p. 1291-304, 2005.

MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v 11, p. 47-60, 1984.

MUMBY, D. G.; WOOD, E. R.; DUVA, C. A.; KORNECOOK, T. J.; PINEL, J. P.; PHILLIPS, A. G. 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.

NESBIT, G.M; LUH, G., TIEN, R., BARNWELL, S.L.. New and future endovascular treatment strategies for acute ischemic stroke. **J. Vasc. Interv. Radiol.** 15, S103 – S110.

O'COLLINS, V.E., MACLEOD, M.R., VAN DER WERP, B.H., HOWELLS, D.W., 2006. Experimental treatments in acute stroke. **Ann. Neurol.** 59, 467-477.

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.

PARI, L.; RASATH, A.P., **Chem. Biol. Interact.** 173 (2008) 77–83.

PIRES, S. L.; GAGLIARDI, R. J.; GORZONI, M. L. Estudo das frequências dos principais fatores de risco para acidente vascular cerebral isquêmico em idosos. **Arq Neuropsiquiatria**, v. 62(3-B), p. 844-851, 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.

PRADEEP, H.; DIYA, J. B.; SHASHIKUMAR, S.; RAJANIKANT, G. K. Oxidative stress – assassin behind the ischemic stroke. **Folia Neuropathol.**, v. 50(3), p. 219-230, 2012.

RENDEIRO, C.; GUERREIRO, J. D.; WILLIAMS, C. M.; SPENCER, J. P. Flavonoids as modulators of memory and learning: molecular interactions resulting in behavioural effects. **Proceedings of the Nutrition Society**, p. 1-17, 2012.

RENDEIRO, C.; VAUZOUR, D.; RATTRAY, M.; WAFFO-TE'GUO, P.; MÉRILLON, J.M; et al. (2013) Dietary Levels of Pure Flavonoids Improve Spatial Memory Performance and Increase Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor. **PLoS ONE** 8(5): e63535. doi:10.1371/journal.pone.0063535

ROGER, V.L., et al., 2011. Heart disease and stroke statistics – 2011 update: a report from the **American Heart Association**. *Circulation* 123, e18-e-209.

RUSSO, A., Longo, R., Vanella, A., 2002. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia** 73, S21–S29.

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(3), p. 335–345, 2007.

SARTER, M.; BODEWITZ, G.; STEPHENS, D. N. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. **Psychopharmacology**, v. 94(4), p. 491-5, 1988.

SAYAN-OZACMAK H, OZACMAK VH, BARUT F, JAKUBOWSKA-DOGRU E. Neuroprotective efficacy of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligand in chronic cerebral hypoperfusion. **Curr Neurovasc Res.**, v. 1, p. 190-9, 2011.

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.

SHENG, H.; WNAG, Y. Correlation of locomotor activity and brain infarction in rats with transient focal ischemia. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 186, p. 150–154, 2010.

SHICHITA, T.; SAKAGUCHI, R.; SUZUKI, M.; YOSHIMURA, A. Post-ischemic inflammation in the brain. **Frontier in immunology**, v.3, p. 132, 2012.

SHUAIB, A.; BUTCHER, K.; MOHAMMAD, A. A.; SAQQUR, M.; LIEBESKIND, D. Collateral blood vessels in acute ischaemic stroke: a potential therapeutic target. **Lancet Neurol.**, v. 10, p. 909–21. 2011.

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

SILVA, G. S.; GOMES, D. L.; MASSARO, A. R. Tratamento da fase aguda do acidente vascular cerebral isquêmico. **Rev. Neurociências**, v. 13(1), p. 39-49, 2005.

SIMONYI, A.; WANG, Q.; MILLER, R. L.; YUSOF, M.; SHELAT, P. B.; SUN, A. Y.; SUN, G. Y. Polyphenols in cerebral ischemia: novel targets for neuroprotection. **Mol Neurobiol.**, v. 31(1-3), p. 135-47, 2005.

SMITH, W. S. Pathophysiology of Focal Cerebral Ischemia: a Therapeutic Perspective. **J Vasc Interv Radiol**, v. 15, p. 3–12, 2004.

SOOBRAATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research**, v. 579, p. 200–213, 2005.

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

STARKOV, A. A.; CHINOPOULOS, C.; FISKUM, G. Mitochondrial calcium and oxidative stress as mediators of ischemic brain injury. **Cell Calcium**, v. 36, p. 257–264, 2004.

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 Research**, v. 960, p. 273–276, 2003.

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

TAKEDA, H., M. TSUJI, M. INAZU, T. EGASHIRA & T. MATSUMIYA: Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. **Eur. J. Pharmacol.** 2002a, 449, 261–267.

TAKEDA, H., M. TSUJI, J. MIYAMOTO, J. MASUYA, M. LIMORI & T. MATSUMIYA: Caffeic acid produces antidepressive- and/or anxiolytic-like effects through indirect modulation of the $\alpha 1A$ -adrenoceptor system in mice. **Neuroreport** 2003, 14, 1067–70.

TAKEDA, H., M. TSUJI, J. MIYAMOTO & T. MATSUMIYA: Rosmarinic acid and caffeic acid reduce the defensive freezing behavior of mice exposed to conditioned fear stress. **Psychopharmacology** 2002b, 164, 233–235.

TRAYSTMAN, R. J. Animal model of focal and global cerebral ischemia. **ILAR Journal**, v. 44(02), 2003.

TAZAKI Y, SAKAI F, OTOMO E, et al. Treatment of acute cerebral infarction with a choline precursor in a multicenter double-blind placebo-controlled study. **Stroke**; v. 19, p. 211–216, 1988.

TUREYEN, K.; VEMUGANTI, R.; SAILOR, K. A.; DEMPSEY, R. J. Infarct volume quantification in mouse focal cerebral ischemia: a comparison of

triphenyltetrazolium chloride and cresyl violet staining techniques. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 139, p. 203–207, 2004.

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, 2006.

VAN DER WORD, H.B; VAN GIJN, J., 2007. Clinical practice: acute ischemic stroke. **N. Engl. J. Med.** 572-579.

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.

WANG, Q.; SUN, A. Y.; SIMONYI, A.; JENSEN, M. D.; SHELAT, P. B.; ROTTINGHAUS, G. E.; MACDONALD, R. S.; MILLER, D. K.; LUBAHN, D. E.; WEISMAN, G. A.; SUN, G. Y. Neuroprotective mechanisms of curcumin against cerebral ischemia-induced neuronal apoptosis and behavioral deficits. **J Neurosci Res.**, v. 82(1), p. 138-48, 2005.

WANG, W.; REDECKER, C.; YU, Z. Y.; XIE, M. J.; TIAN, D. S.; ZHANG, L.; BU, B. T.; WITTE, O. W. Rat focal cerebral ischemia induced astrocyte proliferation and delayed neuronal death are attenuated by cyclin-dependent kinase inhibition. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 15, p. 278–285, 2008.

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

WANG, Q.; TANG, X. N.; YENARI, M. A. The inflammatory response in stroke. **J Neuroimmunol.**, v. 184(1-2), p. 53–68, 2007.

WARDLAW, J.M., MURRAY, V., BERGE, E., DEL ZOPPO, G., Sandercock, P., LINDLEY, R.L., 2205 COHEN, G., 2012. Recombinant tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke: an updated systematic review and meta-analysis. **Lancet** 379, 2364– 2207 2372.

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

WHO (World Health Organization). The top 10 causes of death. Junho, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>>. Acesso em: 01 dezembro 2013.

WHO (World Health Organization). Neurological disorders. 2006. Disponível em: <www.who.int/entity/mental_health/neurology/neurological_disorders_report_web.pdf>. Acesso em: 01 dezembro de 2013.

XIAO, Y.; GUAN, Z. Z.; WU, C. X.; LI, Y.; KUANG, S. X.; PEI, J. J. Correlations Between Cholinesterase Activity and Cognitive Scores in Post-Ischemic Rats and Patients with Vascular Dementia. **Cell Mol Neurobiol.**, v. 32, p. 399–407, 2012.

YAMAMOTO, M.; TAMURA, A.; KIRINO, T.; SHIMIZU, M.; SANO, K. Effects of a new thyrotropin-releasing hormone derivative on behavioral changes after focal cerebral ischemia in rats. **Stroke**, v. 20, p. 362-366, 1989.

YONEMORI, F.; YAMADA, H.; YAMAGUCHI, T.; UEMURA, A.; TAMURA, A. Spatial memory disturbance after focal cerebral ischemia in rats. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 16, p. 973-980, 1996.

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

YU, Y. M.; KIM, J. B.; LEE, K. W.; KIM, S. Y.; HAN, P. L.; LEE, J. K. Inhibition of the cerebral ischemic injury by ethylpyruvate with a wide therapeutic window. **Stroke**, v. 36, p. 2238–2243, 2005

ZÉTOLA, V. H. F.; NÓVAK, E. M.; CAMARGO, C. H. F.; JÚNIOR, H. C.; CORAL, P.; MUZZIO, J. A.; IWAMOTO, F. M.; COLETE, M. V. D.; WERNRCK, L. C. Acidente vascular cerebral em pacientes jovens. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, p. 59, 2001.

ZHANG S, BOYD J, DELANEY K, MURPHY TH. Rapid reversible changes in dendritic spine structure in vivo gated by the degree of ischemia. **J Neurosci**, v.25, p. 5333–8, 2005.

ZHANG, Z.; CHOPP, M.; POWERS, C. Temporal profile of microglial response following transient (2 h) middle cerebral artery occlusion. **Brain Res.**, v. 744, p. 189–198, 1997.

ZHANG, X.; YEUNG, P. K.; McALONAN, G. M.; CHUNG, S. S.; CHUNG, S. K. Transgenic mice over-expressing endothelial endothelin-1 show cognitive deficit with blood–brain barrier breakdown after transient ischemia with long-term reperfusion. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 101(C), p. 46-54, 2013.

ZHAO Q; TANG X. Effects of huperzine A on acetylcholinesterase isoforms in vitro: comparison with tacrine, donepezil, rivastigmine and physostigmine. **Eur J Pharmacol** 2002;455:101–7.