



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

ANA THAIS ARAÚJO DA SILVA

**FISETINA, UM FLAVONÓIDE QUE PROTEGE CAMUNDONGOS DO DANO
NEURONAL E DÉFICIT DE MEMÓRIA INDUZIDO POR ISQUEMIA CEREBRAL
FOCAL PERMANENTE**

FORTALEZA

2016

ANA THAIS ARAÚJO DA SILVA

**FISETINA, UM FLAVONÓIDE QUE PROTEGE CAMUNDONGOS DO DANO
NEURONAL E DÉFICIT DE MEMÓRIA INDUZIDO POR ISQUEMIA CEREBRAL
FOCAL PERMANENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.
Área de concentração: Farmacologia

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

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S578f Silva, Ana Thais Araújo da.
Fisetina, um flavonóide que protege camundongos do dano neuronal e
deficit de memória induzido por isquemia cerebral focal permanente / Ana Thais
Araújo da Silva. – 2016.
95 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2016.
Orientação: Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade.

1. Isquemia cerebral focal permanente. 2. Inflamação. 3. Plantas medicinais. 4. Fisetina. I. Título.
CDD 615.1

ANA THAIS ARAÚJO DA SILVA

**FISETINA, UM FLAVONÓIDE QUE PROTEGE CAMUNDONGOS DO DANO
NEURONAL E DÉFICIT DE MEMÓRIA INDUZIDO POR ISQUEMIA CEREBRAL
FOCAL PERMANENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em: ____/____/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Geanne Matos de Andrade (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a Fernanda Martins Maia
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof. Dr. Orleâncio Gomes Ripardo de Azevedo
FANOR/DEVRY

A Deus, primeiramente, por todas as coisas.
E a minha mãe, minha mentora e heroína.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por tanto amor.

Agradeço à minha mãe pelo amor, companheirismo e, principalmente pelo exemplo de vida, mulher, enfim, um ser humano cheio de luz. Ao meu filho que sempre entendeu as longas horas de estudos e me ajudou se comportando quando mais precisava (risos). Aos meus irmãos, Tatiana, Nelio e Sérgio por, simplesmente, existirem.

À minha professora querida, Geanne Matos, por todos os ensinamentos e exemplos. Muito orgulho e honra em ser sua pupila. Carinho e gratidão definem meus sentimentos.

À minha equipe de laboratório, todos os dias eu agradeço à Deus por sempre colocar anjos em meu caminho, dessa vez ele caprichou! Me deu irmãs! Juliana Pereira por ser sempre a que coloca nossos pés no chão e ser tão companheira, prestativa e nossa blogueira; Analu por ser minha “madrinha”, por todos os ensinamentos, pelas oportunidades e por ter esse coração tão mole e bondoso; Julianna Catharina por tantas gargalhadas, tanta leveza e carinho; Ana Paula por tanto amor e cuidado; Mara Yone por ser minha companheira de viagem, cirurgias e por nos iluminar com sua luz; Carol por todos os ensinamentos e amizade. Kelly, Arnaldo, Patrícia, Marta, Jéssica e todos os integrantes do LNC, minha gratidão.

À Universidade Federal do Ceará, por todas as oportunidades, muito orgulho em fazer parte. Agradeço também ao Órgão Financiador CNPQ, pela bolsa concedida ao longo do curso. Nós não fazemos nada sozinhos.

É graça divina começar bem. Graça maior persistir na caminhada certa. Mas, graça das graças é não desistir nunca.”

Dom Helder Câmara

RESUMO

O acidente vascular cerebral (AVC) é uma doença comum e uma das maiores causas de morte e incapacidade em todo o mundo. O acidente vascular cerebral isquêmico focal (AVCi) ocorre devido a uma redução do aporte sanguíneo para uma região cerebral, levando ao decréscimo de oxigênio e glicose nos tecidos, induzindo a uma cascata de eventos, incluindo o estresse oxidativo e inflamação, que culminam com a morte neuronal e, com isso uma perda rápida da função neurológica. A Fisetina é um membro do subgrupo flavonol pertencente aos flavonoides, encontrado em diversas frutas e vegetais que apresentam propriedades antiinflamatórias e antioxidantes. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da Fisetina sobre o dano neuronal e memória, resposta inflamatória e sinaptogênese em camundongos submetidos ao modelo experimental de isquemia cerebral focal permanente (pMCAO). Os foram animais divididos entre os grupos falso-operados, tratados com veículo ou fisetina (FIS) na dose de 50 mg/kg, isquemeados tratados com veículo e isquemeados tratados com FIS nas doses de 10, 30, e 50 mg/kg via oral, 3 horas depois da eletrocauterização da artéria cerebral média. O modelo de isquemia cerebral focal permanente foi comprovado através do aumento significativo da área de infarto e dos déficits sensório-motores nos animais isquemeados, observado através da coloração com TTC e da avaliação neurológica. A Fisetina foi capaz de reverter esses efeitos, diminuindo a área isquêmica e os déficits sensório-motores. Os animais isquemeados não apresentaram alterações na atividade locomotora horizontal, apenas na vertical e a Fisetina foi capaz de reverter esse efeito. A pMCAO induziu déficits na memória de trabalho, memória aversiva, episódica e espacial nos animais. A Fisetina reverteu os déficits na memória de trabalho, episódica e espacial na dose de 50 mg/kg, porém na avaliação da memória aversiva a Fisetina não conseguiu reverter esses déficits. A pMCAO provocou um aumento na ativação dos astrócitos e dos níveis do TNF- α (no corpo estriado) e a fisetina na dose de 50 mg/kg conseguiu diminuir a ativação dos astrócitos e mas não os níveis do TNF- α . Também observamos uma diminuição da expressão de sinaptofisina no corpo estriado dos animais isquemeados e a fisetina conseguiu elevar esses níveis. A pMCAO diminuiu os níveis do BDNF do corpo estriado e aumentou no hipocampo dos animais isquemeados e a fisetina na dose de 50mg/kg conseguiu reverter esses níveis no corpo estriado. Os resultados do presente estudo sugerem que a Fisetina possui ação de neuroresgate, melhorando a lesão neuronal, as alterações neurológicas e os déficits de memória causados pela isquemia. Esses efeitos devem-se, possivelmente, as suas ações anti-inflamatória.

Palavras-chave: Isquemia cerebral focal permanente, inflamação, plantas medicinais, fisetina.

ABSTRACT

FISETINA, UM CAMUNDONGOS FLAVONÓIDES PROTEGER NEURONAL E DO DANO DÉFICITS DE MEMÓRIA INDUZIDO POR PERMANENTE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL

Stroke is a common disease and a major cause of death and disability worldwide. The focal ischemic stroke (ischemic stroke) occurs due to a reduced blood supply to brain region, leading to the decrease of oxygen and glucose in tissues, inducing a cascade of events including oxidative stress and inflammation, culminating with neuronal death and thus a rapid loss of neurological function. Fisetin is a member of subgroup belonging to the flavonol flavonoid found in many fruits and vegetables that have anti-inflammatory and antioxidant properties. The objective of this work was to study the effects of fisetin on neuronal damage and memory, inflammatory response and synaptogenesis in mice undergoing experimental model of permanent focal cerebral ischemia (pMCAO). Were animals divided between the false-operated groups treated with vehicle or fisetin (SIF) at a dose of 50 mg / kg-ischemic treated with vehicle and-ischemic treated with FIS in doses of 10, 30, and 50 mg / kg po 3 hours after the middle cerebral artery electrocautery. The permanent focal cerebral ischemia model was proven by the significant increase in infarct area and sensorimotor deficits in-ischemic animals, observed by staining with TTC and neurological evaluation. Fisetin was able to reverse these effects by decreasing the ischemic area and sensorimotor deficits. The-ischemic animals showed changes in horizontal locomotor activity, only vertically and fisetin was able to reverse this effect. The pMCAO induced deficits in working memory, aversive, episodic and spatial memory in animals. Fisetin reversed the deficits in working memory, episodic and space at a dose of 50 mg / kg, but in the evaluation of aversive memory fisetin failed to reverse these deficits. The pMCAO caused an increase in astrocyte activation and TNF- α levels (in the striatum) and fisetin at a dose of 50 mg / kg was able to decrease the activation of astrocytes and TNF- α but not the levels. We also observed a decrease in synaptophysin expression in the striatum of animals-ischemic and fisetin could raise these levels. The pMCAO decreased BDNF levels in the striatum and increased in the hippocampus of fisetin-ischemic animals and the dose of 50mg / kg was able to reverse these levels in the striatum. The results of this study suggest that fisetin has neuroresgate action, improving neuronal injury, neurological disorders and memory deficits caused by ischemia. These effects are possibly their anti-inflammatory actions.

Keywords: permanent focal cerebral ischemia, inflammation, medicinal plants, fisetin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Cascata isquêmica (Adaptado de HOSSMANN, 2009.)	16
Figura 2	Core e penumbra depois da isquemia (AL-QAZZAZ, 2014)	18
Figura 3	Mecanismos de injúria neuronal após isquemia. (Adaptado de Traystman, 2003.)	19
Figura 4	Mediadores do estresse oxidativo (CHAMORRO <i>et al</i> , 2016)	21
Figura 5	Resposta inflamatória após isquemia cerebral focal (adaptada de BROUNS, DEYN, 2009)	24
Figura 6	Estrutura da Fisetina	30
Figura 7	Protocolo experimental	35
Figura 8	Eletrocauterização da artéria cerebral média	36
Figura 9	Arena do Campo Aberto	39
Figura 10	Labirinto em Y	39
Figura 11	Arena com objetos	40
Figura 12	Labirinto aquático	41
Figura 13	Aparelho de Esquiva Passiva	42
Figura 14	Fotografia 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	46
Figura 15	A Fisetina (50 mg/kg) melhora o dano neuronal isquêmico em camundongos submetidos à pMCAO (n=8/grupo)	47
Figura 16	A Fisetina (50 mg/kg) melhora os déficits sensório-motor em camundongos submetidos à pMCAO (n = 8 / grupo).	48
Figura 17	Efeito da Fisetina (10, 30 e 50mg/kg) sobre o número de cruzamentos no teste do campo aberto de camundongos submetidos à pMCAO (n = 8/grupo).	49
Figura 18	Efeito da Fisetina (10,30 e 50mg/kg) sobre o número de “rearings” no teste do campo aberto de camundongos submetidos à pMCAO (n = 8/grupo).	50
Figura 19	Efeito da Fisetina (10, 30 e 50 mg/kg) sobre a memória de trabalho de camundongos submetidos à pMCAO (n = 8/grupo).	51
Figura 20	Efeito da Fisetina (10, 30 e 50 mg/kg) sobre a memória episódica avaliada através do teste de reconhecimento de objetos de camundongos submetidos à pMCAO (n = 8/grupo).	52

Figura 21	Efeito da Fisetina (10, 30 e 50 mg/kg) sobre a memória espacial, avaliada através do parâmetro latência para alcançar a plataforma, de camundongos submetidos à pMCAO	54
Figura 22	Efeito da Fisetina (10, 30 e 50 mg/kg) sobre a memória espacial, avaliada através do parâmetro número de cruzamentos, de camundongos submetidos à pMCAO (n = 8/grupo).	55
Figura 23	Efeito da Fisetina (10, 30 e 50 mg/kg) sobre a memória espacial, avaliada através do parâmetro tempo de permanência no quadrante, de camundongos submetidos à pMCAO (n = 8/grupo)	55
Figura 24	Efeito da Fisetina (10, 30 e 50 mg/kg) sobre a memória aversiva de camundongos submetidos à pMCAO (n = 8/grupo).	56
Figura 25	Efeito da Fisetina (50 mg/kg) sobre a ativação de astrócitos (GFAP) no córtex temporal de camundongos submetidos à pMCAO	57
Figura 26	Imagens representativas do efeito da Fisetina (50 mg/kg) sobre a ativação de astrócitos (GFAP) no córtex temporal de camundongos submetidos à pMCAO	58
Figura 27	Quantificação por densitometria ótica dos níveis do TNF- α no corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO.	59
Figura 28	Imagens representativas (40x) do efeito da Fisetina (50 mg/kg) sobre a imunorreatividade do TNF- α no estriado de camundongos submetidos à pMCAO	59
Figura 29	Quantificação por densitometria ótica dos níveis do TNF- α no córtex de camundongos submetidos à pMCAO	60
Figura 30	Imagens representativas (40x) do efeito da Fisetina (50 mg/kg) sobre a imunorreatividade do TNF- α no córtex de camundongos submetidos à pMCAO	60
Figura 31	Quantificação por densitometria ótica da expressão da proteína Sinaptofisina em estriado de camundongos tratados com salina ou Fisetina (50mg/kg)	61
Figura 32	Quantificação por densitometria ótica da expressão da proteína Sinaptofisina em córtex de camundongos tratados com salina ou Fisetina (50mg/kg)	62
Figura 30	Efeito da Fisetina (50mg/kg) sobre os níveis de BDNF no estriado de camundongos submetidos à pMCAO	63
Figura 31	Efeito da Fisetina (50mg/kg) sobre os níveis de BDNF no hipocampo de camundongos submetidos à pMCAO	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Grupo de tratamento	35
Tabela 2	Escala utilizada para a avaliação neurológica	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACM: artéria cerebral média
AD : Doença de Alzheimer
AMPA: Ácido amino-3-hidroxi-5-metil-isoxasole-propiônico
ASICs: Canais iônicos sensíveis à acidez
ATP: Trifosfato de Adenosina
CE: Côrtex Entorrinal
Cm: Centímetros
COX : Clicoxygenase
CypD: Cyclophilina D
DNA: Ácido Dexorribonucléico
DP : Doença de Parkinson
eNOS : óxido nítrico sintase endotelial
EPM: Erro Padrão Médio
FO: Falso-operado
FSC: Fluxo sanguíneo cerebral
h : Hora
H2O2, R-OOH, R-OO: Peróxidos
HO: Radical hidroxila
HTAB: Brometo de cetil trimetil amônio
i.p.: Intraperitoneal
ICAM-1: Molécula de adesão intercelular-1
ICAM-1: Molécula de adesão intracelular-1
IL: Interleucina
Kg: Kilograma
LOX : Lipoxigenase
LTP Potenciação de longa duração
mA : Miliampere
Mac-1 : Antigénio de macrófagos-1
MG: Miligramas
Min: Minutos
mL : Mililitros
 mM: Milimolar
NaCl : Cloreto de sódio
NF-κB : Factor nuclear kappa B
Nm: Nanômetro
NMDA: N-Metil-D-Aspartato
nNOS: Óxido nítrico sintase neuronal
NO: Óxido nítrico
O2-: Ânion superóxido
O2-: Superóxido
OCL-: Hipoclorito
ONOO - : peroxinitrito
pMCAO : Oclusão permanente da artéria cerebral média
RIPK : Receptor-Interação de Proteína Kinase
RLs: Espécies reativas ou radicais livres
RN: Necrose Regulada
RNAm : Ácido Ribonucléico mensageiro

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

s : Segundos

SNC : Sistema Nervoso Central

TNF- α : Fator de necrose tumoral- α

TTC: Cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazol

VCAM-1 : Molécula-1 de adesão celular vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Fisiopatologia do AVCi.....	15
1.1.1	Core e penumbra.....	16
1.1.2	Depleção de oxigênio e ATP.....	18
1.1.3	Excitotoxicidade.....	19
1.1.4	Estresse oxidativo.....	20
1.2	Inflamação.....	21
1.3	Tipos de morte neuronal na isquemia.....	24
1.4	Disfunção de memória induzida por isquemia.....	25
1.5	Isquemia Cerebral Focal: Modelos experimentais <i>in vivo</i>.....	27
1.6	Isquemia cerebral e flavonóides.....	28
1.6.1	Fisetina.....	29
1.7	Relevância e justificativa.....	31
2	OBJETIVOS.....	33
2.1	Objetivo geral.....	33
2.2	Objetivo específico.....	33
3	MATERIAIS E METODOS.....	34
3.1	Animais.....	34
3.2	Drogas.....	34
3.3	Protocolo experimental.....	34
3.4	Isquemia cerebral focal por oclusão da artéria cerebral média (pMCAO) (Tamura <i>et al.</i>, 1981).....	36
3.5	Avaliação do infarto isquêmico - Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol (TTC) (Bederson, <i>et al.</i>, 1986).....	36
3.6	Avaliação Neurológica (Garcia <i>et al.</i>, 1995).....	37
3.7	Avaliação da atividade locomotora - Teste do Campo Aberto	38
3.8	Avaliação da memória de trabalho - Teste do labirinto em Y (Sarter <i>et al.</i>, 1988).....	39
3.9	Avaliação da memória episódica – Teste do Reconhecimento de Objetos (Ennaceur; Delacour, 1988).....	40
3.10	Avaliação da memória espacial - Teste do Labirinto Aquático (Morris <i>et</i>	40

<i>al., 1984).....</i>	
3.11 Avaliação da memória aversiva – Teste da Esquiva Passiva (Gold, 1986)	41
3.12 Avaliação da astrogliose através da imunomarcação com GFAP.....	42
3.13 Avaliação da expressão de sinaptofisina através da técnica de Western-blot.....	43
393.14 Ensaio do BDNF.....	44
3.15 Avaliação da imunoreatividade para TNF-α.....	44
3.16 Análise estatística.....	45
4 RESULTADOS.....	46
4.1 Avaliação do dano isquêmico em camundongos submetidos à pMCAO tratados com a fisetina (10, 30 e 50 mg/kg).....	46
4.2 Avaliação neurológica de camundongos submetidos à pMCAO tratados com a fisetina (10, 30 e 50 mg/kg).....	48
4.3 Efeito da Fisetina (10, 30 e 50mg/kg) sobre a atividade locomotora de camundongos submetidos à pMCAO.....	49
4.4 Efeito da Fisetina (10, 30 e 50mg/kg) sobre a memória de trabalho de camundongos submetidos à pMCAO.....	51
4.5 Efeito da Fisetina (10, 30 e 50 mg/kg) sobre a memória episódica avaliada através do teste de reconhecimento de objetos em camundongos submetidos à pMCAO.....	52
4.6 Efeito da Fisetina (10, 30 e 50 mg/kg) sobre a memória espacial de camundongos submetidos à pMCAO.....	53
4.7 Efeito da Fisetina (10, 30 e 50 mg/kg) sobre a memória aversiva de camundongos submetidos à pMCAO.....	56
4.8 Efeito da Fisetina (50mg/kg) sobre a ativação de astrócitos evidenciada através da imunomarcação com GFAP no córtex temporal de camundongos submetidos à pMCAO.....	57
4.9 Efeito da Fisetina (50mg/kg) sobre os níveis de TNF-α no corpo estriado e córtex de camundongos submetidos à pMCAO.....	59
4.10 Efeito da Fisetina (50 mg/kg) sobre a expressão de sinaptofisina no corpo estriado e córtex de camundongos submetidos a pMCAO.....	61
4.11 Efeito da Fisetina sobre os níveis de BDNF no estriado e cortex de camundongos submetidos à pMCAO.....	63

5	DISCUSSÃO.....	65
6	CONCLUSÃO.....	74
7	REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

O acidente Vascular Cerebral (AVC) é caracterizado por um déficit neurológico súbito, ocasionado por processos isquêmicos ou hemorrágicos no sistema nervoso central (SNC). O AVC isquêmico acontece em 85% dos casos, é causado pela oclusão vascular cerebral localizada, principalmente por aterosclerose, que leva a uma interrupção do fluxo sanguíneo e, consequentemente, redução do fornecimento de oxigênio e glicose a sítios cerebrais atingidos. Quando a causa é hemorrágica denomina-se Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico, onde ocorre uma hemorragia intraparenquimatosa (10%) ou uma hemorragia subaracnóidea (5%), devido a um rompimento do endotélio vascular (EUSI, 2003; WOODRUFF *et al.*, 2011; WHO, 2014).

Segundo a OMS, o acidente vascular cerebral (AVC) é a segunda causa de morte no mundo ficando atrás somente da doença cardíaca isquêmica e, no Brasil, está entre as principais causas de morte e incapacidade, trazendo um enorme impacto social e econômico para os cofres públicos. Segundo a Pesquisa Nacional de Saúde em 2015, 1,5% da população teve o diagnóstico de AVC ou derrame, representando, aproximadamente 2,2 milhões de pessoas. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; WHO, 2016). As regiões do Brasil onde observamos mais casos de AVC é a sudeste seguida da região nordeste (DATASUS, 2014).

Até 2050, mais de 1,5 bilhões de pessoas com 65 anos ou mais, serão acometidas pelo AVC e essa perspectiva irá aumentar em paralelo com o envelhecimento da população, causando um custo de 3-7% do total das despesas de saúde em países de alta renda (FEIGIN, 2009).

Os principais fatores de riscos do AVC são hipertensão arterial sistêmica, dislipidemias, sedentarismo, tabagismo, obesidade, diabetes mellitus, idade avançada, hereditariedade, coronariopatia, fibrilação atrial, estenose de carótidas (ZHENG, 2014). O diagnóstico do AVC baseia-se na avaliação neurológica. Geralmente, as vítimas podem apresentar sinais clínicos como déficits motores, alterações na marcha, na fala, nos músculos da face e déficits de memória. Em casos mais graves, o indivíduo pode apresentar convulsão. Entretanto, a tomografia computadorizada (TC) do crânio é o exame padrão ouro para o desfecho de diagnóstico (PERSSON *et al.*, 2014).

Atualmente, a intervenção terapêutica para o AVC isquêmico fundamenta-se na aplicação de agentes antiplaquetários, anticoagulantes e trombolíticos, bem como, procedimento cirúrgico. A administração de um trombolítico, permite a desobstrução da artéria que dissolve o coágulo e libera o fluxo sanguíneo para a área cerebral isquêmica. Esse tratamento deve ser aplicado em até

4 horas e 30 minutos do início dos sintomas, após esse período existe um risco associado a sua utilização, pelo risco de causar hemorragia intracraniana, especialmente em pacientes com isquemias severas ou em idade avançada (VAN DER WORP; VAN DER GIJN, 2007). Isso minimiza as sequelas, ajuda na recuperação do paciente e reduz a taxa de mortalidade. Como agente trombolítico utilizado na terapia do AVC, pode-se destacar o ativador de plasminogênio tecidual recombinante (rtPA). A trombólise endovenosa com rtPA para pacientes com AVC isquêmico agudo é um tratamento com eficácia demonstrada em diversos ensaios clínicos e amplamente recomendado (HACKE *et al.*, 2008).

1.1 Fisiopatologia do AVCi

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 consequente infarto do tecido cerebral suprido pelo vaso ocluído (KAPOSZTA *et al.*, 1999).

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).

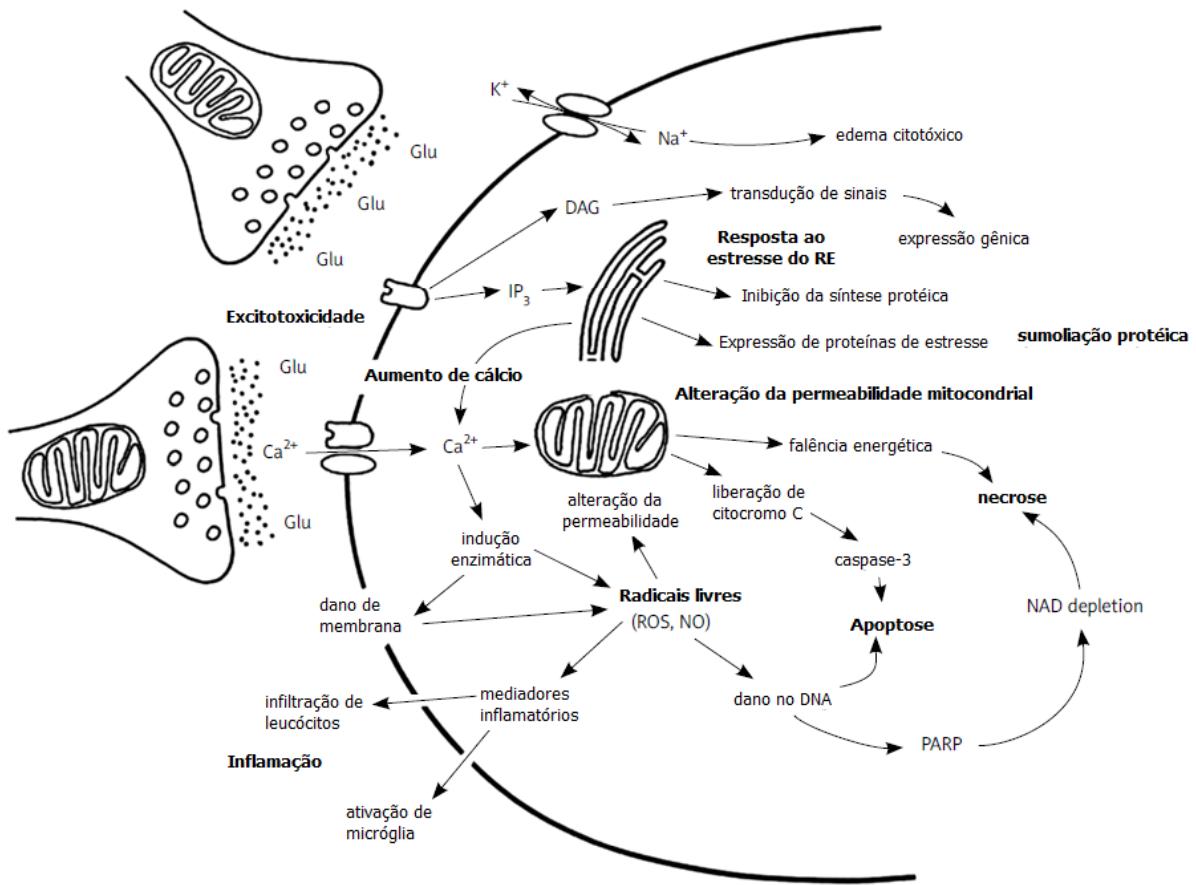


Figura 01 – Cascata isquêmica (Adaptado de HOSSMANN, 2009.)

1.1.1 Core e penumbra

A lesão isquêmica é dividida em duas áreas, o core, ou centro da lesão, região que é irrigada prioritariamente pelo vaso que foi ocluído, e a penumbra, região que circunda o core. O fluxo sanguíneo diminui de forma crucial no core e gradativamente na região de penumbra, onde os neurônios perdem a capacidade de exercer suas funções, porém, permanecem estruturalmente intactos, devido ao fato de ainda existir uma perfusão residual proveniente dos vasos colaterais (LIPTON, 1999; DURUKAN, TATLISUMAK, 2007; BROUNS, DEYN, 2009).

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

O fluxo sanguíneo na região da penumbra se reduz a 20 a 40% do normal e o nível de ATP fica mantido em torno de 50 a 70% do normal, não caindo o suficiente para permitir despolarizações anóxicas. Entretanto, essa região contém neurônios eletricamente silenciosos (que não respondem ao estímulo elétrico), com seus gradientes iônicos intactos. Estes neurônios podem ter suas membranas despolarizadas se o fluxo não for restaurado rapidamente. A lesão nesta região é fundamentalmente reversível, mas o sucesso desta reversão é limitado pelo tempo. A maneira de preservar e evitar o progresso da destruição neuronal nessa região é foco de inúmeras pesquisas (LIPTON, 1999; GREEN *et al*, 2003; HOSSMANN, 2009).

Os neurônios da zona de penumbra podem ser recrutados para a zona central da lesão devido a sinalizadores de morte neuronal liberados pelos neurônios em necrose. O período de tempo deste processo de recrutamento constitui um período crítico, em que a intervenção farmacológica pode bloquear este evento. Esta janela terapêutica corresponde às primeiras 2 a 4 horas que se segue a isquemia, após as quais a eficácia da terapia decresce rapidamente (GILGUN-SHERKI *et al.*, 2002; WEINSTEIN; HONG; SHARP, 2004).

A morte celular generalizada que ocorre na região de core promove perda total da estrutura e da função neuronal, ocorrendo destruição das sinapses, região de comunicação entre os neurônios. O desaparecimento da atividade sináptica é uma das primeiras consequências da isquemia (HOFMEIJER, VAN PUTTEN, 2012). Mesmo após várias semanas, existem poucas evidências de recuperação da região de core da lesão isquêmica. No entanto, na região de penumbra a capacidade de recuperação é maior (BROWN *et al*, 2007; WINSHIP, MURPHY, 2008). Nos modelos animais de AVCi as mudanças na estrutura sináptica dos neurônios da região de penumbra são profundas, mas, muitas vezes, reversíveis (WINSHIP, MURPHY, 2008). Estudos revelam que a perda aguda, menor que 20%, do fluxo sanguíneo provoca uma rápida perda da estrutura dos dendrítos e axônios em neurônios poucos minutos após o início da isquemia (ZHANG *et al*, 2005; MURPHY *et al*, 2008). A sinaptofisina é uma glicoproteína de membrana da vesícula sináptica, que está envolvida no mecanismo de fusão da vesícula pré-sináptica com a membrana, que pode ser utilizada como marcador da sinaptogênese (KOREMATSU *et al*, 1993; BONANOMI, BENFENATI, VALTORTA, 2006).

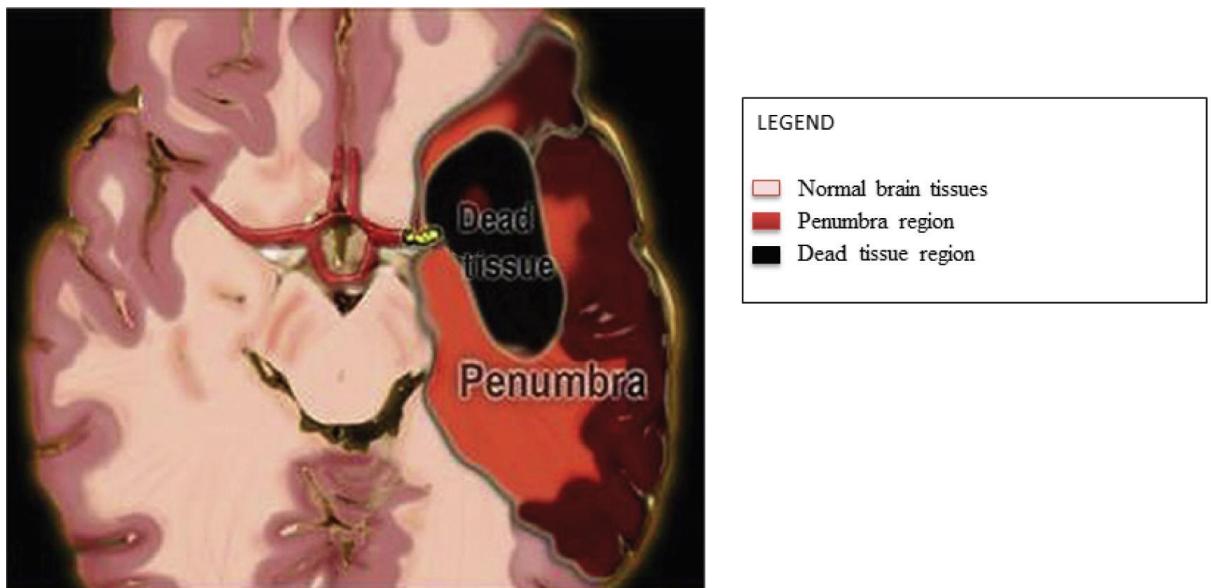


Figura 2: Core e penumbra depois da isquemia (AL-QAZZAZ, 2014)

1.1.2 Depleção de oxigênio e ATP

O cérebro possui alto consumo de glicose e oxigênio, e depende quase que exclusivamente da fosforilação oxidativa como forma de produção de energia. A interrupção do fluxo sanguíneo diminui o aporte de glicose e oxigênio levando à ocorrência da glicólise anaeróbica, que produz ácido láctico que vai se acumulando no interior das células e então diminuindo o pH. A falta de oxigênio e glicose e a acidose celular promovem a diminuição da produção de energia devido à parada da atividade da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, diminuindo a produção de ATP, que mantém o gradiente iônico das células (DIRNAGL, IADECOLA, MOSKOWITZ 1999; SMITH, 2004; DURUKAN, TATLISUMAK, 2007).

A diminuição de ATP intracelular inibe os processos celulares dependente do mesmo (ANDERSON *et al.*, 1996; BIRK *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2014; PEGG, 1986) e provoca falência das bombas transportadoras de íons dependentes de ATP, principalmente da bomba sódio-potássio/ATPase, mas também da bomba cálcio-hidrogênio/ATPase, com consequente aumento na concentração de sódio e cálcio intracelular e de potássio no exterior da célula. Além disso, devido ao aumento de sódio intracelular o simporte de sódio-cálcio é revertido, com maior acúmulo de cálcio no interior da célula (SMITH, 2004; DURUKAN, TATLISUMAK, 2007; BROUNS; DEYN, 2009).

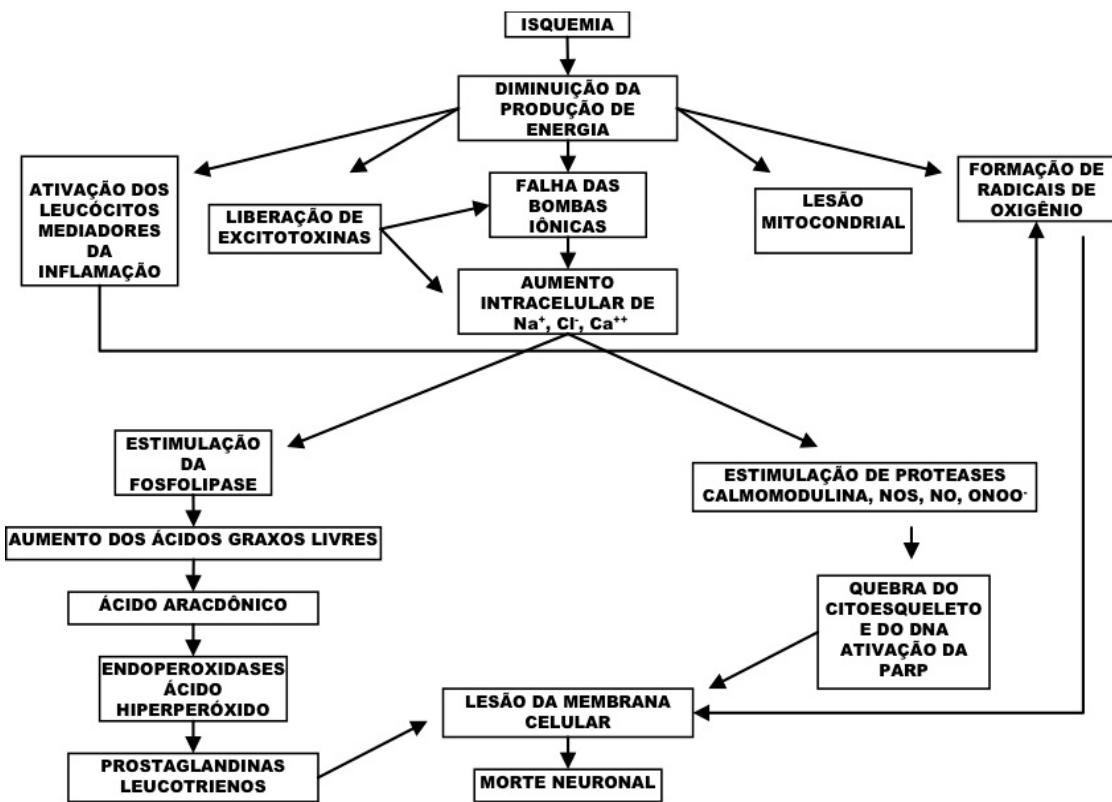


Figura 03 – Mecanismos de lesão neuronal após isquemia. (Adaptado de Traystman, 2003.)

1.1.3 Excitotoxicidade

A excitotoxicidade foi descrito pela primeira vez por John Olney em 1970 (DOBREK, THOR, 2011). É o processo no qual acontece um aumento da liberação de glutamato com consequente super-estimulação dos receptores glutamatérgicos. Diversas patologias como AVC e Doença de Parkinson envolvem a excitotoxicidade em seus mecanismos fisiopatológicos (SATTLER *et al.*, 2001).

O aparecimento de altas concentrações de glutamato e ATP no espaço extracelular é indicativo de danos nos tecidos neuronais. Na isquemia todas as células apresentam altas concentrações intracelulares de glutamato e baixas de ATP (SAYRE *et al.*, 2014; BALTAN, 2014; WANG; LI; DING, 2014). Esses mediadores agem como uma neurotoxina levando a morte celular (OUYANG *et al.*, 2014).

O glutamato no meio extracelular irá se ligar aos seus receptores ionotrópicos, NMDA (N-metil-D-aspartato), que é permeável ao cálcio e em situações fisiológicas seu canal é bloqueado pelo magnésio, e o AMPA/Cainato (ácido α -amino-hidróxi-5-metil-4-isoxazolpropionico) que é permeável ao sódio, potássio e zinco e eventualmente ao cálcio. A ativação destes receptores induz o aumento do influxo de cálcio para dentro da célula (DIRNAGL, IADECOLA, MOSKOWITZ 1999; HOSSMAN, 2009; WANG, MICHAELIS,

2010).

O glutamato também irá se ligar aos seus receptores metabotrópicos, acoplados a proteína G, induzindo a formação de segundos mensageiros como o IP3, que ativa uma via de sinalização promovendo estresse ao retículo endoplasmático e ativando genes que levam a uma adaptação genômica celular (HOSSMAN, 2009). Sendo liberado principalmente de neurônios do core irá exercer sua ação nos neurônios da penumbra e em altas concentrações é capaz de induzir a necrose direta pelo excesso de cálcio intracelular (SMITH, 2004; HOSSMAN, 2009).

1.1.4 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é um desequilíbrio no balanço de moléculas oxidantes e sistema antioxidante fisiológico, produzindo danos celulares. Está envolvido no envelhecimento celular e na fisiopatologia de diversas doenças como aterosclerose, câncer, doenças neurodegenerativas e AVC (ALLEN, BAYRAKTUTAN, 2009; BROUNS, DE DEYN, 2009; PRADEEP *et al*, 2012).

O estresse oxidativo representa um grande desafio para o tecido isquêmico. Esse estresse é, em parte, consequência da excitotoxicidade, resultantes de um aumento dos mensageiros secundários acoplados a geração enzimática de radicais livre. Tais mecanismos podem ser alimentados pelo suprimento de oxigênio que ainda atinge o tecido isquêmico na região da penumbra, particularmente, depois da reperfusão (FUKUYAMA, *et al*, 1998)

O aumento da produção de superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e peróxinitrito ou dióxido de nitrogênio foi mostrado em infiltrados fagocíticos, células vasculares e células da glia (por exemplo, astrócitos, oligodendrócitos e micróglia) na zona de penumbra (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007)

O estresse oxidativo tem um papel deletério na isquemia cerebral. Favorecido pelo aumento de cálcio nas células e, em particular, na mitocôndria, seus mediadores causam a nitratação e oxidação de proteínas, peroxidação lipídica, danos no DNA mitocondrial, ativação ou inibição de várias vias de sinalização que podem favorecer a resposta inflamatória, a apoptose e necrose (CHAMORRO *et al*, 2016)

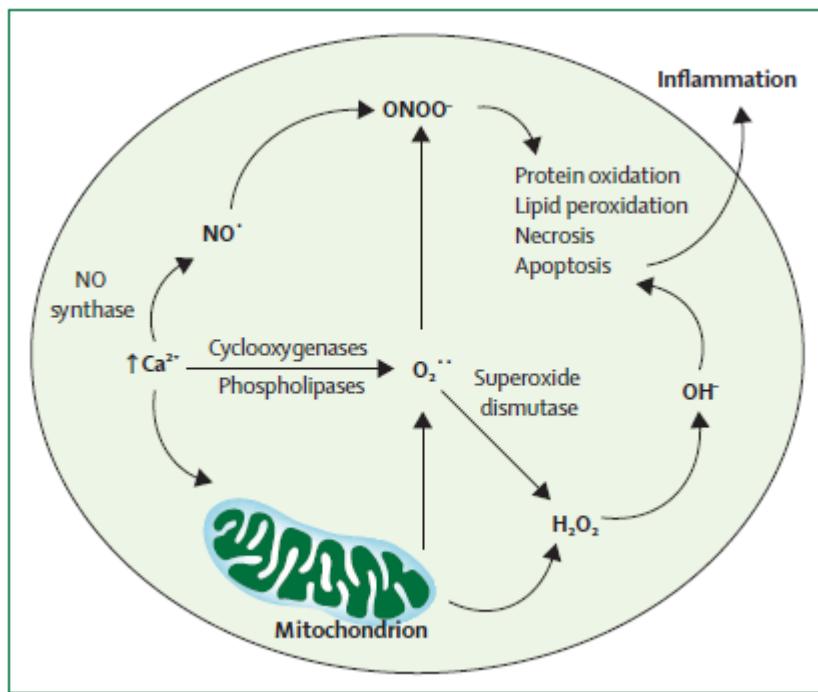


Figura 4: Mediadores do estresse oxidativo (CHAMORRO *et al*, 2016)

1.2 Inflamação

A inflamação é tradicionalmente definida, em termos histológicos, pela presença de células imunes no tecido de interesse. As células inflamatórias têm sido documentadas em amostras de autópias de pacientes que sofreram AVC. As células imunes circundantes ganham acesso ao cérebro isquêmico através de um rápido aumento da expressão das moléculas de adesão (ISHIKAWA,2004)

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). 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 facilitando 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).

A micróglia, macrófagos residentes no SNC, 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 pMCAO, 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).

A expressão do TNF- α têm sido observado em neurônios, astrócitos, além do sistema imunológico periférico (UNO, 1997; OFFNER, 2006). Apresentam um “upregulation” inicial dentro de 1-3 h, após a isquemia e seu pico acontece entre 12-24 h. O TNF- α liberado no estriado leva a uma neurodegeneração, enquanto o que é liberado no hipocampo pode promover a neuroproteção (SRIRAM; O’CALLAGHAN, 2007). TNF- α estimula a apoptose de células endoteliais e contribui para o edema vasogênico e infiltração de células imunes. Por outro lado, o TNF- α ativa processos de reparação da microvasculatura cerebral e medeia a plasticidade neuronal (SRIRAM; O’CALLAGHAN, 2007). A razão para essas disparidades das funções do TNF- α ainda é desconhecida mas existem algumas hipóteses como, o tempo de sua ação, ele parece contribuir para efeitos prejudiciais na fase precoce da resposta inflamatória, mas podem ter efeitos mais benéficos numa fase posterior (AMANTEA, *et al.*, 2009) e seus receptores onde, o TNF- α solúvel que se liga a um receptor primário conduz principalmente a efeitos prejudiciais, enquanto que o TNF- α que se liga a receptor secundário leva a neuroproteção (LAY *et al* 2006; PRADILLO *et al* 2007).

O BDNF, ou fator neurotrófico derivado do cérebro, tem emergido como mediador crucial da plasticidade neuronal, uma vez que é abundante em regiões cerebrais particularmente relevantes para a plasticidade, mas também porque mostra uma regulação dependente da atividade notável da sua expressão e secreção (BRAMHAM, MESSAOUD, 2005). Vários estudos *in vivo* demonstraram que a inflamação claramente afeta a expressão de BDNF no cérebro, em particular, tem sido relatado que a administração

de citocina pró-inflamatória ou do lipopolissacarídeo indutor de citocinas (LPS), faz com que ocorra a redução significante da expressão do gene BDNF (RAETZ; WHITFIELD, 2002).

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 estimuladoras 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 aracídônico a partir dos fosfolipídeos de membrana que é metabolizado pela ácido graxo ciclooxygenase (COX), produzindo prostaglandinas e tromboxanos, ou pela 5-lipoxigenase (LOX) que produz leucotrienos. A COX do tipo 2 está super expressa após a isquemia e exerce efeitos tóxicos (NOGAWA *et al.*, 1997).

O tratamento com antinflamatórios 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, previu a formação de prostaglandinas e diminuiu o dano causado por isquemia cerebral global transitória (GALVÃO *et al.*, 2005).

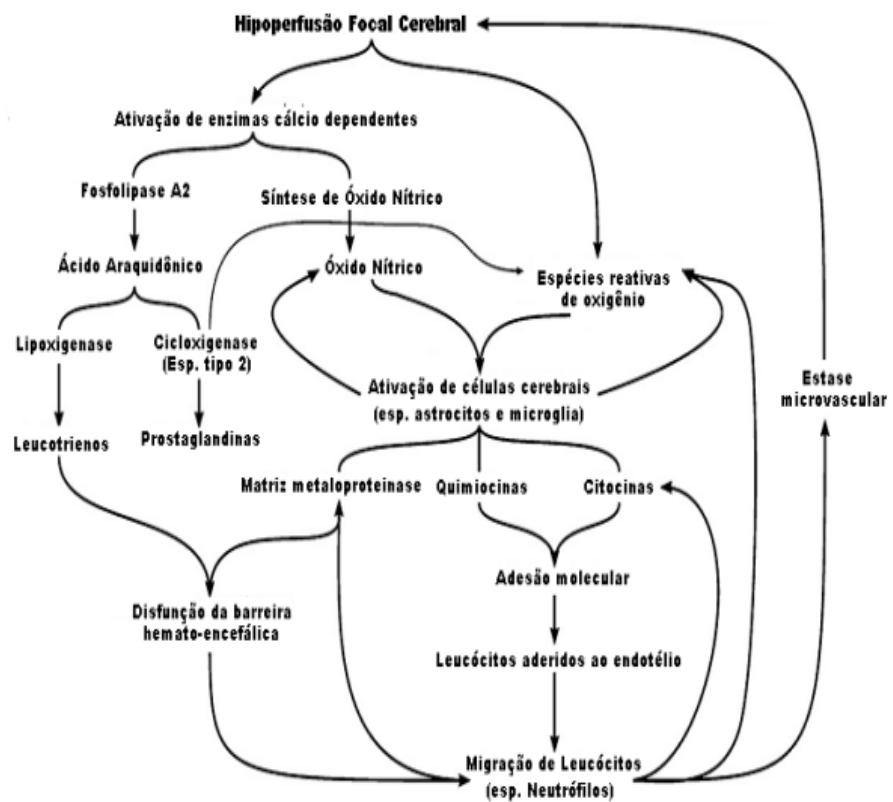


Figura 5- Resposta inflamatória após isquemia cerebral focal (adaptada de BROUNS, DEYN, 2009).

1.3 Tipos de morte neuronal na isquemia

Existem três tipos de morte celular: morte celular autofágica, apoptose/necrose, e a poli (ADPribose) onde a morte celular é mediada por uma polimerase (PARP-1) (DEGTEREV; YUAN, 2008). Cada um tem sua própria bioquímica e características morfológicas e cada um desempenha um papel importante na fisiopatologia. A autofágica tem sido observada em vários modelos de doenças, incluindo modelos de isquemia cardíaca reperfusão em ratos (MATSUI *et al.*, 2007).

A apoptose é um processo geneticamente controlado caracterizado por uma série de perturbações nas vias de sinalização, que contribuem não só para a morte celular mas, também, para a remoção dos fagócitos e prevenção das respostas imunes indesejadas (TAYLOR *et al.*, 2008).

O processo apoptótico tem como principais características a condensação da cromatina, intensa fragmentação do DNA, formação de protuberâncias na membrana plasmática e formação de corpos apoptóticos que serão fagocitados por macrófagos (LOVE, 2003). Esse processo é dependente de energia. A morte celular programada é realizada por uma numerosa

família de proteases de cisteína altamente específicas conhecidas como caspases, que se encontram inativas nas células normais, mas são ativadas pelos sinais apoptóticos (DANIAL; KORSMEYER, 2004; GHOBRIAL; WITZIG; ADJEI, 2005; STRASSER; O'CONNOR; DIXIT, 2000).

A necrose é um processo passivo, onde a célula responde ao estresse externo de uma forma aleatória e descoordenada. Hoje, é evidente que os mecanismos de morte celular vão além da simples relação apoptose e necrose. Pesquisadores clássicos da morte celular relatam a existência de novos modos de regulação da morte celular, mas que devido a sua complexidade ainda não foram descritos (DEGTEREV; YUAN, 2008). A administração do inibidor necrose/apoptose, o Nec-1 fornece proteção tecidual significativa e melhoramentos de uma variedade de lesões agudas do tecidual em modelos isquemia/reperfusão em ratos com lesão por mecanismos de inibição da apoptose (SMITH *et al.*, 2007).

O excesso de ação da poli (ADP-ribosil) em resposta a danos no DNA também pode levar à morte celular numa série de situações, como o acidente vascular cerebral, lesão cerebral traumática, e lesão de isquemia/reperfusão em vários órgãos (ANDRABI *et al.*, 2008). Assim, os inibidores da PARP-1 podem fornecer proteção em ratos submetidos ao modelo de lesão de isquemia e reperfusão (MARTIN *et al.*, 2000), doenças inflamatórias (MIESEL; KURPISZ; KRÖGER, 1995), neurodegeneração (COSI; MARIEN, 1999) e diabetes (PIEPER *et al.*, 1999).

1.4 Disfunção de memória induzida por isquemia

A memória é a aquisição (ou aprendizagem), a conservação e a evocação (recordação, lembrança, recuperação) de informações (IZQUIERDO *et al.*, 2002). Origina de um processo evolutivo que permite aos animais adquirir, reter e evocar diversos tipos de informação que conferem alguma vantagem por comparar situações presentes com experiências prévias (SHERRY; SCHACTER, 1987).

É um processo ativo e dependente de algumas variáveis como o meio e as experiências anteriores. O estado emocional desempenha um papel de filtro na retenção da memória (MCEWEN, SAPOLSKY, 1995). A memória é conceitualmente dividida em dois tipos: “declarativa” e “não declarativa” (TARIOT *et al.*, 1987; IZQUIERDO *et al.*, 1992).

A memória declarativa também denominada de memória explícita está relacionada com fatos (memória semântica) e experiências pessoais (memória episódica) que requer a ação do lobo temporal medial (hipocampo e regiões anatomicamente próximas como o córtex entorrinal, peririnal) e córtex parahipocampal em conexão com córtex (SQUIRE; ZOLA-

MORGAN, 1996; KANDEL; SQUIRE, 2000. KANDEL, 2009). A memória recente, ou de curto prazo, está relacionada a eventos que ocorrem em um período de horas ou dias e representa o armazenamento temporário de informação que é utilizado para planejar uma ação (SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1996. KANDEL; KANDEL; ABEL, 1995; KANDEL, 2009).

A memória implícita (inconsciente) é constantemente definida como um fenômeno não explícito da memória consciente. Isso mostra as incertezas presentes no entendimento deste tipo de memória. A memória é caracterizada como sendo um comportamento, porque alguns fatos mostraram que a memória é obtida através da medição de uma mudança no comportamento após a formação dessa memória. A memória pode ser ainda melhor conceituada baseada nas mudanças que ocorrem nas conexões sinápticas no cérebro. Essas alterações produzem uma mudança cerebral, que por sua vez pode ser definida como memória (MUTSO *et al.*, 2014), e que é o resultado final de uma série de eventos neurofisiológicos associados com perturbações na eletrofisiologia (LEGA; JACOBS; KAHANA, 2012). As regiões do cérebro relacionadas com à memória de procedimento ou implícita, são o cerebelo, estriado e a amígdala, que está envolvida com a percepção, habilidade motora e outras formas de memória não declarativa (KANDEL, 2009).

A definição da memória humana vem evoluindo ao longo tempo, de acordo com a neurofisiologia da memória. Embora não exista dúvida que o hipocampo é fundamental para a codificação de uma nova memória consciente (episódica), o seu papel na recuperação dessas memórias, e a possibilidade de reconsolidação dessas memórias recuperadas, ainda estão sendo investigadas (EICHENBAUM, 2000). Além disso, o hipocampo parece participar em processos independentes da consciência (HENKE, 2010; PARK *et al.*, 2004).

Nos seres humanos, as lesões nas regiões CA1 / Subículo ou hipocampo bilateral que levam a reduções de volume de mais de 30% são suficientes para causar amnésia grave, incluindo tanto comprometimento da memória episódica como espacial (REMPEL-CLOWER, 1996; VARGHA-KHADEM *et al.*, 2007). Estudos utilizando como base, algumas lesões em primatas, mostrou que o córtex perirrinal é crítico para a memória episódica (MEUNIER *et al.*, 1993, MALKOVA; MISHKIN, 2013).

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 *et al.*, 1992).

Um estudo mostrou que neurônios-grade foram encontradas no córtex entorinal de primatas (JEFFRIES; KILLIAN; PEZARIS, 2013). Esta é uma região onde as informações são altamente processadas a partir de várias modalidades sensoriais e que, em roedores, a

divisão medial do córtex entorrinal contém neurônios-grade de alta resolução e parece formar parte de um percurso espacial, semelhante ao espaço-caudal via hipocampo entorrinal-posterior que é importante para o processamento e consolidação de informações espaciais (MAVIEL *et al.*, 2004; CZAJKOWSKI *et al.*, 2014).

O córtex frontal age como um local de execução e de controle das várias interações que ocorrem nas áreas corticais e subcorticais das funções cognitivos e emocionais e do comportamento motor em vez de ser um dos depósitos finais de memórias de longo prazo. A organização anatómica e funcional do hipocampo e as interações entre a formação tálamo-frontal, são de fundamental importância, e exigem mais pesquisas (AGGLETON; BROWN, 1999). O córtex frontal como um todo, e mais especificamente as áreas frontal medial, especialmente a área infralimbica, área prelimbica, e a area anterior ao córtex cingulado, parecem os responsáveis pelo circuito talâmico e límbico, que é critica para a memória episódica declarativa em diferentes espécies (NIEUWENHUIS; TAKASHIMA, 2010). Estudos mostraram que o córtex retrosplenial tem conexões com o núcleo dorso-lateral do tálamo, mas as conexões entre as áreas relacionadas com a memória espaciais e o córtex pré-frontal dorsolateral por intermédio do tálamo ainda são pouco conhecidos (AGGLETON, 2014). Outros autores mostraram que o córtex pré-frontal lateral é importante para a memória de trabalho (BLUMENFELD; RANGANATH, 2007), enquanto o córtex frontal medial está relacionado com a consolidação da memória (VAN KESTEREN *et al.*, 2013).

Alguns tipos de agressão como o estresse oxidativo, inflamação, excitotoxicidade, levam a perda de memória devido à neurodegeneração cerebral. Todos esses processos estão presentes nas doenças neurodegenerativas e AVC. Grande parte das vítimas de AVC sofrem com problemas de memória e dificuldades na execução das tarefas diárias (HATTORI, 2000; MAUD, 2006).

Vários autores têm detectado distúrbios na aquisição da memória após oclusão da artéria cerebral média em animais usando testes como esquiva passiva e labirintos .(SANDSTROM; ROWAN, 2007; MUMBY *et al.*, 1996; PLAMONDON; MORIN; CHARRON, 2006). A isquemia ocasiona déficits na memória operacional, acessada através de tarefas de reconhecimentos de objetos e lugares (MUMBY *et al.*, 1996)

1.5 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).

1.8 Isquemia cerebral e flavonóides

Estudos 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 isquemico (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; SPENCER; RICE-EVANS, 2004; SPENCER, 2008). Já foi demonstrado, por exemplo, os efeitos benéficos do chá verde, mirtilo e *Ginkgo 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 (WANG *et al.*, 2007; HATTIANGADY *et al.*, 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; CASTELLO; COTMAN, 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 flavonóides, e por estruturas mais complexas como ligninas, melaninas e taninos (SOOBRATTEE, 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 (KIZILTEPE *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2005; SIMONYI *et al.*, 2005; SOUZA, 2012).

1.8.1 Fisetina

A fisetina (3,3,4,7-tetrahidroxiflavona) é um flavonóide pertencente ao subgrupo flavonol, encontrado em diversas frutas e vegetais, tais como morango, maçã, uva, cebola e pepino, tem peso molecular de 286,24 g/mol e fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_6$ é solúvel em etanol e dimetilsulfóxido (DMSO) (ARAI *et al.*, 2000).

Quando administrada via intravenosa, a fisetina foi rápida e extensivamente metabolizada por conjugação no fígado, principalmente por sulfatação e, quando por via oral, ela também é rapidamente metabolizada em sulfatos e glicuronídeos mas ocorrendo menos sulfatação quando comparamos com a administração intravenosa (SHIA, *et al*, 2009)

Assim como outros flavonoides a fisetina apresenta ação antioxidante tanto por varrer/sequestrar radicais livres como por sua ação indireta, modulando por exemplo a via de sinalização Nrf-2 (*NF-E2-related factors2*)/ARE (*antioxidant responsive element*). A ativação de genes alvos do Nrf-2, em particular o HO-1 (*heme-oxygenase-1*), em astrócitos e neurônios é altamente eficaz na proteção contra o estresse oxidativo, inflamação e morte celular (BURDO *et al.*, 2008). Sua capacidade de aumentar os níveis de GSH confere uma neuroproteção contra o glutamato na injúria pois este, diminui os níveis de GSH por inibir a captação da cistina que é necessária para a produção do GSH (ISHIGE; SCHUBERT; SAGARA, 2001). Além disso, tem atividade anti-inflamatória por inibir a atividade da 5-lipoxigenase, reduzindo desse modo a produção de peróxidos lipídicos (MAHER, 2009) e também por inibir a via de sinalização PI3K/AKT/NF-KB que está associada a inflamação, sobrevivência celular e proliferação (PAL *et al*, 2015)

Estudos *in vivo* e *in vitro* indicaram que a fisetina possui propriedade antiproliferativas contra vários cânceres, como câncer no pâncreas, próstata, cólon e melanoma (SYED *et al*, 2008; SYED *et al*, 2011; MURTAZA *et al*, 2009; SZLISZKA *et al*, 2011; KUNTZ; WENZEL; DANIEL, 1999). A fisetina pode reduzir a angiogênese e, consequentemente, suprimir o crescimento do tumor através da inibição do ativador de plasminogênio urokinase (uPA) (JANKUN *et al.*, 2006).

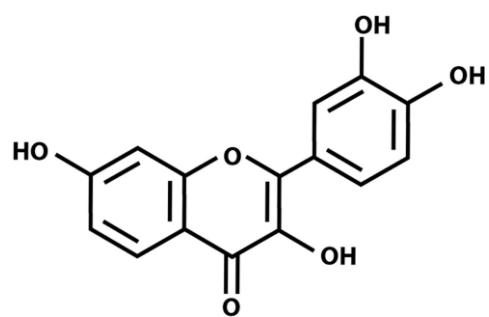


Figura 6. Estrutura da fisetina.

Maher e colaboradores (2006) demonstraram que a fisetina (20mg/kg v.o.) melhorou a

capacidade mnemônica de camundongos quando administrada agudamente por via oral assim como promoveu a potencialização da LTP através da ativação de ERK e fosforilação de CREB em fatias de hipocampo. Através da ativação da via ERK/JNK a fisetina melhorou o desempenho motor e diminuiu a mortalidade em modelo de doença de Huntington (MAHER *et al.* 2011).

A fisetina (15mg/kg v.o.) foi eficaz na profilaxia e no tratamento de alterações motora e de memória em modelo de neurotoxicidade induzida por alumínio. Seus efeitos foram mediados pela diminuição do estresse oxidativo, da inflamação e da morte neuronal (PRAKASH; GOPINATH; SUDHANDIRAN, 2012).

1.9 Relevância e justificativa

O AVC é a principal causa de incapacidade, fazendo com que as pessoas acometidas, em muitos casos, dependa 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, na população Brasileira, ainda possui altas taxas de mortalidades 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.

A Fisetina é uma droga promissora devido seus efeitos antiinflamatórios e antioxidante (ARAI *et al*, 2000) e por ser administrada via oral e três horas após a indução da isquemia é uma estratégia que simula a condição do AVC e o tempo de socorro do paciente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos da Fisetina sobre o dano neuronal e memória e resposta inflamatória de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente.

2.2 Objetivos Específicos

- Prevenir o dano neuronal e déficits de memória nos animais isquemados, pelo tratamento da Fisetina.
- Avaliar o efeito da Fisetina sobre a resposta inflamatória através da imunofluorescência do GFAP no córtex temporal e corpo estriado e através da quantificação do TNF- α .
- Avalia o efeito da Fisetina sobre a sinaptogênese através da quantificação do BDNF por ELISA em camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente. .
- Avaliar o efeito da Fisetina sobre as sinapses através da quantificação de sinaptofisina por Western Blot no corpo estriado e córtex de camundongos submetidos à pMCAO.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos adultos Swiss, machos, pesando entre 30 e 35g, provenientes do biotério central do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC) e 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 maravalhas, com ciclo de claro/escuro de 12h/12h e alimentados com ração padrão e água à vontade.

Em relação aos cuidados com os animais, este estudo seguiu os princípios éticos da experimentação animal, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para uso de animais (CEUA) da UFC sob o número de registro 26/2015.

3.2 Drogas

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

3.3 Protocolo experimental

Foram utilizados 96 animais divididos entre os grupos falso-operados, tratados com veículo (Tween 3%+salina) ou fisetina (FIS) na dose de 50 mg/kg, isquemeados tratados com veículo e isquemeados tratados com FIS nas doses de 10, 30, e 50 mg/kg via oral.

Os animais foram tratados com a Fisetina 3 horas depois da eletrocauterização da pMCAO. Nos dias que se seguiram a cirurgia, as doses de 10, 30 e 50 mg/kg foram administradas 1 vez ao dia até o último dia de teste. As concentrações da Fisetina foram escolhidas baseadas em estudos anteriores (GERLDEBLOM *et al*, 2012; MAHER *et al*, 2006; SHIA *et al*, 2009; MAHER *et al*, 2007)

Para a realização dos testes comportamentais foram seguidos três protocolos experimentais. Protocolo 1: 24 horas após a cirurgia foi realizada a avaliação neurológica e 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=8/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, 96 horas após foi realizado o teste de reconhecimento de objetos, e 120 horas após foi realizada a retenção do labirinto aquático (n=8/grupo). Ao final do protocolo 3 os animais foram perfundidos com paraformaldeído 4% e seus cérebros fixados com formol tamponado, sendo depois feito imunohistoquímica para GFAP, TNF- α com os cortes histológicos.

Tabela 1 – Grupos de tratamento.

Grupo	Tratamento
FO	Animais falso operados e tratados com veículo (salina) v.o.
FO + FIS50	Animais falso operados e tratados com FIS na dose de 50 mg/kg v.o.
pMCAO	Animais submetidos a pMCAO tratados com veículo v.o.
pMCAO + FIS 10	Animais submetidos a pMCAO tratados com 10 mg/kg de FIS v.o.
pMCAO + FIS 30	Animais submetidos a pMCAO tratados com 30 mg/kg de FIS v.o.
pMCAO + FIS 50	Animais submetidos a pMCAO tratados com 50 mg/kg de FIS v.o.

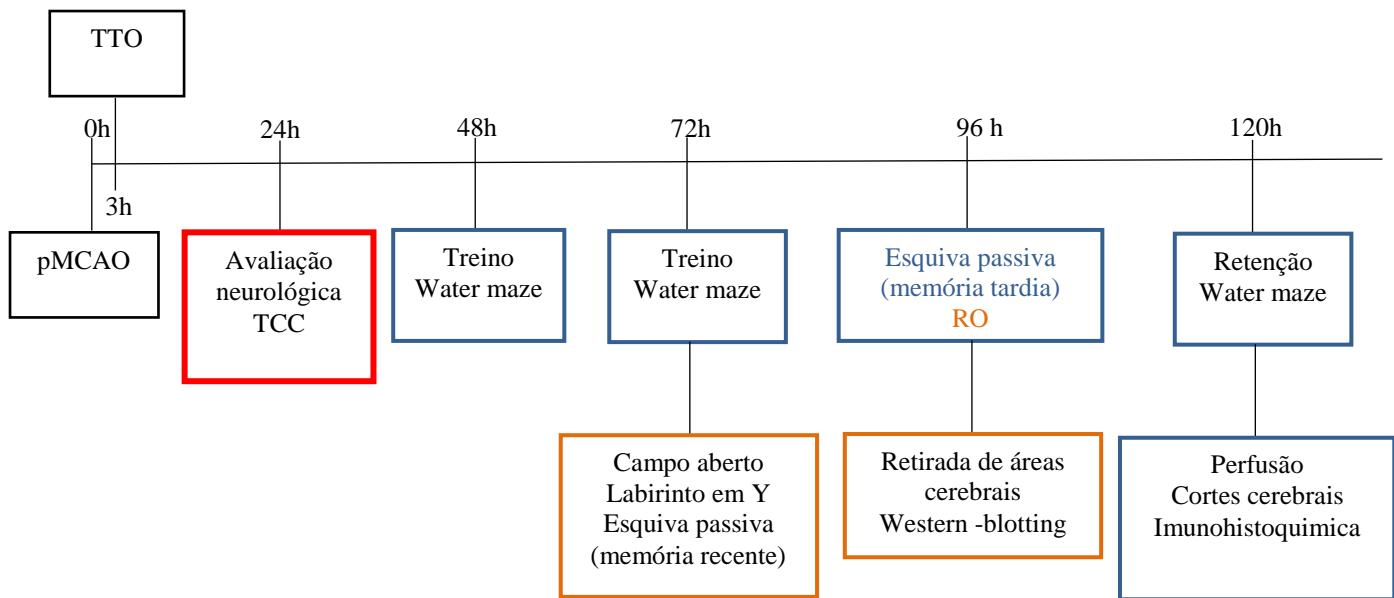


Figura 07 – Protocolo experimental.

3.4 Isquemia cerebral focal por oclusão da artéria cerebral média (pMCAO) (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 37º C com o auxílio de uma lâmpada incandescente.

Inicialmente foi realizada uma incisão na linha entre o olho esquerdo e a orelha, o músculo temporal foi dissecado e, posteriormente, realizada uma craniectomia com uma broca odontológica de 1 (mm), seguido da exposição e eletrocauterização da artéria cerebral média. Em seguida a incisão foi suturada com fio de seda agulhado 4,0, e os animais foram colocados em gaiolas para recuperação da cirurgia com livre acesso a água e comida. Os animais falso-operados (FO) foram submetidos aos procedimentos descritos para isquemia, exceto a eletrocauterização da artéria cerebral média (Figura 07).

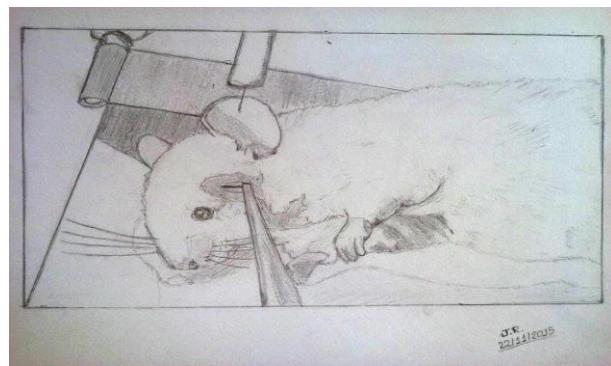


Figura 08: Eletrocauterização da artéria cerebral média

Arte: Jéssica Rabelo

3.5 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 com a cor normal do tecido cerebral.

Vinte e quatro horas após a isquemia os animais foram eutanasiados, decapitados e seus cérebros foram removidos, cortados e conservados em salina gelada até o momento da

coloração, os cérebros foram fatiados na espessura de 2 mm e imersos em solução de 2% de TTC à 37°C por 30 minutos. Em seguida, as fatias tiveram suas imagens digitalizadas em alta resolução, sendo analisadas as áreas de infarto e as áreas totais para os cálculos das respectivas percentagens. Tal metragem foi realizada utilizando-se o software ImageJ.

3.6 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 de subir e agarrar firmemente uma grade de ferro ou de fazer movimentos circulares; a propriocepção corpórea na qual o animal é tocado com uma pinça em ambos os lados do corpo 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.

Tabela 2 – Escala utilizada para a avaliação neurológica.

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 dos três lados da caixa	Animal se movimenta, mas não se aproxima dos três lados da caixa
Simetria do movimento das quatro patas	Contralateral: Sem movimento	Contralateral: raros movimentos	Contralateral: Movimentos lentos	Ambos os lados se movem simetricamente
Estiramento das patas dianteiras	Contralateral: raros movimentos	Contralateral: Movimentos lentos	Ambos os lados se movem simetricamente
Escalada/ Prensão	Animal falhou em escalar e exibiu movimentos circulares	Contralateral com dificuldade de subir e garrar a grade	Animal escala normalmente e agarra a grade
Propriocepção corpórea	Contralateral: Sem resposta	Contralateral < ipsilateral	Resposta simétrica
Resposta ao toque da vibrissa	Contralateral: Sem resposta	Contralateral < ipsilateral	Resposta simétrica

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

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

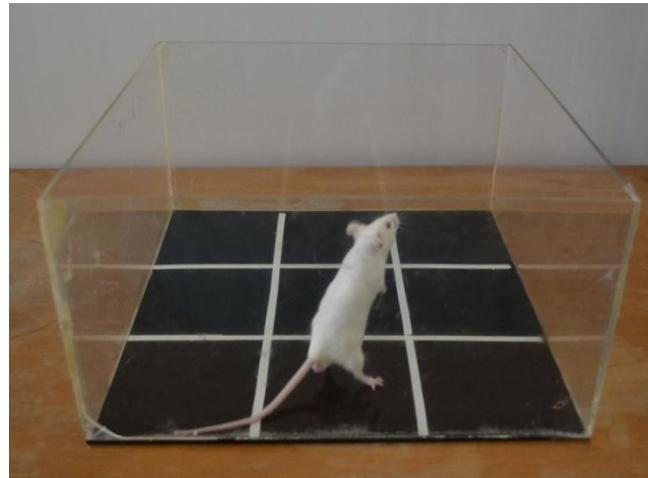


Figura 09 – Arena do Campo Aberto

Fonte: LNC

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

A memória operacional ou de trabalho foi avaliada através do teste do labirinto em Y. 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 10). Nesse teste, o animal é colocado no labirinto e deixado explorar por 8 minutos (Sarter *et al.*, 1988). Os animais apresentam forte tendência de alternar a entrada nos diferentes ambientes.



Figura 10 - Labirinto em Y.

Fonte: LNC.

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

fórmula matemática:

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

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

3.9 Avaliação da memória episódica – Teste do Reconhecimento de Objetos (ENNACEUR; DELACOUR, 1988).

O teste de reconhecimento de objetos é baseado na tendência natural dos animais buscarem o novo. Durante o treino o animal foi colocado numa arena quadrada (30 x 30 x 15 cm) de acrílico preto contendo dois objetos iguais (OI) e, durante 10 min, ele podia explorar o ambiente e os objetos (Figura 09A). Após 1h, um dos objetos iguais foi substituído pelo objeto novo (ON) e o animal foi colocado novamente na arena (teste) (Figura 09B). Durante 5 min o tempo que o animal utilizou explorando cada um dos objetos foi anotado. O resultado foi expresso como índice de reconhecimento e foi obtido através da seguinte fórmula matemática: (tempo ON – tempo OI) / (tempo ON + tempo OI).

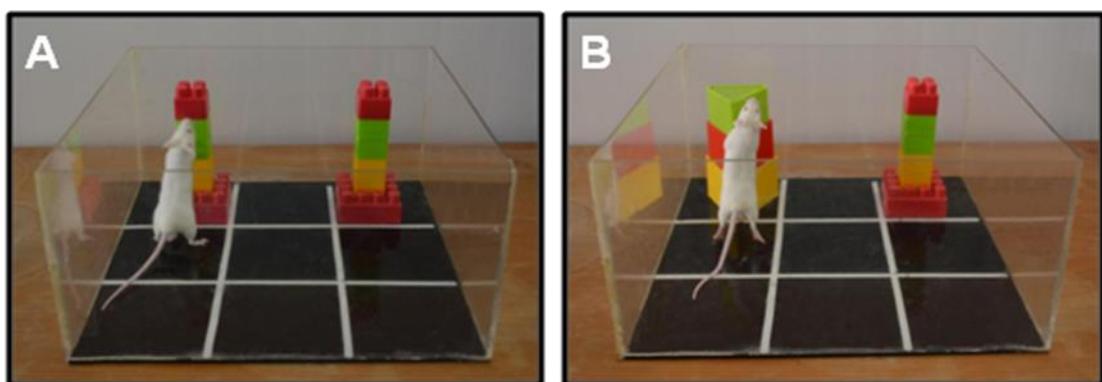


Figura 11: Arena com objetos

Fonte: LNC.

3.10 Avaliação da memória espacial - Teste do Labirinto Aquático (MORRIS, 1984)

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

O animal foi colocado de forma aleatória em uma piscina circular (90 cm de diâmetro e 60 cm de profundidade) contendo água turva (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 (que permaneceu no mesmo local em todos os treinos) e lá permaneceu por 10s. Este treino foi realizado quatro vezes por dia com intervalos de 30s entre os treinos, durante dois dias (aprendizagem) e 48h após o último treino, os animais foram submetidos ao teste, agora sem a plataforma, onde foi avaliada a aquisição da memória. Na ocasião, o animal permaneceu na piscina por 60s e foi registrado o tempo em que o animal 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 12: Labirinto aquático

Fonte: LNC

3.11 Avaliação da memória aversiva – Teste da Esquiva Passiva (GOLD, 1986)

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

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 recebe o choque.



Figura 13: Aparelho de Esquiva Passiva.

Fonte: Insight LTDA.

3.14 Avaliação da astrogliose através da imunomarcação com GFAP

As células da glia são células imunocompetentes do cérebro, ativadas durante a morte neuronal e instruídas para remover os resíduos no sítio da injúria, mas esta ativação pode ser uma fonte para a morte neuronal adicional (CICCHETTI *et al.*, 2002). Assim a avaliação da ativação de astrócitos foi feito pela imunomarcação com o anticorpo para GFAP (Glial fibrillary acidic protein).

Os animais foram perfundidos através do ventrículo esquerdo com salina gelada, seguido de paraformaldeído a 4% em PBS. Os cérebros foram removidos e pós-fixados com formol tamponado por 24 horas, após esse período foram armazenados em solução crioprotetora de sacarose a 30% em geladeira. O tecido foi cortado no criostato fatias de 20 μm armazenadas em placa de 24 poços com solução tampão PBS e azida sódica.

As fatias foram lavadas três vezes em PBS por 5 min e depois simultaneamente permeabilizadas e bloqueadas com TBS (0,05 M Tampão Trizma base com 150 mM de NaCl, pH 7,2) contendo 0,2 % Triton X-100 e 10 % de soro de cabra, por 1 hora a temperatura ambiente (TA). Em seguida, foram incubadas, free-floating, com o anticorpo primário preparado em solução de bloqueio (anti-GFAP, 1:500, rabbit polyclonal, Sigma-Aldrich, Portugal) overnight a TA e depois lavadas 3 vezes por 10 min cada em PBS. Posteriormente,

foi realizada a incubação por 2 horas em TA com o anticorpo secundário (goat anti-rabbit), conjugado com o fluorocromo Alexa Fluor 594 (Invitrogen, Portugal), diluído a 1:200 em solução de bloqueio. Após serem lavadas mais 3 vezes em PBS e serem contracoradas com DAPI (Vector Laboratories, UK), as fatias foram montadas em lâminas gelatinizadas usando o meio de montagem DPX e deixadas secar protegidas da luz. A visualização foi realizada no microscópio de fluorescência Zeiss Axiovert 200 (Axiovision software 4.6, PG-Hitec, Portugal).

3.15. Avaliação da expressão de sinaptofisina através da técnica de Western-blot

Tecidos do corpo estriado e do córtex foram homogeneizadas separadamente em 5 mL de tampão de sacarose 32 mM, EDTA 1 mM, Hepes 10 mM e BSA 1 mg/mL, usando um pistão de vidro (potter). Os homogenatos foram centrifugados a 3.000g durante 10 min a 4°C, para remoção de *debris*. O sobrenadante foi submetido a uma nova centrifugação de 14.000 g durante 12 min a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspensionado em 1mL de solução de Percoll a 45% seguido de nova centrifugação a 20.000 g por 2 min. Após a centrifugação foi coletado o que ficou em suspensão no Percoll e submetido a duas centrifugações sucessivas em KHR a 20.000 g por 2 min. Os pellets resultantes foram ressuspensionados em 50 µL de SDS a 5% com inibidor de protease. 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 adicionadas a um tampão de amostra – (Tris 125 mM, glicerol 20%, DTT 100 mM, SDS 4%, e de Azul de Bromofenol 0,02% -) após a quantificação de proteína. Em seguida aquecidas a 90°C durante 5 min. Quantidades iguais de proteínas totais (15 µg por linha) foram separadas em SDS-PAGE (gel a 12,5 %), utilizando-se o sistema *Mini Protean®3Cell* (Bio-Rad, EUA), sendo eletricamente transferidas as membranas de PVDF (Bio-Rad, EUA). As membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 5% em TBS-T por 1 hora e incubadas *overnight* os anticorpos primários anti- α tubulina produzida em camundongo (1:4000; Sigma, MO), anti-sinaptofisina produzida em coelho (1:2000; Santa Cruz Biotechnology, CA).

A seguir, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com anticorpos secundários *goat anti-rabbit* e *goat anti-mouse* (*horseradish-peroxidase conjugated*, 1:3300; Bio-Rad, EUA 1:2000; Sigma, MO), respectivamente por 1 hora.

Após a incubação com os anticorpos secundários as membranas foram lavadas

duas vezes com o TBS-T e incubadas com com ECL (*Enhanced Chemiluminescent substrate*, Bio Rad.) por cerca de 5 minutos, sendo finalmente detectadas e analisadas pelos softwares Molecular Imager VersaDoc e Quantity One (Bio Rad), respectivamente. O valor final foi expresso pela razão da sinaptofisina pela α -tubulina.

3.16 Ensaio do BDNF

Seis animais de cada grupo foram eutanasiados após 120 h da pMCAO o hipocampo e o corpo estriado foram removidos. As amostras de cérebro foram homogeneizados (10% v / v) numa solução de tampão de fosfato (PBS) (50 mM, pH 6,0) contendo inibidores de protease (Sigma-Aldrich, EUA). Os homogenatos foram centrifugados a 14.000 g, 4°C, durante 30 min, e as concentrações de BDNF no sobrenadante foram medidas com o kit ELISA (Quantikine®Elisa R & D Systems), de acordo com as instruções dos fabricantes.

3.17 Avaliação da imunoreatividade para TNF- α

Cinco dias após pMCAO, os animais (n=4/grupo), foram anestesiados com xilazina (10mg/kg) e ketamina (90mg/kg) por via intraperitoneal e perfundidos transcardialmente com salina, seguido por paraformaldeído a 4% em PBS. Os cérebros foram removidos e fixados com formol tamponado durante 24 h e armazenados em sacarose a 30% (4°C), até a realização dos cortes. Os cortes coronais do córtex e estriado foram feitos em um criostato (Leica CM3050 S, Heidelberg, Alemanha) a -21 °C, e armazenados free floating em PBS (4°C) numa série de “um em seis” de 50 mm (300 mm de intervalo).

Para a realização da técnica de imunohistoquímica, as fatias cerebrais foram lavadas três vezes durante 10 min (cada) com PBS e incubadas (PBS + 10% de metanol e 1,05% de peróxido de hidrogênio), durante 40 minutos à temperatura ambiente, para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Depois de lavar 3 vezes durante 10 min (cada) com PBS e tendo bloqueadas as ligações inespecíficas com soro normal de cabra em PBS a 10% suplementado com Triton X-100 (solução de bloqueio) durante duas horas à temperatura ambiente, as secções foram incubadas com os anticorpos primários (anti-TNF- α , 1: 250 ou anti-iNOS, 1: 400, Santa Cruz Biotechnology) diluída em solução de bloqueio a 4°C durante 48 h. As secções foram então lavadas três vezes durante 10 min, em PBS e subsequentemente incubadas com conjugado de avidina-biotina-peroxidase (coloração Sistema ABC, Santa Cruz Biotechnology), durante 30 min. Após a lavagem, as lâminas foram incubadas com anticorpo de cabra anti-coelho biotinilado (anticorpo secundário), diluído 1:500 em solução de bloqueio.

Como revelador foi utilizado o DAB. As fatias foram montadas em entellan (Merck, Alemanha), e visualizadas sob um microscópio (Nikon Elipse E200) com aumento de 400x. Foram selecionadas três fatias de cada animal, aleatoriamente, ao longo da área da lesão e a quantificação das células foi realizada utilizando o software Image J (NIH, Bethesda , MD, EUA). As células foram consideradas positivas para TNF- α quando apresentaram uma coloração acastanhada. Os resultados foram expressos por densitometria óptica.

3.18 Análise estatística

Antes da realização dos testes estatísticos foi realizado o teste de normalidade para todos os dados. O teste de Bonferroni foi realizado para análise dentro do grupo na avaliação da memória aversiva. Para avaliar o TTC e o Aprendizado do labirinto aquático foi utilizado Man-Whitney para comparação entre 2 grupos. Para avaliação dos escores neurológicos, Y-maze e Reconhecimento de objetos foram utilizados os testes de Kruskall-Wallis seguido do teste de Dunn e os valores expressos em mediana (mínimo e máximo). Para a análise do GFAP, BDNF, Esquiva, Labirinto aquático e Campo Aberto foi realizado teste ANOVA seguido do teste de Newman Keuls. Para a análise da expressão de sinaptofisina foi realizado teste *t*. O critério de significância utilizado foi de $p < 0,05$. O programa de computador usado foi Graph Pad Instat® 5.0.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito da fisetina (10, 30 e 50 mg/kg) sobre a avaliação do dano isquêmico em camundongos submetidos à pMCAO.

Os animais submetidos à pMCAO apresentaram dano isquêmico observado através medida da porcentagem de áreas sem coloração como podemos observar na figura 13. A porcentagem de área isquêmica foi maior nos animais isquemados em relação aos animais falso-operados (FO: 1,0 (0,0-1,0) %; pMCAO: 12,0 (6,0-16,0) %). O tratamento com a fisetina na dose de 50mg/kg conseguiu diminuir a área isquêmica quando comparamos com os animais isquemados (FIS10: 6,0 (4,0-24,0) %; FIS30: 10,5 (9,5,0-12,0) %; FIS50: 6,0 (2,0-12,0) %) (Figura 15).

Figura 14. Fotografia das fatias cerebrais submetidas à coloração com TTC 1 %. As áreas isquêmicas, nas quais as células não são mais viáveis (com enzimas inativas) correspondem às regiões pálidas, sem coloração, demarcadas pelas setas.

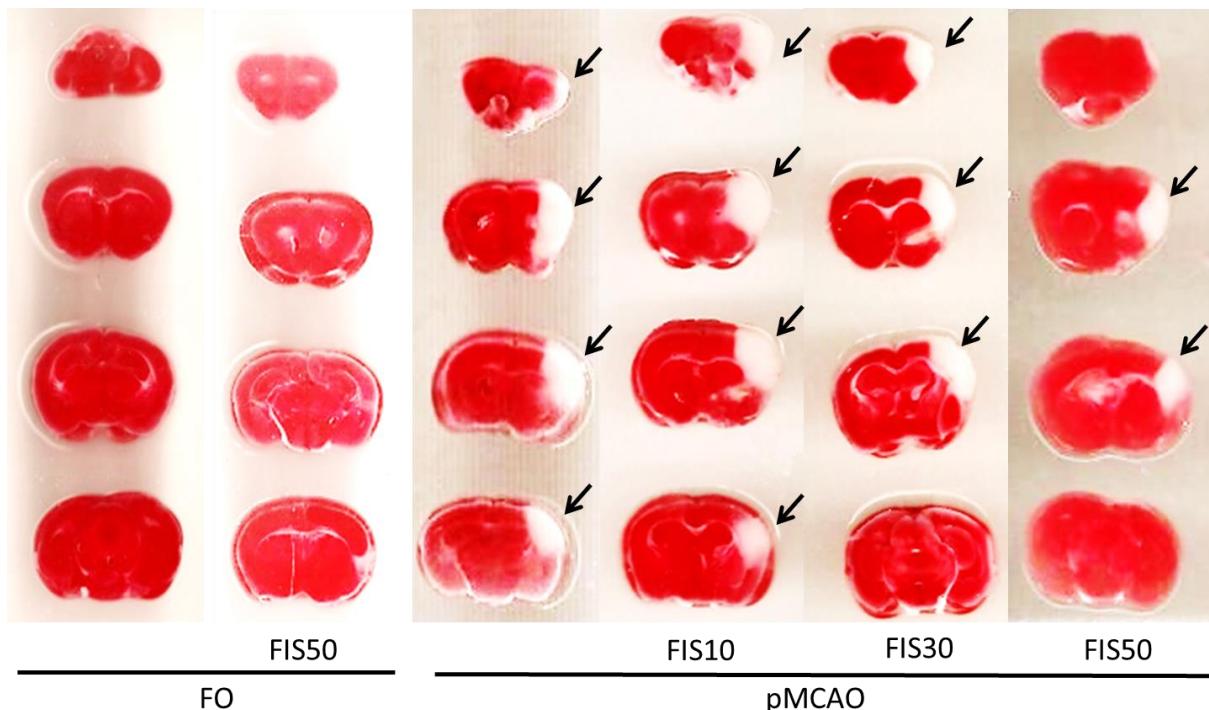
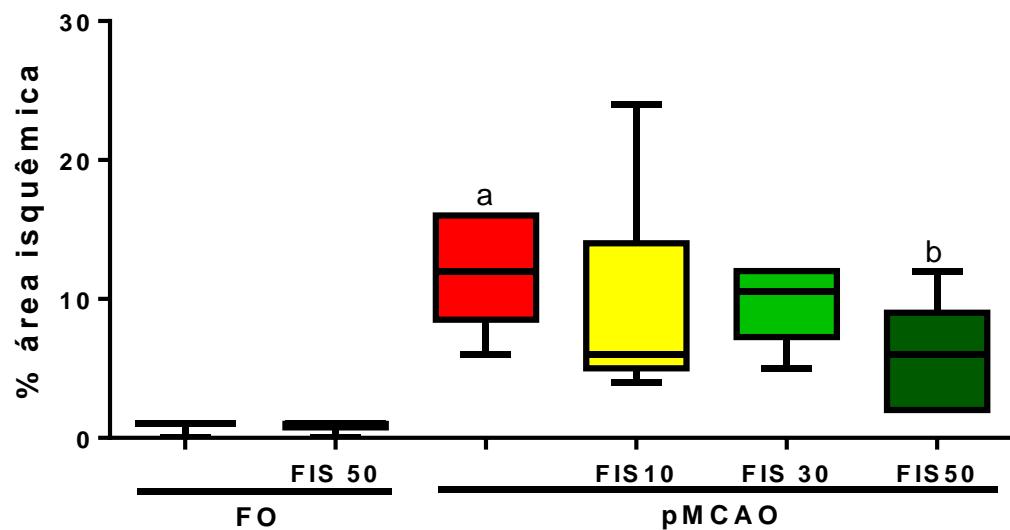


Figura 15. A Fisetina (50 mg/kg) melhora o dano neuronal isquêmico em camundongos submetidos à pMCAO (n=8/grupo).

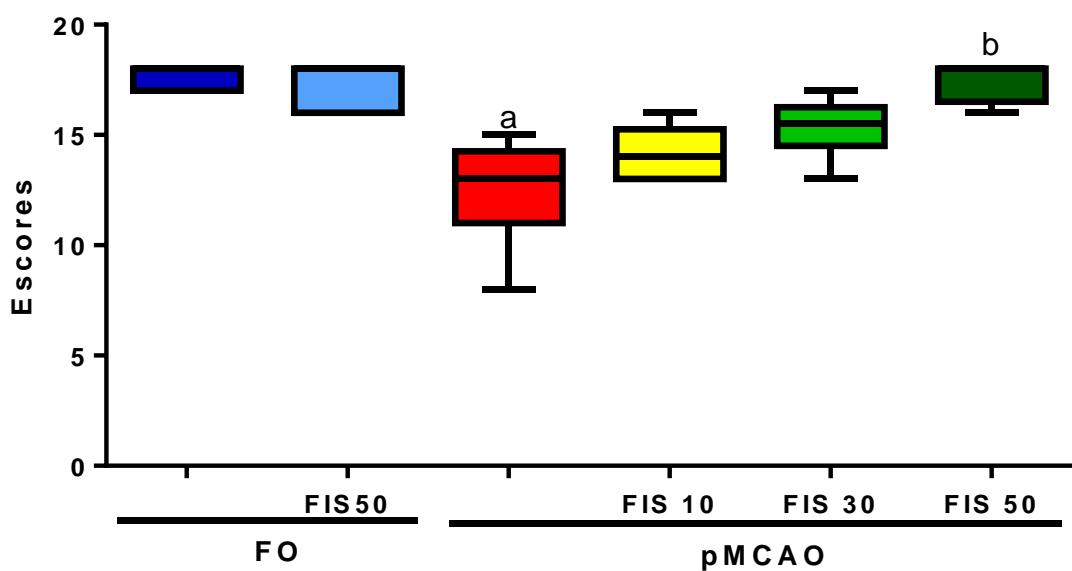


Os valores representam a mediana (MIN-MÁX). ^avs FO, ^bvs pMCAO, p<0.05.
Teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos.

4.2 Efeito da fisetina (10, 30 e 50 mg/kg) sobre a avaliação neurológica de camundongos submetidos à pMCAO.

Na avaliação neurológica, realizada 24h após a cirurgia, os animais isquemeados apresentaram déficit sensório-motor significativo (FO: 18 (17-18) escores; pMCAO: 13 (8-15) escores). Os animais tratados com a fisetina, nas doses de 30 e 50mg/kg, obtiveram melhora no desempenho sensório-motor em relação aos animais isquemeados (FIS10: escores; FIS30: 15,5 (13-17) escores; FIS 50:18 (16-18) escores) (Figura 16).

Figura 16 A Fisetina (30 e 50 mg/kg) melhora os déficits sensório-motores em camundongos submetidos à pMCAO (n=8/grupo).

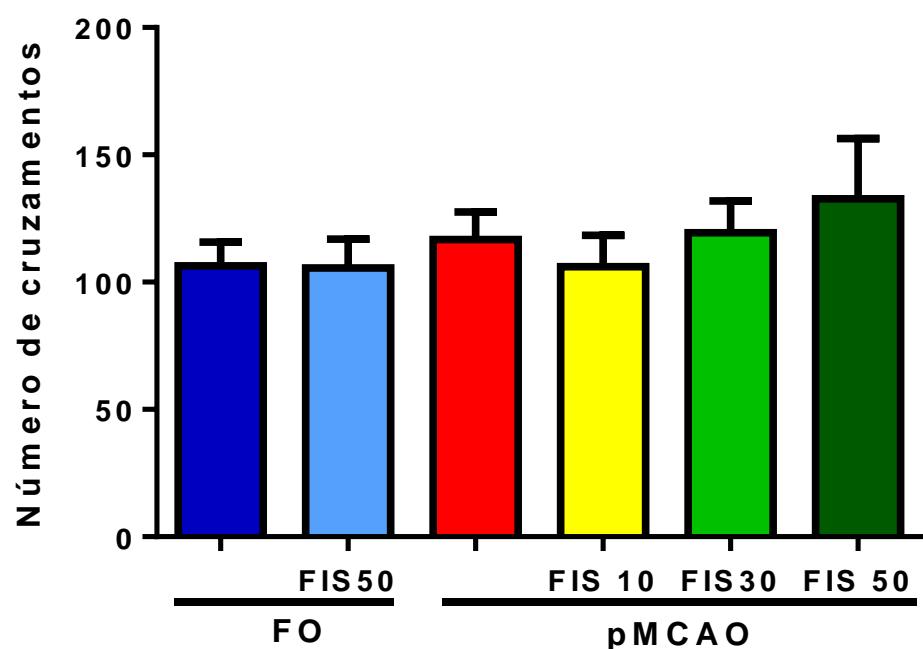


Os valores representam a mediana (MIN-MAX). ^avs FO, ^bvs pMCAO, p=0,0001.
Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn.

4.3 Efeito da Fisetina (10, 30 e 50mg/kg) sobre a atividade locomotora de camundongos submetidos à pMCAO.

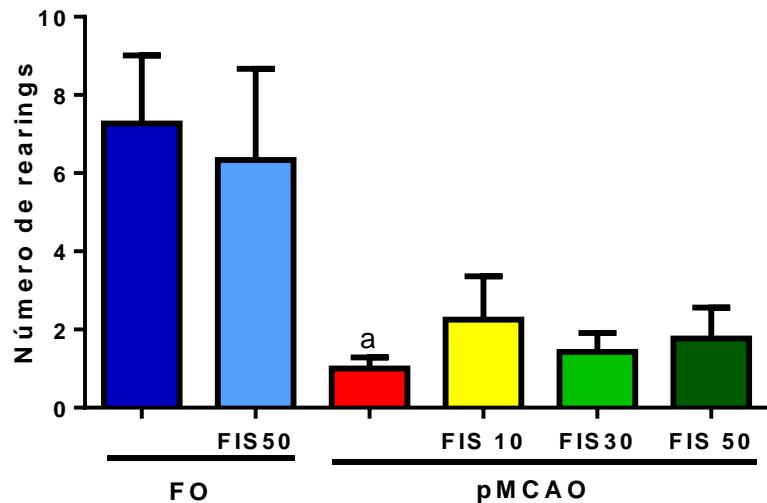
O teste de campo aberto, realizado 72 h após a indução de pMCAO, avalia a atividade locomotora. Não foram observadas alterações motoras na capacidade de exploração horizontal dos animais, avaliada através da observação do número de cruzamentos, como podemos observar na figura 17 (FO: $106,4 \pm 9,31$ número de cruzamentos; FO+FIS50: $105,5 \pm 11,49$ número de cruzamentos; pMCAO: $116,6 \pm 10,84$ número de cruzamentos; FIS10: $106 \pm 10,84$ número de cruzamentos; FIS30: $131,6 \pm 16,6$ número de cruzamentos; FIS50: $132 \pm 23,55$ número de cruzamentos). Na avaliação da exploração vertical, os animais isquemeados tiveram uma diminuição significativa da atividade locomotora (FO: $7,27 \pm 1,7$ número de *rearings*; FO+FIS: $6,33 \pm 2,3$ número de *rearings*; pMCAO: $1,0 \pm 0,28$ número de *rearings*) e essa diminuição não foi alterada pelo tratamento com a fisetina (FIS10: $2,25 \pm 1,1$ número de *rearings*; FIS30: $1,42 \pm 0,48$ número de *rearings*; FIS50: $1,76 \pm 0,79$ número de *rearings*) (Figura 18).

Figura 17. Efeito da Fisetina (10, 30 e 50mg/kg) sobre o número de cruzamentos no teste do campo aberto de camundongos submetidos à pMCAO (n = 8/grupo).



Os valores representam a média \pm EPM.
ANOVA, seguido do teste de Newman-Keuls.

Figura 18. Efeito da Fisetina (10,30 e 50mg/kg) sobre o número de “rearings” no teste do campo aberto de camundongos submetidos à pMCAO (n = 8/grupo).

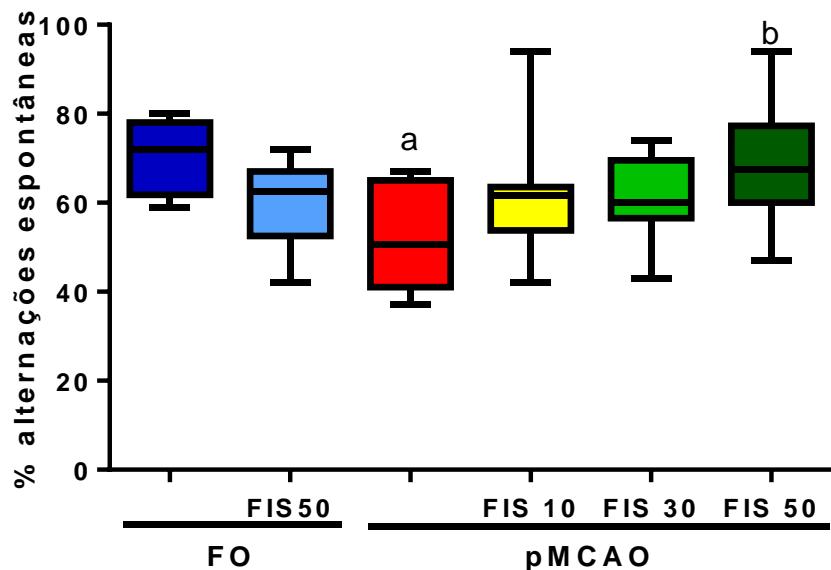


Os valores representam a média ± EPM. ^avs pMCAO, p=0,0012.
ANOVA, seguido do teste de Neuwman-Keuls.

4.4 Efeito da Fisetina (10, 30 e 50mg/kg) sobre a memória de trabalho de camundongos submetidos à pMCAO.

Na memória de trabalho, avaliada pelo teste do Labirinto em Y, realizado 72 h após a cirurgia, os animais isquemeados apresentaram um déficit de memória em relação aos animais falso-operados (FO: 72 (59-80) %; FO+FIS50: 62,5 (42-72) %; pMCAO: 50,5 (37-67) %). Esse déficit foi revertido pelo tratamento com a fisetina na dose de 50 mg/kg (FIS10: 61,5 (42-94) %; FIS30: 60 943-74) %; FIS50: 67,5 (47-94) %) (Figura19).

Figura 19. Efeito da Fisetina (10, 30 e 50 mg/kg) sobre a memória de trabalho de camundongos submetidos à pMCAO (n=8/grupo).

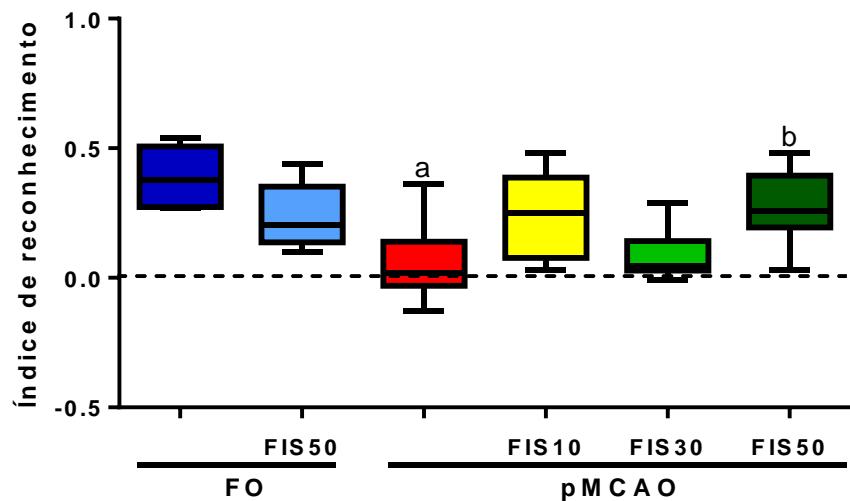


Os valores representam a mediana (MIN-MAX). ^avs FO, ^bvs pMCAO, p=0,0151. Kruskall-Wallis, seguido do teste de Dunn.

4.5 Efeito da Fisetina (10, 30 e 50 mg/kg) sobre a memória episódica avaliada através do teste de reconhecimento de objetos em camundongos submetidos à pMCAO.

Os animais submetidos à pMCAO apresentaram déficit na habilidade de reconhecer um novo objeto, avaliado 96 h após a isquemia, em relação aos animais falso-operados (FO: 0,375 (0,27-0,54); FO+FIS50: 0,2050 (0,1-0,44); pMCAO: 0,02 (-0,13-0,43)) apresentando menor índice de reconhecimento. O tratamento com a fisetina na dose de 50 mg/kg diminuiu significativamente este déficit (FIS10: 0,25 (0,03-0,48); FIS30: 0,05 (0,027-0,29); FIS50: 0,26 (0,03-0,48)) (Figura 20).

Figura 20. Efeito da Fisetina (10, 30 e 50 mg/kg) sobre a memória episódica avaliada através do teste de reconhecimento de objetos de camundongos submetidos à pMCAO (n = 8/grupo).

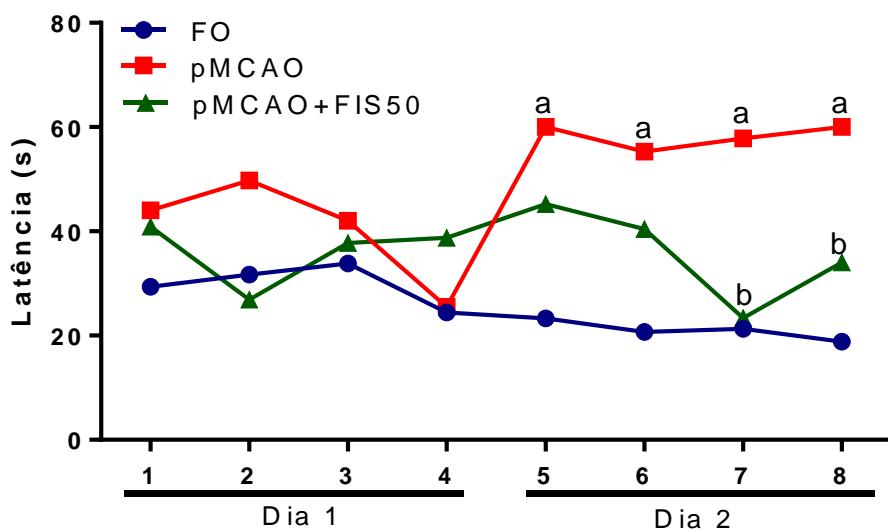


Os valores representam a mediana (MIN-MAX). ^avs FO, ^bvs pMCAO, p=0,0001.
Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn.

4.6 Efeito da Fisetina (10, 30 e 50 mg/kg) sobre a memória espacial de camundongos submetidos à pMCAO.

No teste de labirinto aquático de Morris podemos avaliar a capacidade de aprendizado dos animais avaliando a latência nos dias de treino. Nossos resultados mostram que os animais isquemiados tiveram maior dificuldade de aprendizado em relação aos animais falso-operados, diferindo estatisticamente no segundo de treinos quando comparamos a cada dois grupos, como podemos observar na figura 21 (treino 5: FO: $23,3 \pm 6,0$ s; pMCAO: $60,0 \pm 0,0$ s; treino 6: FO: $20,7 \pm 8,3$ s; pMCAO: $55,3 \pm 4,7$ s; treino 7: FO: $21,3 \pm 7,1$ s; pMCAO: $57,8 \pm 2,2$ s; treino 8: FO: $18,9 \pm 6,6$ s; pMCAO: $60,0 \pm 0,0$ s). O tratamento com a fisetina foi capaz de reverter a deficiência de aprendizado induzida pela pMCAO nos treinos 7 e 8 em relação ao pMCAO (treino 7: FIS50: $23,4 \pm 7,1$ s; treino 8: FIS50: $34,0 \pm 8,9$ s). Foi realizado ANOVA de medidas repetidas seguido do teste de Bonferroni para avaliar a capacidade de aprendizado dentro do grupo, porém não foram encontrados diferenças significativas.

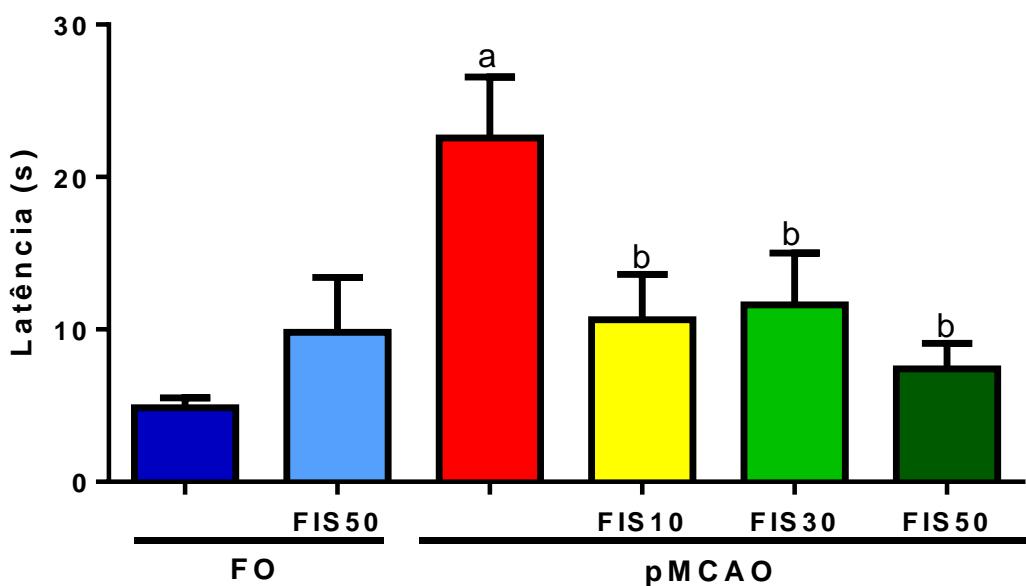
Figura 21. Efeito da Fisetina (50 mg/kg) sobre o aprendizado avaliada através do tempo de latência nos treinos para alcançar a plataforma de camundongos submetidos à pMCAO ($n = 8/\text{grupo}$).



Os valores representam a média \pm EPM. ^avs FO, ^bvs pMCAO, $p=0,0008$.
Teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos.

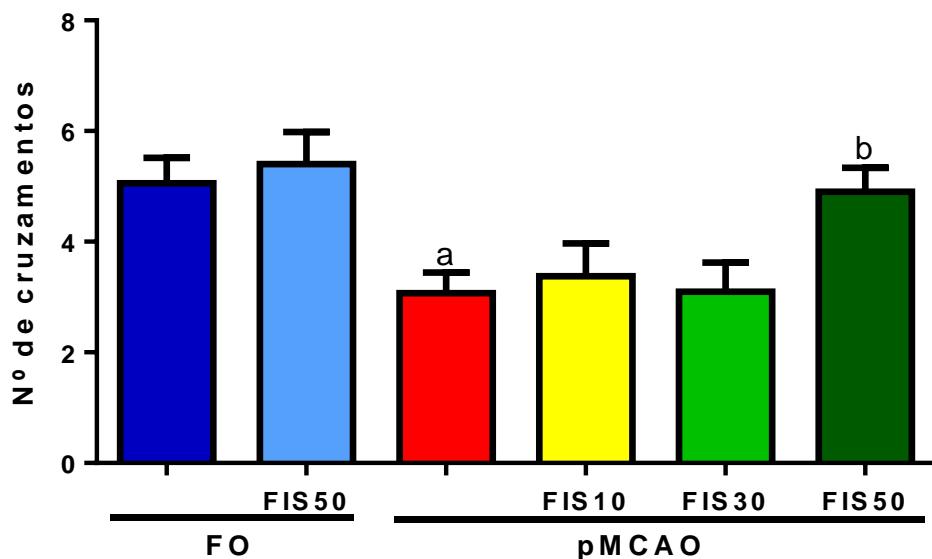
Na retenção da memória espacial, avaliada 120 h depois da cirurgia foram avaliados os parâmetros de latência, número de cruzamentos e tempo de permanência no quadrante. Podemos observar que os animais isquemeados tiveram um déficit de memória espacial em relação aos animais falso-operados nos parâmetros de latência (FO: $4,87 \pm 0,65$ s; FO+FIS50: $9,8 \pm 3,6$ s; pMCAO: $22,57 \pm 3,9$ s), número de cruzamentos (FO: $5,06 \pm 0,45$ s; FO+FIS50: $5,4 \pm 0,58$ s; PMCAO: $3,07 \pm 0,37$ s) e tempo de permanência no quadrante (FO: $20,75 \pm 1,4$ s; FO+FIS50: $17,50 \pm 2,24$ s; pMCAO: $7,4 \pm 1,4$ s). O tratamento com a fisetina nas três doses conseguiu reverter o déficit de memória espacial no parâmetro latência (FIS10: $10,63 \pm 2,9$ s; FIS30: $8,56 \pm 1,7$ s; FIS50: $6,0 \pm 1,06$ s), porém apenas a dose de 50 mg/kg reverteu o déficit observado no número de cruzamentos (FIS10: $3,37 \pm 0,59$ s; FIS30: $3,75 \pm 0,36$ s; FIS50: $4,9 \pm 0,43$ s) e tempo de permanência (FIS10: $7,2 \pm 1,1$ s; FIS30: $6,7 \pm 1,4$ s; FIS50: $18,9 \pm 1,4$ s). (Figuras 22, 23 e 24).

Figura 22. Efeito da Fisetina (10, 30 e 50 mg/kg) sobre a memória espacial, avaliada através do parâmetro latência para alcançar a plataforma, de camundongos submetidos à pMCAO (n = 8/grupo).



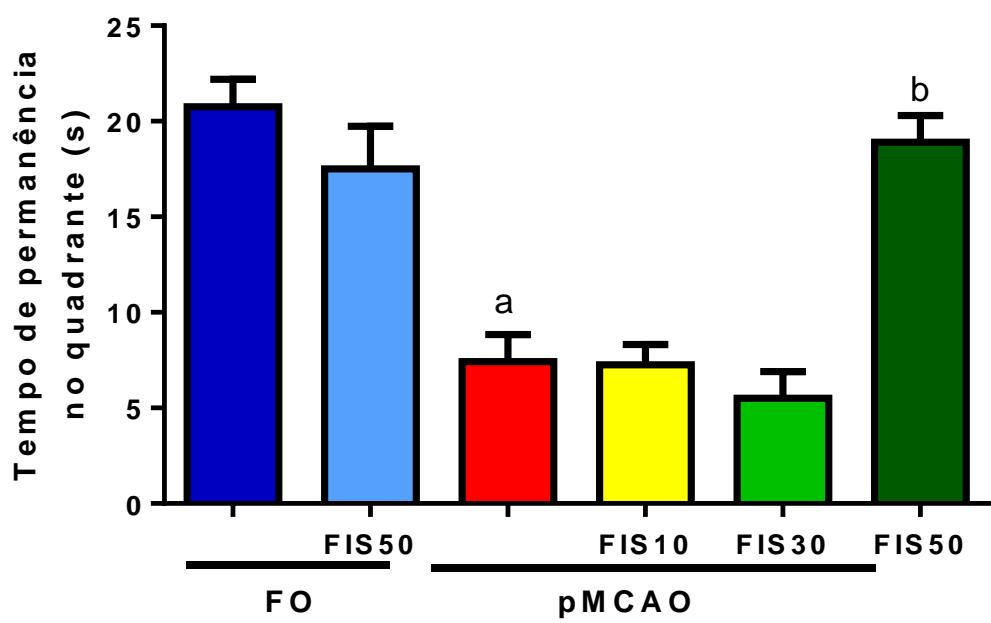
Os valores representam a média \pm EPM. ^avs FO, ^bvs pMCAO, $p < 0,0001$.
ANOVA, seguido do teste de Neuman-Keuls.

Figura 23. Efeito da Fisetina (10, 30 e 50 mg/kg) sobre a memória espacial, avaliada através do parâmetro número de cruzamentos, de camundongos submetidos à pMCAO (n = 8/grupo).



Os valores representam a média \pm EPM. ^avs FO, ^bvs pMCAO. p=0,0008.
ANOVA seguido do teste de Neuman-Keuls.

Figura 24. Efeito da Fisetina (10, 30 e 50 mg/kg) sobre a memória espacial, avaliada através do parâmetro tempo de permanência no quadrante, de camundongos submetidos à pMCAO (n = 8/grupo)

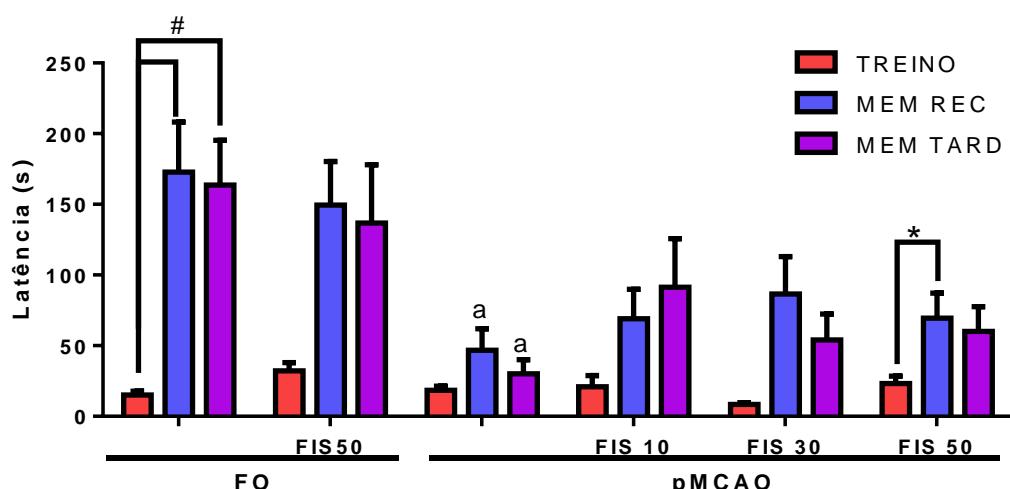


Os valores representam a média \pm EPM. ^avs FO, ^bvs pMCAO, p<0,0001.
ANOVA, seguido do teste de Newman-Keuls.

4.7 Efeito da Fisetina (10, 30 e 50 mg/kg) sobre a memória aversiva de camundongos submetidos à pMCAO.

No teste da esquiva passiva, avaliamos a memória recente e tardia feita 72 e 96 h após a cirurgia, respectivamente. Os animais submetidos à pMCAO apresentaram um déficit da memória aversiva recente (FO: $172,9 \pm 35,3$ s; FO+FIS50: $149,4 \pm 30,9$ s; pMCAO: $46,7 \pm 15,3$ s) e tardia (FO: $163,6 \pm 31,81$ s; FO+FIS50: $136,4 \pm 41,2$ s; pMCAO: $30,0 \pm 10,0$ s) em comparação aos animais falso-operados. A fisetina não foi capaz de reverter esses déficits quando comparados com o grupo pMCAO nem na memória recente (FIS10: $69,0 \pm 20,8$ s; FIS30: $86,6 \pm 26,4$ s; FIS50: $69,4 \pm 17,8$ s) e nem na memória tardia (FIS10: $91,3 \pm 34,3$ s; FIS30: $54,0 \pm 18,4$ s; FIS50: $60,0 \pm 17,6$ s). Porém quando comparamos dentro do grupo através do teste estatístico ANOVA de medidas repetidas, seguido pelo teste de Bonferroni para comparação dentro do grupo observamos que, assim como os animais falso-operados apresentaram diferença significativa de memória recente e tardia em relação ao treino (FO: $15 \pm 2,8$ s; FO+FIS50: $32,2 \pm 5,9$ s), o tratamento com a fisetina na dose de 50 mg/kg foi capaz de induzir o aprendizado desses animais quando comparamos a memória recente em relação ao treino, porém não quando comparamos a memória tardia em relação ao treino (FIS10: $20,9 \pm 8,0$ s; FIS30: $8,4 \pm 1,3$ s; FIS50: $23,1 \pm 5,3$ s). Os animais isquemeados não apresentaram diferença estatística dentro do grupo, demonstrando que não houve aprendizado em relação ao treino (pMCAO: $18,43 \pm 2,9$ s) (Figura 25).

Figura 25. Efeito da Fisetina (10, 30 e 50 mg/kg) sobre a memória aversiva de camundongos submetidos à pMCAO (n = 8/grupo).



Os valores representam a média \pm EPM.

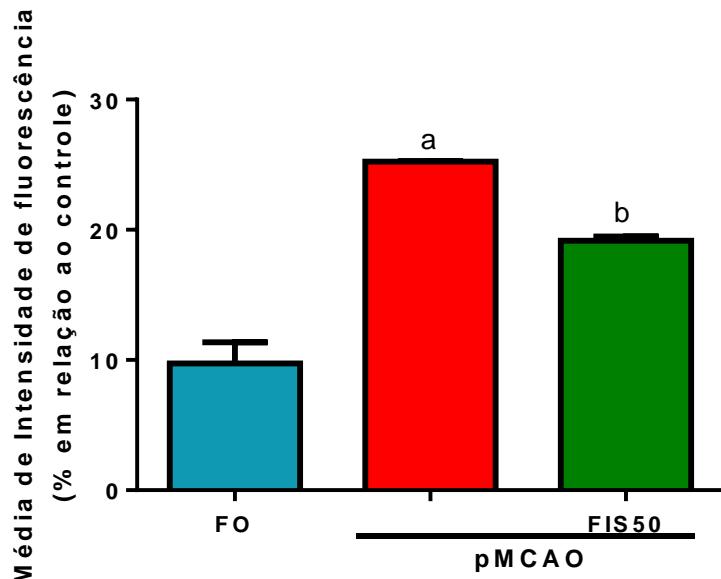
^avs FO. Mem. Rec p=0,086, Mem. Tard p=0,0038. ANOVA, seguido do teste de Newman-Keuls.

#vs FO Treino, p=0,0002, *vs FIS50 Treino, p=0,0082. ANOVA de medidas repetidas, seguido do teste de Bonferroni.

4.8 Efeito da Fisetina (50mg/kg) sobre a ativação de astrócitos evidenciada através da imunomarcação com GFAP no córtex temporal de camundongos submetidos à pMCAO.

Os animais isquemiados apresentaram aumento na ativação astrocitária evidenciada pela imunomarcação do GFAP (figura 26) no córtex temporal 5 dias após a isquemia e o tratamento com a Fisetina na dose de 50 mg/kg não diminui essa ativação. (FO: $9,75 \pm 1,6\%$; pMCAO: $25,04 \pm 0,4\%$; FIS50: $19,16 \pm 0,3\%$) (Figura 26).

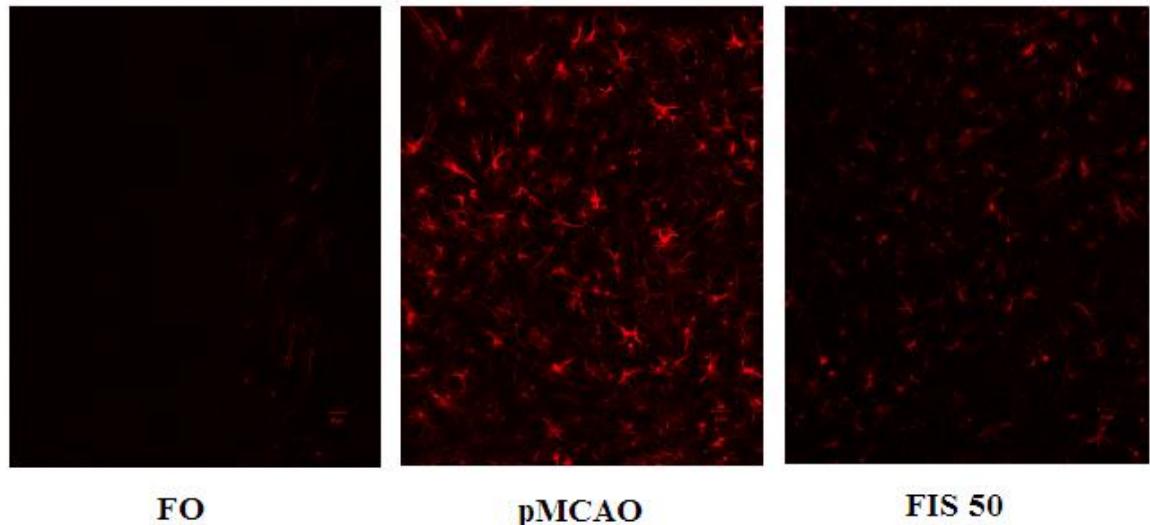
Figura 26. Efeito da Fisetina (50 mg/kg) sobre a ativação de astrócitos (GFAP) no córtex temporal de camundongos submetidos à pMCAO



Os valores representam a média \pm EPM. ^avs FO, ^bvs pMCAO, $p < 0,05$.

ANOVA, seguida do teste de Newman-Keuls.

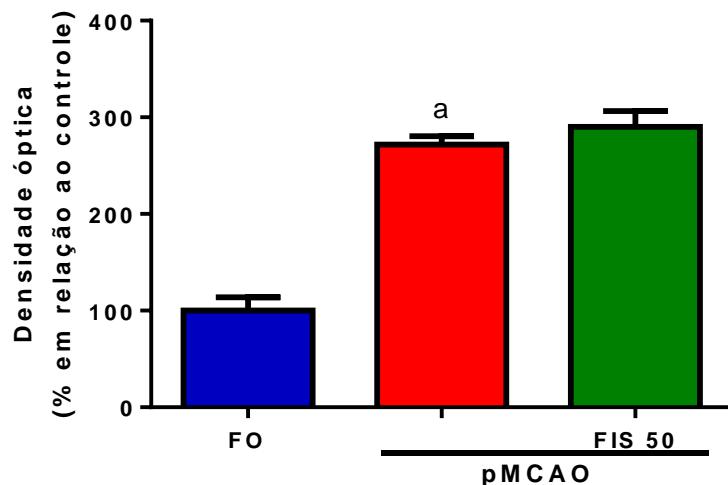
Figura 27. Imagens representativas do efeito da Fisetina (50 mg/kg) sobre a ativação de astrócitos (GFAP) no córtex temporal de camundongos submetidos à pMCAO



4.9 Efeito da Fisetina (50mg/kg) sobre os níveis de TNF- α no corpo estriado e córtex de camundongos submetidos à pMCAO.

Os animais submetidos à pMCAO apresentaram um aumento dos níveis de TNF- α no corpo estriado (FO: $100\pm14\%$; pMCAO: $271\pm8,9\%$), porém o tratamento com a fisetina não foi capaz de diminuir o aumento de TNF- α induzido pela pMCAO (FIS 50: $290\pm16\%$) (Figura 28). No córtex não houve alteração dos níveis de TNF- α entre os grupos (FO: $100\pm9,6\%$; pMCAO: $102\pm5,6\%$; FIS 50: $124\pm5,5\%$) (Figura 30).

Figura 28. Quantificação por densitometria ótica dos níveis do TNF- α no corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO.



Os valores representam a média \pm EPM. ^avs FO, p,0,0001.ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Figura 29. Imagens representativas (40x) do efeito da Fisetina (50 mg/kg) sobre a imunorreatividade do TNF- α no estriado de camundongos submetidos à pMCAO

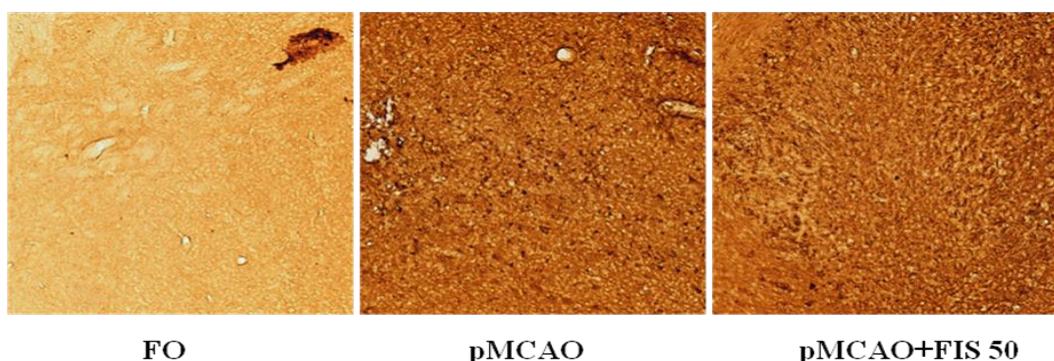
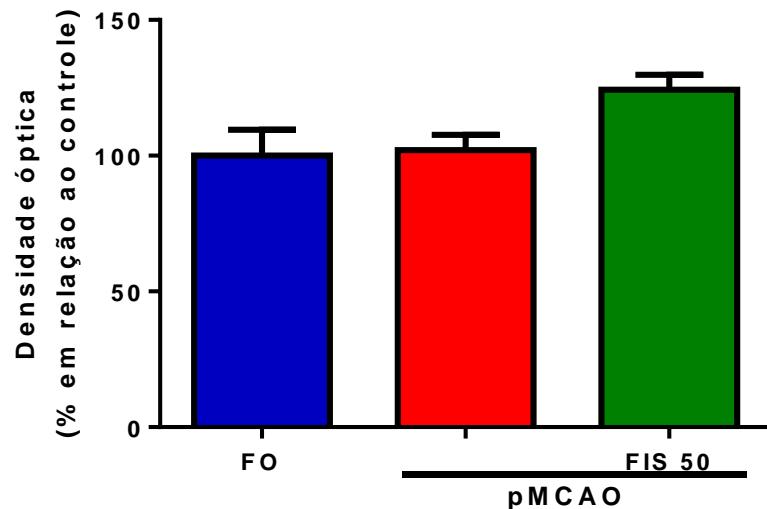
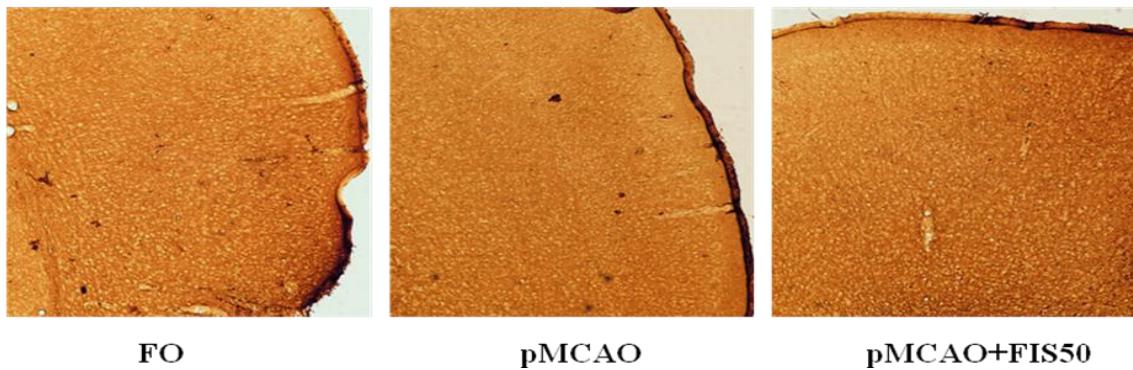


Figura 30. Quantificação por densitometria ótica dos níveis do TNF- α no córtex de camundongos submetidos à pMCAO.



Os valores representam a média \pm EPM. ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Figura 31. Imagens representativas (40x) do efeito da Fisetina (50 mg/kg) sobre a imunorreatividade do TNF- α no córtex de camundongos submetidos à pMCAO

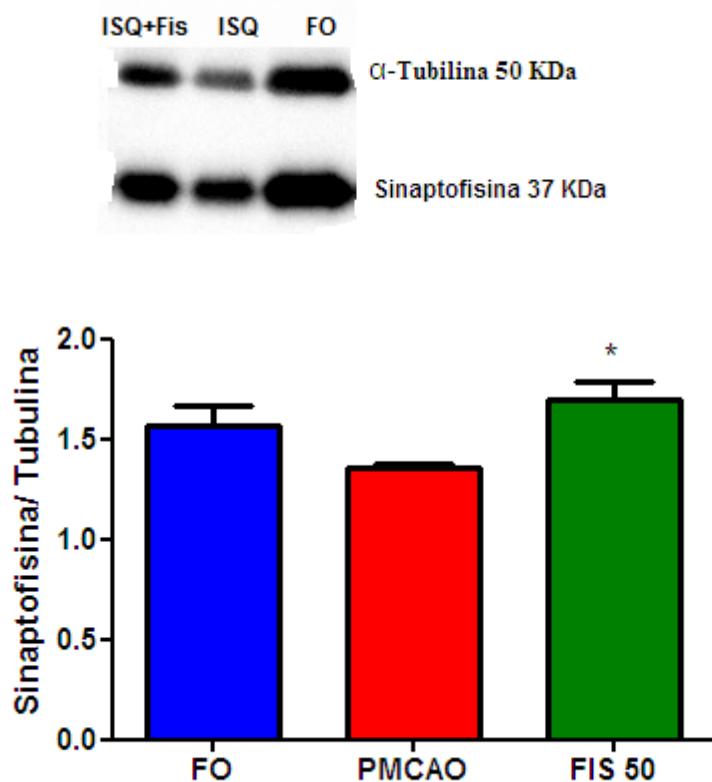


4.10 Efeito da fisetina (50 mg/kg) sobre a expressão de sinaptofisina no corpo estriado e córtex de camundongos submetidos a pMCAO.

Os animais submetidos à pMCAO apresentaram uma diminuição significativa da expressão de sinaptofisina no estriado quando comparamos com os animais falso-operados. Os animais tratados com a Fisetina apresentaram um aumento significativo na expressão de sinaptofisina quando comparamos com os animais isquemiados (FO: $1,56 \pm 0,10$; pMCAO: $1,35 \pm 0,02$; FIS50: $1,69 \pm 0,09$).

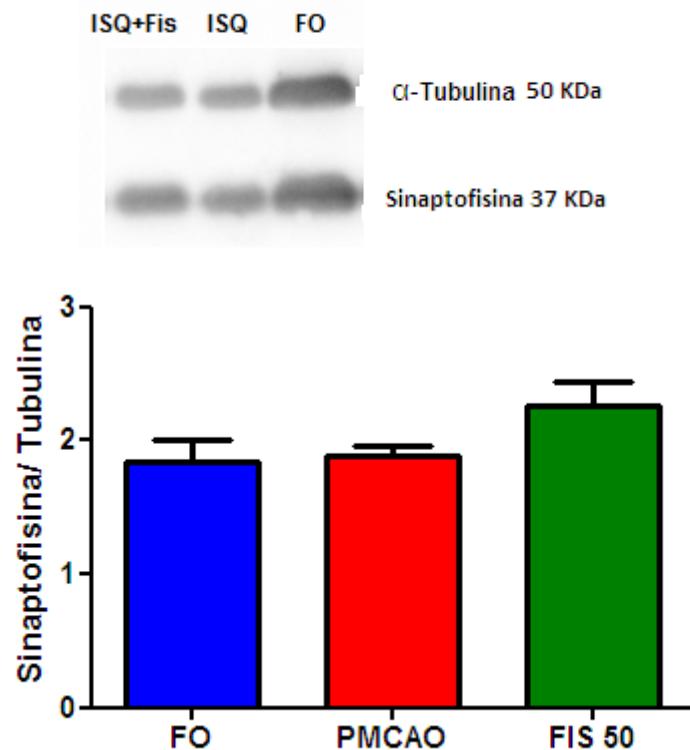
Na quantificação de sinaptofisina no córtex, não houve diferença entre os grupos, mas os animais tratados com a Fisetina apresentaram um aumento da proteína quando comparamos aos outros grupos (FO: $1,84 \pm 0,17$; pMCAO: $1,88 \pm 0,07$; FIS50: $2,26 \pm 0,17$).

Figura 32. Efeito da fisetina (50mg/kg) na expressão da proteína sinaptofisina no corpo estriado de camundongos submetidos a pMCAO.



Representação do imunoblot e análise densitométrica das bandas representadas por média \pm EPM. A proteína α -tubulina foi usada como controle padrão. (n=4) *p <0,05 vs pMCAO (Teste *t* de Student).

Figura 33. Efeito da fisetina (50mg/kg) na expressão da proteína Sinaptofisina em CórTEX de camundongos submetidos a pMCAO.



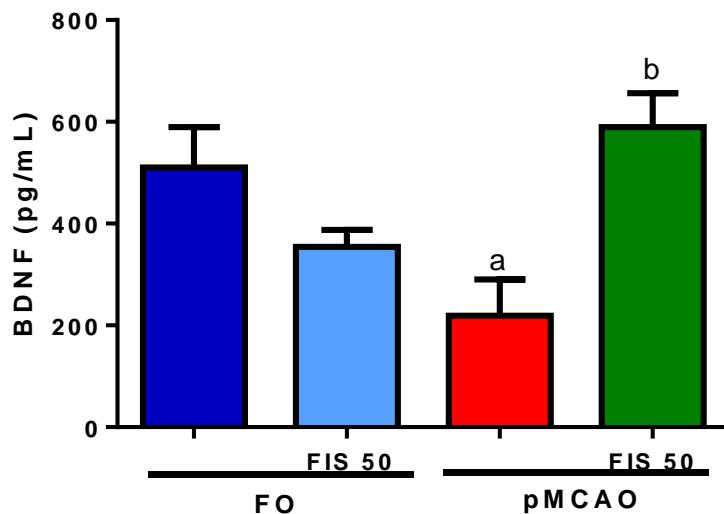
Representação do imunoblot e análise densitométrica das bandas representadas por média \pm EPM.

A proteína α -tubulina foi usada como controle padrão. (n=4/grupo) (Teste *t* de Student).

4.11 Efeito da fisetina sobre os níveis de BDNF no estriado e hipocampo de camundongos submetidos à pMCAO.

A indução de pMCAO diminuiu os níveis de BDNF no corpo estriado dos animais isquemeados em relação aos animais falso-operados (FO: $510,1\pm79,52$ pg/mL; FO+FIS: $354,3\pm33,65$ pg/mL; pMCAO: $219,2\pm70,85$ pg/mL) e essa diminuição foi revertida pelo tratamento com a fisetina (FIS50: $589,8\pm66,61$ pg/mL) (Figura 34). No hipocampo houve um aumento dos níveis de BDNF nos animais isquemeados quando comparados com os animais falso-operados (FO: $449,6\pm88,7$ pg/mL; FO+FIS: $747,7\pm173,1$ pg/mL; pMCAO: $1407\pm354,9$ pg/mL) e a fisetina na dose de 50 mg/kg provocou aumento dos níveis de BDNF em relação aos animais falso-operados, porém essa diferença não foi significativa estatisticamente (FIS50: $979,7\pm85,56$ pg/mL) (Figura 35).

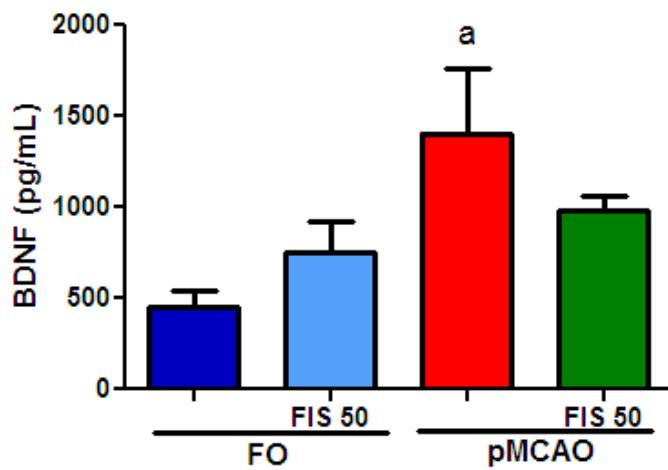
Figura 34. Efeito da fisetina (50mg/kg) sobre os níveis de BDNF no corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO.



Os valores representam a média \pm EPM. $p=0,0265$, ^bvs pMCAO.

ANOVA, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

Figura 35. Efeito da fisetina (50mg/kg) sobre os níveis de BDNF no hipocampo de camundongos submetidos à pMCAO.



Os valores representam a média±EPM, p<0,05, ^avs FO.

ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls.

5. DISCUSSÃO

O AVC isquêmico, devido a sua característica intrínseca de ser um evento agudo, ainda não possui tratamento farmacológico eficaz, capaz de reduzir os danos causados pela isquemia cerebral e de minimizar as sequelas. Diante deste fato, é crescente o número de estudos que buscam estratégias terapêuticas para o AVC. Os flavonoides aparecem nesse contexto como uma estratégia promissora, devido às suas atividades antioxidantes e anti-inflamatórias. Diversos estudos têm demonstrado através de modelos experimentais de isquemia cerebral a eficácia destes compostos (MAHER *et al*, 2007; LIN *et al*, 2015).

A fisetina é um flavonóide subgrupo flavonol presente em frutas e vegetais com atividade anti-inflamatória e antioxidantes já bem descritas, com efeito neuroprotetor em modelos experimentais de isquemia cerebral (MAHER *et al*, 2007, GELDERBLOM *et al*, 2012), tornando-se assim um candidato promissor para a terapia da isquemia. Embora o efeito neuroprotetor da fisetina administrada oralmente 3 h após o início da isquemia tenha sido demonstrado (GELDERBLOM *et al*, 2012), é a primeira vez que foi avaliado efeito da fisetina sobre as sequelas induzidas pela isquemia cerebral.

No presente trabalho foram avaliados os efeitos da fisetina sobre as alterações de memória induzidas pela isquemia cerebral focal permanente em camundongos, dentre outros parâmetros envolvidos na patogênese da isquemia cerebral como o tamanho da área isquêmica, avaliação neurológica, ativação de células da glia, produção de citocinas pró-inflamatórias e sinaptogênese.

Primeiramente avaliamos a capacidade da fisetina de diminuir o tamanho da área isquêmica cerebral, verificado através da quantificação pelo TTC. Os resultados demonstram que o grupo dos animais submetidos a pMCAO tiveram uma grande percentagem de área de dano isquêmico, corroborando com a literatura (WANG *et al*, 2016). O tratamento com a fisetina na dose de 50 mg/kg, administrada via oral 3 h após a indução de pMCAO, foi capaz de diminuir a percentagem de área isquêmica. Estes dados demonstram que a indução da isquemia cerebral através do modelo escolhido foi bem sucedida. Além disso, nossos resultados corroboram com Gelderblom e colaboradores (2012), que também observaram que a fisetina, administrada 3 h após a indução da isquemia, diminuiu a área de isquêmica em 46%. Maher e colaboradores em 2007, testaram a fisetina em modelo de isquemia *in vitro* e

verificou que a fisetina aumenta os níveis de ATP, condição super importante pois a fisiopatologia da isquemia tem como ponto forte a diminuição de ATP. A fisetina também foi eficiente na diminuição do dano isquêmico no modelo de isquemia transitória (RIVIERA *et al*, 2004). Tendo em vista que na clínica o indivíduo acometido por uma AVC isquêmico precisa chegar rápido ao hospital para que não saia da janela terapêutica de 4,5 horas preconizada pela OMS para receber o tPA, como tratamento vigente, a janela terapêutica encontrada em nossos resultados demonstram a potente atividade neuroprotetor da fisetina, e a fazem despontar como candidato promissor.

O tratamento com a fisetina foi capaz de reverter os déficits neurológicos induzidos pela pMCAO, avaliados 24 horas após a cirurgia, tanto na dose de 30mg/kg como na dose de 50mg/kg. A avaliação neurológica foi realizada através de uma escala desenvolvida por Garcia e colaboradores (1995) com o objetivo de observar no modelo animal de isquemia os sinais e sintomas neurológicos clínicos apresentados por pacientes após um AVC isquêmico. Outros estudos já demonstraram que o modelo de pMCAO é capaz de induzir déficits neurológicos em animais (FONTELES *et al*, 2016; GUOSHENG *et al*, 2016). Zhou e colaboradores em 2015 mostraram que no AVC hemorrágico a expressão de receptores TRL-4 aumentam e estes induzem a elevação dos níveis do NFKB levando assim, à liberação de citocinas inflamatórias e a fisetina foi capaz de reverter esse déficit sensório-motor por diminuir a expressão dos receptores TRL-4. Estudos demonstram que os flavonóides devido às suas atividades anti-oxidantes e anti-inflamatórias foram capazes de diminuir os déficits neurológicos induzidos pela isquemia cerebral, como demonstrou Dong e colaboradores (2013) com a *Litsea coreana* leve, um flavonóide usado na medicina chinesa.

No modelo de isquemia utilizado neste trabalho, a lesão apresenta-se principalmente no córtex temporal e corpo estriado, assim, um dano nessas regiões resulta numa redução da atividade locomotora (SHENG, 2010). Nossos resultados demonstraram que os animais submetidos a pMCAO apresentaram déficit locomotor, como menor número de explorações verticais (*rearings*) avaliado através do teste de campo aberto, em relação aos animais falso-operados e a fisetina na dose de 50mg/kg conseguiu reverter esse déficit. Porém, não foi observado comprometimento significativo na exploração horizontal (*crossing*). O motivo pelo qual os animais submetidos a pMCAO não apresentaram déficit na exploração horizontal, mas sim na exploração vertical provavelmente se deve ao fato de os animais isquemeados apresentaram uma menor estabilidade postural. Além disso, SHEN e WANG

(2009) define o movimento vertical como mais sensível a lesão cortical promovida pela pMCAO do que o movimento horizontal. Nossos resultados corroboram com os dados de Fernandes e colaboradores (2014) que demonstraram que a indução de pMCAO em camundongos foi capaz de promover déficit de exploração vertical, mas não de exploração horizontal no teste do campo aberto e que o polifenol ácido caféico diminuiu o déficit locomotor provavelmente devido sua ação antiapoptótica e sinaptogênica. Os testes do campo aberto e avaliação neurológica também tem como objetivo uma análise se o animal não adquiriu nenhuma disfunção motora grave, decorrente da cirurgia para indução da isquemia, o que poderia prejudicar nos posteriores testes para a avaliação da memória.

A ação da fisetina sobre os déficits cognitivos causados pela pMCAO são avaliados pelos testes de memória aversiva, espacial e operacional. A isquemia cerebral provoca uma cascata de eventos como acúmulo de metabólitos tóxicos, estresse oxidativo, inflamação e por fim, a morte neuronal (GRUPKE *et al.*, 2014) em regiões cerebrais como o hipocampo, área conhecida como o centro da memória. Apesar do hipocampo não estar no centro ou core da lesão isquêmica deste modelo, esta região se encontra na penumbra da lesão. A penumbra é a região da lesão isquémica onde os neurônios perderam a capacidade de gerar potenciais de ação espontâneos e/ou evocados, mas com perfusão de sanguínea suficiente para manter as funções da membrana plasmática e controle de gradiente iônico (GARCIA *et al.*, 1995). Existem dois tipos de plasticidade sinaptica, a plasticidade de curto prazo (STP) e a potenciação de longo prazo (LTP) que são necessários para o armazenamento das informações, com isso, tem sido sugerido que a pMCAO prejudica essas sinapses (LI; RICHTER-LEVIN, 2012).

O labirinto em Y e o reconhecimento de objetos foram instrumentos usados para avaliarmos o comprometimento da memória operacional ou de trabalho, e memória episódica ou de reconhecimento, respectivamente, em animais submetidos à pMCAO. O modelo de memória operacional baseia-se na tendência dos animais de explorar ambientes novos. Neste tipo de teste influências como componente emocional ou motivação são minimizadas, ocorrendo 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).

Neste trabalho, avaliamos a memória operacional 72 horas após a isquemia. Observamos que os animais isquemeados apresentaram um déficit neste tipo de memória e a fisetina na dose de 50mg/kg conseguiu reverter esses déficits. Corroborando com nossos resultados, Seo e Jeong (2015) mostraram que a isquemia global transitória em gerbils causou déficits na memória operacional avaliada através do teste de labirinto em Y. Trabalhos mostraram também que outros compostos, como a *spinosina*, um flavonóide assim como a fisetina, foi capaz de melhorar a memória operacional em modelo da injeção de escopolamina para indução dos déficits de memória (JUNG *et al.*, 2014).

O teste de reconhecimento de objetos se baseia, assim como o labirinto em Y, na tendência natural do animal em buscar o novo, sem necessidade de estímulo aversivo ou privação de comida ou água (BEVINS; BESHEER, 2006). É uma tarefa útil para avaliar em regiões específicas, principalmente o hipocampo e córtex perirrinal (Win-SHWE; FUJIMAKI; 2011) e alterações neuroquímicas produzidas por lesões. A integridade do hipocampo está intimamente relacionada com o reconhecimento de objetos e o córtex perirrinal com a codificação, consolidação e recuperação da memória relacionada a objetos (WINTERS; SAKSIDA; BUSSEY, 2008). Em nosso estudo, na memória episódica avaliada 96h após a pMCAO, os animais isquemeados apresentaram um déficit neste tipo de memória e a fisetina na dose 50 mg/kg conseguiu reverter esses déficits. Estudos mostram que a fisetina melhorou os déficits de memória através da ativação de ERK e fosforilação de CREB promovendo a potencialização da LTP (MAHER, 2006). Além disso, estudos mostram que outros flavonóides, como a *baicalein*, conseguiram reverter os déficits de memória em modelos de doença de Alzheimer provavelmente devido à potencialização do LTP (GU *et al.*, 2016).

Uma das formas de medir a função cognitiva em modelos experimentais se dá através do aparelho de esquiva passiva, que avalia déficits de memória aversiva (DEVRIES, 2001). A esquiva passiva do tipo “step-down”, que quer dizer “descer um degrau”, é baseada no comportamento natural que os roedores têm de explorar além da plataforma, mas também de evitar o choque produzido pela grade, o que pode ser chamado de memória aversiva (IZQUIERDO, MEDINA, 1997). Neste trabalho, os animais isquemeados apresentaram um déficit de memória aversiva em relação aos animais falso-operados. Corroborando com nossos resultados Nazaria e colaboradores (2016) demonstrou que o modelo pMCAO induz o

déficit de memória aversiva avaliado através do teste de esquiva passiva. Lee e colaboradores (2016) demonstrou que a spinosina, um flavonóide, conseguiu reverter os déficits de memória aversiva em modelo de Doença de Alzheimer, sugerindo que esse efeito se deve à sua ação neurogênica hipocampal. O tratamento com a fisetina, porém, não foi capaz de reverter o déficit de memória aversiva. Evidências sugerem que dano na memória aversiva estão relacionados com lesões em diferentes áreas cerebrais, estando alterada em diversos modelos animais (AZOGU *et al.*, 2015, YAMAGUCHI *et al.*, 2015, BIANCHI *et al.*, 2016). Além disso, estudos que observaram a restauração desse tipo de memória avaliava, na maioria dos casos, neurogênese na região do hipocampo (MOON *et al.*, 2016) o que não foi observado no nosso estudo através da avaliação dos níveis de BDNF no hipocampo.

O labirinto aquático, previamente descrito por Morris (1984) foi utilizado para avaliar as alterações na memória espacial. O autor mostrou a necessidade de referências externas à piscina para 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'HOOGE; DE DEYNN, 2001).

Neste trabalho, os animais isquemeados apresentaram déficit na memória espacial em todos os parâmetros avaliados: latência, número de cruzamentos e tempo de permanência no quadrante. Corroborando com nossos resultados, Wang e colaboradores (2004) mostraram que os animais submetidos a isquemia cerebral transitória também obtiveram um déficit nesse tipo de memória. A fisetina conseguiu reverter esses déficits na dose de 50mg/kg, corroborando com os dados de AHMAD e colaboradores (2016) no qual a fisetina reverteu os déficits cognitivos avaliados também através do labirinto aquático em modelo de Doença de Alzheimer induzido por injeção de β -amilóide. Esse efeito provavelmente se deve à capacidade da fisetina em aumentar a fosforilação de CREB que está envolvido no processamento da memória no hipocampo para a formação da memória espacial.

A isquemia é responsável pelo dano neural hipocampal através de múltiplos fatores incluindo excitotoxicidade, estresse oxidativo, e citocinas inflamatórias, especialmente nos neurônios piramidais na região CA1 do hipocampo (CAI *et al.*, 2011). Sabe-se que a regeneração neuronal, plasticidade sináptica, neurogênese e sinaptogênese são processos

necessários para a recuperação de déficits cognitivos. Na busca de uma melhor compreensão dos mecanismos pelos quais a fisetina foi capaz de reverter os déficits de memória induzidos pela pMCAO foram realizados a quantificação da expressão da sinaptofisina e de BDNF. A sinaptofisina é uma glicoproteína existente em vesículas pré sinápticas que é responsável pela ancoragem destas vesículas no terminal sináptico e pelo resgate dessas proteínas por endocitose, tornando-se responsável por uma neurotransmissão rápida e eficiente (VAYNMAN *et al.*, 2006). Como um marcador protéico 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).

No presente trabalho observamos que a isquemia cerebral não foi capaz de induzir alterações no córtex, porém no corpo estriado houve uma diminuição não significativa da expressão de sinaptofisina. A fisetina mostrou uma tendência em aumentar os níveis de sinaptofisina no córtex e aumentou significativamente no corpo estriado. Corroborando com nossos resultados, Wang (2015) mostrou não haver alteração da quantidade da sinaptofisina entre os grupos, 14 dias após a indução de pMCAO. Ahmad e colaboradores neste ano mostraram que a fisetina aumentou os níveis de sinaptofisina em modelo de doença de alzheimer pela sua capacidade de regular as proteínas pré e pós sinápticas. REHMAN e colaboradores (2016) mostraram que o polifenol anthocianina aumentou a expressão de sinaptofisina em modelo de demência induzido por d-galactose. O efeito sinaptogênico de outros polifenóis, como o ácido lipóico, já havia sido demonstrado por outros autores, em modelo de isquemia cerebral transitória em ratos (GONZALEZ-PEREZ *et al.*, 2002) e do ácido rosmarínico em camundongos submetidos à pMCAO (FONTELES *et al.*, 2016).

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; BRAMBILLA; THOMAS, 2010). No nosso trabalho, o BDNF aumentou significativamente no hipocampo nos animais isquemeados. Este fato ocorreu provavelmente por se tratar de uma região de penumbra e ainda existirem células viáveis, capazes de realização de síntese protéica. Porém, a fisetina não foi capaz de aumentar os níveis de BDNF no hipocampo, provavelmente a razão pela qual a fisetina não foi capaz de reverter o déficit de memória aversiva. Okuyama e colaboradores (2015) também mostraram aumento do BDNF induzido pela isquemia cerebral, sugerindo uma tentativa natural de neurogênese em

resposta ao insulto da isquemia cerebral. No estriado, região onde se situa o core da lesão, local onde a morte acontece principalmente por necrose, o BDNF está diminuído nos animais isquemeados, corroborando com os resultados de YAO e colaboradores (2012) que mostraram diminuição do BDNF no córtex, região de core da lesão e FONTELES e colaboradores (2016) que demonstrou que o BDNF está diminuído nos animais isquemeados 5 após a indução de pMCAO. A fisetina aumentou os níveis de BDNF possivelmente devido à sua capacidade de aumentar a fosforilação de CREB aumentando, consequentemente, a expressão do BDNF como descrito por outros autores (CHO, 2013). Assim, é possível relacionarmos o efeito neuroprotetor da fisetina sobre os déficits de memória induzidos pela isquemia cerebral a sua capacidade de induzir a sinaptogênese. Porém, outros mecanismos não podem ser descartados.

Já está bem descrito na literatura a inflamação, sinaptogênese e neurogênese são fatores envolvidos na patogênese da isquemia cerebral e responsáveis, em parte, pelos danos cognitivos (PATTERSON *et al*, 2015). Sendo assim, avaliamos a ação anti-inflamatória da fisetina através da avaliação da astrogliose e TNF- α .

As células da glia são as principais responsáveis pela resposta inflamatória do sistema nervoso central (SRIRAM e O'CALLAGHAN, 2007). Os astrócitos são células da glia que aparecem ativados no processo inflamatório após AVC, levando a expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), evento esse, conhecido como astrogliose reativa (PEKNY, NILSSON, 2005). Os astrócitos ativados contribuem para a neuroinflamação secretando citocinas e quimiocinas, bem como, a óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) (DONG e BENVENISTE, 2001). Essa cascata imune é crucial para o desenvolvimento do infarto cerebral (IADECOLA e ANRATHER, 2011). Estudos demonstram que os astrócitos têm importante participação na sinaptogênese através da liberação de mediadores que mantém o microambiente neuronal, mesmo em condições em que os neurônios perdem sua funcionalidade, como no caso de uma isquemia cerebral. A maneira pela qual a astrogliose ocorre após a isquemia difere dependendo do tempo e da área cerebral observada, possuindo tanto efeitos deletérios como benéficos para o cérebro isquemado (KIMELBERG; NEDERGAARD, 2010, STELIGA *et al*, 2013).

No presente estudo mostramos que a isquemia promoveu a ativação dos astrócitos, evidenciada através do aumento da imunomarcação para GFAP. Corroborando com nossos resultados, Tuor e colaboradores (2016) verificaram o aumento do GFAP em modelo

de isquemia cerebral transitória. Outros estudos observaram que o número de células GFAP-positivas estava aumentada no córtex 4 dias após isquemia cerebral focal permanente (NAKASE *et al.*, 2003) e na penumbra isquêmica 24 h, e 3, 7 e 14 dias após a isquemia cerebral focal transitória (WANG *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2013). O tratamento com a fisetina foi capaz de diminuir a astrogliose induzida pela isquemia, corroborando com outros estudos que mostraram que a fisetina conseguiu diminuir a ativação dos astrócitos no modelo de doença de Alzheimer por diminuir a geração do p25 que é responsável pelo aumento da inflamação, astrogliose e alteração no metabolismo dos eicosanóides (CURRAIS *et al.*, 2014). Outros compostos como o polifenol ácido rosmarínico também diminuiu a astrogliose induzida pela pMCAO (FONTELES *et al.*, 2016) e o flavonóide pinocembrim foi capaz de diminuir a ativação dos astrócitos em animais submetidos a isquemia cerebral global (MENG *et al.*, 2011).

A pMCAO induz a um aumento significativo da expressão de NF- κ B, que, por sua vez, faz a mediação da transcrição do TNF- α e expressão do seu mRNA no prazo de 7 dias após o evento isquêmico (TANG *et al.*, 2014). No presente estudo não observamos o aumento do TNF- α 5 dias após a indução de pMCAO. É provável esse dado tenha sido encontrado porque o TNF- α começa a se elevar na primeira hora após a oclusão da artéria cerebral média, com pico de resposta à isquemia em 6 a 12 horas e depois disso os níveis começam a diminuir (BARONE *et al.*, 1997; YAMASAKI *et al.*, 1995). Estudos mostraram que a Fisetina diminui os níveis do TNF- α através da inibição da sinalização de NF- κ B uma vez que impede a fosforilação induzida por LPS de I κ B α e sua degradação e posterior supressão da translocação nuclear de subunidade p65 de NF- κ B em macrófagos peritoneais (SAHU, 2016). Outros estudos também mostram a Fisetina diminuindo os níveis de TNF- α , em modelo de nefrotoxicidade induzida por cisplatina, pelo mesmo mecanismo de modulação do NF- κ B (SAHU, 2014).

Estes resultados em conjunto demonstram a capacidade neuroprotetora e de neuroresgate da fisetina frente a isquemia cerebral focal permanente, visto que sua administração foi realizada com uma janela de 3 h após a indução de pMCAO. Além da fisetina reverter o dano neuronal, como pudemos observar através da diminuição da área isquêmica e da avaliação neurológica, a fisetina foi capaz de proteger dos déficits de memória induzidos pela isquemia. Os nossos resultados sugerem que a fisetina possui ação sinaptogênica e antiinflamatória o que resultou em sua capacidade de diminuir os déficits cognitivos. Mostrando-se promissora candidata a estudos clínicos que visam avaliar sua ação

no AVC isquêmico. Porém, mais estudos precisam ser realizados com o objetivo de compreender melhor os mecanismos pelos quais a fisetina possui ação neurorestauradora.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que a fisetina reverteu o déficit de memória, sensório motor e dano neuronal em camundongos submetidos à pMCAO.

A administração da fisetina diminuiu a inflamação através mostrado através do GFAP, mas não conseguiu diminuir os níveis do TNF- α . E melhorou a neurogênese através do aumento da expressão da sinaptofisina.

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

O presente trabalho aponta a Fisetina como uma nova perspectiva de agente antiinflamatória e neuroresgate.

REFERÊNCIAS

- AGGLETON, J.P. Looking beyond the hippocampus: old and new neurological targets for understanding memory disorders. **Proc. R. Soc. B**, v. 281, p. 1-9, 2014.
- AGGLETON, J.P.; BROWN, M.W. Episodic memory, amnesia, and the hippocampal anterior thalamic axis. **Behav Brain Sci**, v. 22, p. 425-444, 1999.
- AHMAD, A.; ALI1, T.; PARK, H.Y.; BADSHAH, H.; REHMAN, S.U.; KIM, M.O. Neuroprotective Effect of Fisetin Against Amyloid-Beta-Induced Cognitive/Synaptic Dysfunction, Neuroinflammation, and Neurodegeneration in Adult Mice. **Mol Neurobiol**, 2016. DOI 10.1007/s12035-016-9795-4
- AHMED, N.; NASMAN, P.; WAHLGREN, N.G. Effect of intravenous nimodipine on blood pressure and outcome after acute stroke. **Stroke**, v. 31, p. 1250–1255, 2000.
- 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.
- AL-QAZZAZ, N. K.; ALI, S. H.; AHMAD, S. A.; ISLAM, S.; MOHAMAD. Cognitive impairment and memory dysfunction after a stroke diagnosis: a post-stroke memory assessment. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 10, p. 1677-1691, 2014.
- AMANTEA, D.; NAPPI, G.; BERNARDI, G.; BAGETTA, G.; CORASANITI, M.T. Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators. **Febs J.**, v. 276, p.13–26, 2009.
- ANDERSON, S. E.; DICKINSON, C. Z.; LIU, H.; CALA, P. M. Effects of Na-K-2Cl cotransport inhibition on myocardial Na and Ca during ischemia and reperfusion. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 270, p. C608–C618, 1996.
- ANDRABI, S.A.; TED, M.; DAWSON, T.M.; VALINA L. DAWSON, V.L. Mitochondrial and Nuclear Cross Talk in Cell Death. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1147, v. 233-241, 2008.
- ANDRES-LACUEVA, C.; SHUKITT-HALE, B.; GALLI, R.L.; JAUREGUI, O.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M.; JOSEPH, J.A. Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. **Nutr Neurosci**, v. 8, p. 111-20, 2005.
- ARAI, Y.; WATANABE, S.; KIMIRA, M.; SHIMOI, K.; MOCHIZUKI, R.; KINAE, N. Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. **J Nut.**, v.130, p. 2243–2250, 2000.
- AZOGU, I.; TREMBLAYE, P.B.; DUNBAR, M.; LEMAREC, N.; PLAMONDON, H. Acute sleep deprivation enhances avoidance learning and spatial memory and induces delayed alterations in neurochemical expression of GR, TH, DRD1, pCREB and Ki67 in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 279, p. 177–190, 2015.

- 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.
- BALTAN, S. Excitotoxicity and mitochondrial dysfunction underlie age-dependent ischemic white matter injury. **Adv Neurobiol.**, v.11, p. 151-70, 2014.
- BECHER, A.; DRENCKHAHN, A.; PAHNER, I.; MARGITTAI, M.; JAHN, R.; AHNERT-HILGER, G. The synaptophysin-synaptobrevin complex: a hallmark of synaptic vesicle maturation. **J Neurosci.**, v .15, p. 1922-31, 1999.
- 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.
- BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M.; IGAZ, L.M.L.; BEVILAQUA, L.R.M.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Persistence of Long-Term Memory Storage Requires a Late Protein Synthesis- and BDNF-Dependent Phase in the Hippocampus. **Neuron**, v.53, p. 261–277, 2007.
- BERCHTOLD, N. C.; CASTELLO, N.; COTMAN, C.W. Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. **Neuroscience**, v. 19, p. 588–597, 2010.
- BEVINS, R. A.; BESHEER, J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. **Nat Protoc.**, v. 1, p.1306-11, 2006.
- BIANCHI, E.; MANNELLI, L.D.C.; MICHELI, L.; FARZAD, M.; AGLIANÒ, M.; GHELARDINI, C. Apoptotic process induced by oxaliplatin in rat hippocampus causes memory impairment. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.**, 2016 doi: 10.1111/bcpt.12629.
- BIRK, A. V.; LIU, S.; SOONG, Y.; MILLS, W.; SINGH, P.; WARREN, J. D.; SESAN, S. V.; PARDEE, J. D.; SZETO, H. H. The mitochondrial-targeted compound SS-31 re energizes ischemic mitochondria by interacting with cardiolipin. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 24, p. 1250–1261, 2013.
- 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.
- 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. 126–8, 1993.
- BLUMENFELD, R.S.; RANGANATH, C. Prefrontal Cortex and Long-Term Memory Encoding: An Integrative Review of Findings from Neuropsychology and Neuroimaging. **The neuroscientist**, v. 13, p.280- 291, 2007.
- BONANOMI, D.; BENFENATI, F.; VALTORTA, F. Protein sorting in the synaptic vesicle life

- cycle. **Progress in Neurobiology.**, v. 80, p. 177-217, 2006.
- BRAMHAM, C.R.; MESSAOUDI, E. BDNF function in adult synaptic plasticity: The synaptic consolidation hypothesis. **Progress in Neurobiology**, v. 76, p. 99–125, 2005.
- 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. **Br J Psychol.**, v.48, p.1-12, 1957.
- BROUNS, R.; DE DEYNA, P. P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. **Clin. Neurol. Neurosurg.**, v. 111, p. 483–495, 2009.
- BROWN CE, LI P, BOYD JD, DELANEY KR, MURPHY TH. Extensive turnover of dendritic spines and vascular remodeling in cortical tissues recovering from stroke. **J Neurosci**, v. 27, p. 4101–9, 2007
- BURDO, J., SCHUBERT, D., MAHER, P. Glutathione production is regulated via distinct pathways in stressed and non-stressed cortical neurons. **Brain Res.** 1189: 12–22, 2008.
- CAI, J.; HU, Y.; LI, W.; LI, L.; LI, S.; ZHANG, M.; LI, Q. The neuroprotective effect of propofol against brain ischemia mediated by the glutamatergic signaling pathway in rats **Neurochem Res.**, v. 36, p.1724-31, 2011.
- CAO, G; YE, X.; XU, Y.; YIN, M.; CHEN, H.; KOU, J.; YU, B. YiQiFuMai powder injection ameliorates blood-brain barrier dysfunction and brain edema after focal cerebral ischemia-reperfusion injury in mice. **Drug Des Devel Ther.**, v. 10, p. 315-25, 2016.
- CELEUMANS, A.; ZGAVC, T.; KOOIJMAN, R.; IDRISI, S.; SARRE, S.; MICHOTTE, Y. The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia. **Journal of neuroinflammation**, v. 7, n. 74, 2010.
- CHAMORRO, A.; DIRNAGL, U.; PLANAS, A.M. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. **Published online**, v. 11, p. 1 – 13, 2016
- CHO, N.; LEE, K.Y.; HUH, J.; CHOI, J.C.; JEONG, E.J.; SUNG, S.H. Cognitive enhancing effects of Rhus verniciflua bark extract and its active flavonoids with neuroprotective and anti-inflammatory activities. **Food and Chemical Toxicology**, n. 58, p. 355–361, 2013.
- CHUN, H. S.; KIM, J. M.; CHOI, E. H.; CHANG, N. Neuroprotective effects of several korean medicinal plants traditionally used for stroke remedy. **J. Med. Food**, v. 11, p.246 251, 2008.
- CICCHETTI, F.; COSTANTINI, L.; BELIZAIRE, R.; BURTON, W.; ISACSON, O.; FODOR, W. Combined Inhibition of Apoptosis and Complement Improves Neural Graft Survival of Embryonic Rat and Porcine mesencephalon in the Rat Brain. **Experimental Neurology**, v. 177, p. 376–384, 2002.
- COSI. C.; MARIEN, M. Implication of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in

neurodegeneration and brain energy metabolism. Decreases in mouse brain NAD⁺ and ATP caused by MPTP are prevented by the PARP inhibitor benzamide. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 890, p. 227-39, 2009.

CUNHA, C.; BRAMBILLA, R.; THOMAS, K.L. A simple role for BDNF in learning and memory? **Front Mol Neurosci.**, v. 9;,p. 3:1, 2010.

CZAJKOWSKI, R.; JAYAPRAKASH, B.; WILTGEN, B.; ROGERSON, T.; GUZMAN-KARLSSON, M.C.; BARTH, A.L.; TRACHTENBERG ,J.T.; SILVA, A.J. Encoding and storage of spatial information in the retrosplenial cortex. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 23, p. 8661-6, 2014.

D'HOOGE, R.; DE DEYN, P.P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and Memory. **Brain Research Reviews**, v. 36, p. 60–90, 2001.

DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S.J. Cell death: critical control points. **Cell.**, v. 116, p. 205-19, 2004.

DATASUS, 2014 disponível em: <http://datasus.saude.gov.br/sistemas-e-aplicativos/epidemiologicos/siab> acesso em: julho de 2016

DEGTEREV, A.; YUAN, J. Expansion and evolution of cell death programmes. **Nat Ver Mol Cell Biol.**, v. 9, p.378-90, 2008.

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? **Neurosci Biobehav. Rev.**, v. 25, p. 325-342, 2001.

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

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

DONG, S.; TONG, X.; LI, J.; HUANG, C.; HU, C.; JIAO, H.; GU, Y. Total flavonoid of *Litsea coreana* leve exerts anti-oxidative effects and alleviates focal cerebral ischemia/reperfusion injury. **Neural Regen Res.**, v. 8, p. 3193-202, 2013.

DONG, Y.; BENVENISTE, E.N. Immune function of astrocytes. **Glia**.36 (2), 180-190, 2001.

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.

- EICHENBAUM, H. Hippocampus: Mapping or memory? **Curr Biol.** v. 10, p.R785-7, 2000.
- ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. **Behav. Brain Res.**, v. 31, p. 47-59, 1988.
- EUSI, 2003. AVC Isquêmico, Profilaxia e Tratamento. Informação para médicos hospitalares e medicina ambulatória. Recomendações 2003 – Flyer Portugal. European Stroke Iniciative. Disponível em:<www.congrexswitzerland.com/.../EUSI_recommendations_flyer_portug>. Acesso em março 2016
- FEIGIN, V. L.; LAWES, C. M.; BENNETT, D. A.; BARKER-COLLO, S. L.; PARAG, V. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. **Lancet Neurol.**, v.8, n. 4, p. 355-369, 2009.
- FERNANDES, F.D. P.; MENEZES, A.P. f.; NEVES, J.C. s.; FONTELES, A.A., DA SILVA, A.T., RODRIGUES, P. A.; CARMO, M.R. S.; SOUZA, C.M., ANDRADE, G.M. Caffeic acid protects mice from memory déficits induced by focal cerebral ischemia. **Behav Pharmacol.**, v. 25, p. 637-647, 2014.
- FERRO, J. M.; VERDELHO, A. Epidemiologia, fatores de risco e prevenção primária do AVC. **Pathos**, p. 7-15, 2000.
- FONTELES, A.A.; SOUZA, C. M.; NEVES, J.C.S.; MENEZES, A.P.F.; CARMO, M.R.S.; FERNANDES, F.D.P.; ARAÚJO, P.R.; ANDRADE, G.M. Rosmarinic acid prevents against memory deficits in ischemic mice. **Behavioural Brain Research**, n. 297, p. 91–103, 2016.
- FUKUYAMA, N.; TAKIZAWA, S.; ISHIDA, H.; HOSHIAI, K.; SHINOHARA, Y.; impairments: A 6-month survival study. **Horm Behav**, v.30, p.30, 2006.
- GALVÃO, R. I. M.; DIÓGENES, J. P. L.; MAIA, G. C. L.; FILHO, E. A. S.; VASCONCELOS, S. M. M.; MENEZES, D. B.; CUNHA, G. M. A.; VIANA, G. S. B. Tenoxicam Exerts a Neuroprotective Action after Cerebral Ischemia in Rats. **Neurochem Res.**, v. 30, p. 39-46, 2005.
- GARCIA, J. G. 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. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 98, n. 6, p. 519-527, 2012.
- GELDERBLOM, M.; LEYPOLDT, F.; LEWERENZ, J.; BIRKENMAYER, G.; OROZCO, D.; LUDEWIG, P.; THUNDYIL, J.; ARUMUGAM, T. .; GERLOFF , C.; TOLOSA, E.; MAGNUS, T. The flavonoid fisetin attenuates postischemic immune cell infiltration, activation and infarct size after transient cerebralmiddle artery occlusion in mice. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, n. 32, p. 835–843, 2012
- GHOBRIAL, I. M.; WITZIG, T.E.; ADJEI, A.A. Targeting apoptosis pathways in câncer therapy. **CA Cancer J Clin.**, v. 55, p. 178-94, 2005.

GILGUN-SHERKI, Y.; ROSENBAUM, Z.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Antioxidant Therapy in Acute Central Nervous System Injury: Current State. **Pharmacological Reviews**, Bethesda, v. 54, n. 2, 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. **Behav. Neural Biol.** v. 46, p. 87–98, 1986.

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 a-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.

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

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

GU, X.H.; XU, L.J.; LIU, Z.Q.; WEI, B.; YANG, Y.J.; XU, G.G.; YIN, X.P.; WANG, W. The flavonoid baicalein rescues synaptic plasticity and memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. **Behav Brain Res.**, v. 311, p. 309-321, 2016.

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.

HALEY, E.C. J.R. High-dose tirilazad for acute stroke (RANTTAS II). RANTTAS I Investigators. **Stroke**, v. 29, p. 1256–1257, 1998.

HATTIANGADY, B.; RAO, M.S.; SHETTY, G.A.; SHETTY, A.K. Brain-derived neurotrophic factor, phosphorylated cyclic AMP response element binding protein and neuropeptide Y decline as early as middle age in the dentate gyrus and CA1 and CA3 subfields of the hippocampus. **Exp Neurol.**, v. 195, p. 353-71, 2005.

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

HENKE, K. A model for memory systems based on processing modes rather than consciousness. **Nat Rev Neurosci.**, v. 11, p. 523-32, 2010.

HOFMEIJER, J.; VAN PUTTEN, M. J. A. M. Ischemic Cerebral Damage: An Appraisal of Synaptic Failure. **Stroke**, v. 43, p. 607-615, 2012.

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

HOU, Y.; ABOUKHATWA, M.A.; LEI, D.L.; MANAYE, K.; KHAN, I.; LUO, Y. Anti depressant natural flavonols modulate BDNF and beta amyloid in neurons and hippocampus of double TgAD mice. **Neuropharmacology.**, v. 58, 911-20, 2010.

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

IADECOLA, C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. **Trends Neurosci.**, v. 20, p. 132-139, 1997.

IGAZ, L.M.; BEKINSCHTEIN, P.; VIANNA, M.M.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Gene expression during memory formation. **Neurotox Res.**, v. 6, p. 189-204, 2004.

ISHIGE, K.; SCHUBERT, D.; SAGARA, Y. Flavonoids protect 2 neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. **Free Radic Biol Med**, v. 30, p. 433-446, 2001.

ISHIKAWA, M.; ZHANG, J. H.; NANDA, A.; GRANGER, D.N. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in the cerebral microcirculation. **Front Biosci.**, v. 9, p.1339-1347, 2004.

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. **Neurobiol. Learning Memory**, v. 68, p. 285-316, 1997.

IZQUIERDO, I.; VIANNA, M.R.; IZQUIERDO, L.A.; BARROS, D.M.; SZAPIRO, G.; COITINHO, A.S.; MULLER, L.; CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.R.; MEDINA, J.H. Memory retrieval and its lasting consequences. **Neurotox Res.**, v. 4, p. 573-593, 2002.

JANKUN, J.; SELMAN, S.H.; ANIOLA, J.; SKRZYPczAK-JANKUN, E. Nutraceutical inhibitors of urokinase: potential applications in prostate cancer prevention and treatment. **Oncol Rep**, v. 16, p. 341-346, 2006.

JEFFRIES, A. M.; KILLIAN, N.J.; PEZARIS, J.S. Mapping the primate lateral geniculate nucleus: a review of experiments and methods. **J Physiol Paris.**, v. 108, p. 3-10, 2014.

JUNG, I.H.; LEE, H.E.; PARK, S.J.; AHN, Y.J.; KWON, G.; WOO, H.; LEE, S.Y.; KIM, J.S.; JO, Y.W.; JANG, D.S.; KANG, S.S.; RYU, J.H. Ameliorating effect of spinosin, a C-glycoside flavonoid, on scopolamine-induced memory impairment in mice. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 120, p. 88-94, 2014.

- KALT, W.; BLUMBERG, J.B; MCDONALD, J.E.; VINQVIST-TYMCHUK, M.R.; FILLMORE, S.A.; GRAF, B.A.; O'LEARY, J.M.; MILBURY, P.E. Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. **J Agric Food Chem.**, v. 56, p. 705-12, 2008.
- KANDEL, E. R. The Biology of Memory: A Forty-Year Perspective. **J Neurosc**, v. 29, p. 12748 -12756, 2009.
- KANDEL, E. R.; SQUIRE, L.R. Neuroscience: breaking down scientific barriers to the study of brain and mind. **Science**, v. 290, p. 1113-20, 2000.
- KANDEL, E.; ABEL, T. Neuropeptides, adenylyl cyclase, and memory storage. **Science**, v. 268, p. 825-6, 1995.
- KAPOSZTA, Z.; TOUNG, E.; BATH, P.M.W.; MARKUS, H.S. Clinical application os asymptomatic embolic signal detection in acute stroke: a prospective study. **Stroke**, v. 30, p. 1814-1818, 1999.
- KELLY, S.; MCCULLOCH, J.; HORSBURGH, K. Minimal ischaemic neuronal damage and HSP70 expression in MF1 strain mice following bilateral common carotid artery occlusion. **Brain Res.**, v. 914, p. 185-95, 2001.
- KIMELBERG, H.K.; NEDERGAARD, M. Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. **Neurotherapeutics**, v. 7, p. 338-53, 2010.
- 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, p. 138-45, 2004.
- KOREMATSU, K.; GOTO, S.; NAGAHIRO, S.; USHIO, Y. Changes of immunoreactivity for synaptophysin ('protein p38') following a transient cerebral ischemia in the rat striatum. **Brain Res.**, v. 616, p. 320-4, 1993.
- KRIZ, J.; LALANCETTE-HÉBERT, M. Inflammation, plasticity and real-time imaging after cerebral ischemia. **Acta Neuropathol.**, v. 117, p. 497-509, 2009.
- KUNTZ, S.; WENZEL, U.; DANIEL, H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. **Eur J Nutr**, v. 38, p. 133–142, 1999.
- LAI, A.Y.; TODD, K.G. Microglia in cerebral ischemia: molecular actions and interactions. **Can J Physiol Pharmacol.**, p. 84, p.49–59, 2006.
- 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. **Neurosci. Behav. Rev.**, v. 26, p. 91-104, 2002.

LEE, Y.; JEON, S.J.; LEE, H.E.; JUAG, Y.J.; LEE, S.; CHEONG, J.H.; JANG, D.S.; RYU, J.H. Spinosin, a C-glycoside flavonoid, enhances cognitive performance and adult hippocampal neurogenesis in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, n. 145, p. 9–16, 2016.

LEGA, B. C.; JACOBS, J.; KAHANA, M. Human hippocampal theta oscillations and the formation of episodic memories. **Hippocampus**, v. 22, p. 748–746, 2012.

LI, Q.; ZHAO, H.F.; ZHANG, Z.F.; LIU, Z.G.; PEI, X.R.; WANG, J.B.; LI, Y. Long term green tea catechin administration prevents spatial learning and memory impairment in senescence-accelerated mouse prone-8 mice by decreasing Abeta1-42 oligomers and upregulating synaptic plasticity-related proteins in the hippocampus. **Neuroscience**, v. 163, p. 741-9, 2009.

LIN, M.; SUN, W.; GONG, W.; ZHOU, Z.; DING, Y.; HOU, Q. Methylophiopogonanone A Protects against Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury and Attenuates Blood-Brain Barrier Disruption In Vitro. **Plos one**, p. 1-14, 2015.

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

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

LIU, S.; SOONG, Y.; SESHAN, S. V.; SZETO, H. H. Novel cardiolipin therapeutic protects endothelial mitochondria during renal ischemia and mitigates microvascular rarefaction, inflammation, and fibrosis. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 306, p. F970 F980, 2014.

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

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

MAHER , P. Modulation of multiple pathways involved in the maintenance of neuronal function during aging by fisetin. **Genes. Nutr.** 2009.

MAHER, P., DARGUSCH, R., BODAI, L., GERARD, P. E. PURCELL, J. M., MARSH, J. L. ERK activation by the polyphenols fisetin and resveratrol provides neuroprotection in multiple models of Huntington's disease. **Human Mol Gen.** 20, 2011.

MAHER, P.; AKAISHI, T.; ABE, K. Flavonoid fisetin promotes ERK-dependent long term potentiation and enhances memory. **PNAS**, v.103, p.16568–16573. 2006.

MAHER, P.; SALGADO, K . F.; ZIVIN, J.A.; LAPCHAK, P. A. A novel approach to screening for new neuroprotective compounds for the treatment of stroke. **RAINRE SEARCH**, n. 1173, p. 117 – 125, 2007.

MARSH, J. D.; KEYROUZ, S. G. Stroke prevention and treatment. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 56, p. 683-691, 2010.

MARTIN, D.R., LEWINGTON, A.J.; HAMMERMAN, M.R.; PADANILAM, B.J. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates ischemic renal injury in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 279, p. R1834-40, 2000.

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

MATSUI, Y.; TAKAGI, H.; QU, X.; ABDELLATIF, M.; SAKODA, H.; ASANO, T.; LEVINE, B.; SADOSHIMA. J. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. **Circ Res.**, v. 100, p. 914-22, 2007.

MAUD, A. Memory loss after stroke. **Am. Acad. Neurol.**, v.24, p. 67, 2006.

MAVIEL, T.; DURKIN, T.P.; MENZAGHI, F.; BONTEMPI, B. Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. **Science.**, v. 305, p. 96-9, 2004.

MCEWEN, B. S.; SAPOLSKY, R. M. Stress and cognitive function. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 5, p. 205–216, 1995.

MCGAUGH, J.L. Memory--a century of consolidation. **Science.**, v. 287, p. 248-51, 2000.

MENG, F.; LIU, R.; GAO, M.; WANG, Y.; YU, X.; XUAN, Z.; SUN, J.; YANG, F.; WU, C.; DU, G. Pinocembrin attenuates blood–brain barrier injury induced by global cerebral ischemia–reperfusion in rats. **Brain research**, v. 1391, p. 93 – 101, 2011.

MEUNIER, M.; BACHEVALIER, J.; MISHKIN, M.; MURRAY, E.A. Effects on visual recognition of combined and separate ablations of the entorhinal and perirhinal cortex in rhesus monkeys. **J Neurosci.**, v. 13, p. 5418-32, 1993.

MIESEL, R.; KURPISZ, M.; KRÖGER, H. Modulation of inflammatory arthritis by inhibition of poly (ADP ribose) polymerase. **Inflammation.**, v. 19, p. 379-87, 1995.

MIMISTÉRIO DA SAÚDE, 2015 disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio#61> acesso: julho 2016

MOON, M.; JEONG, H. U.; CHOI, J.G.; JEON, S.G.; SONG, E.J.; HONG, S.P.; OH, M.S. Memory-enhancing effects of Cuscuta japonica Choisy via enhancement of adult hippocampal neurogenesis in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 311, p. 173–182, 2016.

MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **J. Neurosci. 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.

MURPHY, T.H.; LI, P.; BETTS, K.; LIU, R. Two-photon imaging of stroke onset in vivo

reveals that NMDA-receptor independent ischemic depolarization is the major cause of rapid reversible damage to dendrites and spines. **J Neurosci**, v. 28, p. 1756–72, 2008.

MURTAZA, I.; ADHAM, V.M.; HAFEEZ, B.B.; SALEEM, M.; MUKHTAR, H. Fisetin, a natural flavonoid, targets chemoresistant human pancreatic cancer AsPC-1 cells through DR3-mediated inhibition of NF- κ B. **Int J Cancer**, v.125, p. 2465–2473, 2009

MUTSO, A.A.; PETRE, B.; HUANG, L.; BALIKI, M.N.; TORBEY, S.; HERRMANN, K.M.; SCHNITZER, T.J.; APKARIAN, A.V. Reorganization of hippocampal functional connectivity with transition to chronic back pain. **J. Neurophysiol.**, v. 111, p. 1065–1076, 2014.

NAKASE, T.; FUSHIKI, S.; NAUS, C. C. G. Astrocytic Gap Junctions Composed of Connexin 43 Reduce Apoptotic Neuronal Damage in Cerebral Ischemia. **Stroke**, v. 34, p. 1987–1993, 2003.

NAKAZAWA, H. Peroxynitrite formation in focal cerebral ischemia-reperfusion in rats occurs predominantly in the peri-infarct region. **J Cereb Blood Flow Metab**, v.18, p. 123–29, 1998.

NAZARIA, M.; KESHAVARZ, S.; RAFATI, A.; NAMAVAR. M. R. Fingolimod (FTY720) improves hippocampal synaptic plasticity and memory deficit in rats following focal cerebral ischemia. **Brain Research Bulletin**, n. 124, p. 95–102, 2016.

NIEUWENHUIS, I.L.; TAKASHIMA, A. The role of the ventromedial prefrontal cortex in memory consolidation. **Behav Brain Res.**, v. 218, p. 325-34, 2011.

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

OFFNER, H.; SUBRAMANIAN, S.; PARKER, S.M.; AFENTOULIS, M.E.; VANDENBARK, A.A.; HURN, P.D. Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 26, p. 654 665, 2006.

OKUYAMA, S.; MORITA, M.; SAWAMOTO, A.; TERUGO, T.; NAKAJIMA, M.; FURUKAWA, Y. Edaravone enhances brain-derived neurotrophic factor production in the ischemic mouse brain. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 8, p. 176-85, 2015.

OUYANG, Y.B.; XU, L.; LIU, S.; GIFFARD, R.G. Role of Astrocytes in Delayed Neuronal Death: GLT-1 and its Novel Regulation by MicroRNAs. **Adv Neurobiol.**, v. 11, p.171-88, 2014

PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev**, v. 87, p. 315–424, 2007.

PEGG, D. E. Organ preservation. **Surg. Clin. North Am.**, v. 66, p. 617–632, 1986.
PEKNY, M.; NILSSON, M. Astrocyte activation and reactive gliosis. **Glia.**, v. 50, p. 427 434, 2005.

PERSSON, M. FHAGER, A. ; TREFNA, H.D. ; YINAN YU ; MCKELVEY, T. ; PEGENIUS, G. ; KARLSSON, J.-E. ; ELAM, M. Microwave-Based Stroke Diagnosis Making Global Prehospital Thrombolytic Treatment Possible. **Browse Journals & Magazines**, v. 61, p. 2806-17, 2014

PIEPER, A.A.; BRAT, D.J.; KRUG, D.K.; WATKINS, C.C.; GUPTA, A.; BLACKSHAW, S.; VERMA, A.; WANG, Z.Q.; SNYDER, S.H. Poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice are protected from streptozotocin-induced diabetes. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 96, p. 3059-64, 1999.

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.

POO, M.M. Neurotrophins as synaptic modulators. **Nat Rev Neurosci.**, v. 2, p. 24-32,2001.

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

PRADILLO, J.M.; ROMERA, C.; HURTADO, O.; CARDENAS, A.; MORO, M.A.; LEZA, J.C.; DAVALOS, A.; CASTILLO, J.; LORENZO, P.; LIZASOAIN, I. TNFR1 upregulation mediates tolerance after brain ischemic preconditioning. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 25, v. 193–203, 2005.

PRAKASH, D., GOPINATH, K., SUDHANDIRAN, G. Fisetin Enhances Behavioral Performances and Attenuates Reactive Gliosis and Inflammation During Aluminum Chloride-Induced Neurotoxicity. **Neuromol Med**, 2012.

RADANOVIC, M. Características do atendimento de pacientes com Acidente Vascular Cerebral em hospital secundário. **Arq Neuropsiquiatr.**, v. 58, p. 99-106, 2000.

RAETZ, C.R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharideendotoxins. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 71, p. 635–700, 2002.

REHMAN, S.U.; SHAH, S.A.; ALI, T.; CHUNG, J.I.; KIM, M.O. Anthocyanins Reversed D-Galactose-Induced Oxidative Stress and Neuroinflammation Mediated Cognitive Impairment in Adult Rats. **Mol Neurobiol.** 2016 Jan 6. DOI 10.1007/s12035_015-9604-5

REMPEL-CLOWER, N. L.; ZOLA, S. M.; SQUIRE, L. R.; AMARAL, D. G. Three cases of enduring memory impairment after bilateral damage limited to the hippocampal formation. **J. Neurosci.**, v. 16, p. 5233-5255, 1996.

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.

RUNE, G.M.; FROTSCHER, M. Neurosteroid synthesis in the hippocampus: role in synaptic plasticity. **Neuroscience.**, v. 136, p. 833-42, 2005.

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 alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. **Psychopharmacology**, v. 94, p. 491-505, 1988.

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

SCHAAF ,M.J.; WORKEL, J.O.; LESSCHER, H.M.; VREUGDENHIL, E.; OITZL, M.S.; DE KLOET, E.R. Correlation between hippocampal BDNF mRNA expression and memory performance in senescent rats. **Brain Res.**, v. 915, p. 227-33, 2001.

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

SEO, SEUNG-HEE.; JEONG, GIL-SAENG. Fisetin inhibits TNF α - induced inflammatory action and hydrogen peroxide- induced oxidative damage in human keratinocyte HaCat cells through PI3K/AKT/Nrf-2-mediated heme oxygenase-1 expression. **Internation Immunopharmacology**, v.298, p. 246-253, 2015.

SHEN, H.; WANG, Y. Correlation of locomotor activity and brain infarction in rats with transient focal ischemia. **J Neurosci Methods.**, v. 186, p. 150-4, 2010.

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

SHIA, C.S.; TSAI, S.Y.; KUO, S.C.; HOU, Y.C.; CHAO, P.D. Metabolism and pharmacokinetics of 3,3¢,4¢,7-tetrahydroxyflavone (fisetin), 5-hydroxyflavone, and 7-hydroxyflavone and antihemolysis effects of fisetin and its serum metabolites. **J Agric Food Chem**, v. 57, p. 83–89, 2009.

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

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, C.C.; DAVIDSON, S.M.; LIM, S.Y.; SIMPKIN, J.C.; HOTHERSALL, J.S.; YELLON, D. M. Necrostatin: a potentially novel cardioprotective agent? **Cardiovasc Drugs Ther.**, v. 21, p. 227-33, 2007.

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

SOOBRATEE, 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.

SOUZA, Carolina Melo de. Efeito neuroprotetor da curcumina sobre o estresse oxidativo, inflamação, memória e dano neuronal de ratos submetidos à isquemia cerebral transitória. 2012. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

SPENCER, J.P.E. Flavonoids: modulators of brain function? **British Journal of Nutrition**, v. 99, p. ES60–E, 2008.

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

SRIRAM, K.; O'CALLAGHAN, J.P. Divergent roles for tumor necrosis factor-alpha in the brain. **J Neuroimmune Pharmacol.**, v. 2, p. 140–153, 2007.

STELIGA, A.; WAŚKOW, M.; KARWACKI, Z.; WÓJCIK, S.; LIETZAU, G.; KLEJBOR, I.; KOWIAŃSKI, P. Transcription factor Pax6 is expressed by astroglia after transient brain ischemia in the rat model. **Folia Neuropathol.**, v. 51, p. 203-13, 2013.

STRASSER, A.; O'CONNOR, L.; DIXIT, V. M. Apoptosis signaling. **Annu Ver Biochem.**, v. 69, p.217-45, 2000.

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.

SYED, D.N.; AFAQ, F.; MADDODI, N.; JOHNSON, J.J.; SARFARAZ, S.; AHMAD, A.; SETALURI, V.; MUKHTAR, H. Inhibition of human melanoma cell growth by the dietary flavonoid fisetin is associated with disruption of Wnt/beta-catenin signaling and decreased Mitf levels. **J Invest Dermatol**, v. 131, p. 1291–1299, 2011.

SYED, D.N.; SUH, Y.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Dietary agents for chemoprevention of prostate cancer. **Cancer Lett**, v. 265, p.167– 176, 2008.

SZLISZKA, E.; HELEWSKI, K.J.; MIZGALA, E.; KROL, W. The dietary flavonol fisetin enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in prostate cancer cells. **Int J Oncol**, v. 39, p. 771–779, 2011.

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.

TARIOT, P.N.; SUNDERLAND, T.; WEINGARTNER, H.; MURPHY, D.L.; WELKOWITZ, J.A.; THOMPSON, K.; COHEN, R.M. Cognitive effects of L-deprenyl in Alzheimer's disease. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 91, p.489-95, 1987.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 9, p. 231–224, 2008.

- 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.
- TRAYSTMAN, R.J. Animal models of focal and global cerebral ischemia. **ILAR J.**, v. 44, p. 85-95, 2003.
- TUOR, U.I.; ZHAO, Z.; BARBER, P.A.; MIN QIAO, M. Recurrent mild cerebral ischemia: enhanced brain injury following acute compared to subacute recurrence in the rat. **BMC Neurosci**, v. 17, p. 28, 2016.
- UNO, H.; MATSUYAMA, T.; AKITA, H.; NISHIMURA, H.; SUGITA, M. Induction of tumor necrosis factor-alpha in the mouse hippocampus following transient forebrain ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v.17, p. 491–499, 1997.
- VAN DER WORP, H. B.; VAN DER GIJN, J. Clinical practice. Acute ischemic stroke. **N Engl J Med.**, v. 357, p. 572-9, 2007.
- VAN KESTEREN, M. T.; RIJPKEMA, M.; RUITER, D.J.; FERNÁNDEZ, G. Consolidation differentially modulates schema effects on memory for items and associations. **PLoS One**, v. 8, p. :e56155, 2013.
- VAYNMAN, S.S.; YING, Z.; YIN, D.; GOMEZ-PINILLA, F. Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF. **Brain Res.**, v. 26, n. 1070, p. 124-30, 2006.
- WANG, Q.; SUN, A. Y.; SIMONYI, A.; JENSEN, M. D.; SHELAT, P. B.; WANG, Q.; TANG, X. N.; YENARI, M. A. The inflammatory response in stroke. **J Neuroimmunol.**, v. 184, p. 53–68, 2007.
- WANG, R.; YAN, H.; TANG, X.C. Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine. **Acta Pharmacol Sin.**, v.27, p. 1 26, 2006.
- WANG, W.; MA, X.; HAN, J.; ZHOU, M.; REN, H.; PAN, Q.; ZHENG, C.; ZHENG, Q. Correction: Neuroprotective Effect of Scutellarin on Ischemic Cerebral Injury by Down-Regulating the Expression of Angiotensin-Converting Enzyme and AT1 Receptor. **PLoS One**, v. 11, p. e0147780, 2016.
- WANG, 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. **J. Clin. Neurosci.**, v. 15, p. 278–285, 2008.
- WANG, X.; LI, H.; DING, S. The effects of NAD⁺ on apoptotic neuronal death and mitochondrial biogenesis and function after glutamate excitotoxicity. **Int J Mol Sci.**, v. 15, p. 20449-68, 2014.
- WANG, X.; MICHAELIS, E. K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. **Aging Neurosci.**, v 30, p.12, 2010

WANG, Z. F.; WANG, J.; ZHANG, H.Y.; TANG, X.C. Huperzine A exhibits anti inflammatory and neuroprotective effects in a rat model of transient focal cerebral ischemia. **J Neurochem.**, v. 106, v. 1594-603, 2008.

WANG, Z.; DU, Q.; WANG, F.; LIU, Z.; LI, B.; WANG, A.; WANG, Y. Microarray analysis of gene expression on herbal glycoside recipes improving deficient ability of spatial learning memory in ischemic mice. **J Neurochem.**, v. 88, p. 1406-15, 2004.

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

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.

WILLIAMS, C.M.; EL MOHSEN, M.A.; VAUZOUR, D.; RENDEIRO, C.; BUTLER, L.T.; ELLIS, J.A.; WHITEMAN, M.; SPENCER, J.P. Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB phosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. **Free Radic Biol Med.**, v. 45, p. 295-305, 2008.

WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? **Free Radic Biol Med.**, v. 36, p. 838-49, 2004.

WINSHIP, I. R., MURPHY, T. H. In vivo calcium imaging reveals functional rewiring of single somatosensory neurons after stroke. **J Neurosci**, v. 28, p. 6592–606, 2008.

WIN-SHWE, T.T.; FUJIMAKI, H. Acute administration of toluene affects memory retention in novel object recognition test and memory function-related gene expression in mice. **J Appl Toxicol.**, v. 32, p. 300-4, 2011.

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

WHO (World Health Organization). Neurological disorders. Disponível em: http://www.who.int/mental_health/neurology/neurological_disorders_report_web.pdf. Acesso em: 28 de maio de 2016

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

YAMAGUCHI, T.; GOTO, A.; NAKAHARA, I.; YAWATA, S.; MATSUDA, M.; FUNABIKI, K.; NAKANISHI, S. Role of PKA signaling in D2 receptor-expressing neurons in the core of the nucleus accumbens in aversive learning. **PNAS**, v. 112, p.11383–11388, 2015.

YAO, R.Q.; QI, D.S.; YU, H.L.; LIU, J.; YANG, L.H.; WU, X.XQuercetin attenuates cell apoptosis in focal cerebral ischemia rat brain via activation of BDNF-TrkB-PI3K/Akt signaling pathway. **Neurochem Res.**, v. 37, p. 2777-86, 2012.

YOO, K. Y.; HWANG, I. K.; KIM, J. D.; KANG, I. J.; PARK, J.; YI, J. S.; KIM, J. K.; BAE, Y. S.; WON, M. H. Antiinflammatory effect of the ethanol extract of Berberis koreana in a gerbil model of cerebral ischemia/reperfusion. **Phytother. Res.**, v. 22, 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.; CARRARO JÚNIOR, H.; CORAL, P.; MUZZIO, J. A.; IWAMOTO, F. M.; COLETE, M. V. D.; WERNRCK, L. C. Acidente vascular cerebral em pacientes jovens. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 59, n. 3B, p. 740-745, 2001.

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

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, p. 46-54, 2013.

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

ZHENG, G.; CHEN, B.; FANG, Q.; YI, H.; LIN, Q.; CHEN, L.; TAO, J.; LI, J.; ZHENG, X.; LI, M.; LAN X. Primary prevention for risk factors of ischemic stroke with Baduanjin exercise intervention in the community elder population: study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**, v. 15, p. 113, 2014.