



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

**JULLIANA CATHARINA DE SOUSA NEVES**

**LICOPENO DIMINUI A LESÃO CEREBRAL ISQUÊMICA POR INIBIÇÃO  
DA INFLAMAÇÃO EM CAMUNDONGOS**

**FORTALEZA**

**2017**

**JULLIANA CATHARINA DE SOUSA NEVES**

**LICOPENO DIMINUI A LESÃO CEREBRAL ISQUÊMICA POR INIBIÇÃO  
DA INFLAMAÇÃO EM CAMUNDONGOS**

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

**FORTALEZA**

**2017**

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

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

---

N424l neves, Julliana catharina de sousa.  
LICOPENO DIMINUI A LESÃO CEREBRAL ISQUÊMICA POR INIBIÇÃO DA INFLAMAÇÃO EM  
CAMUNDONGOS / Julliana catharina de sousa neves. – 2017.  
112 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação  
em Farmacologia, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade.

1. licopeno. 2. isquemia cerebral focal. 3. inflamacao. I. Título.

CDD 615.1

---

**JULLIANA CATHARINA DE SOUSA NEVES**

**LICOPENO DIMINUI A LESÃO CEREBRAL ISQUÊMICA POR INIBIÇÃO  
DA INFLAMAÇÃO EM CAMUNDONGOS**

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

Aprovada em: \_\_/\_\_/\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

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

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Nylane Maria Nunes de Alencar  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Ana Maria Sampaio Assruey  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof. Dr. Orleancio Gomes Riparo de Azevedo  
Faculdade de Odontologia Paulo Picanço

À Deus.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, pois sem ele nada seria possível e nas horas mais difíceis é a ele a quem nós recorremos.

À minha família, meus pais, Socorro e Vilmar, por me darem tanto amor.

Agradeço a meu marido Leandro e a Benjamim, meu filho, por trazerem mais luz à minha vida.

À professora Dr<sup>a</sup>. Geanne Matos de Andrade, pela excelente orientação e por seus ensinamentos.

Agradeço enormemente às minhas amigas, que tenho como irmãs, que me socorrem sempre em todas as horas que mais preciso. Minha gratidão de vida.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Neurociências e Comportamento pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Obrigada a todos por me ajudarem a transpor mais uma etapa.

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

(Gabriel Garcia Marques)

## RESUMO

### LICOPENO DIMINUI A LESÃO CEREBRAL ISQUÊMICA POR INIBIÇÃO DA INFLAMAÇÃO EM CAMUNDONGOS

O acidente vascular Cerebral (AVC) resulta da interrupção aguda do fluxo sanguíneo aos tecidos cerebrais, ocasionando decréscimo de oxigênio e glicose para os tecidos e consequentemente em perda rápida da função neurológica. É a segunda principal causa de morte no mundo e uma das principais causas de incapacidade física. O licopeno é um membro da família dos carotenoides e têm demonstrado atividade antioxidante, anti-inflamatória e anti-apoptótica. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos do licopeno sobre o dano neuronal, déficits de memória e resposta inflamatória de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente induzida por oclusão da artéria cerebral média (pMCAO). Foram utilizados 156 camundongos Swiss, divididos em 7 grupos: 1. falso-operado, 2. falso-operado tratado com licopeno (20 mg/kg), 3. isquemiados pMCAO, 4. pMCAO tratados com licopeno (2 mg/kg), 5. pMCAO tratados com licopeno na dose de 10 mg/kg e 6. pMCAO tratados com licopeno (20 mg/kg). pMCAO tratados com licopeno (40 mg/kg). O licopeno foi administrado via oral 2 h após a indução de pMCAO e uma vez ao dia durante 4 dias. O dano isquêmico foi avaliado através da coloração com TTC e o da avaliação neurológica. O licopeno diminuiu significativamente a área de infarto e o desempenho sensorio-motor dos animais (20 mg/kg). A atividade locomotora foi avaliada através do teste de campo aberto. Os animais isquemiados apresentaram diminuição da exploração vertical e o licopeno reverteu essas alterações. Os animais isquemiados apresentaram déficits de memória de trabalho, episódica, espacial e de aversiva e o tratamento com licopeno (20 mg/kg), preveniu significativamente esses déficits. A neuroinflamação foi avaliada através da avaliação da astrogliose (GFAP) microgliose (iba 1) e TNF- $\alpha$  e através da expressão de NF- $\kappa$ B. Também foi avaliada a ação do licopeno sobre as proteínas sinápticas e de expressão de GSK-3 $\beta$ . O licopeno diminuiu a ativação do GFAP no córtex, de TNF- $\alpha$  e de NF- $\kappa$ B no córtex e estriado e não interfere na proteína sináptica (sinaptofisina). O licopeno possui atividade neuroprotetora provavelmente devido a sua ação anti-inflamatória. Nosso estudo fornece evidência experimental acerca do uso do licopeno no tratamento da isquemia cerebral.

**Palavras-chave:** Isquemia cerebral focal permanente, Licopeno, neuroinflamação.



## ABSTRACT

### LYCOPENE DECREASES ISCHEMIC BRAIN INJURY FOR INHIBITION OF INFLAMMATION IN MICE

Ischemic cerebrovascular accident results from reduced blood supply to brain tissue, resulting in deprivation of glucose and oxygen characterized by rapid loss of neurological function. Stroke is the second leading cause of death and the first cause of disability worldwide. Lycopene is a member of the carotenoid family of phytochemicals and has been demonstrated to be effective in anti-oxidative stress, anti-inflammatory and antiapoptotic reaction in the models of neurodegenerative diseases. The aim of this work was to study the effect of lycopene in neuronal damage, memory deficits and neuroinflammatory response in mice subjected to experimental model of focal cerebral brain ischemia by occlusion of middle cerebral artery (pMCAO). One hundred and fifty-six animals were divided into 7 groups as following: 1. sham-operated, 2. sham-operated treated with lycopene (20 mg/kg v.o.), 3. ischemic animals (pMCAO), 4. ischemic animals treated with lycopene at 2 mg/kg p.o., 5. ischemic animals treated with lycopene at 10 mg/kg p.o., 6. ischemic animals treated with lycopene at 20 mg/kg, 7. ischemic animals treated with lycopene at 40 mg/kg p.o. Lycopene treatment was initiated 2 h after pMCAO induction once a day in 4 days following. The effect on ischemic damage was assessed by TTC staining and sensorimotor damage through the neurological evaluation scale. Lycopene decreased the area of ischemic infarction and improved the sensory-motor performance of the animals at 20 mg/kg. The locomotor activity was evaluated through the open field test. The ischemic animals presented increased number of crossings and decreased number of rearings and lycopene reversed these changes at 20 mg/kg. The pMCAO produced deficits in operational memory, episodic memory, spatial memory and aversive memory and the treatment with lycopene (20 mg/kg) prevented memory deficits. The role of neuroinflammation was assessed through the evaluation of astrogliosis (GFAP) and the expression of TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B. The action of lycopene on synaptogenesis and GSK-3B expression was also evaluated. Lycopene decreased inflammation by decreasing GFAP in the cortex, TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B in the cortex and striatum and has no effect on synaptogenesis. The results of this study suggest that lycopene has neuroprotective activity probably due to its effect against neuroinflammation. Our study provides experimental evidence for using lycopene in the treatment of cerebral ischemia.

**Key-word:** Cerebral ischemia, Neuroinflammation, Lycopene

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Esquema mostrando as artérias cerebrais anteriores e posteriores, artérias comunicantes anteriores e posteriores e a carótida interna que formam o polígono de Willis	19
Figura 2	Fisiopatologia da isquemia	21
Figura 3	Estrutura molecular do licopeno	33
Figura 4	Eletrocauterização da artéria cerebral média	39
Figura 5	Arena do Campo Aberto	42
Figura 6	Labirinto em Y	42
Figura 7	Arena com objetos	44
Figura 8	Arena Water Maze	45
Figura 9	Aparelho de Esquiva Passiva	46
Figura 10	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.	51
Figura 11	O Licopeno protege contra o dano neuronal isquêmico em camundongos submetidos à pMCAO (n=5/grupo).	52
Figura 12	O licopeno (20 mg/kg) melhora os déficits sensório-motores em camundongos submetidos à pMCAO (n=6/grupo).	53
Figura 13	Efeito do licopeno (20 e 40 mg/kg) sobre o número de cruzamentos e explorações verticais no teste do campo aberto de camundongos submetidos à pMCAO (n=8/grupo)	54
Figura 14	Efeito do licopeno (20 e 40 mg/kg) sobre a memória de trabalho de camundongos submetidos à pMCAO (n=8/grupo).	55
Figura 15	Efeito do licopeno (20 e 40 mg/kg) sobre a memória episódica avaliada através do teste de reconhecimento de objetos de camundongos submetidos à pMCAO (n = 8/grupo).	56
Figura 16	Efeito do licopeno (20 e 40 mg/kg) sobre o aprendizado avaliada através do tempo de latência nos treinos para alcançar a plataforma de camundongos submetidos à pMCAO (n = 8/grupo).	57
Figura 17	Efeito do licopeno (20 e 40 mg/kg) sobre a memória espacial, avaliada através do parâmetro latência para alcançar a plataforma, de camundongos submetidos à pMCAO.	58

Figura 18	Efeito do licopeno (20 e 40 mg/kg) sobre a memória espacial, avaliada através do parâmetro número de cruzamentos, de camundongos submetidos à pMCAO.	58
Figura 19	Efeito do licopeno (20 e 40 mg/kg) sobre a memória espacial, avaliada através do parâmetro tempo de permanência no quadrante, de camundongos submetidos à pMCAO.	59
Figura 20	Efeito do licopeno (20 e 40 mg/kg) sobre a memória aversiva de camundongos submetidos à pMCAO	60
Figura 21	Imagens representativas do efeito do licopeno (20 mg/kg) sobre a ativação de astrócitos (GFAP) no córtex temporal de camundongos submetidos à pMCAO.	61
Figura 22	Efeito do licopeno sobre a ativação de astrócitos (GFAP) no córtex temporal de camundongos submetidos à pMCAO	61
Figura 23	Imagens representativas do efeito do licopeno (20 mg/kg) sobre a ativação de astrócitos (GFAP) no córtex temporal de camundongos submetidos à pMCAO	62
Figura 24	Efeito do licopeno (20 mg/kg) sobre a ativação de micróglia (Iba-1) no córtex temporal de camundongos submetidos à pMCAO.	63
Figura 25	Imagens representativas do efeito do licopeno (20 mg/kg) sobre a imunreatividade para TNF- $\alpha$ no córtex temporal e no estriado de camundongos submetidos à pMCAO	64
Figura 26	Quantificação por densitometria ótica dos níveis do TNF- $\alpha$ no corpo estriado e córtex de camundongos submetidos à pMCAO	65
Figura 27	Efeito do licopeno sobre a expressão de NF $\kappa$ B no corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO.	66
Figura 28	Efeito do licopeno sobre a expressão de NF $\kappa$ B no córtex de camundongos submetidos à pMCAO.	66
Figura 29	Efeito do licopeno sobre a expressão de GSK-3 $\beta$ no córtex de camundongos submetidos à pMCAO. 6	67
Figura 30	Efeito do licopeno na expressão da proteína sinaptofisina no corpo estriado de camundongos submetidos a pMCAO.	68
Figura 31	Efeito do licopeno na expressão da proteína sinaptofisina no corpo estriado de camundongos submetidos a pMCAO.	69



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína quinase B
ATP	Adenina Trifosfato
AVCi	Acidente Vascular Cerebral Isquêmico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FO	Falso Operado
GSH	Glutationa
GSK-3 $\beta$	Glicogênio Sintase 3 $\beta$
i.p.	Intraperitoneal
ICAM-1	Moléculas de Adesão Intracelular
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-6	Interleucina 6
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i> / óxido nítrico sintase induzível
IP3	Inositol Tri Fosfato
LPS	Lipopolissacarídeo
LTP	<i>Long term potentiation</i>
MCAO	Artéria Cerebral Média
Nrf 2	<i>Nuclear Factor Erythroid 2</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OH-1	Hemeoxigenase 1
pMCAO	<i>Permanent middle cerebral artery occlusion</i> / oclusão permanente da artéria cerebral média
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
rt-PA	Ativador de plasminogênio treccidual recombinante
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase

TNF $\alpha$  Fator de Necrose Tumoral

VCAM-1 *Vascular cell adhesion molecule*/Molécula de adesão celular vascular-1

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>1.1</b>	<b>Acidente vascular cerebral (AVC)</b>	<b>18</b>
<b>1.2</b>	<b>Epidemiologia do AVC no Brasil e no mundo</b>	<b>19</b>
<b>1.3</b>	<b>AVC e suas consequências para o indivíduo</b>	<b>20</b>
<b>1.4</b>	<b>Isquemia cerebral</b>	<b>21</b>
1.4.1	Lesão isquêmica cerebral	22
1.4.2	Modelo de isquemia cerebral	22
1.4.3	Excitotoxicidade e a isquemia	23
1.4.4	Inflação e a isquemia cerebral	24
<b>1.5</b>	<b>Tipos de morte celular na isquemia</b>	<b>26</b>
<b>1.6</b>	<b>Memória e isquemia cerebral</b>	<b>27</b>
<b>1.7</b>	<b>Terapias de reparo</b>	<b>29</b>
<b>1.8</b>	<b>Plantas medicinais e a neuroproteção</b>	<b>30</b>
<b>1.9</b>	<b>Licopeno</b>	<b>32</b>
<b>2</b>	<b>RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral</b>	<b>35</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>Animais</b>	<b>36</b>
<b>4.2</b>	<b>Drogas</b>	<b>36</b>
<b>4.3</b>	<b>Protocolo experimental</b>	<b>36</b>
<b>4.4</b>	<b>Isquemia cerebral focal permanente por oclusão da artéria cerebral média (pMCAO)</b>	<b>39</b>
<b>4.5</b>	<b>Avaliação do infarto isquêmico - Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol (TTC)</b>	<b>39</b>
<b>4.6</b>	<b>Avaliação Neurológica</b>	<b>40</b>
<b>4.7</b>	<b>Avaliação da atividade locomotora - Teste do Campo Aberto</b>	<b>41</b>
<b>4.8</b>	<b>Avaliação da memória de trabalho - Teste do labirinto em Y</b>	<b>42</b>
<b>4.9</b>	<b>Avaliação da memória episódica – Teste do Reconhecimento de Objetos</b>	<b>43</b>

<b>4.10</b>	<b>Avaliação da memória espacial - Teste do Labirinto Aquático</b>	44
<b>4.11</b>	<b>Avaliação da memória aversiva – Teste da Esquiva Passiva</b>	45
4.11.1	Preparo da amostra para avaliação da expressão de sinaptofisina	46
4.11.2	Preparo da amostra para a avaliação da expressão de NF $\kappa$ B e GSK3 $\beta$	46
4.11.3	Avaliação da expressão de sinaptofisina, NF $\kappa$ B e GSK 3 $\beta$	47
<b>4.12</b>	<b>Avaliação da astrogliose e microgliose através da imunomarcacão com GFAP e Iba 1</b>	48
<b>4.13</b>	<b>Avaliação da imunoreatividade para TNF-<math>\alpha</math></b>	48
<b>4.14</b>	<b>Análise estatística</b>	49
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	51
<b>5.1</b>	<b>Efeito do licopeno sobre o dano isquêmico dos animais submetidos à pMCAO</b>	51
<b>5.2</b>	<b>Avaliação neurológica dos animais submetidos à pMCAO e tratados com licopeno.</b>	53
<b>5.3</b>	<b>Efeito do licopeno sobre a atividade locomotora de camundongos submetidos à pMCAO</b>	53
<b>5.4</b>	<b>Efeito do licopeno sobre a memória de trabalho de camundongos submetidos à pMCAO</b>	54
<b>5.5</b>	<b>Efeito do licopeno sobre a memória episódica avaliada através do teste de reconhecimento de objetos em camundongos submetidos à pMCAO</b>	55
<b>5.6</b>	<b>Efeito do licopeno sobre a memória espacial de camundongos submetidos à pMCAO</b>	56
<b>5.7</b>	<b>Efeito do licopeno sobre a memória aversiva de camundongos submetidos à pMCAO</b>	59
<b>5.8</b>	<b>Efeito do licopeno sobre a ativação de astrócitos evidenciada pela imunomarcacão com GFAP no córtex temporal de camundongos submetidos à pMCAO</b>	60
<b>5.9</b>	<b>Efeito do licopeno sobre a ativação de microglial evidenciada pela imunomarcacão com Iba-1 no córtex temporal de camundongos submetidos à pMCAO</b>	62
<b>5.10</b>	<b>Efeito do licopeno sobre a imunoreatividade de TNF-<math>\alpha</math> no corpo estriado e córtex de camundongos submetidos à pMCAO</b>	63
<b>5.11</b>	<b>Efeito do licopeno sobre a expressão de NF-<math>\kappa</math>B no corpo estriado e</b>	65



	<b>córtex de camundongos submetidos à pMCAO</b>	
<b>5.12</b>	<b>Efeito do licopeno sobre a expressão de GSK-3<math>\beta</math> no córtex de camundongos submetidos à pMCAO</b>	<b>67</b>
<b>5.13</b>	<b>Efeito do licopeno sobre a expressão de sinaptofisina no corpo estriado e córtex de camundongos submetidos a pMCAO</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>86</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>87</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1. Acidente vascular cerebral (AVC)

O Acidente vascular cerebral (AVC) é definido, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), como uma lesão cerebral resultante da interrupção aguda do fluxo sanguíneo arterial que pode surgir por uma obstrução do vaso provocada por um êmbolo ou trombo (coágulo), pela pressão de perfusão cerebral insuficiente ou pela ruptura da parede da artéria. Ainda segundo a OMS, o AVC comumente se apresenta com desenvolvimento rápido de sinais clínicos de distúrbios focais (ou globais) da função cerebral, com sintomas que perduram por um período superior a 24 h ou conduzem à morte, sem outra causa aparente que a de origem vascular (OMS, 2016).

O ataque transitório isquêmico (ATI) diferencia-se do AVC pois o suporte sanguíneo é espontâneo e rapidamente reestabelecido, e concomitante a esse restabelecimento dá-se o retorno completo das funções neurológicas. Outra causa de hipóxia e reoxigenação pode ser raramente episódios cíclicos de obstrução de ar durante o sono, apnéia do sono (FLYNN; MACWALTER; DONEY 2008).

O AVC é dividido em duas categorias: isquêmico e hemorrágico. O AVC isquêmico é resultante da insuficiência de suprimento sanguíneo cerebral (PIRES; GAGLIARDI; GORZONI, 2004). No AVC hemorrágico ocorre sangramento no parênquima cerebral ou no espaço subaracnóideo (FERRO, VERDELHO, 2000; GILGUN-SHERKI *et al.*, 2002). Os acidentes vasculares cerebrais hemorrágicos são geralmente mais graves e são associados com um risco consideravelmente maior de mortalidade, quando comparado com isquêmico (ANDERSEN *et al.*, 2009). A hemorragia subaracnóidea (HSA), em geral decorre de aneurismas saculares congênitos localizados nas artérias do polígono de Willis. A hemorragia intraparenquimatosa (HIP) decorre da degeneração hialina de artérias intraparenquimatosas cerebrais, tendo como principal doença associada a hipertensão arterial sistêmica (HAS) (RADANOVIC., 2000). Estudos epidemiológicos demonstram que 87% dos casos de AVC são isquêmicos o restante são hemorrágicos sendo 10% intracerebral e 3% do parênquima subaracnóideo. Aproximadamente 70% dos casos de AVC isquêmicos são causados pelo bloqueio da Artéria Cerebral Média (ACM) (CAI *et al.*, 2016).

Os sintomas mais comuns de um acidente vascular cerebral são súbita fraqueza ou dormência da face, braços ou pernas, mais frequentemente de um lado do corpo.

Outros sintomas incluem: confusão, dificuldade em falar ou entender a fala; dificuldade de enxergar com um ou ambos os olhos; dificuldade para caminhar, tontura, perda de equilíbrio ou coordenação; dor de cabeça intensa sem causa conhecida; desmaio ou inconsciência (OMS, 2014).

## **1.2. Epidemiologia do AVC no Brasil e no mundo**

O AVC é a segunda principal causa de morte acima da idade de 60 anos, e a quinta causa em pessoas com idade entre 15 e 59 anos de idade (OMS, 2015). Dados da *American Heart Association*, em 2011 revelaram que em média a cada 40 segundos, uma pessoa sofre AVC e a cada quatro min alguém vai a óbito em função da doença. (ROGER *et al.*, 2011).

Os acidentes vasculares cerebrais (AVC) têm pico de incidência entre a 7<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> décadas de vida quando se somam com as alterações cardiovasculares e metabólicas relacionadas à idade (ZETOLA *et al.*, 2001). A hipertensão arterial é fator de risco preditivo poderoso para o AVC. Sua ocorrência está estimada em torno de 70% de todos os quadros vasculares cerebrais (RADANOVIC, 2000). A insuficiência cardíaca, doença cardíaca coronariana, fibrilação atrial, *Diabetes Mellitus*, consumo regular de álcool também se encaixam como fatores de risco para a ocorrência do AVC (GUIRAUD *et al.*, 2010).

Estima-se que em 2050, mais de 1,5 bilhão de pessoas acima de 65 anos no mundo será acometida por AVC. Países desenvolvidos gastam de 3 a 7 % do orçamento com saúde para tratar vítimas de AVC (FEIGIN *et al.*, 2010).

Entre os países da América Latina, o Brasil é o que apresenta as maiores taxas de mortalidade por AVC (LOTUFO, 2005). Mesmo sendo referida uma redução dos índices de mortalidade nas últimas décadas, os valores continuam muito elevados (ANDRE *et al.*, 2006). No Brasil, o AVC é a principal causa de morte com taxas mais elevadas do que os outros países da América do Sul (LAVADOS *et al.*, 2007). O AVC é a principal causa de incapacidade de trabalho em adultos, informações mostram que cerca de 30 a 60% dos pacientes acometidos pelo AVC apresentam alguma incapacidade física após o evento, ocasionando efeitos negativos na saúde e na economia, por gerar elevados custos econômicos (MALLMANN *et al.*, 2012; GREENHAM *et al.*, 2016; GONZÁLEZ-GIRALDO *et al.*, 2016; KOTLEGA *et al.*, 2016).

O AVC no Brasil mostra uma maior prevalência do sexo feminino 51,8% a cada grupo de 100.000 habitantes (DE CARVALHO *et al.*, 2011). Quando nos referirmos a aspectos epidemiológicos é importante salientar que a cobertura deficiente de pesquisas de mortalidade na região amazônica e da zona rural do Nordeste, como também à proporção elevada de casos classificados nos quais os sinais e sintomas são mal definidos, concluímos que a análise das regiões metropolitanas do país (que representam um terço da população brasileira) é mais adequada que a análise do conjunto do país (LOTUFO, 2000). Em 2003, no Nordeste, a taxa de mortalidade pelo acidente vascular encefálico foi de 54,6/100 mil habitantes. No Ceará, em 2004, essa taxa foi de 44,8/100 mil habitantes. (CAVALCANTE *et al.*, 2010). O estudo epidemiológico de AVC feito na cidade de Salvador entre 1979 e 1980 demonstrou alta taxa de mortalidade por AVC, provavelmente como resultado dos baixos padrões de atendimento prestado aos pacientes com AVC na área do estudo (LESSA, 1984).

No município de Fortaleza foi realizado o maior estudo epidemiológico prospectivo de AVC já realizado no Brasil e nesse estudo demonstrou-se que o AVC isquêmico apresenta maior frequência, 72,9 %, e que a frequência de incapacidade após o AVC nos pacientes é maior que a aceitável pela OMS. Uma explicação para a situação pode ser devido a baixos padrões de atendimento aos pacientes com AVC combinado com baixas taxas de tratamento com trombólíticos e agentes anti-plaquetários (DE CARVALHO *et al.*, 2011).

Em Fortaleza, dados do ministério da saúde relatam que mais de 22% da população têm hipertensão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Segundo a pesquisa Vigitel 2013 (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico), 48,6% dos brasileiros avaliaram como médio seu nível de consumo diário de sódio. No entanto, estima-se que consumo médio seja de quase 12g por pessoa por dia, o que é mais do que o dobro do que a recomendação da OMS, de no máximo de 5 gramas ao dia. O consumo exagerado do sal está relacionado ao aumento no risco das Doenças Crônicas Não Transmissíveis, AVC e infarto, responsáveis por 63% das mortes no mundo e 72% no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Um acordo do Ministério da Saúde com a Associação das Indústrias da Alimentação (ABIA), em quatro anos de funcionamento do programa de controle de consumo de sódio, possibilitou a retirada de quase 15 mil toneladas de sódio dos produtos alimentícios. Com a redução do consumo excessivo de sal, será possível

reduzir em até 15% os óbitos por AVC e em 10% óbitos por infarto (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

### **1.3. AVC e suas consequências para o indivíduo**

O AVC pode limitar de modo significativo o desempenho funcional de um indivíduo, trazendo consequências negativas e afetando aspectos motores, relações pessoais, familiares, sociais e, sobretudo a qualidade de vida (CALIL *et al.*, 2007). Estudos relatam serem comuns sintomas de ansiedade, depressão, distúrbios do sono, alterações fisiológicas durante atividades físicas (dispnéia, angina, hipertensão) e disfunção sexual, além de distúrbios motores, sensoriais, cognitivos, de comunicação que causam limitações para o retorno ao trabalho produtivo de indivíduos após o AVC (ROCHA *et al.*, 1993; MEDINA *et al.*, 1998).

A perda sensória e motora impede os pacientes de retornar ao trabalho e quase um terço dos pacientes que sobrevivem ao AVC são posteriormente afastados do trabalho por invalidez (DOBKIN *et al.*, 2003; 2008). Embora após um AVC, possa ocorrer algum grau de retorno motor e funcional, muitos sobreviventes apresentam consequências crônicas que são, usualmente, complexas e heterogêneas, podendo resultar problemas em vários domínios da funcionalidade. Essa funcionalidade se refere à capacidade de realizar atividades do dia-a-dia, seja no aprendizado e aplicação de conhecimentos (atenção, pensamento, cálculos, resolução de problemas); na comunicação (linguagem falada, escrita); na mobilidade (manutenção da posição corporal, transferências de ambulação); no autocuidado, vida doméstica, interação interpessoal e social (SCHEPER *et al.*, 2007).

A depressão é a complicação psiquiátrica mais frequente do AVC. A depressão pós-AVC, ou seja, aquela que ocorre posteriormente ao AVC, está associada com aumento da mortalidade, maior prejuízo no funcionamento físico e da linguagem, hospitalização mais prolongada e redução da qualidade de vida (TERRONI *et al.*, 2009).

### **1.4. Isquemia cerebral**

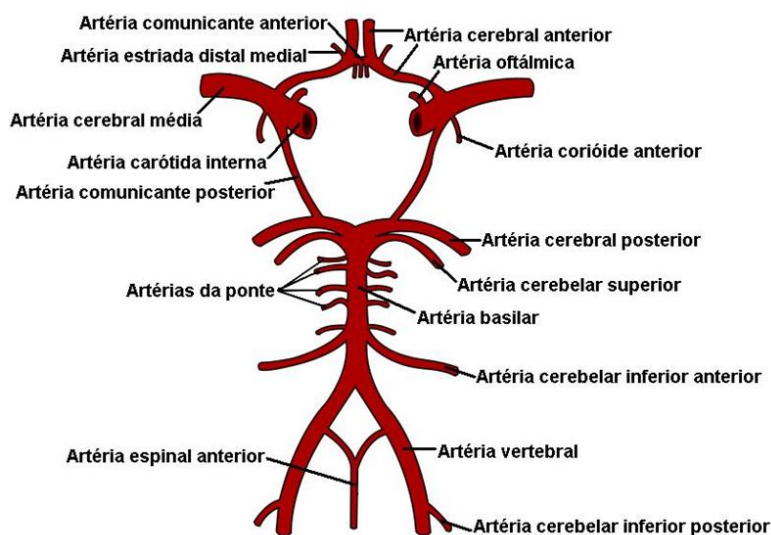
O cérebro humano apresenta alta taxa metabólica, e tem a necessidade de até um quarto do débito cardíaco para manter-se em funcionamento, qualquer interrupção nesse

fluxo sanguíneo gera uma deficiência energética e consequente interrupção das funções neurológicas. (FLYNN; MACWALTER; DONEY 2008).

O sangue chega ao cérebro através das artérias vertebrais e das artérias carótidas internas, que se comunicam através do polígono de Willis, uma anastomose arterial que fornece o suprimento sanguíneo para os hemisférios cerebrais. Este é formado pelas artérias cerebrais anteriores e posteriores, artérias comunicantes anterior e posterior e pela carótida interna (Figura 1). Estas artérias possuem paredes muito finas, o que as tornam mais vulneráveis a eventos hemorrágicos (WIKIMIDIA COMMONS, 2008).

A isquemia focal ocorre quando o fluxo sanguíneo cerebral é limitado em uma região específica, este bloqueio do suprimento sanguíneo pode ocorrer em virtude de um embolo ou um trombo (LIPTON, 1999; TAOUFIK; PROBERT, 2008). A isquemia global ocorre quando há falência circulatória generalizada e se apresenta secundária a outras causas, como parada cardíaca, cirurgias de grande porte com bloqueio da circulação sanguínea, choques hemorrágicos ocasionados por traumas (LIPTON, 1999; WITYK *et al.*, 2001; NUSMEIER *et al.*, 2002).

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



Fonte: WIKIMIDIA COMMONS, 2008.

#### 1.4.1. Lesão isquêmica cerebral

O cérebro necessita de um contínuo suporte de glicose e oxigênio para manter suas funções normais e sua viabilidade. Quando este processo é interrompido, uma série de eventos acontecem, chamada de cascata isquêmica, que é uma sequência complexa de eventos patofisiológicos espaciais e temporais, que apresentam importantes interrelações perdurando por h ou dias (DURUKAN; TATLISSUMAK, 2007; BROUNS; DEYNN, 2009). A isquemia cerebral focal provoca também acúmulo de metabólitos ácidos desencadeando uma sequência de eventos responsáveis pelo dano neuronal (SMITH, 2004).

A cascata isquêmica ocorre em duas fases distintas, a fase aguda e subaguda. Na fase aguda a diminuição do fluxo sanguíneo, diminui a oferta de oxigênio e limita a fosforilação oxidativa que é a principal via de geração de ATP na célula (MIES *et al.*, 1993). O forte declínio na concentração de ATP perturba a homeostase iônica, provocando a falência da bomba de sódio-potássio ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) ATPase (SMITH, 2004). Esse evento resulta em uma despolarização persistente o que permite a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula, que provoca a liberação de cálcio intracelular e liberação de neurotransmissores excitatórios.

Essa condição superestimula os receptores de glutamato de modo a influenciar o influxo de sódio e cálcio, produzindo, assim, uma série de eventos nucleares e citoplasmáticos, excitotoxicidade, levando à falência mitocondrial e a apoptose (LI *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2006).

O excesso de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+$  liberado também desregulam a célula pós sináptica, o que gera um edema isquêmico. O cálcio intracelular é sequestrado pela mitocôndria, o que provoca uma disfunção mitocondrial que leva a produção de ROS (Espécies reativas de oxigênio) (WU; GROTTA, 2013).

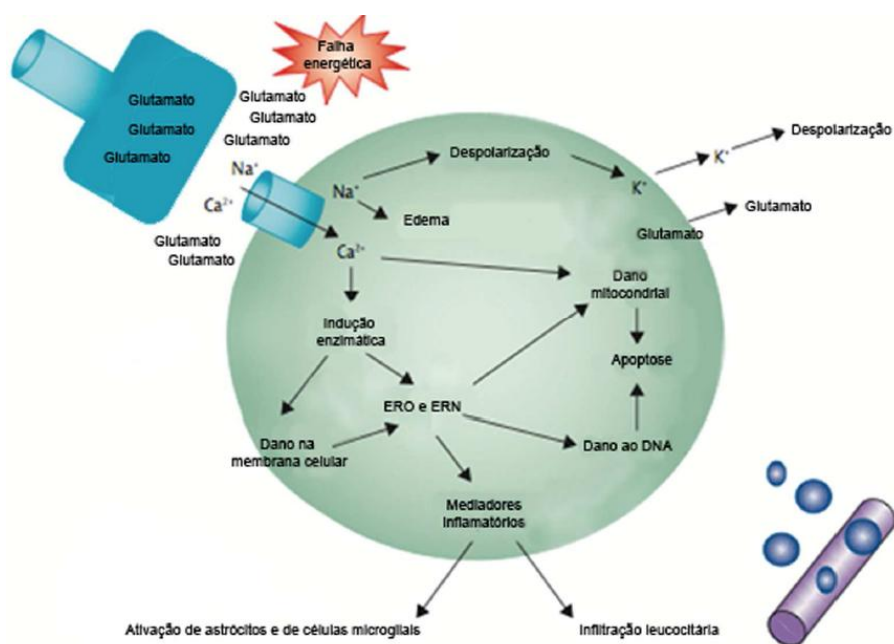
O aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  inicia uma série de eventos citoplasmáticos e nucleares, entre os quais a geração de radicais livres e ativação de enzimas dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , incluindo fosfolipase A2, endonucleases, ciclooxigenase e óxido nítrico sintetase, resultando em danos celulares (LOVE, 1999). A ativação de enzimas degradativas e a produção de radicais livres levam a morte celular imediata por necrose, entretanto os mecanismos excitatórios iniciam eventos moleculares que levam a morte por apoptose. Além dos fatos relatados, a excitotoxicidade ativa vias de sinalização intracelulares que desencadeiam processos inflamatórios (BROUNS; DEYN, 2009).

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de radicais livres supera a capacidade endógena das defesas antioxidantes celulares, ou seja, os níveis de enzimas

antioxidantes endógenas, como a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona, e as vitaminas antioxidantes, como  $\alpha$ -tocoferol e ácido ascórbico, não são suficientes para combater o excesso de radicais livres (MAKAR *et al.*, 1994).

Na fase subaguda as vias neuroinflamatórias e pró apoptóticas são iniciadas h ou dias após o início da isquemia. A inflamação tem um papel fundamental na lesão e morte neuronal causada pela a isquemia. Embora a inflamação também tem seus benefícios, o resultado final é prejudicial (WU; GROTTA, 2013) (Figura 2).

Figura 2. Fisiopatologia da isquemia.



Modificado de WU; GROTTA, 2013

#### 1.4.2. Modelo de isquemia cerebral

A resposta neuronal é muito fracamente caracterizada em pacientes com AVC, existe uma impossibilidade de recolher tecido cerebral pós morte em diferentes períodos de tempo após o acontecimento da injúria neuronal e por isso o conhecimento sobre o mecanismo do dano neuronal advém de modelos animais de isquemia, sejam eles focal, global ou hipóxia/isquemia (TAOUFIK; PROBERT, 2008).

O modelo de isquemia global pode ser induzido em ratos ou em gerbils. No modelo de oclusão dos 4 vasos (4-VO) ocorre uma oclusão permanente das artérias vertebrais e temporária através de ligadura das carótidas comuns. No modelo de oclusão



de 2 vasos (2-VO) há a ligadura temporária das duas carótidas comuns acompanhado de hipotensão. Na isquemia global existe um fluxo sanguíneo residual em torno de 1- 4%, sendo que isquemia completa só é atingida com parada cardíaca (KAWAI *et al.*, 1992).

O modelo de isquemia experimental cerebral é reproduzível, bem controlado e padronizado. Eventos fisiopatológicos que ocorrem nos primeiros min após um AVC não são detectáveis por exames de imagem, portanto somente pode ser estudado em modelos animais (LIPTON, 1999). O fato de utilizarmos, em modelo animal de isquemia, técnicas invasivas e com isso ser necessário o uso de anestésicos sabemos que podem exercer efeitos neuroprotetores leves que podem retardar a maturação do infarto, mas ainda não está claro se isso influencia ou não a recuperação a longo prazo do animal (BALKAYA *et al.*, 2017)

A isquemia cerebral focal é produzida, em todos os modelos, pela oclusão da artéria cerebral média (ACM), que pode ser ocluída de forma permanente, por ligadura ou eletrocoagulação, ou transitória, em que a reperfusão pode variar entre 1-3 h. A oclusão proximal, que é realizada próximo onde ocorre a bifurcação da carótida interna, afeta principalmente regiões como o estriado, neocórtex, córtex entorrinal e somatossensorial. A oclusão distal afeta principalmente o córtex parietal (TAMURA *et al.*, 1981; BOLANDER *et al.*, 1989; MEMEZAWA *et al.*, 1992). A característica comum aos modelos é a formação de duas regiões, o core, também chamado de centro da lesão, e a penumbra, região que circunda o centro da lesão.

O *core* é uma área de isquemia grave, em que o fluxo sanguíneo apresenta-se de 10-25% do normal, com conseqüente deficiência de oxigênio e glicose. O baixo fluxo sanguíneo resulta em comprometimento do potencial de membrana, proteínas transportadoras, síntese de ácido nucleicos (HEISS *et al.*, 2010). Se a isquemia persiste por um longo período de tempo, esta área é comprometida desencadeando morte neuronal necrótica e de células gliais. Na isquemia focal permanente, o  $Ca^{2+}$  total na região do core da lesão aumenta gradualmente em uma relação maior que na penumbra, subindo cerca de 1,0 mM / h do início do insulto até 24 h depois deste (KIM; VAUGHAN; GHOSH, 1998).

A penumbra é uma região em que o fluxo sanguíneo está a um nível o qual a função neuronal é prejudicada, embora ainda não esteja em um ponto no qual ocorre falha irreversível da membrana e danos morfológicos (HEISS *et al.*, 2010). Nesta região o fluxo sanguíneo encontra-se reduzido 40% do normal sendo baixo para manter

atividade elétrica, por isso nessa região há neurônios silenciosos, mas suficientes para preservar os canais iônicos mantendo a viabilidade celular (CASTILLO *et al.*, 2015).

Os neurônios perifocais na zona de penumbra são os de mais alto risco e, com o tempo, a zona de infarto pode crescer em tamanho, com mais células da penumbra sendo recrutadas para a zona central. O período de tempo deste processo de recrutamento constitui um período crítico, em que a onda de tecido necrótico pode ser bloqueada pela intervenção farmacológica. Esta janela terapêutica corresponde as primeiras 2 a 4 h que se segue o derrame, após as quais a eficácia da terapêutica decresce rapidamente (GILGUN-SHERKI *et al.*, 2002; WEINSTEIN; HONG; SHARP, 2004). A região da penumbra torna-se o alvo terapêutico, afim de evitar o crescimento dessa região e tentar resgatar a funcionalidade destes neurônios.

#### 1.4.3 Excitotoxicidade e isquemia

A interrupção do fluxo sanguíneo cerebral durante a isquemia resulta na privação de oxigênio e glicose, interferindo na homeostasia e função neuronal (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999).

A excitotoxicidade é o processo no qual acontece um aumento da liberação de glutamato com conseqüente super-estimulação dos receptores glutamatérgicos. (SATTLER; TYMIANSKI, 2001). O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso de mamíferos e suas potenciais ações neurotóxicas são relatadas desde 1950. Como principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC), o glutamato desempenha um papel fisiológico (por exemplo, memória, aprendizagem) e fisiopatológico (acidente vascular cerebral, epilepsia, doenças neurodegenerativas tais como Doença de Alzheimer e de Parkinson, etc.) (MELDRUM, 2000; GENOUX; MONTGOMERY, 2007).

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

Está bem demonstrado que os receptores glutamatérgicos podem mediar a excitotoxicidade, mas a chave dela está nos receptores ionotrópicos, estes por sua vez são ligados a canais iônicos, sendo a ativação desses receptores responsável pelo aumento da permeabilidade ao  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  que contribui para a despolarização da membrana. O aumento do  $\text{Na}^+$  intracelular provoca uma reversão dos transportadores glutamatérgicos permitindo a saída do glutamato através do gradiente de concentração.

A concentração de cálcio extracelular é 1,2 mM o suficiente para regular os processos celulares, mas durante a isquemia os níveis de cálcio sobem para 50-100 mM o que ativa diversas proteases dependente de cálcio, lipases e DNAses (EDVINSSON; KRAUSE, 2002). O aumento da concentração de cálcio citossólico ativa fosfolipases capazes de quebrar as membranas lipídicas. A neurotoxicidade causada pelo cálcio pode ocorrer por vários mecanismos, atualmente a teoria mais aceita é a de que algumas rotas de influxo de cálcio são mais propensas a causar neurotoxicidade do que outras. A rota em que a entrada do  $\text{Ca}^{2+}$  ocorre por canais voltagem dependente não acarreta em toxicidade, mas a entrada através dos receptores NMDA está associada a toxicidade dependente do cálcio (SZYDLOWSKA; TYMIANSKI, 2010). Em estudos pré-clínicos foi observado diminuição do edema e da degeneração neuronal posterior ao evento isquêmico com o uso de antagonistas do receptor NMDA (BRASSAI *et al.*, 2015).

#### 1.4.4 Inflamação e isquemia cerebral

A inflamação desempenha papel importante na fisiopatologia da isquemia cerebral, no entanto se a inflamação pós isquêmica é deletéria ou benéfica para a recuperação ainda é uma questão controversa (KRIZ, 2006). Portanto, o controle das respostas inflamatórias nocivas é uma promissora terapêutica para as vítimas de AVC (HE *et al.*, 2016).

O AVC, experimental ou clínico, é seguido por uma resposta inflamatória aguda e prolongada caracterizada pela produção de citocinas inflamatórias, infiltração de leucócitos e monócitos no cérebro e a ativação de células gliais residentes, esses eventos podem contribuir para a lesão cerebral isquêmica (KRIZ, 2006).

A cascata de inflamação é caracterizada por uma fase imediata, que inicia algumas h após o AVC e pode durar dias e semanas como uma reação tardia do tecido à lesão. Dentro de h após o insulto isquêmico, os níveis aumentados de citocinas e quimiocinas aumentam a expressão de moléculas de adesão tais como (ICAM-1) em

células endoteliais cerebrais, facilitando a aderência e a migração transendotelial de neutrófilos e monócitos. Estes por sua vez podem acumular-se nos vasos e prejudicar ainda mais o fluxo sanguíneo ou podem extravasar no parênquima cerebral liberando citocinas, quimiocinas e ROS (AMANTEA *et al.*, 2009).

A adesão dos leucócitos ao endotélio se dá através da expressão de moléculas de adesão, que estão distribuídas em 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 causam modificação conformacional em leucócitos facilitando a diapedese, a ICAM-1, ICAM-2 e VCAM-1 promovem interações de forte afinidade dos leucócitos com o endotélio e estimulam a diapedese (CELEUMANS *et al.*, 2010).

A micróglia desempenha um papel importante na defesa imune no sistema nervoso central. É considerada um regulador do dano neuronal, pois além, da secreção de mediadores inflamatórios, aumenta o estresse oxidativo e desencadeia diretamente mecanismos de morte (GAO *et al.*, 2011; HIRSCH *et al.*, 2005; KANEKO *et al.*, 2012; QIN *et al.*, 2007). A ativação da micróglia/macrófagos desempenha um papel crucial na resposta imune. Vinte e quatro h após a isquemia focal, ocorre uma intensa reação microglial, particularmente na penumbra e dentro de alguns dias a maioria das células microgliais tornam-se fagócitos (SCHILING *et al.*, 2005). Uma vez ativada a microglia sofre marcadas alterações morfológicas e genéticas. A microglia se polariza em duas populações antagônicas onde o fenótipo M1 clássico produz citocinas pró- inflamatórias que medeiam danos neuronais no cérebro isquêmico, e no fenótipo M2 o qual secretam citocinas antiinflamatórias que suprimem a resposta imune e contribuem para a recuperação pós - isquemia (HE *et al.*, 2016). Uma vez ativada, a micróglia desencadeia a produção de citocinas, a apresentação de antígenos e a liberação de metaloproteinases que desregulam a barreira hematoencefálica (IADECOLA *et al.*, 2011). O rompimento da barreira hematoencefálica é um evento crítico na patogênese da isquemia cerebral (GIACCOPPO *et al.*, 2015).

Em modelo de oclusão transitória da ACM 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 por meio de moléculas neurotróficas como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o fator de crescimento semelhante a insulina tipo I (IGF-1) e efeito deletério pela liberação de

citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, além de outras moléculas como NO, ROS e prostanóides (LAKHAN, KIRCHGESSNER, HOFER, 2009). A superestimulação da micróglia leva à uma “tempestade de citocinas” o que leva a neurotoxicidade. Regular a ativação microglial pode controlar a neuroinflamação.

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) tem seus efeitos mediados por duas vias, a primeira se dá por ligações específicas aos seus receptores seguida de ativação de quinases e fosfolipase A<sub>2</sub>, a segunda via é a transdução de sinal intracelular, com ativação de fatores como Fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) que induz a expressão de genes e moléculas de adesão entre outras citocinas favorecendo assim a aderência e acúmulo de leucócitos em microvasos (KOLESNICK; GOLDE, 1994).

O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição amplamente encontrado em células eucariotas, que desempenha papel fundamental na reação inflamatória participando de uma variedade de transcrições de genes relacionados a inflamação. (RIDER; SCHWANINGER., 2009). NF-  $\kappa$ B é uma proteína dimérica que permanece em estado inativo no citoplasma associado à sua unidade inibitória I- $\kappa$ B. Estímulos inflamatórios desencadeiam sua fosforilação e sua ubiquitinação, levando a sua dissociação e degradação de I-  $\kappa$ B e posterior translocação do citoplasma para o núcleo (HARARI; LIAO, 2010).

A lesão por isquemia e reperfusão também pode ativar a expressão de TNF- $\alpha$  e desencadear a fosforilação de NF-  $\kappa$ B. A fosforilação dos inibidores de NF-  $\kappa$ B levam a translocação para o núcleo onde se ligam com regiões promotoras de genes que medeiam a apoptose e a degradação do DNA (GHOLAMI *et al.*, 2016).

### **1.5. Tipos de morte celular na isquemia**

A isquemia cerebral é uma condição na qual ocorre uma redução no fluxo sanguíneo levando a uma redução no metabolismo e uma crise energética na célula. Essa falência pode induzir a morte celular por autofagia, sendo a célula autofágica passível de sobreviver ou evoluir para a apoptose (NAKASHIMA *et al.*, 1995; LINDSBERG; CASO, 2016, YEH *et al.*, 2016).

A apoptose na região da penumbra isquêmica pode ocorrer após várias h ou dias, enquanto a necrose começa nas primeiras h após o início da isquemia no núcleo isquêmico. A apoptose causa a fragmentação do DNA, degradação de proteínas citoesqueléticas e nucleares, reticulação de proteínas, formação de corpos apoptóticos,

expressão de ligantes para receptores de células fagocíticas e finalmente captação por células fagocíticas (RADAK *et al.*, 2016).

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

Em resposta a sinais apoptóticos, a proteína Bax associada a bcl-2, pode ser produzida, ativada e depois translocada para a membrana externa da mitocôndria a partir do citoplasma (SAIKUMAR *et al.*, 1998, LIN *et al.*, 2013). Neste sentido, o Bax ativado pode permeabilizar a membrana mitocondrial, levando à liberação do citocromo c e subseqüentes ativações em cascata das caspases-9, -3 e -6 (OW *et al.*, 2008).

A glicogênio sintase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) está implicado em diversos processos celulares, tais como sinalização celular e sobrevivência. Evidências indicam que o aumento da atividade de GSK-3 $\beta$  contribui para a morte neuronal e patogênese do AVC isquêmico. Considerando os papéis predominantes de GSK-3 $\beta$  na apoptose neuronal, a modulação desta proteína quinase é uma estratégia confiável para a neuroproteção isquêmica (HANUMANTHAPPA *et al.*, 2014).

A necrose é um processo passivo, em que a célula responde ao estresse externo de uma forma aleatória e descoordenada. A necrose é caracterizada pelo extravasamento do material intracelular devido a um aumento no volume da célula. Pode ser observado um intenso dano às organelas e a ruptura dos lisossomos (YAKOVLEV; FADEN, 2004). É uma resposta a estímulos muito agressivos, como, por exemplo, exposição a altas concentrações de agentes tóxicos. Nesse caso, há uma intensa resposta inflamatória no local, oriunda da liberação de citocinas. (LEIST; JÄÄTELÄ, 2001).

É evidente que os mecanismos de morte celular vão além da simples relação apoptose e necrose (DEGTEREV; YUAN, 2008). A administração do inibidor necrose/apoptose, o Nec-1 fornece proteção tecidual significativa e melhora as lesões

agudas do tecido em modelos de isquemia/reperfusão em ratos com lesão por mecanismos de inibição da apoptose (SMITH *et al.*, 2007).

## 1.6 Memória e isquemia cerebral

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).

O processo de formação de memória é complexo e altamente dinâmico, durante o aprendizado a nova informação adquirida é frágil. É através do processo de consolidação, que envolve a síntese proteica, que o traço de memória é estocado e estabilizado (SCHMIDT *et al.*, 2016).

As formas mais usuais de classificação dos tipos de memórias se referem ao tempo de duração e à sua natureza. Quanto à sua natureza a memória é dividida em declarativa ou explícita que pode ser descrita por meio de palavras; implícita, não declarativa ou de procedimento que não pode ser descrita por meio de palavras; de trabalho ou operacional onde permite o raciocínio e planejamento do comportamento (DEW; CABEZA, 2011).

A memória declarativa trata-se de uma rede de imagens e associações constituindo um registro de nossas experiências que são continuamente atualizadas em um processo de organização ativa (EICHENBAUM, 2000). A memória declarativa é composta pela nossa memória episódica, semântica e pela capacidade de lembrança consciente (SCHACTER; TULVING, 1994). O hipocampo tem sido identificado como a região envolvida nesse tipo de memória, tendo papel crítico na expressão da autobiografia e da memória espacial. O sistema de memória do hipocampo é composto de regiões corticais, parahipocampais e o próprio hipocampo (BURWELL; WITTER; AMARAL, 1995). A memória implícita é a memória de capacidades, de habilidades motoras ou sensoriais (BEVILAQUA, 2000; IZQUIERDO, 2002), é inconsciente e requer mais tempo e treinamento para se formar, mas persiste por períodos maiores. Acredita-se que a memória implícita seja processada pelo núcleo estriado e/ou diencéfalo (SQUIRE; ZOLA, 1996; DEW; CABEZA, 2011). A memória recente, ou de curto prazo, está relacionada a eventos que ocorrem em um período de h ou dias e

representa o armazenamento temporário de informação que é utilizado para planejar uma ação (KANDEL; KANDEL; ABEL, 1995; SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1996; KANDEL, 2009).

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).

Após o AVC isquêmico a recuperação da função sensório-motora é observada o desempenho cognitivo e a função neuronal do hipocampo é irreversivelmente prejudicada (BAYAT *et al.*, 2015).

O hipocampo é a região mais vulnerável ao efeito isquêmico em humanos (ZOLA-MORGAN *et al.*, 1986) e em animais (PULSINELLI; BRIERLEY, 1979). As células hipocampais são extremamente sensíveis a hipóxia/isquemia (BUETERS *et al.*, 2008; MAROSI *et al.*, 2009).

Os dois tipos de plasticidade sináptica no hipocampo, plasticidade de curto prazo (STP) e a plasticidade de longo prazo (LTP) são necessárias para o armazenamento de informações. Estudos tem sugerido que o oclusão da artéria cerebral média MCAO prejudica a indução da LTP (PANG *et al.*, 2012).

Os mecanismos envolvidos nos deficits cognitivos apresentados pós- isquemia estão relacionados a diminuição das proteínas sinápticas (SINCLAIR; TAYLERT; LOVET, 2015). A redução do fluxo sanguíneo para menos de 20% conduz a perda de axônios e dendritos em min o que leva ao déficit da formação de memória (MURPHY; CORBETT, 2009; HOFMEIJER; VAN PUTTEN, 2012).

Após o AVC algumas alterações cognitivas ocorrerão com mais frequência. No caso do déficit memória pode ser observado em um tipo de memória e em outro não. Apesar de ser extremamente variável, pois depende da área afetada pelo AVC é comum em pacientes pós- AVC ter a memória de curta duração afetada, assim como problemas na atenção e a interação social, o que pode até modificar parte do comportamento do paciente (Associação sobre AVC, 2012).

## **1.7 Terapias de reparo**



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

Atualmente, o ativador de plasminogênio tecidual (tPA) é a terapia farmacológica aprovada pela FDA para o tratamento do acidente vascular cerebral isquêmico agudo. Entretanto, devido à estreita janela de tempo para a terapia pós-AVC, menos de 10% dos pacientes com AVC isquêmico agudo são aptos para administração de tPA (BOEHME *et al.*, 2014; WRITING *et al.*, 2016). O uso de agentes trombolíticos como protocolo de rotina aumenta o risco de outras complicações, em particular as hemorragias (SPYCHALA; HONARPISHEH; MCCULLOUGH, 2017).

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

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

Na maioria dos hospitais a droga de escolha é o ácido acetil-salicílico (AAS), pelo baixo custo, rápido início de ação e por ser o único antiagregante testado

cl clinicamente no tratamento da fase aguda do AVC. Existem outras opções de antiagregantes plaquetários disponíveis para serem utilizados em caso de contra-indicação ao uso do AAS, mas tais medicamentos não foram testados na fase aguda, tendo eficácia comprovada apenas para a prevenção secundária (1º Consenso de Brasileiro no tratamento de AVC agudo).

### **1.8 Plantas medicinais e neuroproteção**

Na última década, um grande progresso foi feito para identificar compostos ativos isolados de plantas com as propriedades anti-inflamatórias de modo a diminuir a inflamação pós-isquêmica. Nas últimas décadas muitos compostos químicos sintetizados foram testados como drogas promissoras para essa finalidade (GU; CHEN; SHEN, 2014).

Usando como base de dados pubmed, caracterizou-se 55 compostos que possuem atividade anti-inflamatória e tem ação neuroprotetora contra isquemia cerebral. Vários compostos foram identificados e separados conforme sua característica estrutura química (GU; CHEN; SHEN, 2014). Os compostos polifenólicos apresentam atividade antioxidante que geralmente contribuem para os efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores contra lesão de isquemia-reperfusão cerebral. O resveratrol, um composto fenólico é um componente presente em vinhos, frutas e vegetais que previne a morte neuronal e diminui os níveis de metaloproteinase (MMP-9) e NO na lesão isquêmica (LI *et al.*, 2012; GAO *et al.*, 2006; TSAI *et al.*, 2007). Os alcaloides geralmente estão presentes nas ervas medicinais sendo compostos bioativos. A Huperzina A, um alcalóide, composto da *Huperzia serrata*, foi demonstrado restabelecer o fluxo sanguíneo e reduzir a área de infarto e o déficit neurológico 24 h após 2 h de isquemia. Huperzina A inibe a translocação NF- $\kappa$ B e inibe a expressão de iNOS e COX-2 no córtex e estriado (WANG *et al.*, 2008).

As saponinas são consideradas como um dos principais compostos anti-inflamatórios compostos em muitas ervas medicinais e são usadas para múltiplas doenças infecciosas e auto-imunes. São um grupo de moléculas relativamente grande com propriedade de detergente, geralmente não atravessam a barreira hematoencefálica no seu estado normal. Entretanto no processo isquêmico ocorre uma ruptura dessa barreira e facilita a entrada dessas saponinas no parênquima (GU; CHEN; SHEN, 2014). A astraglasida IV um dos maiores compostos de *Astragalus membranaceus*, uma

saponina, reduz o volume do infarto 24 h após a isquemia, quando administrado no início da reperfusão (LI *et al.*, 2012). Os terpenóides apresentam forte ação antioxidante e anti-inflamatória com alguns exemplos neuroprotetores. O 6-shogaol suprime a ativação migroglial em modelo de isquemia transitória global (HA *et al.*, 2012). O Tetrahidroxilbeno diminui e previne a diminuição da perda neuronal em ratos que foram submetidos a 90 min de isquemia seguido de 24 h de reperfusão (WANG *et al.*, 2009).

O grupo de pesquisa em neurociências (LNC) possui nos últimos anos 7 publicações à respeito de isquemia cerebral, dentre essas, 5 envolvem produtos naturais e a proposta de diversos mecanismos de neuroproteção. Foi demonstrado pelo grupo o efeito do ácido cafeico, um composto fenólico com sabida atividade antioxidante e anti-inflamatória capaz de reduzir o dano neuronal e cognitivo, em parte pela prevenção da perda neuronal e de sinapses nos camundongos submetidos ao modelo de isquemia focal permanente em camundongos (pMCAO) (FERNANDES *et al.*, 2014). O ácido rosmarínico, também um composto polifenólico, foi demonstrado atividade neuroprotetora contra os déficits induzido por pMCAO por reduzir a resposta inflamatória e a ativação astrogliar e induzir a sinaptogênese (FONTELES *et al.*, 2015). O efeito neuroprotetor pré-clínico do eriodictiol foi demonstrado pela primeira vez pelo nosso grupo e evidenciando que seus efeitos protetores ocorrem dentro da janela terapêutica (FERREIRA *et al.*, 2016). A boldina, principal alcalóide nas folhas e casca do *Peumus boldus Molina*. No estudo de Lima e colaboradores (2016) a boldina protegeu os animais do déficit cognitivo e dano neuronal submetidos à pMCAO pela redução da ativação do GFAP, TNF -  $\alpha$  e iNOS.

## 1.9 Licopeno

Os carotenóides são corantes naturais presentes nas frutas e vegetais (cenouras, tomates, espinafre, laranjas, pêssegos, entre outros), sua estrutura química é composta por ligações duplas conjugadas, que são responsáveis por sua cor e por algumas de suas funções biológicas (STAHL e SIES, 1999; SILVA, *et al.*, 2001). Juntamente com as vitaminas, são as substâncias mais investigadas como agentes quimiopreventivos, funcionando como antioxidantes em sistemas biológicos (POOL-ZOBEL *et al.*, 1997).

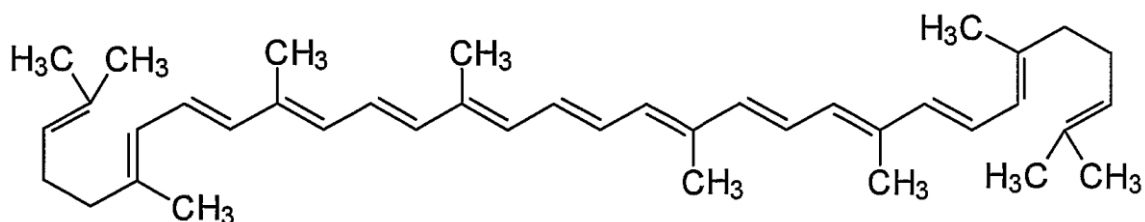
Os carotenóides reagem com os radicais livres, notadamente com os radicais peróxidos e com o oxigênio molecular, sendo a base de sua ação antioxidante.

carotenóides como o beta- caroteno, licopeno, zeaxantina e luteína, exercem funções antioxidantes em fases lipídicas, bloqueando os radicais livres que danificam as membranas lipoprotéicas (SIES; STAHL, 1995). A criptoxantina, canthaxantina, luteína, licopeno e zeaxantina são carotenoides que não são convertidos em vitamina A (TAKEDA *et al.*, 2014).

O licopeno é o carotenóide que possui a maior capacidade seqüestrante do oxigênio *singlete*, tendo forte propriedade antioxidante, possivelmente devido à presença das duas ligações duplas não conjugadas, o que lhe oferece maior reatividade para neutralizar os radicais livres de espécies reativas de oxigênio, oxigênio molecular *singlete* e radicais peroxil (DI MASCIO, *et al.*, 1989; KRINSKY, 2001; ATESSAHIN, *et al.*, 2005; RAFI *et al.*, 2007) (Figura 3).

O processamento térmico bem como a digestão intestinal de produtos de tomate cru facilita a cis-isomerização do licopeno. No homem, o licopeno é representado predominantemente por vários cis isômeros sugerindo que a transformação cis é essencial para a absorção intestinal eficiente. A isomerização cis também pode ser iniciada pela exposição do licopeno ao calor, luz e oxigênio, embora isso possa eventualmente causar degradação irreversível da molécula de licopeno a uma série de pequenos produtos finais (PETYAYEV, 2016).

**Figura 3** - Estrutura molecular do licopeno.



Foi relatado que a concentração sérica de  $\beta$ -caroteno e vitamina A encontra-se diminuída em pacientes com doença de Alzheimer (JIMÉNEZ-JIMÉNEZ *et al.*, 1999). A suplementação de carotenoides pode reduzir os marcadores de peptídeo A $\beta$  amiloide e biomarcadores de estresse oxidativo. Portanto, esses nutrientes podem provavelmente modular o desempenho cognitivo e suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias (CHANG *et al.*, 2010, KIKO *et al.*, 2012, NOLAN *et al.*, 2015)

Muitos estudos epidemiológicos mostraram que uma elevada ingestão de frutas e vegetais ricos em carotenoides ou altas concentrações séricas de carotenóides estão associadas com um risco diminuído de AVC (KARPPI *et al.*, 2012).

Acredita-se, que o licopeno devido sua capacidade de neutralizar os radicais livres protege contra câncer, aterosclerose, diabetes e algumas doenças inflamatórias (RICCIONI *et al.*, 2008). O benefício terapêutico do licopeno está bem estabelecido no carcinoma da próstata por vários ensaios clínicos (MAGBANUA *et al.*, 2011) e foi proposto no tratamento de gliomas (DE LORENZE *et al.*, 2010; PURI *et al.*, 2010). Coloca-se como um promissor a gente no tratamento de doenças neurodegenerativas por sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (KHACHIK *et al.*, 2002).

Já foi demonstrado que o licopeno protege cultura de neurônios hipocâmpais da toxicidade induzida por glutamato (MATTSON; CHAN; DUAN, *et al.*, 2002). Akbaraly e colaboradores, (2007) demonstraram que o licopeno atenua os déficits cognitivos ocasionados pelo envelhecimento. Outro trabalho mostrou que o licopeno apresenta atividade neuroprotetora em modelo de doença de Huntington induzida pelo ácido 3 - nitropropilônico (KUMAR; KALONIA; KUMAR, 2009).

## **2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA**

Nas últimas décadas, o Brasil vem mudando o seu perfil de morbimortalidade, com as doenças crônicas não transmissíveis liderando as principais causas de morte. Entre as mais importantes doenças crônicas está o AVC, que é uma das principais causas de internações e mortalidade, causando na grande maioria dos pacientes, algum tipo de deficiência, seja parcial ou completa. 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.

O estudo dos mecanismos e de estratégias terapêuticas envolvidos no AVC é importante principalmente por ser incapacitante e afetar drasticamente a qualidade de vida da população acometida. Além disso, pelo impacto socioeconômico devido ao alto custo dos tratamentos utilizados. Devido à pequena janela terapêutica do tratamento preconizado e visto que a fisiopatologia da isquemia cerebral é complexa e envolve múltiplas vias iônicas, enzimáticas e genéticas, que variam em função do tempo e extensão da isquemia, se faz necessário o desenvolvimento de novas terapias para o

tratamento do AVC, principalmente no sentido de neuroproteção. O presente estudo visa investigar uma nova substância que possa vir a ser uma estratégia terapêutica ou coadjuvante no tratamento do AVC.

Estudos demonstram a relação entre o aumento no consumo de alimentos ricos em carotenoides e a diminuição no risco de várias doenças. Ainda não foi estudado o efeito do licopeno sobre o déficit cognitivo no modelo de isquemia cerebral e a sinalização intracelular envolvida nesse efeito. O presente estudo visa avaliar um possível efeito do licopeno e a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na ação anti-inflamatórias em camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Estudar o efeito do licopeno induzido pela oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO) sobre o dano neuronal e déficit de memória e os mecanismos de proteção em camundongos.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Em animais submetidos à oclusão da artéria cerebral média (pMCAO) e tratados com licopeno, avaliar:
  - A área de infarto isquêmico e os déficits sensoriais-motores
  - Os déficits de memória trabalho, espacial, episódica e aversiva
  - A resposta inflamatória pela imunomarcagem do GFAP, Iba-1 e TNF- $\alpha$ .
  - Avaliar o efeito do licopeno sobre a expressão do NF- $\kappa$ B, GSK3- $\beta$  e do marcador sináptico, sinaptofisina por *Western Blot*

### **4 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 Animais**

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

No que se refere aos cuidados com os animais, este estudo seguiu os princípios éticos da experimentação animal estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob número 029/16.

## **4.2 Drogas**

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

## **4.3 Protocolo experimental**

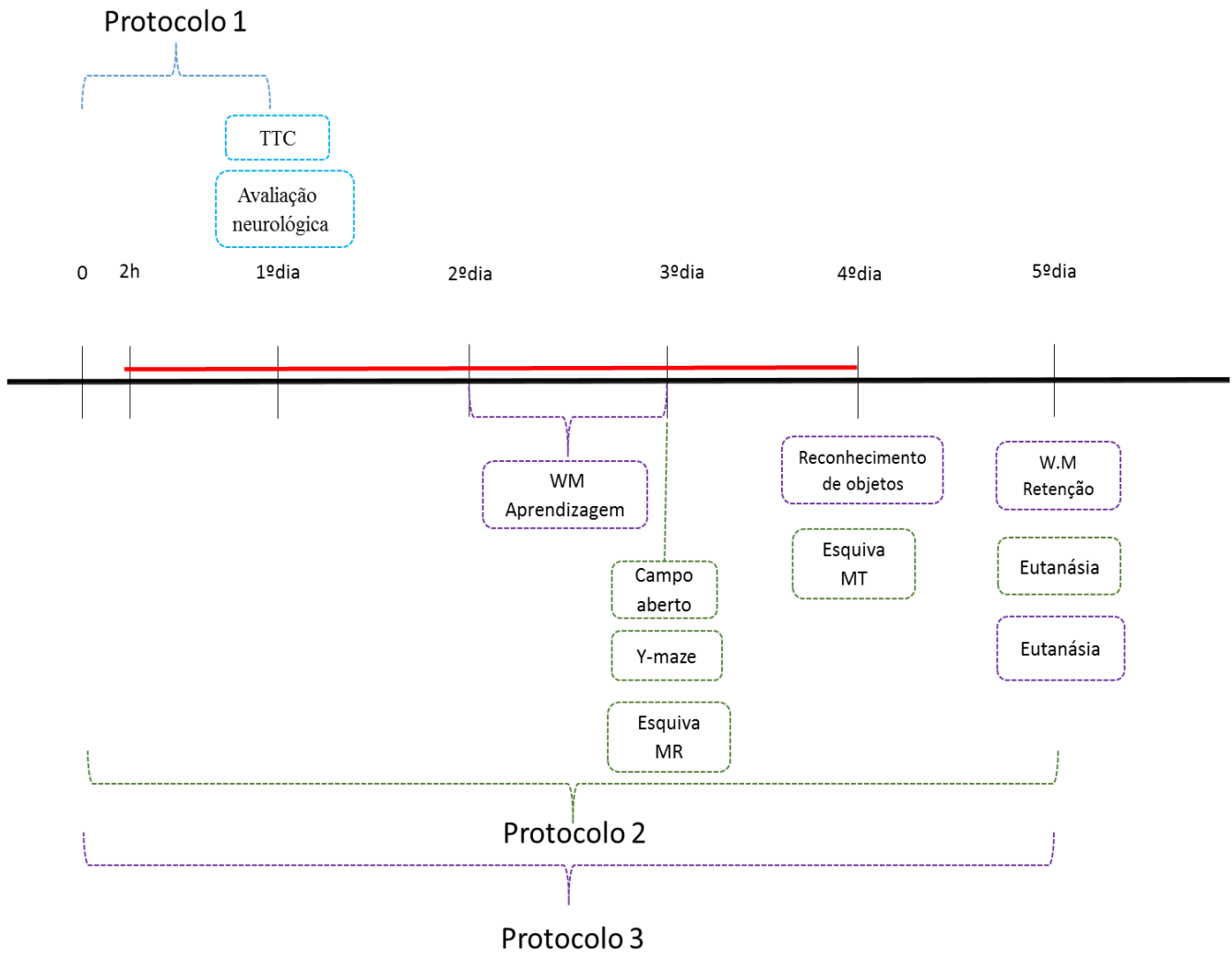
Os animais foram divididos inicialmente em 7 grupos ilustrados na (Tabela 1). O licopeno foi dissolvido em uma solução de 2% de Tween 80 em solução salina (veículo). Foram realizados 3 protocolos experimentais como descrito a seguir protocolo (1, 2 e 3). Imediatamente após os testes comportamentais os animais foram eutanasiados por decaptação para a realização do TTC ou Western Blotting (Protocolo 1 e 3) ou anestesiados com tiopental sódico (10mg/kg) e perfundidos com paraformaldeído (protocolo 2) destinados à técnica de imunohistoquímica. Os protocolos 2 e 3 foram realizados utilizando apenas os grupos de animais que receberam o licopeno nas doses com que responderam ao protocolo 1.

Tabela 1. Grupos Experimentais

<i>Grupo Experimental</i>	<i>Tratamento</i>	<i>Dose</i>	
<i>FO (Falso operado)</i>  <i>pMCAO (Oclusão permanente da artéria cerebral média)</i>	Veículo (Tween80 a 2%)	-----	
	<i>FO Lic 20</i>	Licopeno	20mg/kg v.o
	<i>pMCAO</i>	Veículo	-----
	<i>pMCAO Lic 2</i>	Licopeno	2 mg/kg v.o
	<i>pMCAO Lic 10</i>	Licopeno	10mg/kg v.o
	<i>pMCAO Lic 20</i>	Licopeno	20mg/kg v.o
	<i>pMCAO Lic 40</i>	Licopeno	40mg/kg v.o





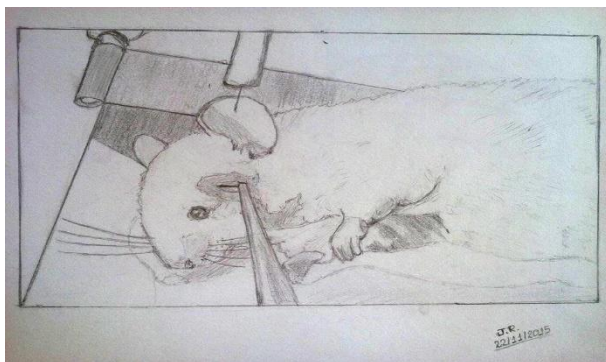


#### 4.4 Isquemia cerebral focal permanente por oclusão da artéria cerebral média (pMCAO) (TAMURA *et al.*, 1981)

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

Inicialmente foi realizada uma incisão na linha entre o olho esquerdo e a orelha, o músculo temporal foi 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 4).

Figura 4: Eletrocauterização da artéria cerebral média



Arte: Jéssica Rabelo

#### 4.5 Avaliação do infarto isquêmico - cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazol (TTC)

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 pálida.

Vinte e quatro h após a isquemia os animais foram eutanasiados por decapitação 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 min. 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. A análise foi realizada utilizando-se o software Image J.

#### **4.6 Avaliação Neurológica**

A avaliação sensório-motora foi realizada 24 h após a isquemia. Os achados neurológicos foram pontuados utilizando uma escala previamente descrita por Garcia e colaboradores (1995).

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, para a avaliação da resposta sensorial; e a resposta ao toque da vibrissa, no qual a pinça toca as vibrissas em ambos os lados do animal.

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).

**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/ Preensão	....	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.

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

O teste do campo aberto foi originalmente descrito por Hall (1934), para analisar o estado emocional em ratos. O teste utilizado nesse trabalho foi baseado no modelo de Broadhurst (1957) e foi utilizado com o intuito de aferir a capacidade locomotora dos animais. O campo aberto consiste de uma arena quadrada (30 x 30 x 15 cm) de acrílico preto com o piso dividido em nove quadrantes iguais (Figura 5). No teste o animal foi colocado na arena e deixado para explorar o ambiente por 5 min, 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 5** – Arena do Campo Aberto



**Fonte:** LNC

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

A memória operacional ou de trabalho foi avaliada através do teste do labirinto em Y. O labirinto em Y é composto por 3 braços de madeira com 16 cm de altura, 5 cm de largura e 40 cm de comprimento (Figura 6). Nesse teste, o animal é colocado no labirinto e deixado explorar por 8 min (Sarter *et al.*, 1988). Os animais apresentam forte tendência de alternar a entrada nos diferentes ambientes.

**Figura 6** - 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 min 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:

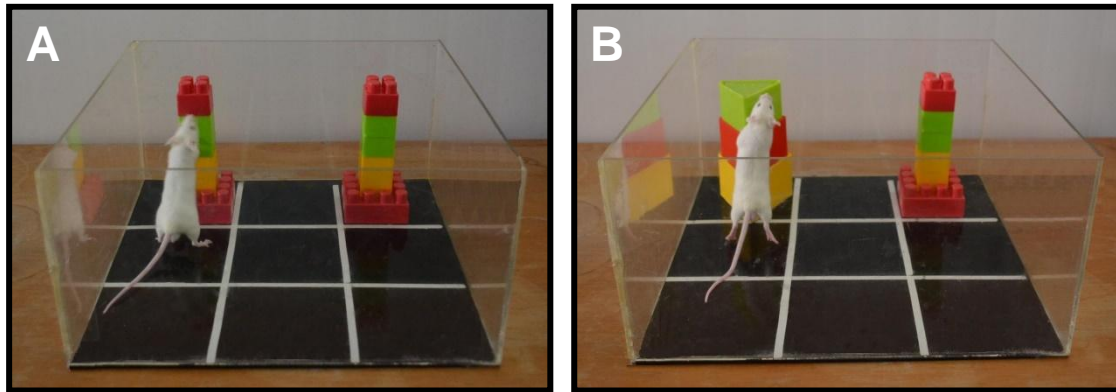
$$\text{Alternações espontâneas (\%)} = \frac{\text{Número de acertos}}{\text{Número total de entradas} - 2} \times 100$$

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.

#### **4.9 Avaliação da memória episódica – Teste do Reconhecimento de Objetos**

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 7A). Após 1 h, um dos objetos iguais foi substituído pelo objeto novo (ON) e o animal foi colocado novamente na arena (teste) (Figura 7B). 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 7: Arena com objetos



Fonte: Autoria própria

#### 4.10 Avaliação da memória espacial - Teste do Labirinto Aquático

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 8). 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 8: Arena Water Maze



Fonte: A autoria própria.

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

O teste de esquiva passiva envolve o aprendizado de evitar o choque reprimindo a tendência natural do animal de explorar o ambiente, 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 9). 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 min (treino). Retirou-se o animal e após 15 min 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 9:** Aparelho de Esquiva Passiva





Fonte: Insight LTDA.

#### **4.11.1 Preparo da amostra para 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 foi ressuscitado 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 ressuscitados em 50  $\mu$ L 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.

#### **4.11.2. Preparo da amostra para a avaliação da expressão de NF $\kappa$ B e GSK-3 $\beta$**

Na marcação de NF-  $\kappa$ B foi utilizadoo extrato total tecidual do tecido cortical e do tecido estriatal, estes foram homogeneizados em 100  $\mu$ l de tampão de lise (1ml de tampão de lise + 10  $\mu$ M de PMSF+ Inibidor de protease 0,1%) para cada 10 mg de tecido a 4°C, com o intuito de garantir a total lise foram agitados gentilmente a 4°C por

1 hora em agitador de placas, após a agitação foram centrifugados a uma velocidade de 12000 RPM por 15min (WANG *et al.*, 2015).

#### 4.11.3 Avaliação da expressão de sinaptofisina, NF- $\kappa$ B e GSK-3 $\beta$

As amostras foram desnaturadas por adição de um tampão contendo – Tris 125 mM, glicerol 20%, DTT 100 mM, SDS 4%, e de Azul de Bromofenol 0,02% - seguida de aquecimento a 90 °C durante 5 min. Quantidades iguais de proteínas totais (50 $\mu$ g para NF- $\kappa$ B e GSK-3 $\beta$  e 20 $\mu$ g para a sinaptofisina) foram aplicadas em cada poço de gel de poliacrilamida-SDS 12,5 %, utilizando-se o sistema Mini Protean®3Cell (Bio-Rad, EUA). Adicionou-se tampão de corrida (Tris 25 mM; Glicina 192 mM e SDS 0,1%) e em seguida iniciou-se a corrida em condições constantes de voltagem e variáveis de miliamperagem por 2 h. Após a separação proteica se deu o início da transferência (overnight, 100 V, 395 mA) para a membrana PVDF (BIO RAD), previamente ativada por imersão em metanol durante 5s, seguida de um a imersão de 5 min em água, e finalmente em tampão de eletrotransferência (Tris 25 mM; Glicina 192 mM e Metanol 20 %) durante 5 min.

Após a transferência as membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 5 % em TBS-T por uma hora, sob agitação, à temperatura ambiente. Em seguida as membranas foram incubadas em TBS-T overnight contendo os seguintes anticorpos primários: NF- $\kappa$ B (*rabbit* 1:1000, Santa Cruz Biotechnology,CA); GSK3- $\beta$  (*goat*,1:800, ABCAM); Sinaptofisina (*rabbit* 1:2000, SIGMA).

A seguir, as membranas foram lavadas com TBS-T (3 lavagens) e incubadas com anticorpos secundários marcados com peroxidase: anti-IgG *rabbit* (1:3000; BIO RAD) e anti-IgG *goat* (1:2000; SIGMA) por 1 hora. Após esse período as membranas foram novamente lavada com TBS-T (3 lavagens) e então incubadas com ECL (Enhanced Chemi-Luminescent substrate, BIO RAD, EUA) de acordo com especificações do fabricante. A detecção foi realizada utilizando o aparelho fotodocumentador Quemi-Doc (BIO RAD) e analisadas pelo software Image Lab (BIO RAD). Os resultados foram expressos como intensidade relativa entre as bandas das proteínas analisadas.

#### 4.12. Avaliação da astrogliose e microgliose através da imunomarcção com GFAP e Iba 1.

A avaliação da ativação de astrócitos foi feita pela imunomarcação com o anticorpo para GFAP (Glial fibrillary acidic protein) (Sigma-Aldrich) e a microgliose IBA1(Wako laboratory chemicals) esta proteína ligada ao cálcio é expressa por macrófagos /microglia e superexpressa na ativação dessas células.

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 h, após esse período foram armazenados em solução crioprotetora de sacarose a 30% em geladeira. O tecido foi cortado no criostato, as fatias de 30 µm foram armazenadas em placa de 24 poços com solução tampão PBS e 0,01% de azida sódica. Foram selecionadas três fatias de cada animal, aleatoriamente, ao longo da área da lesão

As fatias foram lavadas três vezes em PBS por 5 min e depois simultaneamente permeabilizadas e bloqueadas com TBS (0,05 M) Tampão Tris 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 os anticorpos primários preparados em solução de bloqueio (anti-GFAP, 1:500, mouse policlonal, Sigma-Aldrich,) ou anti-Iba1, 1:1000, *rabbit*, policlonal, Wako) overnight a TA e depois lavadas 3 vezes por 10 min cada em PBS. Posteriormente, foi realizada a incubação por 2 h em TA com os anticorpos secundários (*goat anti-mouse* ou *goat anti-rabbit*, conjugado com o fluorocromo Alexa Fluor 594 (Invitrogen, Portugal) e fluorocromo Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Portugal) respectivamente, diluído a 1:200 em solução de bloqueio. Após serem lavadas mais 3 vezes em PBS as fatias foram montadas em lâminas gelatinizadas usando o meio de montagem *fluoromount* (Sigma-aldrich) e deixadas secar protegidas da luz. A visualização foi realizada no microscópio de fluorescência Zeiss Axiovert 200.

#### **4.13 Avaliação da imunoreatividade para TNF- $\alpha$**

Quatro 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  $-21^{\circ}\text{C}$ , e armazenados free floating em PBS ( $4^{\circ}\text{C}$ ) 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 min 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 h à temperatura ambiente, as secções foram incubadas com os anticorpos primários (anti-TNF- $\alpha$ , 1: 250, Santa Cruz Biotechnology) diluída em solução de bloqueio a  $4^{\circ}\text{C}$  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 biotilado (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- $\alpha$  quando apresentaram uma coloração acastanhada. Os resultados foram expressos por densitometria óptica.

#### **4.14 Análise estatística**

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

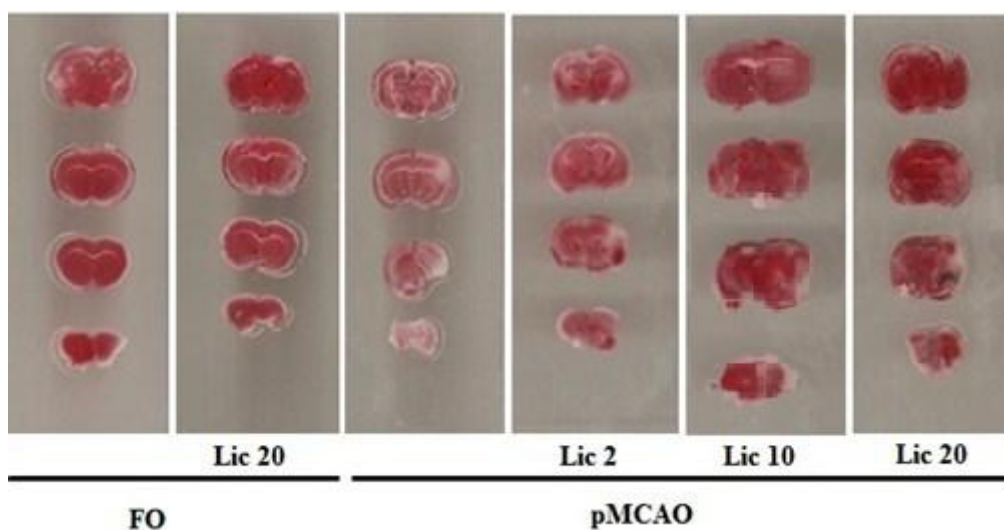
O critério de significância utilizado foi de  $p < 0,05$ . O software de análise usado foi Graph Pad Instat® 5.0.

## 5 RESULTADOS

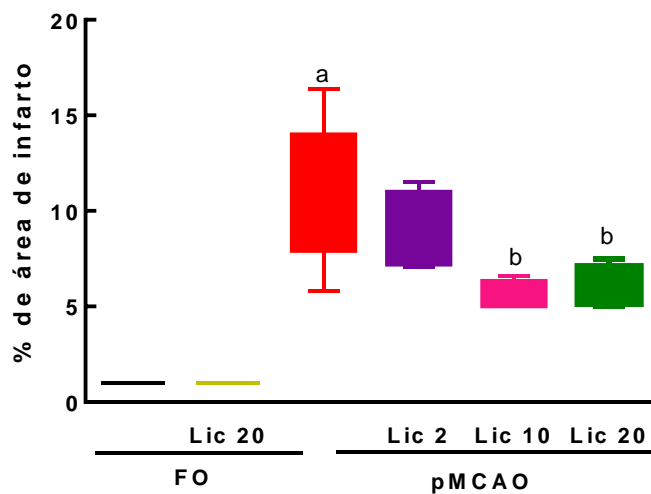
### 5.1. Efeito do licopeno sobre o dano isquêmico dos animais submetidos à pMCAO.

Os animais submetidos à pMCAO apresentaram dano isquêmico observado através medida da porcentagem de áreas sem atividade mitocondrial 24 h após a isquemia. A porcentagem de área nos animais isquemiados foi significativamente maior em relação aos animais falso-operados (FO: 1,0 (1,0-1,0) %; pMCAO: 10,7 (5,8-16,4) %). O tratamento com o licopeno na dose de 20 mg/kg foi capaz de diminuir significativamente a área isquêmica quando comparados com os animais isquemiados (pMCAO + LIC2: 8,3 (7,1-11,5) %; pMCAO+LIC20: 5,75 (5,0-7,5) %) (Figura 10 e 11).

**Figura 10.** Fotografia das fatias cerebrais submetidas à coloração com TTC 1 %. As áreas isquêmicas, nas quais as células viáveis correspondem às regiões pálidas, sem coloração.



**Figura 11.** O Licopeno protege do dano neuronal isquêmico em camundongos submetidos à pMCAO (n=6/grupo).

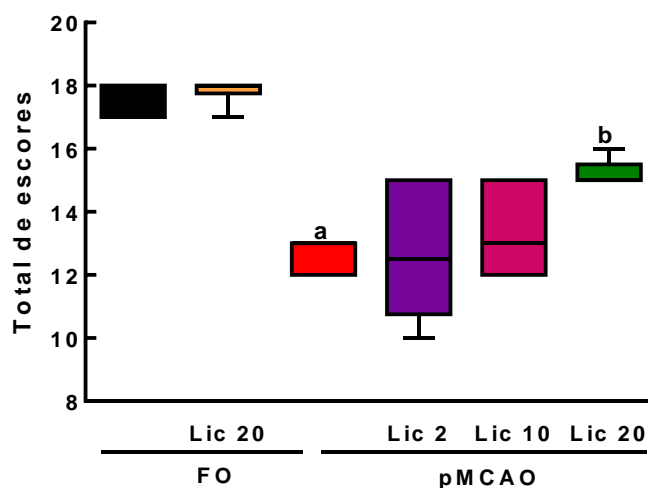


Os animais foram isquemiados por oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO), tratados 2 h após com licopeno e a área do infarto isquêmico avaliada 24 h depois. Os valores representam a mediana (MIN-MÁX). <sup>a</sup>vs FO, <sup>b</sup>vs pMCAO,  $p < 0,005$ . Teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos.

## 5.2 Avaliação neurológica dos animais submetidos à pMCAO e tratados com licopeno.

A avaliação neurológica foi realizada 24 h após a cirurgia onde os animais isquemiados apresentaram déficit sensório-motor significativo (FO: 18 (17-18) escores; pMCAO: 13 (13-15) escores. Os animais tratados com o licopeno, na dose de 20 mg/kg, obtiveram melhora no desempenho sensório-motor em relação aos animais isquemiados (escores- pMCAOLIC2: 12,5 (10-15); pMCAOLic10: 13(12-15); pMCAOLIC20: 15 (15-16) (Figura 12).

**Figura 12.** O licopeno (20 mg/kg) melhora os déficits sensório-motores em camundongos submetidos à pMCAO (n=6/grupo).

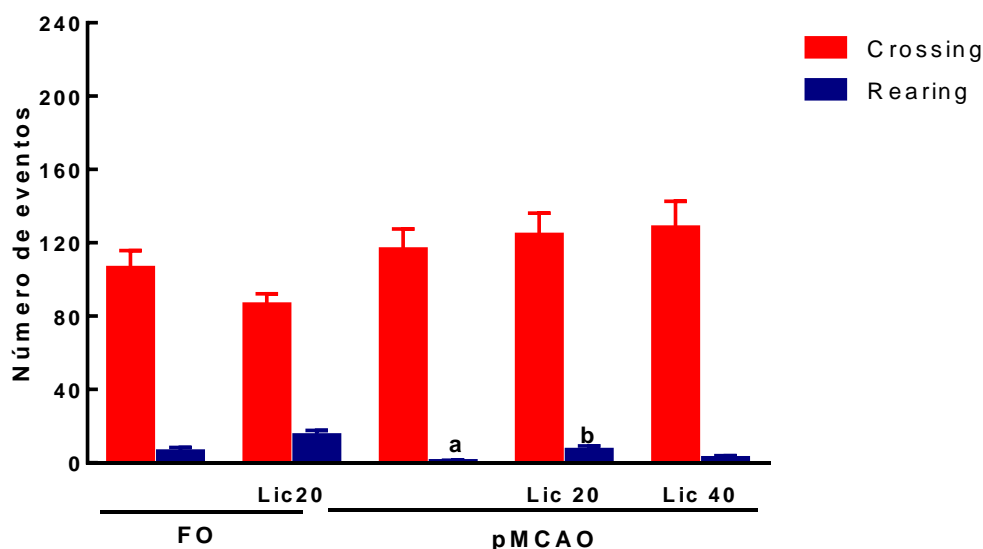


Os animais foram isquemiados por oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO), tratados 2 h após com licopeno e a avaliação neurológica 24 h depois. Os valores representam a mediana (MIN-MAX). <sup>a</sup>vs FO, <sup>b</sup>vs pMCAO,  $p < 0,005$ . ANOVA, seguido do Teste Tukey.

### 5.3 Efeito do licopeno sobre a atividade locomotora de camundongos submetidos à pMCAO.

A avaliação da atividade locomotora dos animais foi realizada através do teste de campo aberto, 72 h após a indução de pMCAO, onde se observou a exploração horizontal (número de cruzamentos) e vertical (*rearing*) dos animais. Os animais isquemiados apresentaram maior número de cruzamentos em relação aos animais falso-operados (número de cruzamentos- FO:  $104,4 \pm 9,3$ ; FO+LIC20:  $86,5 \pm 5,7$ ; pMCAO:  $116,6 \pm 10,92$ ). Não foram observadas diferença comparando aos animais isquemiados e animais tratados com licopeno (número de cruzamentos-pMCAO +LIC20:  $124,5 \pm 11,74$ ; pMCAO+LIC40:  $128,6 \pm 14,12$ ) (Figura 12). Na avaliação da exploração vertical foi observado uma diminuição significativa do número de *rearings* nos animais isquemiados em relação aos animais falso-operados (número de *rearing*- FO:  $6,4 \pm 1,9$ ; FO+LIC20:  $15,18 \pm 2,45$ ; pMCAO:  $1,13 \pm 0,29$ ) e o tratamento com o licopeno 20 mg/kg foi capaz de proteger essa alteração (número de *rearings*-LIC20:  $7,21 \pm 2,0$  número de *rearings*; LIC40:  $2,78 \pm 1,12$  número de *rearings*) (Figura 13).

**Figura 13.** Efeito do licopeno (20 e 40 mg/kg) sobre o número de cruzamentos e explorações verticais no teste do campo aberto de camundongos submetidos à pMCAO (n=8/grupo)



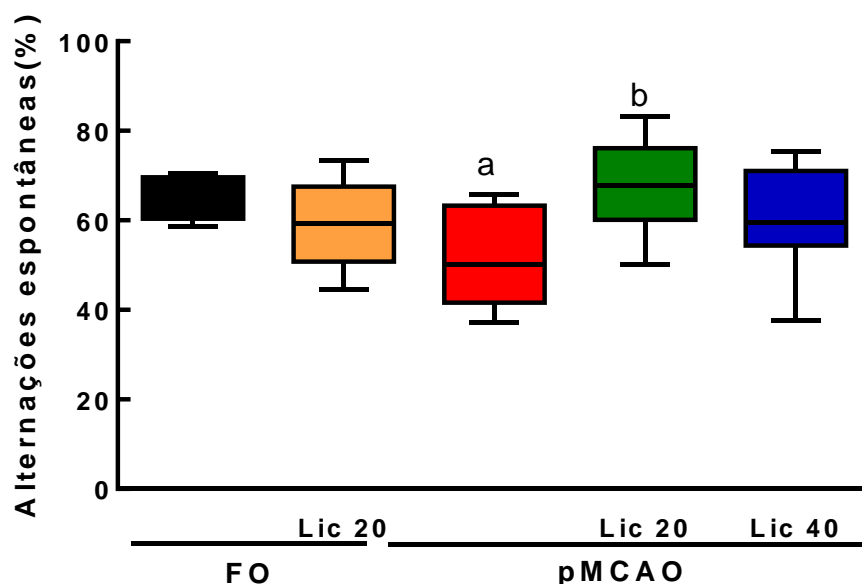
Os animais foram isquemiados por oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO), tratados 2 h após com licopeno e nos 3 dias seguintes, sendo a atividade locomotora avaliada 3 dias após pMCAO. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.<sup>a</sup>vs FO, <sup>b</sup>vs pMCAO.  $p < 0,005$ , ANOVA, seguido do teste de Tukey.



#### 5.4 Efeito do licopeno 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 isquemiados apresentaram um déficit de memória em relação aos animais falso-operados (FO: 65,7 (58,6-70,6) %; FO+LIC20: 59,2 (44,4-73,5) %; pMCAO: 50,4 (37,1-65,7) %). Esse déficit foi prevenido significativamente pelo tratamento com o licopeno na dose de 20 mg/kg (pMCAO+LIC20: 67,8 (50,0-83,3) %; pMCAO+LIC40: 59,6 (37,5-75,5) %) (Figura 14).

**Figura 14.** Efeito do licopeno (20 e 40 mg/kg) sobre a memória de trabalho de camundongos submetidos à pMCAO (n=8/grupo).

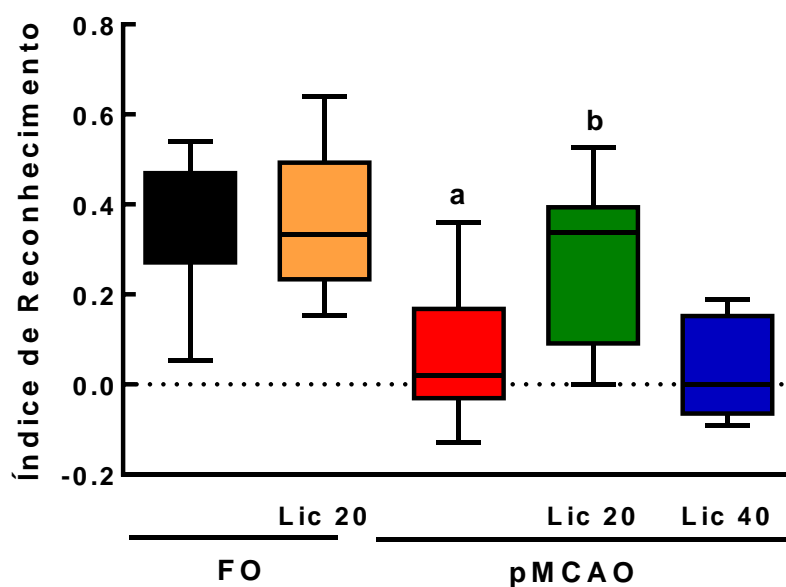


Os animais foram isquemiados por oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO) e tratados 2 h após com licopeno e nos 3 dias seguintes, sendo a memória de trabalho avaliada após 3 dias após pMCAO. Os valores representam a mediana (MIN-MAX). <sup>a</sup>vs FO, <sup>b</sup>vs pMCAO,  $p < 0,005$ . ANOVA, seguido do teste de Tukey.

### 5.5 Efeito do licopeno 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 (IR- FO: 0,35 (0,05-0,54); FO+LIC20: 0,33 (0,15-0,64); pMCAO: 0,02 (-0,13-0,36) apresentando menor índice de reconhecimento. O tratamento com o licopeno na dose de 20 mg/kg diminuiu significativamente este déficit (IR-pMCAO+LIC20: 0,34(0,0-0,53); pMCAO+LIC40: 0,0 (-0,09-0,19)) (Figura 15).

**Figura 15.** Efeito do licopeno (20 e 40 mg/kg) sobre a memória episódica avaliada através do teste de reconhecimento de objetos de camundongos submetidos à pMCAO (n = 8/grupo).

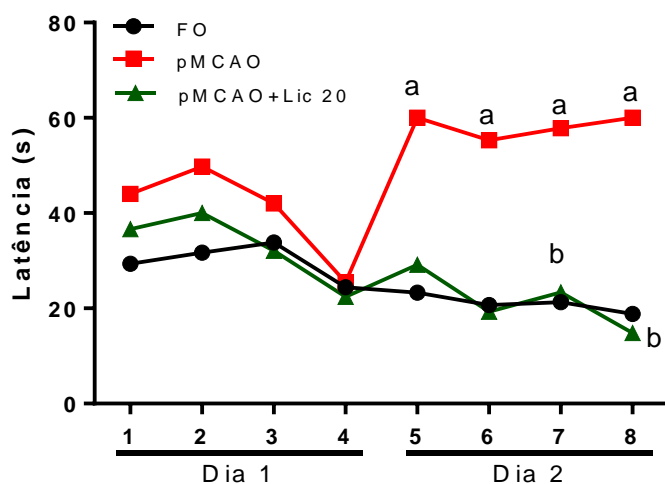


Os animais foram isquemiados por oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO) e tratados 2 h após com licopeno e 4 dias seguintes sendo a memória episódica avaliada após 4 dias de pMCAO. Os valores representam a mediana (MIN-MAX). <sup>a</sup>vs FO, <sup>b</sup>vs pMCAO, p<0,005. Teste de Kruskal-Wallis.

## 5.6 Efeito do licopeno 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 para alcançar a plataforma nos dias de treino. Nossos resultados mostraram que os animais isquemiados tiveram maior dificuldade de aprendizado em relação aos animais falso-operados, diferindo estatisticamente no segundo dia treinos quando comparamos os grupos, como podemos observar na figura 16 (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 licopeno foi capaz de prevenir a deficiência de aprendizado induzida pela pMCAO nos treinos 7 e 8 em relação ao pMCAO (treino 7: LIC20:  $19,55 \pm 4,98$  s; treino 8: LIC20:  $14,82 \pm 2,88$ s). (Figura 16).

**Figura 16.** Efeito do licopeno (20mg/kg) sobre o aprendizado avaliada através do tempo de latência nos treinos para alcançar a plataforma de camundongos submetidos à pMCAO (n= 8/grupo).

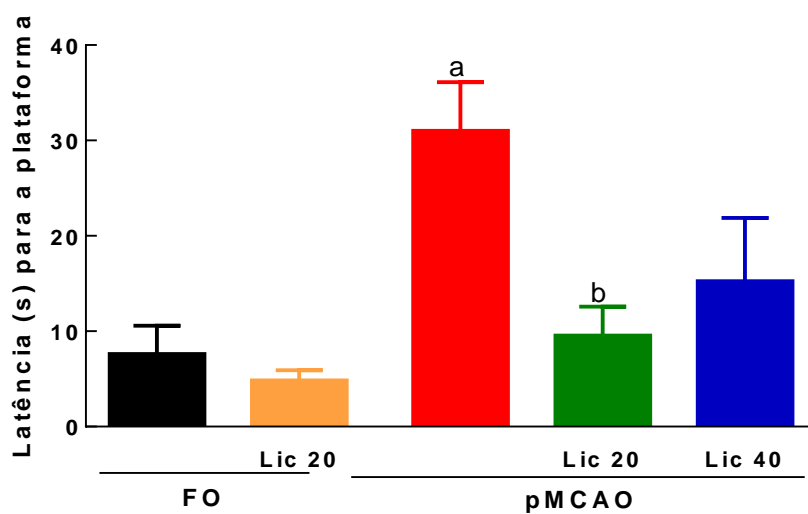


Os animais foram isquemiados por oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO) e tratados 2 h e 4 nos 4 dias seguintes com licopeno sendo o aprendizado na memória espacial 2 e 3 dias após pMCAO.. Os valores representam a média±EPM. <sup>a</sup>vs FO, <sup>b</sup>vs pMCAO,  $p < 0,005$ . ANOVA, seguido do teste de Tukey.

Na retenção da memória espacial, avaliada 120 h depois da cirurgia foram avaliados os parâmetros de latência para atingir a plataforma, número de cruzamentos e

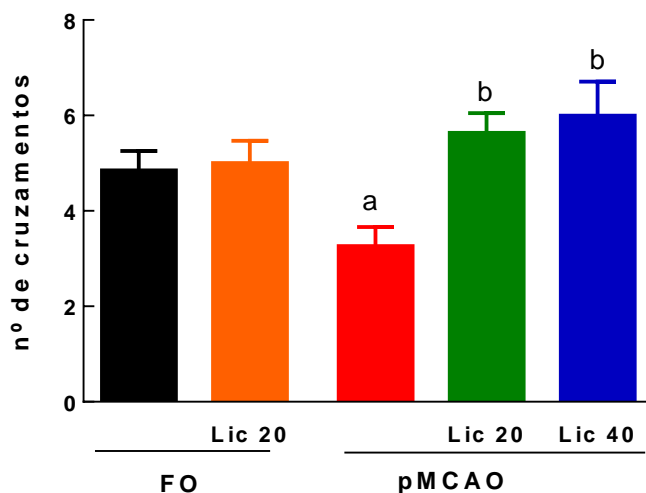
tempo de permanência no quadrante. Podemos observar que os animais isquemiados tiveram um déficit de memória espacial em relação aos animais falso-operados nos parâmetros de latência (FO:  $7,63 \pm 2,95$ s; FO+LIC20:  $4,86 \pm 1,05$  s; pMCAO:  $21,6 \pm 3,83$  s), número de cruzamentos (FO:  $4,85 \pm 0,41$ ; FO+LIC20:  $5,0 \pm 0,47$ ; pMCAO:  $3,27 \pm 0,39$ ) e tempo de permanência no quadrante (FO:  $18,11 \pm 1,8$  s; FO+LIC20:  $13,7 \pm 2,5$ ; pMCAO:  $8,4 \pm 1,4$ s). O tratamento com o licopeno na dose de 20 mg/kg conseguiu diminuir significativamente o déficit de memória espacial nos três parâmetros, a dose de 40 mg/kg diminui o parâmetro de número de cruzamentos (Latência: pMCAO+LIC20:  $9,55 \pm 3,03$ s; pMCAO+LIC40:  $15,3 \pm 6,6$ s/Número de cruzamentos; pMCAO+LIC20:  $5,64 \pm 0,41$ ; pMCAO+LIC40:  $6,0 \pm 0,71$ /Tempo de permanência no quadrante; pMCAO+LIC20:  $16,18 \pm 2,02$ s; pMCAO+LIC40:  $14,5 \pm 2,63$ s) (Figuras 17, 18 e 19, respectivamente).

**Figura 17.** Efeito do licopeno (20 e 40 mg/kg) sobre a memória espacial, avaliada através do parâmetro latência para alcançar a plataforma, de camundongos submetidos à pMCAO.



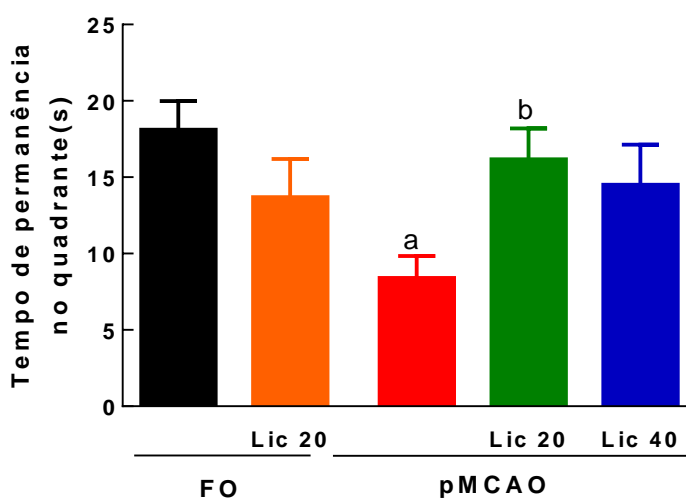
Os animais foram isquemiados por oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO) e tratados 2 h e 4 dias seguintes com licopeno sendo a latência da memória espacial avaliada após 5 dias de pMCAO. Os valores representam a média  $\pm$  EPM. <sup>a</sup>vs FO, <sup>b</sup>vs pMCAO,  $p < 0,005$ . ANOVA, seguido do teste de Tukey.

**Figura 18.** Efeito do licopeno (20 e 40 mg/kg) sobre a memória espacial, avaliada através do parâmetro número de cruzamentos, de camundongos submetidos à pMCAO.



Os animais foram isquemiados por oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO) e tratados 2 h e 4 dias com seguites com licopeno sendo avaliados o nº de cruzamentos após 5 dias de pMCAO. Os valores representam a média ± EPM. <sup>a</sup>vs FO, <sup>b</sup>vs pMCAO.  $p < 0,005$ . ANOVA seguido do teste de Tukey.

**Figura 19.** Efeito do licopeno (20 e 40 mg/kg) sobre a memória espacial, avaliada através do parâmetro tempo de permanência no quadrante, de camundongos submetidos à pMCAO.



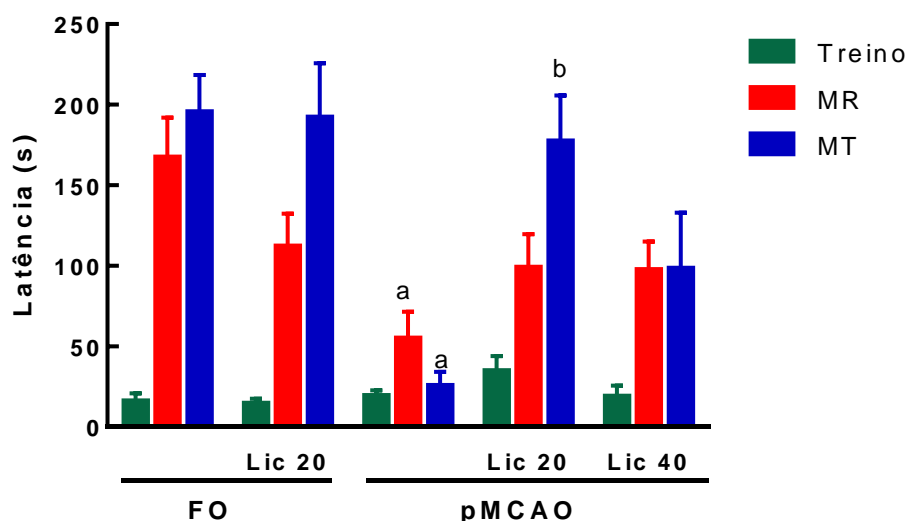
Os animais foram isquemiados por oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO) e tratados 2 h e nos 4 dias seguintes com licopeno sendo avaliados pelo tempo de permanência no quadrante após 5 dias

de pMCAO. Os valores representam a média  $\pm$  EPM. <sup>a</sup>vs FO, <sup>b</sup>vs pMCAO,  $p < 0,005$ . ANOVA, seguido do teste de Tukey.

### 5.7 Efeito do licopeno sobre a memória aversiva de camundongos submetidos à pMCAO.

As memórias aversivas recente e tardia foram avaliadas através do teste da esQUIVA passiva, 72 e 96 h após a cirurgia, respectivamente. Os animais submetidos à pMCAO apresentaram um déficit da memória aversiva recente (FO:  $167,9 \pm 23,99$  s; FO+LIC20:  $112,7 \pm 19,64$  s; pMCAO:  $55,63 \pm 15,98$  s) e tardia (FO:  $196,0 \pm 22,5$  s; FO+LIC20:  $192,6 \pm 33,05$  s; pMCAO:  $26,11 \pm 8,12$  s) em comparação aos animais falso-operados. O licopeno preveniu o déficit de memória tardia na dose de 20mg/kg, apesar de não ter protegido contra os déficits de memória aversiva recente em nenhuma das doses (MR; pMCAO+LIC20:  $99,47 \pm 20,23$  s; pMCAO+LIC40:  $97,88 \pm 17,07$  s/ MT pMCAO+LIC20:  $177,8 \pm 27,86$  s; pMCAO+LIC40:  $98,75 \pm 34,35$  s) (Figura 20).

**Figura 20.** Efeito do licopeno (20 e 40 mg/kg) sobre a memória aversiva de camundongos submetidos à pMCAO.

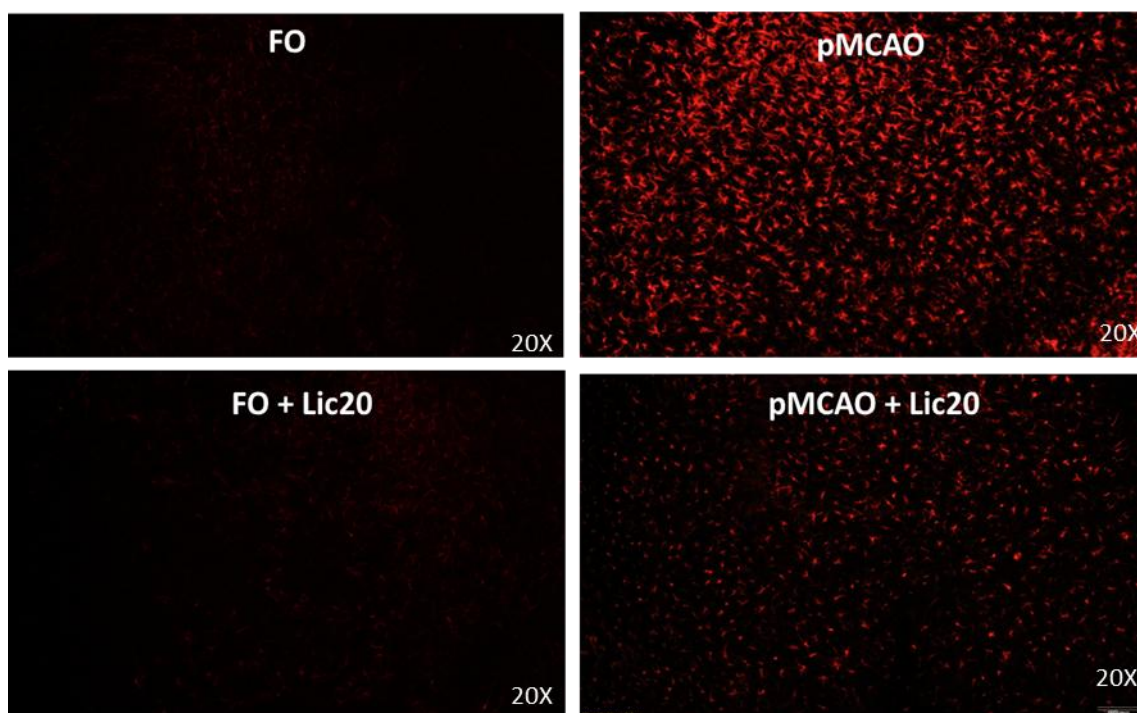


Os animais foram isquemiados por oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO) e tratados 2 h após e 4 dias seguintes com licopeno sendo a latência avaliada 5 dias após pMCAO. Os valores representam a média  $\pm$  EPM. <sup>a</sup>vs FO. MR  $p < 0,005$ , MT  $p < 0,005$ . ANOVA, seguido do teste de Tukey.

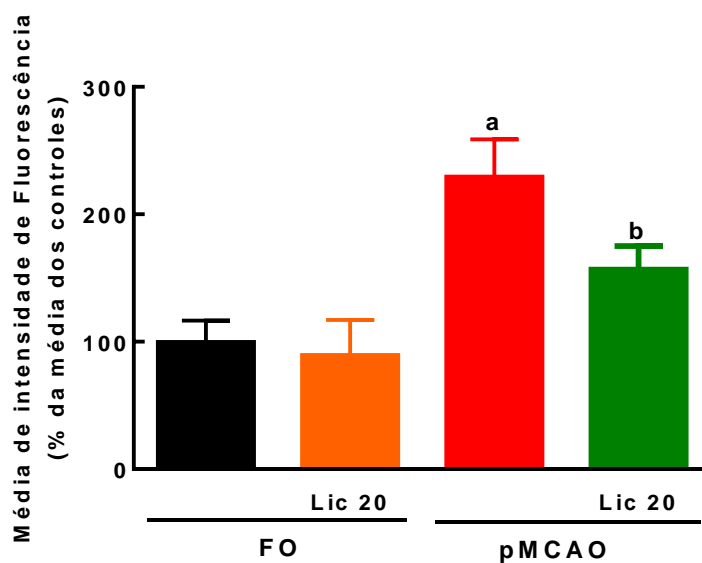
### 5.8 Efeito do licopeno sobre a ativação de astrócitos evidenciada através da imunomarcação com GFAP no córtex temporal de camundongos submetidos à pMCAO.

Os animais isquemiados apresentaram aumento na ativação astrocitária (GFAP) evidenciada pelo aumento da média de intensidade de fluorescência no córtex temporal 5 dias após a isquemia e o tratamento com o licopeno na dose de 20 mg/kg diminui essa ativação (FO:  $100,0 \pm 16,65\%$ ; FO+LIC20:  $89,65 \pm 27,59\%$ ; pMCAO:  $229,7 \pm 29,33\%$ ; pMCAO+LIC20:  $157,4 \pm 17,79\%$ ) (Figura 21 e 22).

**Figura 21.** Imagens representativas do efeito do licopeno (20 mg/kg) sobre a ativação de astrócitos (GFAP) no córtex temporal de camundongos submetidos à pMCAO.



**Figura 22.** Efeito do licopeno sobre a ativação de astrócitos (GFAP) no córtex temporal de camundongos submetidos à pMCAO.



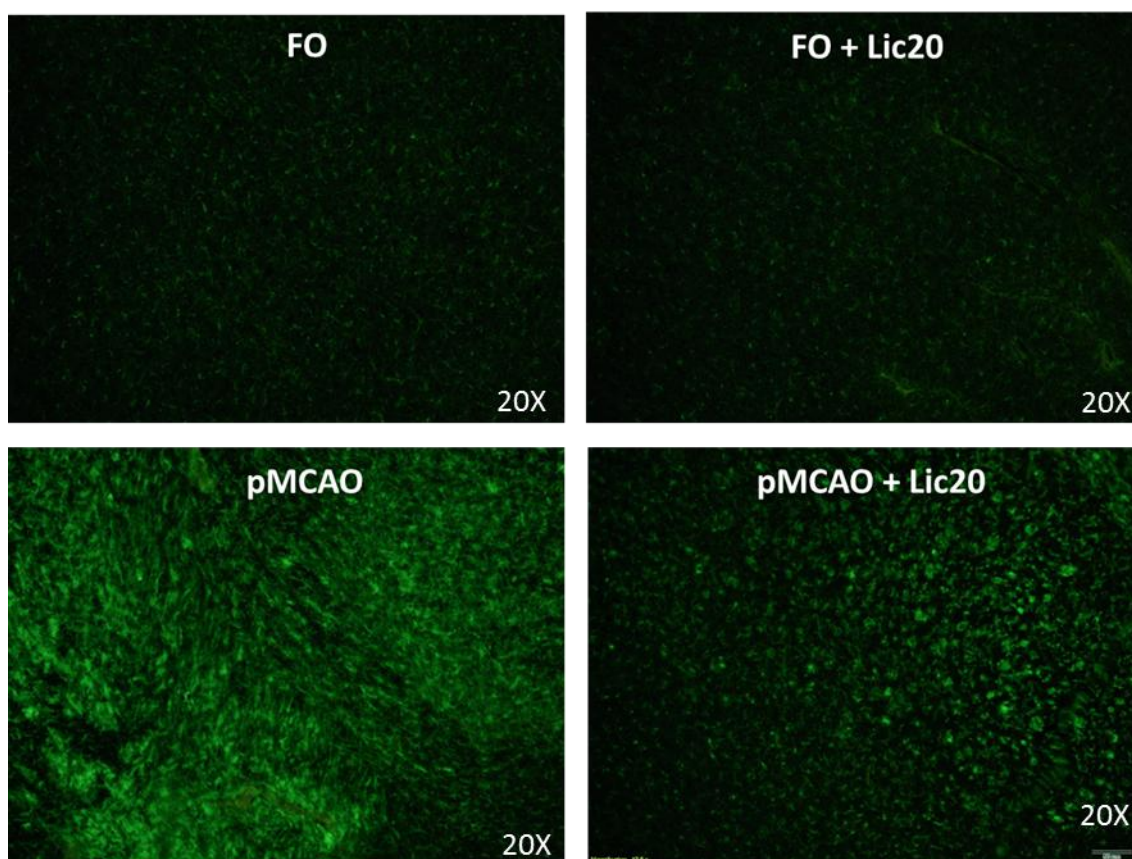
Os animais foram isquemiados por oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO) e tratados 2 h após. Os valores representam a média  $\pm$  EPM. <sup>a</sup>vs FO, <sup>b</sup>vs pMCAO,  $p=0,0118$ . ANOVA, seguida do teste de Tukey.



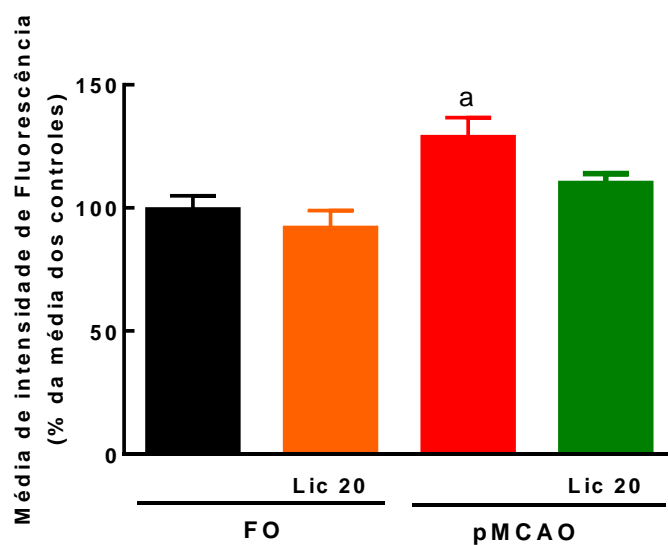
### 5.9 Efeito do licopeno sobre a ativação de microglial evidenciada através da imunomarcação com Iba-1 no córtex temporal de camundongos submetidos à pMCAO.

Os animais isquemiados apresentaram aumento na ativação microglial evidenciada pelo aumento da média de intensidade de fluorescência correspondente ao Iba-1 (figura 23) no córtex temporal 5 dias após a isquemia e o tratamento com o licopeno na dose de 20 mg/kg não reduziu essa ativação (FO:  $99,62 \pm 5,32\%$ ; FO+LIC20:  $99,11 \pm 6,870\%$ ; pMCAO:  $128,9 \pm 7,696\%$ ; LIC20:  $110,3 \pm 3,612\%$ ) (Figura 24).

**Figura 23.** Imagens representativas do efeito do licopeno (20 mg/kg) sobre a ativação de astrócitos (GFAP) no córtex temporal de camundongos submetidos à pMCAO.



**Figura 24.** Efeito do licopeno (20 mg/kg) sobre a ativação de micróglia (Iba-1) no córtex temporal de camundongos submetidos à pMCAO.

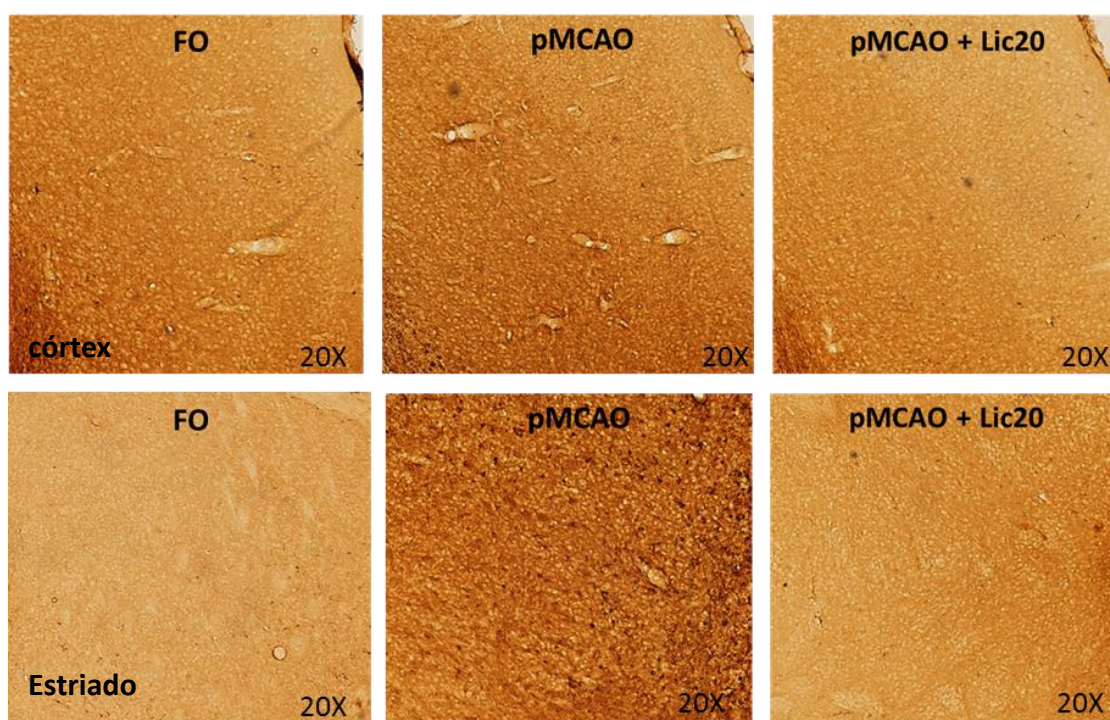


Os animais foram isquemiados por oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO) e tratados 2 h e nos 4 dias seguintes. Os valores representam a média  $\pm$  EPM. <sup>a</sup>vs FO,  $p=0,0195$ . ANOVA, seguida do teste de Tukey.

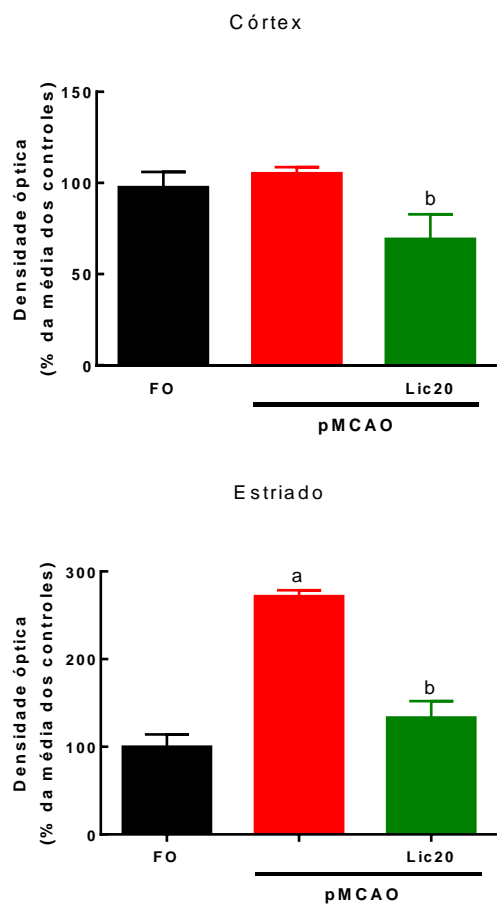
### 5.10 Efeito do licopeno sobre a imunoreatividade de TNF- $\alpha$ no corpo estriado e córtex de camundongos submetidos à pMCAO.

Os animais submetidos à pMCAO apresentaram um aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  no corpo estriado (FO:  $100 \pm 14$  %; pMCAO:  $271 \pm 6,9$ %) o mesmo não ocorreu no córtex (FO:  $97,67 \pm 8,3$ %; pMCAO:  $105,3 \pm 3,45$ %). O tratamento com o licopeno foi capaz de diminuir o aumento de TNF- $\alpha$  induzido pela pMCAO (Corpo estriado: pMCAO+LIC20:  $133,3 \pm 9,4$ %/Córtex: pMCAO+LIC20:  $69,25 \pm 6,76$ %) (Figuras 25 e 26).

**Figura 25.** Imagens representativas do efeito do licopeno (20 mg/kg) sobre a imunoreatividade para TNF- $\alpha$  no córtex temporal e no estriado de camundongos submetidos à pMCAO.



**Figura 26.** Quantificação por densitometria ótica dos níveis do TNF- $\alpha$  no corpo estriado e córtex de camundongos submetidos à pMCAO.

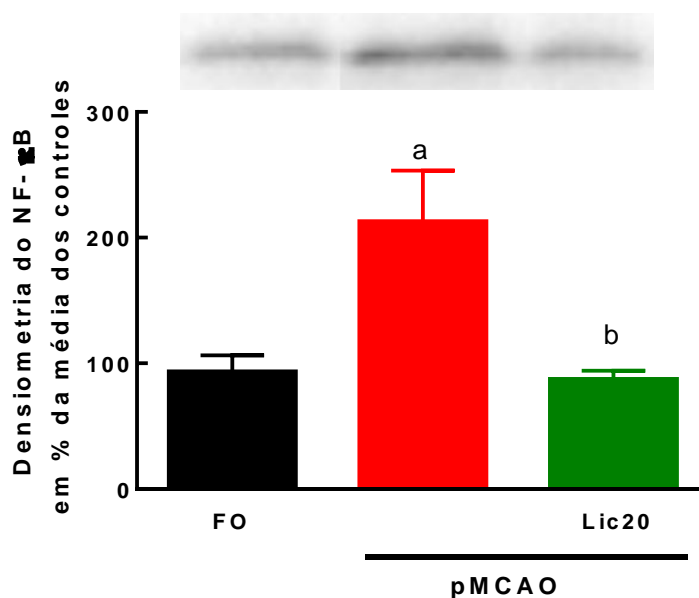


Os animais foram isquemiados por oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO) e tratados 2 h e nos 4 dias seguintes com licopeno. Os valores representam a média $\pm$ EPM. <sup>a</sup>vs FO, <sup>b</sup>vs pMCAO,  $p < 0,005$ . ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

### 5.11 Efeito do licopeno sobre a expressão de NFκB no corpo estriado e córtex de camundongos submetidos à pMCAO.

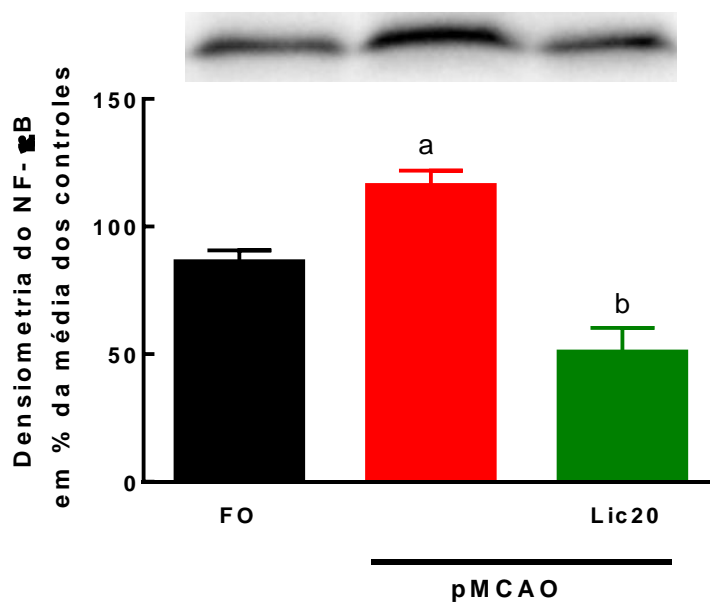
Os animais submetidos à pMCAO apresentaram um aumento significativo da expressão de NFκB no corpo estriado e no córtex comparados aos animais falso-operados (Corpo estriado: FO:  $93,67 \pm 12,67$  %; pMCAO:  $213,0 \pm 40,43$  %; Córtex: FO:  $84,5 \pm 4,87$  %; pMCAO:  $116,3 \pm 5,55$  %). O tratamento com o licopeno inibiu esse aumento (Corpo estriado: pMCAO + LIC20:  $87,5 \pm 11,5$ ; Córtex: pMCAO+LIC20:  $51,0 \pm 9,3$  %) (Figuras 27 e 28).

**Figura 27.** Efeito do licopeno sobre a expressão de NFκB no corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO.



Os animais foram isquemiados por oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO) e tratados 2 h e 4 dias seguintes com licopeno. Representação do imunoblot e análise densiométrica das bandas representadas. Os valores representam a média±EPM.  $P < 0,005$ , <sup>a</sup>vs FO, <sup>b</sup>vs pMCAO, ANOVA, seguida pelo teste de Tukey.

**Figura 28.** Efeito do licopeno sobre a expressão de NFκB no córtex de camundongos submetidos à pMCAO.

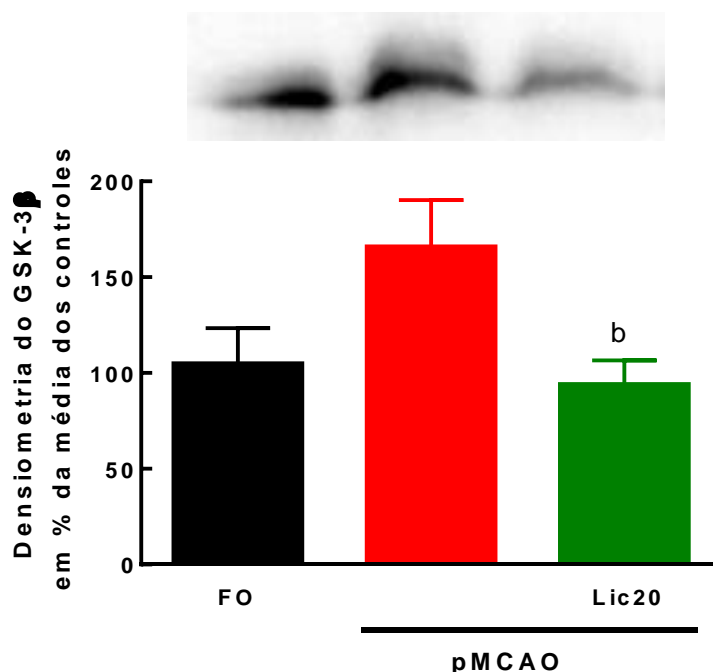


Os animais foram isquemiados por oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO) e tratados 2 h e 4 dias seguintes com licopeno. Representação do imunoblot e análise densitométrica das bandas representadas. Os valores representam a média±EPM,  $p < 0,005$ , <sup>a</sup>vs FO, <sup>b</sup>vs pMCAO. ANOVA, seguida pelo teste de Tukey.

### 5.12 Efeito do licopeno sobre a expressão de GSK-3 $\beta$ no córtex de camundongos submetidos à pMCAO.

Os animais submetidos à pMCAO apresentaram uma tendência ao aumento da expressão de GSK-3 $\beta$  no córtex comparados aos animais falso-operados (FO: 105,0 $\pm$ 18,48%; pMCAO: 166,0 $\pm$ 24,25 %) e tratamento com o licopeno diminuiu significativamente esse aumento (pMCAO +LIC20: 94,25 $\pm$ 12,37 %) (Figura 29).

**Figura 29.** Efeito do licopeno sobre a expressão de GSK-3 $\beta$  no córtex de camundongos submetidos à pMCAO.

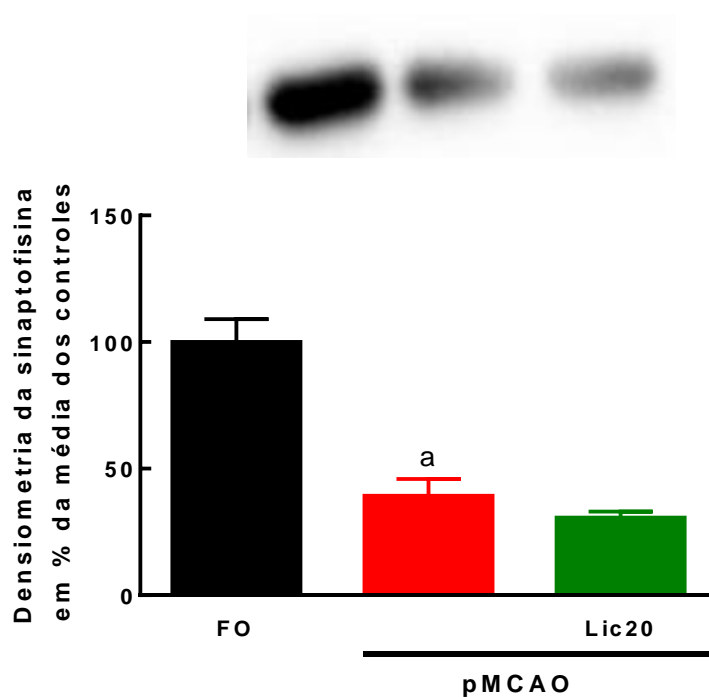


Os animais foram isquemiados por oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO) e tratados 2 h e 4 dias seguintes com licopeno. Representação do imunoblot e análise densitométrica das bandas representadas. Os valores representam a média $\pm$ EPM,  $p < 0,005$ , <sup>b</sup>vs pMCAO. ANOVA, seguida pelo teste de Tukey.

### 5.13 Efeito do licopeno 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 corpo estriado comparados aos animais falso-operados, o tratamento com o licopeno não alterou a diminuição (FO:100,0±9,0 %; pMCAO: 39,33±6,64 %; pMCAO+LIC20: 30,67±2,40). Não foram observadas diferenças entre os grupos na quantificação de sinaptofisina no córtex (FO: 100,0±21,01 %; pMCAO: 119,0±11,42 %; pMCAO+LIC20: 110,0±13,39 %) (Figuras 30 e 31).

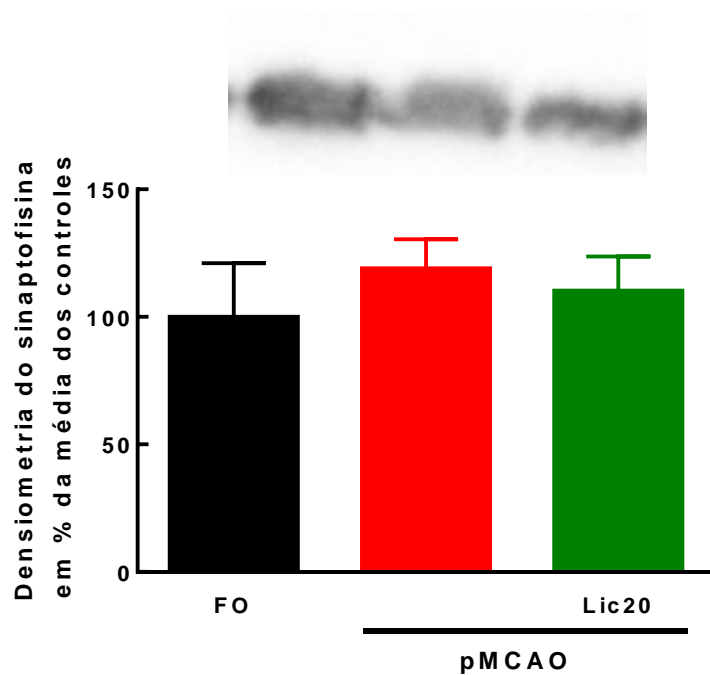
**Figura 30.** Efeito do licopeno na expressão da proteína sinaptofisina no córtex de camundongos submetidos a pMCAO.



Os animais foram isquemiados por oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO) e tratados 2 h e 4 dias seguintes com licopeno. Representação do imunoblot e análise densitométrica das bandas representadas. Representação do imunoblot e análise densitométrica das bandas representadas por média±EPM. <sup>a</sup>vs FO p<0,005,



**Figura 31.** Efeito do licopeno na expressão da proteína sinaptofisina no estriado de camundongos submetidos à pMCAO.



Os animais foram isquemiados por oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO) e tratados 2 h e 4 dias seguintes com licopeno. Representação do imunoblot e análise densitométrica das bandas representadas. Representação do imunoblot e análise densitométrica das bandas representadas por média±EPM.  $p < 0,005$  <sup>a</sup>vs FO, <sup>b</sup>vs pMCAO. ANOVA, seguido do teste de Tukey.

## 6 DISCUSSÃO

São necessários estudos que visem a pesquisa por drogas que protejam os neurônios da isquemia e evitem o progresso da cascata bioquímica que leva a morte celular (ZHOU *et al.*, 2008) e que sejam de custo mais acessível para que possam ingressar na padronização do SUS como coadjuvantes à terapia trombolítica que apresenta alto custo.

No presente estudo, demonstramos o efeito neuroprotetor do licopeno nos déficits de memória induzidos por pMCAO em camundongos. Nossos resultados revelaram que o licopeno suprime a resposta inflamatória e a ativação glial, e previne os déficits de memória induzidos por isquemia cerebral.

Dados atuais mostram que uma dieta rica em alimentos fitoquímicos é capaz de melhorar déficits na função cognitiva tanto de animais e como de humanos relacionados à idade. Apesar de historicamente o efeito neuroprotetor destas substâncias, ser atribuído à sua ação antioxidante, atualmente se sabe que a ação antioxidante não é a única responsável pela habilidade de prevenir ou reverter disfunções neuronais e déficits cognitivos. Estudos recentes apontam para diversos outros mecanismos neuroprotetores em potencial, como ação anti-inflamatória, regulação de fatores de transcrição e inibição de proteínas (RENDEIRO *et al.*, 2012).

O licopeno é encontrado naturalmente no tomate e em outras frutas como o papaia, a goiaba vermelha e melancia (KLIPSTEIN-GROBUSCH *et al.*, 2000). Entre os carotenóides naturais, o licopeno tem a alta capacidade de para eliminar os radicais livres: sendo 10 vezes maior que o  $\alpha$ -tocoferol, 47 vezes maior que  $\beta$ -caroteno e 100 vezes mais que a vitamina E (CONN; SCHALCH; TRUSCOTT, 1991). Além disso, estudos sugerem que o licopeno tem propriedades como anti-apoptose, anti-inflamatório (MILLER *et al.*, 1996); FUJITA *et al.*, 2013). Cerca de 10 a 30 % do licopeno na dieta é absorvida pelos seres humanos e distribuída em vários tecidos, incluindo glândula adrenal, fígado, próstata, cérebro e testículos (RAO; ALI, 2007). Foi avaliado o consumo de 25 g de purê de tomate que equivale a 7 mg de licopeno e 0,3 mg de beta-caroteno, durante 14 dias consecutivos. Em conclusão, foi observado que pequenas quantidades de purê de tomate adicionadas à dieta durante um curto período de tempo podem aumentar as concentrações de carotenóides e a resistência dos linfócitos ao estresse oxidativo (PORRINI; RISO, 2000). O licopeno protege camudongos de dano

causado pela isquemia global transitória e tem sua neuroproteção associada a ativação da via de sinalização Nrf2/HO-1 (LEI *et al.*, 2016).

Em muitos pacientes o AVC é causado devido à oclusão da artéria cerebral média (MICHALSKI *et al.*, 2011) e mesmo quando a revascularização é bem-sucedida, o resultado é por vezes lesão por reperfusão (KENT; MANDAVA, 2007). Dentre os diversos modelos experimentais de isquemia cerebral podemos citar o modelo de oclusão da artéria cerebral média de modo permanente ou transitório. O modelo utilizado no presente trabalho foi de oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO). Este modelo está padronizado e resultados como as alterações histológicas, neuroquímicas, comportamentais e a geração de radicais livres no cérebro de animais já estão comprovados (ASSHAFQAQ *et al.*, 2011), assim como ativação microglial, astrocitária e redução de proteínas sinápticas em camundongos submetidos à pMCAO (FONTELES *et al.*, 2016). Sendo por esta razão um modelo bastante utilizado para reproduzir experimentalmente eventos que ocorrem no AVC em humanos.

Ao avaliarmos a porcentagem da área isquêmica, 24 h após a isquemia, pela técnica de coloração do TTC verificamos que os animais submetidos à pMCAO apresentaram área isquêmica em torno de 10%. Outros trabalhos na literatura têm demonstrado que ocorre o surgimento de área ou de volume isquêmico no córtex e estriado após a oclusão da artéria cerebral média em camundongos e que o pico máximo se observa após 24 h da indução de pMCAO (WANG *et al.*, 2016, FONTELES *et al.*, 2016, FERREIRA *et al.*, 2016). Fonteles e colaboradores 2016 verificou o surgimento de 6% de área isquêmica em relação a área total avaliada, enquanto Ferreira e colaboradores 2016 verificaram surgimento de 13% de área isquêmica. TU e colaboradores (2010) evidenciaram que volume da área de infarto isquêmico cerebral foi significativamente maior 6 h após a indução de pMCAO, atingindo o pico máximo 24 h após que chega a ser 150 vezes maior que com 6 h, e diminuindo após 72 h.

Os animais submetidos à pMCAO tratados com licopeno na dose de 20 mg/kg tiveram redução na área de infarto isquêmico. Estudos demonstraram que a exposição prolongada ao licopeno, 31 dias, com dose de 1 mg/kg reduz o dano causado pela isquemia/reperfusão do miocárdio de ratos (IM). Benefícios esse atribuídos a capacidade do licopeno de reduzir a peroxidação lipídica induzida por IM e através da análise histopatológica evidenciar a capacidade do licopeno de reduzir o infiltrado inflamatório, edema e o dano necrótico ao músculo cardíaco (BANSAL *et al.*, 2006). Ratos submetidos ao modelo de MCAO transitória e tratados antes da isquemia e

reperusão com licopeno nas doses 2 mg/kg e 4 mg/kg i.p apresentaram redução do volume de infarto isquêmico, avaliado pelo TTC (HSIAO *et al.*, 2004). Tong e colaboradores em 2016 demonstraram que 1  $\mu$ M de licopeno administrado i.v. reduziu a área de infarto no miocárdio causada por 20 min de isquemia e 4 h de reperusão. Essa redução pode ser atribuída por a capacidade do licopeno atenuar a apoptose induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, já que, durante a isquemia, a atividade mitocondrial é inibida pela escassez de oxigênio e ROS é gerado drasticamente.

A avaliação neurológica realizada 24 h após pMCAO foi realizada pela escala desenvolvida por Garcia e colaboradores (1995) com o objetivo de observar no modelo animal de isquemia os sinais e sintomas neurológicos parecido com os apresentados por pacientes após um AVC isquêmico. No presente trabalho, os animais submetidos à pMCAO apresentaram déficits neurológicos. Embora exista uma recuperação espontânea da função neurológica, visualiza-se um déficit, 24 h após a indução de pMCAO (LI *et al.*, 2008). Estudos anteriores (LIU *et al.*, 2017; FERNANDES *et al.*, 2014) demonstraram que o modelo de pMCAO provoca alteração sensório motora quando avaliamos pela escala de Garcia e colaboradores (1995). O infarto no córtex cerebral, que podemos observar através da coloração com TTC, é uma das causas dos déficits neurológicos observados em animais (LI *et al.*, 2008). No presente trabalho os animais isquemiados e tratados com licopeno v.o, na dose de 20 mg/kg, apresentaram menor comprometimento sensório-motor. O trabalho de Lei e colaboradores (2016) demonstrou que camundongos submetidos ao modelo de oclusão bilateral das carótidas tratados com licopeno, 20 mg/kg, i.p, 7 dias antes da cirurgia, possuem menor dano neurológico e este efeito se deu através da redução de estresse oxidativo e aumento de GSH. Outro estudo mostrou que o licopeno fornecido na comida (5 mg – 100 g de comida/ração) aumenta proteínas sinalizadoras antiapoptóticas como bcl2 após 1, 3 e 7 dias de isquemia bilateral das carótidas em gerbil. Assim como, induziu a um aumento na atividade de SOD e inibiu a apoptose (FUJITA *et al.*, 2013). Já foi demonstrado que o ácido retinóico, outro carotenóide, administrado 30 min após MCAO, promove significativa melhora da função neural (LI *et al.*, 2008).

Alguns estudos sugerem que a redução do volume da área de infarto é acompanhada por uma melhoria no quadro funcional (KARELINA *et al.*, 2009) (CRAFT *et al.*, 2005). Níveis elevados de espécies reativas de oxigênio durante a cascata isquêmica, e o subsequente esgotamento das enzimas antioxidantes existentes, podem resultar numa degradação maciça dos sistemas de defesa antioxidante

endógenos, resultando na incapacidade de proteger os neurônios dos danos oxidativos (ALTERMANN *et al.*, 2107). Estudos recentes têm demonstrado que as moléculas oxidativas formadas nas mitocôndrias também podem desempenhar um papel como mediadores da sinalização molecular, em vias apoptóticas mitocôndria dependente, que envolvem ligação protéica de fatores pró e anti-apoptóticas e a liberação de citocromo c (NIIZUMA *et al.*, 2010). O efeito antioxidante pode ser um dos mecanismos pelo qual o licopeno esteja recuperando a função neurológica no presente trabalho, visto que reduzindo o estresse oxidativo e melhorando a resposta anti-apoptótica, o licopeno protege a progressão da lesão, reduzindo a área de infarto isquêmico e recuperando as funções neurológicas.

A atividade locomotora dos animais foi avaliada 72 h após pMCAO, através do teste de campo aberto, onde verificamos que não houve alteração na atividade locomotora quando avaliado o parâmetro de exploração horizontal entre os grupos estudados. Esses dados corroboram com os achados de Fernandes e colaboradores (2014), que também não observaram aumento do número de crossings no teste do campo aberto em animais submetidos à pMCAO. Diversas áreas cerebrais são afetadas pela isquemia, dentre elas o córtex, o corpo estriado e hipocampo (RICE *et al.*, 1981). Os déficits motores e de memória presentes após a isquemia são associados a diminuição do fluxo sanguíneo nessas áreas (NETTO *et al.*, 1993; NUNN; HODGES, 1994; HODGES *et al.*, 1997; NELSON *et al.*, 1997; ISHIBASHI *et al.*, 2004). O tecido cerebral é extremamente sensível a períodos sem aporte de oxigênio, que podem desencadear a cascata de excitotoxicidade, perda da homeostase do  $Ca^{2+}$ , inflamação e estresse oxidativo (BROUNS; DEDEYN, 2009). A isquemia promove diminuição no número de “rearing” que pode ocasionar de uma menor estabilidade postural. SHEN e WANG (2009) mostraram que o movimento exploratório vertical era mais sensível à lesão cortical promovida pela pMCAO do que o movimento horizontal.

No presente trabalho verificamos que os animais submetidos à pMCAO apresentaram redução da exploração vertical comparados aos animais falso-operados e o tratamento com licopeno, 20 mg/kg, reverteu essa alteração. No estudo de Kumar e colaboradores (2009) o tratamento com licopeno nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg, v.o., protegia do déficit motor causado pelo 3-ácido nitropropiónico e o pré-tratamento com L- arginina revertia o efeito protetor do licopeno, sugerindo que o efeito protetor do licopeno, possivelmente, envolve o NO.

Estudo de Al-Ami e colaboradores (2016) demonstraram que ratos expostos ao cloreto de alumínio que tem o seu depósito cerebral associado a doenças neurodegenerativas como Doença de Alzheimer e Doença de Parkinson, apresentavam diminuição da atividade locomotora e o tratamento com a astaxantina, um carotenoide, na dose 20mg/kg por 42 dias, preveniu o déficit motor, evidenciado pelo aumento na distância percorrida no aparato. O alumínio tem sua toxicidade baseada no estresse oxidativo, onde ocorre uma exacerbada produção de ROS (HAN *et al.*, 2013). Neste trabalho, o tratamento com a astaxantina protegeu os animais através da redução de proteínas oxidantes e formação NO.

Pacientes com doença cerebrovascular ocasionalmente exibem distúrbios cognitivos, como amnésia e desorientação topográfica (CAPLAN *et al.*, 1985; CAPLAN *et al.*, 1990). Portanto, estudamos o efeito do licopeno sobre os déficits de memória induzidos pela pMCAO.

Estudos têm demonstrado que o modelo de pMCAO é capaz de induzir déficits de memória operacional (CARMO *et al.*, 2014, FERNANDES *et al.*, 2015, FONTELES *et al.*, 2016). 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). No presente trabalho observamos déficit na memória de trabalho avaliada pelo labirinto em Y 3 dias após pMCAO, corroborando com os trabalhos de Zhou e colaboradores (2014) que demonstraram déficit em memória de trabalho avaliado após MCAO e de Ferreira e colaboradores (2015) que encontram déficit na memória de trabalho após 3 dias de pMCAO. 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). Os neurônios piramidais do córtex pré-frontal estão envolvidos no planejamento das respostas motoras e exigem do hipocampo a capacidade de organiza-las e expressá-las (FUSTER *et al.*, 1999; JOHANSSON; BELINCHENKO, 2002). Os neurônios pré-frontais podem codificar informações relacionadas à eventos de curto prazo e a componentes específicos de tarefas espaciais (JUNG *et al.*, 1998). O córtex pre frontal e o hipocampo são vulneráveis ao dano causado pela isquemia. Após isquemia cerebral global foi identificado uma redução do numero de neurônios piramidais, reduzindo a formação de espinhas dendríticas (GARCIA-CHAVEZ *et al.*, 2008).

No presente trabalho o licopeno, na dose de 20 mg/kg, preveniu o déficit na memória operacional. Outros estudos têm demonstrado a ação do licopeno frente a déficits de memória operacional. O licopeno, na dose de 4mg/kg v.o, diminuiu o déficit na memória de trabalho de animais submetidos a dieta rica em gordura, demonstrando que o licopeno é capaz de atenuar a redução da densidade da espinha dendríticas induzida pela dieta rica em gordura (WANG *et al.*, 2016). A crocina, um carotenóide como o licopeno, foi capaz de prevenir o déficit de memória de trabalho no labirinto em Y em ratos submetidos a modelo de Doença de Alzheimer esporádico induzido pela estreptozotocina, sendo esta ação da crocina de diminuir o estresse oxidativo induzido pela perturbação do metabolismo da glicose induzido pelo STZ (KHALILI; HAMZEH, 2010). Assim como o licopeno, a crocina apresenta reconhecidas atividades antioxidantes e anti-inflamatória, mecanismos estes importantes para o combate a doenças neurodegenerativas.

A tarefa de reconhecimento de objetos envolve uma memória de trabalho sem componente espacial. O desempenho dos animais durante a retenção da memória reflete uma modulação de processos mnemônicos pós-treinamento (armazenamento e/ou recuperação) (PITISIKAS *et al.*, 2007). A tarefa do reconhecimento de objetos é útil para avaliar regiões específicas, principalmente o hipocampo e córtex perirrinal (WINSHWE; 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). Estudos anteriores envolvendo roedores mostraram que pMCAO induz a déficit mnemônicos (WILLING *et al.*, 2003; TAMURA *et al.*, 2001). Camundongos submetidos à hipóxia/isquemia apresentam baixo desempenho no reconhecimento do objeto novo (MCAULIFFE *et al.*, 2009). Corroborando com nossos resultados que demonstram que houve uma redução no índice de reconhecimento do objeto após 4 dias de pMCAO.

Nosso estudo demonstrou que o licopeno é capaz de prevenir o dano na memória episódica, relacionada a objetos causado por pMCAO. Outro estudo demonstrou que o licopeno exerce efeito benéfico sobre os processos de memória em modelo de Doença de Alzheimer induzida pela injeção de A $\beta$ -amiloide, por restaurar os níveis de BDNF e por sua ação antioxidante (PRAKASH; KUMAR, 2014). A astaxantina, um carotenoíde como o licopeno, protege de déficit na tarefa de reconhecimento de objetos induzida por traumatismo craniano em camundongos, possivelmente por ativar as vias de sinalização

protetora, como as vias Akt e ERK (WANG *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2014) e estimulam fatores neurotróficos (JI *et al.*, 2017). Estdos mostram que fatores neurotróficos, como o BDNF, estão relacionados a memória e o aprendizado e podem proteger os neurônios hipocampais da neuroinflamação causada por diversos agentes.

Estudo clínico com pacientes entre 70 e 76 anos sugere que o consumo de carotenoides, incluindo o licopeno, reduz o déficit cognitivo na população idosa, e que esse efeito se deve, provavelmente, às suas propriedades antioxidantes (AKBARALY *et al.*, 2007).

A esQUIVA passiva é um dos modelos mais utilizados para o estudo bioquímico e farmacológico da memória. Um modelo robusto que apenas em um treino pode gerar memórias de longa duração para esta tarefa (IZQUIERDO *et al.*, 2006). A esQUIVA passiva do tipo “step-down”, 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). Nazari e colaboradores (2016) demonstraram que o modelo pMCAO induz o déficit de memória aversiva avaliado através do teste de esQUIVA passiva. Outro estudo também identificou que pMCAO causa déficit na memória aversiva avaliada pela esQUIVA “step down”, tanto na avaliação do aprendizado quanto na retenção da memória (FONTELES *et al.*, 2016). Esses resultados corroboram com os achados do nosso trabalho que verificou déficit no aprendizado e na retenção da memória aversiva dos animais isquemiados, avaliados 3 e 4 dias respectivamente após pMCAO. O hipocampo é considerado o centro do processo de memória (WAHL *et al.*, 1992). Os neurônios colinérgicos que inervam o córtex cerebral, amígdala, hipocampo são essenciais para aprendizagem e formação da memória.

O presente trabalho demonstrou que o licopeno é capaz de prevenir o dano na retenção da memória aversiva tardia, mas não na avaliação da memória recente (apredizagem). Existem poucos estudos que envolvem o licopeno e seu efeito sobre a apredizagem e memória. Foi demonstrado que tratamento com licopeno pode inibir a atividade da AChE e restaurar parcialmente os níveis de Ach e restaurar a função de alguns neurônios em modelo de resistência à insulina provocado por ingestão de frutose (YIN *et al.*, 2014) . O hipocampo é considerado o centro do processo de memória (WAHL *et al.*, 1992). Os neurônios colinérgicos que inervam o córtex cerebral, amígdala, hipocampo são essenciais para aprendizagem e formação da memória (BHUTADA *et al.*, 2011). O estudo de Rajaei e colaboradores (2016) demonstrou que a



Crocina, um carotenoide, atua como um agente antioxidante e anti-inflamatório no hipocampo de ratos parkinsonianos e poderia melhorar memória aversiva, pelo menos em parte, através da redução dos níveis de nitrito no cérebro. O licopeno inibe a peroxidação lipídica e inibe o dano oxidativo no DNA de forma eficiente com antioxidante potente (KUHAD *et al.*, 2008; SANDHIR *et al.*, 2010). Outro estudo demonstrou que o tratamento com licopeno atenua déficit cognitivo e estresse oxidativo e nitrosativo em ratos diabéticos (KUHAD *et al.*, 2008).

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

Porém, além do hipocampo, a memória espacial avaliada no labirinto aquático também depende de outras regiões cerebrais como o corpo estriado, como foi demonstrado por Block, Kunkel, Schwarz (1993), onde a injeção de ácido quinolínico no corpo estriado induziu alterações no desempenho de ratos no labirinto aquático de plataforma submersa (D’HOOGHE; DE DEYNN, 2001).

Foi demonstrado que pacientes com oclusão de ACM apresentava falhas cognitivas envolvendo o sistema límbico e o córtex frontal e dano hipocampal ipsilateral. O bloqueio da expansão da área do perinfarto reduz a lesão hipocampal com conseqüente melhora cognitiva (XIE *et al.*, 2011). O insulto isquêmico pode ocasionar lesão hipocampal a nível funcional e estrutural (NIKONENKO *et al.*, 2009).

Neste trabalho, os animais isquemiados 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. Após a isquemia o dano sensorio motor tem sido relatado como passível de recuperação, mas a performance cognitiva e função neuronal do hipocampo são irreversivelmente danificadas. O hipocampo apresenta dois tipos de plasticidade de curto prazo (STP), e a plasticidade de longo prazo (LTP), que é

o mais expressivo evento eletrofisiológico relacionado à aprendizagem e memória (IZQUIERDO *et al.*, 2008), são eventos necessários para o armazenamento da informação e já foi sugerido que MCAO prejudica a indução do LTP (LI *et al.*, 2012).

No presente trabalho demonstramos que o licopeno consegue reverter o dano na memória espacial quando avaliamos os parâmetros de aumento no tempo no quadrante, número de cruzamentos e verificamos uma redução na latência. A Crocina, um carotenoide, previne a inibição de LTP no hipocampo causada pela toxicidade induzida por etanol, por um mecanismo que envolve a antagonização dos receptores de NMDA (ABE *et al.*, 1998; ABE; SAITO, 2000). O modelo de toxicidade pela colchicina, que é particularmente muito tóxico para o hipocampo, principalmente as células do giro denteado, é sabidamente provocado por estresse oxidativo. A colchicina produz alterações cognitivas por dano oxidativo aumento de malonaldeído, nitrito e depleção de defesas endógenas. A administração do licopeno reduziu significativamente o déficit na memória espacial na tarefa do water maze em ratos após a administração de colchicina.

Uma dieta rica e variada de frutas e vegetais coloridos que fornece quantidade suficiente de carotenóides pode contribuir para a preservação da função cognitiva durante o envelhecimento (GUYOT *et al.*, 2014). No presente estudo verificamos efeitos de prevenção dos déficits cognitivos na dose de 20mg/kg e não na dose de 40mg/kg, por isso a investigação do mecanismo de proteção foi feito com a dose de 20mg/kg. Um estudo mostrou que em concentrações elevadas de licopeno, luteína e  $\beta$ -caroteno apresentaram efeitos pró-oxidantes. Em altas concentrações eles podem alterar as propriedades de membranas biológicas, influenciando a permeabilidade a toxinas, ao oxigênio ou metabólitos (EL-AGAMEY *et al.*, 2004). No presente trabalho não verificamos piora dos animais pMCAO tratados na dose de 40mg/kg com licopeno, mesmo porque não devemos considerar a dose 40mg/kg uma dose alta, visto que a DL50 em ratos é maior que 5000mg/kg em uma única tomada (HONDA *et al.*, 2017), mas verificamos que o efeito neuroprotetor no modelo de pMCAO foi perdido, mostrando uma dependência da dose.

Não há estudos que estabeleçam a relação do licopeno com a isquemia cerebral envolvendo a cascata neuroinflamatória desencadeada pelo processo isquêmico, mas se sabe que a disfunção no aprendizado e memória causado pelo A $\beta$  amiloide é reduzida pelo licopeno ao reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias (SACHDEVA; CHOPRA *et al.*, 2015). Muitos estudos têm demonstrado que a inflamação é um dos importantes mecanismos patológicos que aparece em consequência do infarto cerebral

isquêmico e que, portanto, a inibição da inflamação reduziria os danos cerebrais isquêmicos (WANG *et al.*, 2016). A isquemia cerebral leva à perda neuronal severa devido a reações inflamatórias secundárias que estão associadas com a invasão de leucócitos e a ações da microglia e macrófagos residentes (JIN *et al.*, 2010). Um estudo em células SW480, células de câncer de colo retal humano, estimuladas com LPS demonstrou que o licopeno diminui a ativação de NF- $\kappa$ B e JNK que causa inflamação e suprime a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, COX-2, e iNOS (CHA *et al.*, 2017). Com tudo os descrito acima fomos investigar se a proteção exercida pelo licopeno contra o déficit cognitivo causado por pMCAO também apresenta relação com efeito anti-inflamatórios do licopeno.

Existem evidências de que o dano causado pela inflamação promove uma sinalização caracterizada pela ativação da glia, liberação de mediadores inflamatórios, liberação de citocinas pró-inflamatórias e ativação de macrófagos (THIEL; HEISS, 2011; LAMBERTSEN *et al.*, 2012). Microglia e astrócitos são células residentes, fagocíticas do sistema nervoso central, recrutadas após eventos como isquemia cerebral. A glia ativada sintetiza e libera citocinas, tais como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (LAI; TODD, 2006). Estas citocinas inflamatórias são acumulados em até dezenas de vezes, exacerbando o dano neurovascular durante à isquemia (LAMBERTSEN *et al.*, 2012).

Os astrócitos são células da glia são ativados no processo inflamatório após isquemia, levando a expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), evento esse, conhecido como astrogliose reativa (PEKKNY, NILSSON, 2005). A expressão da proteína GFAP permite a diferenciação dos astrócitos de outras células (O'CALLAGHAN; SRIRAM, 2005). O presente trabalho demonstrou o aumento da ativação de astrócitos após 5 dias de pMCAO no córtex temporal. Foi demonstrado o aumento da expressão do GFAP no hemisfério ipsilateral de animais submetidos à MCAO (ASHAFAQ *et al.*, 2016). Ferreira e colaboradores (2016) identificaram aumento na expressão de GFAP após cinco dias da indução de pMCAO, o que corrobora com os achados do presente trabalho. O tratamento com o licopeno, 20 mg/kg, preveniu o aumento da imunoreatividade de GFAP no córtex temporal. A luteína é também classificada como um hidroxi-carotenoide, foi utilizada em modelo de isquemia e reperfusão na retina e verificou-se uma redução na indução da gliose o que contribui para a manutenção da função da retina. O estudo verificou que a redução na ativação de GFAP atenua a liberação de citoninas pró inflamatórias (LI *et al.*, 2012). Propondo o efeito protetor da luteína por sua ação anti-inflamatória.

A ativação microglial pode ser resultado de liberação de aminoácidos excitatórios, de óxido nítrico (NO) ou de ROS, bem como do dano mitocondrial (ARONOWSKI *et al.*, 1997; HALLENBECK; DUTKA, 1990) mecanismos que fazem parte da cascata isquêmica.

O licopeno tem sido estudado em vários modelos de doenças neurodegenerativas devido a sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, ação anti-inflamatória e potente ação antioxidante (PREMA *et al.*, 2015). Sendo considerado uma droga eficaz e segura em doenças que envolvem a neuroinflamação (ZHANG *et al.*, 2016). O licopeno apresenta comprovada ação anti-inflamatória e já foi demonstrado que o licopeno (5 e 10 mg/kg v.o) é capaz de reduzir os níveis de marcadores inflamatórios em modelo de discinesia induzida por haloperidol (DATTA *et al.*, 2015). Ruan e colaboradores, 2015 demonstraram através de técnica imunohistoquímica que na fase aguda após a isquemia ocorre ativação glial evidenciada pelo aumento imunomarcção para Iba-1 e proliferação astrocitária identificada pelo aumento imunomarcção de GFAP, como também o aumento na produção de TNF- $\alpha$ . O Iba-1 é uma proteína ligante de cálcio ionizada expressa especificamente em micróglia. O aumento de sua expressão após evento isquêmico foi identificada em um período de 48 h até 7 dias após a reperfusão na região de penumbra, esse resultado foi demonstrado pelo aumento de células positivas marcadas com a proteína e o aumento de sua expressão (ITO *et al.*, 2001).

O presente trabalho mostrou aumento da ativação microglial após 5 dias de pMCAO no córtex temporal. O licopeno administrado após a 2h da indução da isquemia não diminuiu significativamente a ativação no córtex. LIN e colaboradores (2014) demonstraram que o licopeno, administrado nos animais durante 3 dias anteriores a indução de neuroinflamação por LPS, protegeu os animais da ativação microglial no estriado. HSIAO e colaboradores (2004) estimularam cultura celular de micróglia com LPS e verificaram que o licopeno (5 e 10  $\mu$ M) inibiu a produção de NO. Desse modo, observou-se de forma indireta a redução da ativação microglial na cultura. Na literatura não foi encontrado a ação do licopeno ou outros carotenoides sobre a ativação microglial em modelos de isquemia cerebral. Apesar de não ter sido observado no presente trabalho diminuição da ativação microglial pelo tratamento com o licopeno, não foi encontrada diferença significativa entre o grupo pMCAO tratados com licopeno e o grupo FO.

Vários estudos têm revelado que citocinas pró-inflamatórias envolvidas no processo de estresse oxidativo e inflamação estão associadas a neurodegeneração. A ativação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  junto com o aumento da expressão de GFAP promove o dano tecidual (HENNESSY; GRIFFIN; CUNNIGHAM, 2015). Esse cenário é um ciclo vicioso onde a liberação de citocinas ativa a micróglia e os astrócitos, que por sua vez também estimulam a liberação de mediadores inflamatórios. O TNF- $\alpha$  pode contribuir com o dano isquêmico de diversas maneiras como a alteração da permeabilidade da barreira, ativação da micróglia e astrócitos, indução da expressão de moléculas de adesão e recrutamento de neutrófilos (GONG *et al.*, 1998).

No presente estudo verificou-se um aumento na imunoreatividade para TNF- $\alpha$  no estriado dos animais submetidos à pMCAO. O mesmo não foi identificado no córtex temporal, isso provavelmente se deve ao fato de que na área de penumbra da isquemia a morte é principalmente por apoptose (GREEN; REED; 1998) e pode ser desencadeada por diversos estímulos como ativação de receptor de TNF, produção exacerbada de ROS, indução de p53, dentre outros eventos que podem produzir lesão mitocondrial (MACMANUS; LINNIK; 1997). O *core*, ou núcleo da lesão, isquêmico encontram-se neurônios em processo de morte por necrose devido à falência da membrana (SMITH, 2004). O estudo de Kostulas e colaboradores (2002) identifica o aumento da expressão de TNF- $\alpha$  no córtex dos animais submetidos a pMCAO com 1, 2, 6 e 12h e 2, 6 dias após pMCAO, sendo utilizada a técnica *hibridização in situ* onde era observado o aumento da expressão em células dentríticas. Nesse contexto especulamos que não havia, 5 dias após pMCAO no córtex temporal total, preservação da maquinaria celular capaz de expressar imunoreatividade de TNF- $\alpha$ .

No presente trabalho, verificamos que o tratamento com licopeno reduziu a imunomarcagem do TNF- $\alpha$  no córtex e estriado dos animais submetidos a pMCAO. O licopeno, 40 mg/kg, administrado via i.p. 2 h após a indução de hemorragia subaracnóidea em ratos, protegeu os animais do dano neuronal através da inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  (WU *et al.*, 2015). No estudo de HE e colaboradores (2014) o tratamento com licopeno reduziu significativamente a expressão de mRNA de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em modelo de isquemia de miocárdio, sugerindo que o efeito cardioprotetor do licopeno pode ser devido à redução da produção de citocinas pró-inflamatórias através da inibição da atividade NF- $\kappa$ B induzida por lesão miocárdica. A ativação de NF- $\kappa$ B resulta em uma sinalização para a expressão de

citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , bem como COX-2. Portanto, agentes terapêuticos que podem bloquear ou inibir o NF- $\kappa$ B possuem a ação de inibir a via de sinalização de diversas citocinas pró-inflamatórias (HARARI *et al.*, 2010).

Um dos principais mecanismos pelos quais a inflamação contribui para o dano cerebral isquêmico é a liberação de mediadores inflamatórios tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e iNOS (XU *et al.*, 2012). O NF- $\kappa$ B é constitutivamente ativo, em células do hipocampo e córtex, em baixos níveis (KALTSCHMIDT *et al.*, 1994), a sua ativação é desencadeada por ROS, hipóxia e mediadores inflamatórios (RIDDER; SCHWANINGER, 2009). Evidências indicam que NF- $\kappa$ B está elevado no estágio inicial da isquemia e que sua ativação persistente torna os neurônios vulneráveis ao insulto isquêmico (NURMI *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2010). A pMCAO induz a um aumento significativo da expressão de NF- $\kappa$ B, que por sua vez, faz a mediação da transcrição do TNF- $\alpha$  e expressão do seu mRNA no prazo de 7 dias após o evento isquêmico (TANG *et al.*, 2014). O trabalho de Zhang e colaboradores (2016) verificou 24 h após MCAO um aumento na imunorreatividade de NF- $\kappa$ B no córtex dos animais. No presente trabalho demonstramos aumento da expressão de NF- $\kappa$ B no córtex e estriado dos animais após 5 dias de pMCAO e uma redução na expressão de NF- $\kappa$ B no córtex e estriado após a administração de licopeno 20 mg/kg. Vasconcelos e colaboradores 2017 demonstraram que o licopeno reverte a inflamação causada pela carragenina ao diminuir a expressão de iNOS, COX<sub>2</sub> e NF- $\kappa$ B. Este efeito do licopeno é observado na dose de 25mg/kg e não na dose de 50mg/kg v.o.

Pesquisas recentes demonstram que diversos dímeros de NF- $\kappa$ B podem levar a morte ou a sobrevivência neuronal após lesão isquêmica. Existem evidências de que o NF- $\kappa$ B participa dos processos de memória e aprendizagem visto que em camundongos que não expressam a subunidade p65 do NF- $\kappa$ B o aprendizado da localização espacial é prejudicado (MEFFERT *et al.*, 2003). Essa dualidade apresenta-se quando ocorre uma ativação transiente que pode levar a expressão de genes anti-apoptóticos, enquanto que uma ativação sustentada, como na isquemia, pode levar a indução de um conjunto de genes pró-apoptóticos (RIDDER; SCHAWNINGER, 2009).

O dímero p50/p65 participa da patogênese da lesão pós isquêmica induzindo a expressão de genes pró apoptóticos (INTA *et al.*, 2006). A administração de licopeno 10mg/kg inibe a apoptose neuronal induzida por isquemia/reperfusão em gerbil, aumentando o bcl-2 e diminuindo os níveis de caspase 3 no hipocampo (FUJITA *et al.*, 2013). O licopeno atenua ativação inflamatória em células endoteliais causada por TNF-

$\alpha$ , por mecanismo que envolve a redução da expressão das subunidades NF- $\kappa$ B p65 e p50 (ARMOZA *et al.*, 2012). O licopeno diminuiu a translocação nuclear de NF- $\kappa$ B p65 e marcadamente suprimiu a ativação de NF- $\kappa$ B em modelo de isquemia do miocárdio (HE *et al.*, 2014). No presente trabalho não verificamos a relação de NF- $\kappa$ B citoplasmática e nuclear e sim a fração NF- $\kappa$ B p65 total. Verificamos que o licopeno tem sua ação neuroprotetora, pelo menos em parte, por sua ação anti-inflamatória e anti-apoptótica.

No presente trabalho também avaliamos o GSK-3, que é uma proteína quinase de serina/treonina que participa da regulação do metabolismo da glicose, dentre outros processos fisiológicos. Entre as isoformas homologas, a isoforma GSK-3 $\beta$  é abundante no SNC e específico de neurônios (KELLY *et al.*, 2004). A GSK-3 foi considerado outro alvo potencial para a neuroproteção contra a excitotoxicidade em modelos animais de isquemia cerebral devido ao seu potencial em modular a apoptose, inflamação, angiogênese e neurogênese (CHUANG; WANG; CHIU, 2011). Sabe-se que no AVC ou outras doenças neurodegenerativas o GSK-3 $\beta$  é ativado e sua inibição seletiva de GSK-3 $\beta$  tem efeito neuroprotetor (GUO *et al.*, 2014; KELLY *et al.*, 2004; SUN *et al.*, 2011). Evidências crescentes mostraram que a inibição da GSK-3 pode reduzir a lesão da isquemia cerebral e reperfusão (CHEN *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016; PANG *et al.*, 2016). Estudos recentes relataram que GSK-3 $\beta$  fosforilado em Ser9 está aumentada em MCAO 3 ou 5 dias após isquemia (GUO *et al.*, 2015; LUO *et al.*, 2014). Outro estudo realizado em camundongos mostrou aumento de GSK-3 $\beta$  fosforilado em Ser9 após 54 h de pMCAO, não havendo alteração no GSK-3 total no córtex dos animais (PEREZ-ALVAREZ *et al.*, 2015), demonstrando assim a participação desta proteína na cascata isquêmica. No presente trabalho observou-se um aumento da expressão de GSK-3 $\beta$  no córtex dos animais 5 dias após pMCAO e o tratamento com licopeno reduziu a expressão de GSK-3 $\beta$ . O GSK-3 $\beta$  influencia na isquemia cerebral e reperfusão e esses efeitos parecem ser mediados pela regulação de Nrf2 (LI *et al.*, 2016). Estudos anteriores relataram que a ativação de Nrf2 pelo licopeno protege os neurônios da isquemia em modelo de isquemia global (LEI *et al.*, 2016). A astaxantina, um carotenóide, exerce proteção em células HT22, que são células hipocámpais de camundongo, em modelo de toxicidade induzida pelo glutamato, por induzir a expressão de Nrf2 mediado pela via AKT/ GSK-3 $\beta$  (WEN *et al.*, 2015). O que demonstra que este seja um dos mecanismos pelos quais o licopeno exerça seu efeito neuroprotetor. No entanto, existem outras vias que GSK-3 $\beta$  e que podem representar

mecanismos de neuroproteção como o que ocorre com o ácido salvanólico, um tipo de ácido cafeíco, que é capaz de diminuir o infarto do cérebro e déficits neurológicos após 2 dias de MCAO através da modulação do GSK-3 $\beta$ , promovendo a neurogênese através da aumento da expressão de  $\beta$ -catenina, é um componente central da via de sinalização Wnt /  $\beta$ -catenina envolvida na neurogênese adultos, diminuição da expressão de pAKT que é um sinal para a expressão da Sp GSK-3 (forma inativada da proteína) e o aumento do BDNF (CHIEN *et al.*, 2016). O nosso grupo mostrou que o ácido caféico exerce proteção prevenindo a redução de sinaptofisina, proteína, correlacionada a formação e função sináptica que está diminuída após evento isquêmico (PINHEIRO *et al.*, 2014). Quanto ao licopeno não visualizamos estudos que envolvam a sua ação sobre o GSK-3 $\beta$  e a neurogêneses, apenas a antaxantina, um carotenoide, agindo na via de sinalização Wnt /  $\beta$ -catenina promovendo a angiogênese em células de músculo liso de aorta de rato (XU *et al.*, 2015).

Como já relatamos precisamos esclarecer se o efeito de neuroproteção do licopeno nos déficits cognitivos causados por pMCAO poderia envolver não somente ação antiinflamatória e antiapoptótica, mas também algum mecanismo de sinaptogênese fomos investigar a ação sobre a sinaptofisina. Esta é uma proteína associada à membrana que pode ser encontrado em todas as terminações nervosas centrais e periféricas (NAVONE *et al.*,1986). Esta proteína é um importante marcador de sinaptogênese, desenvolvimento neural e densidade sináptica. Existem evidências que demonstram que a isquemia cerebral não só causa perda neuronal, mas também leva a mudança na morfologia e composição nas sinapses (HORNER *et al.*,1996; JOURDAIN *et al.*, 2002). A remodelação e a plasticidade dendrítica são críticas para a regeneração nervosa e reparação cerebral da área lesada após o AVC (UENO *et al.*,2012), mas a recuperação funcional após isquemia cerebral é extremamente limitada (WALMSLEY; MIR, 2007).

Pinheiro e colaboradores (2014) evidenciaram que ocorre a diminuição da expressão de sinaptofisina no córtex temporal 5 dias após pMCAO. Outro estudo demonstrou redução na expressão de sinaptofisina com 8, 12, 24, 72 e 120 h após pMCAO (LIU *et al.*, 2017). Estes estudos corroboram com os nossos achados, que demonstram redução na expressão de sinaptofisina no córtex cerebral de animais 5 dias após pMCAO. Em nosso estudo não foi verificado diferença significativa quanto a expressão da sinaptofisina no estriado dos animais. A sinaptofisina contribui para estrutura e função das sinapses, e com isso a sua superregulação pode estar envolvida na



plasticidade sináptica (LAN *et al.*, 2013). A administração de licopeno não reverteu essa redução na expressão de sinaptofisina no cortex cerebral. Não há estudos na literatura relatando ação sinaptogênica do licopeno. Porém, um estudo usando suplementação de luteína, um carotenoíde, por 30 dias em modelo de retinopatia diabética induzida por estreptozotocina demonstra aumento de sinaptofisina, provavelmente, pela ação antioxidante da luteína (SASAKI *et al.*, 2010). Talvez pelo fato de no presente trabalho não ter sido avaliado a administração crônica do licopeno, não tenha sido observado ação do licopeno sobre a sinaptofisina no modelo de isquemia cerebral focal permanente. Sendo assim, não podemos descartar esta ação do licopeno. Diante do exposto, podemos sugerir, baseados em nossos resultados, que a ação do licopeno sobre a melhora da função cognitiva dos animais isquemiados não se dá através do mecanismo de sinaptogênese.

Tomando nossos resultados em conjuntos podemos sugerir que o licopeno tem a capacidade de reverter a lesão isquêmica, quando administrado ainda na fase aguda da lesão, melhorando a função neurológica e os déficits de memória provavelmente por sua ação antiinflamatória e anti apoptótica. Não podemos descartar outros mecanismos como a ação sobre o estresse oxidativo, que já foi exaustivamente demonstrado por outros autores e por isso não foi o objetivo do nosso trabalho.

Importante salientar que o nosso trabalho verificou que o licopeno teve sua ação após o evento isquêmico, dentro da janela terapêutica e que representa uma alternativa de menor custo que o rt-PA podendo ser usado como coadjuvante ao tratamento de AVC isquêmico.

## 7 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a pMCAO causa dano neuronal, sensório motor e déficit de memória em camundongos e que o tratamento com o licopeno na dose de 20mg/kg preveniu esses déficits. O licopeno apresentou efeito anti-inflamatório, pois reduziu a imunomarcção de GFAP no córtex dos animais, não exercendo efeito protetor sobre a microgliose identificada através da imunomarcção de iba-1 e reduzindo a imunomarcção de TNF-  $\alpha$  no córtex dos animais. Além disso, reduziu a expressão do NF- $\kappa$ B e visualizado que o licopeno reduz a sua expressão no córtex e estriado, como também reduz da expressão do GSK -3 $\beta$ . Serão necessário mais estudos para esclarecer os mecanismos envolvidos na neuroproteção induzida pelo licopeno no modelo de isquemia cerebral focal, bem como avaliar a utilização clínica do licopeno no tratamento do AVC.

**REFERÊNCIAS**

ABE, K.; SAITO, H. Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behaviour and long-term potentiation. **Phytother Res.**, v. 14, n. 3, p. 149-152, 2000.

ABE, K.; SUGIURA, M.; SHOYAMA, Y.; SAITO, H. Crocin antagonizes ethanol inhibition of NMDA receptor-mediated responses in rat hippocampal neurons. **Brain Res.**, v. 787, n. 1, p. 132-8, 1998.

AKBARALY, N.T.; FAURE, H.; GOURLET, V.; FAVIER, A.; BERR, C. Plasma carotenoid levels and cognitive performance in an elderly population: results of the

EVA Study. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.**, v. 62, n. 3, p. 308-316, 2007.

AKBARALY, N.T.; FAURE, H.; GOURLET, V.; FAVIER, A.; BERR, C. Plasma carotenoid levels and cognitive performance in an elderly population: results of the

AL-AMIN, M.M.; REZA, H.M.; SAAFI, H.M.; MAHMUD, W.; IBRAHIM, A.A.; ALAM, M.M.; KABIR, N.; SAIFULLAH, A.R.; TROPA, S.T.; QUDDUS, A.H. Astaxanthin ameliorates aluminum chloride-induced spatial memory impairment and neuronal oxidative stress in mice. **Eur J Pharmacol.**, v. 15, n. 777, p. 60-69, 2016.

ALTERMANN, C.D.C.; SOUZA, M.A.; SCHIMIDT, H.L.; IZAGUIRRY, A.P.; MARTINS, A.; GARCIA, A.; SANTOS, F.W.; MELLO-CARPES, P.B. Short-term green tea supplementation prevents recognition memory deficits and ameliorates hippocampal oxidative stress induced by different stroke models in rats. **Brain Res Bull.**, v. 131, p. 78-84, 2017.

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.

ANDERSEN, K.K.; OLSEN, T.S.; DEHLENDORFF, C.; KAMMERSGAARD, L.P. Hemorrhagic and ischemic strokes compared: stroke severity, mortality, and risk factors. **Stroke**, v.40, n. 6, p. 2068-2072, 2009.

ANDRÉ, C.; CURIONI, C.C.; BRAGA DA CUNHA, C.; VERAS, R. Progressive decline in stroke mortality in Brazil from 1980 to 1982, 1990 to 1992, and 2000 to 2002. **Stroke**, v. 37, n. 11, p. 2784-2789, 2006.

ARMOZA, A.; HAIM, Y.; BASHIRI, A.; WOLAK, T.; PARAN, E. Tomato extract and the carotenoids lycopene and lutein improve endothelial function and attenuate inflammatory NF- $\kappa$ B signaling in endothelial cells. **J Hypertens.**, v. 31, n. 3, p. 521-9, 2013.

ARONOWSKI, J.; STRONG, R.; GROTTA, J.C. Reperfusion injury: demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 17, n. 10, p. 1048-56, 1997.

ASHAFAQ, M.; TABASSUM, H.; PARVEZ, S. Modulation of Behavioral Deficits and Neurodegeneration by Tannic Acid in Experimental Stroke Challenged Wistar Rats. **Mol Neurobiol.**, p. 1-11, 2016.

ATESSAHIN, A.; YILMAZ, S.; KARAHAN, I.; CERIBASI, A.O.; KARAOGLU, A. Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. **Toxicology.**, v. 212, n. 2-3, p. 116-123, 2005.

BANSAL, P.; GUPTA, S.K.; OJHA, S.K.; NANDAVE, M.; MITTAL, R.; KUMARI, S.; ARYA, D.S. Cardioprotective effect of lycopene in the experimental model of myocardial ischemia-reperfusion injury. **Mol Cell Biochem.**, v. 289, n. 1-2, p. 1-9, 2006.

BAYAT, M.; SHARIFI, M.D.; HAGHANI, M.; SHABANI, M. Enriched environment improves synaptic plasticity and cognitive deficiency in chronic cerebral hypoperfused rats. **Brain Res Bull.**, v. 119, n. Pt A, p. 34-40, 2015.

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.

BOLANDER, H.G.; PERSSON, L.; HILLERED, L.; D'ARGY, R.; PONTEN, U.; OLSSON, Y. Regional cerebral blood flow and histopathologic changes after middle cerebral artery occlusion in rats. **Stroke.**, v. 20, n.7, p. 930-7, 1989.

BRASSAI, A.; SUVANJEIEV, R.G.; BÁN, E.G.; LAKATOS, M. Role of synaptic and nonsynaptic glutamate receptors in ischaemia induced neurotoxicity. **Brain Res Bull.**, v. 112, p.1-6, 2015.

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

BUETERS, T.; VON EULER, M.; BENDEL, O.; VON EULER, G. Degeneration of newly formed CA1 neurons following global ischemia in the rat. **Exp Neurol.**, v. 209, n. 1, p. 114-124, 2008.

BURWELL, R.D.; WITTER, M.P.; AMARAL, D.G. Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain. **Hippocampus.**, v.5, n. 5, p. 390-408, 1995.

CAI, Q.; XU, G.; LIU, J.; WANG, L.; DENG, G.; LIU, J.; CHEN, Z. A modification of intraluminal middle cerebral artery occlusion/reperfusion model for ischemic stroke with laser Doppler flowmetry guidance in mice. **Neuropsychiatr Dis Treat.**, v. 12, p. 2851-2858, 2016.

CALIL, S.R.; SANTOS, T.A.B.T, BRAGA, D. M. B, DIAS, R. H.D. Reabilitação por meio da dança: uma proposta fisioterapêutica em pacientes com seqüela de AVC. **Rev Neurocienc**, v. 15, n.3, p. 195–202, 2007.

CAO, G.; MINAMI, M.; PEI, W.; YAN, C.; CHEN, D.; O'HORO, C.; GRAHAM, S.H.; CHEN, J. Intracellular Bax translocation after transient cerebral ischemia: implications for a role of the mitochondrial apoptotic signaling pathway in ischemic neuronal death. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 21, n. 4, p.321-333, 2001.

CARMO, M.R.; SIMÕES, A.P.; FONTELES, A.A.; SOUZA, C.M.; CUNHA, R.A.; ANDRADE, G.M. ATP P2Y1 receptors control cognitive deficits and neurotoxicity but not glial modifications induced by brain ischemia in mice. **Eur J Neurosci.**, v. 39, n. 4, p. 614-622, 2014.

CAVALCANTE, T.F.; MOREIRA, R.P.; ARAUJO, T.L.; LOPES, M.V.O. Fatores demográficos e indicadores de risco de acidente vascular encefálico: comparação entre moradores do município de Fortaleza e o perfil nacional. *Rev. Latino-Am. Enferma*, v. 18, n. 4, p. 01-06, 2010.

CEULEMANS, A.G.; ZGAVC, T.; KOOIJMAN, R.; HACHIMI-IDRISSI, S.; SARRE, S.; MICHOTTE, Y. The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia. **J Neuroinflammation.**, v. 1, n. 7, p. 1-18, 2010

CONN, P.F.; SCHALCH, W.; TRUSCOTT, T.G. The singlet oxygen and carotenoid interaction. **J Photochem Photobiol B.**, v. 11, n. 1, p. 41-47, 1991.

CRAFT TK, GLASPER ER, MCCULLOUGH L, ZHANG N, SUGO N, OTSUKA T, HURN PD, DEVRIES AC. Social interaction improves experimental stroke outcome. **Stroke**, v. 36, p. 2006–2011, 2005.

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.

DATTA, S.; JAMWAL, S.; DESHMUKH, R.; KUMAR, P. Beneficial effects of lycopene against haloperidol induced orofacial dyskinesia in rats: Possible neurotransmitters and neuroinflammation modulation. **Eur J Pharmacol.**, v. 771, p. 229-35, 2016.

DE CARVALHO, J.J.; ALVES, M.B.; VIANA, G.Á.; MACHADO, C.B.; DOS SANTOS, B.F.; KANAMURA, A.H.; LOTTENBERG, C.L.; NETO, M.C.; SILVA, G.S. Stroke epidemiology, patterns of management, and outcomes in Fortaleza, Brazil: a hospital-based multicenter prospective study. **Stroke**, v. 42, n.12, p. 3341-3346, 2011.

DEGTEREV, A.; YUAN, J. Expansion and evolution of cell death programmes. **Nat Ver Mol Cell Biol.**, v. 9, n. 5, p.378-90, 2008.

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

DEW, I.T.; CABEZA, R. The porous boundaries between explicit and implicit memory: behavioral and neural evidence. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1124, p. 174-190, 2011.

DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch Biochem Biophys**, v. 274, n.2, p. 532-538, 1989.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M.A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends Neurosci.**, v. 22, n. 9, 391-397, 1999.  
doi: 10.3892/mmr.2015.4534. Epub 2015 Nov 9.

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. A cortical-hippocampal system for declarative memory. **Nat Rev Neurosci**, v. 1, n. 1, p. 41-50, 2000.

EL-AGAMEY, A.; LOWE, G. M.; MCGARVEY, D. J.; MORTENSEN, A.; PHILLIP, D. M.; TRUSCOTT, T. G.; YOUNG, A. J.. **Arch. Biochem. Biophys.** 430, 37 2004.

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.

FEIGIN, V.L.; FOROUZANFAR, M.H.; KRISHNAMURTHI. R.; et al. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet.**, v. 383, n. 9913, p. 245-254, 2014.

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

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

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

FLYNN, R.W.V.; MACWALTER, R.S.M.; DONEY, A.S.F. The cost of cerebral ischaemia. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 250-256, 2008.

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

FUJITA, K.; YOSHIMOTO, N.; KATO, T.; IMADA, H.; MATSUMOTO, G.; INAKUMA, T.; NAGATA, Y.; MIYACHI, E. Lycopene inhibits ischemia/reperfusion-induced neuronal apoptosis in gerbil hippocampal tissue. **Neurochem Res.**, v. 38, p. 461-469, 2013.

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

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.

GARCÍA-CHÁVEZ, D.; GONZÁLEZ-BURGOS, I.; LETECHIPÍA-VALLEJO, G.; LÓPEZ-LOEZA, E.; MORALÍ, G.; CERVANTES, M. Long-term evaluation of cytoarchitectonic characteristics of prefrontal cortex pyramidal neurons, following global cerebral ischemia and neuroprotective melatonin treatment, in rats. **Neurosci Lett.**, v. 448, n. 1, p. 148-52, 2008.

GASPAROVA, Z.; STARA, V.; STOLC, S. Effect of antioxidants on functional recovery after in vitro-induced ischemia and long-term potentiation recorded in the pyramidal layer of the CA1 area of rat hippocampus. **Gen Physiol Biophys.**, v. 33, n. 1, p. 43-52, 2014.

GENOUX, D.; MONTGOMERY, J.M. Glutamate receptor plasticity at excitatory synapses in the brain. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 34, n. 10, p. 1058-63, 2007.

GHOLAMI, M.; KHAYAT, Z.K.; ANBARI, K.; OBIDAVI, Z.; VARZI, A.; BOROJENI, M.B.; ALIPOUR, M.; NIAPPOOR, A.; GHARRAVI, A.M. Quercetin ameliorates peripheral nerve ischemia-reperfusion injury through the NF-kappa B pathway. **Anat Sci Int.**, 2016. doi:10.1007/s12565-016-0336-z

GILGUN-SHERKI, Y.; ROSENBAUM, Z.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. **Pharmacol Rev.**, v. 54, n. 2, p. 271-284, 2002.

GOLDSCHMIDT, R.B.; STEWARD, O. Preferential neurotoxicity of colchicine for granule cells of the dentate gyrus of the adult rat. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 77, n. 5, p. 3047-51, 1980.

GONG, C.; QIN, Z.; BETZ, A.L.; LIU, X.H.; YANG, G.Y. Cellular localization of tumor necrosis factor alpha following focal cerebral ischemia in mice. **Brain Res.**, v. 801, n. 1-2, p. 1-8, 1998.

GREEN, D.R.; REED, J.C. Mitochondria and apoptosis. **Science.**, v. 281, n. 5381, p. 1309-12, 1998.

GUIRAUD, V.; AMOR, M.B.; MAS, J.L.; TOUZÉ, E. Triggers of ischemic stroke: a systematic review. **Stroke**, v. 41, n. 11, p. 2669-2677, 2010.



GUO, Y.; SHI, S.; TANG, M.; LIANG, D.; XU, W.; WANG, L.; WANG, Z.; QIAO, Z. The suppressive effects of gx-50 on A $\beta$ -induced chemotactic migration of microglia. **Int Immunopharmacol.**, v. 19, n. 2, p. 283-9, 2014.

HALLENBECK, J.M.; DUTKA, A.J. Background review and current concepts of reperfusion injury. **Arch Neurol.**, v. 47, n. 11, p. 1245-54, 1990.

HAN, S.; LEMIRE, J.; APPANNA, V.P.; AUGER, C.; CASTONGUAY, Z.; APPANNA, V.D. How aluminum, an intracellular ROS generator promotes hepatic and neurological diseases: the metabolic tale. **Cell Biology and Toxicology**, v. 29, n. 2, p. 75–84, 2013.

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

HE, Q.; ZHOU, W.; XIONG, C.; TAN, G.; CHEN, M. Lycopene attenuates inflammation and apoptosis in post-myocardial infarction remodeling by inhibiting the nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway. **Mol Med Rep.**, v. 11, n. 1, p. 374-8, 2015.

HE, Y.; MA, X.; LI, D.; HAO, J. Thiamet G mediates neuroprotection in experimental stroke by modulating microglia/macrophage polarization and inhibiting NF- $\kappa$ B p65 signaling. **J Cereb Blood Flow Metab.**, 2016.

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

HODGES, H.; NELSON, A.; VIRLEY, D.; KERSHAW, T.R.; SINDEN, J.D. Cognitive deficits induced by global cerebral ischaemia: prospects for transplant therapy. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 56, n. 4, p. 763-780, 1997.

HOFMEIJER, J.; VAN PUTTEN, M.J. Ischemic cerebral damage: an appraisal of synaptic failure. **Stroke.**, v. 43, n. 2, p. 607-615, 2012.

HORNER, C.H.; DAVIES, H.A.; BROWN, J.; STEWART, M.G. Reduction in numerical synapse density in chick (*Gallus domesticus*) dorsal hippocampus following transient cerebral ischaemia. **Brain Res.**, v. 735, n. 2, p. 354-9, 1996.

HSIAO, G.; FONG, T.H.; TZU, N.H.; LIN, K.H.; CHOU, D.S.; SHEU, J.R. A potent antioxidant, lycopene, affords neuroprotection against microglia activation and focal cerebral ischemia in rats. **In Vivo.**, v. 18, n. 3, p. 351-356, 2004.

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

INTA, I.; PAXIAN, S.; MAEGELE, I.; et al. Bim and Noxa are candidates to mediate the deleterious effect of the NF- $\kappa$ B subunit RelA in cerebral ischemia. **J Neurosci.**, v. 26, p. 12896–12903, 2006.

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

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

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L.R.; ROSSATO, J.I.; BONINI, J.S.; MEDINA, J.H.; CAMMAROTA, M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends Neurosci.**, v. 29, n. 9, p. 496-505, 2006.

IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M.; DA SILVA, W.C.; BEVILAQUA, L.R.; ROSSATO, J.I.; BONINI, J.S.; MELLO, P.; BENETTI, F.; COSTA, J.C.; MEDINA, J.H. The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks. **An Acad Bras Cienc.**, v. 80, n. 1, p. 115-127, 2008.

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.

JI, X.; PENG, D.; ZHANG, Y.; ZHANG, J.; WANG, Y.; GAO, Y.; LU, N.; TANG, P. Astaxanthin improves cognitive performance in mice following mild traumatic brain injury. **Brain Res.**, v. 1659, p. 88-95, 2017.

JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, F.J.; MOLINA, J.A.; DE BUSTOS, F.; ORTÍ-PAREJA, M.; BENITO-LEÓN, J.; TALLÓN-BARRANCO, A.; GASALLA, T.; PORTA, J.; ARENAS, J. Serum levels of beta-carotene, alpha-carotene and vitamin A in patients with Alzheimer's disease. **Eur J Neurol.**, v. 6, n. 4, p. 495-497, 1999.

JIN, R.; YANG, G.; LI, G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. **J Leukoc Biol.**, v. 87, n. 5, p. 779-89, 2010.

JOHANSSON, B.B.; BELINCHENKO, P.V. Neuronal plasticity and dendritic spines: effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 22, p. 89–96, 2002.

JOURDAIN, P.; NIKONENKO, I.; ALBERI, S.; MULLER, D. Remodeling of hippocampal synaptic networks by a brief anoxia-hypoglycemia. **J Neurosci.**, v. 22, n. 8, p. 3108-16, 2002.

JUNG, M.W.; QIN, Y.; NAUGHTON, B.L.; BARNES, C.A. Firing characteristics of deep layer neurons in prefrontal cortex in rats performing spatial working memory tasks. **Cereb. Cortex**, v. 8, p. 437–450, 1998.

KALTSCHMIDT, C.; KALTSCHMIDT, B.; NEUMANN, H.; WEKERLE, H.; BAEUERLE, P.A. Constitutive NF-kappa B activity in neurons. **Mol Cell Biol.**, v. 14, n. 6, p. 3981-92, 1994.

KANDEL, E. R. The Biology of Memory: A Forty-Year Perspective. **J Neurosci**, v. 29, n. 41, p. 12748 -12756, 2009.

KANDEL, E.; ABEL, T. Neuropeptides, adenylyl cyclase, and memory storage. **Science.**, v. 268, n. 5212, p. 825-6, 1995.

KARELINA, K.; NORMAN, G.J.; ZHANG, N.; DEVRIES, A.C. Social contact influences histological and behavioral outcomes following cerebral ischemia. **Exp Neurol.**, v. 220, p. 276–282, 2009.

KARPPI, J.; LAUKKANEN, J.A.; SIVENIUS, J.; RONKAINEN, K.; KURL, S. Serum lycopene decreases the risk of stroke in men: a population-based follow-up study. **Neurology.**, v. 79, n. 15, p. 1540-1547, 2012.

KENT, T.A.; MANDAVA, P. Recanalization rates can be misleading. **Stroke**, v. 38, n.10, p. e103 -e104, 2007.

KHACHIK, F.; CARVALHO, L.; BERNSTEIN, P.S.; MUIR, G.J.; ZHAO, D.Y.; KATZ, N.B. Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. **Exp Biol Med (Maywood).**, v. 227, n. 10, p. 845-851, 2002.

KHALILI, M.; HAMZEH, F. Effects of active constituents of *Crocus sativus* L., crocin on streptozocin-induced model of sporadic Alzheimer's disease in male rats. **Iran Biomed J.**, v. 14, n. 1-2, p. 59-65, 2010.

KIKO, T.; NAKAGAWA, K.; TSUDUKI, T.; SUZUKI, T.; ARAI, H.; MIYAZAWA, T. Significance of lutein in red blood cells of Alzheimer's disease patients. **J Alzheimers Dis.**, v. 28, n. 3, p. 593-600, 2012.

KIM, H.Y.; VAUGHAN, D.K.; GHOSH, S. Pathways of cerebral calcium accumulation in a model of focal ischemia in rats. **Neurol Res.**, v. 20, n. 2, p. 169-77, 1998.

KLIPSTEIN-GROBUSCH, K.; LAUNER, L.J.; GELEIJNSE, J.M.; BOEING, H.; HOFMAN, A.; WITTEMAN, J.C. Serum carotenoids and atherosclerosis. The Rotterdam Study. **Atherosclerosis.**, v. 148, n .1, p. 49-56, 2000.

KOLESNICK, R.; GOLDE, D.W. The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. **Cell.**, v. 77, n. 3, p. 325-328, 1994.

KRINSKY, N.I. Carotenoids as antioxidants. **Nutrition**, v. 17, n. 10, p. 815-817, 2001.

KRIZ, J. Inflammation in ischemic brain injury: timing is important. **Crit Rev Neurobiol.**, v. 18, n. 1-2, 145-157, 2006.

KUHAD, A.; SETHI, R.; CHOPRA, K. Lycopene attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats. **Life Sci.**, v. 83, n. 3-4, p. 128-134, 2008.

KUMAR, P.; KALONIA, H.; KUMAR, A. Lycopene modulates nitric oxide pathways against 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity. **Life Sci.**, v. 85, n. 19-20, p. 711-718, 2009.

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

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

LAMBERTSEN, K.L.; BIBER, K.; FINSEN, B. Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 32, n. 9, p. 1677-98, 2012.

LAN, X.; ZHANG, M.; YANG, W.; ZHENG, Z.; WU, Y.; ZENG, Q.; LIU, S.; LIU, K.; LI, G. Effect of treadmill exercise on 5-HT, 5-HT1A receptor and brain derived neurotrophic factor in rats after permanent middle cerebral artery occlusion. **Neurol Sci.**, v. 35, n. 5, p. 761-6, 2014.

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

LEI, X.; LEI, L.; ZHANG, Z.; CHENG, Y. Neuroprotective effects of lycopene pretreatment on transient global cerebral ischemia-reperfusion in rats: The role of the Nrf2/HO-1 signaling pathway. **Mol Med Rep.**, v. 13, n. 1, p. 412-418, 2016.

LI, L.; LI, Y.; JI, X.; ZHANG, B.; WEI, H.; LUO, Y. The effects of retinoic acid on the expression of neurogranin after experimental cerebral ischemia. **Brain Res.**, v. 21, n. 1226, p.234-240, 2008.

LI, S.Y.; FUNG, F.K.; FU, Z.J.; WONG, D.; CHAN, H.H.; LO, A.C. Anti-inflammatory effects of lutein in retinal ischemic/hypoxic injury: in vivo and in vitro studies. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, v. 53, n. 10, p. 5976-84, 2012.

LI, Y.; ZHU, J.; LIU, Y.; CHEN, X.; LEI, S.; LI, L.; JIANG, B.; TAN, L.; YU, S.; ZHAO, Y. Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  Influences Injury Following Cerebral Ischemia/Reperfusion in Rats. **Int J Biol Sci.**, v. 12, n. 5, p. 518-31, 2016.

LI, Z.; PANG, L.; FANG, F.; ZHANG, G.; ZHANG, J.; XIE, M.; WANG, L. Resveratrol attenuates brain damage in a rat model of focal cerebral ischemia via up-regulation of hippocampal Bcl-2. **Brain Res.**, v. 1450, p. 116-24, 2012.

LIN, H.Y.; HUANG, B.R.; YEH, W.L.; LEE, C.H.; HUANG, S.S.; LAI, C.H.; LIN, H.; LU, D.Y. Antineuroinflammatory effects of lycopene via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase- $\alpha$ 1/heme oxygenase-1 pathways. **Neurobiol Aging.**, v. 35, n. 1, p. 191-202, 2014.

LIN, J.W.; CHEN, J.T.; HONG, C.Y.; LIN, Y.L.; WANG, K.T.; YAO, C.J.; LAI, G.M.; CHEN, R.M. Honokiol traverses the blood-brain barrier and induces apoptosis of neuroblastoma cells via an intrinsic bax-mitochondrion-cytochrome c-caspase protease pathway. **Neuro Oncol.**, v. 14, n. 3, p. 302-314, 2012.

LINDSBERG, P.J.; CASO, V. Desmoteplase After Ischemic Stroke in Patients With Occlusion or High-Grade Stenosis in Major Cerebral Arteries. **Stroke.**, v. 47, n.3, p. 901-903, 2016.

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

LIU, J.; JIANG, X.; ZHANG, Q.; LIN, S.; ZHU, J.; ZHANG, Y.; DU, J.; HU, X.; MENG, W.; ZHAO, Q. Neuroprotective effects of Kukoamine A against cerebral ischemia via antioxidant and inactivation of apoptosis pathway. **Neurochem Int.**, 2017.

LOTUFO, P.A. Mortalidade pela doença cerebrovascular no Brasil. **Rev Bras Hipertens**, v. 7, n. 4, p. 387-391, 2000.

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

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

LUO, F.; BURKE, K.; KANTOR, C.; MILLER, R.H.; YANG, Y. Cyclin-dependent kinase 5 mediates adult OPC maturation and myelin repair through modulation of Akt and GSK-3 $\beta$  signaling. **Neurosci.**, v. 34, n. 31, p. 10415-29, 2014.

MACMANUS, J.P.; LINNIK, M.D. Gene expression induced by cerebral ischemia: an apoptotic perspective. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 17, n. 8, p. 815-32, 1997.

MAROSI, M.; FUZIK, J.; NAGY, D.; RÁKOS, G.; KIS, Z.; VÉCSEI, L.; TOLDI, J.; RUBAN-MATUZANI, A.; TEICHBERG, V.I.; FARKAS, T. Oxaloacetate restores the long-term potentiation impaired in rat hippocampus CA1 region by 2-vessel occlusion. **Eur J Pharmacol.**, v. 604, n. 1-3, p. 51-57, 2009.

MATTSON, M.P.; CHAN, S.L.; DUAN, W. Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behavior. **Physiol Rev.**, v. 82, n. 3, p. 637-672, 2002.

MAUD, A. Memory loss after stroke. **Am. Acad. Neurol.**, v.24, n. 8, p. 67, 2006.

MCAULIFFE, J.J.; LOEPKE, A.W.; MILES, L.; JOSEPH, B.; HUGHES, E.; VORHEES, C.V. Desflurane, isoflurane, and sevoflurane provide limited neuroprotection against neonatal hypoxia-ischemia in a delayed preconditioning paradigm. **Anesthesiology.**, v. 111, n. 3, p. 533-46, 2009.

MELDRUM, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J Nutr.**, v.130, n. 4S Suppl, p. 1007S-10015S, 2000.

MEMEZAWA, H.; MINAMISAWA, H.; SMITH, M.L.; SIESJÖ, B.K. Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. **Exp Brain Res.**, v. 89, n. 1, p.67-78, 1992.

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

MILLER, N.J.; SAMPSON, J.; CANDEIAS, L.P.; BRAMLEY, P.M.; RICE-EVANS, C.A. Antioxidant activities of carotenoids and xanthophylls. **FEBS Lett.**, v. 384, n. 3, p. 240-242, 1996.

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

MURPHY, T.H.; CORBETT, D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. **Nat Rev Neurosci.**, v. 10, n. 12, p. 861-872, 2009.

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

NAZARI, M.; KESHAVARZ, S.; RAFATI, A.; NAMAVAR, M.R.; HAGHANI, M. Fingolimod (FTY720) improves hippocampal synaptic plasticity and memory deficit in rats following focal cerebral ischemia. **Brain Res Bull.**, v. 124, p. 95-102, 2016.

NELSON, A.; LEBESSI, A.; SOWINSKI, P.; HODGES, H. Comparison of effects of global cerebral ischaemia on spatial learning in the standard and radial water maze: relationship of hippocampal damage to performance. **Behav Brain Res.**, v. 85, n. 1, p. 93-115, 1997.

NETTO, C.A.; HODGES, H.; SINDEN, J.D.; LE PEILLET, E.; KERSHAW, T.; SOWINSKI, P.; MELDRUM, B.S.; GRAY, J.A. Effects of fetal hippocampal field grafts on ischaemic-induced deficits in spatial navigation in the water maze. **Neuroscience.**, v. 54, n.1, p. 69-92, 1993.

NIIZUMA, K.; YOSHIOKA, H.; CHEN, H.; KIM, S.G.; JUNG, J.E.; KATSU, M.; OKAMI, N.; CHAN, P.H. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia. **Biochim Biophys Acta**, v. 1802, p. 92-99, 2010.

NIKONENKO, A.G.; RADENOVIC, L.; ANDJUS, P.R.; SKIBO, G.G. Structural features of ischemic damage in the hippocampus. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 292, n. 12, p. 1914-1921, 2009.

NOLAN, J.M.; LOSKUTOVA, E.; HOWARD, A.; MULCAHY, R.; MORAN, R.; STACK, J.; BOLGER, M.; COEN, R.F.; DENNISON, J.; AKUFFO, K.O.; OWENS, N.; POWER, R.; THURNHAM, D.; BEATTY, S. The impact of supplemental macular carotenoids in Alzheimer's disease: a randomized clinical trial. **J Alzheimers Dis.**, v. 44, n.4, p. 1157-69, 2015.

NUNN, J.; HODGES, H. Cognitive deficits induced by global cerebral ischaemia: relationship to brain damage and reversal by transplants. **Behav Brain Res.**, v.65, n. 1, p.1-31, 1994.



NURMI, A.; LINDSBERG, P.J.; KOISTINAHO, M.; et al. Nuclear factor-kappaB contributes to infarction after permanent focal ischemia. **Stroke.**, v. 35, n. 4, p. 987-91, 2004.

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

OW, Y.P.; GREEN, D.R.; HAO, Z.; MAK, T.W. Cytochrome c: functions beyond respiration. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 9, n. 7, p. 532-542, 2008.

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

PETYAEV, I.M. Lycopene Deficiency in Ageing and Cardiovascular Disease. **Oxid Med Cell Longev.**, v. 2016, p.3218605, 2016. doi: 10.1155/2016/3218605.

PIRES, S. L.; GAGLIARDI, R. J.; GORZONI, M. L. Estudo das frequências dos principais fatores de risco para acidente vascular cerebral isquêmico em idosos. **Arq Neuropsiquiatria**, v. 62, n. (3-B), p. 844-851, 2004.

PITSIKAS, N.; ZISOPOULOU, S.; TARANTILIS, P.A.; KANAKIS, C.D.; POLISSIOU, M.G.; SAKELLARIDIS, N. Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L., crocins on recognition and spatial rats' memory. **Behav Brain Res.**, v. 183, n. 2, p. 141-146, 2007.

POOL-ZOBEL, B.L.; BUB, A.; MÜLLER, H.; WOLLOWSKI, I.; RECHKEMMER, G. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. **Carcinogenesis.**, v. 18, n. 9, p. 1847-1850, 1997.

PRAKASH, A.; KUMAR, A. Implicating the role of lycopene in restoration of mitochondrial enzymes and BDNF levels in  $\beta$ -amyloid induced Alzheimer's disease. **Eur J Pharmacol.**, v.741, p. 104-111, 2014.

PREMA, A.; JANAKIRAMAN, U.; MANIVASAGAM, T.; THENMOZHI, A.J. Neuroprotective effect of lycopene against MPTP induced experimental Parkinson's disease in mice. **Neurosci Lett.**, v. 599, p. 12-9, 2015.

PULSINELLI, W.A.; BRIERLEY, J.B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. **Stroke.**, v. 10, n. 3, p. 267-272, 1979.

PULSINELLI, W.A.; BRIERLEY, J.B.; PLUM, F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. **Ann Neurol.**, v.11, n. 5, p. 491-8, 1982.

RADAK, D.; KATSIKI, N.; RESANOVIC, I.; JOVANOVIC, A.; SUDAR-MILOVANOVIC, E.; ZAFIROVIC, S.; MOUSA, S.A.; ISENOVIC, E.R. Apoptosis and Acute Brain Ischemia in Ischemic Stroke. **Curr Vasc Pharmacol.**, 2016.

RADANOVIC, M. Características do atendimento de pacientes com Acidente Vascular Cerebral em hospital secundário. **Arq Neuropsiquiatr.**, v. 58, n. 1, p. 99-106, 2000.

RAFI, M.M.; YADAV, P.N.; REYES, M. Lycopene inhibits LPS-induced proinflammatory mediator inducible nitric oxide synthase in mouse macrophage cells. **J Food Sci.**, v. 72, n. 1, p. S069-74, 2007.

RAJAEI, Z.; HOSSEINI, M.; ALAEI, H. Effects of crocin on brain oxidative damage and aversive memory in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. **Arq Neuropsiquiatr.**, v. 74, n. 9, p. 723-729, 2016.

RAO, A.V.; ALI, A. Biologically active phytochemicals in human health: lycopene. **Int. J. Food Prop.**, v. 2, p. 279-288, 2007.

RENDEIRO, C.; GUERREIRO, J.D.; WILLIAMS, C.M.; SPENCER, J.P. Flavonoids as modulators of memory and learning: molecular interactions resulting in behavioural effects. **Proc Nutr Soc.**, v. 71, n. 2, p. 246-262, 2012.

RICCIONI, G.; MANCINI, B.; DI ILIO, E.; BUCCIARELLI, T.; D'ORAZIO, N. Protective effect of lycopene in cardiovascular disease. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.**, v. 12, n. 3, p. 183-90, 2008.

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

RIDDER, D.A.; SCHWANINGER, M. NF-kappaB signaling in cerebral ischemia. **Neuroscience.**, v. 158, n. 3, p. 995-1006, 2009.

ROCHA, M.S.; ALMEIDA, A.C.; ABATH NETO, O.; PORTO, M.P.; BRUCKI, S.M. Impact of stroke unit in a public hospital on length of hospitalization and rate of early mortality of ischemic stroke patients. **Arq Neuropsiquiatr.**, v. 71, n. 10, p. 774-779, 2013.

ROGER, V.L., *et al.* Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 123, n. 4, p. e18-e209, 2010.

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

SACHDEVA, A.K.; CHOPRA, K. Lycopene abrogates A $\beta$ (1-42)-mediated neuroinflammatory cascade in an experimental model of Alzheimer's disease. **J Nutr Biochem.**, v. 26, n. 7, p. 736-44, 2015.

SAIKUMAR, P.; DONG, Z.; PATEL, Y.; HALL, K.; HOPFER, U.; WEINBERG, J.M.; VENKATACHALAM, M.A. Role of hypoxia-induced Bax translocation and cytochrome c release in reoxygenation injury. **Oncogene.**, v.17, n. 26, p. 3401-3415, 1998.

SANDHIR, R.; MEHROTRA, A.; KAMBOJ, S.S. Lycopene prevents 3-nitropropionic acid-induced mitochondrial oxidative stress and dysfunctions in nervous system. **Neurochem Int.**, v. 57, n. 5, p. 579-587, 2010.

SASAKI, M.; OZAWA, Y.; KURIHARA, T.; KUBOTA, S.; YUKI, K.; NODA, K.; KOBAYASHI, S.; ISHIDA, S.; TSUBOTA, K. Neurodegenerative influence of oxidative stress in the retina of a murine model of diabetes. **Diabetologia.**, v. 53, n. 5, p. 971-9, 2010.

SATTLER, R.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. **Mol Neurobiol.**, v. 24, n. 1-3, p. 107-29, 2001.

SCHILLING, M.; BESSELMANN, M.; MÜLLER, M.; STRECKER, J.K.; RINGELSTEIN, E.B.; KIEFER, R. Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: an investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. **Exp Neurol.**, v. 196, n.2, p.290-297,2005.

SCHMIDT, S.D.; FURINI, C.R.; ZINN, C.G.; CAVALCANTE, L.E.; FERREIRA, F.F.; BEHLING, J.A.; MYSKIW, J.C.; IZQUIERDO, I. Modulation of the consolidation and reconsolidation of fear memory by three different serotonin receptors in hippocampus. **Neurobiol Learn Mem.**, 2016.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2016.12.017>

SHEN, H.; WANG, Y. Correlation of locomotor activity and brain infarction in rats with transient focal ischemia. **J Neurosci Methods.**, v. 186, n. 2, 150-154, 2010.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **Am J Clin Nutr.**, v. 62, n. 6 Suppl, p. 1315S-1321S, 1995.

SINCLAIR, L.I.; TAYLER, H.M.; LOVE, S. Synaptic protein levels altered in vascular dementia. **Neuropathol Appl Neurobiol.**, v. 41, n. 4, p. 533-543, 2015.

SMITH, M.I.; DESHMUKH, M. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis requires bax for commitment and Apaf-1 for execution in primary neurons. **Cell Death Differ.**, v. 14, n. 5, p. 1011-1019, 2007.

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

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

SPYCHALA, M.S.; HONARPISHEH, P.; MCCULLOUGH, L.D. Sex differences in neuroinflammation and neuroprotection in ischemic stroke. **J Neurosci Res.**, v. 95, p. 462-471, 2017.

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

SUN, B.; CHEN, L.; WEI, X.; XIANG, Y.; LIU, X.; ZHANG, X. The Akt/GSK-3 $\beta$  pathway mediates flurbiprofen-induced neuroprotection against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 409, n. 4, p. 808-13, 2011.

SZYDŁOWSKA, K.; TYMIANSKI, M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. **Cell Calcium.**, v. 47, n. 2, p. 122-129, 2010.

TAKEDA, A.; NYSSSEN, O.P.; SYED, A.; JANSEN, E.; BUENO-DE-MESQUITA, B.; GALLO, V. Vitamin A and carotenoids and the risk of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. **Neuroepidemiology.**, v. 42, n.1, p. 25-38, 2014.

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

TAMURA, M.; AOKI, Y.; SETO, T.; ITOH, Y.; UKAI, Y. Cerebroprotective action of a Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> channel blocker NS-7. II. Effect on the cerebral infarction, behavioral and cognitive impairments at the chronic stage of permanent middle cerebral artery occlusion in rats. **Brain Res.**, v. 890, n. 1, p. 170-6, 2001.

TAOUFIK, E.; PROBERT, L. Ischemic neuronal damage. **Curr Pharm Des.**, v. 14, n. 33, p. 3565-3573, 2008.

TERRONI, L.M., FRÁGUAS, R., LUCIA, M.D., TINONE, G., MATTOS, P., IOSIFESCU, D.V., SCAF, M. Importance of retardation and fatigue/interest domains for the diagnosis of major depressive episode after stroke: a four months prospective study. **Rev Bras Psiquiatr.**, v.31, n. 3, p. 202-207, 2009.

THIEL, A.; HEISS, W.D. Imaging of microglia activation in stroke. **Stroke.**, v. 42, n. 2, p. 507-12, 2011.

TONG, C.; PENG, C.; WANG, L.; ZHANG, L.; YANG, X.; XU, P.; LI, J.; DELPLANCKE, T.; ZHANG, H.; QI, H. Intravenous Administration of Lycopene, a Tomato Extract, Protects against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. **Nutrients.**, v. 8, n. 3, p.138, 2016.

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

UENO, Y.; CHOPP, M.; ZHANG, L.; BULLER, B.; LIU, Z.; LEHMAN, N.L.; LIU, X.S.; ZHANG, Y.; ROBERTS, C.; ZHANG, Z.G. Axonal outgrowth and dendritic plasticity in the cortical peri-infarct area after experimental stroke. **Stroke.**, v. 43, n. 8, p. 2221-8, 2012.

WALMSLEY, A.R.; MIR, A.K. Targeting the Nogo-A signalling pathway to promote recovery following acute CNS injury. **Curr Pharm Des.**, v.13, n. 24, p. 2470-84, 2007.

WANG, H.Q.; SUN, X.B.; XU, Y.X.; ZHAO, H.; ZHU, Q.Y.; ZHU, C.Q. Astaxanthin upregulates heme oxygenase-1 expression through ERK1/2 pathway and its protective

effect against beta-amyloid-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells. **Brain Res.**, v. 1360, p. 159-167, 2010.

WANG, Z.; FAN, J.; WANG, J.; LI, Y.; XIAO, L.; DUAN, D.; WANG, Q. Protective effect of lycopene on high-fat diet-induced cognitive impairment in rats. **Neurosci Lett.**, v. 627, p.185-191, 2016.

WANG, Z.K.; XUE, L.; WANG, T.; WANG, X.J.; SU, Z.Q. Infiltration of invariant natural killer T cells occur and accelerate brain infarction in permanent ischemic stroke in mice. **Neurosci Lett.**, v. 633, p. 62-68, 2016.

WARNER, D.S.; SHENG, H.; BATINIĆ-HABERLE, I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. **J Exp Biol.**, v. 207, n. Pt 18, p. 3221-3231, 2004.

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

WEN, X.; HUANG, A.; HU, J.; ZHONG, Z.; LIU, Y.; LI, Z.; PAN, X.; LIU, Z. Neuroprotective effect of astaxanthin against glutamate-induced cytotoxicity in HT22 cells: Involvement of the Akt/GSK-3 $\beta$  pathway. **Neuroscience.**, v. 303, p .558-68, 2015.

WHO (World Health Organization). Neurological disorders. Disponível em: [http://www.who.int/mental\\_health/neurology/neurological\\_disorders\\_report\\_web.pdf](http://www.who.int/mental_health/neurology/neurological_disorders_report_web.pdf). Acesso em: 28 de maio de 2016

WILLING, S.J.; SKIDMORE, F.; DONALDSON, J.; NOBO, U.L.; CHERNUKHA, K. Treatment of acute intracranial vertebrobasilar dissection with angioplasty and stent placement: report of two cases. **AJNR Am J Neuroradiol.**, v. 24, n. 5, p. 985-9, 2003.

WIN-SHWE, T.T.; FUJIMAKI, H. Nanoparticles and neurotoxicity. **Int J Mol Sci.**, v. 2, n. 9, p. 6267-6280, 2011.

WINTERS, B.D.; SAKSIDA, L.M.; BUSSEY, T.J. Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 32, n. 5, p. 1055-70, 2008.

WU, A.; LIU, R.; DAI, W.; JIE, Y.; YU, G.; FAN, X.; HUANG, Q. Lycopene attenuates early brain injury and inflammation following subarachnoid hemorrhage in rats. **Int J Clin Exp Med.**, v. 8, n. 8, p. 14316-22, 2015.

WU, T.C.; GROTTA, J.C. Hypothermia for acute ischaemic stroke. **Lancet Neurol.**, v. 12, n. 3, p. 275-284, 2013.

XIE, M.; YI, C.; LUO, X.; XU, S.; YU, Z.; TANG, Y.; ZHU, W.; DU, Y.; JIA, L.; ZHANG, Q.; DONG, Q.; ZHU, W.; ZHANG, X.; BU, B.; WANG, W. Glial gap junctional communication involvement in hippocampal damage after middle cerebral artery occlusion. **Ann Neurol.**, v. 70, n. 1, p. 121-132, 2011.

XU, M.; YANG, L.; HONG, L.Z.; ZHAO, X.Y.; ZHANG, H.L. Direct protection of neurons and astrocytes by matrine via inhibition of the NF- $\kappa$ B signaling pathway contributes to neuroprotection against focal cerebral ischemia. **Brain Research**, v. 1454, p. 48-64, 2012.

YEH, H.J.; HUANG, N.; CHOU, Y.J.; CHENG, S.P.; LEE, W.K.; LAI, C.C.; CHENG, C.C. Older Age, Low Socioeconomic Status, and Multiple Comorbidities Lower the Probability of Receiving Inpatient Rehabilitation Half a Year After Stroke. **Arch Phys Med Rehabil.**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apmr.2016.08.468>

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, n. 10, 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, L.; ZHANG, X.; ZHANG, C.; et al. Nobiletin promotes antioxidant and anti-inflammatory responses and elicits protection against ischemic stroke in vivo. **Brain Res.**, v. 1636, p. 130-41, 2016.

ZHANG, X.S.; ZHANG, X.; WU, Q.; LI, W.; ZHANG, Q.R.; WANG, C.X.; ZHOU, X.M.; LI, H.; SHI, J.X.; ZHOU, M.L. Astaxanthin alleviates early brain injury following subarachnoid hemorrhage in rats: possible involvement of Akt/bad signaling. **Mar Drugs.**, v. 12, n. 8, p. 4291-4310, 2014.

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

ZHOU, X.Q.; ZENG, X.N.; KONG, H.; SUN, X.L. Neuroprotective effects of berberine on stroke models in vitro and in vivo. **Neurosci Lett.**, v. 447, n. 1, p. 31-36, 2008.

ZHOU, Y.; HUANG, J.; HE, W.; FAN, W.; FANG, W.; HE, G.; WU, Q.; CHU, S.; LI, Y. N2 ameliorates neural injury during experimental ischemic stroke via the regulation of thromboxane A2 production. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 124, p. 458-465, 2014.

ZOLA-MORGAN, S.; SQUIRE, L.R.; AMARAL, D.G. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. **J Neurosci.**, v. 6, n. 10, p. 2950-2967, 1986.