



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

FRANCISCA TACIANA SOUSA RODRIGUES

**ESTUDO DO EFEITO COMPORTAMENTAL E NEUROPROTETOR DA
ERYTHRINA VELUTINA NA ISQUEMIA CEREBRAL AGUDA EM
CAMUNDONGOS**

FORTALEZA

2013

FRANCISCA TACIANA SOUSA RODRIGUES

**ESTUDO DO EFEITO COMPORTAMENTAL E NEUROPROTETOR DA
ERYTHRINA VELUTINA NA ISQUEMIA CEREBRAL AGUDA EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos

FORTALEZA

2013

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

R613e Rodrigues, Francisca Taciana Sousa.
 Estudo do efeito comportamental e neuroprotetor da *Erythrina velutina* na isquemia cerebral aguda em camundongos/ Francisca Taciana Sousa Rodrigues. – 2013.
 103 f. : il.

 Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2013.
 Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos.

 1. Erythrina. 2. Isquemia Encefálica. 3. Atividade Motora. 4. Memória. 5. Aminoácidos. I. Título.

CDD 615.1

FRANCISCA TACIANA SOUSA RODRIGUES

**ESTUDO DO EFEITO COMPORTAMENTAL E NEUROPROTETOR DA
ERYTHRINA VELUTINA NA ISQUEMIA CEREBRAL AGUDA EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Otoni Cardoso do Vale (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Adriana Rolim Campos Barros
Universidade de Fortaleza

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre investiram no meu conhecimento me deram força e me proporcionaram a maior herança, a sabedoria.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser minha base forte, meu consolo, meu abrigo. Tudo devo àquele que morreu para me dar a vida.

À minha mãe, fonte inspiradora de fé. Àquela que é conselheira, amiga, confidente que esteve comigo em todos momentos, e me ensinou a correr atrás dos sonhos.

Ao meu pai, que sempre investiu e acreditou no meu potencial, torce muito por mim e vibra com as minhas conquistas.

Aos meus irmãos Tacielle, Allany e Samuel pelos momentos compartilhados de alegrias e “discussões” que nos fazem amadurecer e tornam nossa convivência fraternal.

Ao meu amor, melhor amigo, companheiro e marido Rafael, por estar sempre ao meu lado, dispensando seu amor, carinho e compreensão. Mostrou-me de forma simples o que é o verdadeiro amor.

À minha professora e orientadora Silvânia Vasconcelos, que em anos de convivência me fez perceber que a sabedoria e a simplicidade caminham juntas. Agradeço pelas conversas, orientações, ensinamentos e mais do que isso pela amizade. Meu muito obrigada!

As minhas amigas da iniciação científica Anália, Caren, Naiara, Susy e Germana pela convivência diária, pelos momentos de descontração e mais pela ajuda no trabalho árduo, sem o apoio de vocês esse trabalho teria sido ainda mais difícil.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Eliane, Sarah, Eduardo, Dayane, Rafael, Edna, Rita Neuma e Clayton pela amizade sincera e pelos momentos de troca de conhecimentos não só científicos, mas para vida.

Às minhas amigadas conquistadas através do mestrado Vlândia, Patricia Xavier e Marilia pelos momentos de descontração, pelas conversas despretensiosas e pela cumplicidade. Agradeço a Deus pela oportunidade de ter conhecido cada uma.

À professora Luzia Kalyne por ter contribuído de forma direta para execução desse trabalho e por ter aceitado participar da banca examinadora do mesmo.

Ao professor Otoni Cardoso por ter aceitado ser co-orientador desse trabalho, contribuindo com seu vasto conhecimento, e por participar da banca examinadora do mesmo.

À professora Adriana Rolim por aceitar participar da banca examinadora desse trabalho.

À amiga e doutora Márcia Calheiros pelos momentos de companheirismo e aprendizagem tão importantes para caminhada acadêmica e por aceitar participar como suplente da banca examinadora desse trabalho.

À professora Danielle Mâcedo pela disponibilidade e transferência de conhecimentos.

Aos demais professores da Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará que tive a oportunidade de conhecer e absorver o conhecimento repassado.

Aos técnicos do Laboratório de Neurofarmacologia: Vilani, Arnaldo e Lena, pela ajuda dada nos experimentos.

Às secretárias da Pós-graduação: Dona Áurea e Márcia pela dedicação destinada a esta instituição e assim, sempre facilitando a vida dos alunos do Departamento de Pós-graduação em Farmacologia da UFC.

A FUNCAP pelo apoio financeiro para a execução deste trabalho.

Àqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho encerramento de mais um ciclo em minha vida.

Meu muito Obrigada!

Há nela, com efeito, um espírito inteligente, santo, único, múltiplo, sutil, móvel, penetrante, puro, claro, inofensivo, inclinado ao bem, agudo, livre, benéfico, benévolo, estável, seguro, livre de inquietação, que pode tudo, que cuida de tudo, que penetra em todos os espíritos, os inteligentes, os puros, os mais sutis. Mais ágil que todo o movimento é a Sabedoria, ela atravessa e penetra tudo, graças à sua pureza.

(...) *Salmos*.

RESUMO

O estudo mostrou os efeitos do extrato padronizado de *Erythrina velutina* (EPEV), na atividade motora, na memória e nas concentrações de aminoácidos cerebrais de camundongos submetidos à isquemia cerebral global (ISQ). Os animais (camundongos *swiss*, machos, 30-35g) foram submetidos à isquemia cerebral transitória pela oclusão de ambas as artérias carótidas durante 30 minutos e tratados durante 5 dias com EPEV 200 ou 400 mg/kg e Memantina (MEM), controle positivo, 10mg/kg, 2 ou 24 h após a isquemia. O mesmo procedimento foi feito no grupo Falso-operado + DMSO (FO) com exceção do clampeamento das artérias carótidas. No 6º dia após a indução da isquemia, os animais foram submetidos aos testes de atividade locomotora, *rota rod* e memória (*step down*, *Y-maze* e reconhecimento de objetos), a seguir foram sacrificados e as áreas cerebrais dissecadas como (córtex pré-frontal – CPF; hipocampo- HC e corpo estriado- CE) para determinação das concentrações de aspartato (ASP), glutamato (GLU), glicina (GLI), taurina (TAU) e ácido gama-amino-butyrico (GABA). Nenhuma alteração na atividade exploratória vertical foi detectada entre os grupos FO e ISQ tratados com os diluentes, bem como entre os grupos tratados com EPEV ou MEM. Porém, um aumento na atividade exploratória horizontal (*rearing*) foi observado no grupo EPEV 200mg 2H quando comparado com o grupo ISQ. No teste de *rota rod* nenhuma alteração significativa foi detectada entre os grupos. No teste de memória *step down* a ISQ afetou os processos de aquisição e retenção de memória tanto na fase imediata (memória recente - MR), quanto na fase de consolidação (memória tardia - MT) quando comparado ao grupo FO. Comparando os tratamentos de EPEV 200 ou 400 mg/kg observamos um aumento significativo, no tempo de permanência na plataforma, nos animais tratados após a isquemia quando avaliados na MR e na MT. No teste *Y-maze* a ISQ promoveu um dano na retenção da memória dos animais em relação ao grupo controle (FO), porém o EPEV e a MEM conseguiram reverter esse dano em ambas as doses. Os animais submetidos a ISQ mostraram déficit na memória também no teste de reconhecimento de objetos. Esse déficit foi revertido pelo grupo EPEV 400mg (2 ou 24H) e por MEM. A dosagem de aminoácidos após o teste de comportamento no CPF, HC e CE apresentou aumento nas concentrações dos aminoácidos excitatórios (ASP, GLU) nos animais ISQ +DMSO quando comparados ao FO. No CPF esse aumento pode ser revertido pelos animais tratados com EPEV 24H em ambas as doses e MEM 24H. Já no HC esse aumento foi revertido por todos os grupos tratados. No CE houve redução das concentrações de GLU nos grupos EPEV 200mg (2 ou 24H) e MEM 2H. A respeito das concentrações de GABA, GLI e TAU, no CPF, houve reversão dos valores nos grupos EPEV 200mg 2H e no grupo 400mg em ambos os horários de tratamento como também no grupo MEM 24H quando comparados ao controle isquemiado. No HC um aumento nas concentrações de GLI e TAU pode ser visto nos grupos EPEV 200mg 24H, EPEV 400mg 2H e MEM 24H. Já as concentrações de GABA foram revertidas nos grupos EPEV 400mg e MEM no tempo de 24H. O CE apresentou concentrações elevadas de TAU e GABA nos animais ISQ quando comparados com o controle. O valor de GABA só foi revertido pelo grupo EPEV 200mg 2H. Diante do exposto, concluímos que o EPEV em ambas as doses desenvolveu uma ação neuroprotetora, possivelmente pela redução das concentrações de aminoácidos excitatórios e aumento dos inibitórios após a isquemia. Possibilitando, assim, a perspectiva de um uso futuro do EPEV em doenças isquêmicas no Sistema Nervoso Central.

Palavras-chave: Erythrina. Isquemia Encefálica. Atividade Motora. Memória. Aminoácidos.

ABSTRACT

The study shows the effects of standardized extract of *Erythrina velutina* (EPEV) in motor activity, in memory and in the determination of amino acids in mice brain undergoing global cerebral ischemia (ISQ). Animals (swiss mice, males, 30-35 g) were subjected to transient cerebral ischemia by occlusion of both carotid arteries during 30 minutes and treated for 5 days with EPEV 200 or 400 mg/kg and Memantine (MEM) 10 mg/kg, 2 or 24 hours after ischemia. The same procedure was done in false-operated group + DMSO (FO) with the exception of clamping the carotid arteries. On day 6 after induction of ischemia, the animals were subjected to tests of locomotor activity, rota rod and memory (step down, Y-maze and object recognition), then were sacrificed and dissected brains on ice the prefrontal cortex (PFC), Hippocampus (HC) and striatum (ST) determination of aspartic acid (ASP), glutamate (GLU), glycine (GLY), taurine (TAU) and gamma-amino-butirico acid (GABA). No change in exploratory activity was detected between the groups vertical FO and ISQ treated with solvents, as well as between the groups treated with EPEV or MEM, however, an increase in exploration activity across (rearing) was observed on EPEV 200 mg 2H group when compared to the ISQ. In rota rod test no substantial modification has been detected between the groups FO and ISQ treated with DMSO and in the groups treated with EPEV and MEM. Memory test step down the ISQ has affected the processes of acquisition and retention of memory both in the immediate phase (recent memory-RM), and the consolidation phase (late memory-LM) when compared with the group FO. Comparing the treatments we observed a significant increase in the length of stay in the non-electrified platform, in the animals treated after ischemia when evaluated in RM, and in LM. Y-maze test the ISQ promoted a retention damage in memory of animals compared to the control group (FO), however the EPEV and MEM managed to revert the damage on the acquisition of memory induced by ISQ at both doses. Animals subjected to ISQ showed deficit in memory also in object recognition test, this deficit was reversed by EPEV 400 mg 2 or 24 H group and by MEM 10 mg. The dosage of amino acids after testing behavior on PFC, HC and ST presented an increase in concentration of excitatory amino acids (ASP, GLU) in animals ISQ + DMSO when compared to FO. In the CPF that increase can be reversed by the animals treated with EPEV 24H at both doses and MEM 10 mg 24H in HC this increase was reversed by all treated groups. In CE there was a reduction in levels of GLU on EPEV 200 mg 2 or 24H and MEM 10 mg 2H. Regarding the levels of GABA, GLY and TAU in the CPF, there was reversal of values in the Group EPEV 200 mg 2H and 400 mg in both treatment schedules as well as group MEM 10 mg 24H when compared to the control that suffered ischemia. In the HC an increase in levels of GLY and TAU can be seen in EPEV 200 mg 24H, EPEV 400 mg 2H and MEM 10 mg 24H groups. GABA levels were already reverted on EPEV 400 mg and MEM 10 mg groups at the time of 24H. The ST presented high levels of TAU and GABA in the ISQ animals when compared with the control. The value of GABA was only reversed by EPEV 200 mg 2H group. With this, we concluded that the EPEV at both doses developed a neuroprotective action, possibly by reducing the levels of excitatory amino acids and inhibitory increase after ischemia.

Key-words: *Erythrina*. Brain Ischemia. Motor Activity. Memory. Amino Acids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema demonstrativo das artérias cerebrais anteriores e posteriores, artérias comunicantes anteriores e posteriores e carótida interna que formam o polígono de Willis ...	24
Figura 2: Modelo estrutural de cascata isquêmica	27
Figura 3: <i>Erythrina velutina</i> Willd (Fabaceae)	36
Figura 4: Teste de Campo Aberto	44
Figura 5: Teste de <i>Rota Rod</i>	45
Figura 6: Teste de Esquiva inibitória	46
Figura 7: Teste de Labirinto em Y	47
Figura 8: Teste de reconhecimento de objetos	48
Figura 9: Efeito da administração dos diluentes Salina ou DMSO no número de <i>crossings</i> (teste de campo aberto) de camundongos submetidos à isquemia global transitória por oclusão bilateral das carótidas por 30 min.....	52
Figura 10: Efeito da administração dos diluentes Salina ou DMSO no número de <i>rearing</i> (teste de campo aberto) de camundongos submetidos à isquemia global transitória por oclusão bilateral das carótidas por 30 min.....	53
Figura 11: Efeito do tratamento com EPEV (200 ou 400mg) ou Memantina (10mg) no número de <i>crossings</i> (teste de campo aberto) de camundongos submetidos à isquemia global transitória por oclusão bilateral das carótidas por 30 min	55
Figura 12: Efeito do tratamento com EPEV (200 ou 400mg) ou Memantina (10mg) no número de <i>rearing</i> (teste de campo aberto) de camundongos submetidos à isquemia global transitória por oclusão bilateral das carótidas por 30 min	56

Figura 13: Efeito do tratamento com EPEV (200 ou 400mg) ou Memantina (10mg) no tempo de latência do animal na barra de <i>Rota Rod</i> , submetidos à isquemia global transitória por oclusão bilateral das carótidas por 30 min	58
Figura 14: Efeito do tratamento com diluentes Salina ou DMSO na aquisição de memória recente (teste de <i>step down</i>) de camundongos submetidos à isquemia global transitória por oclusão bilateral das carótidas por 30 min	60
Figura 15: Efeito do tratamento com diluentes Salina ou DMSO na aquisição de memória tardia (teste de <i>step down</i>) de camundongos submetidos à isquemia global transitória por oclusão bilateral das carótidas por 30 min	61
Figura 16: Efeito do tratamento com EPEV (200 ou 400mg) ou Memantina (10mg) na aquisição de memória recente (teste de <i>step down</i>) de camundongos submetidos à isquemia global transitória por oclusão bilateral das carótidas por 30 min	62
Figura 17 Efeito do tratamento com EPEV (200 ou 400mg) ou Memantina (10mg) na aquisição de memória tardia (teste de <i>step down</i>) de camundongos submetidos à isquemia global transitória por oclusão bilateral das carótidas por 30 min	63
Figura 18: Efeito do tratamento com EPEV (200 ou 400mg) ou Memantina (10mg) na memória operacional (teste de <i>Y maze</i>) de camundongos submetidos à isquemia global transitória por oclusão bilateral das carótidas por 30 min	65
Figura 19: Efeito do tratamento com EPEV (200 ou 400mg) ou Memantina (10mg) na memória operacional (teste de reconhecimento de objetos) de camundongos submetidos à isquemia global transitória por oclusão bilateral das carótidas por 30 min.....	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Modelos animais de isquemia cerebral para o estudo da fisiopatologia e terapia do AVC.....	21
Quadro 2: Tipos de memória	31
Quadro 3: Grupos de tratamento.....	43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Efeito do EPEV (200 ou 400mg) sobre a ação de aminoácidos excitatórios no córtex pré-frontal de camundongos submetidos à isquemia global transitória 69
- Tabela 2:** Efeito do EPEV (200 ou 400mg) sobre a ação de aminoácidos inibitórios no córtex pré-frontal de camundongos submetidos à isquemia global transitória 70
- Tabela 3:** Efeito do EPEV (200 ou 400mg) sobre a ação de aminoácidos excitatórios no hipocampo de camundongos submetidos à isquemia global transitória 72
- Tabela 4:** Efeito do EPEV (200 ou 400mg) sobre a ação de aminoácidos inibitórios no hipocampo de camundongos submetidos à isquemia global transitória..... 73
- Tabela 5:** Efeito do EPEV (200 ou 400mg) sobre a ação de aminoácidos excitatórios no corpo estriado de camundongos submetidos à isquemia global transitória..... 75
- Tabela 6:** Efeito do EPEV (200 ou 400mg) sobre a ação de aminoácidos inibitórios no corpo estriado de camundongos submetidos à isquemia global transitória..... 76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

± - Mais ou menos

% - Percentagem

°C - Grau (s) Centígrado (s)

α - Alfa

®- Marca Registrada

μL – Microlitro

μg - Micrograma

μg/g - Micrograma/grama

μm - Micromol/grama

μM - Micromolar

4VO - oclusão de quatro vasos

2VO - oclusão dos dois vasos

ACC - artéria carótida comum

ADP - adenosina difosfato

ALE - Atividade Locomotora

AMP - adenosina monofosfato

ANOVA - Análise de Variância

ASP - Aspartato

ATP - Adenosina Trifosfato

AVC - Acidente Vascular Cerebral

AVCi - AVC isquêmico

AMPA – ácido α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4- isoxazole-propionico

Ca⁺⁺ – íon cálcio

CE – corpo estriado

CEPA – Comitê de Ética em Pesquisa Animal

Cl⁻ - íon cloreto

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CM - Córtex motor

CPF – córtex pré-frontal

DAD – Detector de arranjo de diiodo

EAG - equivalente de ácido gálico

EI - esquiiva inibitória
EPEV- extrato padronizado de *Erythrina velutina*
EPM - erro padrão da média
et al - ... e colaborador
FO - falso operado
FSC - fluxo sanguíneo cerebral
g – grama
GABA – ácido γ -aminobutírico
GLI - Glicina
GluR2 – Subunidade do receptor de glutamato
GLU- Glutamato
i.p – via intraperitoneal
ISQ – Isquemiado
h – hora
HC – hipocampo
HClO₄ - ácido perclórico
HPLC – Cromatografia líquida de alta performance
K⁺ - potássio
Kg – quilograma
MEM - Memantina
mL/kg - Mililitros/quilograma
mg/kg - Miligrama/quilograma
mm - Milímetro
mmol/L - Milimol/litro
mM - Milimol
mL - Mililitros
n^o – número
nm – nanômetro
nM – nanomolar
NMDA – N-metil-D-aspartato
P - Nível de Significância
RO - Reconhecimento de Objetos
Rpm - rotações por minuto
SAL - salina

SNC – Sistema Nervoso Central

tPA - ativador plasminogênio tecidual

TAU- Taurina

UFC - Universidade Federal do Ceará

v.o. – via oral

ZSV - zona subventricular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Acidente Vascular Cerebral (AVC)	18
1.1.1	Tipos de AVC definição e classificação	19
1.1.2	Características fisiopatológicas do AVC isquêmico	19
1.2	Modelos experimentais de Isquemia Cerebral <i>in vivo</i>	20
1.2.1	Isquemia Cerebral Focal e o conceito de núcleo e penumbra	22
1.2.2	Isquemia Cerebral Global Transitória	23
1.2.3	Áreas cerebrais e isquemia	25
1.3	Mecanismos envolvidos no dano neuronal induzido por isquemia e reperfusão....	27
1.3.1	Redução dos níveis de oxigênio e ATP.....	27
1.3.2	Cálcio e aminoácidos envolvidos no processo isquêmico	28
1.4	Memória	31
1.5	Farmacoterapia.....	33
1.6	Gênero <i>Erythrina</i>	35
1.6.1	Aspectos gerais da <i>Erythrina</i>	35
1.6.2	Aspectos farmacológicos da <i>Erythrina</i>	37
1.6.3	Efeitos farmacológicos da <i>Erythrina velutina</i> no Sistema Nervoso Central	38
2	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	39
3	OBJETIVOS	40
3.1	Objetivo Geral	40
3.2	Objetivos Específicos.....	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	Animais	41
4.2	Produção e padronização do extrato de <i>Erythrina velutina</i>	41
4.3	Drogas utilizadas nos tratamentos	42
4.4	Isquemia cerebral transitória por oclusão bilateral das carótidas (Ulrich, 1998)..	42
4.5	Protocolo experimental	43
4.6	Testes Comportamentais.....	44
4.6.1	Teste de atividade locomotora (<i>open field</i> – campo aberto).....	44
4.6.2	<i>Rota Rod</i>	45
4.7	Testes de Memória.....	45
4.7.1	Esquiva Inibitória teste do tipo <i>step-down</i>	45

4.7.2	Teste labirinto em Y (<i>Y-maze</i>)	47
4.7.3	Teste de reconhecimento de Objetos.....	48
4.8	Testes Neuroquímicos.....	49
4.8.1	Dosagem dos aminoácidos	49
4.9	Análise estatística.....	50
5	RESULTADOS	51
5.1	Testes Comportamentais.....	51
5.1.1	Efeito da administração dos diluentes Salina ou DMSO em camundongos submetidos à isquemia global transitória no Teste da Atividade Locomotora (Campo Aberto).....	51
5.1.2	Efeito do EPEV (200 ou 400mg) sobre atividade locomotora de camundongos submetidos à isquemia global transitória: Teste de Campo Aberto.....	54
5.1.3	Efeito do EPEV (200 ou 400mg) em camundongos submetidos à isquemia global transitória no Teste de <i>Rota Rod</i>	57
5.2	Testes de Memória.....	59
5.2.1	Efeito do EPEV (200 ou 400mg) em camundongos submetidos à isquemia global transitória no Teste de esquivas inibitória (<i>Step down</i>).....	59
5.2.2	Efeito do EPVE (200 ou 400mg) em camundongos submetidos à isquemia global transitória no Teste de labirinto em Y.....	64
5.2.3	Efeito do EPEV (200 ou 400mg) em camundongos submetidos à isquemia global transitória no Teste de reconhecimento de objetos	66
5.3	Dosagens de Aminoácidos.....	68
5.3.1	Determinação das concentrações de aminoácidos no córtex pré-frontal (PF).....	68
5.3.2	Determinação das concentrações de aminoácidos no hipocampo.....	71
5.3.3	Determinação das concentrações de aminoácidos no corpo estriado	74
6	DISCUSSÃO	77
7	CONCLUSÃO.....	86
	REFERÊNCIAS	87
	ANEXO.....	103

1 INTRODUÇÃO

1.1 Acidente Vascular Cerebral (AVC)

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde o Acidente Vascular Cerebral (AVC), representa a terceira causa de morte no mundo, depois de doenças coronarianas e câncer (WHO, 2010).

Nos Estados Unidos, o AVC representa a principal causa de incapacidade, datando nesse país 500.000 casos novos e 200.000 casos recorrentes a cada ano, sendo que 25% morrem no momento do evento ou logo depois (TONER, 2005). Em 2008, a incidência de AVC passou para 780.000 casos (ROSAMOND, 2008). Neste mesmo ano, os custos diretos ou indiretos com o AVC atingiram a marca de 65,5 bilhões de dólares (AHA, 2008). O AVC tem uma maior prevalência após a 7ª década de vida, contudo pode ocorrer em todas as faixas etárias, apesar de ser bem menos frequente na infância e na adolescência.

No Brasil a incidência de casos de AVC tem crescido, consideravelmente, apresentando profundas repercussões para a saúde pública, pois, atualmente, é a segunda causa de mortalidade no Brasil e a primeira incapacitante em adultos (CURONI *et al.*, 2009). Dados epidemiológicos revelam que três quartos dos casos de AVC acometem pessoas acima de 65 anos (CDC, 2012). As taxas de mortalidade relacionadas à doença cerebrovascular no Brasil são as mais altas da América Latina, tanto para homens como para mulheres, devido a fatores que ainda não estão bem elucidados. Uma possível causa descrita pode estar relacionada ao maior peso corporal entre as pessoas que vivem em áreas de exclusão social (LOTUFO, 2005).

Em 2003, no Nordeste brasileiro, a taxa de mortalidade pelo acidente vascular cerebral foi de 54,6/100 mil habitantes (CURONI *et al.*, 2009). No Ceará, em 2004, essa taxa foi de 44,8/100 mil habitantes (SESA, 2004). No município de Fortaleza, nesse mesmo ano, as doenças do aparelho circulatório corresponderam a 25,4% do total de internações, realizadas no Sistema Único de Saúde, em indivíduos acima de 65 anos (BRASIL, 2004).

Considerando o exposto acredita-se que a tendência elevada de hospitalizações por AVC gera expressivo aumento dos custos com as internações hospitalares, as quais requerem tratamentos especializados e complexos.

1.1.1 Tipos de AVC definição e classificação

O AVC é definido como uma síndrome que consiste no desenvolvimento rápido de distúrbios clínicos focais da função cerebral, global no caso do coma, que duram mais de 24 horas ou conduzem à morte sem outra causa aparente que não a de origem vascular (NICE, 2012). É causado pela redução do suprimento sanguíneo, resultando no decréscimo da tensão de oxigênio e nos metabólitos de alta energia em uma área do cérebro, como por exemplo, adenosina trifosfato (ATP) e glicose.

O AVC é classificado em dois grandes grupos: AVC isquêmico (AVCi) e o AVC hemorrágico, este consiste em sangramento no parênquima cerebral ou espaço subaracnóide. O mais frequente, com cerca de 85% dos casos é o AVCi, que se caracteriza pela interrupção do fluxo sanguíneo (obstrução arterial por trombos ou êmbolos) em uma determinada área do encéfalo (CRAMER *et al.*, 2000).

No Brasil, o AVCi representa na população nacional, segundo diferentes estatísticas, entre 53% a 85% dos casos de AVC (PIRES; GAGLIARDI; GORZONI, 2004). Os principais fatores de riscos para a ocorrência dos AVCs são: hipertensão arterial, diabetes mellitus, doenças cardíacas, obesidade, sedentarismo e tabagismo (CRAMER *et al.*, 2000).

1.1.2 Características fisiopatológicas do AVC isquêmico.

A redução do fluxo sanguíneo pode ser desencadeada através da oclusão de vasos cérvico-cranianos ou por hipoperfusão para o cérebro, causado por vários processos: arterotrombose, embolia ou anormalidades hemodinâmicas (KAPOSA *et al.*, 1999).

Embora os processos bioquímicos do sofrimento isquêmico cerebral sejam uniformes, há uma série de diferentes causas de AVC isquêmico, incluindo:

- lesões estenóticas ateroscleróticas e aterotrombóticas das artérias cervicais extracranianas e das grandes artérias cerebrais da base do crânio, causando uma hipoperfusão crítica distal às estenoses graves;
- embolismo de ponto de partida arterial de lesões aterotrombóticas causando oclusão de vasos intracranianos;
- embolismo sistêmico (fontes cardíacas como próteses valvulares, fibrilação auricular, trombos cardíacos, cardiomiopatia dilatada, enfarte do miocárdio recente ou *shunts* intracardíacos) (HACKE *et al.*, 2003)

Todas as causas acima citadas culminam na oclusão vascular localizada, levando à interrupção do fornecimento de oxigênio e glicose ao tecido cerebral, afetando subsequentemente processos metabólicos do território envolvido. Contudo, o SNC pode sofrer lesões isquêmicas globais e focais, e para ambas as situações existem modelos experimentais (COLLI; NUNES; CARLOTTI, 1998), sendo a isquemia global encontrada durante situações de parada cardíaca e a isquemia focal durante falência do suprimento sanguíneo a uma parte restrita do cérebro.

Os déficits neurológicos maiores (graves) como as hemiplegias, hemianestésias, hemianopsias e afasias globais, associadas ou não a diminuição do nível de consciência, são observados principalmente em indivíduos com infarto por oclusão de artérias do sistema carotídeo esquerdo (ROBERTS *et al.*, 1998). Essas sequelas do AVC isquêmico dependem da localização, do tamanho da área cerebral que foi atingida e do tempo que o paciente leva para ser atendido.

A reorganização dos mapas corticais ou “neuroplasticidade” acontece no organismo logo após os danos causados no cérebro por um AVC. Essas alterações descritas na organização do córtex incluem o aumento dos dendritos, das sinapses e de fatores neurotróficos essenciais para sobrevivência das células nervosas. Após o surgimento da lesão no córtex motor, alterações de ativação em outras regiões motoras são observadas. Essas alterações podem ocorrer em regiões homólogas do hemisfério não afetado ou no córtex intacto adjacente a lesão, passando a assumir as funções perdidas. Devido ao surgimento dessas organizações corticais, que podem ter início de um a dois dias após o AVC, podendo prolongar-se por meses, pacientes conseguem recuperar, pelo menos em parte habilidades que haviam sido perdidas (LIEPERT *et al.*, 2000).

1.2 Modelos experimentais de Isquemia Cerebral *in vivo*

A partir dos anos 70, modelos animais de isquemia cerebral começaram a ser desenvolvidos com o objetivo de identificar os possíveis mecanismos que causavam danos aos tecidos, bem como, para fornecer a base para o desenvolvimento, em um nível pré-clínico, de novas terapias para o AVC. Vários modelos animais, então, foram projetados especificamente para tratar fatores de risco específicos, para determinar processos de reparação neural, testar estratégias de recanalização de vasos cerebrais e efeitos neuroprotetores de algumas substâncias. Os modelos animais de acidente vascular cerebral hoje são disponíveis em uma variedade de espécies, incluindo primatas, porcos, ovelhas, cães,

gatos, gerbils mongol, coelhos, ratos e camundongos (BACIGALUPPI; COMI; HERMANN, 2010).

Os ratos e camundongos ainda são os animais mais comumente utilizados para estudos com isquemia cerebral através de modelos de isquemia global e focal (OHTAKI *et al.*, 2005), por que permitem o fácil monitoramento das variáveis fisiológicas e da manipulação de estruturas vasculares.

Os modelos de isquemia cerebral podem ser diferenciados em isquemia focal e isquemia global (Quadro 1). A isquemia focal é caracterizada por uma redução do fluxo sanguíneo cerebral em regiões distintas do cérebro, enquanto que na isquemia global a redução do fluxo de sangue afeta todo o cérebro ou parte do cérebro anterior (TRAYSTMAN, 2003).

Quadro 1. Modelos animais de isquemia cerebral para o estudo da fisiopatologia e terapia do AVC.

Isquemia cerebral focal	Oclusão da artéria cerebral média proximal	Cachorro, gato, coelho e roedor	Longa <i>et al</i> ; 1989
	Oclusão da artéria cerebral média distal	Primata não humano, cachorro, gato, coelho e roedor	Longa <i>et al</i> ; 1989
	Oclusão tromboembólica ACM em roedores	Roedor	Gerriets <i>et al</i> ; 2003
	Modelo de endotelina em roedores	Roedor	Horie <i>et al</i> ; 2008
	Modelo de fototromboembolismo	Roedor	Watson <i>et al</i> ; 1985
Trombose venosa cerebral	Trombose venosa cerebral	Cachorro, gato, porco, coelho e roedor	Stam, 2005
Isquemia cerebral global	Oclusão de quatro vasos	Cachorro, porco e roedor	Pulsinelli <i>et al</i> ; 1982
	Oclusão de dois vasos	Cachorro, porco e roedor	Smith <i>et al</i> ; 1984
	Parada cardíaca e ressuscitação	Cachorro, porco e roedor	Crumrine e Lamanna, 1991

Fonte: Adaptado de Bacigaluppi, Comi e Hermann, (2010)

1.2.1 Isquemia Cerebral Focal e o conceito de núcleo e penumbra

A redução de 25 a 40% do fluxo sanguíneo cerebral (FSC) normal em uma zona de penumbra isquêmica, que se define por ser uma área que circunda a região isquemiada e contém tecido cerebral funcionalmente afetado mas ainda viável, é suportada pelo cérebro em torno de até 4 horas (HACKE *et al.*, 2003; PULSINELLI, 1995). Reduções maiores levam a perda da homeostase iônica, que se inicia com a depleção de ATP, alterando os sistemas de transporte ativo, seguindo-se a abertura dos canais dos receptores tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), estimulados pelo glutamato, permitindo a penetração do Ca^{++} em grande quantidade para o interior das células, o que desencadeia a cascata metabólica que culmina com a morte e lise celular (ROTHMAN; OLNEY, 1986; GRAHAM; CHEN 1993).

A zona de penumbra isquêmica é distinta da zona da isquemia central, porque o funcionamento metabólico destas áreas é diferente, ao apresentar caracteres hemodinâmicos particulares.

A zona central (núcleo) é considerada a área mais crítica, uma vez que os eventos secundários da cascata isquêmica neuronal acontecem em maior velocidade, apresentando um fluxo sanguíneo cerebral inferior a 16 ml/100g de encéfalo por minuto. A lembrar, que o fluxo sanguíneo cerebral é de 60 ml/100g de cérebro por minuto, o que na ausência deste fluxo o cérebro dispõe de energia apenas para poucos minutos (BRAGA; ALVARENGA; MORES NETO, 2006).

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

Os eventos na penumbra são menos drásticos comparados com a zona central, apesar de também levar ao infarto. Nessa região, a morte celular ocorre menos rapidamente, via mecanismos como apoptose e inflamação. O nível de ATP é mantido em torno de 50 a 70% do normal, não caindo o suficiente para permitir despolarizações anóxicas. Entretanto, essa região contém neurônios eletricamente silenciosos (que não respondem ao estímulo elétrico), com seus gradientes iônicos intactos e com neurônios que podem ter suas membranas despolarizadas se o fluxo não for restaurado rapidamente (GONZALEZ *et al.*, 2006).

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

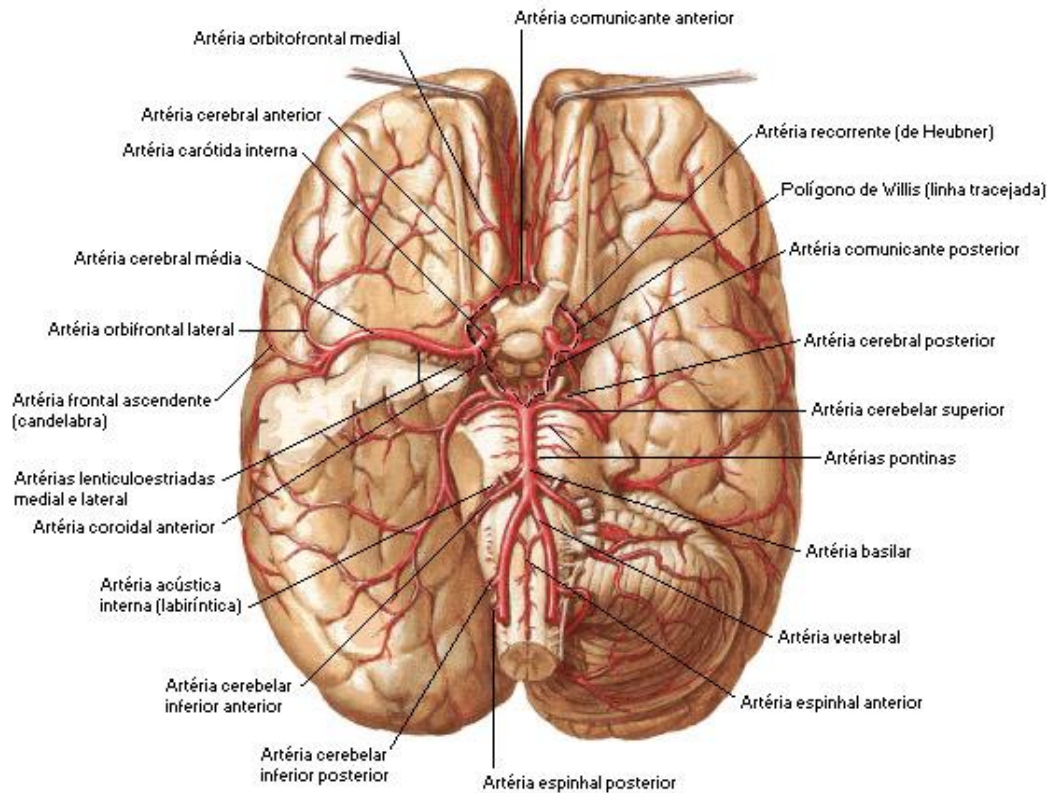
Como anteriormente citado, diversos mecanismos estão envolvidos na produção de lesões cerebrais após isquemia e reperfusão, à semelhança de diversos outros órgãos. Dentre esses mecanismos, podemos destacar as lesões causadas por metabólitos de ácidos graxos livres, por metabólitos das purinas, por formação de óxido nítrico e por ação de leucócitos (GUYTON; HALL, 2011). O estudo de drogas antioxidantes e de bloqueadoras de radicais livres auxilia na compreensão das diversas reações bioquímicas e dos possíveis caminhos seguidos por esses metabólitos no desencadeamento das lesões.

Embora os mecanismos dos danos provocados pela isquemia cerebral não tenham sido claramente determinados, evidências experimentais acumuladas sugerem que a produção de radicais livres seja possivelmente um dos principais fatores envolvidos (FLAMM *et al.*, 1978; SIESJÖ *et al.*, 1989; SIESJÖ *et al.*, 1992). Vários trabalhos têm demonstrado que a produção de radicais livres durante a isquemia representa um papel importante no desenvolvimento da lesão neuronal (CHAN, 1992; KINOCHI *et al.*, 1991; KITAGAWA *et al.*, 1990).

1.2.2 Isquemia Cerebral Global Transitória

A isquemia cerebral global caracteriza-se por redução crítica do fluxo sanguíneo em todo o cérebro, induz lesão neuronal seletiva na região do corno de Amon (CA1) do hipocampo desde que a duração da isquemia seja limitada. Os principais modelos de oclusão global podem ser por oclusão das artérias carótidas comuns, oclusão dos quatro vasos arteriais cerebrais, e o modelo de sequestro cardíaco, que consiste na compressão temporária da parte superior da artéria aorta, vasos que compõe o polígono de Willis (Figura 1), ocasionando uma lesão generalizada em toda área cerebral (OHTAKI *et al.*, 2005).

Figura 1- Esquema demonstrativo das artérias cerebrais anteriores e posteriores, artérias comunicantes anteriores e posteriores e carótida interna que formam o polígono de Willis.



Fonte: www.auladeanatomia.com. Acesso: 28 de janeiro de 2013.

Os modelos de isquemia cerebral global são normalmente utilizados para estudo de danos cerebrais que ocorrem em situações de ressuscitação cardio-circulatória. A isquemia global pode ser induzida por meio de diferentes abordagens. O chamado “método de oclusão de quatro vasos” (4VO) consiste de uma oclusão reversível das artérias carótidas comuns (ACC), o que combinado com a interrupção permanente das artérias vertebrais através de eletro-cauterização, resultando em isquemia do tronco cerebral com uma lesão cerebral altamente previsível (PULSINELLI; BRIERLEY, 1979).

Como alternativa ao método 4VO, a isquemia global pode também ser induzida por oclusão das duas carótidas comuns, isto é, por oclusão dos dois vasos (2VO) que é realizada em conjunto com indução de hipotensão, durante um período de tempo limitado. Neste modelo de isquemia do prosencéfalo, a lesão seletiva no CA1 do hipocampo, putâmen caudado e neocórtex é observada, o fluxo sanguíneo chega a diminuir em 1% nessas áreas

(SMITH *et al.*, 1984). Esta pequena intensidade do dano é mais facilmente protegida, por exemplo, por bloqueadores de receptores NMDA.

Outro modelo a ser considerado é o da oclusão de 2 vasos em animais Gerbils que consiste no ligamento temporário das carótidas, sem redução da pressão sanguínea, porque não existem artérias comunicantes posteriores nos Gerbils, produzindo uma profunda isquemia cerebral (KIRINO *et al.*, 1985). Estas mudanças são semelhantes àquelas dos modelos em ratos, diminuição do fluxo em torno de 1% no córtex e em tronco de 4% no hipocampo em relação ao controle (KATO *et al.*, 1990).

Desse modo, os dois principais objetivos nos estudos de isquemia são a recanalização e a neuroproteção. A administração precoce de terapêutica no AVC isquêmico baseia-se no conceito de que a restituição precoce da circulação no território afetado, mediante a recanalização de uma artéria intracraniana ocluída, preserva o tecido neuronal reversivelmente danificado na zona isquemiada (HACKE *et al.*, 2003). O estudo da recanalização tem sido cada vez mais utilizado por se aproximar mais com o que acontece com o ser humano, bem como estudar as consequências da reperfusão no território isquêmico.

Já a neuroproteção tem objetivo de neutralizar a cascata de eventos que conduz à morte celular, facilitando o resgate e proteção da zona de penumbra isquêmica. Por sua vez, ao limitar a extensão da necrose pela melhoria da perfusão sanguínea cerebral irá evitar lesões secundárias e complicações futuras (FERREIRA; MARQUES, 2011).

1.2.3 Áreas cerebrais e isquemia

A isquemia pode causar danos em diversas partes do cérebro, dependendo do tipo, local de oclusão e tempo de duração pode vir a desenvolver lesão cerebral no córtex, hipocampo e estriado.

O córtex pré-frontal (CPF) tem sido associado a diversos processos emocionais, cognitivos, entre outros (VERTES, 2006). O desenvolvimento do CPF é prolongado, o que permite a aquisição de capacidades cognitivas complexas por meio da experiência, mas o torna susceptível a fatores que podem conduzir ao funcionamento anormal, o que é muitas vezes manifestado em distúrbios neuropsiquiátricos. (KOLB *et al.*, 2012)

Existem diferentes tipos celulares no córtex pré-frontal, incluindo neurônios piramidais excitatórios, como neurônios glutamatérgicos, eferentes colinérgicos, interneurônios gabaérgicos inibitórios e interneurônios colinérgicos. Com relação ao glutamato, as terminações nervosas glutamatérgicas no CPF medial nascem principalmente de

projeções eferentes do núcleo mediodorsal do tálamo, do hipocampo e amígdala (RUGGIERO *et al.*, 2011).

O modelo de oclusão de uma das carótidas seguida de baixas tensões de oxigênio (8%) levam a atrofia cerebral tardia de estruturas como córtex e hipocampo (RICE; VANNUCCI; BRIERLEY, 1981)

O hipocampo e suas estruturas lobulares adjacentes, temporal e parietal, denominados de formação hipocampal, tem numerosas conexões e, principalmente, conexões indiretas com muitas porções do córtex cerebral, bem como com as estruturas basais do sistema límbico – a amígdala, o hipotálamo, o septo e os corpos mamilares. Regiões do hipocampo, especialmente a área de CA1, núcleo caudado, putâmen e neocórtex estão seletivamente vulneráveis durante a isquemia cerebral global (SMITH *et al.*, 1984; CHEN *et al.*, 1992).

O hipocampo está tradicionalmente relacionado a processos cognitivos, como aprendizado e memória, também parece estar envolvido com a resposta ao estresse (RIEDEL; MICHEAU, 2001; LATHE, 2001). É ativado por diferentes estressores e participa do processamento de informações sobre eventos ameaçadores (LOPEZ; AKIL; WATSON, 1999). Infartos do hipocampo uni ou bilaterais estão diretamente envolvidos na disfunção da memória (BORRONI, 2004; TAKAHASHI *et al.*, 1997), com potencial para causar amnésia irreversível.

Outras áreas de destaque são os núcleos da base, o globo pálido, a substância negra e os núcleos subtalâmicos. Os neurônios se projetam para o globo pálido e substância negra, as áreas do córtex emitem projeções glutamatérgicas excitatórias para porções específicas do corpo estriado (CE), além de receber projeções dopaminérgicas do mesencéfalo e impulsos de entrada serotoninérgicos dos núcleos da rafe (DeLONG *et al.*, 2000).

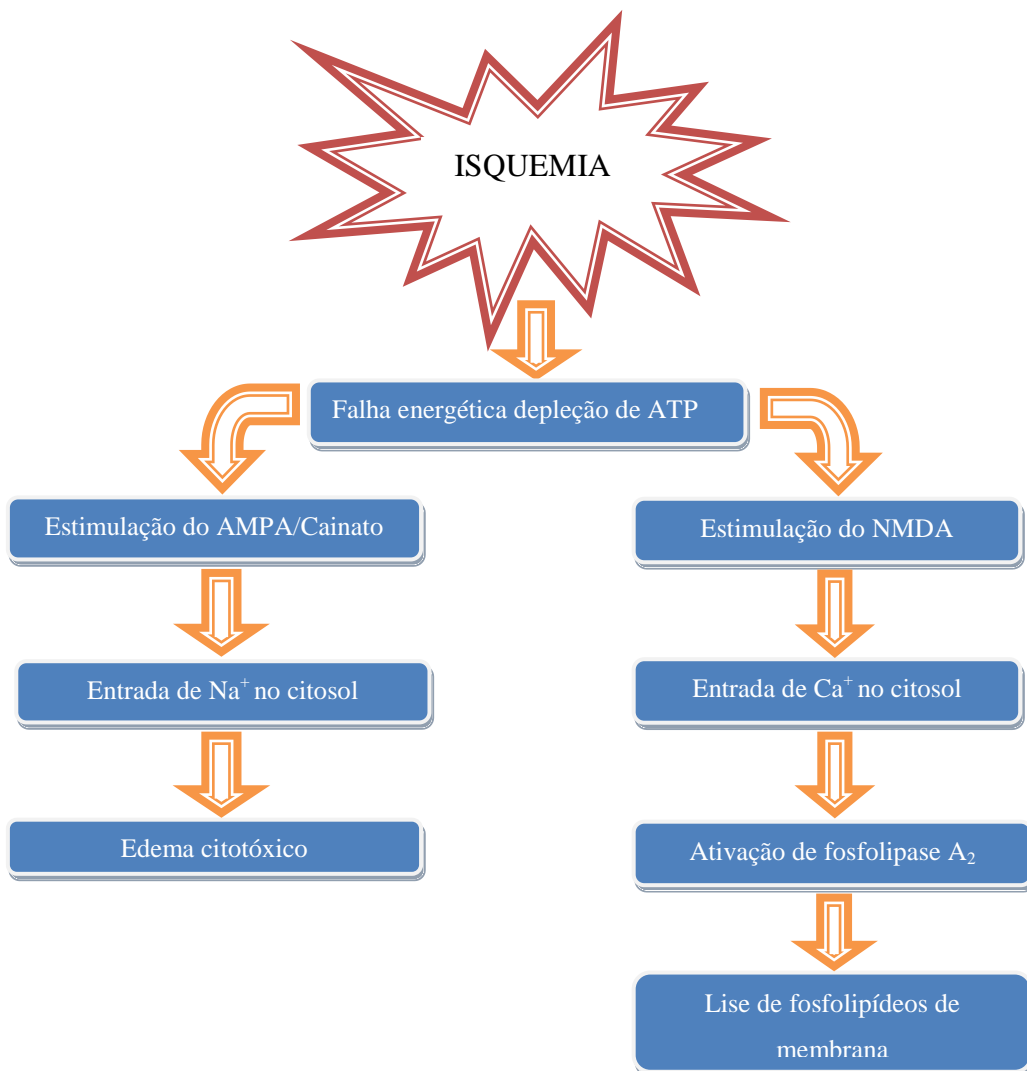
No corpo estriado, as projeções de neurônios gabaérgicos espinhosos são de 90 a 95%. Esses neurônios gabaérgicos projetam-se para o globo pálido e a substância negra. Cerca de 1 a 2% constituem os interneurônios estriatais, que são do tipo não espinhoso e fazem conexão com os espinhosos médios (GOODMAN; GILMAN, 2012). É importante destacar que a migração de neuroblastos da zona subventricular (ZSV) para estriado lesionado, devido ao processo isquêmico, persiste durante até um ano após a isquemia, sugerindo que a ZVS pode servir como um reservatório constante de novos neurônios, oferecendo, assim, uma janela para fins terapêuticos (KERNIE; PARENT, 2010). Estes dados levantam a possibilidade reparativa de progenitores endógenos no estriado para doenças neurodegenerativas, incluindo acidente vascular cerebral.

1.3 Mecanismos envolvidos na lesão neuronal induzido por isquemia e reperfusão

1.3.1 Redução dos níveis de oxigênio e ATP

A diminuição do fluxo sanguíneo cerebral abaixo de certos valores (16ml de sangue por 100g/min de encéfalo) é um acontecimento crítico que resulta em uma série de alterações funcionais, bioquímicas estruturais e que culminam com a morte neuronal irreversível. Os acontecimentos moleculares desencadeados para isquemia aguda podem ser resumidos em uma cascata (Figura 2), caracterizado por redução na produção e falha de energia nas bombas de íons, estimulação persistente dos receptores de toxicidade do glutamato sobre os neurônios da área comprometida (BROTT; BOGOUSSLAVSKY, 2000).

Figura 2- Modelo estrutural de cascata isquêmica.



Fonte: Adaptado de Zarco, González e Coral (2008).

Durante a fase de isquemia, ocorre uma redução do aporte de oxigênio para o tecido acometido, levando em inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial e queda da produção de ATP. O metabolismo anaeróbico, através de um mecanismo compensatório, supre a falta de ATP por um curto período de tempo, levando a acidose tecidual. Com o processo isquêmico instalado, o consumo do estoque de ATP continua e passa a ser degradado em adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP) e, posteriormente, a adenosina, inosina e hipoxantina (YOSHIDA, 2002). A falta de energia celular desencadeia a falência da bomba de sódio potássio (Na^+/K^+) e, com a falência da bomba, passa a haver um maior acúmulo de Na^+ intracelular e perda de K^+ extracelular, com conseqüente edema celular e profundas despolarizações anóxicas. Concomitantemente a este evento, passa a ocorrer o influxo de Ca^{++} e de cloreto para o meio intracelular (BRALET *et al.*, 1987; TRAYSTMAN *et al.*, 1991; LIPTON., 1999).

A redução do fluxo sanguíneo cerebral priva o neurônio dos seus substratos energéticos principais: oxigênio e glicose. A recaptção sináptica de glutamato é um processo dependente de energia; por conseguinte, na isquemia ocorre acumulação de glutamato extracelular o qual induz a estimulação dos receptores NMDA, AMPA (ácido α -amino-hidróxi-5-metil-4-isoxazolpropionico), Cainato e metabotrópicos (mGluRs). O aumento da ativação dos receptores NMDA pelo glutamato causa também um grande influxo de cálcio, o que ativa a bomba de cálcio aumentando ainda mais a depleção de ATP. Sem o ATP a célula perde sua habilidade de manter a homeostase (ZARCO; GONZÁLEZ; CASAS, 2008).

1.3.2 Cálcio e aminoácidos envolvidos no processo isquêmico

A diminuição de energia resultante da redução da oferta de oxigênio e glicose durante a isquemia impede a manutenção da baixa concentração de cálcio (Ca^{++}), que está normalmente presente em cada célula, pela Ca^{++} ATPase (DOYLE; SIMON; STENZELPOORE, 2008), por outra via a falha no controle da recaptção de aminoácidos excitatórios causa ativação sustentada de receptores ionotrópicos (CHOI; ROTHMAN, 1990), desencadeando, com isso, prolongada despolarização neuronal e sobrecarga de cálcio.

Os níveis de cálcio intracelular são modulados pelas ATPases de Ca^{++} e Mg^{++} , mas como as células isquêmicas têm a síntese de ATP gravemente prejudicada essa modulação é incapaz de regular o cálcio ao nível normal (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). O aumento de cálcio, por sua vez, ativa várias enzimas, como exemplo endonucleases e proteases que possuem efeitos deletérios, levando à morte muitas células do core isquêmico

por simples catabolismo. Pois, pelo fato do ATP não estar disponível para ressíntese dos constituintes celulares, essas enzimas catabólicas causam a necrose de estruturas celulares essenciais.

Em regiões isquêmicas, a estimulação excitotóxica advinda da despolarização neuronal constante por consequente abertura dos canais de Ca^{++} , pode desencadear uma resposta inflamatória e morte celular apoptótica ou necrótica, dependendo da intensidade do insulto (BONFOCO *et al.*, 1995; ANKARCRONA *et al.*, 1997). Nesse sentido, tratamentos que reduzem o desequilíbrio de íons através do bloqueio de receptores de glutamato e de canais voltagem-dependentes podem proteger os neurônios e reduzir a área do infarto cerebral (CHEN *et al.*, 1992; CHOI; KOH; PETERS, 1988).

Os bloqueadores de canal de cálcio tendem, a proteger diretamente neurônios sobre injúria isquêmica. Bloqueadores do canal tipo L são protetores contra lesões focais transitórias e permanentes, reduzindo área de infarto mensurada em aproximadamente 50% em todos os casos (CAMPBELL; MACKAY; PATEL, 1997). Resultados de estudos recentes também demonstraram que o tratamento com bloqueadores de canais de Ca^{++} reduziu o volume de infarto, apoptose e o estresse oxidativo no cérebro isquêmico (BIELENBERG *et al.*, 1990; JACEWICZ *et al.*, 1990).

O glutamato é o principal transmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) e desempenha um papel essencial no desenvolvimento neural, na transmissão sináptica excitatória, e plasticidade (GREENGARD, 2001), está envolvido em numerosas funções fisiológicas, como aprendizagem e memória. Imediatamente após isquemia, a um acúmulo de glutamato nas sinapses (DREJER *et al.*, 1985; ROSSI; OSHIMA; ATTWELL, 2000), resultando na estimulação extensa de seus receptores, que podem eventualmente ser tóxicos para os neurônios (LIPTON, 2006; LO; DALKARA; MOSKOWITZ, 2003). Um gradiente de concentração elevado de glutamato é mantido através da membrana plasmática por transportadores de glutamato dependentes de sódio localizados sobre membranas pré e pós-sinápticas (HSU, 1998).

O efeito de um aumento na concentração sináptica de glutamato é a ativação de receptores NMDA e AMPA. Receptores NMDA constituem o subtipo principal de receptores de glutamato, e normalmente participam da transmissão sináptica excitatória rápida. A ativação dos receptores NMDA requer dois eventos coincidentes: 1) ligação a co-agonistas de glutamato e glicina, e 2) a despolarização da membrana simultânea, que remove o bloqueio Mg^{++} do poro do canal, levando ao influxo de Ca^{++} . Sob condições fisiológicas, a entrada de

Ca^{++} produz uma inibição parcial de receptores NMDA através da inativação Ca-dependente, impedindo assim uma sobrecarga intracelular desse íon (KRUPP *et al.*, 1999).

Em um processo isquêmico a abertura desses canais leva a mais despolarizações da membrana e um aumento ainda maior do influxo de Ca^{++} , exacerbando sua sobrecarga intracelular causando excitotoxicidade. Drogas como MK-801 e Aptiganel, antagonistas não-competitivos dos receptores NMDA, assim como CGS 19755, um antagonista competitivo, são capazes de reduzir significativamente a área de infarto, ou a área significativa de necrose celular, causada por isquemia focal (GINSBERG, 2008).

Receptores AMPA possuem todas as subunidades permeáveis a ambos os íons Na^+ e Ca^{++} com a exceção da subunidade GluR2, que é unicamente impermeável ao Ca^{++} . A maioria dos receptores AMPA *in vivo* contem subunidades GluR2 cuja seletividade iônica é dominante sobre outras subunidades (BOULTER *et al.*, 1990). Os receptores AMPA também são firmemente associados ao um padrão seletivo de perda neuronal em certas áreas do cérebro, tanto após a isquemia global como focal (DOS-ANJOS *et al.*, 2009; YIN *et al.*, 2002). Similar ao que é relatado para os receptores NMDA, a excitotoxicidade mediada por AMPA com exceção da subunidade GluR2 é desencadeada pelo influxo de íons (Ca^{++} , Zn^{++}) após a estimulação agonista (WEISS; SENSI, 2000; TANAKA, 2000). Contudo, a subunidade GluR2 está reduzida durante a isquemia, aumentando em cerca de 18 vezes a permeabilidade ao Ca^{++} desses receptores, permitindo assim, que receptores AMPA contribuam para morte celular tardia dependente de cálcio (LIU *et al.*, 2006; PENG *et al.*, 2006).

Além da presença de aminoácidos excitatórios, como o glutamato no processo isquêmico os aminoácidos inibitórios também atuam de maneira amenizar os danos causados pela excitotoxicidade.

Mecanismos gabaérgicos podem mediar alterações na excitabilidade neuronal, de uma maneira semelhante à plasticidade cortical normal, que é a propriedade do sistema nervoso que permite o desenvolvimento de alterações estruturais em resposta à experiência, e como adaptação a condições mutantes e a estímulos repetidos (HENSCH, 2005).

Esses mecanismos mediados pelo GABA (ácido gama-aminobutírico) desempenham um papel central na recuperação funcional do córtex peri-infarto após acidente vascular cerebral. A ação inibitória do neurotransmissor GABA é fundamental para a plasticidade cortical e mapeamento sensorial. A alteração da transmissão gabaérgica muda mapas sensoriais durante o período crítico do desenvolvimento da área cortical (HENSCH, 2005) e produz alterações rápidas em mapas corticais de adultos que se assemelham a

mudanças que ocorrem após a isquemia, alterando assim, a formação da memória (DONOGHUE; SUNER; SANES, 1990; FOELLER; CELIKEL; FELDMAN, 2005).

1.4 Memória

A memória pode ser definida como um processo de formação, conversão, evocação e apanhamento de diferentes informações. Alguns processos como: aquisição, consolidação, armazenamento, evocação e extinção compõem o ato de memorizar. Classifica-se memória de acordo com a sua natureza e seu tempo de retenção (CAMMAROTA *et al.*, 2005).

Atualmente, existem várias classificações para os processos de aprendizado e memória (Quadro 2). De maneira geral, os diferentes tipos de memória podem ser classificados de acordo com o seu tempo de retenção, sua natureza ou conteúdo.

Quadro 2 . Tipos de Memória

Explícita ou declarativa	Lobo temporal e diencéfalo e hipocampo	Envolve a recuperação consciente de eventos ou fatos ocorridos. Divide-se em episódica, que se relaciona com o tempo e semântica, que se relaciona com significado das palavras	Squire e Zola, 1996
Implícita ou não-declarativa	Núcleo estriado, cerebelo e diencéfalo	Incluem habilidades e hábitos de aprendizagem. É subdividida em quatro tipos de memória. Memória de representação perceptiva, memória de procedimento, memórias associativas e não-associativa	Squire e Zola; Isquierdo <i>et al.</i> ; 1993
Memória operacional	Septo medial e hipocampo	Memória instantânea serve para armazenamento temporário de informações utilizado para planejar ação futura	Squire e Zola, 1996; Brioni, 1993

Nem todas as regiões estão igualmente envolvidas no processo de armazenar informações, pois diferentes áreas armazenam distintos aspectos de memória. Regiões cerebrais como hipocampo, amígdala e septo medial são responsáveis pela memória emocional. A memória de habituação espacial depende somente do hipocampo que também processa a informação temporal, contextual e a memória que leva a recordação consciente em humanos (IZQUIERDO *et al.*, 1992, 1993). O septo medial e o hipocampo processam a memória de trabalho e a memória espacial (BRIONI, 1993; IZQUIERDO, 1994; IZQUIERDO *et al.*, 1993).

Memórias explícitas ou declarativas, armazenada no lobo temporal e diencéfalo, são aquelas que registram fatos, eventos ou conhecimentos, sendo chamadas declarativas pelo fato de nós, seres humanos, podermos declará-las e relatá-las como as adquirimos (evocadas conscientemente). Entre elas, as referentes a eventos datados são denominadas episódicas (ex.: recordações do nosso casamento, do aniversário do filho); já as de conhecimentos gerais (ex.: conhecimento sobre astronomia, português), que não se relacionam ao tempo, são chamadas semânticas (SQUIRE; ZOLA, 1996).

A memória declarativa é dividida em memória imediata, memória de curto prazo ou de curta duração e memória a longo prazo ou de longa duração. A memória imediata tem duração de frações a poucos segundos e pode ser ilustrada como a memória de um número de telefone que consultamos na lista telefônica, e que geralmente esquecemos logo após tê-lo digitado. Este tipo de memória não deixa "traços" ou não forma "arquivos"; e parece depender da atividade elétrica de células do córtex pré-frontal. Já a memória de curto prazo é a recuperação imediata de eventos que ocorrem em curso ou eventos recentes de segundo, horas ou dias. A memória de curto prazo engloba o tempo durante o qual a memória de eventos em curso está sendo consolidada e convertida à memória remota, de longo prazo. Durante este tempo, a memória à curto prazo é vulnerável e sujeita a desaparecer, ao passo que as memórias remotas são extremamente resistentes e persistem na presença de grave lesão cerebral (SQUIRE; ZOLA, 1996).

Memórias implícitas (ou não-declarativas) se referem à capacidade de aprender novas habilidades motoras, perceptuais ou cognitivas. Estas não são descritas através de palavras e, muitas vezes, somente percebemos que as possuímos quando somos requisitados a executar determinada ação ou demonstrarmos uma habilidade. Um subtipo de memória implícita é a memória de procedimento que corresponde àquelas capacidades ou habilidades motoras ou sensoriais, que são corriqueiramente chamadas de "hábitos". As memórias implícitas são dependentes de áreas cerebrais também envolvidas com o controle dos

movimentos, como os gânglios da base (principalmente o estriado) e o cerebelo (DUBOIS; PILLON, 1997; MILNER; SQUIRE; KANDEL, 1998).

A memória não-declarativa é subdividida em 4 tipos de memórias. O primeiro subtipo é a memória de representação perceptual é o tipo de memória que armazena algum objeto, forma, sem que saibamos o que o mesmo significa, é uma memória que pode ser lembrada através de pistas. A memória de procedimentos é armazenada no corpo estriado, é aquela memória que usamos para lembrar-nos como se dá um nó em uma gravata, amarrar o cadarço, varrer o chão. As memórias associativa e não-associativa, armazenadas na amígdala, se relacionam a resposta a algum tipo de comportamento (SQUIRE; ZOLA, 1996).

Já as memórias operacionais (*working memory*) consistem no arquivamento temporário da informação para o desempenho de uma diversidade de tarefas cognitivas. A memória de trabalho ou operacional é de curto prazo e fugaz e serve para o armazenamento temporário (segundos ou poucos minutos) de informações que serão úteis apenas para o raciocínio imediato e resolução de problemas, podendo ser esquecidas logo a seguir (BADDELEY, 1986). Ao contrário dos demais tipos de memória, a memória operacional não deixa traços e não produz arquivos. Usamos a memória operacional, por exemplo, para gravar números de telefones, realizar contas matemáticas, planejar compras etc.

Pacientes com doença cerebrovascular ocasionalmente exibem distúrbios cognitivos, como amnésia e desorientação topográfica (CAPLAN *et al.*, 1985; CAPLAN *et al.*, 1990). Por isso a necessidade de se estudar fármacos que além de minimizarem os efeitos deletérios da isquemia no cérebro ajudem a melhorar os danos causados a memória.

1.5 Farmacoterapia

Entender os mecanismos envolvidos na lesão isquêmica e quais são as vias ativadas na reparação neuronal, permeiam um vasto campo de possibilidades para se estudar terapias que ajam reduzindo os danos neurológicos causados pela isquemia.

Uma gama de protocolos clínicos envolvendo coma induzido por barbituratos (BRAIN RESUSCITATION CLINICAL TRIAL I STUDY GROUP, 1986) e antagonistas de canais de cálcio (BRAIN RESUSCITATION CLINICAL TRIAL II STUDY GROUP, 1991) foi utilizada como uma tentativa de reduzir os danos neurológicos causados pelo ataque cardíaco e ressuscitação, mais sem grande sucesso. Estudos feitos com o uso de trilazade (eliminador de radicais livres) e selfotel (antagonista de receptor de glutamato) também se mostraram ineficazes (DAVIS *et al.*, 2000).

O desenvolvimento de agentes neuroprotetores em relação aos danos causados pela isquemia no tecido cerebral tem sido uma estratégia que busca reduzir a morbidade e mortalidade associada ao AVC. O período em que o cérebro tolera a isquemia global sem provocar danos e o período em que a reperfusão falha na redução do tamanho da lesão, devem ser considerados para o desenvolvimento e teste de novos agentes terapêuticos.

Contudo até o presente só existe um tratamento aprovado para AVC isquêmico agudo (DURUKAN; TATLISUMAK, 2007). A revascularização dos vasos cerebrais durante o AVC isquêmico agudo, através do uso do ativador de plasminogênio tecidual (tPA), tem provado ser o único método capaz de melhorar o resultado funcional da isquemia em humanos. No entanto, devido à estreita janela terapêutica, esse tratamento é apropriado somente para um pequeno número de pacientes, além do risco do problema circulatório piorar se o derrame for hemorrágico em vez de trombótico (SMITH, 2004).

Apesar dos resultados laboratoriais, muitas drogas neuroprotetoras apresentam pouco ou nenhum sinal de eficácia em testes clínicos controlados em pacientes com AVC. Das mais de 700 substâncias que foram efetivas em modelos animais, porém ineficazes para o tratamento do AVC isquêmico agudo com mais de 06 horas do início dos sintomas (SHUAIB *et al.*, 2007), a memantina, um antagonista do receptor NMDA, mostrou possuir ação neuroprotetora em modelos de isquemia (LIU *et al.*, 2009). Esses estudos fortalecem a hipótese glutamatérgica na fisiopatologia da morte neuronal devido à isquemia (SENCER *et al.*, 2008).

Dentre os agentes neuroprotetores as drogas anticonvulsivantes vêm sendo utilizadas há vários anos, inclusive como estabilizadoras do humor. A ação farmacológica dos anticonvulsivantes é atribuída a sua capacidade de potencializar a função do ácido gama-aminobutírico (GABA) e envolve também a diminuição da neurotransmissão glutamatérgica através do bloqueio dos receptores NMDA ao inibir o influxo de íons Ca^{++} .

Já existem vários estudos demonstrando a relação de convulsão com isquemia (KUHR; KORF, 1988). Agentes neurocitotóxicos podem desencadear a ação da proteína cinase estimuladora de Ca^{++} que está envolvida fortemente com a regulação da função sináptica e está relacionada com a isquemia e o *status epilepticus*. Além de ser essencial para plasticidade sináptica e exercer um papel importante no aprendizado e memória. Várias drogas anticonvulsivantes têm efeitos neuroprotetores *in vitro* e em modelos animais. O ácido valpróico demonstrou ação protetora comprovada histologicamente e bioquimicamente além de uma melhora clínicos em cachorros pré-tratados e posteriormente submetidos à isquemia cerebral (WILLIAMS *et al.*, 2006).

Existe um número crescente de substâncias sendo utilizadas como agentes neuroprotetores. Dentro desse grupo, algumas são derivadas de plantas. As plantas têm sido cada vez mais pesquisadas isoladamente ou combinadas (YUN *et al.*, 2007), por certo devido suas ações antiinflamatória e antioxidantes. Compostos antioxidantes, como ácido dehidroascórbico, α -tocotrienóis, γ -tocoferol, flavonóides, resveratrol e ginkgo biloba vem sendo testados, em modelos animais de acidente vascular cerebral isquêmico, mostrando resultados promissores (CHERUBINI *et al.*, 2008).

Pelo exposto fica evidente a importância de se pesquisar novos fármacos que atuem diminuindo o dano isquêmico.

1.6 Gênero *Erythrina*

1.6.1 Aspectos gerais da *Erythrina*

O termo *Erythrina* possui origem grega, erythros, que significa vermelho, em alusão à cor de suas flores e o epíteto específico *velutina*, origina-se do latim, referindo-se à presença de um conjunto de pêlos macios e delicados em suas folhas. (CARVALHO, 2008).

O gênero *Erythrina* pertence à família das leguminosas Papilionóideas, atualmente conhecida como Fabaceae. Consiste em mais de 110 espécies distribuídas através das regiões tropicais do mundo, sendo que 70 são naturais das Américas (VIRTUOSO, 2005). No Brasil temos algumas espécies de *Erythrina*, como a *E. verna*, *E. velutina* e *E. mulungu*. O gênero *Erythrina* é conhecido no Ceará, vulgarmente como mulungu, bucaré, mulungu-da-flor-vermelha e mulungu-da-flor-amarela, essas denominações abrangem as espécies *E. velutina* (mais comum no Ceará, especialmente na serra de Baturité). Em Minas Gerais, é mais comumente conhecida por muchôco e mulungá; em estados como Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, São Paulo e Sergipe, simplesmente mulungu, nome este que se origina do tupi, mussungú ou muzungú e do africano mulungu, significando pandeiro, termo possivelmente alusivo ao som emitido pela batida em seu tronco oco (CARVALHO, 2008).

A espécie *E. velutina* (Figura 3) é uma árvore de grande porte, decídua, que mede cerca de 8 a 12 m de altura, com tronco de 40-70 cm de diâmetro; possui fruto do tipo legume, flores de coloração vermelha e folhas alternadas compostas e trifolioladas, sustentadas por pecíolo de 6-14 cm; folíolos cartáceos, com face ventral apenas pulverulenta e dorsal de cor verde mais clara revestida por densa pilosidade felpuda, de 6-12 cm de comprimento por 5-14 cm de largura (LORENZI, 1998).

Figura 3 - *Erythrina velutina* Willd (Fabaceae)

A- Semente; B – Árvore



Fonte: A – Carvalho, 2009; B- Lopes, 2010.

O gênero *Erythrina* é conhecido pela bioprodução significativa de alcalóides, sendo uma das principais fontes dos alcalóides tetracíclicos tipo eritrina, como a (+)-eritralina e a (+)-eritratina. Das sementes de *E. velutina*, foi obtida uma lectina (STOJANOVIC *et al.*, 1994; MORAES *et al.*, 1996) e vários alcalóides, já nos estudos fitoquímicos realizados com as cascas do caule de *E. velutina*, destacam-se a identificação de um grande número de flavonoides: duas flavanonas, a 5,7- dihidroxi-4',5'-dimetoxi-flavanona (homoesperidina) e a 5, 7, 3'-trihidroxi-4'-O-metil-5'-prenilflavanona (4'-O-metilsigmoidina B); dois isoflavonóides, o 3,9-dihidroxi-10- prenilpterocarpano (faseolidina) e a 2'-4'-dihidroxi-6-prenil-7-metoxi-isoflavanona (erivelutinona) e um flavonóide glicosilado inédito no gênero, 7-O-[α -ramnopiranosil- β -glicopiranosídeo]-genisteína. Além do triterpeno 3β -olean-12-ene-3,28-diol e do alcalóide 3β - 1,2,6,7-tetradehidro-3,16-dimetoxi-eritran-15-ol (erisovina), descrito pela primeira vez nas cascas do caule de *E. velutina* (DA-CUNHA *et al.*, 1996; RABELO *et al.*, 2001; CABRAL, 2009).

As cascas do caule de *E. velutina* na medicina popular do nordeste brasileiro, são consumidas na forma de infusos devido a suas propriedades sudorípara, emoliente, calmante e sedativa da tosse, além de auxiliar no tratamento contra verminoses, hemorróidas e bronquite, embora seu uso ainda não tenha sido comprovado cientificamente sobre a eficácia e a segurança. Os frutos secos e triturados, quando adicionados ao tabaco, são usados na forma de cigarros para combater a dor de dente, ato que se deve a sua ação anestésica local (MORS, 2000; AGRA; FRANÇA; BARBOSA-FILHO, 2007; AGRA *et al.*, 2008).

1.6.2 Aspectos farmacológicos da *Erythrina*

Muitas ações farmacológicas têm sido demonstradas pelo gênero *Erythrina*. Dentre essas podemos citar: osteoproteção- *Erythrina variegata* (ZHANG *et al.*, 2010); antibacteriana- *Erythrina caffra* (CHUKWUJEKWU; VAN HEERDEN; VAN STADEN, 2011) e antineoplásico (NGUYEN *et al.*, 2009).

Diversos trabalhos citados na literatura também atribuem diferentes atividades farmacológicas a espécie *E. velutina* em vários modelos animais realizados *in vivo*. O extrato aquoso e etanólico das cascas do caule de *E. velutina* utilizados em testes farmacológicos apresentaram resultados relevantes. No extrato etanólico administrado em gatos, foram reportados sintomas tais como depressão da respiração e da pressão sanguínea. Para o extrato aquoso observou-se estímulo respiratório. Quando ambos os extratos foram utilizados em sapos, observou-se depressão da atividade do músculo cardíaco e inibição das contrações musculares induzidas em uma preparação de músculo abdominal de sapo. Já em coelhos, observou-se inibição da motilidade e tônus de uma preparação de duodeno para ambos os extratos e forte atividade inibidora de contrações uterinas induzidas por ocitocina (BARROS *et al.*, 1970).

Carvalho *et al.* (2009) avaliaram o mecanismo de ação do extrato aquoso das folhas da espécie *E. velutina* em íleo isolado de cobaia. O presente estudo demonstrou que o extrato aquoso produziu uma resposta contrátil de maneira concentração-dependente.

Vasconcelos *et al.* (2003) realizaram um estudo com o extrato hidroalcoólico das cascas de *E. velutina* e *E. mulungu*. Ambas as espécies apresentaram efeitos antinociceptivos em diferentes modelos experimentais, e os efeitos analgésicos destas plantas foram independentes do sistema opióide. No ano seguinte, Vasconcelos *et al.* (2004) avaliaram os efeitos dos mesmos extratos no comportamento de ratos, demonstrando diminuição da atividade locomotora após tratamento intraperitoneal (i.p.) no teste do labirinto em cruz elevado, campo aberto e de coordenação motora (*rota rod*).

Os últimos estudos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, mostraram que esse extrato, também nas doses de 200 e 400 mg/kg, apresentou atividade antiedematogênica, em modelo de edema de pata induzido por dextrano (VASCONCELOS *et al.*, 2011), processo o qual a degranulação de mastócitos exerce um papel importante.

1.6.3 Efeitos farmacológicos da *Erythrina velutina* no Sistema Nervoso Central

Várias ações da *E. velutina* são demonstradas no SNC. Trabalho realizado por Oliveira *et al.* (2000) mostraram que o extrato aquoso interfere com a atividade locomotora em camundongos e provavelmente afeta mecanismos envolvidos com a formação da memória. Ribeiro *et al.* (2006) pesquisando os efeitos do extrato hidroalcoólico da casca do caule da *E. velutina* e *E. mulungu* em ratos submetidos a modelos animais de ansiedade e depressão, demonstraram efeito do tipo ansiolítico no teste do labirinto em T similar ao diazepam, utilizado como controle positivo. O estudo também demonstrou que, tanto a atividade locomotora no campo aberto como o tempo de imobilidade na natação forçada não foram alterados em nenhuma das doses após administração aguda ou crônica.

Efeito similar foi encontrado no estudo citado por Raupp *et al.* (2008) utilizando modelos experimentais de ansiedade em camundongos, sugeriram efeito ansiolítico do extrato hidroalcoólico da casca da *E. velutina* quando da sua administração crônica. Teixeira-Silva *et al.* (2008) também avaliaram o efeito do extrato alcoólico das folhas da *E. velutina* em modelos animais de ansiedade, memória e epilepsia.

Trabalhos prévios em nosso laboratório demonstraram efeitos anticonvulsivantes do extrato hidroalcoólico da casca de *E. velutina* (v.o. e i.p.) e *E. mulungu* (i.p.), utilizando o teste das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol e estriçnina, sugerindo ação depressora do sistema nervoso central (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Em 2004, Dantas *et al.* testaram o extrato aquoso das folhas de *E. velutina* em roedores e houve aumento do sono induzido por pentobarbital de maneira dose-dependente, indicando efeito sedativo, hipnótico e diminuição da atividade motora.

Dentre os estudos farmacológicos realizados com *E. velutina*, podemos perceber efeitos ansiolíticos e depressores do sistema nervoso central na maioria deles, ficando evidente, com isso, uma possível interação do extrato com o sistema gabaérgico. Esses efeitos podem ser confirmados pelo uso popular atribuído a planta, considerando que a mesma é utilizada na forma de chás no combate a insônia e como calmante (CARVALHO *et al.*, 2008).

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O AVC é a principal causa de incapacidade, a longo prazo, entre os adultos em países industrializados. Mais de 60% dos sobreviventes de AVC sofrem de déficits neurológicos persistentes (ZIEMANN *et al.*, 2006). Dessa maneira, estudos para tentar minimizar os danos causados pelo o AVC são necessários.

Sabe-se que a fisiopatologia da isquemia cerebral é complexa e envolve múltiplas vias, iônicas, enzimáticas e genéticas, que variam em função da profundidade e duração da isquemia (SMITH, 2004). Dessa forma, procurar entender os mecanismos envolvidos no dano e reparação neuronal é fundamental para diminuir a morbidade neurológica e procurar a terapia mais efetiva.

Tendo em vista a dificuldade de fármacos realmente eficazes no tratamento do AVC sugerimos com este estudo um possível efeito neuroprotetor do extrato padronizado de *E. velutina* já que às espécies desse gênero tem demonstrado ação importante no sistema nervoso central, com a ação sedativa, ansiolítica e anticonvulsivante. Na ação anticonvulsivante, foi possível observar um provável efeito neuroprotetor do extrato, como citado por Vasconcelos *et al.* (2007), onde foi sugerido uma relação de supressão da convulsão e conseqüente morte celular. Efeito esse que se deve, possivelmente, a identificação de um número elevado de flavonóides nas cascas do caule de *E. velutina*.

Os flavonoides apresentam ações importantes no organismo, evidências epidemiológicas sugerem que dietas ricas em flavonoides têm efeitos positivos na saúde especialmente em doenças inflamatórias e cardiovasculares (GARCÍA-LAFUENTE *et al.*, 2009) e na redução da incidência do AVC (GRIEP *et al.*, 2011). Uma potente atividade anti-inflamatória está relacionada com sua capacidade terapêutica e profilática (GARCÍALAFUENTE *et al.*, 2009; HAVSTEEN, 2002).

Assim busca-se, com esse estudo entender a ação neuroprotetora da *E. velutina* no modelo de isquemia cerebral global transitória e iniciar o processo de produção de um agente terapêutico eficaz, viável e de baixo custo que possa ser utilizado no tratamento agudo do acidente vascular cerebral, patologia frequente, com tratamento geralmente sintomático e de alto custo em nosso meio.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Estudar o efeito neuroprotetor do extrato padronizado da *Erythrina velutina* (EPEV) sobre lesão neuronal, comportamento e memória de camundongos submetidos à isquemia cerebral global transitória.

3.2 Objetivos Específicos

- Estudar as alterações comportamentais no SNC em camundongos tratados com EPEV após isquemia cerebral global pela oclusão bilateral das artérias carótidas comum;
- Determinar a ação de EPEV sobre as concentrações de aminoácidos (Aspartato; Glutamato; Taurina e GABA) no córtex pré- frontal, hipocampo e corpo estriado de camundongos submetidos à isquemia cerebral global transitória.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos (30-35g), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), ambientados em grupos de 10 animais em caixas de propileno 26 ± 2 °C, a um ciclo claro/escuro de 12 h, recebendo ração padrão e água “ad libitum”. O peso dos animais foi monitorado diariamente, 60 minutos antes da administração das drogas para verificar sua saúde e responsividade à droga.

A presente pesquisa foi iniciada após aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa Animal (CEPA) da UFC, com protocolo nº 17/06 (em anexo) e os experimentos foram conduzidos de acordo com o Guia de Cuidados e Usos de Animais de Laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América (OLFERT *et al*, 1993).

4.2 Preparo do extrato

As cascas do caule de *Erythrina velutina Willd* (Fabaceae) foram coletadas em agosto de 2010, no município de Mulungu, Ceará. Exsicata da espécie (nº 44802) encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará.

O extrato foi produzido pelo Laboratório de Farmacognosia da Universidade Federal do Ceará e obtido a partir da droga vegetal previamente seca (80 ± 5 °C), em estufa com renovação e circulação de ar por 24h, pulverizada, em moinho de facas, com granulometria adequada, a qual foi submetida à extração por percolação precedida por maceração (24h), numa proporção 1:2 (p/p) entre droga vegetal e solvente. O solvente orgânico utilizado (etanol) foi evaporado ao final do processo extrativo em evaporador rotatório a 60°C. O extrato seco obtido, pó pardacento de odor característico, foi transferido para recipiente apropriado, identificado e armazenado.

O extrato foi caracterizado quando ao teor de fenóis totais com o emprego do reagente de Folin-Ciocalteu, onde foi encontrado o valor de $153,2 \pm 3,3$ µg de equivalente de ácido gálico (EAG)/mg de extrato, e quanto ao perfil cromatográfico por CLAE-DAD, onde foram identificados cinco metabólitos secundários, todos compostos fenólicos, tais como

hesperidina (Tr: 18,8 min), abissinina (Tr: 22,9 min), homoesperidina (Tr: 31,2 min), ácido rizônico (Tr: 32,1 min) e sigmoidina C (Tr: 38,6 min (dados não mostrados)).

4.3 Drogas utilizadas nos tratamentos

O protocolo de tratamento teve como base, além da planta em estudo as seguintes substâncias:

- Memantina (Ebix®) 10 mg comprimidos como controle positivo.
- Ketamina (Francotar – Virbac, Brasil®) (100 mg/mL ampola) utilizado como anestésico
- Cloridrato de Xilazina 2% (0,02g/mL) (Rompum® - Bayer, Brasil) utilizado como relaxante muscular.

Todas as substâncias foram dissolvidas em salina 0,9% e/ou DMSO 4% com exceção dos anestésicos. Os reagentes usados no preparo dos tampões e demais soluções foram de grau analítico.

4.4 Isquemia cerebral transitória por oclusão bilateral das artérias carótidas (Ulrich, 1998)

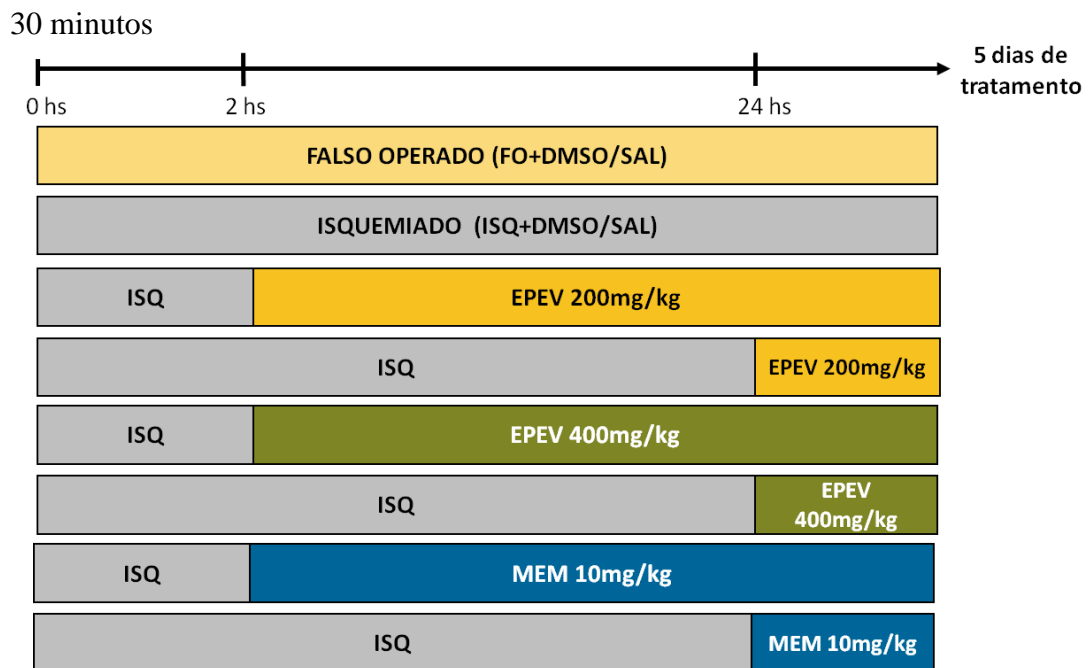
Os animais foram anestesiados com Ketamina (90 mg/kg) e Cloridrato de xilazina (10 mg/Kg) administrados por via intraperitoneal (i.p.) e imobilizados. Foi feito um corte vertical na altura da traquéia, para exposição das carótidas em ambos os lados. Após separação do nervo vago das artérias, estas foram pinçadas com pinça buldogue e submetidas à isquemia cerebral transitória durante 30 minutos. A temperatura retal foi monitorada e mantida em torno de 37°C com auxílio de uma luz incandescente. Após esse período, os buldogues foram removidos, o local da incisão foi suturado e os animais foram colocados em gaiolas individuais para recuperação da cirurgia com livre acesso a água e comida. O grupo falso-operado foi submetido a procedimento semelhante com exceção do clameamento das artérias carótidas.

4.5 Protocolo experimental

Após a cirurgia os animais foram divididos em grupos de 10 animais, de acordo com esquema de tratamento (Quadro 3):

Quadro 3. Grupos de tratamento

Isquemia durante



v.o. – via oral

* - O tratamento com o extrato padronizado de *Erythrina velutina* (EPEV) foi feito 2 ou 24 horas depois do início da isquemia cerebral transitória e continuado, diariamente, por 5 dias após a cirurgia. As doses foram definidas a partir de estudos prévios em nosso laboratório.

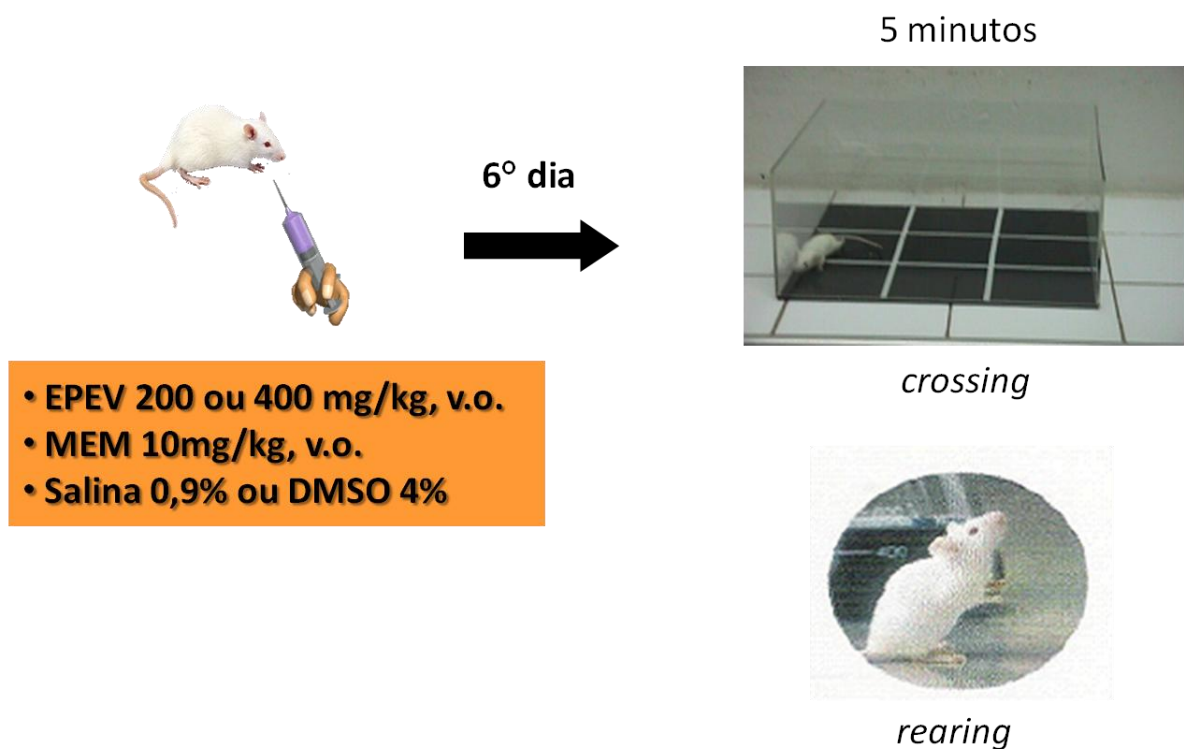
Após 24 horas do final do tratamento (6º dia), os animais foram submetidos aos testes de atividade locomotora, rota rod e memória, a seguir foram sacrificados e os cérebros dissecados sobre gelo para retirada do córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado utilizados para a determinação da concentração de aminoácidos.

4.6 Testes Comportamentais

4.6.1 Teste de atividade locomotora (*open field* – campo aberto)

Para verificar se o tratamento não alterou a atividade locomotora dos animais, o que prejudicaria a realização dos testes de memória, foi realizado o teste de atividade locomotora usando o modelo de Campo Aberto (*open field*) (BROADHURST, 1957). O teste foi executado vinte e quatro horas após o fim do tratamento com EPEV ou memantina. O campo aberto (Figura 4) consiste de uma arena de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm). O piso da arena é dividido em nove quadrados iguais. No teste o animal foi colocado na arena e deixado para explorar o ambiente por um (01) minuto, após este período foi registrado o número de quadrantes atravessados pelo animal, durante um tempo de (05) minutos. A arena foi higienizada com álcool a 20% após cada animal ser retirado, para evitar que o cheiro de urina e fezes interferisse no teste.

Figura 4 – Teste de Campo Aberto

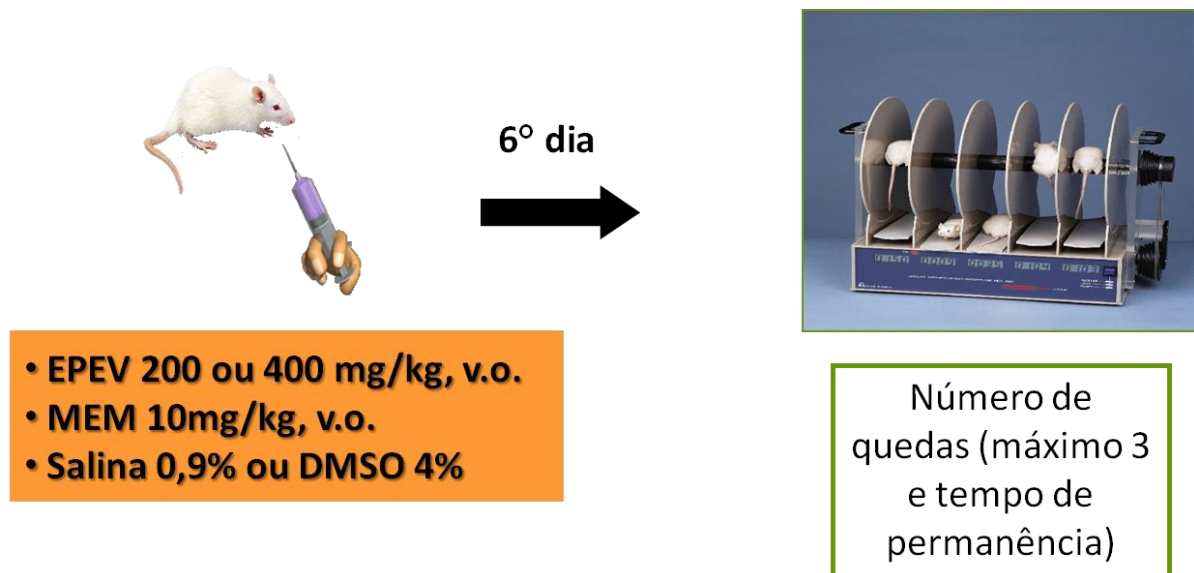


Fonte: Broadhurst, 1957.

4.6.2 Rota Rod

A coordenação motora dos animais foi avaliada no teste do *rota-rod*. O aparelho (Figura 5) consiste de uma barra rotacional, que no caso do teste rodava a uma velocidade constante de 12rpm. A barra é dividida em cinco compartimentos, porém apenas um animal foi avaliado por vez. O animal foi posicionado na barra e assim que começou a caminhar, o tempo foi marcado. O tempo em que o animal permaneceu caminhando na barra foi registrado, sendo que o tempo máximo de permanência no aparelho era de 1 minuto.

Figura 5 – Teste do Rota Rod



(DUNHAM e MIYA, 1957)

4.7 Testes de Memória

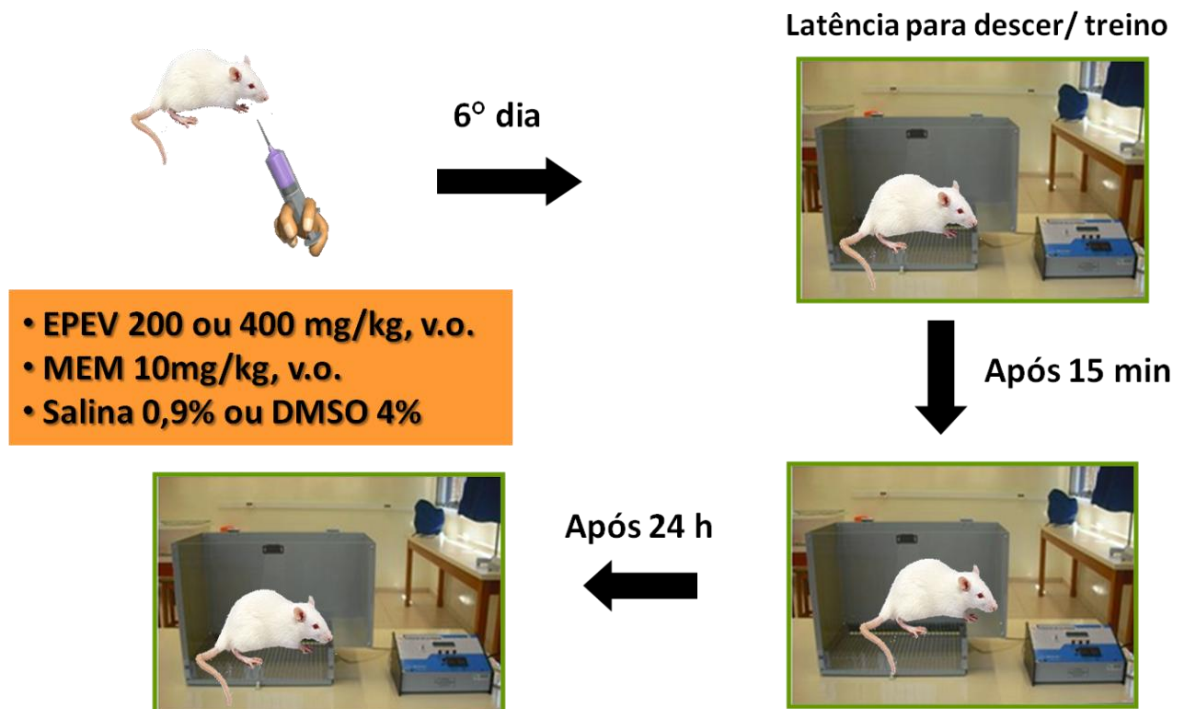
4.7.1 Esquiva Inibitória teste do tipo *step-down*

O modelo de esquiva inibitória (EI) utilizado permite avaliar a memória aversiva dos animais. No teste de EI do tipo *step-down*, o animal aprende a relacionar a descida de uma plataforma com um leve choque aplicado nas patas. Com isso, numa segunda exposição à

caixa de esquiva, o mesmo evita um comportamento inato de descer da plataforma para explorar a caixa.

O aparelho é constituído por uma caixa medindo 50 cm de comprimento 25 cm de largura e 25 cm de altura. A parte do chão é formada por barras paralelas de metal (1 mm de diâmetro). Os espaços entre as barras medem 1 cm e possui uma plataforma com 7 cm de largura e 2,5 cm de comprimento colocada junto à parede esquerda do aparelho (Figura 6) (IZQUIERDO; MEDINA, 1991).

Figura 6 - Teste de Esquiva inibitória



(IZQUIERDO e MEDINA, 1991)

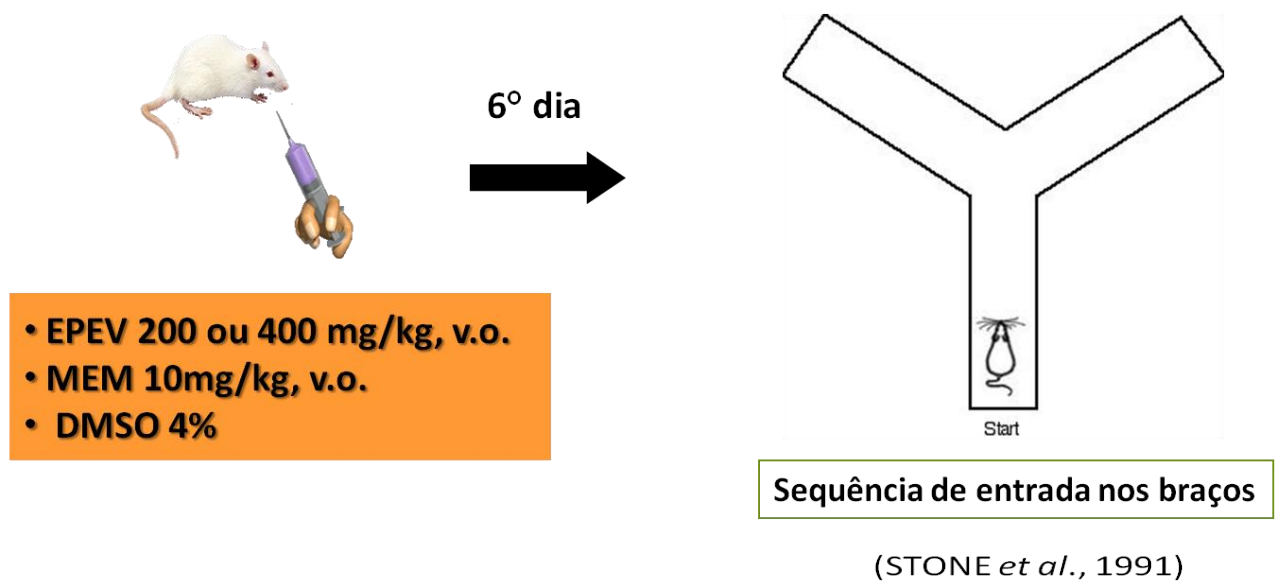
O animal foi colocado sobre a plataforma e o tempo de latência para descer sobre a grade (com as quatro patas) foi registrado. Na sessão de treino, imediatamente após o animal descer sobre a grade, ele foi estimulado com um leve choque nas patas (0.5 mA) durante 1 segundo. Cada animal foi exposto novamente duas vezes: 15min após o treino para verificar aquisição de memória de curta duração, e 24h após o treino para avaliação de memória de longa duração, realizando-se o mesmo procedimento, mas omitindo-se o choque, sendo registrada a latência para a descida da plataforma.

O aprendizado consiste em o animal não descer da plataforma, ou fazê-lo após um período de tempo maior que o observado quando desce a plataforma pela primeira vez (WALZ *et al.*, 1999).

4.7.2 Teste labirinto em Y (*Y-maze*)

A memória operacional (*working memory*) e o aprendizado foram avaliados pela taxa de alternações espontâneas em um labirinto em Y (Figura 7) com os três braços (40 x 5 x 16 cm) posicionados em ângulos iguais como descrito anteriormente por SARTER *et al.* (1988). Antes do teste, os braços foram numerados, o animal foi então, colocado em um braço e alternou espontaneamente as entradas nos outros durante 8 minutos. A sequencia dos braços os quais os animais entraram foi então anotada e as informações analisadas de forma a determinar o número de entradas no braço sem repetição.

Figura 7 - Teste Labirinto em Y



Uma alternção foi considerada correta se o animal visitou um novo braço e não retornou aos dois braços anteriormente visitados. Assim, a porcentagem das alternções foi calculada como a razão entre as alternções corretas (n) e o número de visitas realizadas durante o período de observação (n-2), multiplicado por 100.

$$\% \text{ Alternções espontâneas} = n / n-2 \times 100$$

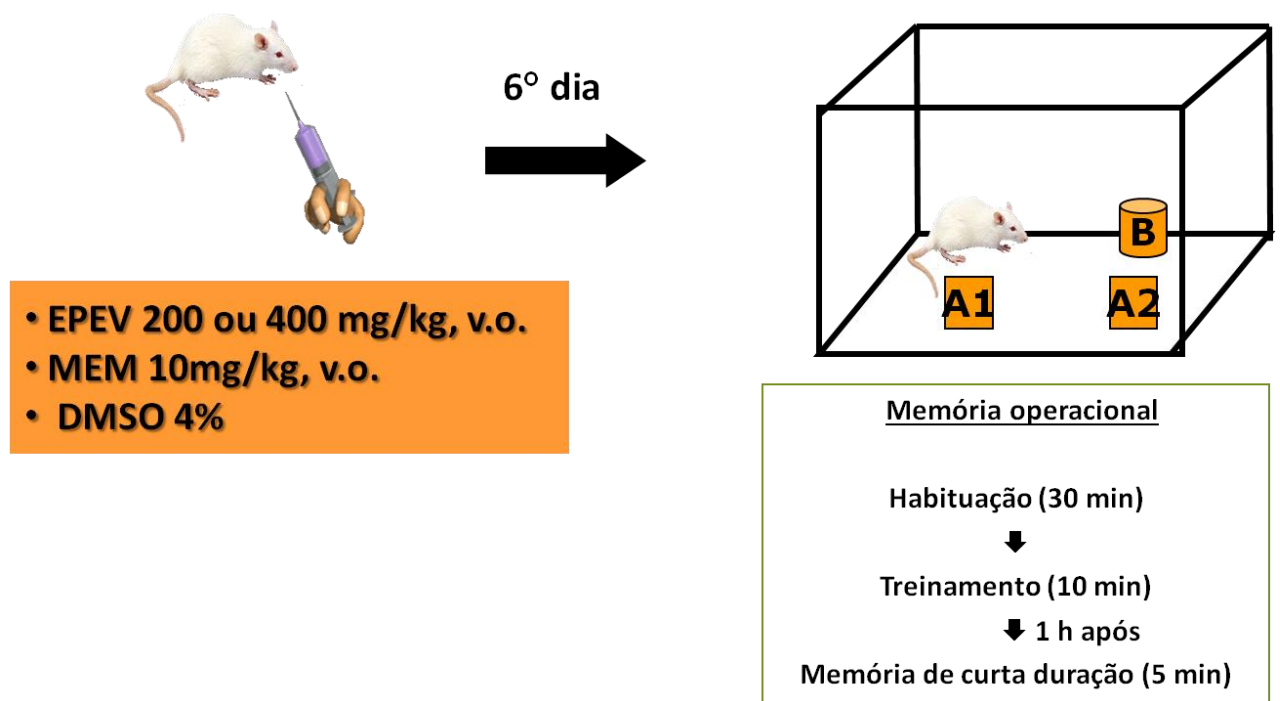
O sucesso do teste é indicado pela alta taxa de alternância nos grupos controle, indicando que os animais podem se lembrar em qual braço eles entraram por último (STONE *et al.*, 1991). Entre cada sessão, o labirinto foi higienizado com uma solução de álcool a 20% e secado com toalhas de papel.

4.7.3 Teste de reconhecimento de Objetos

Esse teste é muito usado para avaliar a capacidade de memorizar e reconhecer objetos, novos, e já conhecidos. No primeiro momento, antes de qualquer procedimento, foi feita a habituação, o animal foi colocado no canto superior esquerdo na caixa, e deixado por 30 minutos, sem nenhum objeto na caixa, para que se habituasse ao ambiente.

Após 30 minutos de habituação, na sessão treino, o animal foi recolocado na caixa, com dois objetos iguais A1 e A2 de brinquedo de Lego duplo (Figura 8), exatamente no meio da caixa, paralelos, e a 10 cm das paredes laterais, e deixado por 10 minutos para que os animais explorassem o ambiente livremente. O tempo de exploração de cada objeto foi cronometrado, para posterior análise através do índice de reconhecimento.

Figura 8 - Teste de reconhecimento de objetos



(IZQUIERDO, 2006)

No mesmo dia após 1 hora da sessão teste, foi testada a memória de trabalho, onde o animal foi recolocado na caixa, com dois objetos, um que ele já estava familiarizado, A1, e um objeto totalmente distinto, B1, de todos os outros, de cor, forma e tamanhos diferentes, o animal teve 5 minutos para explorar o ambiente (IZQUIERDO, 2006).

Para a análise dos resultados foi utilizado o índice de reconhecimento que é calculado pela fórmula $TB1 - TA1 / TE$ onde TB1 é o tempo gasto pelo animal para explorar o objeto novo. TA1 é o tempo gasto para explorar um objeto familiar, que já é conhecido do animal, e TE é o tempo de exploração total somatória do tempo de exploração do animal no objeto novo e antigo.

4.8 Testes Neuroquímicos

Os testes neuroquímicos foram realizados em tecidos cerebrais de animais tratados com o extrato padronizado da *Erythrina velutina* (EPEV). Após do último teste de comportamento, os animais foram sacrificados por rápida decapitação e seus cérebros foram removidos e lavados em solução salina gelada. As regiões cerebrais córtex Pré- frontal (PF), Hipocampo (HC), e Corpo Estriado (CE) foram dissecadas, congeladas e armazenadas a -70 °C até serem utilizadas para os ensaios.

4.8.1 Dosagem dos aminoácidos

Para a determinação das concentrações de aminoácidos, foi utilizado o sistema de HPLC com detector de fluorescência. A espectroscopia de fluorescência pode ser usada como um método de detecção específica (LINDROTH; MOPPER, 1979), e é um dos mais sensíveis para compostos que fluorescem. As áreas cerebrais córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado foram utilizadas para preparar homogenatos a 10 %. Os tecidos cerebrais foram sonicados em ácido perclórico (HClO₄) a 1% por 30s e centrifugados por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 15.000 rpm. O sobrenadante foi separado e posteriormente filtrado através de uma membrana. Um minuto depois do início dessa associação uma alíquota de 20 µl foi retirada e injetada no sistema de HPLC para análise química.

Para a determinação das concentrações dos aminoácidos, uma coluna de fase-reversa C18 (Shimadzu, Japão), foi utilizada. A fase móvel composta de duas fases: A (pH 6,95)- acetato de sódio (0,1 M), metanol (6 %, v/v) e tetrahydrofurano (1,5 %); B- Metanol puro (100 %), correu em um fluxo de 1,0 ml/min em um gradiente de 30 min de duração

(MASSIEU; TAPIA, 1997). Os cromatogramas foram registrados e quantificados por um computador usando um software da Shimadzu. As concentrações de Aspartato, Glutamato, Glicina, Taurina e GABA foram determinadas por comparação com os padrões injetados no HPLC no dia do experimento e foram expressos em $\mu\text{mol/g}$ de tecido.

4.9 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism, versão 5.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego Califórnia EUA. Copyright (c) 1992 – 2007. Os resultados dos experimentos comportamentais e neuroquímicos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Foram utilizados testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para a análise estatística dos testes de memória (*y-maze* e reconhecimento de objetos) e testes paramétricos analisados através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey como teste *post-hoc* para comparações múltiplas para os demais testes. Valores significativos para ambas as análises foram consideradas quando $p < 0,05$.

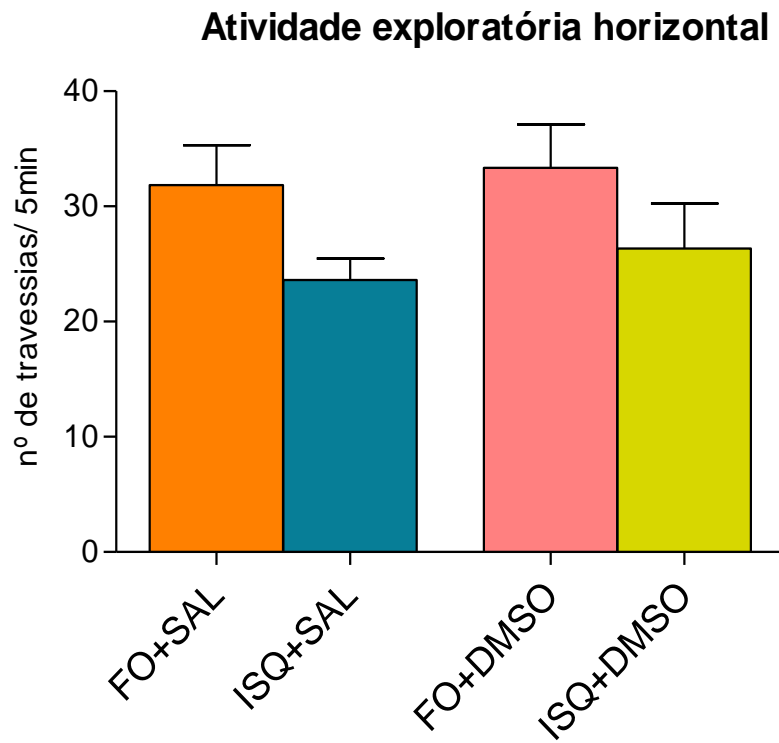
5 RESULTADOS

5.1 Testes Comportamentais

5.1.1 Efeito da administração dos diluentes Salina ou DMSO em camundongos submetidos à isquemia global transitória no Teste da Atividade Locomotora (Campo Aberto)

Com o intuito de avaliar a repercussão do procedimento isquêmico na atividade locomotora dos animais, foi comparada tanto a atividade exploratória horizontal (*crossing*) como a atividade exploratória vertical (*rearing*) dos animais falsos operados (FO) com os animais submetidos à oclusão bilateral das carótidas (ISQ) ambos tratados com os diluentes utilizados no estudo salina (SAL) e DMSO. Não foi observada diferença significativa no comportamento de *crossing* (Nº de eventos: FO + SAL: $31,85 \pm 3,45$; ISQ + SAL: $23,6 \pm 1,88$; FO + DMSO: $33,36 \pm 3,74$; ISQ + DMSO: $26,33 \pm 3,90$) (Figura 9). No entanto, em relação aos *rearings*, observou-se uma diminuição deste comportamento no grupo submetido à isquemia global em relação aos animais falso operado tratado com os diluentes (Nº de eventos: FO + SAL: $9,16 \pm 1,41$; ISQ + SAL: $2,16 \pm 0,48$; FO + DMSO: $15,4 \pm 2,60$; ISQ + DMSO: $3,71 \pm 1,45$) (Figura 10).

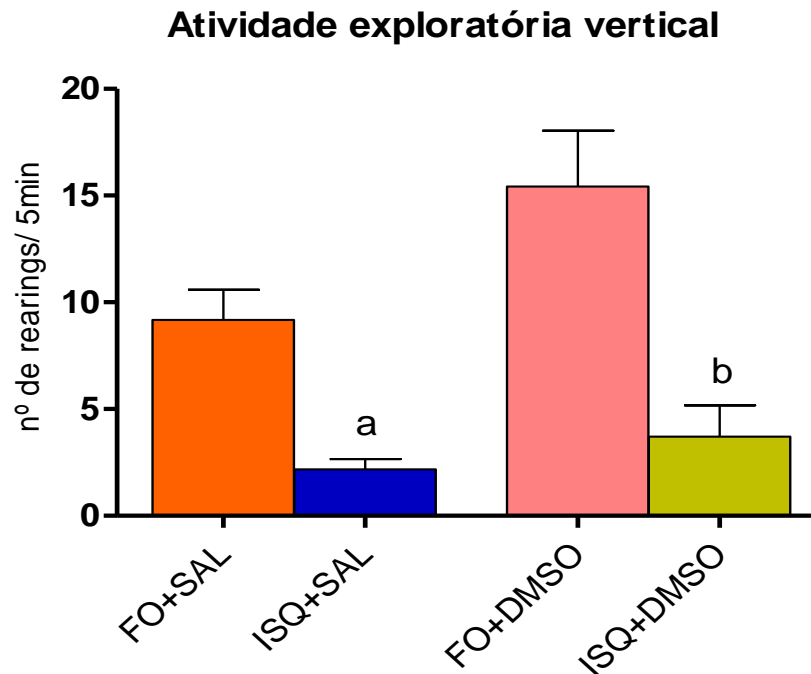
Figura 9 - Efeito da administração dos diluentes Salina ou DMSO no número de *crossings* (teste de campo aberto) de camundongos submetidos à isquemia global transitória por oclusão bilateral das carótidas por 30 min (n=10).



O tratamento foi realizado 2 ou 24 horas depois da cirurgia. Testes de one way ANOVA seguido do teste de Turkey. Os valores representam a média \pm EPM.

Abreviações: FO – falso operado, ISQ – isquemiado, SAL – salina, DMSO – dimetilsufóxido.

Figura 10 - Efeito da administração dos diluentes Salina ou DMSO no número de rearing (teste de campo aberto) de camundongos submetidos à isquemia global transitória por oclusão bilateral das carótidas por 30 min (n=10).



O tratamento foi realizado 2 ou 24 horas depois da cirurgia. ^a vs FO + SAL ; ^b vs FO + DMSO, $p < 0.05$. Testes de one way ANOVA seguido do teste de Turkey. Os valores representam a média \pm EPM.

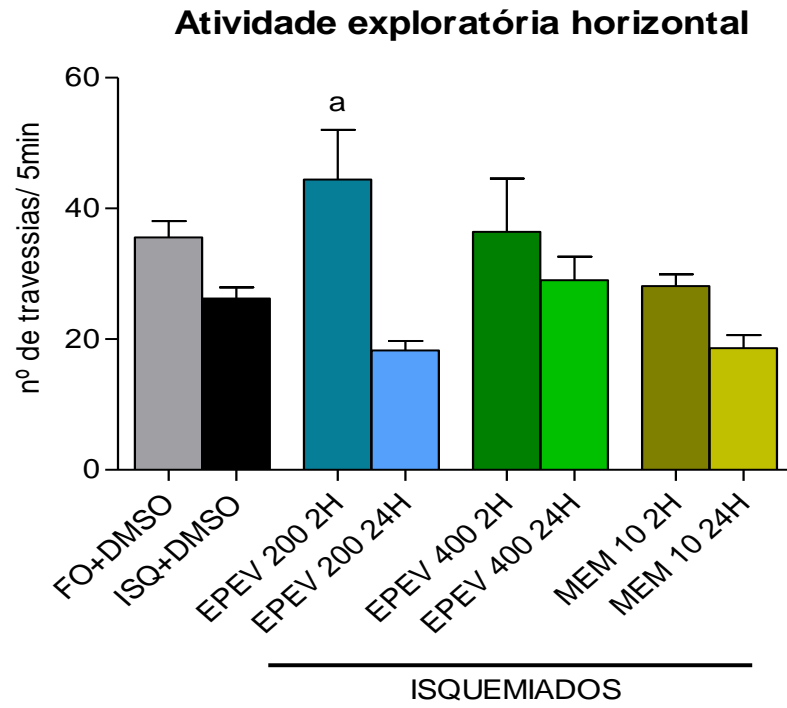
Abreviações: FO – falso operado, ISQ – isquemiado, SAL – salina, DMSO – dimetilsulfóxido.

5.1.2 Efeito do EPEV (200 ou 400mg) sobre atividade locomotora de camundongos submetidos à isquemia global transitória: teste de campo aberto.

Como exposto anteriormente, o tratamento dos animais falsos operados e isquemiados tratados com os diluentes salina e DMSO não demonstraram diferenças estatísticas no teste de campo aberto. Dessa forma, o presente estudo prosseguiu considerando como grupo controle aqueles animais tratados com DMSO.

Na comparação dos grupos isquemiados com o falso operado só foi possível verificar alteração significativa entre os grupos ISQ + DMSO e EPEV 200 2H em relação ao número de *crossings* (Nº de eventos: FO + DMSO: $35,6 \pm 2,45$; ISQ + DMSO: $26,2 \pm 1,69$; ISQ + EPEV 200 2H: $44,4 \pm 7,64$; ISQ + EPEV 200 24H: $18,2 \pm 1,44$; ISQ + EPEV 400 2H: $36,4 \pm 8,16$; ISQ + EPEV 400 24H - $29,0 \pm 3,6$; MEM 10 2H: $28,1 \pm 1,81$; MEM 10 24H: $18,6 \pm 2,02$) (Figura 11). No entanto, em relação aos *rearings*, observou-se uma diminuição, significativa, deste comportamento no grupo submetido à isquemia em relação ao grupo falso-operado e uma reversão desta diminuição somente pelo tratamento com EPVE na dose de 200mg com 2H (Nº de eventos: FO + DMSO: $10,9 \pm 1,35$; ISQ + DMSO: $2,80 \pm 0,59$; ISQ + EPVE 200 2H: $8,0 \pm 0,89$; ISQ + EPVE 200 24H: $1,66 \pm 1,11$; ISQ + EPVE 400 2H: $5,50 \pm 1,45$; ISQ + EPVE 400 24H: $3,0 \pm 0,44$; MEM 10 2H: $2,60 \pm 0,51$; MEM 10 24H: $2,50 \pm 1,14$) (Figura 12).

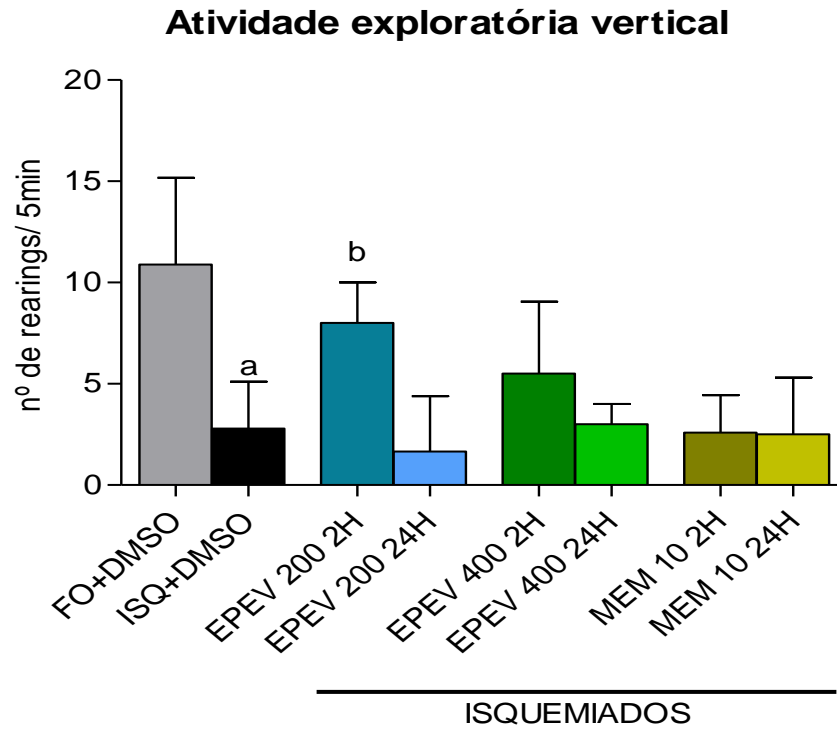
Figura 11 - Efeito do tratamento com EPEV (200 e 400mg) ou Memantina (10mg) no número de *crossings* (teste de campo aberto) de camundongos submetidos à isquemia global transitória por oclusão bilateral das carótidas por 30 min (n=10).



O tratamento foi realizado 2 ou 24 horas depois da cirurgia. ^a vs ISQ + DMSO, $p < 0.05$. Testes de one way ANOVA seguido do teste de Tukey. Os valores representam a média \pm EPM.

Abreviações: DMSO - dimetilsufóxido, ISQ- isquemia, MEM – Memantina, EPEV – extrato padronizado de *Erythrina velutina*.

Figura 12 - Efeito do tratamento com EPEV (200 e 400mg) ou Memantina (10mg) no número de *rearing* (teste de campo aberto) de camundongos submetidos à isquemia por oclusão bilateral das carótidas por 30 min (n=10).



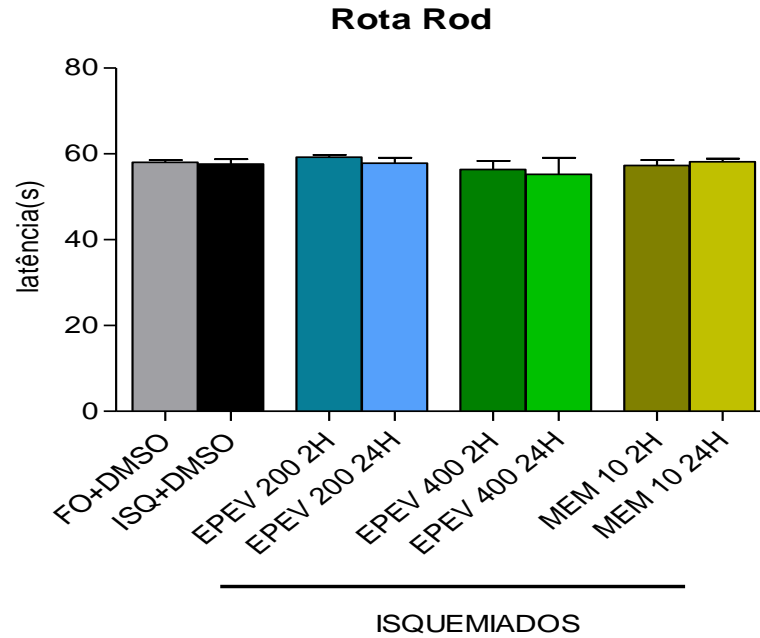
O tratamento foi realizado 2 ou 24 horas depois da cirurgia. ^a vs FO + DMSO, ^b vs ISQ + DMSO, $p < 0.05$. Testes de one way ANOVA seguido do teste de Tukey. Os valores representam a média \pm EPM.

Abreviações: DMSO - dimetilsulfóxido, ISQ - isquemia, MEM - Memantina, EPEV - extrato padronizado de *Erythrina velutina*.

5.1.3 Efeito do EPEV (200 ou 400mg) em camundongos submetidos à isquemia global transitória no Teste de *Rota Rod*.

Os resultados obtidos no teste do *rota-rod* foram ilustrados na Figura 13. Como pode ser observado, não foram verificadas diferenças significativas no desempenho dos animais isquemiados tratados com a solução controle em comparação aos animais tratados com EPEV ou Memantina, indicando que não houve prejuízos na realização dessa tarefa, mesmo depois da isquemia cerebral global transitória. (Latência (s): FO + DMSO 58,0: \pm 0,57; ISQ + DMSO: 57,6 \pm 1,11; ISQ + EPEV 200 2H: 59,2 \pm 0,58; ISQ + EPEV 200 24H: 57,8 \pm 1,24; ISQ + EPEV 400 2H: 56,3 \pm 2,0; ISQ + EPEV 400 24H: 55,2 \pm 3,87; MEM 10 2H: 57,3 \pm 1,28; MEM 10 24H: 58,1 \pm 0,70)

Figura 13 - Efeito do tratamento com EPEV (200 ou 400mg) ou Memantina (10mg) no tempo de latência do animal na barra de *Rota rod*, submetidos à isquemia global transitória por oclusão bilateral das carótidas por 30 min (n=10).



O tratamento foi realizado 2 ou 24 horas depois da cirurgia. Testes de one way ANOVA seguido do teste de Tukey. Os valores representam a média \pm EPM.

Abreviações: DMSO - dimetilsulfóxido, ISQ- isquemia, MEM – Memantina, EPEV – extrato padronizado de *Erythrina velutina*.

5.2 Testes de Memória

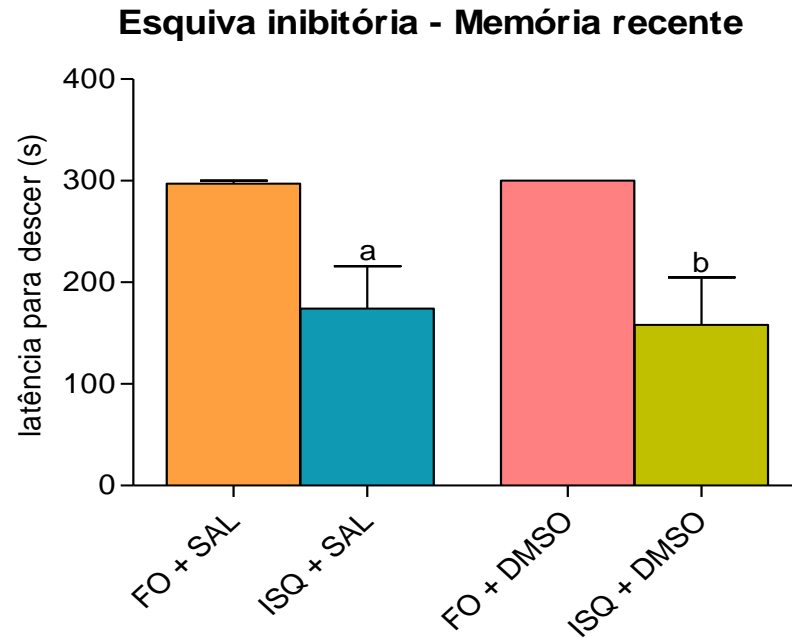
5.2.1 Efeito do EPEV (200 ou 400mg) em camundongos submetidos à isquemia global transitória no Teste de esQUIVA inibitória (*Step down*)

Na avaliação da memória aversiva através do teste de *step down*, os animais aprendem a evitar o choque (treino) não entrando no lado de piso eletrificado do aparelho, quando avaliados 15 minutos após o choque (memória recente) ou 24 horas após o choque (memória tardia). Os animais do grupo isquemiados (ISQ) tratados com diluentes apresentaram um prejuízo na retenção da memória, tanto na fase imediata (Memória Recente: FO + SAL: $297,0 \pm 3,0$ s; ISQ + SAL: $174,2 \pm 41,78$ s; FO + DMSO: $300,0 \pm 0,0$; ISQ + DMSO: $158,0 \pm 46,94$) (Figura 14), quanto na fase de consolidação (Memória Tardia: FO + SAL: $300,0 \pm 0,0$ s; ISQ + SAL: $149,7 \pm 42,07$ s; FO + DMSO: $300,0 \pm 0,0$; ISQ + DMSO: $206,0 \pm 43,23$) (Figura 15), quando comparados com o grupo falso operado (FO).

O tratamento dos animais falso operados e isquemiados tratados com os diluentes salina e DMSO não demonstraram diferenças significativas entre si, caracterizando um efeito semelhante nos testes de memória, dessa forma foi considerado para análise dos testes utilizados no estudo um único grupo tratado esse com DMSO.

Os animais submetidos à isquemia global apresentaram déficit na aprendizagem e dano na aquisição e na retenção da memória (Memória Recente: ISQ + DMSO: $109,9 \pm 33,16$ s; Memória Tardia: ISQ + DMSO: $103,9 \pm 33,79$ s) apresentando uma diferença significativa nesse tempo em relação aos controles como visto anteriormente. Porém esse resultado foi revertido pelo tratamento com EPEV (200 ou 400 mg) como também pela controle positivo Memantina (10 mg), verificando-se um aumento significativo no tempo de permanência na plataforma não eletrificada 15 minutos após o choque (Memória Recente: EPEV 200 2H: $300,0 \pm 0,0$; EPEV 200 24H: $300,0 \pm 0,0$; EPEV 400 2H: $292,2 \pm 7,77$; EPEV 400 24H: $211,8 \pm 29,43$; MEM 10 2H: $228,6 \pm 33,39$ s; MEM 10 24H: $293,5 \pm 6,5$ s) (Figura 16), um resultado semelhante pode ser visto 24 horas após o choque (Memória Tardia: EPEV 200 2H: $270,7 \pm 25,66$; EPEV 200 24H: $249,3 \pm 34,08$; EPEV 400 2H: $300,0 \pm 0,0$; EPEV 400 24H: $256,6 \pm 28,16$; MEM 10 2H: $244,7 \pm 36,8$ s; MEM 10 24H: $248,7 \pm 34,2$ s) (Figura 17).

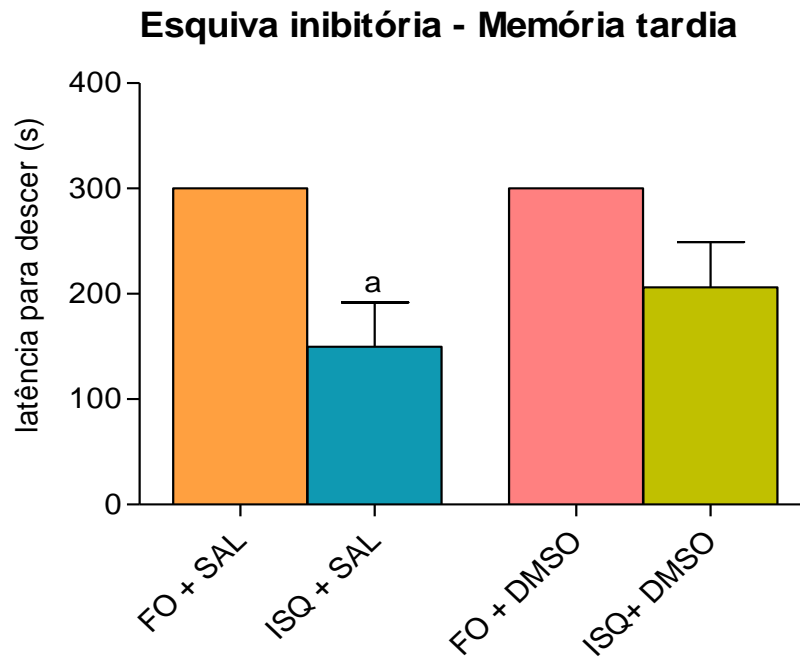
Figura 14 - Efeito do tratamento com diluentes Salina e DMSO na aquisição de memória recente (teste de *step down*) de camundongos submetidos à isquemia global transitória por oclusão bilateral das carótidas por 30 min (n=10).



O tratamento foi realizado 2 horas depois da isquemia ^a vs FO + SAL; ^b vs FO + DMSO; $p < 0.05$; Testes de one way ANOVA e Tukey. Os valores representam a média \pm EPM.

Abreviações: DMSO - dimetilsulfóxido, SAL - salina, ISQ- isquemia.

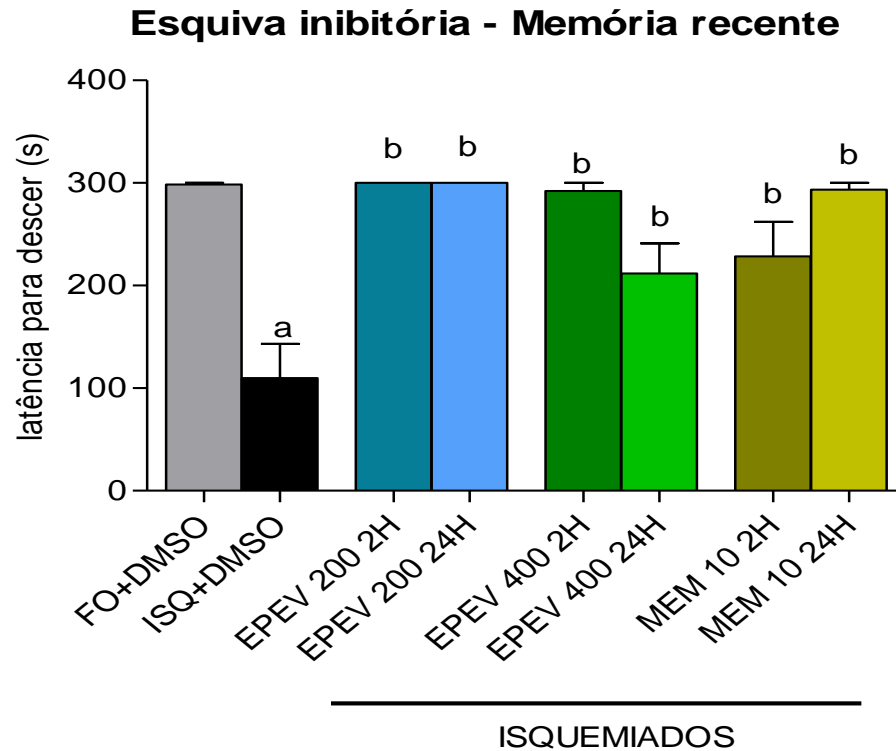
Figura 15 - Efeito do tratamento com diluentes Salina e DMSO na aquisição de memória tardia (teste de *step down*) de camundongos submetidos à isquemia global transitória por oclusão bilateral das carótidas por 30 min (n=10).



O tratamento foi realizado 2 horas depois da isquemia ^a vs FO + SAL; $p < 0.05$; Testes de one way ANOVA e Tukey. Os valores representam a média \pm EPM.

Abreviações: DMSO - dimetilsufóxido, SAL - salina, ISQ- isquemia

Figura 16 - Efeito do tratamento com EPVE (200 e 400 mg) ou Memantina (10 mg) na aquisição de memória recente (teste de *step down*) de camundongos submetidos à isquemia global transitória por oclusão bilateral das carótidas por 30 min (n=10).

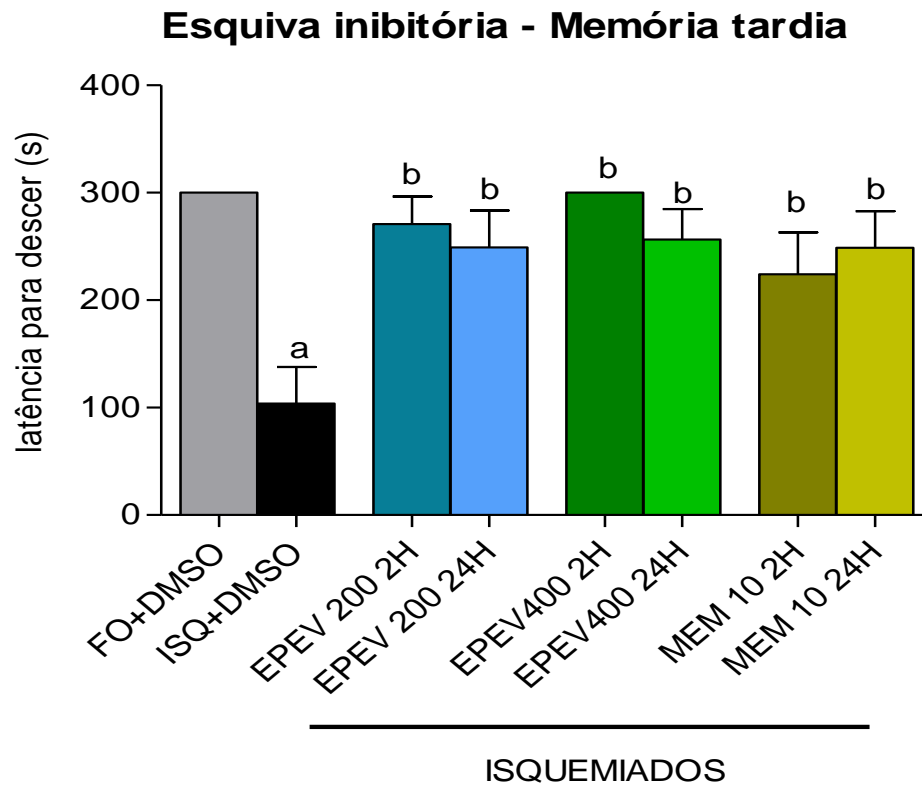


O tratamento foi realizado 2 ou 24 horas depois da isquemia ^a vs FO + DMSO; ^b vs ISQ + DMSO p<0.05;

Testes de one way ANOVA e Tukey. Os valores representam a média ± EPM

Abreviações: DMSO - dimetilsufóxido, ISQ- isquemia, MEM – Memantina, EPVE – extrato padronizado de *Erythrina velutina*.

Figura 17 - Efeito do tratamento com EPVE (200 e 400 mg) ou Memantina (10 mg) na aquisição de memória tardia (teste de *step down*) de camundongos submetidos à isquemia global transitória por oclusão bilateral das carótidas por 30 min (n=10).



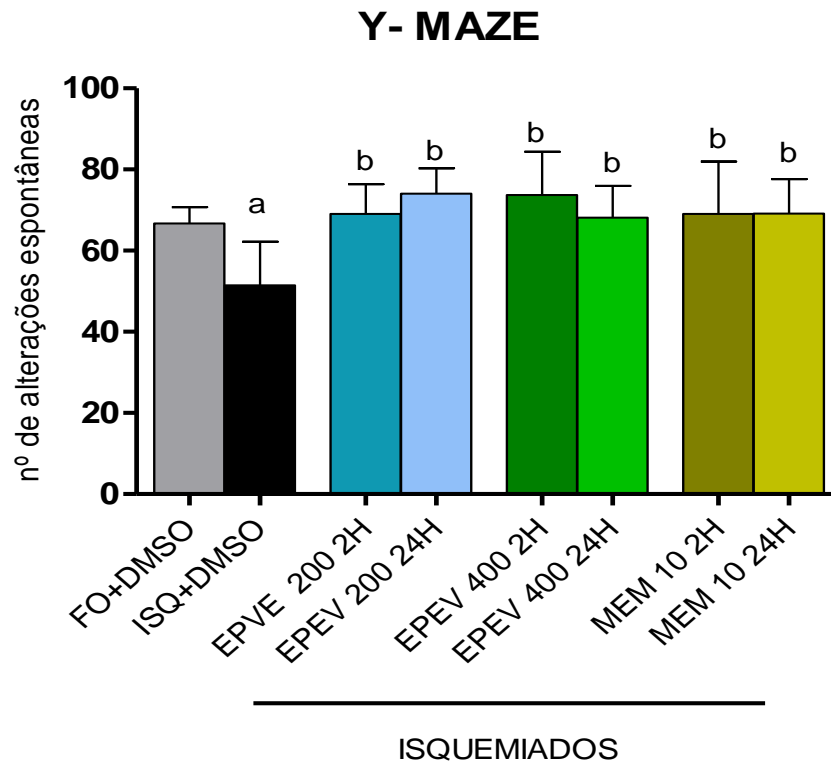
O tratamento foi realizado 2 ou 24 horas depois da isquemia ^a vs FO +DMSO; ^b vs ISQ + DMSO $p < 0.05$; Testes de one way ANOVA e Tukey. Os valores representam a média \pm EPM

Abreviações: DMSO - dimetilsufóxido, ISQ- isquemia, MEM – Memantina, EPVE – extrato padronizado de *Erythrina velutina*.

5.2.2 Efeito do EPVE (200 ou 400mg) em camundongos submetidos à isquemia global transitória no Teste de labirinto em Y.

Os resultados apresentados no teste de memória do Labirinto em Y (*Y-Maze*), que avalia a memória operacional (*working memory*) demonstraram uma diminuição da percentagem de alterações espontâneas nos animais que sofreram isquemia (ISQ + DMSO - $51,4 \pm 4,0\%$) em relação aos animais falso-operados (FO + DMSO: $66,7 \pm 1,1\%$), assim como a reversão deste déficit de memória, pelo tratamento tanto com *E. velutina* nas doses de 200 e 400 mg (EPEV 200 2H: $69,0 \pm 3,0\%$; EPEV 200 24H: $74,00 \pm 2,8\%$; EPEV 400 2H: $73,7 \pm 4,0\%$; EPEV 400 24H: $68,0 \pm 2,7\%$;) quanto com Memantina 10mg (MEM 10 2H: $69,0 \pm 5,2\%$; MEM 10 24H: $69,1 \pm 3,4\%$) (Figura 18).

Figura 18- Efeito do tratamento com EPVE (200 e 400 mg) ou Memantina (10 mg) e na memória operacional (teste de *Y maze*) de camundongos submetidos à isquemia global transitória por oclusão bilateral das carótidas por 30 min (n=10).



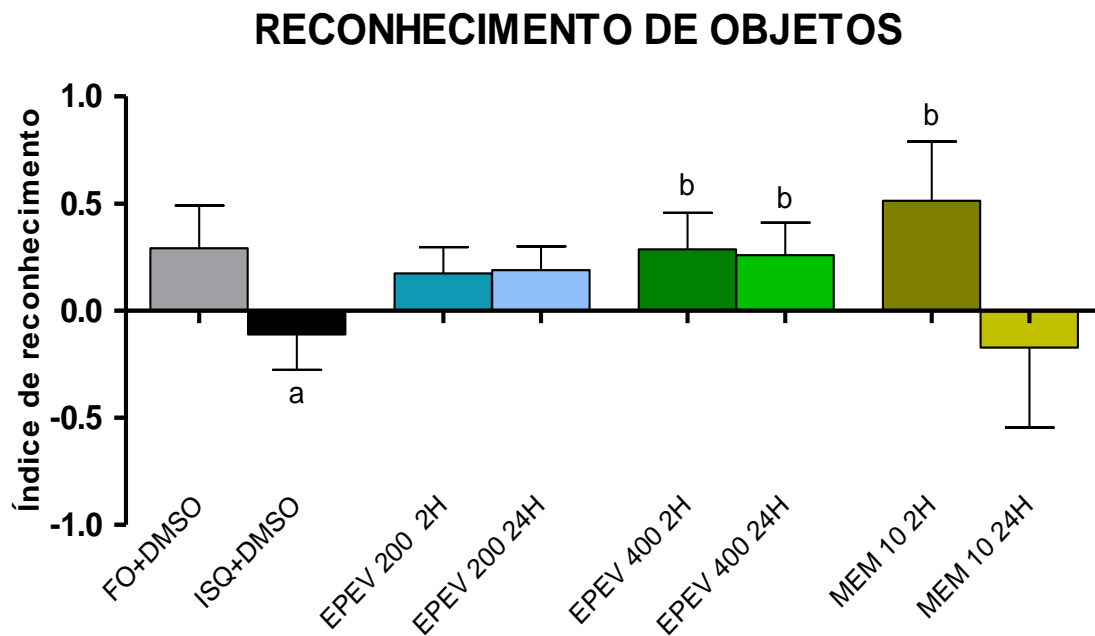
O tratamento foi realizado 2 ou 24 horas depois da isquemia ^a vs FO +DMSO; ^b vs ISQ + DMSO $p < 0.05$; Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores representam a média \pm EPM.

Abreviações: DMSO - dimetilsufóxido, ISQ- isquemia, MEM – Memantina, EPVE – extrato padronizado de *Erythrina velutina*.

5.2.3 Efeito do EPEV (200 ou 400mg) em camundongos submetidos à isquemia global transitória no Teste de reconhecimento de objetos.

O teste de memória de reconhecimento de objetos, que tem como objetivo avaliar a memória de trabalho demonstrou uma diminuição no índice de reconhecimento pelos animais que sofreram isquemia (ISQ + DMSO: $0,11 \pm 0,05$) em relação aos animais falso-operados (FO + DMSO: $0,29 \pm 0,07$), assim como um aumento do índice, pelos animais tratados tanto com *E.velutina* na dose de 400 mg (EPEV 400 2H : $0,28 \pm 0,06$; EPEV 400 24H: $0,26 \pm 0,06$) como Memantina 10mg (MEM 10 2H: $0,51 \pm 0,12$) (Figura 19).

Figura 19- Efeito do tratamento com EPEV (200 e 400 mg) ou Memantina (10 mg) na memória operacional (teste de reconhecimento de objetos) de camundongos submetidos à isquemia global transitória por oclusão bilateral das carótidas por 30 min (n=10).



O tratamento foi realizado 2 ou 24 horas depois da isquemia ^a vs FO +DMSO; ^b vs ISQ + DMSO $p < 0.05$; Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores representam a média \pm EPM.

Abreviações: DMSO - dimetilsufóxido, ISQ- isquemia, MEM – Memantina, EPEV – extrato padronizado de *Erythrina velutina*.

5.3 Dosagens de Aminoácidos

5.3.1 Determinação das concentrações de aminoácidos no córtex pré-frontal (CPF).

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram as concentrações dos aminoácidos excitatórios no CPF, após administrações de EPEV 2H ou 24H (200mg/kg ou 400mg/kg), MEM 2H e 24H (10mg/kg v.o) ou veículo sobre as concentrações de aminoácidos ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) em camundongos isquemiados. Os dados demonstram que houve um aumento na quantidade de aspartato e glutamato no CPF de animais isquemiados tratados com DMSO (ISQ + DMSO: $25,6 \pm 4,6$) quando comparado ao grupo controle (FO + DMSO: $3,28 \pm 0,9$). Entretanto, esse aumento de ASP pode ser revertido pela EPEV 400 (ISQ+ EPEV 400mg 24H : $8,7 \pm 1,5$) e MEM (ISQ + MEM 10mg 24H: $11,7 \pm 2,2$) quando administrada 24 horas depois da isquemia. A quantidade de GLU foi reduzida por ambas as doses de EPEV (ISQ+ EPEV 200mg 24H: $21,9 \pm 6,1$) e (ISQ+ EPEV 400mg 24H: $9,6 \pm 2,1$) somente com os tempos de 24h.

Quanto aos aminoácidos inibitórios no CPF, a Tabela 2 mostra as concentrações de glicina, taurina e GABA para os grupos estudados. Os grupos (ISQ + EPEV 200mg 24H: $355,7 \pm 71,0$) e (ISQ + EPEV 400mg 2H: $606,8 \pm 45,1$) apresentaram aumento significativo quando comparados ao controle isquemiado. O grupo (ISQ+ EPEV 200mg 2H: $54,3 \pm 15,6$) mostrou uma diminuição nas concentrações de GLI quando comparado ao grupo (ISQ + EPEV 200mg 24H: $355,7 \pm 71,0$), o mesmo foi mostrado pelo grupo (ISQ + EPEV 400mg 24H: $31,1 \pm 3,4$) quando comparado com o grupo (ISQ + EPEV 400mg 2H: $606,8 \pm 45,1$). O grupo (ISQ + MEM 10mg 24H: $278,4 \pm 49,2$) aumentou as concentrações de GLI quando comparado aos grupos (ISQ + DMSO: $41,2 \pm 9,5$) e (ISQ + MEM 10mg 2H: $34,7 \pm 4,3$). As concentrações de TAU mostram-se aumentadas no grupo (ISQ + DMSO: $271,0 \pm 57,6$) quando comparado com os grupos (FO + DMSO: $110,4 \pm 11,2$). Esse aumento de TAU foi revertido pelo EPEV, em ambas as doses, somente no tempo de 24h. Efeito semelhante foi observado no grupo de MEM (ISQ + MEM 10mg 24H: $56,3 \pm 15,8$) com esse mesmo tempo de tratamento. Os grupos (ISQ + EPEV 200mg 2H: $263,5 \pm 37,2$); (ISQ+ EPEV 400mg 2H: $235,1 \pm 52,8$); (ISQ + MEM 10mg 24H: $300,4 \pm 49,7$) apresentaram um aumento nas concentrações de GABA quando comparados ao grupo controle (ISQ + DMSO: $115,6 \pm 27,4$). Um aumento nas concentrações desse aminoácido em relação ao tempo de administração da droga, também, pode ser visto quando comparado o grupo (ISQ + MEM 10mg 2H: $138,0 \pm 21,8$) e (ISQ + MEM 10mg 24H: $300,4 \pm 49,7$).

Tabela 1. Efeito do EPEV (200 ou 400mg) sobre a ação de aminoácidos excitatórios no córtex pré-frontal de camundongos submetidos à isquemia global transitória.

<i>Grupos</i>	Aspartato ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)	Glutamato ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)
FO + DMSO	3,28 \pm 0,9(5)	21,0 \pm 4,4(9)
ISQ + DMSO	25,6 \pm 4,6(10) ^a	68,0 \pm 16,3(12) ^a
ISQ + EPEV 200mg 2H	33,2 \pm 6,2(7)	40,2 \pm 2,0(6)
ISQ + EPEV200mg 24H	38,4 \pm 6,9(7)	21,9 \pm 6,1(7) ^b
ISQ+ EPEV 400mg 2H	39,5 \pm 1,6(7)	42,0 \pm 5,1(7)
ISQ+ EPEV 400mg 24H	8,7 \pm 1,5 (9) ^b	9,6 \pm 2,1(6) ^{b,c}
ISQ + MEM 10mg 2H	15,6 \pm 1,5 (6)	45,2 \pm 9,9(6)
ISQ + MEM 10mg 24H	11,7 \pm 2,2(8) ^b	84,7 \pm 12,3(8)

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. a, b , c (p <0.05), quando comparado com FO + DMSO, ISQ + DMSO e EPEV 400mg 2H, respectivamente. A análise estatística foi determinada por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

Tabela 2. Efeito do EPEV (200 ou 400mg) sobre a ação de aminoácidos inibitórios no córtex pré-frontal de camundongos submetidos à isquemia global transitória.

<i>Grupos</i>	Glicina ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)	Taurina ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)	GABA ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)
FO + DMSO	40,0 \pm 9,3(9)	110,4 \pm 11,2 (10)	115,0 \pm 23,8(11)
ISQ + DMSO	41,2 \pm 9,5(12)	271,0 \pm 57,6(11) ^a	115,6 \pm 27,4 (10)
ISQ + EPEV 200mg 2H	54,3 \pm 15,6(6)	237,4 \pm 37,7(9)	263,5 \pm 37,2(8) ^b
ISQ + EPEV 200mg 24H	355,7 \pm 71,0(8) ^{b,c}	146,8 \pm 22,3(5) ^b	191,9 \pm 59,0(9)
ISQ+ EPEV 400mg 2H	606,8 \pm 45,1(7) ^b	126,7 \pm 8,8(7)	214,7 \pm 13,9(6) ^b
ISQ+ EPEV 400mg 24H	31,1 \pm 3,4(8) ^d	38,4 \pm 6,9 (8) ^b	235,1 \pm 52,8(9) ^b
ISQ + MEM 10mg 2H	34,7 \pm 4,3(6)	321,4 \pm 65,19(6)	138,0 \pm 21,8(6)
ISQ + MEM 10mg 24H	278,4 \pm 49,2(8) ^{b,e}	56,3 \pm 15,8(8) ^b	300,4 \pm 49,7(9) ^{b,e}

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. a, b, c, d, e ($p < 0.05$), quando comparado com FO + DMSO, ISQ + DMSO, EPEV 200mg 2H e EPEV 400mg 2H, MEM 10mg 2H respectivamente. A análise estatística foi determinada por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

5.3.2 Determinação das concentrações de aminoácidos no hipocampo

A dosagem de aminoácidos excitatórios no hipocampo pode ser vista na Tabela 3. Os resultados encontrados mostraram que as concentrações de ASP e GLU foram aumentadas no grupo isquemiado (ISQ + DMSO: $41,8 \pm 8,5$); (ISQ + DMSO: $280,3 \pm 46,2$) quando comparado com o controle (FO + DMSO: $14,6 \pm 3,4$); (FO + DMSO: $45,0 \pm 7,7$). Entretanto o tratamento com EPEV e MEM, nos dois tempos de início de tratamento 2 ou 24H, foram capazes de reverter esse efeito.

Os aminoácidos inibitórios do hipocampo, apresentados na Tabela 4, mostraram valores semelhantes aos encontrados no CPF. Os valores de glicina aumentaram, significativamente, nos grupos, (ISQ + EPEV 200mg 24H: $172,9 \pm 29,8$); (ISQ+ EPEV 400mg 24H: $109,8 \pm 36,5$); (ISQ + MEM 10mg 24H: $444,8 \pm 72,8$) quando comparados com o controle isquemiado (ISQ + DMSO: $24,1 \pm 4,3$). Os grupos ISQ + EPEV 200mg 24H e MEM 10mg 24H também demonstraram uma aumento nas concentrações de GLI quando comparados aos grupos (ISQ + EPEV 200mg 2H: $16,7 \pm 4,0$); (ISQ + MEM 10mg 2H: $11,7 \pm 2,1$), respectivamente. TAU e GABA apresentaram-se em concentrações menores nos animais (ISQ + DMSO: $15,4 \pm 2,7$), (ISQ + DMSO: $109,3 \pm 19,9$) quando comparados com o controle (FO + DMSO: $104,1 \pm 22,8$), (FO + DMSO: $252,1 \pm 38,5$), respectivamente. As concentrações de TAU foram aumentados em praticamente todos os grupos (ISQ + EPEV 200mg 2H: $198,7 \pm 36,2$), (ISQ + EPEV 200mg 24H: $160,6 \pm 37,6$), (ISQ+ EPEV 400mg 2H: $160,6 \pm 37,6$), (ISQ + MEM 10mg 2H: $181,3 \pm 36,9$), (ISQ + MEM 10mg 24H: $117,0 \pm 13,8$) quando comparados com o controle isquemiado. Já as concentrações de GABA só foram revertidos pelos grupos (ISQ+ EPEV 400mg 24H: $280,8 \pm 73,0$); (ISQ + MEM 10mg 24H: $468,0 \pm 63,9$) quando comparados ao grupo isquemiado (ISQ + DMSO: $109,3 \pm 19,9$).

Tabela 3. Efeito do EPEV (200 ou 400mg) sobre a ação de aminoácidos excitatórios no hipocampo de camundongos submetidos à isquemia global transitória.

<i>Grupos</i>	Aspartato ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)	Glutamato ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)
FO + DMSO	14,6 \pm 3,4 (9)	45,0 \pm 7,7(7)
ISQ + DMSO	41,8 \pm 8,5 (8) ^a	280,3 \pm 46,2(7) ^a
ISQ + EPEV 200mg 2H	18,8 \pm 2,8(6) ^b	56,2 \pm 11,6(7) ^b
ISQ + EPEV200mg 24H	21,9 \pm 3,4(7) ^b	37,2 \pm 8,6(6) ^b
ISQ+ EPEV 400mg 2H	29,7 \pm 3,6(5)	45,3 \pm 3,0(6) ^b
ISQ+ EPEV 400mg 24H	7,2 \pm 1,1(7) ^b	11,6 \pm 3,4(5) ^b
ISQ + MEM 10mg 2H	23,0 \pm 5,4(6)	24,0 \pm 1,7(6) ^b
ISQ + MEM 10mg 24H	22,0 \pm 5,2(8)	184,4 \pm 28,0(10) ^b

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. a, b ($p < 0.05$), quando comparado com FO + DMSO e ISQ + DMSO, respectivamente. A análise estatística foi determinada por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

Tabela 4. Efeito do EPEV (200 ou 400mg) sobre a ação de aminoácidos inibitórios no hipocampo de camundongos submetidos à isquemia global transitória.

<i>Grupos</i>	Glicina ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)	Taurina ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)	GABA ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)
FO + DMSO	45,9 \pm 9,0(10)	104,1 \pm 22,8 (9)	252,1 \pm 38,5(6)
ISQ + DMSO	24,1 \pm 4,3(7)	15,4 \pm 2,7(8) ^a	109,3 \pm 19,9(7) ^a
ISQ + EPEV 200mg 2H	16,7 \pm 4,0(6)	198,7 \pm 36,2(8) ^b	191,7 \pm 39,8(6)
ISQ + EPEV 200mg 24H	172,9 \pm 29,8(5) ^{b,c}	160,6 \pm 37,6(8) ^b	97,9 \pm 18,3(8) ^c
ISQ+ EPEV 400mg 2H	447,5 \pm 61,4(8) ^b	93,7 \pm 10,13 (8) ^b	186,8 \pm 23,9(7)
ISQ+ EPEV 400mg 24H	109,8 \pm 36,5(7) ^d	52,3 \pm 12,6 (7) ^d	280,8 \pm 73,0(6) ^b
ISQ + MEM 10mg 2H	11,7 \pm 2,1(6)	181,3 \pm 36,9(6) ^b	106,9 \pm 24,4(6)
ISQ + MEM 10mg 24H	444,8 \pm 72,8(9) ^{b,e}	117,0 \pm 13,8 (6) ^b	468,0 \pm 63,9(11) ^{b,e}

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. a, b, c, d, e ($p < 0.05$), quando comparado com FO + DMSO, ISQ + DMSO, EPEV 200mg 2H e EPEV 400mg 2H, MEM 10mg 2H respectivamente. A análise estatística foi determinada por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

5.3.3 Determinação das concentrações de aminoácidos no corpo estriado

Os dados apresentados na Tabela 5 mostram que as concentrações dos aminoácidos excitatórios ASP e GLU aumentaram nos animais isquemiados (ISQ + DMSO: $48,6 \pm 9,8$) (ISQ + DMSO: $115,0 \pm 28,8$) quando comparados ao controle (FO + DMSO: $12,3 \pm 2,7$), (FO + DMSO: $31,1 \pm 3,0$), respectivamente. As concentrações de ASP só foram diminuídas no CE pelo grupo (ISQ+ EPEV 400mg 2H: $14,6 \pm 4,4$). Já as concentrações de GLU foram revertidos nos grupos tratados com EPVE na dose de 200mg administrada 2 e 24h após a isquemia, efeito similar pode ser visto pelo grupo (ISQ + MEM 10mg 24H: $52,3 \pm 7,7$), quando comparados com o controle isquemiado.

No corpo estriado, as concentrações de aminoácidos inibitórios mostram-se controversos (Tabela 6). Os valores de GLI não foram alterados entre os animais FO + DMSO ($37,4 \pm 6,4$) e ISQ + DMSO ($34,5 \pm 5,1$), mas mostraram-se aumentados nos grupos ISQ + EPEV 200mg 24H ($112,6 \pm 22,1$) e ISQ+ EPEV 400mg 2H ($172,4 \pm 34,6$) quando comparados com o controle isquemiado. As concentrações de TAU e GABA aumentaram nos animais isquemiados (ISQ + DMSO: $285,6 \pm 52,6$) e (ISQ + DMSO: $276,7 \pm 54,2$) quando comparados com o controle (FO + DMSO: $153,2 \pm 25,8$) e (FO + DMSO: $85,7 \pm 18,7$), respectivamente.

Tabela 5. Efeito do EPEV (200 ou 400mg) sobre a ação de aminoácidos excitatórios no corpo estriado de camundongos submetidos à isquemia global transitória.

<i>Grupos</i>	Aspartato ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)	Glutamato ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)
FO + DMSO	12,3 \pm 2,7(11)	31,1 \pm 3,0(8)
ISQ + DMSO	48,6 \pm 9,8 (10) ^a	115,0 \pm 28,8(11) ^a
ISQ + EPEV 200mg 2H	24,7 \pm 7,1(6)	34,2 \pm 8,9(6) ^b
ISQ + EPEV200mg 24H	37,0 \pm 7,5(8)	44,4 \pm 7,7(9) ^b
ISQ+ EPEV 400mg 2H	14,6 \pm 4,4(8) ^b	64,9 \pm 15,8(6)
ISQ+ EPEV 400mg 24H	44,0 \pm 15,7(3)	152,5 \pm 67,6(3)
ISQ + MEM 10mg 2H	58,3 \pm 20,2(4)	69,1 \pm 19,5(4)
ISQ + MEM 10mg 24H	25,3 \pm 6,9(10)	52,3 \pm 7,7(9) ^b

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. a, b ($p < 0.05$), quando comparado com FO + DMSO e ISQ + DMSO, respectivamente. A análise estatística foi determinada por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

Tabela 6. Efeito do EPEV (200 ou 400mg) sobre a ação de aminoácidos inibitórios no corpo estriado de camundongos submetidos à isquemia global transitória.

<i>Grupos</i>	Glicina ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)	Taurina ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)	GABA ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)
FO + DMSO	37,4 \pm 6,4(7)	153,2 \pm 25,8(11)	85,7 \pm 18,7(10)
ISQ + DMSO	34,5 \pm 5,1(9)	285,6 \pm 52,6(6) ^a	276,7 \pm 54,2(5) ^a
ISQ + EPEV 200mg 2H	22,2 \pm 6,9(5)	166,8 \pm 35,7(6)	92,2 \pm 24,7(6) ^b
ISQ + EPEV 200mg 24H	112,6 \pm 22,1(7) ^b	262,6 \pm 31,4(9)	245,9 \pm 51,7(8)
ISQ+ EPEV 400mg 2H	172,4 \pm 34,6(7) ^b	177,3 \pm 47,2(7)	255,6 \pm 60,5(6)
ISQ+ EPEV 400mg 24H	77,1 \pm 49,8(3)	143,4 \pm 59,8(3)	330,2 \pm 134,5(3)
ISQ + MEM 10mg 2H	68,7 \pm 7,5(4)	213,9 \pm 37,8(4)	288,2 \pm 64,8(4)
ISQ + MEM 10mg 24H	51,3 \pm 8,7(8)	345,5 \pm 50,4 (10)	339,2 \pm 45,5(8)

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. a, b ($p < 0.05$), quando comparado com FO + DMSO e ISQ + DMSO, respectivamente. A análise estatística foi determinada por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

6 DISCUSSÃO

A isquemia produz graves danos ao tecido cerebral acompanhada por alterações bioquímicas, moleculares e sequelas clínicas (IADECOLA, 1999). Quando não é revertida num curto período de tempo, a isquemia pode resultar em enfarte do tecido por anoxemia no território de perfusão do vaso afetado, depleção de energia dos tecidos, e eventual morte das células (ENDRES; DIRNAGL; MOSKOWITZ, 2009).

O modelo utilizado no estudo para reproduzir a isquemia cerebral é o de oclusão bilateral das carótidas que é caracterizado pela redução crítica do fluxo sanguíneo cerebral, seguido por lesão neuronal. Esse modelo é utilizado para mimetizar a isquemia cerebral global em humanos sendo uma das principais consequências da parada cardíaca, o que leva a dramáticas alterações neurológicas ao paciente (LIM *et al.*, 2004).

A disfunção do sistema nervoso central é uma consequência da isquemia/hipóxia em humanos e outros mamíferos (HATTORI *et al.*, 2000) e, sendo o principal objetivo das pesquisas experimentais sobre isquemia, a melhora do resultado funcional da recuperação em humanos, o presente trabalho avaliou o efeito do EPEV sobre os déficits sensório-motor e cognitivo dos animais submetidos à isquemia global, através de testes comportamentais (teste da atividade locomotora e *rota rod*) e de memória, que analisam a aquisição e retenção de memória (*Step down*), assim como a memória operacional (Labirinto em Y e teste de reconhecimento de objetos).

O início dos testes comportamentais foram realizados no sexto dia após a isquemia, tempo para os animais se recuperarem da cirurgia e do estresse da oclusão bilateral das carótidas que durou cerca de 30 minutos.

No teste da atividade locomotora, foi verificado que os animais isquemiados não sofreram déficit motor quando comparado ao falso operado. No entanto, em relação ao número de *rearing*, que mede a atividade exploratória vertical, observou-se uma diminuição deste comportamento nos animais isquemiados em relação ao grupo falso-operado e uma reversão desta diminuição pelo tratamento com EPEV 200mg somente com o início de tratamento 2h depois da isquemia.

Um possível efeito positivo na ação do EPEV quando administrada 2 horas depois da isquemia, na reversão da atividade exploratória vertical, sugere que a administração de EPEV em um curto período de tempo se torna importante.

A isquemia cerebral provoca muitas alterações morfofuncionais em todo o cérebro, e as estruturas mais vulneráveis são o córtex, corpo estriado, e hipocampo,

envolvidos, entre outras coisas, no controle do comportamento motor (BAST; FELDON, 2003; VAN DER KNAAP; VALK, 2005). A lesão ao corpo estriado, especificamente ao núcleo caudato e putâmen, tem sido associado a déficits na atividade locomotora (KIRIK; ROSENBLAD; BJORKLUND, 1998). Outros estudos já haviam demonstrado uma diminuição desse comportamento exploratório em ratos submetidos à isquemia, utilizando, no entanto, um teste de campo aberto modificado (LE PEILLET *et al.*, 1988).

As alterações na função sensório-motora, particularmente atividade locomotora, são fatores controversos nos testes cognitivos (HATTORI *et al.*, 2000). Assim, o teste do Campo Aberto, tem o objetivo principal de analisar alguma possível disfunção motora grave do animal após a cirurgia, o que prejudicaria a realização dos testes de memória. Dessa forma, os animais não apresentaram um déficit motor, o que não prejudicou a realização dos testes cognitivos.

Os dados obtidos a partir do teste de *Rota rod* não indicaram alteração significativa na capacidade motora e de equilíbrio nem do grupo falso operado nem dos animais isquemiados, o que pode ser justificado, já que muitas espécies de roedores apresentam o fenômeno de recuperação espontânea em diferentes momentos após a isquemia, isso é relatado na literatura de forma que muitas estruturas cerebrais apresentam diferentes tempos de pico de morte neuronal, bem como alta ou baixa resistência a lesão isquêmica (CHOI, 1988)

Estudos afirmam que muitos pacientes que sofrem AVC isquêmico podem vir a desenvolver vários problemas de memória e disfunção de aprendizagem (LONGSTRETH e DIKMEN, 1993), essas alterações podem ser originadas de uma deficiência no hipocampo, que é uma região primordial do cérebro que controla a formação de memórias e comportamentos aprendidos (LAGALI; CORCORAN; PICKETTS, 2010).

No presente estudo, foram realizados três testes cognitivos, o teste de esQUIVA inibitória do tipo *step-down*, *Y-maze* e o teste de reconhecimento de objetos abordando diferentes tipos de memória, como memória emocional e os dois últimos memória operacional.

No teste de *Step down*, que lida com a memória emocional envolvida com a memória de alerta, ansiedade ou aversividade associada a um evento, (BRIONI, 1993; IZQUIERDO *et al.*, 1993), os animais submetidos à isquemia global tratados tanto com salina, como com DMSO apresentaram déficit na aprendizagem e dano na aquisição e retenção da memória quando comparados ao grupo falso operado tanto na memória recente como na tardia. O EPEV nas doses de 200 e 400mg administrada a partir de 2 e 24 horas

depois da isquemia bem como a Memantina 10mg foram capazes de melhorar os déficits na aquisição de memória, verificando-se um aumento significativo no tempo de latência de entrada no piso eletrificado 15 minutos após o choque (memória recente) e 24 horas após o estímulo elétrico (memória tardia).

Estes resultados corroboram com relatos anteriores em que a isquemia cerebral transitória tem prejudicado o desempenho comportamental em aprender tarefas de memória em camundongos (HIRAKAWA *et al.*, 1994.; OLSEN *et al.*, 1994). Segundo Vianna *et al.* (2001) a memória de habituação e de tarefas da esQUIVA inibitória é processada pelo hipocampo, córtex entorrinal e outras regiões do cérebro, o que, provavelmente, pode ser um dos alvos para o EPEV utilizado no presente trabalho

A partir dos resultados obtidos no teste de memória aversiva sugerimos que o EPEV possa agir modulando negativamente o glutamato, já que uma reversão nas concentrações desse aminoácido pode ser visto nas dosagens do hipocampo.

O aumento da ativação de receptores de glutamato do tipo NMDA também faz parte dos processos envolvidos no desenvolvimento de necrose focal do cérebro durante os primeiros minutos e horas da isquemia cerebral (GUSEV; SKVORTSOVA, 2001; MATTSON; CULMSEE; YU, 2000). Os antagonistas de receptores de NMDA como exemplo, a Memantina têm um efeito neuroprotetor relacionados com aprendizagem e memória proeminente em animais submetidos a isquemia experimental. Isso se deve porque esse efeito prejudicial na memória ocorre pelo o aumento de Ca^{++} intracelular (situação isquêmica) que permeia um aumento na concentração sináptica de GLU e consequente ativação de receptores NMDA. A memantina age bloqueando os receptores NMDA, impedindo assim, uma transmissão excitatória.

Os testes de alternância espontânea realizados no Labirinto em Y (*Y-Maze*) demonstraram déficit na memória operacional dos animais submetidos à isquemia, contudo, os tratamentos com EPEV e MEM melhoram os déficits de memória induzidos pela isquemia global neste modelo, demonstrando, com isso, efeitos neuroprotetores mediados possivelmente, por uma diminuição da modulação glutamatérgica (via bloqueio de NMDA) e um aumento da ativação gabaérgica por meio da ação do EPEV no hipocampo.

A alternância espontânea é um comportamento utilizado para avaliar a memória operacional (*working memory*) de animais colocados em um novo ambiente (OADES *et al.*, 1985). Pesquisas sobre a memória operacional indicam o envolvimento de muitas partes diferentes do córtex cerebral, principalmente córtex occipital, parietal e frontal direitos (SQUIRE; ZOLA, 1996).

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

Com o intuito de estabelecer um paradigma de estudo de memórias declarativas em roedores, foi proposto mais um teste de memória operacional o teste de Reconhecimento de Objetos (RO), embasado na observação de um comportamento exploratório inato destes animais. O RO torna-se uma ferramenta útil para o estudo dos processos neurais e comportamentais envolvidos na formação, evocação e reconsolidação da memória sem interferir no comportamento natural do animal (ENNACEUR; DELACOUR, 1988).

Os resultados observados nesse teste demonstraram diminuição no índice de reconhecimento de objetos dos animais isquemiados tratados com DMSO quando comparados com os animais falso operados, seguido por reversão desse déficit de memória por EPEV na maior dose de 400mg administrada 2 e 24 horas depois da oclusão bilateral das carótidas e MEM 10mg administrada 2 horas depois da isquemia.

Os déficits na aquisição de memória foram significativamente revertidos pelo tratamento com EPEV. Uma possível ação de neuroproteção do EPEV pode ser confirmada a partir da dosagem de GABA no hipocampo que se mostrou aumentada na maior dose, além desse fator segundo Carvalho *et al.* (2009), a liberação da acetilcolina e a ativação de receptores muscarínicos, também podem melhorar as alterações comportamentais e de memória causadas pela isquemia.

O efeito de reversão da MEM somente nas 2 primeiras horas após a isquemia no teste RO, pode ser associado ao bloqueio rápido dos receptores NMDA, esse bloqueio permitiu a redução de danos no hipocampo por meio da diminuição das concentrações de GLU, e conseqüente melhora da memória.

As ações dos aminoácidos, no sistema nervoso central, têm despertado o interesse de pesquisadores nos últimos anos, principalmente, no que corresponde o envolvimento destes, no processo isquêmico. Há um grande número de neurotransmissores envolvidos na cascata isquêmica, sendo os aminoácidos, como exemplo o glutamato um dos maiores responsáveis pela neurotoxicidade. Desta forma, procurou-se determinar a influência da administração do EPEV em camundongos isquemiados, nas concentrações dos aminoácidos

mais estudados no SNC, sendo o glutamato (GLU) e aspartato (ASP) excitatórios, seguidos da glicina (GLI), taurina (TAU) e o ácido γ -aminobutírico (GABA) inibitórios (DANBOLT, 2001; HAN *et al.*, 2011).

As concentrações de GLU, ASP, GLI, TAU e GABA foram determinadas no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de camundongos falso operados, e submetidos a oclusão bilateral das carótidas, após o tratamento com EPEV (200 ou 400mg/kg, v.o) e MEM (10mg/kg, v.o) 2 e 24 horas depois da isquemia.

A isquemia cerebral pode causar danos em várias áreas do SNC, dentre as áreas mais acometidas podemos citar o córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado. O córtex pré-frontal participa de várias funções de ordem superior, incluindo a atenção seletiva, controle visceromotor e tomada de decisões. Nessa área podemos encontrar interneurônios gabaérgicos, neurônios piramidais excitatórios como glutamato entre outros (VERTES, 2006).

No córtex pré-frontal, as concentrações dos dois principais aminoácidos excitatórios ASP e GLU aumentaram nos animais isquemiados quando comparados com o grupo falso operado, mostrando que os aminoácidos excitatórios têm sido implicados no dano neuronal e na hipóxia-isquêmica.

O ácido glutâmico, maior aminoácido excitatório no cérebro, é citotóxico em células neuronais. Os neurônios que liberam glutamato são ativados durante evento hipóxico pela entrada de cálcio para dentro da célula e pela própria despolarização dessas células (DELIVORIA-PAPADOPOULUS; MISHRA, 1998). Paralelamente, ocorre redução de ATPase-glutamato dependente na membrana pré-sináptica, contribuindo para a manutenção de concentrações elevadas do glutamato extracelular, mantendo um estímulo prolongado deste receptor.

O aspartato atua como agonista relativamente seletivo de receptores glutamatérgicos NMDA extrassinápticos, que estão relacionados com a excitotoxicidade (BRADFORD; NALDER, 2004). O entendimento do mecanismo da modulação mútua entre os aminoácidos é complexo, pois envolve muitas vezes mais de um sistema.

Os grupos isquemiados tratados com EPEV 400mg e MEM 10mg 24 horas após a isquemia diminuíram as concentrações de ASP quando comparados com o grupo isquemiado. Já os níveis de GLU, na região pré-frontal, só apresentaram redução de suas concentrações nos animais tratados com EPEV 200 e 400mg 24 horas depois da isquemia, demonstrando, assim, um possível efeito protetor da droga em estudo quando administrada mais tardiamente. Esses resultados sugerem que o EPEV atua modulando negativamente aspartato e o sistema glutamatérgico apresentando dessa forma um efeito neuroprotetor.

A respeito dos aminoácidos inibitórios, as concentrações de GLI no pré-frontal apresentaram resultados distintos. Os grupos FO e ISQ, não apresentaram diferença significativa quando comparados entre si, já os grupos EPEV 200mg 24H, 400mg 2H e MEM 24H, tiveram valores de GLI superiores quando comparados como o grupo controle isquemiado, supondo possivelmente, que os mecanismos de ação das drogas usadas interfiram ativando receptores de glicina no CPF.

A glicina é um neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central, encontrado na medula espinhal, sendo liberada por interneurônios inibitórios. Ela age como um co-agonista de receptores NMDA, facilitando ação excitatória dos receptores glutamatérgicos. (GUNDERSEN *et al.*, 2005).

Os valores de TAU no córtex pré-frontal mostraram-se elevados no grupo isquemiado quando comparados ao grupo falso operado o que pode ser justificado por um possível efeito compensatório, já que no cérebro, a taurina também desempenha papel osmorregulador, protegendo-o contra a toxicidade dos íons de cálcio (LEHMAN *et al.*, 1984). Um dos papéis importantes da taurina vem sendo relacionado à excitotoxicidade glutamatérgica (WU; PRENTICE, 2010).

As concentrações reduzidas de TAU nos grupos EPEV 200mg, 400mg 24H e MEM 10mg 24H podem estar relacionado a uma ação tardia dessas substâncias no CPF já que as mesmas foram administradas 24 horas após a isquemia e os danos causados pelo aumento de cálcio e consequente excitotoxicidade não conseguiram ser revertidos.

Já as concentrações de GABA foram revertidas nos grupos EPEV 200mg e 400mg 2 e 24h quando comparado ao animal isquemiado, caracterizando uma possível ligação da substância a uma modulação gabaérgica. Os dados encontrados podem ser justificados já que o uso tradicional desta planta combate a insônia, convulsões e excitação no sistema nervoso (DANTAS *et al.*, 2004) através de sua capacidade de ativar os receptores GABAA no sistema nervoso central (BERNARD *et al.*, 1985).

Teixeira-Silva *et al.* (2008) avaliaram o efeito do extrato alcoólico das folhas da *E. velutina* em modelos animais de ansiedade, memória e epilepsia. Os efeitos observados para o extrato alcoólico no sistema nervoso dos roedores assemelharam-se ao perfil dos efeitos dos benzodiazepínicos e podem ser interpretados pela interação do extrato com o sistema gabaérgico.

Entre as áreas cerebrais mais comprometidas, cita-se o hipocampo que é a região mais vulnerável à lesão isquêmica, uma vez que a inervação excitatória é realizada por neurônios glutamatérgicos, o que provalvemente resulta em excitotoxicidade através dos

receptores de glutamato NMDA e não NMDA (cainato e AMPA). Os valores encontrados no hipocampo relacionado aos aminoácidos excitatórios ASP e GLU, demonstram que houve um aumento desses aminoácidos nos animais isquemiados quando comparados com o controle falso operado corroborando com os resultados encontrados por Pulsinelli (1992).

A ação da EPEV tanto na dose de 200 como na dose 400mg conseguiu reverter as concentrações dos aminoácidos excitatórios, quando comparado ao grupo isquemiado. Demonstrando, assim, um possível efeito modulador negativo e neuroprotetor dessa substância frente aos danos causados, na isquemia, pelo excesso de glutamato. Pellegrini-Giampietro *et al.* (1990) afirmam que os aminoácidos excitatórios são neurotóxicos em excesso e a hiperestimulação resultante dos seus receptores contribui para a morte neuronal durante os insultos cerebrais. Na isquemia induzida, a presença de radicais livres e aminoácidos excitatórios agravam os danos neuronais.

Uma diminuição nas concentrações de GLU pode ser visto em animais tratados com MEM 10mg administrada 2 e 24 horas depois da isquemia. A memantina, um antagonista de NMDA, é atualmente usada na Europa para o tratamento da doença de Parkinson, espasticidade, e foi recentemente aprovado o uso para o tratamento de Doença de Alzheimer e demência vascular (LE; LIPTON, 2001). O efeito neuroprotetor da memantina tem sido demonstrado em muitos estudos, especialmente em termos de isquemia aguda cerebral (PRASANNA *et al.*, 2004; RAO *et al.*, 2001).

Sobre as concentrações dos aminoácidos inibitórios no hipocampo, os resultados mostraram uma diminuição de GLI, TAU e GABA nos animais isquemiados comparados com o controle falso operado, esses valores foram revertidos principalmente, nos animais tratados com MEM 10mg 24 horas depois da isquemia. Os grupos tratados com EPEV em ambas as doses 24h depois da isquemia revertem às concentrações de GLI, demonstrando um possível efeito modulador positivo do extrato frente aos receptores de glicina.

Já as concentrações de TAU no hipocampo foram revertidas em todos os grupos tratados comparando com o controle isquemiado. A baixa concentração de TAU observada no grupo isquemiado em nosso experimento demonstra o dano causado no hipocampo pela isquemia. O EPEV mostrou um efeito importante ao conseguir reverter às concentrações de taurina, efeito esse que promoveu uma possível neuroproteção e conseqüente redução dos danos causados na isquemia.

É importante resaltar que a taurina é um aminoácido encontrado em grande quantidade no hipocampo, nos interneurônios, nos neurônios piramidais e nas células granulares denteadas (MAGNUSSON *et al.*, 1989). Estudos têm demonstrado que os

receptores do glutamato ionotrópicos NMDA, agonistas do cainato e AMPA evocam a liberação de taurina no cérebro em desenvolvimento e em adultos (MAGNUSSON *et al.*, 1991; SARANSAARI; OJA 1991). A taurina inibe a lesão nos neurônios piramidais do hipocampo, por meio do aumento da condutância do íon cloreto que leva a hiperpolarização.

Além do grupo MEM 10mg 24h, as concentrações de GABA também foram revertidas pelo EPEV na maior dose administrada 24h depois da isquemia, fato que pode ser justificado pela ação de EPEV em modular o GABA de maneira dose-dependente. Dentre os estudos farmacológicos realizados com *E. velutina*, foram demonstrados os efeitos antinociceptivos e depressores do sistema nervoso central. Estes resultados experimentais estão de acordo com a indicação popular atribuída a planta, considerando que a mesma é utilizada na forma de chás no combate a insônia e como calmante (CARVALHO *et al.*, 2009).

O corpo estriado foi outra área utilizada nos experimentos para identificação da concentração dos aminoácidos. Em relação aos aminoácidos excitatórios, houve aumento nas concentrações de ASP e GLU nos animais isquemiados quando comparados com o controle falso operado. A liberação de aminoácidos excitatórios de estruturas neurais durante a hipóxia e isquemia tem sido observada tanto *in vitro* (PELLEGRINI-GIAMPIETRO *et al.*, 1990; COLLARD; MENON-JOHANSSON, 1993) quanto *in vivo* (BENVENISTE *et al.*, 1984; HAGBERG *et al.*, 1985; GLOBUS *et al.*, 1988).

Os valores de ASP no CE foram revertidos no grupo tratado com EPEV somente na maior dose 2h depois da isquemia quando comparado ao grupo isquemiado. As concentrações de GLU foram revertidas por MEM 10mg 24h, EPEV 200mg em ambos os tempos de tratamento. Esses resultados vêm só confirmar dados já demonstrados em outras áreas, que possivelmente o EPEV apresente ação modulatória negativa de GLU proporcionando, com isso, neuroproteção diante dos danos causados na isquemia.

Segundo Vasconcelos *et al.* (2007) no modelo de convulsão induzida por estriquina, o extrato de *Erythrina velutina* administrado por via oral mostrou um aumento significativo na latência de convulsão e no momento da morte, o que demonstraram um efeito protetor da substância frente a quantidade de GLU liberada na convulsão. Corroborando, assim, com nosso resultado, entretanto esse efeito parece depender da dose administrada já que a reversão não foi vista com a dose de EPEV 400 mg (2 ou 24h).

As concentrações de GLI no CE aumentaram no grupo tratado com EPEV na dose de 200mg 24h e no grupo EPEV 400mg 2h o que pode ser explicado por Vasconcelos *et al.* (2007) que afirmam que a *Erythrina velutina* promove alterações nos mecanismos inibitórios de glicina.

As concentrações dos aminoácidos inibitórios TAU e GABA no CE aumentaram no grupo isquemiado quando comparado como o grupo controle, fato que pode ser explicado pela ação de neurônios glutamatérgicos no corpo estriado liberando GABA, por mecanismo de compensação, que atuaria de forma a minimizar a excitação produzida pela atividade excessiva do glutamato (HIBBERT *et al.*, 2005).

O aminoácido inibitório taurina tem apresentado importante papel na manutenção da homeostase cerebral, além de ter uma ação protetora sobre os neurônios diante dos efeitos excitotóxicos evocados pelos aminoácidos excitatórios, atenuando o influxo de cálcio durante a isquemia (WANG *et al.*, 2005, 2007). Em estudo prévio, TAU elevou a condutância da membrana íon cloreto, ao abrir os canais de cloreto, então, induzindo a hiperpolarização dos neurônios, e reduzindo a excitabilidade celular (DEL OLMO *et al.*, 2000).

É interessante ressaltar que o grupo tratado com EPEV 200mg 2h reverteu o aumento de GABA no CE quando comparado ao grupo isquemiado, resultado esse que pode ser explicado pelo fato da ação do EPEV ter reduzido as concentrações de GLU no corpo estriado desempenhado com isso, seu efeito protetor.

Segundo Foeller *et al.* (2005) a alteração na transmissão gabaérgica permite mudança de mapas sensoriais durante o período crítico do desenvolvimento cortical e produz alterações rápidas nos mapas corticais de adultos que lembram as alterações ocorridas após a isquemia.

Por fim, os resultados obtidos no presente estudo, indicam que a ação agonista na modulação de receptores GABA constitui um interessante alvo para intervenção farmacológica, objetivando reduzir os danos celulares consequentes à isquemia. Apesar da *Erythrina velutina* ter demonstrado um pronunciado efeito neuroprotetor durante eventos isquêmicos, investigações sobre seu mecanismo de ação e sua especificidade a nível de receptor ainda precisam ser estudados.

A identificação dos possíveis mecanismos de ação de moléculas com potencial para o desenvolvimento de novas drogas, como exemplo a *Erythrina velutina*, que interfiram com a neurotransmissão GABAérgica ou mesmo glutamatérgica, justifica-se em decorrência dos diversos tipos de distúrbios que comprometem o SNC pelo desequilíbrio entre os aminoácidos. Dentre estas neuropatologias humanas, citam-se epilepsias, ansiedade, esclerose amiotrófica lateral e isquemia, entre outras (WONG *et al.*, 2003).

7 CONCLUSÃO

A oclusão bilateral das carótidas não diminuiu o desempenho locomotor dos animais, entretanto produziu déficits na aquisição de memória emocional e operacional. Estes efeitos foram atenuados pela administração do EPVE ou Memantina, um antagonista de receptores NMDA. Quanto à concentração de aminoácidos na região pré-frontal, hipocampo e corpo estriado, houve um aumento significativo dos aminoácidos excitatórios, nas áreas cerebrais estudadas, nos animais submetidos à isquemia, sendo esse aumento revertido pelo tratamento com EPEV como também pela MEM.

Os resultados do presente estudo sugerem que o EPEV tem ação neuroprotetora, possivelmente por agir reduzindo as concentrações dos aminoácidos excitatórios e aumentando as concentrações de aminoácidos inibitórios após a isquemia.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.17, p.114-140, 2007.
- AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, p. 472-508, 2008.
- AMERICAN HEART ASSOCIATION. **Heart disease and stroke statistics: 2008 Update.** Dallas, 2008.
- ANKARCRONA, M.; DYPBUKT, J.M.; BONFOCO, E.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.; LIPTON, S.A.; NICOTERA, P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. **Neuron**, n.15, p.961–973, 1997.
- BACIGALUPPI, M.; COMI, G.; HERMANN, D. Animal Models of Ischemic Stroke. Part Two: Modeling Cerebral Ischemia. **The Open Neurology Journal**, n.4, p.34-38, 2010.
- BADDELEY, A.D. **Working memory.** Oxford University Press, Oxford, 1986.
- BARROS, G. S. G.; MATOS, F. J. A.; VIEIRA, J. E.V.; SOUSA, M. P.; MEDEIROS, M. C. Pharmacological screening of some Brazilian plants. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 22, n. 2, p.116-122, 1970.
- BAST, T.; FELDON, J. Hippocampal modulation of sensorimotor processes. **Prog. Neurobiol.**, v. 70, p. 319–345, 2003.
- BECHARA, A.; TRANEL, D.; DAMASIO, H.; ADOLPHS, R.; ROCKLAND, C.; DAMASIO, A.R. Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans. **Science**, v.269, n. 5227, p.1115-1118,1995.
- BENVENISTE, H.; DREJER, J.; SCHOUSBOE, A.; DIEMER, N.H. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. **J. Neurochem.**, v. 43, p.1369-1374, 1984.
- BERNARD, P.S.; BENNETT, D.A.; PASTOR, G.; YOKOYAMA, N.; LIEBMAN, J.M. Cgs-9896—agonist-antagonist benzodiazepine receptor activity revealed by anxiolytic, anticonvulsant and muscle-relaxation assessment in rodents. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v.235, p.98–105, 1985.
- BIELLENBERG, G. W.; BURNIOL, M.; ROSEN, R.; KLAUS, W. Effects of nimodipine on infarct size and cerebral acidosis after middle cerebral artery occlusion in the rat. **Stroke**, v. 21, p. 90–92, 1990.

BONFOCO, E.; KRAINIC, D.; ANKARCRONA, M.; NICOTERA, P.; LIPTON, S.A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p.7162–7166, 1995.

BORRONI B.; AGOSTI, C.; BRAMBILLA, C.; VERGANI, V.; COTTINI, E.; AKKAWI, N.; PADOVANI, A. Is transient global amnesia a risk factor for amnesic mild cognitive impairment? **J. Neurol.**, v. 251, p.1125–1127, 2004.

BOULTER, J.; HOLLMANN, M.; O'SHEA-GREENFIELD, A.; HARTLEY, M.; DENERIS, E.; MARON, C.; HEINEMANN, S. Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes. **Science**, v.249, p.1033–1037, 1990.

BRADFORD, S. E.; NADLER, J. V. Aspartate release from rat hippocampal synaptosomes. **Neuroscience**, n.128, p.751-765, 2004.

BRAGA, J. L.; ALVARENGA, R. M. P.; MORES NETO, J. M. Acidente Vascular Cerebral. **Revista Moreira JR**, 2006.

BRAIN RESUSCITATION CLINICAL TRIAL II STUDY GROUP. A Randomized clinical study of a calcium-entry blocker (lidoflazine) in the treatment of comatose survivors of cardiac arrest. **N. Engl. J. Med.**, v.324, p.1225-1231, 1991.

BRAIN RESUSCITATION CLINICAL TRIAL I STUDY GROUP. A Randomized clinical study of thiopental loading in comatose survivors of cardiac arrest. **N. Engl. J. Med.**, v.314, p.397-401, 1986.

BRALET, J.; BELEY, P.; JEMAA, R.; BRALET, A.M.; BELEY, A. Lipid metabolism, cerebral metabolic rate, and some related enzyme activities after brain infection in rat. **Stroke**, v. 18, p.418-425, 1987.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Informações Hospitalares: Indicadores municipais de saúde: morbidade hospitalar no município de Fortaleza-CE**. Brasília, 2010. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br>> Acesso em: 18 abr. 2012.

BRIONI, J. D. Role of GABA during the multiple consolidation of memory. **Drug Dev. Res.**, v. 28, p. 3-27, 1993.

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

BROTT, T.; BOGOUSSLAVSKY, J. Treatment of acute ischemic stroke. **N. Eng. J. Med.**, v. 343, p. 710-722, 2000.

CABRAL, A. G. F. **Constituintes químicos de *Erythrina velutina* Will (Fabaceae)**. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.R.M.; ROSSATO, J. I.; RAMIREZ, M.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Relationship between short- and long-term memory and short- and long-term extinction. **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 84, p. 25–32, 2005.

CAMPBELL, C. A.; MACKAY, K. B.; PATEL, S. Effects of isradipine and L-type calcium channel blocker on permanent and transient focal cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. **Exp. Neurol.**, v. 148 p. 45–50, 1997.

CARVALHO, A. C. C. S.; ALMEIDA, D. S.; MELO, M. G. D.; CAVALCANTI, S. C. H.; MARÇAL, R. M. Evidence of the mechanism of action of *Erythrina velutina* Willd (Fabaceae) leaves aqueous extract. **J. Ethnopharmacol.**, v. 122, n. 2, p. 374-378, 2009.

CARVALHO, P. E. *Erythrina velutina* – **Mulungu**. Colombo, PR: Embrapa, 2008. (Circular técnico, n. 160).

CAPLAN, L.; BABIKIAN, V.; HELGASON, C.; HIER, D.B.; DEWITT, D.; PATEL, D.; STEIN, R. Occlusive disease of the middle cerebral artery. **Neurology**, v. 35, p. 975–982, 1985.

CAPLAN, L. R.; SCHMAHMANN, J. D.; KASE, C. S.; FELDMANN, E.; BAQUIS, G.; GREENBERG, J. P.; GORELICK, P. B.; HELGASON, C.; HIER, D. B. Caudate infarcts. **Arch Neurol.**, v. 47, p. 133–143, 1990.

CEARA. Secretaria da Saúde. **Indicadores e dados básicos para a saúde no Ceará 2004**. Fortaleza, 2005.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. DIVISION FOR HEART DISEASE AND STROKE PREVENTION. **The Paul Coverdell National Acute Stroke Registry**. 2012.

CHAN, P.H. Antioxidant-dependent amelioration of brain injury: role of Cu Zn superoxide dismutase. **J. Neurotrauma.**, v. 9, Suppl. 2, p. S 417-423, 1992.

CHEN, H.S.; PELLEGRINI, J.W.; AGGARWAL, S.K.; LEI, S.Z.; WARACH, S.; JENSEN, F.E.; LIPTON, S.A. Open-channel block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. **J. Neurosci.**, v. 12, p.4427– 4436, 1992.

CHEN, J.; NAGAYAMA, T.; JIN, K.; STETLER, R. A.; ZHU, R. L.; GRAHAM, S. H.; SIMON, R. P. Induction of caspase- 3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. **J. Neurosci.**, v. 18, n. 13, p. 4914–4928, 1998.

CHERUBINI, A.; RUGGIERO, C.; MORAND, C.; LATTANZIO, F.; DELL'AQUILA, G.; ZULIANI, G.; DI IORIO, A.; ANDRES-LACUEVA, C. Dietary antioxidants as potential pharmacological agents for ischemic stroke. **Curr. Med. Chem.**, v. 15, n. 12, p.1236-1248, 2008

CHOI, D.W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. **Neuron**, v.1, p.623–634, 1988.

CHOI, D.W.; KOH, J.Y.; PETERS, S. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. **J. Neurosci.**, v.8, p.185–196, 1988.

CHOI, D.W.; ROTHMAN, S.M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxicischemic neuronal death. **Annu. Rev. Neurosci.**, v.13, p.171–182, 1990.

CHUKWUJEKWU, J.C.; VAN HEERDEN, F.R.; VAN STADEN, J. Antibacterial activity of flavonoids from the stem bark of *Erythrina caffra* thunb. **Phytother. Res.**, v. 25, p. 46-48, 2011.

COLLARD, K.J.; MENON-JOHANSSON, A.S. Effects of short-term hypoxia on [3H] glutamate release from preloaded hippocampal and cortical synaptosomes. **Neurochem. Res.**, v.18, n.2, p.165-170, 1993.

COLLI, B. O.; NUNES, M.; CARLOTTI JR, C. G. Isquemia cerebral experimental. In: _____. **Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia**. São Paulo: Probel Editora, 1988. p.643-662.

CRAMER, S.C.; MOORE, C.I.; FINKLESTEIN, S.P.; ROSEU, B. R. A pilot study of somatotopic mapping after cortical infarct. **Stroke**, v.31, p.668-671, 2000.

CURIONI, C.; CUNHA, C.B. VERAS, R. P.; ANDRÉ C. The decline in mortality from circulatory diseases in Brazil. **Pan Am. J. Public Health**, v. 25, n. 1, p.9-15, 2009.

DANBOLT, C. N. Glutamate uptake. **Prog. Neurobiol.**, v. 65, p.1-105, 2001.

DA-CUNHA, E. V. L.; DIAS, C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GRAY, A. I. Eryvellutinone, an isoflavanone from the stem bark of *Erythrina velutina*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1371-1373, 1996.

DANTAS, M.C.; DE OLIVEIRA, F.S.; BANDEIRA, S.M.; BATISTA, J.S.; SILVA JR., C.D.; ALVES, P.B.; ANTONIOLLI, A.R.; MARCHIORO, M. Central nervous system effects of the crude extract of *Erythrina velutina* on rodents. **J. Ethnopharmacol.**, v. 94, p.129–133, 2004.

DAVIS, S.M.; LEES, K.R.; ALBERS, G.W.; DIENER, H.C.; MARKABI, S.; KARLSSON, G. Selfotel in acute ischemic stroke: possible neurotoxic effects of an NMDA antagonist. **Stroke**, v.31, p.1453-1458, 2000.

DELIVORIA-PAPADOPOULUS, M.; MISHRA, O.P. Mechanisms of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategies for prevention. **J. Pediatr.**, v.132, S30-34, 1998.

DEL OLMO, N.; BUSTAMANTE, J.; DEL RÍO, R. M.; SOLÍS, J. M. Taurine activates GABA (A) but not GABA (B) receptors in rat hippocampal CA1 area. **Brain Res.**, v. 864, p. 298-307, 2000.

DeLONG, M. R. The basal ganglia. In: KANDEL, E. R.; SCHWART, J. H.; JESSELL, T. M. (Ed.). **Principles of neural science**. 4th ed. New York: McGraw-Hill, 2000. cap. 43, p. 853-867.

DONOGHUE, J.P.; SUNER, S.; SANES, J.N. Dynamic organization of primary motor cortex output to target muscles in adult rats. II. Rapid reorganization following motor nerve lesions. **Exp. Brain Res.**, v. 79, n. 3, p.492-503, 1990.

DOS-ANJOS, S.; MARTINEZ-VILLAYANDRE, B.; MONTORI, S.; REGUEIRO-PURRINOS, M.M.; GONZALO-ORDEN, J.M.; FERNANDEZ-LOPEZ, A. Global ischemia-induced modifications in the expression of AMPA receptors and inflammation in rat brain. **Brain Res.**, v.1287, p.20–27, 2009.

DOYLE, K. P.; SIMON, R. P.; STENZEL-POORE, M . P. Mechanisms of ischemic brain damage. **Neuropharmacology**, v. 55, p. 310 – 318, 2008.

DREJER, J.; BENVENISTE, H.; DIEMER, N.H.; SCHOUSBOE, A. Cellular origin of ischemia-induced glutamate release from brain tissue in vivo and in vitro. **J.Neurochem.** v.45, p.145–151, 1985.

DUBOIS, B.; PILLON, B. Cognitive deficits in Parkinson's disease. **J. Neurol.**, v.244, p. 2-8, 1997.

DU PLESSIS, A.J.; JOHNSTON, M.V. Hypoxic-ischemic brain injury in the newborn. **Clin. Perinatol.**, v.24, p.627-654, 1997.

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

ENDRES, M.; DIRNAGL, U.; MOSKOWITZ, M.A. The ischemic cascade and mediators of ischemic injury. In: FISHER, M. (Ed.). **Stroke**. [S.l: s.n.], 2009. v. 92, p. 31–41.

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

FERREIRA, A.; MARQUES, J. **Fase Aguda do AVC isquémico: a importância da neuroproteção e da reabilitação precoce**. 2011. Disponível em: <<http://www.chbgarvio.min-saude.pt/pdf>> Acesso em: 24 jan. 2013.

FERREIRA, M. B. C.; WOLFMAN, C.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Late posttraining memory processing by entorhinal cortex: Role of NMDA and GABAergic receptors. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.41, p.767-771, 1992.

FLAMM, E.S.; DEMOPOULOS, H.B.; SELIGMAN, M.L.; POSER, R.G.; RANSOHOFF, J. Free radicals in cerebral ischemia. **Stroke**, v. 9, n. 5, p. 445-447, 1978.

FOELLER, E.; CELIKEL, T.; FELDMAN, D.E. Inhibitory sharpening of receptive fields contributes to whisker map plasticity in rat somatosensory cortex. **J. Neurophysiol.**, v. 94, p.4387–4400, 2005.

GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M. A.; MARTÍNEZ, J. A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in câncer and cardiovascular disease. **Inflamm. Res.**, v. 58, p. 537-552, 2009.

GERRIETS, T.; LI, F.; SILVA, M.D.; MENG, X.; BREVARD, M.; SOTAK, C. H.; FISHER, M. The macrosphere model: evaluation of a new stroke model for permanent middle cerebral artery occlusion in rats. **J. Neurosci. Methods**, v. 122, n. 2, p. 201-211, 2003.

GIDO, G.; KRISTIAN, T.; SIESJO, B. K. Extracellular potassium in a neocortical core área after transient focal ischemia. **Stroke**, v. 28, p. 206–210, 1997.

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, June, 2002.

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

GLOBUS, M.; BUSTO, R.; DIETRICH, W. *et al.* Excessive release of glutamate is not sufficient for the development of ischemic damage in vivo. **Stroke**, v. 21, p.176, 1990.

GONZALEZ, R. G.; HIRSCH, J. A.; KOROSHETZ, W. J.; LEV, M. J.; SCHAEFER, P. **Acute Ischemic Stroke: imaging and intervention**. Berlin: Springer, 2006.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2012.

GRAHAM, S.H.; CHEN, J. Limiting ischemic injury by inhibition of excitatory amino acid release. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v.13, p.88-97, 1993.

GREENGARD, P. The neurobiology of slow synaptic transmission. **Science**, v.294, p.1024–1030, 2001.

GRIEP, L. M. O.; VERSCHUREN, M.; KROMHOUT, D.; OCKÉ, M. C.; GELEIJNSE, J. M. Colors of fruit and vegetables and 10 – year incidence of stroke. **Stroke**, v. 42, p. 3190-3195, 2011.

GUNDERSEN, R.Y.; VAAGENES, P.; BREIVIK, T.; FONNUM, F.; OPSTAD, P.K. Glycine – an important neurotransmitter and cytoprotective agent. **Acta Anaesthesiol. Scand.**, v.49, p 1108-1116, 2005.

GUSEV, E. I.; SKVORTSOVA, V. I. **Ishemiya golovnogo mozga (Brain Ischemia)**. Moscow: Meditsina, 2001.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 12. ed. [S.l.]: Elsevier, 2011.

HACKE, W. *et al.* **Avc Isquémico**. [S.l.]: European Stroke Initiative Recommendations, 2003. Disponível em: <http://Www.Eso-Stroke.Org/Pdf/Eusi_Recommendations_Flyer_Portugal.Pdf>. Acesso em: 23 jan. 2012.

HAGBERG, B. R. Syndrome: Swedish approach to analysis of prevalence and cause. **Brain Dev.**, v.7, p.277-280, 1985.

HAN, H.; MIYOSHI, Y.; UENO, K.; OKAMURA, C.; TOJO, Y.; MITA, M.; LINDNER, W.; ZAITSU, K.; HAMASE, K. Simultaneous determination of d-aspartic acid and d-glutamic acid in rat tissues and physiological fluids using a multi-loop two-dimensional HPLC procedure. **J. Chromatogr. B**, v. 4, p.34-39, 2011.

HATTORI, K.; LEE, H.; HURN, P.; CRAIN, B.; TRAYSTMAN, R.; DEVRIES. A.C. Cognitive Deficits After Focal Cerebral Ischemia in Mice. **Stroke**, v. 31, p.1939-1944, 2000.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. Therap.**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HENSCH, T.K. Critical period plasticity in local cortical circuits. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 6, p.877-888, 2005.

HIBBERT, B.; FUNG, I.; MCAULEY, R.; SAMIA, M.; TRUDEAU, V. Catecholamine depletion modulates serum LH levels, GAD67 mRNA, and GABA synthesis in the goldfish. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 140, n. 3, p. 176-183, 2005.

HIRAKAWA, M.; TAMURA, A.; NAGASHIMA, H.; NAKAYAMA, H.; SANO, K. Disturbance of retention of memory after focal cerebral ischemia in rats. **Stroke**, v.25, p.2471-2475, 1994.

HORIE, N.; MAAG, A.L.; HAMILTON, S.A.; SHICHINOHE, H.; BLISS, T.M.; STEINBERG, G.K. Mouse model of focal cerebral ischemia using endothelin-1. **J. Neurosci. Methods**, v. 173, n. 2, p.286-290, 2008

HSU, C.Y. **Ischemic Stroke: From Basic Mechanisms to New Drug Development**. St. Louis: Karger, 1998. (Monogr. Clin. Neurosci.).

IADECOLA, C. Mechanisms of cerebral ischemic damage, in: WALZ, W. (Ed.). **Cerebral ischemia: molecular and cellular pathophysiology**. New Jersey: Humana Press Inc., 1999. p. 3-36.

IZQUIERDO, I. Pharmacology evidence for a role of long-term potentiation in memory. **FASEB J.**, v. 8, p.1139-1145, 1994.

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L. R. M.; ROSSATO, J. I.; BONINI, J. S.; MEDINA, J. H.; CAMMAROTA, M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends In Neurosci.**, p. 496-515, 2006.

IZQUIERDO, I.; BIANCHIN, M.; BUENO E SILVA, M.; ZANNATA, M. S.; WALZ, R.; Da SILVA, R. C.; RUSCHEL, A.; PACZKO, N.; MEDINA, J. H. CNQX infused into rat hippocampus or amygdala disrupts the expression of memory of two different tasks. **Behav. Neural Biol.**, v. 59, p. 1-4, 1993.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. GABA A receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. **Trends. Pharmacol. Sci.**, v. 12, p. 260-265, 1991.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H.; BIANCHIN, M.; WALZ, R.; ZANATTA, M. S.; DA SILVA, R. C.; BUENO E SILVA, M.; RUSCHEL, A. C.; PACZKO, N. Memory processing by the limbic system: Role of specific neurotransmitter systems. **Behav. Brain Res.**, v. 58, p.91-98, 1993.

JACEWICZ, M.; BRINT, S.; TANABE, J.; PULSINELLI, W. A. Continuous nimodipine treatment attenuates cortical infarction in rats subjected to 24 hours of focal cerebral ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 10 p. 89–96, 1990.

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

KATO, R. T.; ARAKI, K.; KOGURE, M.; MURAKAMI, K. Uemura. Sequential cerebral blood flow changes in short-term cerebral ischemia in gerbils. **Stroke**, v. 21, p.1346–1349, 1990.

KERNIE, S.G.; PARENT, J.M. Forebrain neurogenesis after focal ischemic and traumatic brain injury. **Neurobiol. Dis.**, v.37, p.267–274, 2010.

KINOUCHI, H.; EPSTEIN, C.J.; MIZUI, T.; CARLSON, E.; CHEN, S.F.; CHAN, P.H. Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing Cu Zn superoxide dismutase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, n. 24, p.11158- 11162, 1991.

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

KIRINO, T.; TAMURA, A.; SANO, K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia-reversible and irreversible types of ischemic cell damage. **Prog. Brain Res.**, v. 63, p.39–58, 1985.

KITAGAWA, K.; MATSUMOTO, M.; ODA, T.; NIINOBE, M.; HATA, R.; HANDA, N.; FUKUNAGA, R.; ISAKA, Y.; KIMURA, K.; MAEDA, H. Free radical generation during brief period of cerebral ischemia may trigger delayed neuronal death. **Neuroscience**, v. 35, n. 3, p.551-558, 1990.

KOLB, B.; MYCHASIUK, R.; MUHAMMAD, A.; LI, Y.; FROST, D.; GIBB, R. Experience and the developing prefrontal cortex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.109, Suppl. 2, p.17186–17193, 2012.

KRUPP, J.J.; VISSSEL, B.; THOMAS, C.G.; HEINEMANN, S.F.; WESTBROOK, G.L. Interactions of calmodulin and α -actinin with the NR1 subunit modulate Ca²⁺ dependent inactivation of NMDA receptors. **J. Neurosci.**, v.19, p.1165–1178, 1999.

KUHR, W.G.; KORF, J. N-methyl-D-aspartate receptor involvement in lactate production following ischemia or convulsion in rats: **Eur. J. Pharmacol.**, v. 155, p.145-149, 1988.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Patologia**: bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

LAGALI, P.S.; CORCORAN, C.P.; PICKETTS, D. J. Hippocampus development and function: role of epigenetic factors and implications for cognitive disease. **Clin. Genet.**, v. 78, n. 4, p. 321–333, 2010.

LATHE, R. Hormones and the hippocampus. **J. Endocrinol.**, v. 169, n. 2, p. 205-231, 2001.

LE, D.A.; LIPTON, S.A. Potential and current use of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists in diseases of aging. **Drugs Aging**, v.18, p.717-724, 2001.

LEHMAN, A.F.; BABIGIAN, H.M.; REED, S.K. The epidemiology of treatment for chronic and nonchronic mental disorders. **J. Nerv. Ment. Dis.**, v.172, n. 11, p.658-666, 1984.

LE PEILLET, E.; LEKIEFFRE, D.; ALLIX, M.; PLOTKINE, M.; BOULU, R. G. Modified open-field test to study the protective activity of drugs in cerebral ischemia in rats("4 vessel model"). In: KRIEGLSTEIN, J. (Ed.). **Pharmacology of Cerebral Ischemia**. Amsterdam: Elsevier Science, 1988. p. 369-373.

LIEPERT. J.; BAUDER, H.; MILTNER, W.H.R.; TAUB, E.; WEILLER, C. Treatment-induced cortical reorganization after stroke in humans. **Stroke**, v.31, p.1210-1216, 2000.

LIM, C.; ALEXANDER, M.P.; LAFLECHE, G.; SCHNYER, D.M.; VERFAELLIE, M. The neurological and cognitive sequelae of cardiac arrest. **Neurology**, v. 63, p.1774–1778, 2004.

LINDROTH, P.; MOPPER, V. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde, **Anal. Chem.**, v.51, p. 1667–1674, 1979.

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

LIPTON, S.A. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. **Nat. Rev. Discov.**, v. 5, p.160–170, 2006.

LIU, B.; LIAO, M.; MIELKE, J. G.; NING, K.; CHEN, Y.; LI, L.; EL-HAYEK, Y. H.; GOMEZ, E.; ZUKIN, R. S.; FEHLINGS, M. G.; WAN, Q. Ischemic insults direct glutamate receptor subunit 2-lacking AMPA receptors to synaptic sites. **J. Neurosci.**, v. 26, n. 20, p. 5309-5319, 2006.

LIU, C.; LIN, N.; WU, B.; QIU, Y. Neuroprotective effect of memantine combined with topiramate in hypoxic-ischemic brain injury. **Brain Res.**, v.28, p.173-182, 2009.

LO, E.H.; DALKARA, T.; MOSKOWITZ, M.A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 4, p. 399–415, 2003.

LONGA, E.Z.; WEINSTEIN, P.R.; CARLSON, S.; CUMMINS, R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. **Stroke**, v. 20, p.84-91, 1989.

LONGSTRETH JR, W. T.; DIKMEN, S. S. Outcomes after cardiac arrest. **Ann. Emerg. Med.**, v. 22, n. 1, p. 64–69, 1993.

LOPES, C. R. F. R. **Erythrina velutina Willd:** avaliação fitoquímica, farmacológica e biológica. 2010. 117 p. Dissertação (mestrado) – Núcleo de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, 2010.

LOPEZ, J. F.; AKIL, H.; WATSON, S. J. Role of biological and psychological factors in early development and their impact on adult life-neural circuits mediating stress. **Biol. Psychiat.**, v. 46, p. 1461-1471, 1999.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**. 2. ed. São Paulo: Plantarum, 1998.

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

LOTUFO, P.A.; BENSENOR, I.M. Social exclusion and stroke mortality. **Stroke**, v.36, p.505, 2005.

MAGNUSSON, K. R.; CLEMENTS, J. R.; WU, J. Y.; BEITZ, A. J. Colocalization of taurine- and cysteine sulfinic acid decarboxylase-like immunoreactivity in the hippocampus of the rat. **Synapse**, v. 4, n. 1, p. 55-69, 1989.

MALM, J.; BERGENHEIM, A.T.; ENBLAD, P.; HÅRDEMARK, H.G.; KOSKINEN, L.O.; NAREDI, S.; NORDSTRÖM, C.H.; NORRVING, B.; UHLIN, J.; LINDGREN, A. The Swedish Malignant Middle cerebral artery Infarction Study: long-term results from a prospective study of hemicraniectomy combined with standardized neurointensive care. **Acta Neurol. Scand.**, v. 113, n. 1, p. 25-30, 2006.

MASSIEU, L.; TAPIA, R. Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats in vivo. **J. Neurochem.**, v. 69, p. 1151-1160, 1997.

MATTSON, M.P.; CULMSEE, C.; YU, Z.F. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. **Cell Tissue Res.**, v. 301, n. 1, p. 173–187, 2000.

MILNER, B.; SQUIRE, L.R.; KANDEL, E.R. Cognitive neuroscience and the study of memory. **Neuron**, v. 20, p. 445-468, 1998.

MORAES, S. M. D.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; SANTOS-DE-OLIVEIRA, R.; PINTO, V. P. T.; OLIVEIRA, J. T. A. Purification, physicochemical characterization and biological properties of a lectin from *Erythrina velutina* forma aurantiaca seeds. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.29, p. 977-985, 1996.

MOREIRA, A.J.P.; MARCHIORO, M. Ações anti-convulsivantes do extrato aquoso bruto da casca de *Erythrina mulungu*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15., 1998, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 1998.

MORS, W. B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal plants of Brazil**. [S.l.]: Algonac, 2000.

NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CLINICAL EXCELLENCE. **Stroke:** diagnosis and initial management of acute stroke and transient ischaemic attack (TIA). Disponível em: <<http://www.nice.org.uk/nicemedia/pdf/StrokeAcuteTIAClinicalGuidelineFullVersionConsultation.pdf>> Acesso em: 25 May 2011.

NGUYEN, P. H.; LE, T. V.; THUONG, P. T.; DAO, T. T.; NDINTEH, D. T.; MBAFOR, J.; KANG, K. W.; OH, W. K. Cytotoxic and PTP1B inhibitory activities from *Erythrina abyssinica*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.19, p. 6745-6749, 2009.

OADES, R.; TAGHZOUTI, K.; SIMON, H.; LE MOAL, M. Dopaminesensitive alternation and collateral behavior in a Y-maze: Effects of d-amphetamine and haloperidol. **Psychopharmacology**, v. 85, p. 123-128, 1985.

OHTAKI, H.K.; DOHI, T.; NAKAMACHI, S.; YOFU, S.; KUDO, Y.; SHIODA, S. Evaluation of Brain Ischemia in Mice: Acta Hist. **Et Cytochemica**, v. 38, p. 99-106, 2005.

OLFERT, E. D.; CROSS, B. M.; MCWILLIAN, A. A. **Guide to the care and use of experimental animals**. 2nd ed. [S.l.]: Canadian Council on Animal Care, 1993.

OLIVEIRA, F. S.; DANTAS, M.C.; ANTONIOLLI, A.R.; MARCHIORO, M. Efeito do extrato aquoso das folhas da *Erythrina velutina* Willd sobre o desempenho de camundongos no teste de campo aberto. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16., 2000, Recife. **Anais...** Recife, 2000. p. 232.

OLSEN, G.M.; SCHEEL-KRUGER, J.; MOLLER, A.; JENSEN, L.H. Relation of spatial learning of rats in the Morris water maze task to the number of viable CA1 neurons following four-vessel occlusion. **Behav. Neurosci.**, v.108, p.681-690, 1994.

ONUSIC, G.M.; NOGUEIRA, R.L.; PEREIRA, A.M.; FLAUSINO JÚNIOR, O.A.; VIANA, M.D.E. Effects of chronic treatment with a water-alcohol extract from *Erythrina mulungu* on anxiety-related responses in rats. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 26, p.1538-1542, 2003.

ONUSIC, G.M.; NOGUEIRA, R.L.; PEREIRA, A.M.; VIANA, M.B. Effect of acute treatment with a water-alcohol extract of *Erythrina mulungu* on anxiety-related responses in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 473-477, 2002.

PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D.; CHERICI, G.; ALESIANI, M.; CARLA, V.; MORONI, F. Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. **J. Neurosci.**, v. 10, p. 1035-1041, 1990.

PENG, P.; ZHONG, X.; TU, W.; SOUNDARAPANDIAN, M. M.; MOLNER, P.; ZHU, D.; LAU, L.; LIU, S.; LIU, F.; LU, Y. ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia. **Neuron**, v. 49, n. 5, p. 719-733, 2006.

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. Neuropsiquiatr.**, v. 62, n. 3B, p.844-851, 2004.

PRASANNA, G.; KRISHNAMOORTHY, R.; CLARK, A.F.; WORDINGER, R.J.; YORIO, T. Human optic nerve head astrocytes as a target for potential therapeutic strategies. **Prog. Retin Eye Res.**, v. 23, p. 91-147, 2004.

PULSINELLI, W. Pathophysiology of acute ischaemic stroke. **Lancet**, v. 29, n. 339, p.533-536, 1992.

PULSINELLI, W. The ischemic penumbra in stroke. **Scient. Am. Med. Sci.**, v. 2, p.16-25, 1995.

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.

RABELO, L. A.; AGRA, M. F.; da-CUNHA, E. V.; da SILVA, M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. Homohesperetin and phaseollidin from *Erythrina velutina*. **Biochem. System. Ecol.**, v. 29, n. 5, p. 543-544, 2001.

RAO, V.L.; DOGAN, A.; TODD, K.G.; BOWEN, K.K.; DEMPSEY, R.J. Neuroprotection by memantine, a non-competitive NMDA receptor antagonist after traumatic brain injury in rats. **Brain Res.**, v. 911, p.96-100, 2001.

RAUPP, I. M.; SERENIKI, A.; VIRTUOSO, S.; GHISLANDI, C.; CAVALCANTE, E.; SILVA, E. L.; TREBIEN, H. A.; MIGUEL, O. G.; ANDREATINI, R. Anxiolytic-like effect of chronic treatment with *Erythrina velutina* extract in the plus-maze test. **J. Ethnopharmacol.**, v.118, p.295-299, 2008.

RIBEIRO, M. D.; ONUSIC, G. M.; POLTRONIERI, S. C.; VIANA, M. B. Effect of *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in rats submitted to animal models of anxiety and depression. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.39, p.263-270, 2006.

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, p.131-141, 1981.

RIEDEL, G.; MICHEAU, J. Function of the hippocampus in memory formation: desperately seeking resolution. **Prog. Neuro Psychopharmacol.**, v. 25, p. 835-853, 2001.

ROBERTS, L.; COUNSELL, C. Assessment of clinical outcome in acute Stroke trials. **Stroke**, v.29, p. 986-991, 1998.

ROSAMOND, W.; FLEGAL, K.; FURIE, K.; GO, A.; GREENLUND, K.; HAASE, N.; HAILPERN, S.M.; HO, M.; HOWARD, V.; KISSELA, B.; KISSELA, B.; KITTNER, S.; LLOYD-JONES, D.; MCDERMOTT, M.; MEIGS, J.; MOY, C.; NICHOL, G.; O'DONNELL, C.; ROGER, V.; SORLIE, P.; STEINBERGER, J.; THOM, T.; WILSON, M.; HONG, Y. Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. **Circulation**, v. 117, n. 4, p.25-146, 2008.

ROSSI, D.J.; OSHIMA, T.; ATTWELL, D. Glutamate release in severe brain ischemia is mainly by reversed uptake. **Nature**, v.403, p.316-321, 2000.

ROTHMAN, S.M.; OLNEY, J.W. Glutamate and the pathophysiology of hipoxic-ischemic brain damage. **Ann. Neurol.**, v.19, p.105-111, 1986.

RUGGIERO, R. N.; BUENO-JÚNIOR, L. S.; ROSSI, J. B.; FACHIM, H. A.; PADOVAN-NEITO, F. E.; MERLO, S.; ROHNER, C. J. S.; IKEDA, É. T.; BRUSCO, J.; MOREIRA, J. E. Neurotransmissão glutamatérgica e plasticidade sináptica: aspectos moleculares, clínicos e filogenéticos. **Medicina**, v. 44, n. 2, p. 143-156, 2011.

SARANSAARI, P.; OJA, S. S. Excitatory amino acids evoke taurine release from cerebral cortex slices from adult and developing mice. **Neuroscience**, v. 45, n. 2, p. 451-459, 1991.

SARTER, M.; BODEWITZ, G.; STEPHENS, D. N. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. **Psychopharmacology**, v. 94, n. 4, p. 491-495, 1988.

SENCER, A.; ARICA, O.; KIRIS, T.; GORGULU, A.; AKTAN, D. Effects of memantine and MK-801 on ischemia in an experimental model of acute subdural hematoma: **Neurol.Res.**, v. 30, p. 497-503, 2008.

SHUAIB, A.; LEES, K. R.; LYDEN, P.; GROTTA, J.; DAVALOS, A.; DAVIS, S. M.; DIENER, H. C.; ASHWOOD, T.; WASIEWSKI, W. W.; EMERIBE, U. NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke. **N. Engl. J. Med.**, v. 357, n. 6, p. 562-571, 2007.

SIESJO, B. K. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. **Neurosurgery**, v. 77, n. 3, p.337-354, 1992.

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

SMITH, M.L.; BENDEK, G.; DAHLGREN, N.; ROSEN, I.; WIELOCH, T.; SIESJO, BK. Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. **Acta Physiol Scand.**, v. 69, n. 6, p.385-401, 1984.

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

SOUSA, F.C.F.; MELO, C.T.V.; CITO, C.O.M.; FÉLIX, F.H.C.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.F.; BARBOSA FILHO, J.M.; VIANA, G.S.B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.18, p. 642-654, 2008.

SQUIRE, L.R.; ZOLA, S.M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 26, n. 93, p. 13515-13522, 1996.

STAM, J. Thrombosis of the cerebral veins and sinuses. **N. Engl. J. Med.**, v.352, n. 17, p. p.1791-1798, 2005.

STOJANOVIC, D.; FERNANDEZ, M.; CASALE, I.; TRUJILLO, D.; CASTES, M. Characterization and mitogenicity of a lectin from *Erythrina velutina* seeds. **Phytochemistry**, v. 37, n. 4, p. 1069-1074, 1994.

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

TAKAHASHI, S.; HIGANO, S.; KURIHARA, N.; MUGIKURA, S.; SAKAMOTO, K.; NOMURA, H.; IKEDA, H. Correlation of lesions in the hippocampal region noted on MR images with clinical features. **Eur. Radiol.**, v.7, p.281–286, 1997.

TANAKA, H.; GROOMS, S.Y.; BENNETT, M.V.; ZUKIN, R.S. The AMPAR subunit GluR2: still front and center-stage. **Brain Res.**, v. 886, p.190–207, 2000.

TEIXEIRA-SILVA, F.; SANTOS, F. N.; SARASQUETA, D. F. O.; ALVES, M. F. S., NETO ARAÚJO, V.; PAULA, I. C. M.; ESTEVAM, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; MARCHIORO, M. Benzodiazepine-like effects of the alcohol extract from *Erythrina velutina* leaves: Memory, anxiety, and epilepsy. **Pharm. Biol.**, v. 46, n. 5, p. 321-328, 2008.

TORNER, J. Epidemiology and risk factors for stroke. In: ADAMS, H. **Handbook of cerebrovascular diseases**. 2nd ed. New York: Marcel Dekken, 2005. p.1-19.

TRAYSTMAN, R. J. Animal models of focal and global cerebral ischemia. **ILAR J.**, v. 44, n. 2, p.85-95, 2003.

TRAYSTMAN, R. J.; KIRSCH, J.R.; KOEHLER, R.C. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. **J. Appl. Physiol.**, v.71, p.1185-1195, 1991.

ULRICH, P.T.; KROPPESTEDT, S.; HEIMANN, A.; KEMPSKI, O. Laser-Doppler scanning of local cerebral blood flow and reserve capacity and testing of motor and memory functions in a chronic two-vessel occlusion model in rats. **Stroke**, v. 29, p. 2412–2420, 1998.

VASCONCELOS, S. M. M.; SALES, G. T. M.; LIMA, N. M.; LOBATO, R. F. G.; MACÊDO, D. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LEAL, L. K. A. M.; FONTELES, M. M. F.; SOUSA, F. C. F.; OLIVEIRA, J. L.; VIANA, G. S. B. Anti-inflammatory activities of the hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 21, n. 6, p. 11155-11158, 2011.

VASCONCELOS, S.M.M.; LIMA, N.M.; AGUIAR, C.C.T.; SOUSA, F.C.F.; VIANA, G. S.B. Behavioral study with *Erythrina velutina* fractions. **Asian Pacific J. Trop. Med.**, v. 2, p. 30-33, 2009.

VASCONCELOS, S. M. M.; LIMA, N. M.; SALES, G. T. M.; CUNHA, G. M. A.; AGUIAR, L. M. V.; SILVEIRA, E. R.; RODRIGUES, A. C. P.; MACEDO, D. S.; FONTELES, M. M. F.; SOUSA, F. C.F.; VIANA, G. S. B. Anticonvulsant activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu*. **J. Ethnopharmacol.**, v.110, n. 2, p. 271-274, 2007.

VASCONCELOS, S. M. M.; MACEDO, D. S.; MELO, C. T.; PAIVA, M. A.; RODRIGUES, A. C.; SILVEIRA, E. R.; CUNHA, G. M.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. Central activities of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 56, p. 389-393, 2004.

VASCONCELOS, S.M.M.; OLIVEIRA, G.R.; CARVALHO, M.M.; RODRIGUES, A.C.P.; SILVEIRA, E.R.; FONTELES, M.M.F.; SOUSA, F.C.F.; VIANA, G.S.B. Antinociceptive activities of the hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 26, p. 946-949, 2003.

VAN DER KNAAP, M. S.; VALK, J. **Magnetic resonance of myelination and myelin disorders**. 3rd ed. Berlin: Springer, 2005.

VERTES, R. P. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. **Neuroscience**, v.142, p.1-20, 2006.

VIANNA, M.R.M.; IZQUIERDO, I.; BARROS, D.M.; DE SOUZA, M.M.; RODRIGUEZ, C.; SANTANA, M.K.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Pharmacological differences between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learning. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.34, p. 233–240, 2001.

VIRTUOSO, S. **Estudo fitoquímico e biológico das cascas de *Erythrina velutina* Willd. – Fabaceae (Leguminosae - Papilionoide)**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2005.

WALZ, R.; ROESLER, R.; QUEVEDO, J.; ROCKENBACH, I. C.; VIANNA, M. R.; LENZ, G.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Dose-dependent impairment of inhibitory avoidance retention in rats by immediate post-training infusion of a mitogen-activated protein kinase inhibitor into cortical structures. **Behav. Brain Res.**, v. 105, n. 2, p. 219-223, 1999.

WANG, F.; SHING, M.; HUEN, Y.; TSANG, S. Y.; XUE, H. Neuroactive flavonoids interacting with GABAA receptor complex. **Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.**, v. 4, p. 575-585, 2005.

WANG, G. H.; JIANG, Z. L.; FAN, X. J.; ZHANG, L.; LI, X.; KE, K. F. Neuroprotective effect of taurine against focal cerebral ischemia in rats possibly mediated by activation of both GABAA and glycine receptors. **Neuropharmacology**, v. 52, p. 1199-1209, 2007.

WATSON, B.D.; DIETRICH, W.D.; BUSTO, R.; WACHTEL, M.S.; GINSBERG, M.D. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. **Ann. Neurol.**, v. 17, n. 5, p.497-504, 1985.

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

WEISS, J.H.; SENSI, S.L. Ca²⁺-Zn²⁺ permeable AMPA or kainate receptors: possible key factors in selective neurodegeneration. **Trends Neurosci.**, v. 23, p. 365–371, 2000.

WILLIAMS, J. A.; BARREIRO, C. J.; NWAKANMA, L. U.; LANGE, M. S.; KRATZ, L. E.; BLUE, M. E.; BERRONG, J.; PATEL, N. D.; GOTT, V. L.; TRONCOSO, J. C.; JOHNSTON, M. V.; BAUMGARTNER, W. A. Valproic acid prevents brain injury in a canine model of hypothermic circulatory arrest. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 81, n. 6, p. 2235-2241, 2006.

WONG, C. G.; BOTTIGLIERI, T.; SNEAD, O. C. GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease. **Ann. Neurol.**, v. 5, Suppl. 6, p. 3-12, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The World Health Report 2010: reducing risks, promoting healthy lifestyles.** Geneva, 2010.

WU, J. Y.; PRENTICE, H. Role of taurine in the central nervous system. **Biomed. Sci.**, v. 24, n.17, Suppl. 1, 2010.

YIN, H. Z.; SENSI, S. L.; OGOSHI, F.; WEISS, J. H. Blockade of Ca²⁺ + -permeable AMPA/kainite channels decreases oxygen-glucose deprivation-induced Zn²⁺ accumulation and neuronal loss in hippocampal pyramidal neurons. **J. Neurosci.**, v. 22, p.1273–1279, 2002.

YOSHIDA, W. B. Fisiopatologia da isquemia e reperfusão. In: MAFFEI, F. H. A. **Doenças vasculares periféricas.** São Paulo: MEDSI, 2002. p. 253-258.

YUN, Y. J.; LEE, B.; HAHM, D.H.; KANG, S. K.; HAN S.M.; LEE H. J.; PYUN, K. H.; SHIM, I. Neuroprotective effect of palmul-chongmyeong-tang on ischemia-induced learning and memory deficits in the rat. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 30, p. 337-342, 2007.

ZARCO, L. A; GONZÁLEZ, F.; ORAL CASAS, J. Tratamiento actual del ataque cerebrovascular isquémico (ACV) agudo. **Univ. Med.**, Bogotá, v. 49, n. 4, p. 467-498, 2008.

ZHANG, Y.; LI, Q.; LI, X.; WAN, H.Y.; WONG, M.S. Erythrina variegata extract exerts osteoprotective effects by suppression of the process of bone resorption. **Br. J. Nutr.**, v. 21, p.1-7, 2010.

ZIEMANN, U.; MEINTZSCHEL, F.; KORCHOUNOV, A.; TIHOMIR, V. Pharmacological Modulation of Plasticity in the Human Motor Cortex. **Neurorehabil. Neural Repair**, v. 20, p.243, 2006.

ZULLINO, D.F.; KHAZAAL, Y.; HATTENSCHWILER, J.; BERGEAT, F.; BESSON, J. Anticonvulsant drugs in the treatment of substance withdrawal. **Drugs Today**, v. 40, n. 7, p. 603-619, 2004.

ANEXO

Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366-8338 Fax (85) 3366-8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 17/06, sobre o projeto intitulado: “**Estudo farmacológico das plantas *Erythrina velutina* e *Erythrina mulungu* em roedores**” está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal CEPA em reunião realizada em 11 de agosto de 2006.

Fortaleza, 24 de agosto de 2006

Profa. Dra. Gisela Costa Camarão
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA