



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

ANA CAROLINE BARROS PARENTE

**TIMOL, UM MONOTERPENO, PROTEGE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A
ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL PERMANENTE CONTRA DÉFICIT DE MEMÓRIA E
DANO NEURONAL**

FORTALEZA

2024

ANA CAROLINE BARROS PARENTE

TIMOL, UM MONOTERPENO, PROTEGE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A PMCAO
CONTRA DÉFICIT DE MEMÓRIA E DANO NEURONAL

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

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

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

- P252t Parente, Ana Caroline Barros.
Timol, um monoterpreno, protege camundongos submetidos a isquemia cerebral focal permanente contra déficit de memória e dano neuronal / Ana Caroline Barros Parente. – 2024.
98 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2024.
Orientação: Profª. Dra. Geanne Matos de Andrade.
1. Isquemia cerebral; . 2. Neuroproteção; . 3. Timol; . 4. Acetilcolinesterase; . 5. Memória.. I. Título.
CDD 610
-

ANA CAROLINE BARROS PARENTE

TIMOL, UM MONOTERPENO, PROTEGE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A PMCAO
CONTRA DÉFICIT DE MEMÓRIA E DANO NEURONAL

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

Orientador(a): Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Victor Anastácio Duarte Holanda
Johns Hopkins University - School of Medicine

Prof. Dr. Orleancio Gomes Ripardo de Azevedo
Instituto de Educação Médica - Faculdade Estácio de Canindé

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter abençoado minha trajetória e ter me dado força e disciplina, ao longo desses últimos anos. Sou grata pelas bênçãos que recaíram sobre mim. A ele, toda a honra e toda a glória!

Aos meus pais, José e Liduina, pelo amor incondicional, incentivo e apoio, emocional e financeiro que deles recebi ao longo dos anos e por me acompanharem durante mais uma etapa acadêmica da minha vida. Meu sentimento é de gratidão eterna.

As minhas primas e tias, Daiara, Débora, Marta, e Julieta, agradeço pela amizade, pelo carinho, pela cumplicidade, companheirismo, por estarem sempre presentes (mesmo a distância) e por toda a torcida em prol das minhas conquistas. Vocês são muito importantes para mim!

À minha orientadora, Professora Dra. Geanne Matos de Andrade, agradeço por ter me aceitado como aluna há quase três anos, por cada ensinamento ao longo desse período, por ter contribuído para a minha formação científica e pela oportunidade de crescimento acadêmico. O meu sentimento é de gratidão e admiração sincera!

A todos os meus amigos do Laboratório de Neurociências e Comportamento, com quem tenho a honra e o prazer de trabalhar, especialmente à: Alfaete Vieira, por toda ajuda, pelo carinho e as risadas, sua ajuda foi imprescindível na realização desse trabalho. À Arnaldo Viana, pela amizade, por muitos momentos de café com bolo, que me animaram mesmo nos dias mais difíceis e por tornar o ambiente de trabalho um lugar agradável e colaborativo! À Jéssica Pessoa pela amizade e por toda terapia gratuita regada a café, sua amizade é muito importante para mim. À Tyciane Nascimento, pela ajuda que antecedeu até mesmo a seleção do mestrado, por toda colaboração dada à realização deste trabalho, agradeço por toda orientação.

À minha querida amiga Mayara Aguiar, por toda assistência nos experimentos e por cada conselho relacionado a esse trabalho. Além disso, sou grata pela amizade nesses dois anos. Sua chegada e permanência no laboratório tornaram meus dias melhores.

Agradeço à Juliete Tavares pela amizade e pela disponibilidade em me ajudar, muitas vezes aos fins de semana, além de todo apoio emocional e por compartilhar seus conhecimentos comigo.

Sou grata também à Amanda Aragão pela ajuda logo no início dos experimentos os quais eu ainda não tinha domínio dos protocolos experimentais. À Ana Thais Araújo, por compartilhar comigo boa parte do tempo, com o intuito de me ensinar práticas cirúrgicas, pelos conhecimentos e por estar disponível a prestar uma ajuda.

À minha prezada amiga Queila Ferreira, por todo apoio durante o mestrado e por sempre me incentivar a ser melhor. Também agradeço, à minha amiga Aline Crisnir por todo suporte e amizade, há mais de seis anos, seu apoio foi essencial na evolução desse trabalho.

Agradeço a minha estimada amiga Isabelle Luna, por toda amizade e apoio desde os tempos da iniciação científica, mesmo nos dias mais difíceis você sempre teve bons conselhos e palavras doces a me dar. Sou grata também, a Dra. Andréa Lima de Sá, minha primeira orientadora, por quem cultivo profunda admiração, que muito me ensinou sobre o mundo acadêmico durante a iniciação científica. Esse período foi crucial para a construção da profissional que sou hoje.

Ao meu querido amigo Flávio Sidou, por cada palavra de apoio e encorajamento, as quais me ajudaram a colocar projetos mirabolantes em prática.

A Profa. Dra. Ana Paula Fontenele Menezes e ao Dr. Jarbas de Sá Roriz Filho, por aceitarem participar da minha banca de Exame de Qualificação e por me ajudarem a aperfeiçoar esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Victor Anastácio Duarte Holanda e ao Dr. Orleancio Gomes Ripardo de Azevedo, por aceitarem participar da minha Banca de Defesa e por me ajudarem a aperfeiçoar esse trabalho.

A Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade de fazer o curso de pós-graduação, pelo seu corpo docente, direção e administração que foram pilares na minha trajetória.

Agradeço também ao Órgão Financiador CAPES, pela bolsa concedida ao longo desses dois anos.

Chego assim, ao fim desta etapa tão marcante. Mais uma vez, obrigada a todas as pessoas que fizeram parte desse processo. A vocês dedico o meu mais sincero agradecimento!

“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo.” (Walter S. Landor)

RESUMO

O Acidente Vascular Cerebral (AVC) é a segunda principal causa de morte e incapacidade no mundo e envolve a redução do suprimento sanguíneo em áreas cerebrais. No Brasil, o AVC é a principal causa de incapacitação em pessoas acima de 50 anos, devido à alta morbidade e mortalidade, gera altos custos com tratamento e reabilitação. O AVC acarreta excitotoxicidade, estresse oxidativo, apoptose e danos teciduais na região afetada. O timol um monoterpeneo, encontrado em plantas aromáticas, apresenta atividade antimicrobiana, antifúngica, antitumoral, antibacteriano e atividade anti-inflamatória. Objetivamos avaliar os efeitos do timol sobre o dano neuronal, déficits de memória, estresse oxidativo e atividade da acetilcolinesterase de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente (pMCAO). Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, divididos em cinco grupos: Falso operado (FO), FO+TIMOL50, pMCAO, pMCAO+TIMOL25, pMCAO+TIMOL50 (via oral). Os animais receberam o timol três horas após pMCAO, por 5 dias. Após o tratamento os animais foram submetidos a avaliação sensoriomotora, locomotora (campo aberto) e de memória (de reconhecimento, operacional e aversiva). Os animais foram eutanasiados e foram retiradas as áreas cerebrais (córtex temporal, estriado e hipocampo) para a avaliação da área do infarto e morte neuronal (coloração 2,3,5-trifeniltetrazol (TTC), cresil violeta), estresse oxidativo (Malonaldeído (MDA), Nitrito e Tióis totais) e a atividade da acetilcolinesterase. O tratamento com o timol (50mg/Kg) protegeu contra os déficits sensoriomotores e diminuiu a área do infarto nos animais submetidos à pMCAO. O tratamento com o timol (mg/Kg), protegeu os animais contra déficits na atividade locomotora vertical. O timol (25mg/Kg) protegeu os camundongos contra os déficits de memória de trabalho e de memória aversiva tardia. O timol, reduziu o comprometimento sobre a memória de reconhecimento recente e tardia nos camundongos. O timol protegeu contra o aumento da concentração de MDA, no estriado e no hipocampo e contra o aumento da concentração de nitrito no córtex temporal e hipocampo dos animais. O tratamento com o timol na dose de 50 mg/Kg foi capaz de aumentar a concentração do conteúdo tiólico total no corpo estriado dos camundongos. O timol (50 mg/Kg), inibiu a atividade da acetilcolinesterase no córtex total, que se encontrava aumentada nos animais. O timol, aumenta a viabilidade celular avaliada pela coloração para Cresil violeta no estriado e no hipocampo (regiões CA1, CA3 e GD), dos camundongos. Nossos resultados indicam, que o timol pode modificar diversas vias associadas à isquemia cerebral. Entre essas alterações estão a prevenção do estresse oxidativo, a melhoria da neurotransmissão colinérgica, a mitigação dos déficits sensoriomotores e da perda neuronal, além de reduzir os déficits de memória causados pela condição. Esses achados sugerem que o timol pode ser um potencial agente terapêutico para atenuar os danos provocados pela isquemia cerebral.

Palavras-chave: Isquemia cerebral; Neuroproteção; Timol; Estresse oxidativo; Acetilcolinesterase; Memória.

ABSTRACT

Stroke (Cerebrovascular Accident - CVA) is the second leading cause of death and disability worldwide and involves the reduction of blood supply to brain areas. In Brazil, stroke is the leading cause of disability in people over 50 years old due to its high morbidity and mortality, generating high costs for treatment and rehabilitation. Stroke results in excitotoxicity, oxidative stress, apoptosis, and tissue damage in the affected region. Thymol, a monoterpene found in aromatic plants, has antimicrobial, antifungal, antitumor, antibacterial, and anti-inflammatory activities. We aim to evaluate the effects of thymol on neuronal damage, memory deficits, oxidative stress, and acetylcholinesterase activity in mice subjected to permanent focal cerebral ischemia (pMCAO). Male *Swiss* mice were used, divided into five groups: FO, FO+THYMOL50, pMCAO, pMCAO+THYMOL25, pMCAO+THYMOL50 (orally administered). The animals received thymol three hours after pMCAO for 5 days. After treatment, the animals underwent sensorimotor, locomotor (open field), and memory (recognition, working, and aversive) evaluations. The animals were euthanized, and brain areas (temporal cortex, striatum, and hippocampus) were collected for the evaluation of infarct area and neuronal death (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining, cresyl violet), oxidative stress (Malondialdehyde (MDA), nitrite, and total thiols), and acetylcholinesterase activity. Treatment with thymol (50 mg/kg) protected against sensorimotor deficits and reduced the infarct area in animals subjected to pMCAO. Treatment with thymol (mg/kg) protected the animals against deficits in vertical locomotor activity. Thymol (25 mg/kg) protected the mice against working memory and late aversive memory deficits. Thymol, reduced impairment in recent and late recognition memory in mice. Thymol protected against the increase in MDA concentration in the striatum and hippocampus and against the increase in nitrite concentration in the temporal cortex and hippocampus of the animals. Treatment with thymol at a dose of 50 mg/kg was able to increase the total thiol content concentration in the striatum of the mice. Thymol (50 mg/kg) inhibited acetylcholinesterase activity in the total cortex, which was increased in the animals. Thymol, increased cell viability evaluated by cresyl violet staining in the striatum and hippocampus (CA1, CA3, and DG regions) of the mice. Our results indicate that thymol can modify several pathways associated with cerebral ischemia. These changes include the prevention of oxidative stress, improvement of cholinergic neurotransmission, mitigation of sensorimotor deficits, and neuronal loss, as well as reducing memory deficits caused by the condition. These findings suggest that thymol could be a potential therapeutic agent to attenuate the damage caused by cerebral ischemia.

Keywords: Cerebral ischemia; Neuroprotection; Thymol; Oxidative stress; Acetylcholinesterase; Memory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação e diferenciação entre AVC isquêmico e AVC hemorrágico	15
Figura 2	Tomografia do crânio: AVC hemorrágico (esquerda) e isquêmico (direita)	18
Figura 3	Cascata isquêmica	20
Figura 4	Esquema das artérias cerebrais anteriores e posteriores, artérias comunicantes anteriores e posteriores e carótida interna que formam o polígono de Willis	22
Figura 5	Resumo esquematizado da vascularização encefálica	28
Figura 6	Planta Alecrim-pimenta e estrutura química do monoterpene Timol	36
Figura 7	Protocolo experimental	42
Figura 8	Ilustração da Cirurgia de indução isquêmica focal pelo método da Oclusão permanente da Artéria Cerebral Média (pMCAO)	43
Figura 9	Arena do campo aberto	46
Figura 10	Labirinto em Y	47
Figura 11	Aparelho de esquiva passiva. (Insight LTDA)	48
Figura 12	Representação da metodologia do teste de reconhecimento de objetos	49
Figura 13	O timol na dose de 50mg/Kg melhora os déficits sensoriomotores nos animais	54
Figura 14	Fotografia das fatias cerebrais dos animais submetidos a pMCAO e tratados com o timol (coloração com TTC 1%)	55
Figura 15	O timol diminui a área do infarto isquêmico nos camundongos	55
Figura 16	O timol protegeu contra a diminuição da atividade locomotora vertical dos animais	56
Figura 17	O timol (25mg/Kg), protege os camundongos contra os déficits de memória de trabalho	57
Figura 18	O timol (25mg/Kg), protege os camundongos contra os déficits de memória aversiva tardia	58

Figura 19	Efeito do timol (25 e 50 mg/Kg) sobre a memória episódica (teste de reconhecimento de objetos)	59
Figura 20	Efeito do timol (25 e 50 mg/Kg) sobre a peroxidação lipídica avaliado pela dosagem de MDA no córtex temporal (A), corpo estriado (B) e hipocampo (C)	60
Figura 21	Efeito do timol (25 e 50 mg/Kg) sobre a dosagem de nitrito/nitrato no córtex temporal (A), corpo estriado (B) e hipocampo (C)	61
Figura 22	O tratamento com o timol na dose de 50 mg/Kg foi capaz de aumentar a concentração do conteúdo tiólico total no córtex total e no corpo estriado	62
Figura 23	Efeito do timol (25 e 50 mg/Kg) sobre a atividade da AChE avaliado no córtex temporal (A), corpo estriado (B), hipocampo (C) e córtex total (D)	64
Figura 24	Efeito do tratamento com timol (25 e 50 mg/Kg) sobre a viabilidade celular no corpo estriado	65
Figura 25	O timol (25 e 50 mg/Kg), aumenta a viabilidade celular no estriado	66
Figura 26	Efeito do timol (25 e 50 mg/Kg) sobre a viabilidade celular no hipocampo (regiões CA1, CA3 e GD)	68
Figura 27	O timol (25 e 50mg/Kg), aumenta a viabilidade celular no hipocampo (regiões CA1, CA3 e GD)	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resumo dos sintomas e respectivos prognósticos associados a um AVC	17
Tabela 2	Terpenóides	34
Tabela 3	Grupos de tratamento	41
Tabela 4	Escala utilizada para a avaliação neurológica	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Acetilcolinesterase
ACM	Artéria Cerebral Média
AMPA	Ácido Amino-3-Hidroxi-5-Metil-Isoxasole-Propiônico
NA	Avaliação Neurológica
ATP	Trifosfato de Adenosina
AVC	Acidente Vascular Cerebral
AVCI	Acidente Vascular Cerebral Isquêmico
AVCIA	Acidente Vascular Cerebral Isquêmico Agudo
AVE	Acidente Vascular Encefálico
CA	Campo Aberto
Ca ²⁺	Cálcio Íonizado
CoW	Círculo de Willis
DA	Doença de Alzheimer
DNA	Ácido Dexorribonucléico
DP	Doença de Parkinson
DV	Demência Vascular
EPM	Erro Padrão da Média
FDA	Food And Drug Administration
FO	Falso-Operado
FSC	Fluxo Sanguíneo Cerebral
GABA	Ácido γ -Amino Butírico
GD	Giro Denteado
HTAB	Brometo de Cetil Trimetil Amônio
IC	Isquemia Cerebral
iNOS	Óxido Nitrico Sintase Induzida
KCL	Cloreto de Potássio
Kg	Quilograma
MDA	Malonaldeído
Mg	Miligramas
Min	Minutos
mL	Mililitros

mM	Milimolar
MR	Memória Recente
MT	Memória Tardia
NaCl	Cloreto de Sódio
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NO	Óxido nítrico
pMCAO	Oclusão Permanente da Artéria Cerebral Média
RNA _m	Ácido Ribonucleico Mensageiro
RO	Reconhecimento de Objetos
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
Rpm	Rotações por minuto
rt-PA	Ativador Tecidual de Plasminogênio
s	Segundos
SOD	Superóxido dismutase
TTC	Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol
Y-MAZE	Labirinto em Y

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	O Acidente Vascular Cerebral (AVC)	14
<i>1.1.1</i>	<i>Perspectivas históricas</i>	14
<i>1.1.2</i>	<i>Definição e Classificação</i>	15
<i>1.1.3</i>	<i>Epidemiologia</i>	16
<i>1.1.4</i>	<i>Sintomatologia e Diagnóstico</i>	18
1.2	Fisiopatologia da isquemia cerebral	20
<i>1.2.1</i>	<i>Core e Penumbra</i>	23
<i>1.2.2</i>	<i>Isquemia e Estresse Oxidativo</i>	24
<i>1.2.3</i>	<i>Cálcio e Excitotoxicidade</i>	25
<i>1.2.4</i>	<i>Inflamação</i>	26
<i>1.2.5</i>	<i>Apoptose</i>	27
1.3	Isquemia Cerebral Focal: Modelos experimentais <i>in vivo</i>	29
1.4	Memória	33
<i>1.4.1</i>	<i>Demência Vascular</i>	35
1.5	Tratamento	36
1.6	Monoterpenos e Neuroproteção	38
<i>1.6.1</i>	<i>Timol</i>	39
2	JUSTIFICATIVA	41
3	OBJETIVOS	42
3.1	Objetivo Geral	42
3.2	Objetivos Específicos	42
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	Animais	43
4.2	Reagentes	43
4.3	Protocolo Experimental	43
4.4	Isquemia Cerebral por Oclusão Permanente da ACM (pMCAO)	44
4.5	Avaliação Neurológica	45
4.6	Avaliação comportamental	46
<i>4.6.1</i>	<i>Avaliação da atividade locomotora (Teste de campo aberto)</i>	46
<i>4.6.2</i>	<i>Avaliação da Memória de Trabalho - Teste do labirinto em Y</i>	47

4.6.3	<i>Avaliação da Memória Aversiva – Teste da Esquiva Passiva</i>	48
4.6.4	<i>Avaliação da Memória de Reconhecimento – Reconhecimento de Objetos</i>	49
4.7	Quantificação do dano isquêmico através da coloração pelo TTC	50
4.8	Determinação da peroxidação lipídica	51
4.9	Determinação da concentração de nitrito/nitrato	52
4.10	Conteúdo Total de Sulfidril (SH)	53
4.11	Atividade da Acetilcolinesterase	54
4.12	Avaliação da degeneração neuronal pela coloração do Violeta de Cresil	55
4.13	Análise Estatística	56
5	RESULTADOS	57
5.1	Avaliação Neurológica	57
5.2	Quantificação do dano isquêmico através da coloração pelo TTC	58
5.3	<i>Avaliação da atividade locomotora</i>	59
5.4	<i>Avaliação da memória</i>	60
5.4.1	<i>Avaliação da Memória de Trabalho</i>	60
5.4.2	<i>Avaliação da Memória Aversiva</i>	61
5.4.3	<i>Avaliação da Memória de Reconhecimento</i>	62
5.5	Avaliação Bioquímica	63
5.5.1	<i>Determinação da peroxidação lipídica - MDA</i>	63
5.5.2	<i>Determinação da concentração de nitrito/nitrato</i>	65
5.5.3	<i>Conteúdo Total de Sulfidril (SH)</i>	67
5.6	Atividade da Acetilcolinesterase	69
5.7	Avaliação da degeneração neuronal pela coloração do Violeta de Cresil	71
5.7.1	<i>Avaliação da degeneração neuronal – Estriaado</i>	71
5.7.2	<i>Avaliação da degeneração neuronal - Hipocampo</i>	73
6	DISCUSSÃO	76
7	CONCLUSÃO	85
	REFERÊNCIAS	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Acidente Vascular Cerebral (AVC)

1.1.1 *Perspectivas históricas*

Hipócrates (460-370 a.C.) foi o primeiro a documentar a paralisia súbita associada ao Acidente Vascular Cerebral (AVC), observando que essa condição frequentemente resultava em hemiplegia ou hemiparesia contralateral à lesão cerebral e, frequentemente, distúrbios da fala (CEREBRAL, 2019; FERNANDES, 2019). O termo "apoplexia", usado por Hipócrates, significa "golpeado com violência" e descreve a manifestação súbita e severa dos sintomas (THOMPSON, 1996; WARLOW et al, 2007).

O entendimento moderno do AVC começou no século XVII. Johann Jacob Wepfer (1620-1695) identificou a causa do AVC hemorrágico e sugeriu que bloqueios nas artérias poderiam causar AVC isquêmico (WARLOW et al, 2007; CEREBRAL, 2019). Thomas Willis também avançou na compreensão da circulação cerebral e dos fatores que desencadeiam o AVC, com o círculo arterial na base do cérebro nomeado em sua homenagem (WARLOW et al, 2007; CEREBRAL, 2019).

O conceito de AVC foi formalizado em 1927, alinhando-se ao entendimento das teorias vasculares e da importância da interrupção súbita do suprimento sanguíneo cerebral. Atualmente, o termo "AVC" é contestado por alguns, com propostas como "Apoplexia Cerebrovascular" ou "ataque cerebral" para enfatizar a possibilidade de prevenção e a urgência da condição (WARLOW et al, 2007; CEREBRAL, 2019). Esses textos e autores estabelecem uma base robusta para compreender o desenvolvimento histórico e a progressão do conhecimento acerca do AVC. O campo do AVC continua a evoluir, com novas terapias e estratégias preventivas surgindo frequentemente.

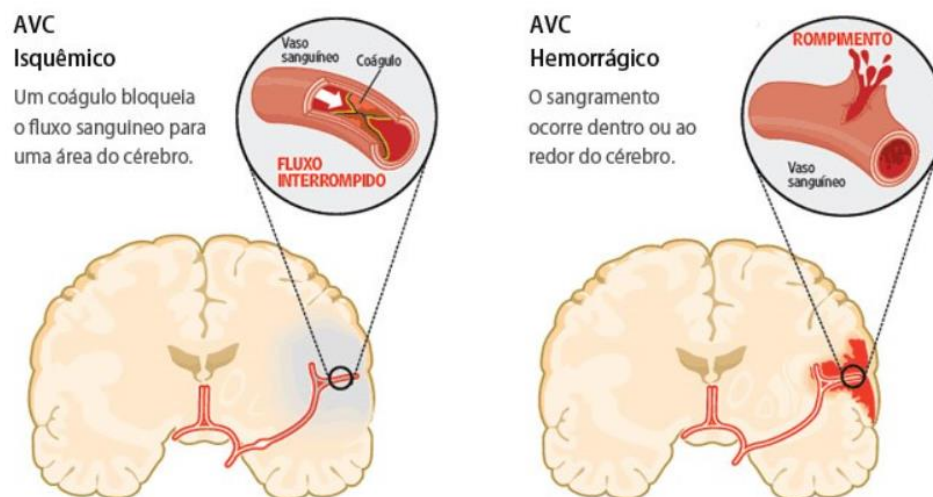
1.1.2 *Definição e classificação*

O AVC, também conhecido como derrame cerebral, é definido como uma lesão cerebral resultante da obstrução ou ruptura de vasos cerebrais, com possíveis déficits cognitivos e/ou sensório-motores conforme a região lesionada. É uma doença que comumente acomete mais o sexo masculino e é uma das principais causas de morte, incapacitação e internações em todo o mundo, gerando ao indivíduo déficits neurológicos que podem perdurar por até 24 horas. Além

disso essa patologia gera um grande gasto aos cofres públicos anualmente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Há duas categorias principais de AVC (Figura 1): isquêmico e hemorrágico. Aproximadamente 71% dos casos globais de AVC são classificados como isquêmicos, caracterizado pelo bloqueio de uma artéria no cérebro, o que restringe o fluxo sanguíneo essencial para a região abastecida por essa artéria, resultando em lesão e morte celular. O AVC isquêmico é o maior responsável pelas taxas de morbidade nos indivíduos afetados. Já o AVC hemorrágico, responsável por cerca de 29% dos casos, é caracterizado pela ruptura de vasos sanguíneos no cérebro e apesar de ter menor prevalência leva o indivíduo a morte na maioria dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021; TROTMAN-LUCAS & GIBSON, 2021).

Figura 1: Representação e diferenciação entre AVC isquêmico e AVC hemorrágico.



Fonte: LOFRANO, 2024.

1.1.3 Epidemiologia

O AVC isquêmico ocorre quando o fluxo sanguíneo no cérebro é interrompido, geralmente por obstrução de artérias importantes, causando danos graves devido à falta de oxigênio e glicose se a recanalização não for rápida (FRANKE et al, 2020). É uma das principais causas de demência e déficits neurológicos, especialmente em idosos (PLANTON et al, 2017; O'BRIEN, 2006). Com o aumento da expectativa de vida global, cresce também o impacto dessas doenças relacionadas ao envelhecimento, como AVC e demência (FEIGIN et al, 2019; VESTERGAARD et al, 2024).

Estimativas da OMS indicam que o AVC é responsável por cerca de seis milhões de mortes anuais no mundo. Além dos custos humanos, há impactos socioeconômicos significativos devido aos altos custos de tratamento, reabilitação e previdência (LOBO *et al*, 2021; OMS, 2021; GBD, 2019). Segundo Laboissière (2023), mais de 110 milhões de pessoas vivem com sequelas de um AVC. A incidência aumenta significativamente com a idade – acontecendo na maior parte dos casos entre os 70 e 80 anos (ZETOLA *et al*, 2001).

No Brasil, o AVC é a principal causa de incapacitação para pessoas com mais de 50 anos, correspondendo a 10% de todas as mortes, 32,6% das mortes por causas vasculares e 40% das aposentadorias precoces (ABRAMCZUK & VILLELA, 2019). Anualmente, cerca de 100 mil pessoas são afetadas, com 50% dos sobreviventes sofrendo sequelas graves (LOFRANO, 2024). No Ceará, de 2009 a 2020, foram registradas uma média de 7.981,5 internações por AVC ao ano. Obteve-se um aumento no número absoluto de internações por AVC em 17,3%, de 7.436 em 2009 para 8.719 em 2020 (BRAZ *et al*, 2022).

Segundo Laboissière (2023), um em cada quatro indivíduos acima de 35 anos enfrentará um AVC em algum momento da vida, sendo que 90% desses casos poderiam ser prevenidos com o controle de fatores como hipertensão, tabagismo, dieta e exercício físico. Segundo um estudo epidemiológico feito por Lobo e colaboradores (2021), o diagnóstico precoce e a atenção primária são essenciais para melhorar o prognóstico e reduzir sequelas (OLIVEIRA & WATERS, 2021). Fatores de risco como hipertensão, tabagismo, hipercolesterolemia, sedentarismo, obesidade, consumo de álcool, contraceptivos hormonais e diabetes aumentam significativamente o risco de AVC (HUSSAIN *et al*, 2021).

1.1.4 Sintomatologia e diagnóstico

Os indivíduos afetados por um acidente vascular cerebral frequentemente enfrentam uma série de complicações debilitantes (Tabela 1), que podem incluir transtornos físicos como dificuldades de deglutição, disfunção sexual, dores e mudanças nas sensações, bem como obstáculos na comunicação, afetando a fala, leitura, escrita e a compreensão, além de experimentarem um notável cansaço e esgotamento e em casos mais graves há a perda de movimentos no lado contralateral à lesão cerebral. Esses fatores têm um impacto significativo no bem-estar diário do indivíduo que sofre um AVC (TROTMAN-LUCAS & GIBSON, 2021).

Tabela 1 – Resumo dos sintomas e respectivos prognósticos associados a um AVC.

Sintoma	Região cerebral afectada	Consequências	Prognóstico
Fraqueza motora	Córtex periférico	Paresia (fraqueza localizada) afectando a face e/ou braço e/ou mão e/ou dedos	A recuperação mais acentuada ocorre nos primeiros 1-3 meses após o AVC. A reabilitação até aos 9 meses revela-se benéfica.
	Tronco cerebral, regiões sub-corticais e/ou proximais	Hemiparesia (fraqueza generalizada) afectando a face e/ou braço e/ou perna de um mesmo lado do corpo	
Ataxia	Hemisfério cerebelar	Descoordenação motora	A recuperação a longo-prazo tem excelente prognóstico.
Perda sensorial	Tálamo lateral, tronco cerebral, região lenticulocapsular	Alteração da percepção de estímulos dolorosos e térmicos, agrafestesia (incapacidade de perceber a escrita sobre a pele, de olhos fechados) e aestereognosia (incapacidade de reconhecer ou identificar a forma e os contornos dos objetos através do tacto)	
Alteração da acuidade visual	Embolismo da artéria carótida	Amaurose (perda parcial ou total da visão)	A recuperação é espontânea e ocorre até 3 meses após o AVC
	Vias visuais nos hemisférios cerebrais	Perda visual de um hemicampo	
	Lobos occipitais (ambos)	Cegueira cortical	
	Regiões posteriores do cérebro	Diplopia (visão dupla)	
Alteração da percepção visuoespacial	Região frontal de um hemisfério	Paralisia ocular	Alteração da percepção da região esquerda do corpo Anosognosia (incapacidade de ter consciência da própria doença)
	Hemisfério cerebral direito		
Alterações ao nível da linguagem e da produção de discurso	Tronco cerebral e cerebelo e regiões que provocam fraqueza localizada na face	Disartria (incapacidade de articular as palavras de forma correcta)	A recuperação pode levar de meses a anos
	Regiões do hemisfério esquerdo	Afasia (deterioração da função da linguagem)	
Défices cognitivos		Afasia e inatensão	
Défices comportamentais		Apraxia (incapacidade de executar movimentos e gestos precisos), perda de memória, demência, fadiga, depressão e outras patologias psiquiátricas	

Fonte: SILVERMAN; RYMER; RUILOPE, 2011

O AVC não é necessariamente letal, e é possível que os pacientes tenham uma vida prolongada depois de passarem por esse evento, mesmo que frequentemente enfrentem sequelas. As consequências físicas do AVC têm sido um importante objeto de estudo acerca de novas intervenções clínicas e de reabilitação ao longo de muitos anos (JOHNSON *et al*, 2016; ZHANG *et al*, 2020). Além disso, o AVC pode levar a uma gama de complicações neuropsiquiátricas, incluindo tanto aspectos cognitivos quanto não cognitivos (HACKETT *et al*, 2014). As complicações mais frequentemente observadas que não estão relacionadas à cognição incluem transtornos de depressão e ansiedade, atingindo taxas de prevalência que chegam a 37% e 24%, respectivamente (RAMÍREZ *et al*, 2020; CAROTA & BOGOUSSLAWSKY, 2012; NASCIMENTO & ALMEIDA, 2024).

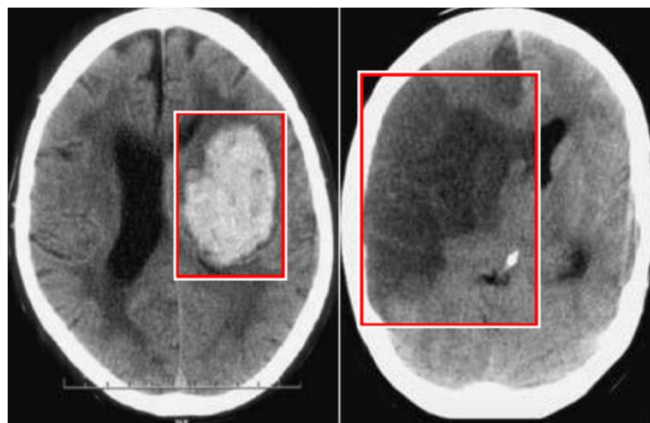
Os transtornos psicóticos, são uma sequela rara do AVC, ocorrendo em cerca de 5% dos casos. No entanto, tendo em conta a elevada incidência de AVC, existe um número substancial de pessoas que vivem com psicose associada a AVC, muitas das quais carecem de um diagnóstico formal, sendo particularmente negligenciada, apesar de seu efeito perturbador na

qualidade de vida. Em geral, os sintomas psiquiátricos pós-AVC são escassamente diagnosticados e tratados, com foco nos transtornos depressivos e de ansiedade mais frequentes. (STANGELAND; ORGETA; BELL, 2018; NASCIMENTO & ALMEIDA, 2024).

No diagnóstico do AVC, é crucial distinguir sua natureza vascular de outras condições com sintomas similares, como tumores cerebrais, enxaquecas e lesões traumáticas. Um diagnóstico preciso exige uma análise detalhada do histórico clínico, avaliação neurológica minuciosa (incluindo identificação de déficits motores e alterações na fala e marcha) e exames de imagem. (SILVERMAN *et al*, 2011). Essa abordagem integrada é vital para determinar o tratamento adequado na fase aguda, estabelecer um prognóstico confiável e desenvolver um plano de cuidados secundários personalizado, melhorando os desfechos para os pacientes (KRALJEVIĆ *et al*, 2024; WHITELEY, 2011; MOUHIEDDINE *et al*, 2015).

A detecção inicial de AVC geralmente se baseia em sinais clínicos e exames de imagem de emergência, como tomografia computadorizada (TC) (Figura 2), ou ressonância magnética (RM). Enquanto a TC cerebral sem contraste é eficaz em reconhecer o AVC hemorrágico, apresenta sensibilidade reduzida para a detecção do AVC isquêmico agudo e lesões menores. Contrastando, certas técnicas de RM, especificamente a imagem ponderada em difusão, apresentam maior sensibilidade para identificar indícios iniciais de AVC, até mesmo 30 minutos após seu começo (KRALJEVIĆ *et al*, 2024; JAUCH *et al*, 2013).

Figura 2: Imagens de tomografia do crânio: AVC hemorrágico (esquerda) e AVC isquêmico (direita).



Fonte: WARLOW *et al*, 2001.

Uma técnica inovadora que pode ser usada como uma ferramenta auxiliar na detecção e no estudo de condições vasculares cerebrais, incluindo o Acidente Vascular Cerebral Isquêmico (AVCI), hemorragias intracranianas decorrentes da ruptura de aneurismas cerebrais, na confirmação de morte cerebral, entre outros usos é o doppler transcraniano que consiste em um

ultrassom não invasivo que mede a velocidade do fluxo sanguíneo nas principais artérias do cérebro (LOFRANO, 2024).

Recentemente, tem-se surgido biomarcadores séricos altamente específicos liberados durante o AVC isquêmico como meios diagnósticos valiosos, complementando os métodos convencionais. Tais biomarcadores poderiam oferecer uma forma objetiva e rápida de diagnóstico inicial, triagem e prognóstico em pacientes acometidos por AVC (KRALJEVIĆ *et al*, 2024).

1.2 Fisiopatologia da isquemia cerebral

O AVC isquêmico pode ser dividido em focal, que acontece devido a um coágulo sanguíneo formado localmente e envolve uma pequena área cerebral, que é irrigada por uma artéria cerebral (HOMI *et al*, 2000). A isquemia global por sua vez, afeta todo Sistema Nervoso Central (SNC), causada por uma hipotensão sistêmica na ausência de um coágulo sanguíneo (HOMI *et al*, 2000). Devido a diferenças na vasculatura, diferentes regiões cerebrais têm diferentes susceptibilidades para eventos relacionados ao AVC e diferentes sensibilidades à lesão isquêmica. Portanto, vários modelos experimentais, variando em termos da região isquêmica (local vs. global), a duração do evento isquêmico (transitório vs. permanente) e os níveis relativos de hipoxia e hipoglicemia, foram estabelecidos para investigar danos neuronais isquêmicos (LIPTON, 1999).

A fisiopatologia do dano cerebral por isquemia global difere da causada pela isquemia focal. A isquemia global, geralmente breve, causa menos dano neuronal se houver reperfusão adequada, afetando principalmente neurônios vulneráveis. Já a isquemia focal é prolongada ou permanente, inicialmente afetando a área suprida pela artéria ocluída e, posteriormente, a zona de penumbra. Os caminhos de morte celular variam entre modelos animais, o que pode explicar a baixa eficácia clínica de medicamentos para AVC isquêmico desenvolvidos em estudos pré-clínicos (SIESJÖ *et al*, 1995; SIESJÖ & SIESJÖ, 1996; TUO; ZOU; LEI, 2021)

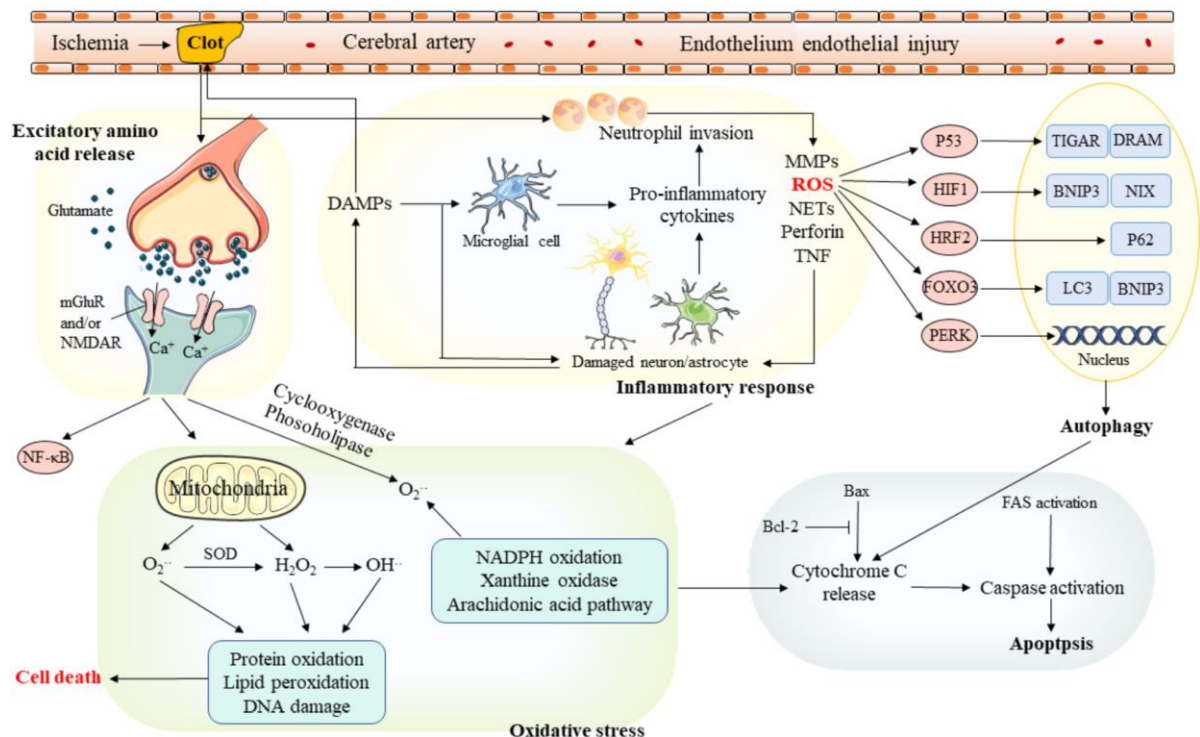
Após a isquemia cerebral (IC), inicia-se uma complexa cadeia de eventos fisiopatológicos, podendo durar horas ou até dias, mesmo após a reperfusão sanguínea e envolve diversos mecanismos de dano neuronal (BROUNS & DEYNA, 2009). A série de processos neuroquímicos transitórios ou permanentes desencadeados pela IC é chamada de cascata isquêmica (Figura 3), dividida em duas fases: aguda e subaguda, onde os principais mecanismos envolvidos são falência bioenergética, excitotoxicidade glutamatérgica,

inflamação, estresse oxidativo e morte celular de neurônios, glia e células endoteliais (BROUNS & DEYNA, 2009).

Na fase aguda da cascata isquêmica, acontece a redução do fluxo sanguíneo e há a diminuição da disponibilidade de oxigênio que afeta a principal via de produção de ATP, a fosforilação oxidativa. A diminuição dos níveis de ATP leva à falha da bomba de sódio-potássio ATPase, resultando na perda do equilíbrio iônico. Com a falência desta bomba, ocorre uma despolarização celular que permite o influxo de Ca^{2+} na célula e aumenta a liberação de Ca^{2+} intracelular e neurotransmissores excitatórios, como o glutamato (SMITH, 2004).

A recaptação do glutamato é comprometida pela redução das funções energéticas (LI *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2017). Isso, provoca uma superestimulação dos receptores glutamatérgicos, aumentando o influxo de sódio e cálcio e resultando em excitotoxicidade, dano mitocondrial, que gera a liberação de cytochrome C e apoptose (LI *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2017). Com a liberação excessiva de glutamato, começa a excitotoxicidade, que ativa vias de sinalização que desencadeiam processos inflamatórios além disso, a baixa disponibilidade de oxigênio leva à glicólise anaeróbica, resultando no acúmulo de lactato, podendo agravar o dano isquêmico. Essa acidose promove a necrose, aumentando a produção de EROs e causando disfunção mitocondrial (BROUNS & DEYN, 2009).

Figura 3: Cascata isquêmica.



Fonte: ZHU *et al.*, 2022.

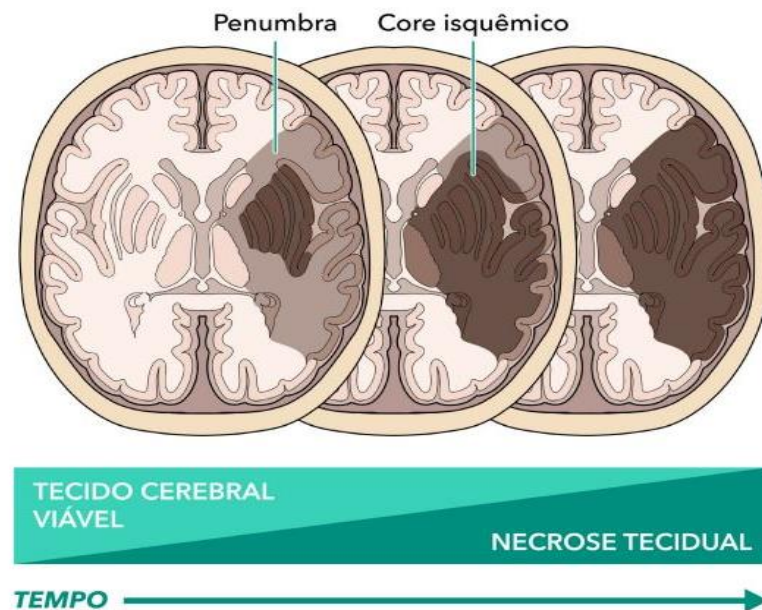
O aumento dos níveis de cálcio intracelular gera espécies reativas de oxigênio (EROs) e ativa enzimas como endonucleases e óxido nítrico sintetase, resultando em danos celulares adicionais (BROUNS & DEYN, 2009; MAKAR et al, 1994). Isso leva à morte celular por necrose e apoptose. O estresse oxidativo ocorre quando a produção de radicais livres supera a capacidade antioxidante celular, e enzimas como superóxido dismutase (SOD) e antioxidantes como o ácido ascórbico não conseguem neutralizar esses radicais livres (BROUNS & DEYN, 2009; MAKAR et al, 1994). Horas ou dias após a isquemia, a fase subaguda inicia vias inflamatórias e pró-apoptóticas (BROUNS & DEYN, 2009; MAKAR et al, 1994).

1.2.1 Core e penumbra

Tecidos afetados por isquemia podem ser classificados funcionalmente em dois tipos: o núcleo isquêmico, também chamado de core, onde o dano é irreversível, e a penumbra isquêmica adjacente (Figura 4). Nos primeiros instantes da redução do fluxo sanguíneo cerebral inicia-se rápida degeneração do tecido cerebral. A área central do acidente vascular (core) morre em pouco tempo, pois o fluxo sanguíneo cerebral está abaixo do limite necessário para evitar a despolarização terminal, resultando na degeneração da maioria dos neurônios (CLAUS *et al*, 2013; SUGIMOTO *et al*, 2014).

Ao redor do núcleo de uma lesão isquêmica encontra-se a penumbra isquêmica, que possui fluxo sanguíneo reduzido e funcionalidade neuronal comprometida, mas que permanece viável por mais tempo. Esta área, que pode constituir até metade do volume total da lesão em casos de AVC isquêmico, é dinâmica e instável, e é onde os esforços terapêuticos devem ser concentrados (LOFRANO, 2024; GINSBERG, 1997; TUO; ZOU; LEI, 2021). A penumbra é identificada clinicamente pelo descompasso entre as imagens de perfusão e difusão em ressonância magnética. Os neurônios na penumbra são recuperáveis e são alvos terapêuticos potenciais no tratamento de infartos cerebrais (LAMBERTSEN; BIBER; FINSEN, 2012; TAKEDA et al, 2021).

Figura 4: Ilustração esquemática da isquemia cerebral, mostrando o núcleo de infarto - core (área irreversivelmente lesionada) e uma penumbra isquêmica (área que pode ser recuperada).



Fonte: CAPLAN, 2022.

Após uma lesão, os neurônios na penumbra ativam mecanismos de sinalização que promovem a sobrevivência por algumas horas a dias (LEE et al, 2000). Sem reperfusão prolongada, a área central do infarto pode expandir e afetar a penumbra, levando à morte de neurônios em outras partes do cérebro devido à desconexão, conhecida como perda neuronal secundária (BACK, 1998). Portanto, proteger os neurônios da penumbra é essencial para o sucesso dos tratamentos de proteção neural (LO; DALKARA; MOSKOWITZ, 2003; MOSKOWITZ; LO; IADECOLA, 2010). Apesar de várias vias de morte celular serem reconhecidas no AVC isquêmico, ainda não está claro se alguma é especialmente relevante (TUO; ZOU; LEI, 2021).

1.2.2 *Isquemia e estresse oxidativo*

O estresse oxidativo caracterizado por um desequilíbrio entre os processos de oxidação e antioxidação no corpo, é visto como um fator fundamental no dano cerebral associado à isquemia cerebral. A produção elevada de espécies reativas de oxigênio (EROs) no organismo leva ao estresse oxidativo, que está envolvido em diversas doenças como doenças neurodegenerativas e AVC (TAO et al, 2020). O estresse oxidativo surge quando as defesas antioxidantes naturais do corpo não conseguem neutralizar a produção de radicais livres. Em

outras palavras, as enzimas antioxidantes que as células produzem, como catalase, glutatona, superóxido dismutase (SOD), e as vitaminas antioxidantes, como ácido ascórbico e α -tocoferol, não são suficientes para superar o excesso de radicais livres (MAKAR *et al.*, 1994).

Os antioxidantes são divididos em duas categorias principais: endógenas e exógenas. Ambas as categorias ajudam a combater diversos fatores metabólicos prejudiciais, reduzindo problemas como inflamações por meio do equilíbrio das espécies reativas de oxigênio. Atualmente, tem sido relatado que ainda não foi desenvolvido nenhum medicamento eficaz para tratamento antioxidante. Portanto, a introdução de novos candidatos antioxidantes é recomendada para uso em práticas clínicas (KONTOGHIORGHES & KONTOGHIORGHE, 2019; MARTELLI & GIACOMINI, 2018; NEHA *et al.*, 2019; PISOSCHI & POP, 2015; SAHOO; PAIDSETTY; PADHY, 2021; SAHOO *et al.*, 2020b).

Embora o tecido cerebral compreenda apenas uma pequena fração do corpo, seu metabolismo de oxigênio é extremamente ativo em comparação com outros órgãos, o que o torna particularmente vulnerável à isquemia (DOYLE; SIMON; STENZEL-POORE, 2008). Em consequência, o AVC promove a oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, resultando em prejuízos ao DNA e à função mitocondrial, culminando na morte de células cerebrais (TAO; LIU; CHEN *et al.*, 2020). As EROs podem, por exemplo, melhorar a membrana plasmática, comprometendo a sua integridade (WANG *et al.*, 2017). Além disso, as EROs são capazes de danificar o DNA, o que pode ocasionar quebras nas cadeias de DNA (DAVIS & PENNYPACKER, 2017). A liberação de citocromo C (Cyt_c) do interior das mitocôndrias para o citosol neuronal também é afetada pela presença de EROs mitocondriais. Essa liberação de Cyt_c da mitocôndria, leva a apoptose celular (PU *et al.*, 2019). Os principais tipos de EROs incluem o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HONDA; KORGE; WEISS, 2005).

O tratamento atual para a isquemia cerebral foca em restabelecer o fluxo sanguíneo no cérebro dentro de um período de 3,5 horas para prevenir danos adicionais ao tecido cerebral. Contudo, a reperfusão pode causar lesões adicionais devido à ativação de enzimas oxidantes, que produzem EROs (KHATRI *et al.*, 2012; CASTILHO *et al.*, 1998). Esse processo afeta todos os componentes celulares, como proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e carboidratos (ZHAO *et al.*, 2016).

Além do contexto mencionado, diversos medicamentos sintéticos foram desenvolvidos com o objetivo de eliminar as EROs para controlar seus níveis intracelulares em tratamentos farmacêuticos (HUANG *et al.*, 2021; POLAKA *et al.*, 2022; CASAS *et al.*, 2020). Contudo, os agentes sintéticos que eliminam EROs enfrentam desafios como baixa estabilidade, elevada

toxicidade e reduzida biodisponibilidade (POLJSAK; ŠUPUT; MILISAV, 2013). Dificuldades relacionadas à solubilidade em água, metabolização rápida, falta de seletividade e efeitos colaterais sistêmicos têm limitado sua aplicabilidade (COCHEMÉ & MURPHY, 2010). Assim, a busca por novas moléculas direcionadas ao combate do estresse oxidativo, pode ser uma estratégia terapêutica e preventiva potencial para pacientes com isquemia cerebral.

1.2.3 Cálcio e excitotoxicidade

A superativação dos receptores ionotrópicos, NMDAs (permeáveis a íons Ca^{2+}) durante a isquemia cerebral provoca excitotoxicidade e inicia eventos de morte neuronal (BENARROCH, 2011; LIPTON & ROSENBERG, 1999; BENVENISTE *et al*, 1984). A excitotoxicidade pode ser definida como uma forma específica de neurotoxicidade induzida pelo glutamato e pode servir como um elo entre a isquemia e a morte dos neurônios. Esse processo induz a produção de radicais livres, disfunção mitocondrial e alterações nas funções de diversos fatores de transcrição (LAI *et al*, 2014), que ativam as vias apoptóticas (TUO; ZOU; LEI, 2021).

O glutamato não é apenas o principal neurotransmissor excitatório no cérebro adulto, mas também, um transmissor chave na degeneração do sinal neuronal após o AVC, o que pode levar à excitotoxicidade durante a superacumulação. Além da neurotoxicidade direta do glutamato aos neurônios, a ativação excessiva dos receptores de glutamato também leva a aumentos adicionais dos níveis intracelulares de Na^+ , Ca^{2+} e Cl^- , e agrava o edema citotóxico (FURUKAWA *et al*, 1997; TAO *et al*, 2020).

O cálcio tem múltiplas funções na fisiologia celular, incluindo a contração muscular, a liberação de neurotransmissores, a ativação de enzimas oxidativas do ciclo do ácido cítrico e de fosfolipases. A concentração de cálcio dentro das células é regulada e mantida em níveis fisiológicos pelos sistemas de captação de cálcio presentes no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias (POZZAN *et al*, 1994).

A sobrecarga de cálcio durante a fase de anoxia isquêmica leva à liberação anormal de glutamato das células, associada a uma diminuição na recaptação pré-sináptica dependente de energia do glutamato, o que aumenta ainda mais seu acúmulo extracelular (LO; DALKARA; MOSKOWITZ, 2003). Enquanto isso, o ambiente hipóxico de baixa glicose reduz a síntese de ATP, resultando na incapacidade de remover o glutamato. Além disso, o transportador de glutamato-1 (GLT-1), que é um dos principais transportadores para a remoção do glutamato extracelular, é significativamente reduzido após a isquemia cerebral, e a inibição de sua

expressão promove ainda mais o desenvolvimento de excitotoxicidade (FANG *et al*, 2014; TAO *et al*, 2020).

A combinação desses fatores pode causar danos extensivos a proteínas, lipídios e DNA celulares, resultando em deterioração da arquitetura e sinalização celular e levando a diferentes formas de morte celular, dependendo da severidade do dano e da rapidez dos processos envolvidos (ANDRABI *et al*, 2011; UNAL-CEVIK *et al*, 2004; FUJIKAWA, 2015; TUO; ZOU; LEI, 2021). Contudo, uma ativação correta dos NMDAR é crucial para o desenvolvimento e a manutenção dos neurônios. Assim, a supressão completa dos NMDAR não é uma estratégia eficaz para reduzir a excitotoxicidade decorrente da isquemia cerebral (MUIR, 2006; TUO; ZOU; LEI, 2021).

1.2.4 Inflamação

Após uma lesão isquêmica, os neurônios ativam e liberam sinais de alerta conhecidos como DAMPs, desencadeando uma intensa resposta inflamatória (CHAMORRO *et al*, 2012). A isquemia cerebral provoca a regulação positiva de citocinas e a invasão de leucócitos (ROTH *et al*, 2018). Mesmo após a recanalização, o dano cerebral pode persistir devido à lesão por isquemia/reperfusão (I/R), embora os mecanismos exatos ainda sejam pouco compreendidos (STOLL & NIESWANDT, 2019; FRANKE *et al*, 2020).

No processo inflamatório, formam-se inflamassomas, que detectam anormalidades na homeostase celular e desencadeiam respostas inflamatórias. Estes inflamassomas são compostos por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), a proteína ASC, e a pró-caspase-1, que, quando ativada, leva à liberação de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18, além de induzir piroptose, contribuindo para a inflamação (HOFFMAN & BRODERICK, 2016; ALISHAHI *et al*, 2019).

A micróglia, rapidamente ativada após a isquemia, libera citocinas pró-inflamatórias e pode sofrer morte celular autofágica sob hipoxia (XU *et al*, 2020; YANG *et al*, 2014). Neutrófilos e monócitos que atravessam a barreira hematoencefálica desempenham um papel crucial na mediação do dano (PETROVIC-DJERGOVIC; GOONEWARDENA; PINSKY, 2016; TAKEDA *et al*, 2021). A resposta inflamatória da microglia/macrófagos varia ao longo do tempo. Inicialmente prejudicial, esta resposta pode se tornar neuroprotetora, secretando fatores anti-inflamatórios e participando da remoção de tecidos degenerados dias após a lesão (LAMBERTSEN; BIBER; FINSSEN, 2012; XU *et al*, 2020). A citocina TGF- β 1 desempenha

um papel anti-inflamatório significativo inibindo a ativação do fator de transcrição pró-inflamatório NF- κ B (SUGIMOTO et al, 2014; ISLAM et al, 2018).

Após um evento isquêmico, os astrócitos entram em estado de ativação, o que leva ao aumento na expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), um processo conhecido como gliose reativa. Esse estado é marcado por alterações específicas na estrutura e função dessas células. Ademais, os astrócitos contribuem para a inflamação cerebral ao liberarem mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas e iNOS. Acredita-se ainda que eles desempenhem um papel na expressão de moléculas de adesão e na liberação de moléculas que promovem a resposta inflamatória TH2, além de inibirem a liberação de IL-12, conforme estudos de WANG & TANG (2007).

1.2.5 Apoptose

Apoptose, derivada do grego para "queda de folhas no outono", é uma forma de morte celular programada e benéfica, essencial para o desenvolvimento e manutenção dos organismos multicelulares, eliminando células senescentes ou danificadas (VASCONCELOS, 2000; PASPARAKIS & VANDENABEELE, 2015). As mortes celulares podem ser divididas em apoptose e necrose, e outras formas reguladas, como piroptose e ferroptose, têm sido identificadas recentemente (KOPEINA & ZHIVOTOVSKY, 2022; STOCKWELL et al, 2017).

A apoptose, frequentemente ocorrendo durante a isquemia, é caracterizada por alterações morfológicas como condensação da cromatina e fragmentação do DNA. Caspases, especialmente da família das cisteínas-proteases, desempenham papéis cruciais na apoptose, clivando substratos específicos e facilitando a fagocitose de células apoptóticas (FERNANDES et al, 2019). A desregulação da apoptose está associada a várias patologias, incluindo doenças autoimunes, neurodegenerativas e câncer (GIOVANNETTI et al, 2008).

Apoptose pode ocorrer por duas vias: intrínseca (mitocondrial) e extrínseca (receptores de morte). A via intrínseca é ativada pela ausência de fatores de crescimento ou danos ao DNA, envolvendo proteínas Bcl-2 e o gene supressor tumoral p53, resultando na ativação de caspases (TUO; ZOU; LEI, 2021). A via extrínseca é ativada por interações receptor-ligante, como o Fas e TNF, levando também à ativação de caspases. Na isquemia cerebral, a ativação das células imunes libera fatores que induzem apoptose neuronal através da via extrínseca (TUO; ZOU; LEI, 2021).

A microglia, rapidamente ativada após a isquemia, fagocita neurônios degenerados e resíduos celulares. Este processo pode limitar a inflamação, mas também pode levar à

fagoptose, onde neurônios saudáveis são fagocitados (BROWN & NEHER, 2014). A microglia também secreta TGF- β 1, inibindo respostas inflamatórias e mostrando um efeito neuroprotetor predominante (JIN et al, 2017; SZALAY et al, 2016).

A necrose, em contraste, é uma morte celular não programada, frequentemente resultante de lesões agudas, infecções ou bloqueio da apoptose, caracterizando-se pelo inchaço e dissolução das células e iniciando uma resposta inflamatória (FESTJENS et al, 2006). Recentemente, novas formas de morte celular, como mitofagia e ferroptose, foram descobertas, ampliando a compreensão dos processos celulares e suas implicações terapêuticas (LU et al, 2023a; DIXON & PRATT, 2023).

1.3 Modelos experimentais de isquemia cerebral *in vivo*

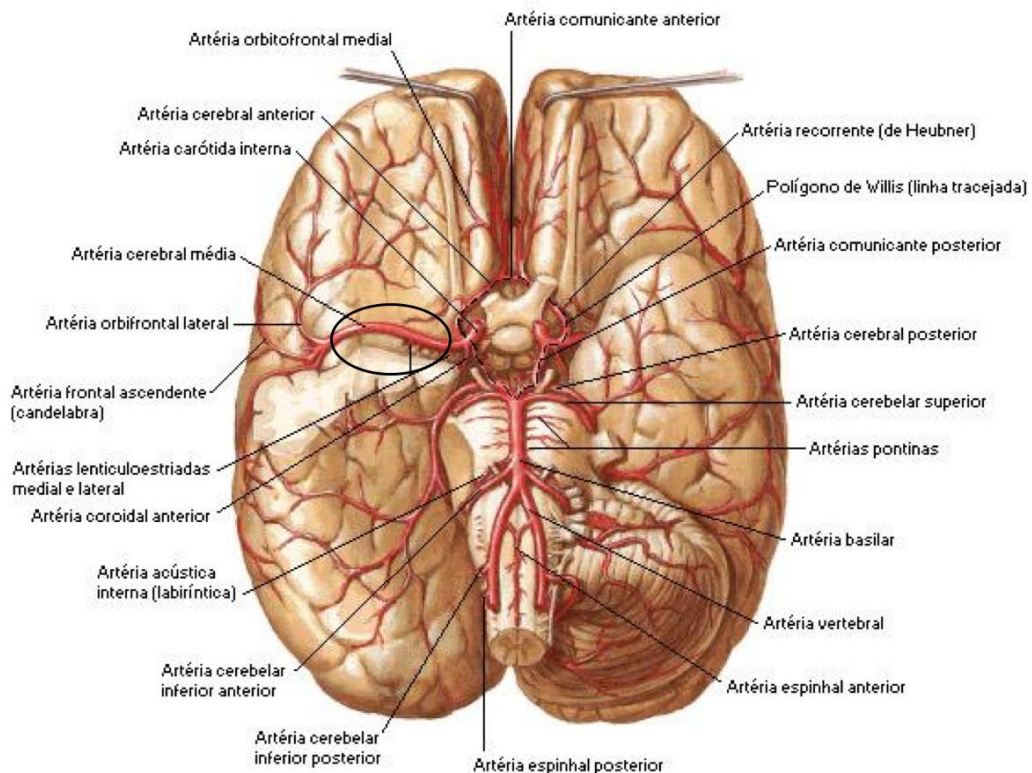
A execução de modelos de *in vivo* de AVC reflete melhor a manifestação clínica de eventos isquêmicos cerebrais, possibilitando a realização de pesquisas pré-clínicas em laboratório de forma mais fiel à realidade (TROTMAN-LUCAS & GIBSON, 2021). Modelos experimentais de AVC isquêmico *in vivo* são essenciais para simular a diminuição do fluxo sanguíneo e seus efeitos adversos no tecido cerebral, além de serem essenciais ao desenvolvimento de novas drogas com potencial neuroprotetor (TROTMAN-LUCAS & GIBSON, 2021; SOMMER, 2017).

Existem vários métodos disponíveis para investigação em diferentes espécies animais, contudo, devido a fatores como custo, disponibilidade e considerações éticas envolvendo animais de ordens superiores, os roedores continuam a ser essenciais na pesquisa, desempenhando um papel crucial para assegurar a robustez experimental e para a avaliação da segurança e eficácia de novos tratamentos (TROTMAN-LUCAS & GIBSON, 2021; SOMMER, 2017).

Existem protocolos *in vivo* de indução da isquemia cerebral global e focal, apresentando vantagens e desvantagens em cada um (TROTMAN-LUCAS & GIBSON, 2021; SOMMER, 2017). Os modelos de isquemia global, quando afetam o cérebro por completo, mimetizam mais fielmente as condições de uma parada cardíaca, já os modelos de isquemia focal, os quais prejudicam apenas uma pequena área do cérebro, são mais representativos das manifestações clínicas de um AVC isquêmico. Na isquemia focal, os modelos de estudo podem ser: permanentes, na ausência de reestabelecimento do fluxo sanguíneo, ou transitórios, caso ocorra a restauração da circulação (TARDINI *et al*, 2003).

A artéria cerebral (Figura 5) mais comumente acometida no AVC em humanos é a artéria cerebral média (ACM), que é responsável pela irrigação da área lateral do hemisfério cerebral e de estruturas subcorticais (LIPTON, 1999). Nos modelos de isquemia focal, a oclusão da ACM pode ser feita de maneira permanente ou temporária, possibilitando a reperfusão, conforme descrito por Kanemitsu e colaboradores em 2002.

Figura 5: 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: 31 de Março de 2024.

As técnicas de oclusão da ACM podem ser categorizadas em abordagens que dispensam a craniectomia, incluindo métodos de embolia, inserção de fio intraluminal, fototrombose utilizando o corante Rosa de Bengala, e a aplicação de endotelina-1; e aquelas que requerem craniectomia, implementadas por meio de procedimentos cirúrgicos como a eletrocauterização, o clampeamento e a ligadura arterial. Adicionalmente, existem modelos focados na oclusão da circulação posterior, que envolvem a obstrução das artérias vertebrobasilares, e modelos de trombose venosa cerebral. Estes dois últimos são menos empregados na prática (DURUKAN & TATLISUMAK, 2007).

O método *in vivo* mais comum para estudar isquemia focal é a técnica de oclusão intraluminal da artéria cerebral média (iMCAO) (HOWELLS *et al*, 2010), que tem sido fundamental para ampliar nosso entendimento sobre a fisiopatologia da isquemia cerebral. Isso inclui o estudo da penumbra isquêmica, danos à barreira sangue-cérebro, mecanismos de morte celular e as reações inflamatórias associadas à isquemia cerebral (KOIZUMI *et al*, 1986; TROTMAN-LUCAS & GIBSON, 2021). Já o modelo animal de eletrocauterização da ACM, foi descrito pela primeira vez por Tamura e colaboradores (1981) e tem sido amplamente utilizado, pois permite o acesso a regiões mais proximais da ACM em comparação com técnicas anteriores, além de permitir o estudo da isquemia cerebral sem o efeito da reperfusão da ACM, leva a interrupção permanente do fluxo sanguíneo na ACM. (DURUKAN & TATLISUMAK, 2007).

Geralmente, a isquemia cerebral global tem duração de alguns minutos e, com a reperfusão eficaz, o prejuízo aos neurônios é consideravelmente postergado, impactando sobretudo os neurônios mais suscetíveis (SIESJÖ & SIESJÖ, 1996; TUO; ZOU; LEI, 2021). A isquemia global não apresenta duas áreas distintas, pois o fluxo sanguíneo é interrompido de maneira geral e súbita, impactando de forma homogênea todas as regiões cerebrais, conforme descrito por Lipton em 1999. Os modelos de isquemia cerebral global replicam o dano cerebral ocasionado por problemas circulatórios, como paradas cardíacas ou hipotensão grave, nos quais a interrupção dos grandes vasos extracranianos diminui o fluxo sanguíneo cerebral como um todo (MOZAFFARIAN ALAN; ROGER; BENJAMIN, 2014).

Na isquemia cerebral global o método experimental mais comum envolve a oclusão de quatro vasos, que inclui a cauterização das artérias vertebrais e a oclusão temporária das artérias carótidas comuns, conforme relatado por Smith e colaboradores em 1984, e Wellons *et al*, em 2000. Alguns aspectos críticos da isquemia global seguida de reperfusão é a morte de neurônios no hipocampo, tipicamente ocorrendo dias após o incidente, com notável evidência na região CA1 (Cornu Ammonis) do hipocampo, de acordo com Bhuiyan e colaboradores em 2015, além do dano neuronal significativo nas regiões CA3 do hipocampo, no estriado e em certas camadas corticais, conforme descrito por Cho *et al*, em 2007, Kirino, em 2000, e Wang e colaboradores em 2017. A desregulação subsequente nessas áreas deve-se à perda neuronal e à disfunção das células gliais, consequência da interrupção no fornecimento de sangue, glicose e oxigênio (WANG *et al*, 2017).

As vias pelas quais ocorre a morte celular podem variar conforme o modelo animal utilizado; contudo, esse aspecto muitas vezes é desconsiderado no decorrer do desenvolvimento farmacêutico (TUO; ZOU; LEI, 2021).

1.4 Memória

Green (1964) descreveu a memória como um "estado" cerebral persistente após estimulação sensorial, afetando atividades subsequentes, e ressaltou que memórias não podem ser medidas diretamente, mas avaliadas por testes de evocação em animais e humanos (IZQUIERDO, 2018). É claro que, uma mudança comportamental induzida pela evocação implica em um reconhecimento anterior, e qualquer forma de reconhecimento supõe uma alteração comportamental, seja ela real ou potencial (IZQUIERDO, 2018). Segundo Green (1964), o hipocampo pode desempenhar um papel na evocação, embora não esteja diretamente envolvido no armazenamento (IZQUIERDO, 2018).

A memória envolve armazenamento e recuperação de informações adquiridas por experiências, processo denominado aprendizado. Aristóteles já afirmava que "Nada há no intelecto que não tenha estado antes nos sentidos" (MARSHALL, 1988). Memórias são o resultado de nossas percepções e sensações anteriores, não inventadas, e os sonhos são recombinações de memórias passadas (SELIGMAN, 1987, p. 46-53). Da mesma forma, nossos planos e projetos, que em essência são tipos de sonhos, derivam-se dessas experiências. Com a vasta gama de experiências possíveis, também é enorme a variedade de memórias que podem ser formadas. Portanto, talvez seja mais apropriado falar em "memórias" no plural (McGAUGH, 1988, p. 33-64), pois cada uma pode ser única, e de certo modo, cada uma é única (IZQUIERDO, p.90, 2018).

A memória de trabalho é temporária, armazenando informações para pensamento imediato e resolução de problemas por segundos ou minutos, gerida pelo córtex pré-frontal ventrolateral e dorsolateral (IZQUIERDO; MEDINA, 1991; MOSCOVITCH, 1992). Já a memória de curto prazo, regulada pelas áreas frontais e parietais, retém informações por minutos a horas e pode ser consolidada em memórias de longo prazo (SQUIRE & ZOLA-MORGAN, 1996; DUDAI, 2004; TAKEHARA-NISHIUCHI, 2021).

A consolidação é o processo que transforma memórias de curto prazo em memórias de longo prazo, e depende do hipocampo, além das regiões entorrinal, perirrinal e para-hipocampal do córtex temporal medial (TAKEHARA-NISHIUCHI, 2021; FOTUHI *et al*, 2020; SQUIRE & ZOLA-MORGAN, 1996). Mecanismos como a potenciação de longo prazo (LTP) e a depressão de longo prazo (LTD) são cruciais nesse processo, com a LTP sendo particularmente importante na região CA1 do hipocampo (IZQUIERDO & MCGAUGH, 2000; TAKEHARA-NISHIUCHI, 2021). A consolidação também envolve transcrição gênica e produção de novas moléculas para estabilizar informações na rede neural (IZQUIERDO & MCGAUGH, 2000).

A formação da memória é um processo altamente dinâmico e complexo. No momento da aquisição (aprendizado), a nova informação é frágil. É por meio do processo de consolidação, que envolve a síntese de proteínas, que essa nova informação é armazenada e estabilizada (SCHMIDT *et al.*, 2016). A memória não declarativa (implícita) inclui habilidades, condicionamento clássico e priming, que é a capacidade de reconhecer ou identificar um estímulo com base em experiências passadas (SQUIRE; DEDE, 2015). Esses tipos de memória dependem de diferentes estruturas, como o hipocampo, o giro para-hipocampal, a amígdala, o corpo estriado, o cerebelo, o neocórtex, e os córtices perirrinal e entorrinal (THOMPSON; KIM, 1996; IZQUIERDO; MCGAUGH, 2000; SQUIRE; DEDE, 2015; OPITZ, 2014).

1.4.1 Demência Vascular e Vias Colinérgicas

A demência de origem vascular é a segunda causa mais comum de demência, após a doença de Alzheimer (DA), representando pelo menos 20% dos casos (KHAN *et al.*, 2016). A definição de DV inclui déficits em domínios cognitivos, interferência nas atividades diárias e evidência de doença cerebrovascular (SKROBOT *et al.*, 2018). Já a DA, é uma doença neurodegenerativa do sistema nervoso central, cuja progressão resulta em demência, anormalidades comportamentais e déficits cognitivos (DHANASEKARAN *et al.*, 2015), juntamente com alterações na neurotransmissão colinérgica. Indivíduos com DA e DV sofrem morte celular neuronal devido à alteração da homeostase da acetilcolina, depósitos de peptídeos amiloides, formação de placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares nas células nervosas do cérebro (FERREIRA *et al.*, 2020).

O termo "comprometimento cognitivo vascular" (CCV) descreve déficits cognitivos causados por doenças cerebrovasculares, sendo a demência vascular (DV) sua forma mais grave (DICHGANS & LEYS, 2017; FLIER *et al.*, 2018). O CCV é classificado em subtipos níveis e graves pelo estudo VICCCS (SKROBOT *et al.*, 2017). O CCV grave (ou DV) se divide em quatro categorias: demência pós-AVC, demência vascular isquêmica subcortical, demência multiinfarto e demências mistas (SKROBOT *et al.*, 2018).

Tanto a DA quanto a DV são distúrbios neurodegenerativos progressivos que representam a causa mais comum de demência em idosos, afetando mais de 50 milhões de pessoas globalmente, segundo uma estimativa de 2019 da ADI (BALKIS *et al.*, 2015). A epidemiologia da DV varia devido a diferentes fatores, como critérios diagnósticos e comorbidades, sendo mais comum em homens e aumentando com a idade (RIZZI *et al.*, 2014; FITZPATRICK *et al.*, 2005). Cerca de 60% dos sobreviventes de AVC apresentam CCV três

meses após o evento, e um terço desenvolve demência dentro de 1 a 3 anos, especialmente com comprometimento do fluxo sanguíneo no hipocampo e áreas pré-frontais (YU *et al*, 2013; SACHDEV *et al*, 2009).

A função colinérgica no corpo e no cérebro é principalmente mediada pela acetilcolina, neurotransmissor crucial no aprendizado e na memória. A acetilcolina é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE), que é uma serina hidrolase que desempenha um papel essencial no sistema colinérgico, abrangendo tanto o sistema nervoso central (SNC) e o periférico (SNP). Quando a AChE está presente em excesso, reduz os níveis de acetilcolina no cérebro, contribuindo para a neurodegeneração, conforme a "hipótese colinérgica" (SIVAPRAKASAM, 2006). Atualmente, não há tratamentos com medicamentos específicos recomendados para DV. Os inibidores de AChE podem retardar a progressão de DA e DV, aumentando a disponibilidade de acetilcolina e melhorando a função neurocognitiva (MUTHURAMAN *et al*, 2023). Contudo, esses inibidores apresentam efeitos colaterais, como hepatotóxicos, incontinência urinária, bradicardia, distúrbios pulmonares e perda de peso involuntária (FERREIRA *et al*, 2020).

Portanto, há a necessidade de inibidores de AChE mais eficazes e seguros para o tratamento dos transtornos neurocognitivos através da regulação da neurotransmissão colinérgica. Uma substância que se mostra benéfica no tratamento de DV é o extrato de Ginkgo biloba que apresenta propriedades neuroprotetoras, melhorando níveis cognitivos, sintomas comportamentais e psicológicos (BATTLE *et al*, 2021). O extrato de Ginkgo biloba contém flavonoides, terpenoides e outros componentes que melhoram a função cognitiva e neurológica, promovendo melhorias no fluxo vascular, efeito antioxidante, ação anti-inflamatória, aumento da neuroplasticidade e proteção contra disfunção mitocondrial (UDE *et al*, 2013; TCHANTCHOU *et al*, 2007; FEHSKE *et al*, 2009). O uso combinado de Ginkgo biloba com AChEIs mostra potencial para o tratamento da DV, mas mais estudos são necessários (CANEVELLI *et al*, 2014; GARCÍA-ALBERCA *et al*, 2022).

1.5 Tratamento

A terapia padrão atual para o AVC isquêmico é a administração intravenosa de ativador de plasminogênio tecidual (rt-PA), devido a critérios rigorosos de elegibilidade e uma janela de tratamento limitada a 4,5 horas, aproximadamente apenas 15% dos pacientes com AVC isquêmico são tratados com rtPA intravenoso, uma taxa consideravelmente baixa que é ainda mais limitada por uma taxa de sucesso de reabertura dos vasos sanguíneos de menos de 50% (BADHIWALA *et al.*, 2015; TROTMAN-LUCAS & GIBSON, 2021).

Além da terapia medicamentosa, a remoção mecânica do coágulo por meio da trombectomia endovascular tem sido cada vez mais adotada na prática clínica para o tratamento de bloqueios em grandes vasos, especialmente em casos nos quais o rtPA não é eficaz. Este procedimento envolve a extração direta do coágulo do vaso sanguíneo afetado, permitindo uma restauração imediata do fluxo sanguíneo. O principal objetivo clínico é restabelecer rapidamente o fluxo sanguíneo para a região afetada pelo AVC, visando salvar tecidos e funções celulares essenciais e, assim, minimizar a extensão do dano isquêmico. Essa rápida reabertura dos vasos está diretamente associada a uma melhor sobrevida e recuperação dos pacientes com AVC isquêmico (TROTMAN-LUCAS & GIBSON, 2021). O tratamento e a compreensão da isquemia cerebral, assim como de lesões relacionadas à reperfusão, têm avançado significativamente ao longo dos anos (HARUTYUNYAN & AVITSIAN, 2020).

Estudos mostram que diversas substâncias com propriedades neuroprotetoras alcançaram a fase de testes clínicos, mas não obtiveram sucesso devido à falta de efetividade ou problemas relacionados à toxicidade. Uma ampla variedade de agentes terapêuticos, incluindo antagonistas do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), inibidores dos canais de cálcio e antioxidantes foram avaliados para o tratamento de AVCs, mas não demonstraram proteção neural considerável em estudos clínicos. Isso destaca a necessidade de identificar novos medicamentos que possam ser eficazes no tratamento de AVC isquêmico. Nesse contexto, agentes imunossupressores, devido à sua diversidade de mecanismos de ação, mostram-se promissores como neuroprotetores. Corticosteroides, ligantes de imunofilina, micofenolato mofetil e minociclina, por exemplo, demonstraram ter efeitos neuroprotetores ao minimizar os efeitos nocivos dos mediadores inflamatórios HAILER, 2008; TSIRKA *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 1998; ZHUO *et al.*, 2000).

Diante desses fatos, há uma grande necessidade de desenvolver uma terapia eficaz que amplie a janela terapêutica, sirva como adjuvante ou substitua a terapia com tPA. A restauração precoce do fluxo sanguíneo é crucial para salvar as células na zona de penumbra e reduzir o acúmulo de radicais livres e a inflamação. Para isso, é importante aprofundar os testes com drogas que já apresentam potencial neuroprotetor em modelos *In vitro* e *In vivo*, tendo com boas opções os terpenóides (Tabela 2).

Tabela 2: Efeitos e mecanismos resumidos do Terpeno em diferentes alvos relacionados ao acidente vascular cerebral isquêmico em estudos *in vivo* e *in vitro*.

Componentes	Modelos	Dose/ concentração	Localizaçã o tecidual	Efeitos	Mecanismos
Ginkgolide B	Modelo de tMCAO em camundongos Células N2a no modelo OGD/R	<i>In vivo</i> : 1, 2 e 4 mg/kg <i>In vitro</i> : i.p.	AVC isquêmico agudo	↓ Déficits neurológicos, conteúdo de água e volume do infarto ↓ Caspase-3	↑ Nível de BDNF
Ginkgolide B	Modelo de tMCAO em camundongos Microglia BV2 induzida por LPS, IFN- γ e IL-4 e macrófagos derivados da medula primária	<i>In vivo</i> : 1.75, 3.5 e 7.0 mg/kg, i.p. <i>In vitro</i> : 0.1, 1 e 10 μ M	AVC isquêmico	↓ Dano isquêmico cerebral e déficits neurológicos ↓ CCL3, iNOS e TNF- α ↑ CD206, Arg1, Ym1, IL-10 e TGF- β	Modulação da polarização de microglia/macrófagos
Ginkgolide B	Modelo de MCAO em ratos Células SY5Y no modelo OGD	<i>In vivo</i> : 1, 2 e 4 mg/kg, i.p. <i>In vitro</i> : 25 mg/L	Lesão isquêmica cerebral	↓ Volume do infarto ↓ ROS ↑ SOD, HO-1 e Nqo1	↑ Via Akt/Nrf2
Catalpol	Modelo de eletrocoagulação em ratos Neurônios primários no modelo OGD/R	<i>In vivo</i> : 2.5, 5 e 7.5 mg/kg, i.p. <i>In vitro</i> : 0.1, 1, 10 e 100 μ g/mL	AVC isquêmico	↓ Escore neurológico ↑ Atividade celular neuronal ↑ Expressão de GAP-43 ↑ Expressão de p-S6	↑ Regeneração axonal via via PI3K/AKT/mTOR
Catalpol	Modelo de pMCAO em ratos	<i>In vivo</i> : 5 e 10 mg/kg	AVC	↓ Déficits neurológicos ↑ BrdU+-Nestin+ e BrdU+-Tuj-1+ ↓ Caspase 3 ↑ Tuj-1 e MAP2	↑ BDNF, mas não sinalização BDNF/TrkB
Catalpol	Modelo de MCAO em ratos Células BMEC no modelo OGD	<i>In vivo</i> : 2.5, 5 e 10 mg/kg, i.v. <i>In vitro</i> : 25, 50 e 100 μ M	Isquemia cerebral	↓ Pontuação de déficits neurológicos e volume do infarto ↑ CD31+/EDU+ ↑ Proliferação, migração e formação de tubos	↑ Via HIF-1 α /VEGF
Catalpol	Modelo de eletrocoagulação em ratos	<i>In vivo</i> : 5 mg/kg, i.p.	AVC	↓ Déficit neuroetológico ↑ Fluxo sanguíneo cerebral ↑ EPO e EPOR ↑ Ativação de STAT3	↑ Produção de VEGF via JAK2/STAT3
Catalpol	Modelo OGD em neurônios primários	<i>In vitro</i> : 10 μ g/mL	AVC	↓ miRNA124 ↑ Expressão de GAP-43	↑ Crescimento axonal via regulação da via PI3K/AKT/ mTOR regulada por miR-124

(↓) redução ou inibição; (↑) aumento ou ativação. **Fonte:** ZHU *et al*, 2022.

1.6 Terpenos e neuroproteção

O uso de plantas medicinais no tratamento de diversas enfermidades possui importante e preponderante papel na medicina popular e pode ser inserido no cotidiano da população com segurança (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012).

Monoterpenos (C₁₀H₁₆), componentes principais dos óleos essenciais, são extensivamente empregados devido às suas variadas propriedades biológicas e farmacológicas, tornando-se uma opção atrativa e promissora para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (BARRETO *et al*, 2014; MAROCCIA *et al*, 2018). Além disso, vários monoterpenos e outros metabólitos secundários dos óleos essenciais foram incorporados em ensaios clínicos com o objetivo de descobrir novos candidatos a medicamentos para tratar doenças que afetam tanto animais quanto seres humanos (MAROCCIA *et al*, 2018).

É importante ressaltar que os monoterpenos descritos como "naturais" e geralmente considerados seguros e sem efeitos colaterais ajudaram a aumentar seu uso na medicina veterinária e humana (MUJEZINOVIC *et al*, 2018), no entanto, poucos estudos foram realizados para avaliar os possíveis efeitos tóxicos dos monoterpenos. Recentemente, algumas evidências apontaram que alterações hepáticas morfológicas e funcionais, associadas a necrose, esteatose, lesões vasculares e aumento de biomarcadores de alteração hepática, como aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), são causadas por monoterpenos como citral (FANDOHAN *et al*, 2008), limoneno (LEI *et al*, 2012), pulegona e mentol (LASSILA *et al*, 2016).

1.6.1 Timol

O timol (C₁₀H₁₄O) conhecido como 2-isopropil-5-metilfenol, mostrado na figura 6, é um monoterpeno, que apresentam potencial para o desenvolvimento de um fitomedicamento, é encontrado em plantas aromáticas da família *Lamiaceae*, incluindo os gêneros *Thymus*, *Ocimum*, *Origanum* e *Monarda* (MARCHESE *et al*, 2016). No Brasil, a espécie cujo óleo essencial contém timol, é a *Lippia organoides* ou *Lippia sidoides*, conhecida como alecrim-pimenta (MORAIS *et al*, 1972).

O alecrim-pimenta, também conhecido como alecrim-do-nordeste e estrepa-cavalo, é um arbusto medicinal pertencente à família *Verbenaceae* nativa do semiárido nordestino e do norte de Minas Gerais, possui altura média de 3m, folhas simples com pelos esbranquiçados na face inferior e flores brancas (MARTINS *et al*, 2002). As folhas do alecrim-pimenta

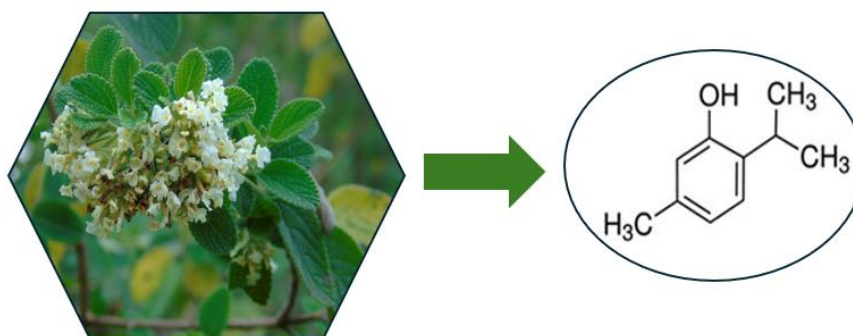
apresentam 4% de óleo essencial (COSTA, 2006), cuja composição tem cerca de 60% de timol ou uma mistura de timol e carvacrol, ambos agentes antimicrobianos, além de outros componentes químicos como flavonoides e quinonas (LORENZI & MATOS, 2002). Além da atividade antimicrobiana, o timol apresenta atividade antifúngica, antitumoral e apresenta bons resultados de atividade anti-inflamatória (MARCHESI *et al*, 2016).

Em 1979 Caspar Neumann, descobriu o timol como uma substância cristalina (DORMAN & DEANS, 2000). O Timol (ou ácido tímico, isopropilmetacresol), um isômero do Carvacrol, tem características semelhantes às do fenol, com odor aromático e sabor picante. Ambos se apresentam como cristais incolores grandes ou pó cristalino branco, com aroma irritante (GUILLEN *et al*, 2007; KHANNA *et al*, 1988).

O timol, é encontrado no orégano e tomilho, comumente utilizado como ingrediente ativo em flavorizantes alimentícios, perfumes, desodorantes, cosméticos e produtos farmacêuticos (ABOELWafa & YOUSEF, 2015). Adicionalmente, o timol é reconhecido por suas várias propriedades farmacológicas, incluindo ação antimicrobiana (WANG & YAM, 2018), antioxidante (LUNA *et al*, 2018), antiparasitária (SILVA LIMA *et al*, 2018) e como promotor de crescimento (EL-HACK *et al*, 2016), hipocolesterolêmico e hipoglicêmico (SARANAVAN & PARI, 2015).

Estudos experimentais mostraram que diversos monoterpenos extraídos de óleos essenciais possuem atividade no SNC (SILVA *et al*, 2007). Um exemplo é o isopulegol, um monoterpeno encontrado em óleos essenciais de várias plantas, que demonstrou efeitos antidepressivos e ansiolíticos em modelos animais de depressão e ansiedade (SILVA *et al*, 2007). Outro monoterpeno é o carvacrol, um isômero do timol, que mostrou efeito ansiolítico (MELO *et al*, 2009), antidepressivo (MELO *et al*, 2010), e antinociceptivo em modelos animais, incluindo testes de nocicepção (MELO *et al*, 2012).

Figura 6: Planta Alecrim-pimenta e estrutura química do monoterpeno Timol.



O timol tem despertado interesse no campo de estudo de doenças neurodegenerativas, uma vez que em estudos anteriores este composto apresentou efeitos antidepressivos em camundongo submetidos a um modelo de depressão (DENG *et al*, 2015). Segundo Javed e colaboradores 2019, o timol apresentou proteção contra neurodegeneração dopaminérgica em um modelo de parkinsonismo induzido por rotenona, seus efeitos neuroprotetores são atribuídos as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do timol. Além disso, já foi demonstrado que o tratamento com timol aumenta a capacidade antioxidante em cérebros de ratos (YOUUDIM & DEANS, 2000) e exibe efeitos neuroprotetores (MARÍN *et al*, 2011). Segundo Azizi e colaboradores (2012), o timol se mostrou efetivo na proteção da cognição em modelos de demência.

A potencial eficácia terapêutica do timol no tratamento de doenças neurodegenerativas, incluindo a isquemia cerebral, pode ser atribuída aos seus diversos efeitos benéficos, composição nutricional, propriedades farmacológicas e constituintes bioativos.

2 JUSTIFICATIVA

O AVC, é a segunda principal causa de mortes no mundo, podendo ser considerado um importante problema de saúde pública, particularmente nos países em desenvolvimento e o tratamento farmacológico atual, se mostra limitado e pouco eficaz. Além disso, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), durante a pandemia houve um aumento das taxas de indivíduos acometidos com isquemia cerebral, principalmente entre jovens de 25 a 45 anos que tiveram que mudar sua rotina de trabalho presencial para o home office, aumentando a carga horária diária de trabalho.

Considerando que a fisiopatologia da isquemia envolve vias inflamatórias e de estresse oxidativo que comprometem a viabilidade celular e que não há na literatura trabalhos com o modelo de isquemia cerebral focal permanente em camundongos *Swiss* tratados com timol, justifica-se o estudo dos efeitos do timol sobre o dano neuronal. Diante disso, estudar o efeito neuroprotetor do timol em camundongos submetidos a pMCAO, irá auxiliar no desenvolvimento de novos tratamentos e métodos de prevenção da isquemia cerebral.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar os efeitos do timol sobre alterações comportamentais e neuroquímicas em camundongos submetidos a isquemia cerebral focal permanente por eletrocoagulação da artéria cerebral média (pMCAO).

3.2 *Objetivos Específicos*

Em animais submetidos à pMCAO e tratados com o timol, avaliar:

- Área de infarto isquêmico utilizando o 2,3,5- trifeniltetrazólio clorídrico e os déficits sensoriais-motores através da avaliação neurológica;
- Déficits de memória de trabalho, memória aversiva e memória de reconhecimento;
- Estresse oxidativo por meio das dosagens de MDA, Nitrito e conteúdo total de sulfidril (SH) no córtex temporal, estriado e hipocampo;
- Atividade *in vivo* da AChE no córtex temporal, estriado, hipocampo e córtex frontal/parietal/occipital (FPO). Devido aos resultados divergentes na literatura, decidimos avaliar a atividade da enzima nas áreas diretamente afetadas pela lesão e nas áreas não afetadas, por isso introduzimos o resultado do córtex FPO;
- Degeneração neuronal através da coloração Violeta de Cresil;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss*, machos jovens, pesando entre 25 e 35g, provenientes do biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM). Os animais foram mantidos em gaiolas microisoladoras, forradas com maravalha, com um ciclo 12h/12h de claro/escuro e com livre acesso a água e ração.

No que se refere aos cuidados com os animais, este estudo seguiu os princípios éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e teve início após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFC, sob o número de registro **10230322-0**.

4.2 Reagentes

Timol pureza >98% (Sigma-Aldrich®); Cloridrato de ketamina 5% (Vetanarcol®, Laboratórios König S.A, Argentina); Cloridrato de xilazina 2% (Sigma-Aldrich®). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.3 Protocolo Experimental

Foram utilizados 220 animais divididos em 5 (cinco) grupos experimentais: falso-operado (FO), tratados com veículo ou timol na dose de 50 mg/Kg, isquemiados tratados com veículo e isquemiados tratados com timol nas doses de 25 e 50 mg/Kg, por via oral de acordo com a tabela 3.

O timol apresentado de forma isolada >98% de pureza, em forma de pó cristalizado, foi solubilizado em 2% de tween 80 e diluído em água destilada, obtendo a concentração final de 2,5 mg/mL e 5,0 mg/mL, correspondentes as doses de timol, 25 e 50mg/Kg e administradas por via oral. No protocolo experimental os animais submetidos ao modelo receberam o timol 4 horas após a indução da isquemia, por 5 dias para avaliação da sua capacidade de neuroresgate.

As doses escolhidas para esse estudo foram baseadas nos resultados de Fernandes (2017), que mostrou que o timol oferece baixos riscos de toxicidade aguda, sendo classificado na categoria 5 com baixo risco de toxicidade, apresenta efeitos antidepressivos e propriedades antioxidantes e um possível efeito neuroprotetor em um estudo *da* toxicidade pré-clínica e

possíveis mecanismos de ação central do timol em camundongos. Fernandes (2017) viu que, na avaliação da toxicidade com doses repetidas não foram encontradas alterações significativas com relação aos parâmetros bioquímicos e hematológicos. Esse trabalho nos forneceu segurança para a escolha das doses.

Quanto ao protocolo de tratamento, os animais foram divididos em 5 grupos, sendo eles descritos na tabela 3. Em todos os grupos a administração foi realizada por gavagem (via oral) 3, 24, 48, 72 e 96 horas após a cirurgia de pMCAO. Todo o protocolo experimental está representado na figura 7.

Tabela 3: Grupos de tratamento.

Grupo	Tratamento
Falso-operado (FO + Veículo)	Veículo do timol v.o. por 5 dias
Falso-operado tratado (FO+TIMOL50)	Timol 50mg/Kg v.o. por 5 dias
Isquemiado (pMCAO)	Veículo do timol v.o. por 5 dias
Tratado25 (pMCAO+TIMOL25)	Timol 25 mg/Kg v.o. por 5 dias
Tratado50 (pMCAO+TIMOL50)	Timol 50 mg/Kg v.o. por 5 dias

Para a realização dos procedimentos experimentais (comportamentais, bioquímicos os animais foram divididos em subgrupos:

- **Subgrupo 1:** 24 horas após a indução da isquemia, foi realizada a avaliação neurológica (n=6/grupo) e a análise da área do infarto isquêmico pelo método do Cloreto de 2,3,5Trifeniltetrazol (TTC) (n=6/grupo).

- **Subgrupo 2:** 24 horas após a indução da isquemia, foi realizada a avaliação neurológica (n=4/grupo) e os animais foram eutanasiados e seus cérebros foram dissecados (córtex temporal, corpo estriado e hipocampo), seguido de dosagem bioquímica nessas estruturas cerebrais para avaliar a atividade enzimática de TBARS (n=6/grupo).

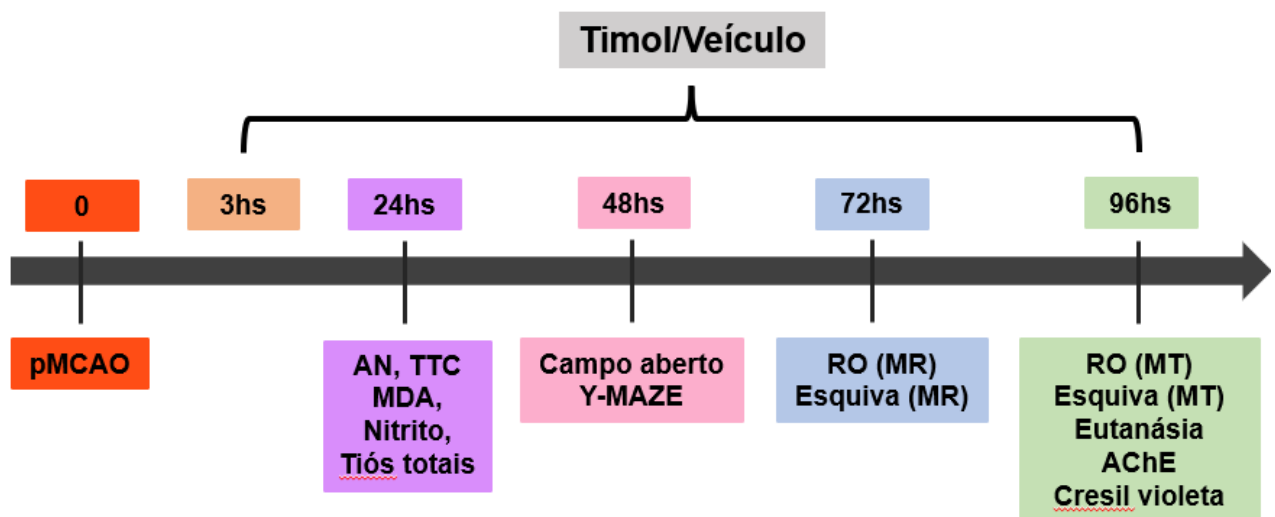
- **Subgrupo 3:** 24 horas após a indução da isquemia, os animais foram eutanasiados e seus cérebros foram dissecados (córtex temporal, corpo estriado e hipocampo), seguido de dosagem bioquímica nessas estruturas cerebrais para avaliar a atividade enzimática de nitrito (n=6/grupo).

- **Subgrupo 4:** 24 horas após a indução da isquemia, os animais foram eutanasiados e seus cérebros foram dissecados (córtex temporal, corpo estriado e hipocampo), seguido de dosagem bioquímica nessas estruturas cerebrais para avaliar a atividade enzimática dos tióis totais (n=6/grupo).

- **Subgrupo 5:** 72 horas após a indução da isquemia, foi realizado o teste de reconhecimento de objetos (memória recente) e 96 horas após a pMCAO, foi feito o teste do reconhecimento de objetos (memória tardia) (n=10/grupo). Após os testes de comportamento os animais foram eutanasiados e as áreas cerebrais (córtex total, córtex temporal, estriado e hipocampo) retiradas para a realização do teste da acetilcolinesterase *in vivo* (n=6/grupo).

- **Subgrupo 6:** 48 horas após a indução da isquemia, serão realizados os testes de campo aberto e labirinto em Y (n=10/grupo). 72 horas após a pMCAO, foi realizado o teste da esquiua passiva (memória recente) e 96 horas após a pMCAO, foi feito o teste da esquiua passiva (memória tardia) (n=10). Ao final do protocolo os animais foram perfundidos para a realização das análises histopatológicas (Cresil-violeta) (n=4).

Figura 7 - Protocolo experimental



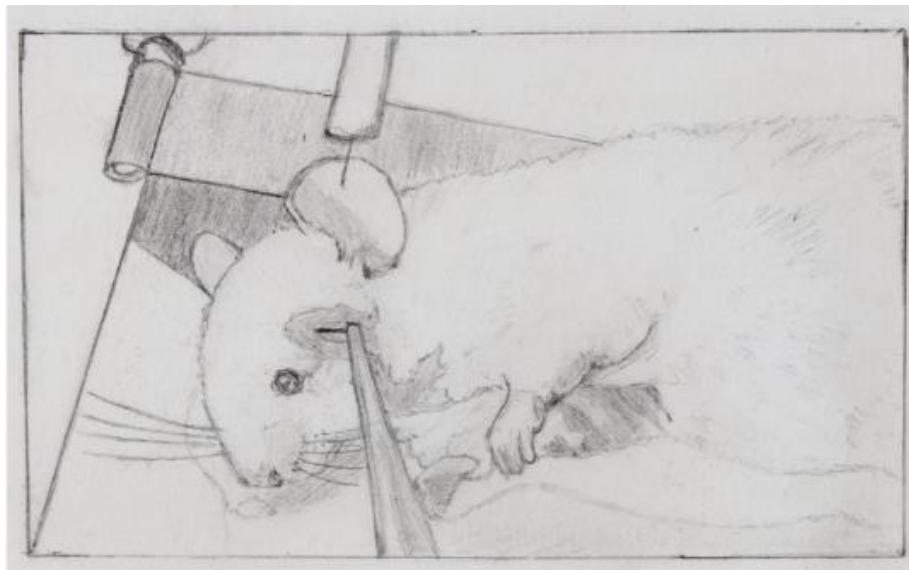
TTC: Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol; AN: Avaliação neurológica; MDA: malonaldeído; CA: Campo aberto; Y-MAZE: Labirinto em Y; RO: Reconhecimento de objetos; MR: Memória recente; MT: Memória tardia; AChE: Acetilcolinesterase.

4.4 Isquemia cerebral por oclusão permanente da artéria cerebral média em camundongos.

Para o procedimento cirúrgico os camundongos foram anestesiados com ketamina (90 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) por via intraperitoneal e mantidos em temperatura entre 36,5° e 37° C.

A oclusão da artéria cerebral média foi realizada com base em uma versão modificada do método de Tamura e colaboradores (1981), onde foi realizada uma incisão de aproximadamente 2cm do lado esquerdo do animal entre o olho e a orelha, o músculo temporal é rebatido sobre o teto da órbita e foi realizada uma craniectomia com o auxílio de uma broca odontológica de 1 milímetro, seguido da exposição e cauterização da artéria cerebral média. Após a isquemia o local da incisão é suturado com fio de seda agulhado 5.0 e os animais colocados em gaiolas individuais para recuperação da cirurgia com livre acesso a água e ração. Os animais FO passaram pelos procedimentos mencionados para indução de isquemia, com exceção da cauterização da artéria cerebral média (Figura 8).

Figura 8: Ilustração da Cirurgia de indução isquêmica focal pelo método da Oclusão permanente da Artéria Cerebral Média (pMCAO): momento da aproximação do bisturi elétrico para coagulação da artéria cerebral média.



Fonte: Laboratório de Neurociências e Comportamento-LNC

4.5 Avaliação Neurológica

A Avaliação Neurológica (sensório-motora) foi conduzida 24 horas após a ocorrência da isquemia. Os resultados neurológicos foram quantificados utilizando uma escala previamente delineada por Garcia e colaboradores (1995), conforme apresentado na Tabela 3. Seis parâmetros foram submetidos à avaliação, a saber:

1. Atividade espontânea, que examina a capacidade do animal de se aproximar das quatro paredes de uma caixa de polipropileno (30 cm de diâmetro), explorando o ambiente;
2. Simetria do movimento das quatro patas, que avalia se, ao ser segurado pela cauda e suspenso no ar, o animal apresenta simetria nos membros;
3. Estiramento das patas dianteiras, no qual o animal é conduzido a caminhar sobre as patas dianteiras na borda de uma mesa;
4. Escalada, que avalia a capacidade do animal de agarrar firmemente uma grade de ferro ou realizar movimentos circulares ao ser puxado pela cauda enquanto escala uma grade de ferro;
5. Propriocepção corpórea, na qual o animal é tocado com uma pinça em ambos os lados do corpo, e sua reação é observada para analisar a resposta sensorial;
6. Resposta ao toque da vibrissa, na qual um toque é aplicado nas vibrissas em ambos os lados do animal utilizando uma pinça, para analisar a resposta sensorial.

O escore neurológico total atribuído a cada animal ao término da avaliação varia de 3 a 18 pontos, representando a soma dos escores obtidos pelo animal em cada parâmetro analisado.

Tabela 4: Escala utilizada para a avaliação neurológica.

Testes	Escore			
	0	1	2	3
Atividade espontânea	Animal sem Movimento	Animal não se ergue e raramente se movimenta	Animal se movimenta, mas não se aproxima de três lados da caixa	Animal se movimenta e se aproxima de três lados da caixa
Simetria do movimento das quatro patas	Contralateral: sem movimento	Contralateral: raros movimentos	Contralateral: movimentos lentos	Ambos os lados: movem Simetricamente
Estiramento das patas dianteiras	Contralateral: sem movimento	Contralateral: raros movimentos	Contralateral: Movimentos lentos	Ambos os lados: movem Simetricamente
Escalada/Prensão	...	Animal falhou em escalar e exibiu movimentos circulares	Contralateral com dificuldade de subir e agarrar a grade	Animal escalou normalmente e agarra
Propiocepção corpórea	...	Contralateral: sem resposta	Contralateral < Ipsilateral	Resposta Simétrica
Resposta ao toque da vibrissa	...	Contralateral: sem resposta	Contralateral < Ipsilateral	Resposta Simétrica

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

4.6 Testes Comportamentais

O comportamento será captado em vídeo e analisado em tempo real, ou a posteriori, com o software ANYmaze (Stoelting Co. EUA).

4.6.1 Avaliação da Atividade Locomotora - Teste do Campo Aberto

O teste do campo aberto, inicialmente descrito por Hall (1934) foi conduzido com o objetivo de avaliar a capacidade locomotora dos animais, seguindo o modelo proposto por Broadhurst (1957). A estrutura do campo aberto consiste em uma arena quadrada de acrílico preto (30 x 30 x 15 cm), com o piso dividido em nove quadrantes iguais (Figura 9).

Durante o teste, o animal foi colocado na arena e permitido explorar o ambiente por 5 minutos. Nesse período, registrou-se o número de quadrantes atravessados pelo animal (número de cruzamentos). Além disso, avaliou-se o número de vezes que o animal se levantou para explorar o ambiente, sustentando-se apenas pelas patas traseiras, caracterizando o comportamento exploratório do tipo rearing. Após cada teste, a arena foi higienizada com álcool a 20% para evitar interferência do odor de urina e fezes no próximo teste.

Figura 9: Arena do Campo Aberto.



Fonte: Laboratório de Neurociências e Comportamento-LNC.

4.6.2 Avaliação da Memória de Trabalho – Teste Labirinto em Y (Y-Maze)

Esse teste objetiva avaliar a memória operacional (FANGFANG *et al*, 2017), no qual o animal é posicionado em um labirinto com a configuração de Y, apresentando três braços idênticos (SARTER *et al*, 1988). Os animais tendem a demonstrar uma forte propensão para alternar entre a entrada nos diferentes ambientes. O labirinto em Y é composto por três braços de madeira, cada um medindo 16 cm de altura, 5 cm de largura e 40 cm de comprimento (Figura 10).

Na avaliação da memória, os braços foram numerados. O animal foi introduzido no dispositivo, e ao longo de 8 minutos, as sequências dos braços nos quais os animais entraram foram registradas. Cada vez que o animal entrou em três braços diferentes sem repetição foi considerado como um acerto.

Figura 10. Labirinto em Y



Fonte: Laboratório de Neurociências e Comportamento-LNC

O resultado foi expresso em porcentagem e obtido através da seguinte fórmula matemática:

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

4.6.3 Avaliação da Memória Aversiva – Teste da Esquiva Passiva

O teste de esquiva passiva (Step Down) é caracterizado pela supressão da tendência inata do animal para explorar além de uma plataforma, requerendo o aprendizado para esquivar-se de um choque, o qual atua como um estímulo aversivo que leva à formação de uma resposta condicionada (IZQUIERDO & DIAS, 1983; De NOBLE *et al*, 1986). Este método utiliza uma caixa de acrílico (dimensões 48 x 22 x 22) equipada com uma plataforma e uma grade no chão que pode ser eletrificada (Figura 11). Inicialmente, o animal é colocado sobre a plataforma, onde permanece por um minuto para se acostumar ao ambiente antes de ser removido.

Após 30 segundos, o animal é recolocado na plataforma. Se ele desce, é aplicado um choque elétrico de 0,5 mA por 1 segundo. O tempo que o animal leva para descer da plataforma é medido, com um limite máximo de 5 minutos (fase de treinamento). O animal é então removido e, depois de 15 minutos, colocado novamente na plataforma para medir a latência de descida (teste de memória de curto prazo), recebendo outro choque ao descer. A retenção da aprendizagem (teste de memória de longo prazo) é avaliada 24 horas depois, colocando o animal na plataforma novamente e registrando o tempo até que desça, mas sem aplicar o choque nesta fase.

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



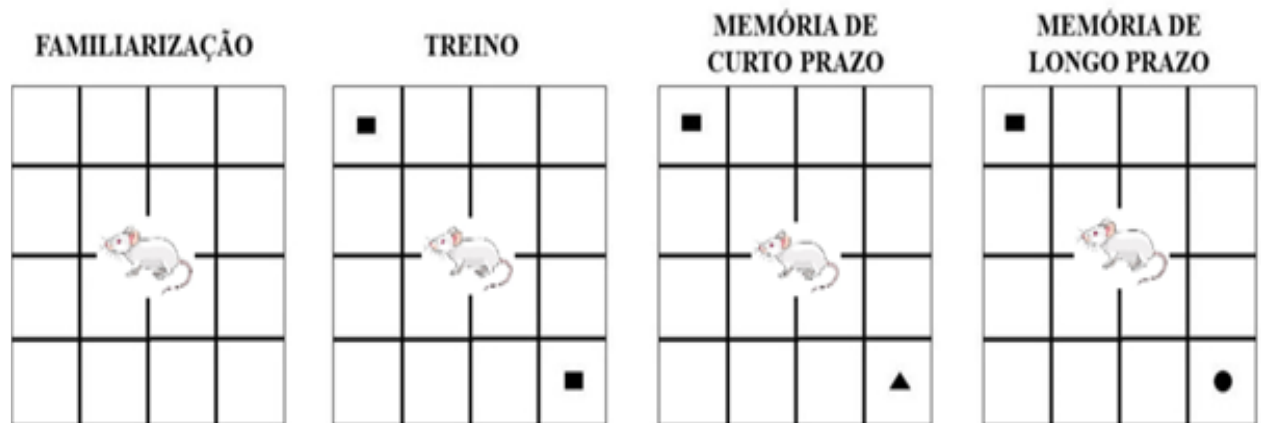
Fonte: INSIGHT LTDA.

4.6.4 Avaliação da Memória de Reconhecimento – Teste do Reconhecimento de Objetos

O teste de reconhecimento de objetos (Figura 12) é baseado na tendência natural dos animais buscarem o novo (ENNACEUR & DELACOUR, 1988) e consiste em dois objetos idênticos colocados em lados opostos da arena de um campo aberto. O teste foi realizado em duas sessões.

Durante o período de treinamento, o animal foi introduzido em uma arena quadrada de acrílico preto com dimensões de 30 x 30 x 15 cm, que continha dois objetos idênticos (OI). Ao longo de 10 minutos, o animal teve a oportunidade de explorar tanto o ambiente quanto os objetos. Após uma hora, um dos objetos idênticos foi substituído por um objeto novo (ON), e o animal foi reintroduzido na arena para o teste. Durante 5 minutos, registrou-se o tempo que o animal dedicou à exploração de cada objeto. Os resultados foram expressos como índice de reconhecimento ou de discriminação e foram calculados com a seguinte fórmula: tempo de exploração do objeto novo menos o tempo de exploração no antigo sobre o tempo total de exploração dos dois objetos.

Figura 12: Representação da metodologia do teste de reconhecimento de objetos



Fonte: Laboratório de Neurociências e Comportamento-LNC

4.7 Quantificação do dano isquêmico através da coloração 2,3,5-trifeniltetrazol (TTC).

A técnica de coloração com cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazol (TTC) foi originalmente introduzida por Jestaedt & Sandritter (1959) para a quantificação da área de infarto no miocárdio. Neste estudo, empregou-se essa técnica para a identificação e mensuração das regiões de infarto resultantes da isquemia cerebral focal.

O TTC, um sal derivado do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl] -2,5-difeniltetrazol), adquire uma coloração avermelhada ao ser reduzido pelas mitocôndrias viáveis (recebendo um próton da succinato desidrogenase), enquanto as células não mais viáveis (com enzimas inativas) apresentam uma coloração pálida, correspondente à área de infarto (GOLDLUST *et al*, 1996).

Os animais foram eutanasiados por decapitação vinte e quatro horas após a isquemia, e seus cérebros foram retirados e preservados em salina gelada até o momento dos cortes. As seções cerebrais, com espessura de 2 mm, foram submersas em uma solução de 2% de TTC a 37°C por 30 minutos em banho maria. Posteriormente, as fatias foram digitalizadas em alta resolução, e as áreas de infarto e as áreas totais foram analisadas para calcular as respectivas percentagens. Essa avaliação foi realizada utilizando o software Osiris TM (University of Geneva, Switzerland).

4.8 Determinação da peroxidação lipídica, por mensuração das concentrações de Malonaldeído (MDA)

Vinte e quatro horas após a indução da isquemia, a peroxidação lipídica foi avaliada por meio da mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um indicador de peroxidação lipídica, conforme descrito por Draper & Hadely (1990). No dia do ensaio, 60 µL do homogenato (10% em tampão fosfato) de córtex temporal, hipocampo e corpo estriado foi transferido para tubos tipo eppendorfs e centrifugado a 1200 rotações por minuto (rpm) a 4°C por 30 minutos. Após a centrifugação, 100 µL de ácido perclórico a 35% foi adicionado para interromper a peroxidação, seguido por uma segunda centrifugação a 5000 rpm a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e adicionaram-se 50 µL de ácido tiobarbitúrico a 1,2%.

Em seguida, a mistura foi submetida a um banho de água por 30 minutos, mantido a uma temperatura variável entre 95 e 100°C. A solução foi retirada e permitida esfriar à temperatura ambiente. Após o resfriamento, 150 µL da solução foram transferidos para os poços

de uma placa de ELISA, e a leitura foi realizada a 535 nm. A curva padrão foi obtida por meio da leitura de diversas concentrações (640; 320; 160; 80; 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,2; 0,6 μM) de malonaldeído (MDA) padrão, e os resultados foram expressos em concentração (μM).

4.9 Determinação da concentração de nitrito/nitrato de sódio

O referido teste foi conduzido também 24 horas após a cirurgia. Utilizando o reativo de Griess (N-1-naftiletilenodiamina a 0,1% em água bidestilada, sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 5%), foram reveladas a presença de nitrito/nitrato (NO_2/NO_3) em amostras (homogenato de córtex). Isso ocorreu por meio da reação de diazotização, resultando na formação de um cromóforo de tonalidade rosada, com um pico de absorvância a 540 nm (GREEN *et al*, 1982).

Para realizar o ensaio, os homogenatos (10% em tampão fosfato) do córtex temporal, hipocampo e estriado foram centrifugados a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C, e 100 μL de cada sobrenadante foram adicionados a 100 μL do reagente de Griess. Para o controle (branco), foram utilizados 100 μL de tampão fosfato e 100 μL de reagente de Griess. Após 10 minutos, as absorvâncias foram lidas a 540 nm. A curva padrão foi estabelecida pela leitura de diversas concentrações de nitrito padrão (100; 50; 25; 12,5; 6,52; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,195 μM), e os resultados foram expressos em concentração (μM). As leituras de absorvância dos padrões (y) foram plotadas em função da concentração de cada padrão (x), e a equação da reta obtida foi utilizada para determinar a concentração de nitrito em cada amostra.

4.10 Conteúdo Total de Sulfidrila (SH)

Este ensaio foi realizado conforme descrito por Aksenov & Markesbery (2001), que se baseia na redução do ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) por grupos tióis e, por sua vez, torna-se oxidado (dissulfeto) gerando um derivado amarelo, o ácido 2-nitro-5-mercaptopbenzoico (TNB). Para a realização do ensaio, serão adicionados 145 μL de PBS – EDTA (1 mM), pH 7,5 a 10 μL da amostra. Após, 10 μL de DTNB (10 mM) em PBS serão adicionados, incubando-se por 1 hora em temperatura ambiente. A absorvância será determinada a 412 nm e os resultados serão expressos como nmol de TNB/mg de proteína.

4.11 Avaliação da atividade da AChE *in vivo*

A atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi avaliada utilizando o método de Ellman e colaboradores (1961), que envolve a hidrólise da acetiltiocolina (ACTI) pela AChE, resultando na formação de colina. Esta, ao combinar-se com DTNB, gera um composto de coloração amarela, quantificado a 412 nm em um leitor de Elisa (ASYS UVM 340).

Os tecidos do córtex temporal, estriado, hipocampo e córtex FPO dos animais foram homogeneizados em tampão fosfato (10%, pH 7,4) e diluídos em tampão fosfato para ajuste da concentração de proteína no ensaio (0,5 mg/mL). Foram pipetados 34 μ L dessa solução nos poços da microplaca em triplicata, seguidos pela adição de 134 μ L de DTNB 0,75mM em tampão fosfato (pH 7,4). Em seguida, foram adicionados a cada amostra 34 μ L de ACTI, 9 mM, para iniciar a reação. Após a adição do ACTI, as leituras de absorbância foram realizadas no leitor de Elisa a um comprimento de onda de 412 nm, durante 5 minutos com intervalos de 30 segundos.

O cálculo da atividade da AChE, foi baseado na equação de Lambert-Beer:

$$A = c \cdot \epsilon \cdot d$$

Onde,

- A = absorbância (D.O.)
- c = concentração
- ϵ = coeficiente de extinção molar ($1,36 \cdot 10^4 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
- d = caminho óptico (0,642 cm)

Assim:

$$c \text{ ou nmol. min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} = \frac{(\Delta \text{ D.O. min}^{-1}) \times 1000}{13,6 \times 0,642}$$

4.12 Avaliação da degeneração neuronal pela coloração do Violeta de Cresil.

A coloração de cresil-violeta foi utilizada para evidenciar os corpúsculos de Nissl presentes no citoplasma de neurônios viáveis (SCORZA *et al*, 2005). Os cortes coronais do estriado e hipocampo foram feitos em um criostato (Leica CM3050 S, Heidelberg, Alemanha) a 21°C, e armazenados numa série de “um em seis” de 10 µm (300µm de intervalo). As lâminas foram visualizadas em um microscópio (Nikon Elipse E200) com aumento de 200x. Foram selecionadas três fatias de cada animal, aleatoriamente, ao longo da área da lesão e a quantificação das células serão realizadas utilizando o software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA).

4.13 Análise estatística

Antes de realizar os testes estatísticos, procedeu-se o teste de normalidade Shapiro-Wilk para todos os dados, para a partir desse resultado, direcionar as análises para testes paramétricos ou não paramétricos.

Os escores neurológicos são dados não paramétricos, sendo apresentados como mediana (intervalo interquartil) e as diferenças foram examinadas por meio dos testes de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's para dados não paramétricos. Os resultados dos testes foram submetidos aos testes de Kruskal-Wallis (não paramétrico) seguidos por Dunn's (post hoc), os resultados foram expressos em mediana com valores de mínimo e máximo.

Os testes bioquímicos e histopatológicos (dados paramétricos) foram analisados por ANOVA de uma via, com o teste post hoc de Tukey e Bonferroni e foram representados como média mais o erro padrão da média.

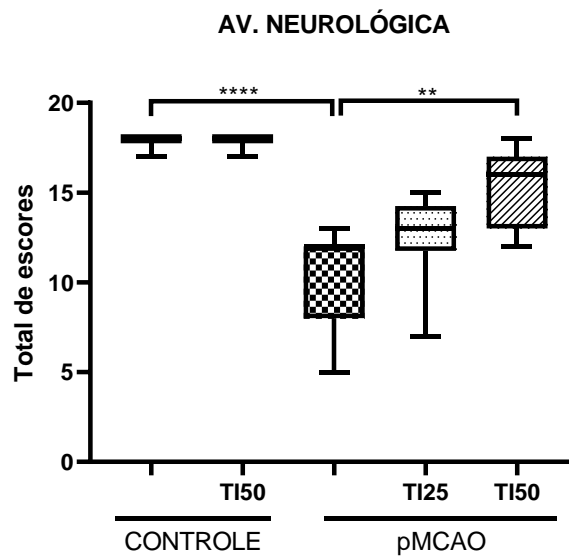
O critério de significância adotado foi $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do timol sobre os déficits neurológicos de camundongos submetidos a isquemia cerebral focal permanente (pMCAO).

Os animais que foram submetidos à pMCAO exibiram déficits neurológicos 24 horas após a isquemia (Escores-FO: 18.00 (17-18); pMCAO: 12.00 (5-13)), manifestando principalmente uma redução na capacidade de resposta a estímulos e movimentação do lado contralateral à isquemia. Já os animais tratados com timol na dose de 50 mg/Kg mostraram uma redução nos déficits neurológicos induzidos pela pMCAO (Escores – FO + TI50: 18.00 (17-18); pMCAO + TI25: 13.00 (7-15); pMCAO + TI50: 16.00 (12-18)) (Figura 13).

Figura 13: O timol na dose de 50mg/Kg protege contra os déficits sensoriomotores em camundongos submetidos à pMCAO.

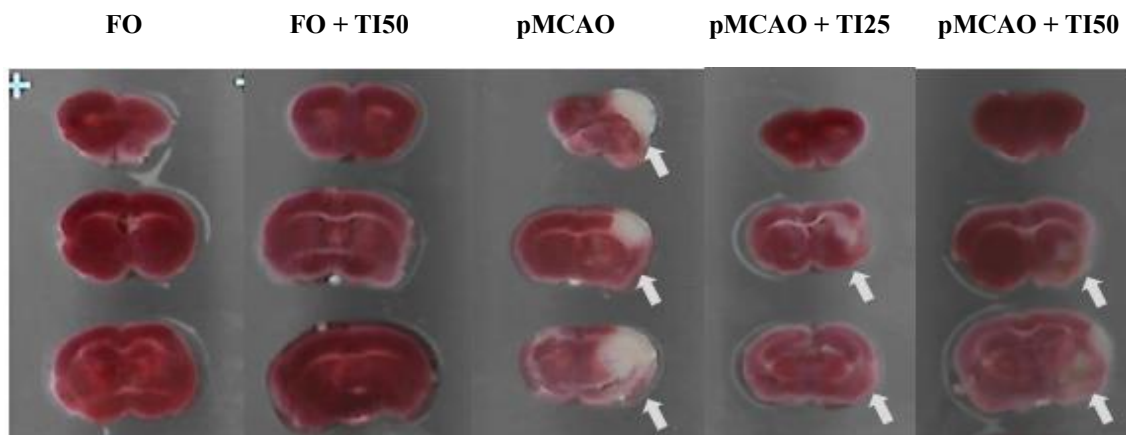


Os animais foram isquemiados por pMCAO e tratados 3 horas depois com o timol (25 e 50 mg/Kg). Após 24 horas da pMCAO foi realizada a avaliação neurológica. Os valores representam a mediana (MIN-MAX). $p < 0,05$ ($n = 9-10$). Teste de Kruskal-Wallis seguido, do teste de Dunn's. **($p < 0,01$); ****($p < 0,0001$).

5.2 Efeito do timol (25 e 50 mg/Kg) sobre o dano isquêmico dos camundongos.

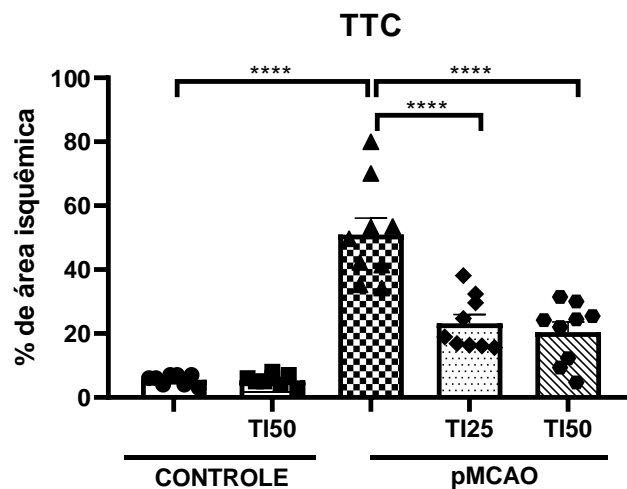
O efeito do timol na extensão da área de infarto isquêmico foi avaliado 24 horas após a realização da cirurgia de pMCAO. Os animais submetidos à isquemia apresentaram uma área isquêmica significativa (FO: $5,500 \pm 0,567$; pMCAO: $50,96 \pm 5,156$). No entanto, os animais tratados com timol nas doses de 25 e 50 mg/Kg exibiram uma redução na porcentagem da área isquêmica em comparação com os animais que não receberam o tratamento (FO + TI50: $5,375 \pm 0,653$; pMCAO + TI25: $23,19 \pm 2,797$; pMCAO + TI50: $20,46 \pm 3,134$) (Figuras 14 e 15).

Figura 14: Fotografia das fatias cerebrais dos animais submetidos a pMCAO e tratados com o timol (coloração com TTC 1%).



Observar a área isquêmica (setas).

Figura 15: O timol diminui a área do infarto isquêmico.



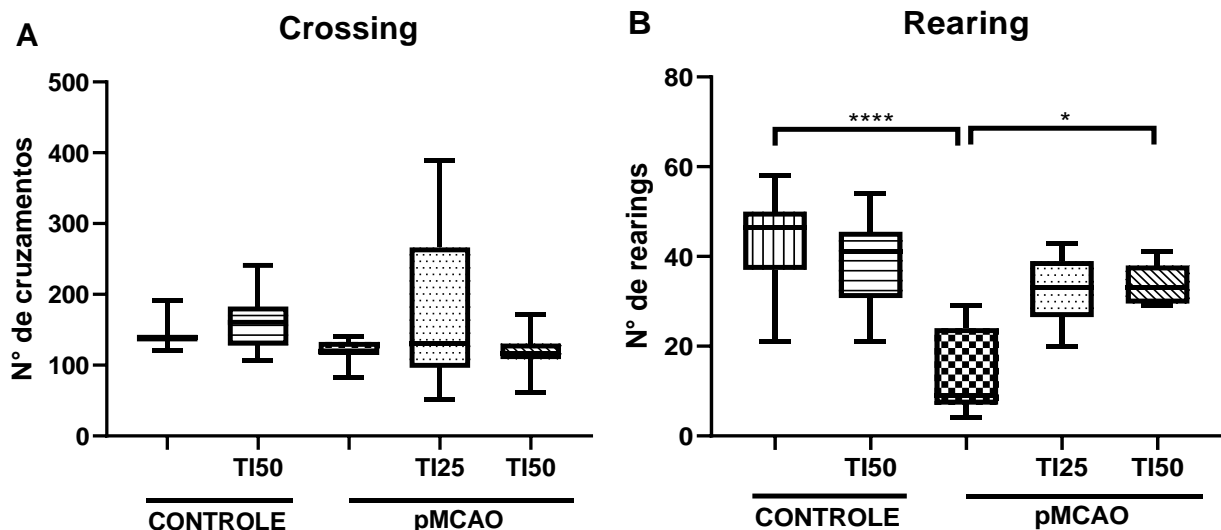
Os animais foram isquemiados por pMCAO e foram tratados 3 horas depois com timol (25 e 50 mg/Kg). A área do infarto isquêmico foi avaliada 24 horas depois da pMCAO. Os valores representam a média \pm EPM, (n= 8-9). Teste ANOVA, seguido do teste de Tukey's. ****(p<0,0001).

5.3 Efeito do timol 25 e 50 mg/Kg sobre a atividade locomotora dos animais

O teste do campo aberto foi realizado 48 horas após a indução de pMCAO. Foi avaliada a atividade locomotora horizontal, pela somatória do número de cruzamentos – *crossings*. (*Crossings* (Figura 16A) - FO: 138.5 (121 - 191); pMCAO: 123.0 (82 - 167)). Os animais tratados com timol nas doses de 25 e 50 mg/Kg/dia não apresentaram uma redução no déficit de atividade locomotora horizontal (*Crossings* – FO + TI50: 160.5 (107 - 241); pMCAO + TI25: 130.0 (51 - 389); pMCAO + TI50: 116.0 (62 - 172)).

O teste foi realizado 48 horas após a indução de pMCAO. O grupo pMCAO exibiu um menor número de "*rearings*" (movimento que consiste no ato do animal se apoiar sobre as patas traseiras) em comparação aos grupos falsos operados, indicando um déficit na atividade locomotora vertical dos animais isquemiados. *Rearings* (Figura 16B) - 46.50 (21 - 58); pMCAO: 15.00 (4 - 33). Os animais tratados com timol nas doses de 25 e 50 mg/Kg/dia apresentaram uma redução no déficit de atividade locomotora vertical (*Rearings* - FO+TI50: 41.0 (21 - 54); pMCAO+TI25: 33.00 (10 - 43); pMCAO+TI50: 32.00 (18 - 41)).

Figura 16: O timol protegeu os animais contra a diminuição da atividade locomotora vertical.



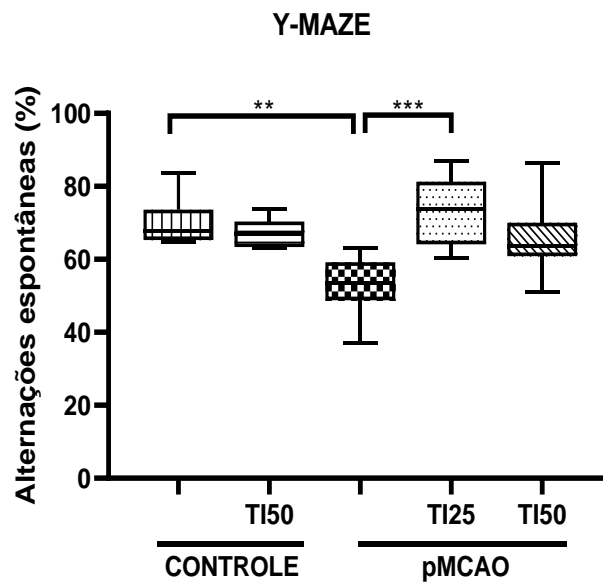
Os animais foram isquemiados e tratados com o timol (25 e 50 mg/Kg), e após 48 horas da pMCAO foi realizado o teste de campo aberto. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's. Os valores representam a mediana (MIN-MAX). $p < 0,05$ ($n = 9-12$). Teste de Kruskal-Wallis seguido, do teste de Dunn's. * ($p < 0,05$), **** ($p < 0,0001$).

5.4 Avaliação da memória

5.4.1 Efeito do timol (25 e 50 mg/Kg) sobre a memória de trabalho

Os animais submetidos à pMCAO apresentaram déficit na memória de trabalho, no teste do labirinto em Y (Y-maze) e esse efeito foi prevenido pelo timol na dose de 25mg/Kg (Porcentagem de alterações espontâneas: FO: 67.76 (64.71 - 83.64); pMCAO: 53.59 (37.21 - 63.16); FO + TI50: 67.07 (63.04 - 73.77); pMCAO + TI25: 73.67 (60.47 - 86.89); pMCAO + TI50: 63.72 (51.11 - 86.49)) (Figura 17).

Figura 17: O timol na dose de 25mg/Kg protege contra os déficits de memória de trabalho.



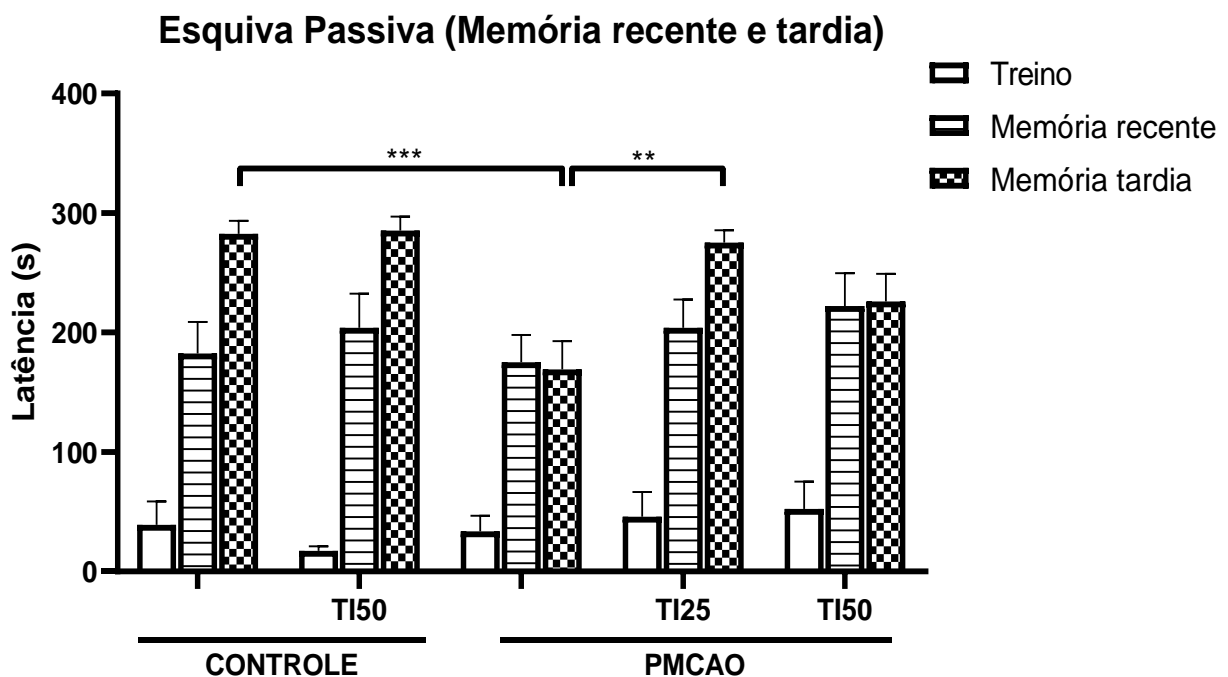
Os animais foram isquemiados por pMCAO e foram tratados com o timol (25 e 50 mg/Kg), 3 e 24 horas depois da isquemia, e após 48 horas da pMCAO foi realizado o teste do labirinto em Y, que avalia a memória de trabalho. Os valores representam a mediana (MIN-MAX). $p < 0,05$ ($n = 10$). Teste de Kruskal-Wallis seguido, do teste de Dunn's. **($p < 0,01$); ***($p < 0,001$).

5.4.2. Efeito do timol (25 e 50 mg/Kg) sobre a memória aversiva de camundongos submetidos a pMCAO.

Na avaliação da memória aversiva através do teste da esQUIVA passiva, os animais isquemiados, apresentaram déficits na memória aversiva, eles não aprenderam a evitar o choque (para demonstrar esse aprendizado, os animais deveriam se manter sobre a plataforma a fim de, evitar o choque), quando avaliados 15 minutos (Memória recente) após o choque. (Latência para descer (segundos) - Memória Recente: FO: 175.0 (60 - 300); pMCAO: 179.0 (48 - 300). O timol não preveniu os déficits na memória recente, (latência para descer - Memória Recente: FO + TI50: 300.0 (40-167); pMCAO + TI25: 204.0 (64-300); pMCAO + TI50: 300.0 (17-300)) (Figura 18).

Quando avaliados 24 horas (Memória tardia) após o choque (latência para descer (segundos) - Memória Tardia: FO: 300.0 (155 - 300); pMCAO: 210.0 (18 - 300). O timol preveniu os déficits na memória tardia (latência para descer - Memória Tardia: FO + TI50: 300.0 (137 - 300); pMCAO + TI25: 300.0 (190 - 300); pMCAO + TI50: 272.5 (87 - 300)) (Figura 18).

Figura 18: O timol na concentração de 25mg/Kg, protege os camundongos contra os déficits de memória aversiva tardia induzidos pela pMCAO.



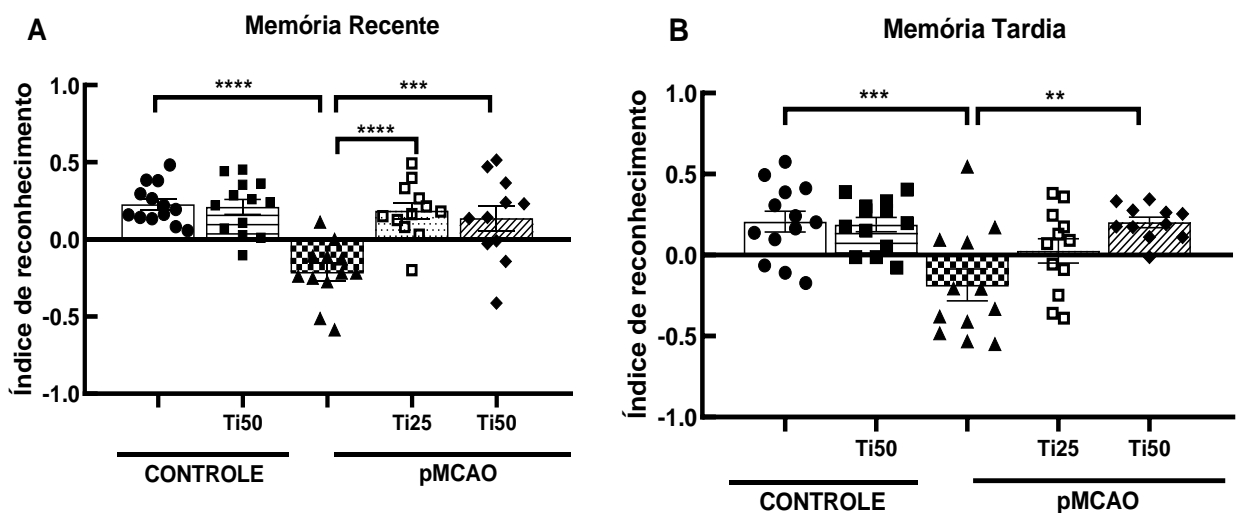
Os animais foram isquemiados por pMCAO, e foram tratados com o timol (25 e 50 mg/Kg). 72 horas depois da pMCAO a memória recente foi avaliada, e 96 horas depois a memória tardia, (n= 14). Os valores representam a mediana (MIN-MAX). $p < 0,05$. Teste de Kruskal-Wallis seguido, do teste de Dunn's. **($p < 0,01$); ***($p < 0,001$).

5.4.3 Efeito do timol (25 e 50 mg/Kg) sobre a memória episódica (teste de reconhecimento de objetos).

Os animais submetidos ao modelo de isquemia cerebral focal permanente demonstraram déficit na capacidade de reconhecer um novo objeto na memória recente, avaliada 1 hora após o treinamento (memória curto prazo – figura 19A), em comparação com os animais controle (índice de reconhecimento: FO: $0,227 \pm 0,035$; pMCAO: $-0,210 \pm 0,056$), apresentando uma menor taxa de reconhecimento. Esta deficiência teve diminuição significativa pelo tratamento com timol em ambas as doses (índice de reconhecimento: FO + TI50: $0,210 \pm 0,048$; pMCAO + TI25: $0,186 \pm 0,052$; pMCAO + TI50: $0,137 \pm 0,082$).

Os animais submetidos à pMCAO tiveram um comprometimento em sua capacidade de reconhecer um novo objeto 24 horas após o treinamento (memória longo prazo - figura 19B) (índice de reconhecimento: FO: $0,20 \pm 0,064$; pMCAO: $-0,18 \pm 0,097$) em comparação com os animais controles. O tratamento com timol na dose de 50mg/Kg reduziu consideravelmente esse comprometimento (índice de reconhecimento: FO + TI50: $0,18 \pm 0,044$; pMCAO + TI25: $0,02 \pm 0,074$; pMCAO + TI50: $0,20 \pm 0,032$).

Figuras 19 A e B: O tratamento com o timol (25 e 50 mg/Kg) reduziu o comprometimento sobre a memória de reconhecimento recente e tardia (teste de reconhecimento de objetos) em camundongos submetidos a pMCAO.



Os animais foram isquemiados por pMCAO, e foram tratados com o timol (25 e 50 mg/Kg), 3, 24, 48 e 72 horas. 48 horas depois da pMCAO a memória recente foi avaliada (A), e 72 horas depois a memória tardia (B), (n= 11-13). Os valores representam a média \pm EPM. Teste Anova, seguido do teste de Tukey's. **($p < 0,01$); ***($p < 0,001$), ****($p < 0,0001$).

5.5 Avaliação bioquímica

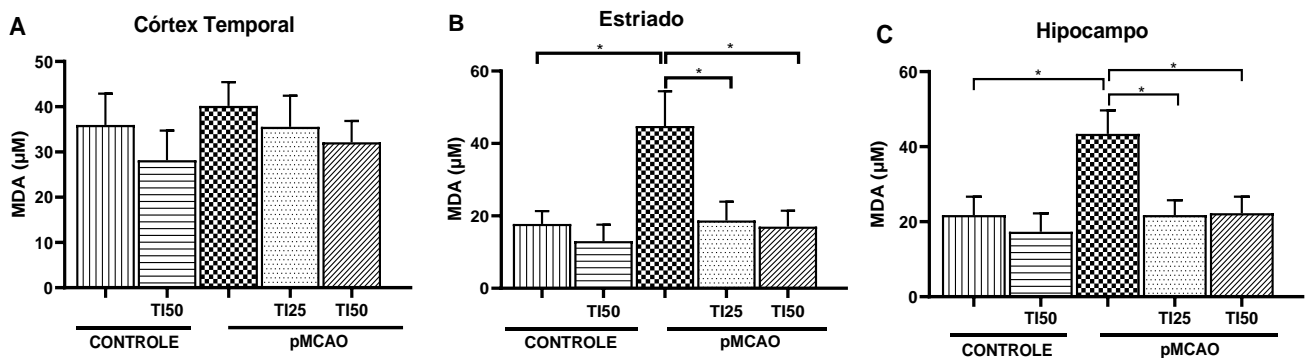
5.5.1 Efeito do timol (25 e 50 mg/Kg) sobre a peroxidação lipídica avaliada através da dosagem de (MDA) em tecidos cerebrais de camundongos.

Os animais submetidos a pMCAO, não apresentaram um aumento nas concentrações de MDA no córtex temporal. No córtex temporal (MDA (μM) FO: $35,99 \pm 6,916$; pMCAO: $40,18 \pm 5,240$; MDA (μM): FO + TI50: $28,21 \pm 6,52$; ISQ + TI25: $35,56 \pm 6,87$; ISQ + TI50: $32,16 \pm 4,67$) (Figura 20A).

Os animais submetidos a pMCAO, apresentaram um aumento nas concentrações de MDA, estriado e hipocampo, mas não houve diferença no córtex temporal. No estriado (MDA (μM) FO: $17,77 \pm 3,552$; pMCAO: $44,84 \pm 9,606$) (Figura 20B) e hipocampo (MDA (μM) FO: $21,76 \pm 4,92$; pMCAO: $43,41 \pm 6,25$) (Figura 20C).

O tratamento com o timol protegeu contra o aumento da concentração de MDA, no estriado e no hipocampo. Estriado (MDA (μM): FO + TI50: $13,04 \pm 4,50$; ISQ + TI25: $18,73 \pm 5,21$; ISQ + TI50: $17,05 \pm 4,37$) e hipocampo (MDA (μM): FO + TI50: $17,34 \pm 4,87$; ISQ + TI25: $21,77 \pm 3,97$; ISQ + TI50: $22,26 \pm 4,43$).

Figura 20: Efeito do timol (25 e 50 mg/Kg) sobre a peroxidação lipídica avaliada pela dosagem de MDA no córtex temporal, corpo estriado e hipocampo.



Os animais foram isquemiados por pMCAO e foram tratados 3 horas depois com timol (25 e 50 mg/Kg). A dosagem de MDA foi realizada 24 horas depois da pMCAO, (n= 6-8). Os valores representam a média \pm EPM. Teste Anova, seguido do teste de Tukey's. *($p < 0,05$).

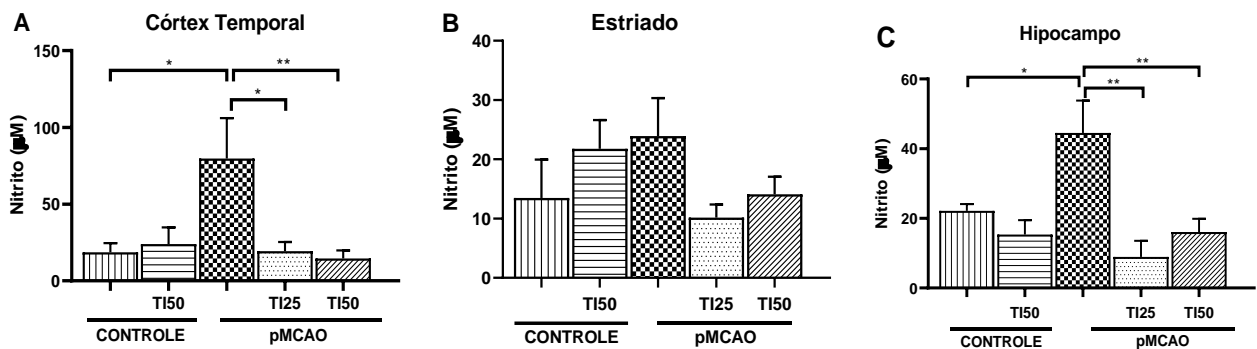
5.5.2 Efeito do timol (25 e 50 mg/Kg) sobre a dosagem de nitrito/nitrato (NO₂/NO₃) em tecidos cerebrais de camundongos.

Na avaliação dos níveis de nitrito/nitrato no córtex temporal, corpo estriado e hipocampo, os animais submetidos a pMCAO, apresentaram um aumento significativo nas concentrações de nitrito, no córtex temporal (nitrito (μM): FO: 18,62 ± 5,967; pMCAO: 79,75 ± 26,30) (Figura 21A). O tratamento com o timol foi capaz de proteger contra o aumento da concentração de nitrito no córtex temporal (nitrito (μM): FO + TI50: 23,96 ± 10,89; pMCAO + TI25: 19,29 ± 6,069; pMCAO + TI50: 14,58 ± 5,221).

No corpo estriado (Figura 21B) não houve alteração significativa nas concentrações de nitrito (nitrito (μM): FO: 13,47 ± 6,487; pMCAO: 23,93 ± 6,385). O tratamento com o timol não foi capaz de diminuir o aumento da concentração de nitrito no corpo estriado (nitrito (μM): FO + TI50: 21,77 ± 4,857; pMCAO + TI25: 10,16 ± 2,223; pMCAO + TI50: 14,10 ± 2,968).

Os animais apresentaram um aumento nas concentrações de nitrito, no hipocampo (nitrito (μM): FO: 22,14 ± 1,961; pMCAO: 44,51 ± 9,279) (Figura 21C). O timol foi capaz de diminuir o aumento da concentração de nitrito no hipocampo (nitrito (μM): FO + TI50: 15,34 ± 4,159; pMCAO + TI25: 8,931 ± 4,597; pMCAO + TI50: 16,08 ± 3,770).

Figura 21: Efeito do timol (25 e 50 mg/Kg) sobre a dosagem de nitrito/nitrato (NO₂/NO₃) no córtex temporal, corpo estriado e hipocampo dos animais.



Os animais foram isquemiados por pMCAO e foram tratados 3 horas depois com timol (25 e 50 mg/Kg). A dosagem de nitrito foi realizada 24 horas depois da pMCAO, (n= 6-8). Os valores representam a média ± EPM. Teste Anova, seguido do teste de Tukey's. *(p<0,05); **(p<0,01).

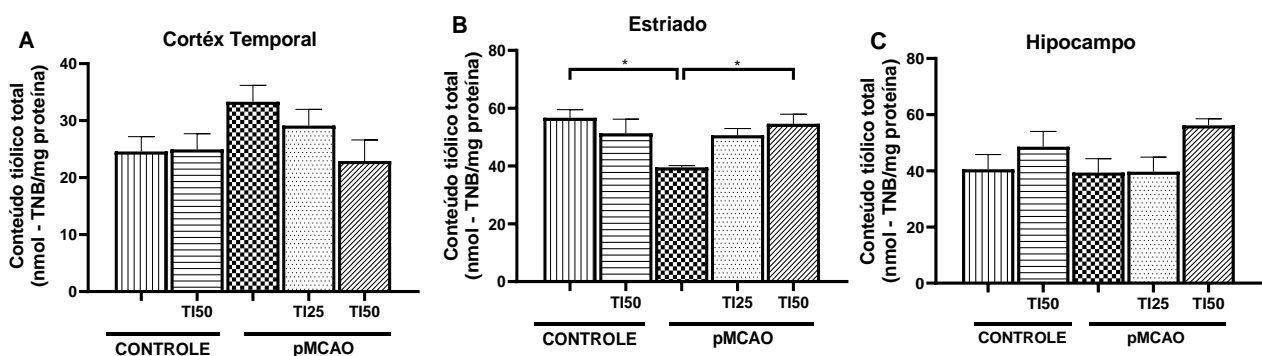
5.5.3 Efeito do timol (25 e 50 mg/Kg) sobre a dosagem do conteúdo tiólico total em tecidos cerebrais.

Na avaliação dos níveis de tióis totais no córtex temporal, corpo estriado e hipocampo, os animais submetidos a pMCAO apresentaram uma diminuição nas concentrações de tióis totais, no córtex temporal (Figura 22A) (conteúdo tiólico total (nmol): FO: $24,59 \pm 2,61$; pMCAO: $33,32 \pm 2,85$), o tratamento com o timol não foi capaz de aumentar a concentração de tióis totais (conteúdo tiólico total (nmol): FO + TI50: $24,96 \pm 2,75$; pMCAO + TI25: $29,14 \pm 2,84$; pMCAO + TI50: $22,93 \pm 3,69$).

No corpo estriado (Figura 22B) houve a diminuição das concentrações de tióis totais nos animais submetidos a pMCAO (conteúdo tiólico total (nmol): FO: $56,70 \pm 2,84$; pMCAO: $39,52 \pm 0,65$). O timol aumentou as concentrações de tióis totais no corpo estriado (conteúdo tiólico total (nmol): FO + TI50: $51,32 \pm 4,88$; pMCAO + TI25: $50,66 \pm 2,31$; pMCAO + TI50: $54,63 \pm 3,31$).

Os animais submetidos a pMCAO não apresentaram uma diminuição nas concentrações de tióis totais, no hipocampo (conteúdo tiólico total (nmol): FO: $40,56 \pm 5,21$; pMCAO: $39,38 \pm 4,92$) (Figura 22C). O tratamento com o timol não foi capaz de aumentar a concentração de tióis totais no hipocampo (conteúdo tiólico total (nmol): FO + TI50: $48,58 \pm 5,41$; pMCAO + TI25: $39,71 \pm 5,13$; pMCAO + TI50: $56,2 \pm 2,33$).

Figura 22: O tratamento com o timol na dose de 50 mg/Kg foi capaz de aumentar a concentração do conteúdo tiólico total no corpo estriado, mas não mostrou diferença no córtex temporal e no hipocampo dos animais.



Os animais foram isquemiados por pMCAO e foram tratados 3 horas depois com timol (25 e 50 mg/Kg). A dosagem de tióis totais foi realizada 24 horas depois da pMCAO, (n= 5-6). Os valores representam a média \pm EPM. Teste Anova, seguido do teste de Tukey's. *($p < 0,05$).

5.6 Efeito do timol (25 e 50 mg/Kg) sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no córtex temporal, corpo estriado e hipocampo dos animais.

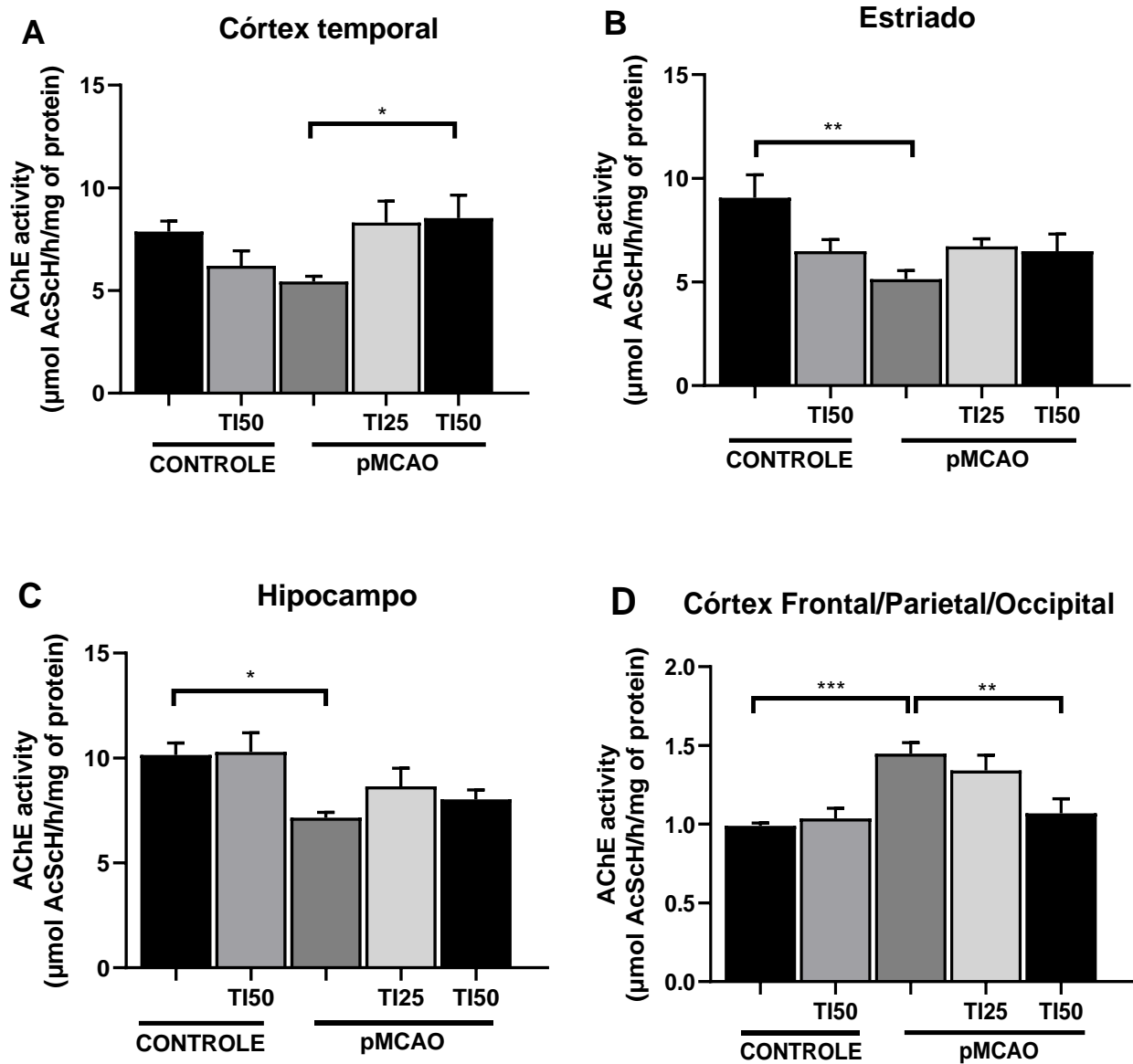
Os animais submetidos ao modelo pMCAO, não apresentaram diminuição na atividade da AChE no córtex temporal (Figura 23A) (AChE (nmol): FO: $7,872 \pm 0,5073$; pMCAO: $5,445 \pm 0,2541$). No córtex temporal, a atividade da AChE foi aumentada pelo tratamento com timol (FO + TI50: $6,204 \pm 0,7297$; pMCAO + TI25: $8,304 \pm 1,055$; pMCAO + TI50: $8,532 \pm 1,119$).

Os animais que foram submetidos a pMCAO, apresentaram diminuição na atividade da AChE no corpo estriado (Figura 23B) (AChE (nmol): FO: $9,061 \pm 1,109$; pMCAO: $5,140 \pm 0,4104$). No corpo estriado, a atividade da AChE não foi alterada pelo tratamento com timol (FO + TI50: $6,480 \pm 0,5671$; pMCAO + TI25: $6,720 \pm 0,3591$; pMCAO + TI50: $6,489 \pm 0,8193$).

Os animais que submetidos ao modelo pMCAO, apresentaram diminuição na atividade da AChE no hipocampo (Figura 23C) (AChE (nmol): FO: $10,15 \pm 0,5615$; pMCAO: $7,150 \pm 0,2640$). No hipocampo, a atividade da AChE não foi alterada pelo tratamento com timol (FO + TI50: $10,29 \pm 0,9224$; pMCAO + TI25: $8,653 \pm 0,8620$; pMCAO + TI50: $8,027 \pm 0,4529$).

Os animais que submetidos ao modelo pMCAO, apresentaram aumento na atividade da AChE no córtex FPO (Figura 23D) (AChE (nmol): FO: $0,9892 \pm 0,01831$; pMCAO: $1,448 \pm 0,0702$). No córtex FPO, a atividade da AChE foi aumentada pelo tratamento com timol (FO + TI50: $1,036 \pm 0,0660$; pMCAO + TI25: $1,341 \pm 0,0970$; pMCAO + TI50: $1,069 \pm 0,0929$).

Figura 23: O timol na concentração de 50 mg/Kg, aumenta a atividade da AChE no córtex temporal e diminui a atividade da enzima no córtex total de camundongos.



Os animais foram isquemiados por pMCAO, e foram tratados com o timol (25 e 50 mg/Kg), 3, 24, 48, 72 e 96 horas. 96 horas após a indução da pMCAO, foi avaliada a atividade de AChE no córtex frontal/parietal/occipital dos animais, (n= 5-6). Os valores representam a média \pm EPM. Teste Anova, seguido do teste de Bonferroni's. *($p < 0,05$); **($p < 0,01$); ***($p < 0,001$).

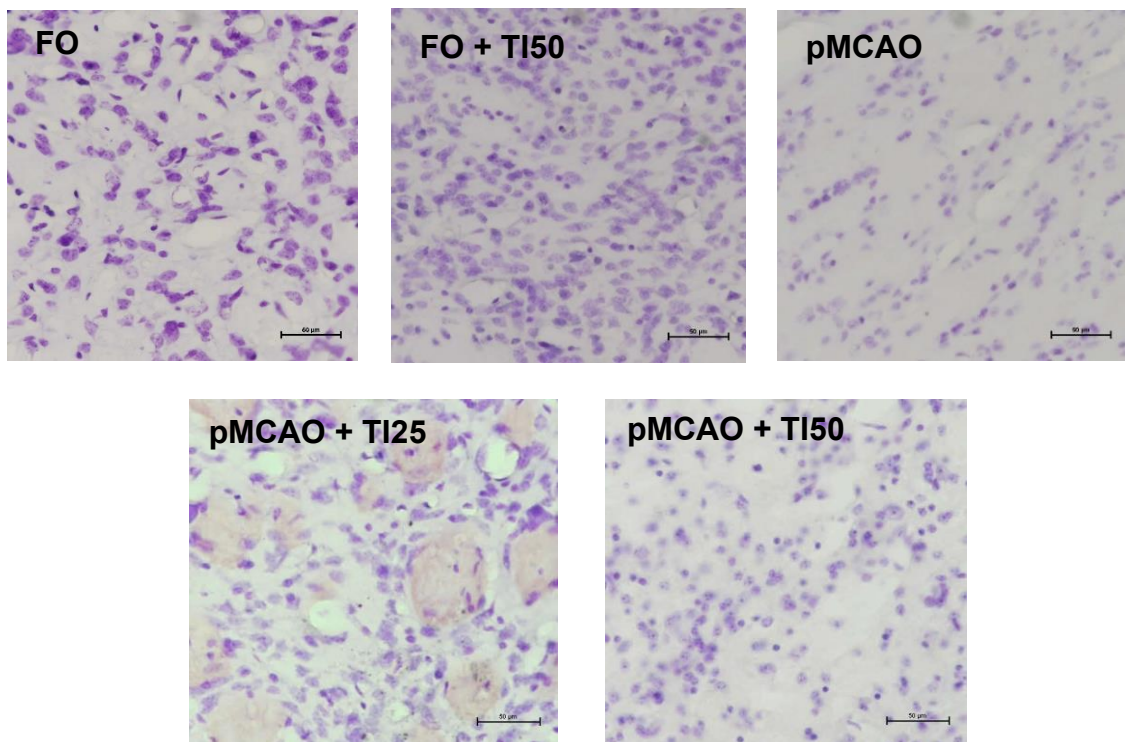
5.7 Avaliação da degeneração neuronal

5.7.1 Efeito do timol (25 e 50 mg/Kg) sobre a morte neuronal através da coloração com o Cresil violeta no corpo estriado.

Os resultados mostraram que os animais submetidos a pMCAO apresentaram perda neuronal (células viáveis – Niessl positivas) no corpo estriado (porcentagem de células viáveis no estriado: FO: $92,03 \pm 4,236$; pMCAO: $62,55 \pm 2,04$) (Figuras 24 e 25).

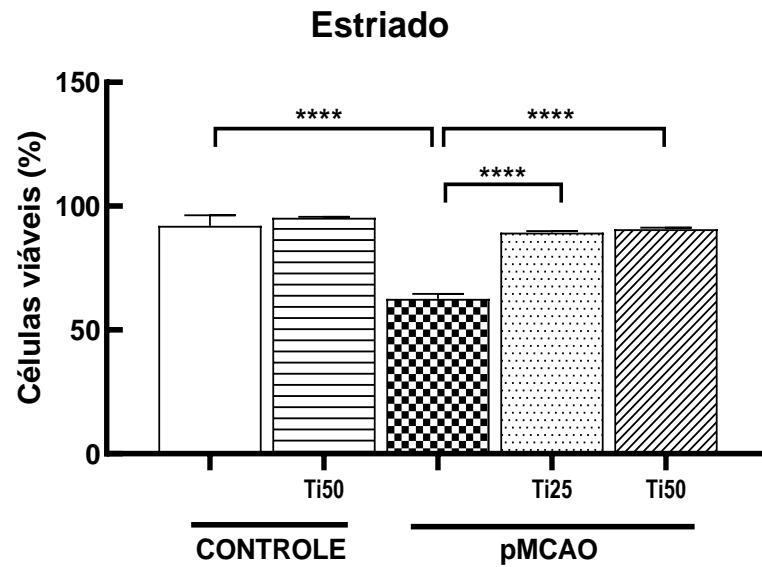
O tratamento com o timol nas doses de 25 e de 50 mg/Kg protegeu contra a morte neuronal no estriado (Estriado: FO + TI50: $95,33 \pm 0,32$; pMCAO + TI25: $89,27 \pm 0,67$; pMCAO + TI50: $90,64 \pm 0,69$), comparado ao grupo pMCAO.

Figura 24: Fotomicrografias (Cresil Violeta) do efeito do tratamento com timol (25 e 50 mg/Kg, v.o.) sobre a viabilidade celular no corpo estriado de camundongos submetidos ao modelo pMCAO.



Aumento de 200x. Barra de escala corresponde a 50µm. FO (Animal falso-operado tratado com veículo); TI (Timol); pMCAO (Isquemia cerebral focal permanente por electrocoagulação da ACM).

Figura 25: O tratamento com timol nas doses de 25 e 50 mg/Kg, aumenta a viabilidade celular avaliada pela coloração para Cresil violeta no estriado dos animais.



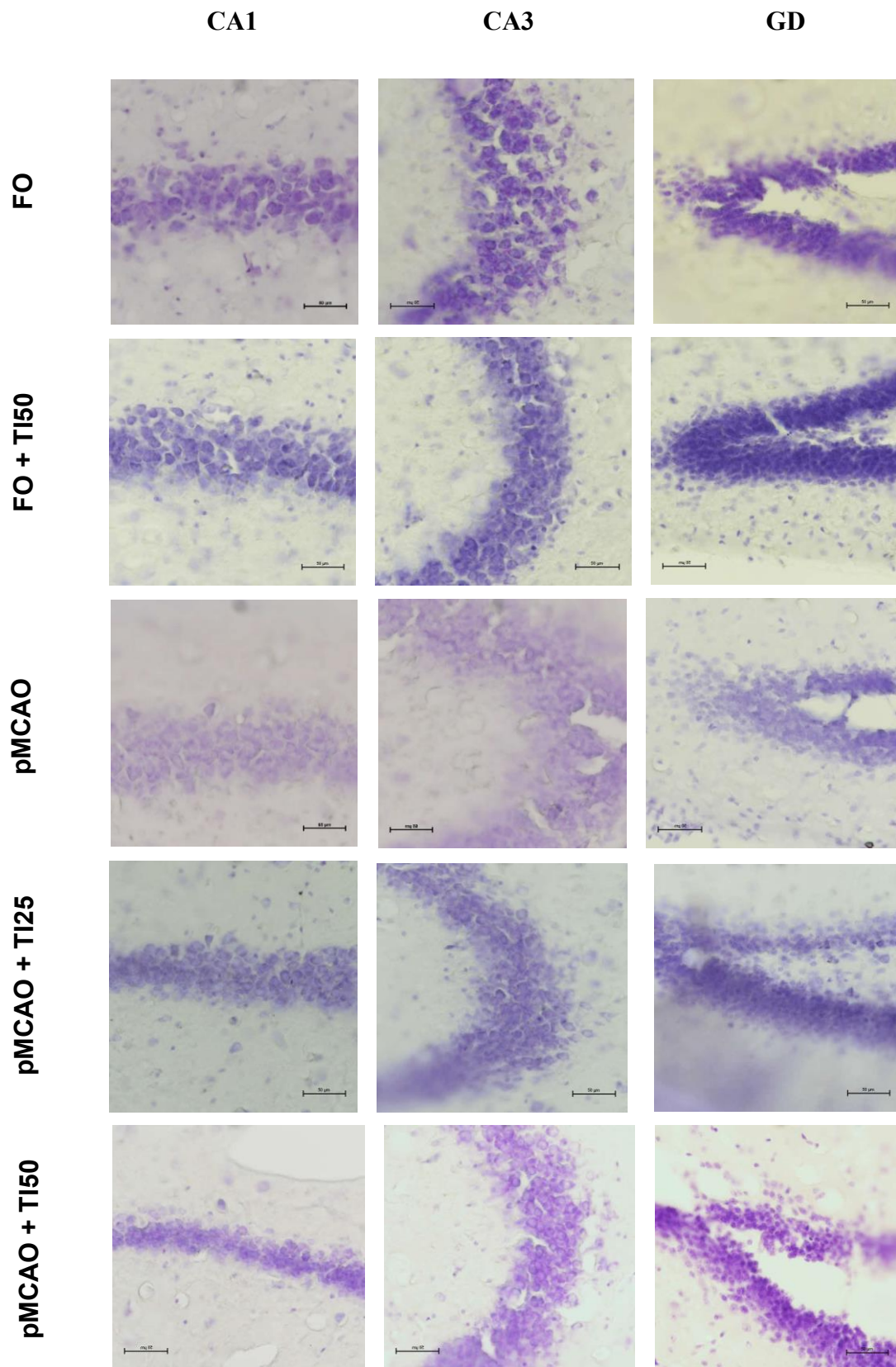
Os animais foram isquemiados por pMCAO, e foram tratados com o timol (25 e 50 mg/Kg), 3, 24, 48, 72 e 96 horas. 96 horas após a indução da pMCAO, foi avaliada a viabilidade celular no estriado dos animais, (n= 3-4). Os valores representam a média \pm EPM. Teste Anova, seguido do teste de Tukey's. ****(p<0,0001).

5.8.2 Efeito do timol (25 e 50 mg/Kg) sobre a morte neuronal através da coloração com o Cresil violeta nas regiões CA1, CA3 e GD do hipocampo.

Os resultados mostraram que os animais submetidos a pMCAO apresentaram perda neuronal (células viáveis – Niessl positivas) no hipocampo CA1 (FO: $93,44 \pm 1,78$; pMCAO: $68,94 \pm 3,57$), CA3 (FO: $93,81 \pm 1,99$; pMCAO: $73,83 \pm 0,44$) e GD (FO: $96,92 \pm 0,58$; pMCAO: $75,83 \pm 0,82$) (Figuras 26 e 27).

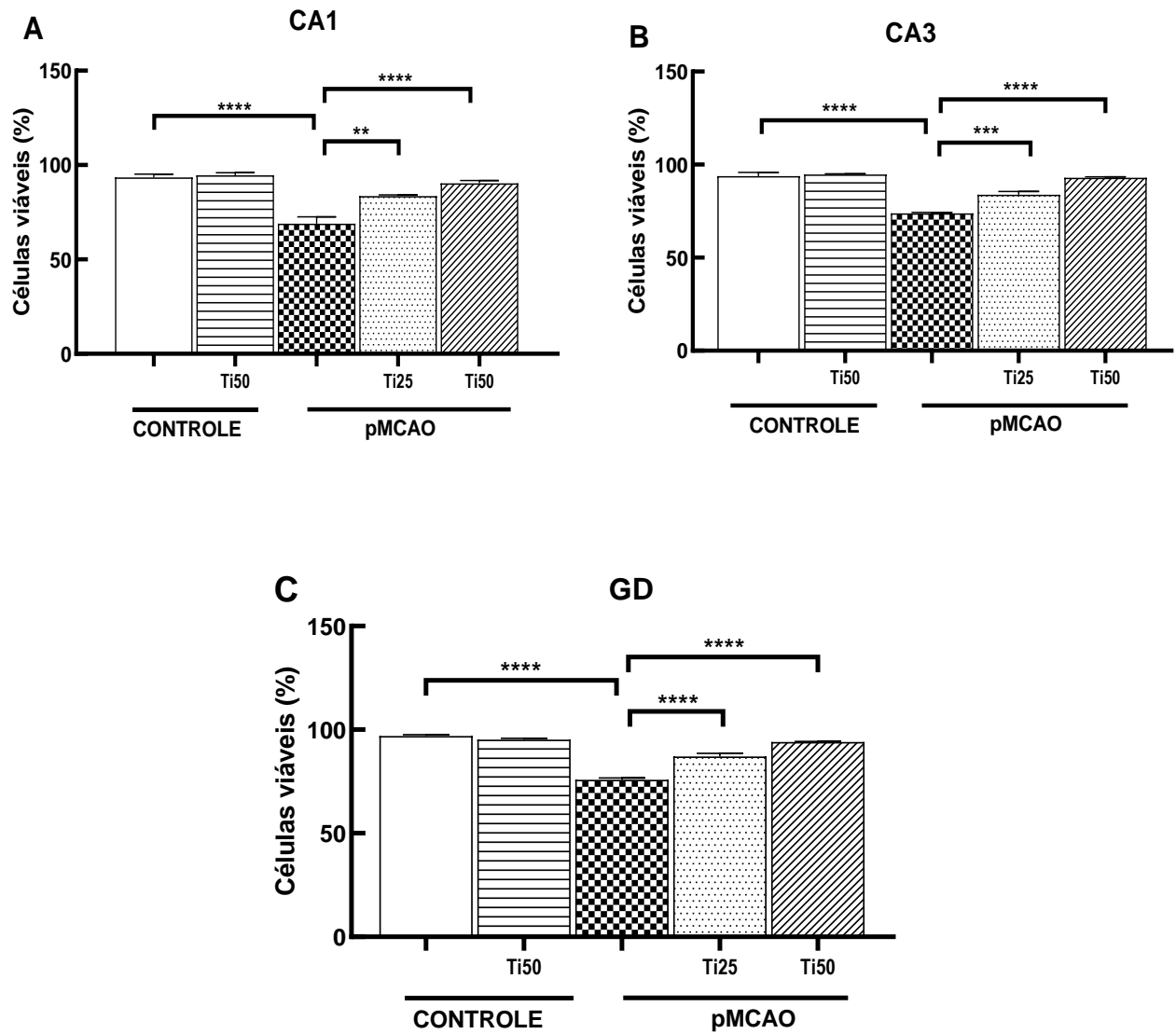
O tratamento com o timol nas doses de 25 e de 50 mg/Kg protegeu contra a morte neuronal no estriado e no hipocampo CA1 (FO + TI50: $94,56 \pm 1,38$; pMCAO + TI25: $83,58 \pm 0,60$; pMCAO + TI50: $90,31 \pm 1,44$), CA3 (FO + TI50: $94,67 \pm 0,34$; pMCAO + TI25: $83,86 \pm 1,64$; pMCAO + TI50: $92,90 \pm 0,52$) e GD (FO + TI50: $95,19 \pm 0,67$; pMCAO + TI25: $87,00 \pm 1,60$; pMCAO + TI50: $94,02 \pm 0,28$), comparado ao grupo pMCAO.

Figura 26: Fotomicrografias (Cresil Violeta) do efeito do tratamento com timol (25 e 50 mg/Kg, v.o.) sobre a viabilidade celular no hipocampo (regiões CA1, CA3 e GD).



Aumento de 200x. Barra de escala corresponde a 50µm. FO (Animal falso-operado tratado com veículo); TI (Timol); pMCAO (Isquemia cerebral focal permanente por electrocoagulação da ACM).

Figura 27: O tratamento com timol nas doses de 25 e 50 mg/Kg, aumenta a viabilidade celular avaliada pela coloração para Cresil violeta no hipocampo (regiões CA1, CA3 e GD).



Os animais foram isquemiados por pMCAO, e foram tratados com o timol (25 e 50 mg/Kg), 3, 24, 48, 72 e 96 horas. 96 horas após a indução da pMCAO, foi avaliada a viabilidade celular no hipocampo (regiões CA1 (A), CA3 (B) e GD (C)) dos animais, (n= 3-4). Os valores representam a média \pm EPM. Teste Anova, seguido do teste de Tukey's. **($p < 0,01$); ***($p < 0,001$); ****($p < 0,0001$).

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou o potencial neuroprotetor do timol sobre danos comportamentais e neuroquímicos decorrentes da isquemia cerebral, em camundongos submetidos ao modelo de eletrocoagulação da artéria cerebral média, por um mecanismo que envolve um efeito antioxidante.

A patogênese do AVC, envolve diversos mecanismos, principalmente: danos oxidativos, excitotoxicidade, processos inflamatórios, desequilíbrio iônico e apoptose (POPA-WAGNER *et al*, 2018; KNECHT *et al*, 2017). Entre os sintomas clínicos estão: déficits funcionais motores (BUCHMAN *et al*, 2013), escores de quociente de inteligência (QI) diminuídos (HOGAN *et al*, 2006) e múltiplos déficits cognitivos de atenção, memória, raciocínio e compreensão verbal, entre outros (BERNAUDIN *et al*, 2000; BROWN *et al*, 2000; DeBAUN, *et al*, 1998). Na maioria dos casos o AVC deixa sequelas, entre essas as mais comumente descritas são, alterações motoras e sensoriais, afasia, dificuldades na orientação espacial e déficits de memória (BOKURA & ROBINSON, 1997; BRADVIK; SONESSON; HOLTAS, 1989).

No modelo de pMCAO, usado neste trabalho, a lesão é observada principalmente no córtex temporal e no corpo estriado. Portanto, danos nessas regiões resultam em uma diminuição da atividade locomotora, conforme indicado por Sheng & Wnag em 2010. Isso destaca a importância de utilizar o teste do campo aberto para verificar a atividade locomotora, esse teste também foi descrito por Kalivas e colaboradores (1988), como sendo um bom parâmetro para a avaliação da função mesocortical.

O estudo de novas drogas que possam ser usadas no tratamento da isquemia cerebral é importante, principalmente, pelo impacto socioeconômico que pode causar ao afetar a população economicamente ativa (BENSENOR *et al*, 2015; OMS, 2021). A fim de abordar novas opções terapêuticas, voltamos nossos estudos aos terpenos encontrados em plantas aromáticas como o timol, que tem mostrado possuir atividades antimicrobiana, antifúngica, antitumoral, além da atividade anti-inflamatória (NAGOOR MEERAN *et al*, 2017; LIANG *et al*, 2014). Boa parte desses terpenos, tem sido usada na medicina tradicional e possui algumas propriedades, incluindo antioxidante, eliminação de radicais livres e anti-inflamatória.

Nourmohammadi e colaboradores (2022), sugerem que o timol exerce efeitos protetores, possivelmente relacionados a um mecanismo anti-oxidação, nesses modelos *in vitro* e *in vivo* da doença de Parkinson. Além disso, já foram observados em outros estudos com doenças neurodegenerativas que o tratamento com o timol diminui a neuroinflamação e apresenta uma neuroproteção, como no estudo prévio de Javed e colaboradores (2019) o qual mostrou que em

um modelo *in vivo* da doença de Parkinson induzida por rotenona, animais tratados com Timol apresentaram uma melhora na neuroinflamação e neuroproteção. Já FangFang e colaboradores (2017), demonstrou que animais tratados com timol apresentavam uma melhora na resistência à insulina. Azizi e colaboradores (2012) trazem resultados *in vitro* do potencial antioxidante do timol, como inibidor do estresse oxidativo em células PC12, corroborando com o uso do timol em pesquisas *in vivo*.

Inicialmente, avaliamos a atividade neurológica (déficits neurológicos sensoriomotores) e observamos que os animais isquemiados apresentaram déficits sensoriomotores. Esses resultados são consistentes com os achados de Zeng e colaboradores (2018), os quais mostraram que ratos submetidos a pMCAO apresentaram escores de déficit neurológico significativamente menores indicando a existência da lesão neuronal e provando o sucesso do modelo de AVC isquêmico do estudo. O tratamento com o timol (administrado por via oral 3h após a cirurgia), foi capaz de proteger, 24 horas após a cirurgia, contra os déficits sensoriomotores induzidos pela pMCAO. Outros terpenóides, como rutaecarpina (YAN et al., 2013), partenolídeo (DONG et al., 2013) e beta-cariofileno (CHANG et al., 2013) mostraram efeitos semelhantes contra danos neuronais e déficits neurológicos, corroborando nossos achados.

Em seguida foi avaliada a capacidade do timol de diminuir a extensão da área isquêmica cerebral foi investigada através da quantificação pelo TTC (GOLDLUST, 1996; TUREYEN, 2004). Os nossos resultados demonstraram que os animais submetidos a pMCAO tiveram um significativo dano isquêmico, particularmente nas áreas do córtex temporal e do estriado, concordando com Longa e colaboradores (1989), que demonstraram um aumento da extensão da área de infarto em animais submetidos à oclusão da artéria cerebral média usando a coloração de TTC. Esse achado entra em concordância com outros autores como, Jiang e colaboradores (2019), Martínez-Torres e colaboradores 2024. Bederson e colaboradores (1986) desenvolveram o protocolo para o uso da técnica de coloração com TTC, demonstrando sua eficácia na detecção e quantificação da extensão da área de infarto 24 horas após uma isquemia cerebral em roedores. Nossos resultados também corroboram com os resultados de Ping e colaboradores (2024), que demonstraram uma área de infarto aumentada em animais submetidos a pMCAO. Esses dados demonstram que a indução da isquemia cerebral através do modelo escolhido foi bem-sucedido. É amplamente aceito que a área de infarto, incluindo o núcleo e a penumbra, alcança seu tamanho máximo entre 6 à 24 horas após o início de uma isquemia cerebral focal permanente (CARMICHAEL, 2005; LIU *et al*, 2011).

O timol, administradas por via oral, foi capaz de diminuir o percentual da área isquêmica. Outros terpenóides mostraram um efeito neuroprotetor, como no trabalho de

Fernandes e colaboradores (2018), onde foi mostrado que o α -Bisabolol, um álcool de sesquiterpeno, retirado da *Matricaria chamomilla*, popularmente conhecida como camomila, da *Vanillosmopsis erythropappa* e da Peperônia, quando administrado nas doses de 100 e 200mg/Kg, 24h antes e 3h após a indução da isquemia, diminuiu os déficits neurológicos e a lesão cerebral isquêmica, por meio da sua atividade antiapoptótica, anti-inflamatória e antioxidante.

A janela terapêutica de 3 horas observada em nossos resultados demonstra a atividade neuroprotetora do timol, destacando-o como um potencial candidato para o desenvolvimento de novos medicamentos no tratamento da isquemia cerebral. Do ponto de vista clínico, após uma lesão cerebral isquêmica, é crucial que o indivíduo chegue rapidamente ao hospital para permanecer dentro da janela terapêutica de 4,5 horas recomendada pela OMS, permitindo a administração do tPA como tratamento atual.

Na avaliação clínica, o diagnóstico do AVC é realizado a partir da história clínica do paciente e de um exame neurológico, que envolve a observação de sinais clínicos característicos, como déficits motores, alterações na marcha e na fala (DAVENPORT; DENNIS, 2000; SILVERMAN *et al.*, 2011). Uma das principais de artérias que fornecem sangue ao córtex cerebral são as artérias cerebrais médias (ACMs) (que possuem a maior distribuição, abrangendo os aspectos laterais e inferiores dos lobos frontal, parietal e temporal) (DUSENBURY & ALEXANDROV, 2020). Segundo Sheng & Wnag (2010), no modelo de oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO), a lesão afeta principalmente o córtex temporal e o corpo estriado. Portanto, danos nessas áreas causam uma diminuição da atividade locomotora.

Nossos resultados demonstraram que os animais submetidos a pMCAO, avaliados, apresentaram déficit motor na exploração vertical (*rearings*). Tais achados são análogos a diversos outros trabalhos como o de Liu e colaboradores (2024). Neste trabalho, o timol apresentou resultados na proteção contra os déficits locomotores na exploração vertical (*rearings*). Shah e colaboradores (2024), mostraram que o carvacrol, um monoterpene fenólico pertencente a mesma família do timol, administrado nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg v.o.), durante 21 dias, melhorou o comprometimento motor em um modelo de DP induzida por Rotenona em camundongos, este achado também pode ser correlacionado ao sinal clínico de declínio cognitivo em ratos que sofrem AVCs, relatado no trabalho de Liu e colaboradores (2024), no qual foi mostrado o envolvimento da degeneração da substância branca após acidente vascular cerebral isquêmico e sua contribuição para o comprometimento cognitivo e demência pós-AVC.

O evento isquêmico pode causar danos ao hipocampo tanto em níveis funcionais quanto estruturais (NIKONENKO *et al*, 2009). O hipocampo é considerado o centro do processo de memória (WAHL *et al*, 1992). O córtex cerebral, a amígdala e o hipocampo (áreas essenciais para o aprendizado e a formação da memória), são inervados por neurônios colinérgicos (BHUTADA *et al*, 2011). É importante prevenir a expansão da área perinfarto, com o intuito de reduzir o dano hipocampal, resultando em melhoria cognitiva (XIE *et al*, 2011).

Observamos que os animais submetidos a pMCAO, apresentavam comprometimento na memória de trabalho ou operacional, o qual já foi mostrado em estudos anteriores que apontaram que a isquemia causa déficits na memória de trabalho avaliado pelo teste do labirinto em Y (Y-maze) 24 e 48 horas após a indução da isquemia (FONTELES *et al*, 2016; FERNANDES *et al*, 2019; CARMO *et al*, 2014). Block e Schwarz (1997) identificaram uma relação entre o dano no hipocampo provocado pelo AVC isquêmico e o comprometimento na aprendizagem operacional. Nossos achados são consistentes com resultados de outros estudos que mostraram déficits nas funções cognitivas em camundongos após isquemia (CARMO *et al*, 2014). O tratamento com o timol, foi capaz de proteger os animais contra esses déficits de memória de trabalho. Diversos terpenóides, demonstraram possuir atividades neuroprotetores, como o carvacrol que apresentou efeito neuroprotetor, contra déficits de memória de trabalho e neurotoxicidade em modelos animais de lesão cerebral traumática (LEE *et al*, 2022), Doença de Parkinson (HADDADI *et al*, 2018; MANOUCHEHRABADI *et al*, 2020), e Doença de Alzheimer (AZIZI *et al*, 2022).

Diversos estudos indicam que a síntese proteica é crucial para a formação da memória de longo prazo (BARONDES 1975; DAVIS & SQUIRE 1984; MATTHIES 1989). Um dos primeiros experimentos a demonstrar isso, foi o experimento de Flexner e colaboradores (1963), no qual foram utilizados camundongos tratados com puromicina, um antibiótico que bloqueia a síntese de proteínas. Uma série de estudos semelhantes seguiu, tornando os efeitos dos inibidores de síntese proteica um campo amplamente estudado na pesquisa sobre memória (DAVIS & SQUIRE, 1984).

Após apenas uma experiência em que são submetidos a um choque nas patas, camundongos com o gene CREB, um fator de transcrição que regula diversas respostas celulares, incluindo proliferação, sobrevivência e diferenciação, intacto conseguem recordar a gaiola em que foram chocados por semanas. Por outro lado, apesar da percepção sensorial normal, a mesma experiência única só consegue desencadear uma memória passageira (inferior a 60 minutos) em camundongos com mutação CREB1 (BOURTCHULADZE *et al*, 1994).

Nesse trabalho, para a avaliação da memória aversiva, foi realizado o teste de esQUIVA

passiva. Esse teste, é amplamente utilizado para estudos bioquímicos e farmacológicos da memória, sendo capaz de gerar memórias de longa duração com apenas um treino (IZQUIERDO *et al*, 2006). Os resultados mostraram que os animais submetidos a pMCAO apresentaram déficits na memória aversiva, corroborando descritos na literatura (YU *et al*, 2018; YANG *et al*, 2015), uma vez que a pMCAO acomete regiões cerebrais como o corpo estriado, que é fundamental para a consolidação da memória, principalmente a de longo prazo (IZQUIERDO, 2018). O timol foi capaz de minimizar esse prejuízo na memória aversiva tardia. Esse resultado pode ser explicado pelo fato do timol, possivelmente ajudar na formação da memória tardia, por estimular a síntese protéica, esse achado está em acordo ao trabalho de Timalina e colaboradores (2023), o timol eleva os níveis de BDNF, em um modelo de DA induzido por injeções de escopolamina, o qual fosforila a GSK-3 β na serina 9 e inativa seus efeitos neurotóxicos na via mediada por PI3K/Akt. Ademais, a regulação positiva mediada por BDNF é promovida pela via do vírus do sarcoma de Rat/Raf (Ras/Raf), ativando a transcrição da proteína de ligação ao elemento de resposta de c-AMP (CREB). O BDNF e fosfo-GSK-3 β (p-GSK-3 β) (Ser 9) regulados positivamente promovem a neurogênese hipocampal adulta e o aprimoramento da aprendizagem/memória. O efeito neuroprotetor do timol na memória também já foi demonstrado na literatura, e foi explicado por sua atividade antioxidante e anti-inflamatória (ASADBEGI *et al*, 2017; BITMEZ *et al*, 2024).

O teste de reconhecimento de objetos foi realizado para avaliar a aquisição e a retenção da memória de reconhecimento de objetos (referência que este teste é usado para este tipo de memória). Os resultados obtidos mostraram que o timol protegeu contra déficits na memória recente e tardia, demonstrando os efeitos neuroprotetores dessa substância. Nossos resultados corroboram com os achados de Bitmez e colaboradores (2024), que demonstraram os efeitos do timol na memória de reconhecimento no modelo de Alzheimer em ratos com aplicação de D-galactose (D-gal) e cloreto de alumínio. Esses efeitos estão relacionados com a redução do estresse oxidativo e de citocinas pró-inflamatórias e o aumento dos níveis de BDNF e p-GSK3 β no hipocampo através da estimulação da neurogênese (BITMEZ *et al*, 2024).

Quando falamos em estresse oxidativo a nível cerebral, é importante levar em consideração que os neurônios são células extremamente vulneráveis a danos oxidativos, o que pode ser atribuído a várias características: eles consomem grandes quantidades de oxigênio, possuem muitas mitocôndrias, têm baixa atividade de enzimas antioxidantes, apresentam alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) em suas membranas, acumulam metais de transição, possuem limitada capacidade de regeneração celular e estão próximos de células microgliais que liberam espécies reativas de oxigênio, dentre outros aspectos

(KARPINSKA & GROMADZKA, 2013; DELGADO-MARÍN; SÁNCHEZ-BORZONE; GARCÍA, 2017).

Vários estudos têm destacado o aumento dos níveis de TBARS após pMCAO como indicativos de estresse oxidativo (JUNG *et al*, 2017; SADEGHNIA *et al*, 2017). Na avaliação dos níveis de MDA no córtex temporal, estriado e hipocampo, os animais isquemiados apresentaram um aumento significativo nas concentrações de MDA nessas áreas. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com o timol promoveu a diminuição de malonaldeído, tanto no estriado como no hipocampo dos animais, por meio da redução dos níveis de TBARS. Porém o tratamento com o timol não mostrou diferença no córtex temporal.

Bora e colaboradores (2011), isolaram os terpenóides linalol e eugenol de folhas de *Ocimum basilicum*, em danos cerebrais causados por isquemia/reperfusão (I/R). Observaram que o extrato diminuiu significativamente os níveis de TBARS e recuperou os níveis de GSH, apresentando assim um possível resultado favorável para a prevenção de acidentes vasculares cerebrais (BORA; ARORA; SHRI, 2011). Trabalhos demonstram que o timol diminui os níveis de MDA em modelos de neurotoxicidade em ratos, além de aumentar os níveis de GSH, SOD e catalase no tecido cerebral (NAGOOR MEERAN *et al*, 2017; ASADBEGI *et al*, 2018).

Após episódios de hipóxia, verifica-se um aumento acelerado nos níveis intracelulares de cálcio que, por sua vez, ativa a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) com a participação da proteína quinase C e da quinase dependente de calmodulina (CDK). Esta ativação da nNOS conduz à produção de óxido nítrico (NO). Em concentrações elevadas, o NO pode danificar células neuronais formando o ânion peroxinitrito, uma vez combinado com o ânion superóxido (BHATTACHARYA *et al*, 2013). Esta molécula é extremamente tóxica e pode danificar proteínas, lipídios de membrana e DNA. De forma indireta, a produção de NO pode ser avaliada através da dosagem de seu metabólito, o nitrito.

Nosso trabalho demonstrou que, a pMCAO promoveu um aumento de nitrito no córtex temporal e no hipocampo dos animais 24h após a cirurgia. Esse resultado, corrobora com os achados de Pravalika e colaboradores (2019), que notaram um aumento nos níveis de nitrito 24 horas após a oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO). Ao tratarmos os animais com o timol, observamos uma diminuição nos níveis de nitrito no córtex temporal e hipocampo. Fernandes e colaboradores (2019), que mostraram que o tratamento com o monoterpeneo α -bisabolol impede o aumento dos níveis de nitrito no modelo de pMCAO. Assim, o efeito antioxidante do timol, pode contribuir para o seu efeito neuroprotetor contra danos induzidos por pMCAO, prevenindo o aumento de espécies reativas de oxigênio no tecido cerebral.

No nosso trabalho, também foi investigado o conteúdo tiólico total, o qual tem sido amplamente utilizado como um marcador detectável de oxidação de proteínas juntamente com os níveis de carbonilas e de nitrotirosinas (AKSENOV E MARKESBERY, 2001; DJORDJEVIC *et al*, 2017). Primeiramente foi demonstrado que há uma redução do conteúdo tiólico total no estriado dos animais submetido a pMCAO. Essa redução pode ser uma consequência do aumento de radicais livres e espécies reativas causadas pelo pMCAO. Essa diminuição do conteúdo tiólico total pode refletir a oxidação de moléculas de cisteínas, os resíduos de aminoácidos contendo sulfidril (SH) nas proteínas, as quais são alvos suscetíveis a uma variedade de pró-oxidantes nitrotirosinas (AKSENOV & MARKESBERY, 2001; DJORDJEVIC *et al*, 2017). Dessa forma, essa redução do conteúdo tiólico total está diretamente associado a oxidação de proteínas, as quais, por consequência dessa oxidação, acabam perdendo a sua função biológica normal e assim contribuem para o dano cerebral causada pelo pMCAO. O tratamento com timol foi capaz de aumentar os níveis de conteúdo tiólico total.

Estudos mostram que o aumento da atividade da AChE no cérebro está ligado a distúrbios neurológicos e perda de memória devido à degradação acelerada do ACh (MACHADO *et al*, 2016; MACIEL *et al*, 2017), um neurotransmissor crucial para a memória e o aprendizado (HASSELMO, 2006) e que está diminuída em pacientes com DA devido a neurodegeneração em áreas colinérgicas, como o núcleo basal de Meynert (SHU *et al.*, 2018; KAUNDAL *et al*, 2018). No nosso estudo foi observado que a pMCAO aumenta a atividade da acetilcolinesterase (AChE) nos córtices frontal, parietal e occipital, e que o timol foi capaz de diminuir este aumento. Esse resultado, pode explicar a melhora cognitiva apresentada pelo timol no estudo. Em um estudo feito por Sahoo e colaboradores (2021), foi visto que compostos sintéticos derivados do timol e do carvacrol, contendo carbamato, apresentaram uma excelente atividade de inibição da acetilconesterase. Alguns desses compostos sintéticos apresentaram uma inibição com o valor IC50 de 2,50 μ M, superior a inibição do padrão Rivastigmina, um conhecido inibidor anticolinesterásico derivado de carbamato.

Optamos por inserir áreas que não são diretamente afetadas pela pMCAO na avaliação da atividade da AChE, devido a observação de resultados conflitantes na literatura, com relação ao aumento da atividade da AChE durante eventos isquêmicos permanentes ou transitórios (SÁEZ-VALERO; GONZÁLEZ-GARCÍA; CEÑA, 2003).

Foi demonstrado em alguns trabalhos, que a atividade da AChE pode estar inibida em animais submetidos a pMCAO, como no trabalho de Sáez-Valero e colaboradores (2003), a atividade da AChE se mostrou diminuída na região cortical de ratos submetidos a pMCAO.

Resultados semelhantes foram demonstrados por Malatova & Marsala (1993) e Mrsulja e colaboradores (1978).

Entretanto, há trabalhos que mostram uma atividade da enzima AChE aumentada, como os trabalhos de Malatova e colaboradores (1984) e Ott *et al.*, (1975) que mostraram resultados onde a atividade da AChE estava aumentada em animais submetidos a modelos de isquemia.

Também há na literatura, estudos que não apresentaram diferenças significativas entre animais controles e isquemiados (GOLDBERG *et al.*, 1985).

Nosso estudo também mostra evidências conflitantes ao analisarmos amostras de áreas cerebrais diretamente afetadas pela isquemia, como córtex temporal e estriado, nos quais observamos a inibição da atividade da AChE. Esses achados, condizem com os trabalhos citados anteriormente.

Desse modo, é possível inferir que os eventos moleculares subjacentes à alteração na atividade da AChE induzida pela isquemia podem ser influenciados pelo modelo animal experimental utilizado, pela reversibilidade ou permanência da oclusão e pela gravidade da isquemia no tecido investigado. Contudo, mesmo com todas as diferenças nos resultados, todos esses estudos sugerem que a expressão da AChE pode ser regulada durante e após a lesão isquêmica.

O trabalho de Sáez e colaboradores (2003) mostrou mudanças na proporção das isoformas de AChE durante a isquemia, possivelmente devido ao desequilíbrio entre a perda deletéria e respostas adaptativas de plasticidade neuronal e o processo de diferenciação celular. Isso mostra que, as diferentes isoformas da AChE podem influenciar numa reorganização celular.

Como já foi dito anteriormente a pMCAO ocasiona uma reação inflamatória com um papel importante da micróglia na liberação de citocinas pró-inflamatórias (TIMALSINA *et al.*, 2023). Trabalhos mostram que a atividade da AChE pode influenciar na ativação da microglia. Esta hipótese é sustentada por estudos anteriores indicando que em culturas de células microgliais, a AChE induz alterações na morfologia celular e promove a regulação positiva da iNOS (VON BERNHARDI *et al.*, 2003). Além disso, uma pesquisa revelou que o aumento da atividade da AChE intensificou a ativação microglial e os níveis de mRNA para HMGB1, uma citocina que pode ser liberada de maneira passiva por células necróticas ou ativamente por células imunologicamente ativadas, desencadeando processos inflamatórios (WANG *et al.*, 1999; ABRAHAM *et al.*, 2000). Devido a relação da atividade da AChE com a ativação microglial, fica evidente a ação antiinflamatória do timol, por atuar como um inibidor da enzima AChE.

Quanto a degeneração neuronal, nossos resultados mostraram que o grupo pMCAO, teve uma redução no número de células Nissl positivas nas regiões do estriado e hipocampo (CA1, CA3 e GD), demonstrando morte neuronal na região do core isquêmico. Os grupos tratados com o timol apresentaram uma redução nas taxas de morte celular no hipocampo (regiões: CA1, CA3 e GD) e no estriado, comprovando assim, o efeito neuroprotetor do timol. No estudo de Timalina e colaboradores (2023), o tratamento com timol aumentou a espessura da zona granular no giro dentado, usando a coloração de hematoxilina e eosina, em um modelo de DA induzido por escopolamina, e relacionou esse achado com o aumento da neurogênese adulta e melhora de aprendizado e memória observados nos animais.

Neste trabalho, foi demonstrado que camundongos submetidos à isquemia focal permanente (pMCAO) apresentaram déficits na função neurológica e déficits na memória, provavelmente, devido a lesões no hipocampo, estriado e córtex, provocados pelo modelo. Os nossos resultados em conjunto demonstram a capacidade neuroprotetora e de neuroresgate do timol frente a isquemia cerebral focal permanente, visto que sua administração foi realizada com uma janela de 2hs após a indução de pMCAO. Foi investigado o mecanismo neuroprotetor do timol e observou-se atividade antioxidante, além da capacidade inibitória da enzima AChE o que se pode inferir que o efeito neuroprotetor dá-se, por meio destes mecanismos.

A partir desses achados, é possível afirmar que este composto tem potencial para se tornar uma nova terapia complementar para acidente vascular cerebral (AVC), uma vez que atua em diversos aspectos da fisiopatologia da isquemia cerebral. Sendo uma substância de baixa toxicidade e comum em vegetais, ela é adequada para testes em humanos. Segundo Fernandes (2017), o timol oferece baixos riscos de toxicidade, apresenta efeitos antidepressivos e propriedades antioxidantes e um possível efeito neuroprotetor em um estudo da toxicidade pré-clínica, decidimos investigar o mecanismo do efeito neuroprotetor do timol no modelo de isquemia cerebral focal permanente *in vivo*.

Entretanto algumas considerações precisam ser levantadas, em nosso estudo, houve limitações por não ter sido investigado as vias de sinalização inflamatória e vias de aumento do BDNF. Assim, no futuro, seria interessante verificar as lacunas que precisam ser preenchidas para uma compreensão mais profunda dos benefícios neuroprotetores do timol e estabelecer os mecanismos de ação específicos do timol na cascata isquêmica, além de sua atividade antioxidante, anti-inflamatória e de inibição da AChE.

7 CONCLUSÃO

- O timol nas doses de 25 e 50mg/Kg diminuiu os déficits sensoriais-motores, a área de infarto isquêmico e a perda neuronal ocasionados pelo modelo de isquemia cerebral focal permanente por oclusão da artéria cerebral média (pMCAO).

- O timol protegeu os camundongos contra os déficits de memória de trabalho, de memória aversiva e de memória de reconhecimento.

- O mecanismo de neuroproteção do timol está relacionado, com a sua capacidade antioxidante pela diminuição nos níveis de TBARS e Nitrito/Nitrato. Outro dado que corrobora com essa relação é que, o tratamento com o timol na maior dose foi capaz de aumentar a concentração do conteúdo tiólico total no córtex total e no corpo estriado dos animais.

- Em amostras de córtex não atingidas diretamente pela isquemia (córtex parietal, frontal e occipital), o aumento na atividade da acetilcolinesterase foi inibida pelo tratamento com timol na dose de 50 mg/Kg, o que pode estar relacionada com a melhora nos déficits de memória. Porém, nas áreas do córtex temporal, estriado e hipocampo, área diretamente atingidas pela isquemia, houve um aumento da atividade da enzima nos animais, sem efeito significativo do timol no estriado e no hipocampo.

- O tratamento com timol nas doses de 25 e 50 mg/Kg, aumentou a viabilidade celular no estriado e no hipocampo (regiões CA1, CA3 e giro denteado).

Assim, nossos resultados indicam que o timol pode proteger contra os efeitos deletérios da isquemia cerebral através de diversas vias, entre elas estão a prevenção do estresse oxidativo e melhora da neurotransmissão colinérgica, mas outras vias não podem ser excluídas como a atividade anti-inflamatória. Esses achados sugerem que o timol pode ser um potencial agente terapêutico adjuvante no tratamento da isquemia cerebral.

REFERÊNCIAS

- ABOELWAFI, H.R.; YOUSEF, H.N. The ameliorative effect of thymol against hydrocortisone-induced hepatic oxidative stress injury in adult male rats. **Biochemistry and Cell Biology**, v.93, n. 4, p. 282-9, 2015.
- ABRAMCZUK, B.; VILLELA, E. A luta contra o AVC no Brasil. **Com Ciência**, n. 109, p. 0-0, 2009.
- AKSENOV, M.Y.; MARKESBERY, W.R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letter**, v.302, n. 2-3, p.141-5, 2001.
- ANDRABI, S.A.; KANG, H.C.; HAINCE, J.F.; LEE, Y.I.; ZHANG, J.; CHI, Z.; WEST, A.B.; KOEHLER, R.C.; POIRIER, G.G.; DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L. Iduna protects the brain from glutamate excitotoxicity and stroke by interfering with poly (ADP-ribose) polymer-induced cell death. **Nature Medicine**, v.17, n.6, p.692-9, 2011.
- ASADBEGI, M.; YAGHMAEI, P.; SALEHI, I.; KOMAKI, A.; EBRAHIM-HABIBI, A. Investigation of thymol effect on learning and memory impairment induced by intrahippocampal injection of amyloid beta peptide in high fat diet- fed rats. **Metabolic Brain Disease**, v.32, n. 3, p.827–839, 2017.
- AZIZI, Z.; EBRAHIMI, S.; SAADATFAR, E.; KAMALINEJAD, M.; MAJLESSI, N. Cognitive-enhancing activity of thymol and carvacrol in two rat models of dementia. **Behavioural Pharmacology**, v.23, n.3, p.241-9, 2012.
- AZIZI, Z.; MAJLESSI, N.; CHOOPANI, S.; NAGHDI, N. Efeitos neuroprotetores do carvacrol contra a doença de Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas: uma revisão. **Avicena J. Fitomedicina**.12 :371–387. 2022.
- BACK, T. Pathophysiology of the ischemic penumbra--revision of a concept. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v.18, n.6, p.621-38, 1998.
- BADHIWALA, J.H.; NASSIRI, F.; ALHAZZANI, W.; SELIM, M.H., FARROKHYAR, F.; SPEARS, J.; KULKARNI, A.V.; SINGH, S.; ALQAHTANI, A.; ROCHWERG, B.; ALSHAHRANI, M.; MURTY, N.K.; ALHAZZANI, A.; YARASCAVITCH, B.; REDDDY, K.; ZAIDAT, O.O.; ALMENAWE, S.A. Endovascular Thrombectomy for Acute Ischemic Stroke: A Meta-analysis. **JAMA**, v. 314, n. 17, p. 1832-1843, 2015.
- BALKIS, A.; TRAN, K.; LEE, Y.Z.; NG, K. Screening Flavonoids for Inhibition of Acetylcholinesterase Identified Baicalein as the Most Potent Inhibitor. **J. Agric. Sci.** **2015**, 7, 26
- BATTLE CE, ABDUL-RAHIM AH, SHENKIN SD, HEWITT J, QUINN TJ. Cholinesterase inhibitors for vascular dementia and other vascular cognitive impairments: a network meta-analysis. **Cochrane Database Syst Rev.** 2021; 2(2):13306.
- BENARROCH, E. E. NMDA receptors: recent insights and clinical correlations. **Neurology**, v. 76, p. 1750-1757, 2011.
- 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. **Journal of Neurochemistry**, v. 43, p. 1369-1374, 1984.
- BENSENOR, I. M.; GOULART, A.C.; SZWARCOWALD, C.L.; VIEIRA, M.L.F.P.; MALTA, D.C.; LOTUFO, P.A. Prevalência de acidente vascular cerebral e de incapacidade associada no

Brasil: Pesquisa Nacional de Saúde – 2013. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 73, n. 9, p. 746-750, 2015.

BERNAUDIN, F.; VERLHAC, S.; FREARD, F.; ROUDOT-THORAVALL, F.; BENKERROU, M.; THURET, I.; MARDINI, R.; VANNIER, J.P.; PLOIX, E.; ROMERO, M.; Multicenter prospective study of children with sickle cell disease: Radiographic and psychometric correlation. **Journal of Child Neurology**, v.15, p.333-343, 2000.

BITMEZ, B.; ÇEVRELI, B.; KAŞIKÇI, E. Effect of thymol on oxidative stress and reelin signaling pathway in Alzheimer's disease model. **Turkish Journal of Biology**, v.48, n.1, p.70-79, 2024.

BHATTACHARYA, P.; PANDEY, A.K.; PAUL, S.; PATNAIK, R.; YAVAGAL, D.R. Aquaporin-4 inhibition mediates piroxicam-induced neuroprotection against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rodents. **PLoS One**, v.2013, e73481, 2013.

BHUIYAN, M.; KIM, J.C.; HWANG, S.N.; LEE, M.Y.; KIM, S. Ischemic tolerance is associated with VEGF-C and VEGFR-3 signaling in the mouse hippocampus. **Neuroscience**, v.290, p.90-102, 2015.

BOKURA, H.; ROBINSON, R.G. Long-term cognitive impairment associated with caudate stroke. **Stroke**, v.28, p.970-975, 1997.

BORA, K.S.; ARORA, S.; SHRI, R. Role of *Ocimum basilicum* L. in prevention of ischemia and reperfusion-induced cerebral damage, and motor dysfunctions in mice brain. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, n. 3, p.1360-1365, 2011.

BRADVIK, B.; SONESSON, B.; HOLTAS, S. Spatial impairment following right hemisphere transient ischaemic attacks in patients without carotid artery stenosis. **Acta Neurologica Scandinavica**, v.80, n.5, p.411-418, 1989.

BRASIL. Ministério da Saúde. Monografia do alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*). 2014.

BRAZ, A.I.D.; ARAÚJO, S.T.; PEREIRA, M.B.; MENDONÇA, F.A. da C.; RABÊLO, D.R.V.; MACÊDO, A.L.C.A.; GUIMARÃES, M.P.G.; MEDEIROS, M.S. Tendências de hospitalizações por acidente vascular cerebral no Ceará 2009-2020. **Research, Society and Development**, v.11, n.8, e11611830819, 2022.

BROUNS, R.; DE DEYNA, P.P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v.111, n.3, p.483–495, 2009.

BROWN, R.T.; DAVIS, P.C.; LAMBERT, R.; HSU, L.; HOPKINS, K.; ECKMAN, J. Neurocognitive functioning and magnetic resonance imaging in children with sickle cell disease. **Journal of Pediatric Psychology**, v.25, n.7, p.503-513, 2000.

BRUNING, M.C.R.; MOSEGUI, G.B.G.; VIANNA, C.M.M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu - Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.17, n.10, p.2675–2685, 2012.

BUCHMAN, A.S.; YU, L.; BOYLE, P.A.; LEVINE, S.R.; NAG, S.; SCHNEIDER, J.A.; BENNETT, D.A. Microvascular brain pathology and late-life motor impairment. **Neurology**, v.80, p.712-718, 2013.

BHUTADA, P.; MUNDHADA, Y.; BANSOD, K.; TAWARI, S.; PATIL, S.; DIXIT, P.; MUNDHADA, D. A proteção do sistema colinérgico e antioxidante contribui para o efeito da berberina na melhora da disfunção da memória em modelo de rato com diabetes induzido por estreptozotocina. **Pesquisa**

comportamental do cérebro, v.220, n.1, p.30-41, 2011.

CANEVELLI M, ADALI N, KELAIDITI E, CANTET C, OUSSET PJ, CESARI M. Effects of Gingko biloba supplementation in Alzheimer's disease patients receiving cholinesterase inhibitors: data from the ICTUS study. **Phytomedicine**. 2014; 21:888–92.

CAPLAN, L.R. AVC: Etiologia, classificação e epidemiologia. UpToDate, 2022. Disponível em: https://med.estrategia.com/portal/conteudos_gratis/doencas/resumo-de-derrame-cerebral-conceito-quadro-clinico-e-mais/. Acesso em: 20 maio de 2024.

CARMO, M.R.S., SIMÕES, A.P., FONTELES, A.A., SOUZA, C.M., CUNHA, R.A., ANDRADE, G.M. ATP P2Y1 receptors control cognitive deficits and neurotoxicity but not glial modifications induced by brain ischemia in mice. **European Journal of Neurosciense**, v.39, p.614–622, 2014.

CAROTA, A.; BOGOUSSLAVSKY, J. Transtornos de humor após acidente vascular cerebral. **Fronteiras da Neurologia e da Neurociência**, v.30, n.1, p.70–74, 2012.

CASAS, A.I.; NOGALES, C.; MUCKE, H.A.M.; PETRAINA, A.; CUADRADO, A.; ROJO, A.I.; GHEZZI, P.; JAQUET, V.; AUGSBURGER, F.; DUFRASNE, F.; SOUBHYE, J.; DESHWAL, S.; DI SANTE, M.; KALUDERCIC, N.; DI LISA, F.; SCHMIDT, H.H.H.W. On the Clinical Pharmacology of Reactive Oxygen Species. **Pharmacological Reviews**, v.72, n.3, p.801–828, 2020.

CASTILHO, R.F.; HANSSON, O.; WARD, M.W.; BUDD, S.L.; NICHOLLS, D.G. Mitochondrial control of acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. **Journal of Neurosciense**, v.18, n.24, p.10277–10286, 1998.

CEREBRAL, Acidente Vascular. Acidente Vascular Cerebral. **História do Acidente Vascular Cerebral**, 2019. Disponível em: <https://acidentevascularcerebral.com/historia-do-acidente-vascular-cerebral#:~:text=Foi%20Hip%C3%B3crates%20quem%20descreveu%20pela,na%20antiga%20Mesoopot%C3%A2mia%20e%20P%C3%A9rsia>. Acesso em: 06 abr. 2024.

CHAMORRO, Á.; MEISEL, A.; PLANAS, A.M.; URRÁ, X.; VAN DE BEEK, D.; VELTKAMP, R. The immunology of acute stroke. **Nature Reviews Neurology**, v.8, n.7, p.401–410, 2012.

CHANG, J.I.; TSIVGOULIS, G.; KATSANOS, A.H.; MALKOFF, M.D.; ALEXANDROV, A.V. Diagnostic accuracy of transcranial doppler for brain death confirmation: systematic review and meta-analysis. **American Journal of Neuroradiology**, v.37, n.3, p.408–414, 2016.

CHANG, H.J., KIM, J.M., LEE, J.C., KIM, W.K., CHUN, H.S. Protective Effect of β - Caryophyllene, a Natural Bicyclic Sesquiterpene, Against Cerebral Ischemic Injury. **J. Med. Food** 16, 471–480. 2013.

CHO, K.O.; KIM, S.K.; CHO, Y.J.; SUNG, K.W.; KIM, S.Y. Regional differences in the neuroprotective effect of minocycline in a mouse model of global forebrain ischemia. **Life Science**, v.80, n.22, p.2030–2035, 2007.

CLAUS, H.L.; WALBERER, M.; SIMARD, M.L.; EMIG, B.; MUESKEN, S.M.; RUEGER, M.A.; FINK, G.R.; SCHROETER, M. NG2 and NG2-positive cells delineate focal cerebral infarct demarcation in rats. **Neuropathology**, v.33, p.30e38, 2013.

COCHEMÉ, H.; MURPHY, M. Can antioxidants be effective therapeutics? **Current opinion in investigational drugs**, v.11, n.4, p.426–431, 2010.

CORBETT, D.; NURSE, S. The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. **Progress in Neurobiology**, v.54, n.5, p.531-548, 1998.

- COSTA, A.S. Sustentabilidade da produção de Alecrim-Pimenta (*Lippia sidoides* Cham.): micropropagação visando a conservação *in vitro*. 2006. 56 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) - Núcleo de Pesquisa e Pós-Graduação e Estudos em Recursos Naturais.
- DAVIS, S.M.; PENNYPACKER, K.R. Targeting antioxidant enzyme expression as a therapeutic strategy for ischemic stroke. **Neurochemistry International**, v.107, n.1, p.23-32, 2017.
- DEBAUN, M.R.; SCHATZ, J.; SIEGEL, M.J.; KOPY, M.; CRAFT, S.; RESAR, L.; CHU, J.Y.; LAUNIUS, G.; DADASH-ZADEH, M.; LEE, R.B.; NOETZEL, M. Cognitive screening examinations for silent cerebral infarcts in sickle cell disease. **Neurology**, v.50, n.6, p.1678-1682, 1998.
- DELGADO-MARÍN, L.; SÁNCHEZ-BORZONE, M.; GARCÍA, D.A. Neuroprotective effects of gabaergic phenols correlated with their pharmacological and antioxidant properties. **Life Sciences**, v.175, n.1, p.11–15, 2017.
- DENG, X.Y.; LI, H.Y.; CHEN, J.J.; LI, R.P.; QU, R.; FU, Q.; MA, S.P. Thymol produces an antidepressant-like effect in a chronic unpredictable mild stress model of depression in mice. **Behavioural Brain Research**, v.291, n.1, p.12–19, 2015.
- DIXON, S.J.; PRATT, D.A. Ferroptosis: a flexible constellation of related biochemical mechanisms. **Molecular Cell**, v.83, n.7, p.1030–1042, 2023.
- DHANASEKARAN, S.; PERUMAL, P.; PALAYAN, M. In-Vitro Screening for Acetylcholinesterase Enzyme Inhibition Potential and Antioxidant Activity of Extracts of *Ipomoea Aquatica* Forsk: Therapeutic Lead for Alzheimer's Disease. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2015**, 5, 012–016. [CrossRef]
- DOYLE, K.P.; SIMON, R.P.; STENZEL-POORE, M.P. Mechanisms of ischemic brain damage. **Neuropharmacology**, v.55, n.3, p.310–318, 2008.
- DURUKAN, A.; TATLISUMAK, T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.87, n.1, p.179–197, 2007.
- DUSENBURY, W.; ALEXANDROV, A. W. Clinical Localization of Stroke. **In Critical Care Nursing Clinics of North America**, v. 32, n.1, p.1-19, 2020.
- ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V, Jr.; FEATHER-STONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v.7, n.2, p.88–95, 1961.
- ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v.31, n.1, p.47–59, 1988.
- FANGFANG, LI, H.; QIN, T.; LI, M.; MA, S. Thymol improves high-fat diet-induced cognitive deficits in mice via ameliorating brain insulin resistance and upregulating NRF2/HO-1 pathway. **Metabolic Brain Disease**, v.32, n.2, p.385–393, 2017.
- GBD 2019 Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **Lancet Neurology**, v. 20, n. 10, p. 795-820, 2021
- FANG, Q.; HU, W.W.; WANG, X.F.; YANG, Y.; LOU, G.D.; JIN, M.M.; YAN, H.J.; ZENG, W.Z.; SHEN, Y.; ZHANG, S.H.; XU, T.L.; CHEN, Z. Histamine up-regulates astrocytic glutamate transporter 1 and protects neurons against ischemic injury. **Neuropharmacology**, v.77, n.1, p.156–166, 2014.

- FEHSKE CJ, LEUNER K, MÜLLER WE. Ginkgo biloba extract (EGb761) influences monoaminergic neurotransmission via inhibition of NE uptake, but not MAO activity after chronic treatment. **Pharmacol Res.** 2009; 60:68–73.
- FERNANDES, M.L. Investigação da toxicidade pré-clínica e possíveis mecanismos de ação central do timol em camundongos: estudos neuroquímicos e participação do estresse oxidativo. Doutorado em Farmacologia – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.
- FERNANDES, M.Y.D.; CARMO, M.R.S.D.; FONTELES, A.A.; NEVES, J.C.S.; SILVA, A.T.A.D.; PEREIRA, J.F.; FERREIRA, E.O.; LIMA, N.M.R.; NEVES, K.R.T.; ANDRADE, G.M. (-)- α -bisabolol prevents neuronal damage and memory deficits through reduction of proinflammatory markers induced by permanent focal cerebral ischemia in mice. *European Journal of Pharmacology*, v.5, n.842, p.270-280, 2019.
- FERREIRA, J.; SANTOS, S.; PEREIRA, H. In vitro Screening for Acetylcholinesterase Inhibition and Antioxidant Activity of Quercus Suber Cork and Corkback Extracts. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2020**, 2020, 3825629.
- FITZPATRICK AL, KULLER LH, LOPEZ OL, KAWAS CH, JAGUST W. Survival following dementia onset: Alzheimer’s disease and vascular dementia. *J Neurol Sci.* 2005;229–230:43–9.
- FLIER WMV, SKOOG I, SCHNEIDER JA, PANTONI L, MOK V, CHEN CL, et al. Vascular cognitive impairment. *Nat Rev Dis Primers.* 2018; 15:18003.
- FONTELES, A.A.; DE SOUZA, C.M.; DE SOUSA NEVES, J.C.; MENEZES, A.P.; SANTOS DO CARMO, M.R.; FERNANDES, F.D.; DE ARAÚJO, P.R.; DE ANDRADE, G.M. Rosmarinic acid prevents against memory deficits in ischemic mice. *Behav Brain Res.*, v. 15, n. 297, p. 91-103, 2016.
- FRANKE, M.; BIEBER, M.; KRAFT, P.; WEBER, A.N.R.; STOLL, G.; SCHUHMANN, M.K. The NLRP3 inflammasome drives inflammation in ischemia/reperfusion injury after transient Middle cerebral artery occlusion in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.92, n.1, p.223–233, 2020.
- FUJIKAWA, D.G. The role of excitotoxic programmed necrosis in acute brain injury. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v.13, n.1., p.212-221, 2015.
- FURUKAWA, K.; FU, W.; LI, Y.; WITKE, W.; KWIATKOWSKI, D.J.; MATTSON, M.P. The actin severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. **The Journal of Neuroscience**, v.17, n.21, p.8178–8186, 1997.
- GARCIA, J.G.; WAGNER, S.; LIU, K.F.; HU, X.J. Neurological Deficit and Extent of Neuronal Necrosis Attributable to Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. **Stroke**, v.26, n.4, p.627-635, 1995.
- GARCÍA-ALBERCA, J. M., MENDOZA, S., & GRIS, E. (2022). Benefits of Treatment with Ginkgo Biloba Extract EGb 761 Alone or Combined with Acetylcholinesterase Inhibitors in Vascular Dementia. *Clinical drug investigation*, 42(5), 391–402. <https://doi.org/10.1007/s40261-022-01136-8>.
- GINSBERG, M.D. The new language of cerebral ischemia. **American Journal of Neuroradiology**, v.18, n.8, p.1435-1445, 1997.
- GIOVANNETTI, A.; PIERDOMINICI, M.; DI IORIO, A.; CIANCI, R.; MURDACA, G.; PUPPO, F.; PANDOLFI, F.; PAGANELLI, R. Apoptosis in the homeostasis of the immune system and in human immune mediated diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v.14, n.3, p.253–268, 2008.
- GOLDBERG, W. J.; DORMAN, R. V.; DABROWIECKI, Z.; HORROCKS, L. A. The effects of

ischemia and CDPamines on Na⁺, K⁺-ATPase and acetylcholinesterase activities in rat brain, **Neurochem. Pathol.** 3 (1985) 237–248.

GOLD, P.E. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. **Behavioral and Neural Biology**, v.46, n.1, p.87–98, 1986.

GOLDLUST, E.J.; PACZYNSKI, R.P.; HE, Y.Y.; HSU, C.Y.; GOLDBERG, M.P. Automated measurement of infarct size with scanned images of triphenyltetrazolium chloridestained rat brains. **Stroke**, v.27, n.9, p.1657–1662, 1996.

GREEN, J.D. The hippocampus, **Physiological Reviews**, v.44, p.561–608, 1964.

HACKETT, M.L., KÖHLER, S., O'BRIEN, J.T., MEAD, G.E. Resultados neuropsiquiátricos do acidente vascular cerebral. *A Lanceta. Neurologia*, v.13, p.525–534, 2014.

HADDADI H., RAJAEI Z., ALAEI H., SHAHIDANI S. O tratamento crônico com carvacrol melhora a memória de evitação passiva em um modelo de rato da doença de Parkinson. **Arq. De Neuro-Psiquiatr.** 76 :71–77. doi: 10.1590/0004-282x20170193. 2018

HAILER, N.P. Immunosuppression after traumatic or ischemic CNS damage: it is neuroprotective and illuminates the role of microglial cells. **Progress in Neurobiology**, v.84, n.3, p.211–233, 2008.

HALL, C.; BALLACHEY, E.L. A study of the rat's behavior in a field: a contribution to method in comparative psychology. **University of California Publications in Psychology**, v.6, n.1, p.1–12, 1932.

HARUTYUNYAN, G.; AVITSIAN, R. Revisiting Ischemia After Brain Injury: Oxygen May Not Be the Only Problem. **Journal of Neurosurgical Anesthesiology**, v.32, n.1, p.5-8, 2020

HOGAN, A.M.; KIRKHAM, F.J.; PRENGLER, M.; TELFER, P.; LANE, R.; VARGHA-KHADEM, F.; HAAN, M. Na exploratory study of physiological correlates of neurodevelopmental delay in infants with sickle cell anaemia. **British Journal of Haematology**, v.132, n.1, p99-107, 2006.

HOMI, H. M. et al. Sociedade Brasileira de. **Anestesiologia Rev Bras Anesthesiol**, v. 50, n. 5, p. 405–414, 2000.

HONDA, H.M.; KORGE, P.; WEISS, J.N. Mitochondria and ischemia/ reperfusion injury. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1047, p.1, p.248–258, 2005.

HOWELLS, D.W.; PORRITT, M.J.; REWELL, S.S.; O'COLLINS, V.; SENA, E.S.; VAN DER WERP, H.B.; TRAYSTMAN, R.J.; MACLEOD, M.R. Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.30, n.8, p.1421-31, 2010.

HU, X.; LEAK, R.K.; SHI, Y.; SUENAGA, J.; GAO, Y.; ZHENG, P.; CHEN, J. Microglial and macrophage polarization-new prospects for brain repair. **Nature Reviews Neurology**, v. 11, n.1, p. 56-64, 2015.

HUANG, X.; HE, D.; PAN, Z.; DENG, J. Reactive-oxygen-species-scavenging nanomaterials for resolving inflammation. *Mater. Materials Today Bio*, v.11. n.1, p.100124, 2021.

HUSSAIN A, LEE M, RANA J, VIRANI SS. Epidemiology and risk factors for stroke in young individuals: implications for prevention. *Curr Opin Cardiol*. 2021 Sep 1;36(5):565-571. doi: 10.1097/HCO.0000000000000894. PMID: 34397463.

- ISLAM, A.; CHOUDHURY, M.E.; KIGAMI, Y.; UTSUNOMIYA, R.; MATSUMOTO, S.; WATANABE, H.; KUMON, Y.; KUNIEDA, T.; YANO, H.; TANAKA, J. Sustained anti-inflammatory effects of TGF- β 1 on microglia/macrophages. **Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Basis of Disease**, v. 1864, n.3, p. 721-734, 2018
- IZQUIERDO, I.; DIAS, R.D. Effect of ACTH, epinephrine, β -endorphin, naloxone, and of the combination of naloxone or β -endorphin with ACTH or epinephrine on memory consolidation. **Psychoneuroendocrinology**, v.8, n.1, p.81–87, 1983.
- IZQUIERDO, I. Memórias (ARTMED, Ed.; 3a EDIÇÃO), 2018.
- JAUCH, C.E., SALVADOR, J.L., ADAMS, H.P., Jr., BRUNO, A., CONNORS, J.J., DEMAE RSCHALK, BM., KHATRI, P., MCMULLAN, PW, Jr., QURESHI, AI., ROSENFELD, K., e outros. Diretrizes para o manejo precoce de pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico agudo: uma diretriz para profissionais de saúde da American Heart Association/American Stroke Association. *Acidente vascular cerebral 2013*, 44, 870–947.
- JAVED, H.; AZIMULLAH, S.; MEERAN, M.F.N.; ANSARI, S.A.; OJHA, S. Neuroprotective Effects of Thymol, a Dietary Monoterpene Against Dopaminergic Neurodegeneration in Rotenone-Induced Rat Model of Parkinson's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, n.7, p.1538, 2019.
- JIN, W.N.; SHI, S.X.; LI, Z.; LI, M.; WOOD, K.; GONZALES, R.J.; LIU, Q. Depletion of microglia exacerbates postischemic inflammation and brain injury. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.37, n.6, p. 2224-2236, 2017.
- JOHNSON, W., ONUMA, O., OWOLABI, M., SACHDEV, S. Stroke: é necessária uma resposta global. *Boletim da Organização Mundial da Saúde*. 2016; 94:634–634A. doi: 10.2471/BLT.16.181636.
- KALIVAS, P.W.; DUFFY, P.; DUMARS, L.A.; SKINNER, C. Behavioral and Neurochemical Effects of Acute and Daily Cocaine Administration in Rats. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 245, n.2, p. 485-492, 1988.
- KARPINSKA, A.; GROMADZKA, G. Oxidative stress and natural antioxidant mechanisms: the role in neurodegeneration. From molecular mechanisms to therapeutic strategies. **Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej**, v.67, n.1, p.43–53, 2013.
- KHAN A, KALARIA RN, CORBETT A, BALLARD C. Update on vascular dementia. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2016; 29:281–301.
- KHATRI, R.; MCKINNEY, A.M.; SWENSON, B.; JANARDHAN, V. Blood-brain barrier, reperfusion injury, and hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. **Neurology**, v. 79, n. 1, p. S52-S57, 2012.
- KIRINO, T. Delayed neuronal death. **Neuropathology**, v.20, n.1, p. S95–S97. 2000.
- KNECHT, T.; STORY, J.; LIU, J.; DAVIS, W.; BORLONGAN, C.; DELA PENˆA, I. Adjunctive therapy approaches for ischemic stroke: innovations to expand time window of treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n.12, p.E2756, 2017.
- KOIZUMI, J-I.; YOSHIDA, Y.; NAKAZAWA, T.; OONEDA, G. Experimental studies of ischemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. **Japanese Journal of Stroke**, v.8, n.1, p. 1-8, 1986.

KONTOGHIORGHES, G.J.; KONTOGHIORGHE, C.N. Prospects for the introduction of targeted antioxidant drugs for the prevention and treatment of diseases related to free radical pathology. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v.28, n. 7, p. 593–603, 2019.

KOPEINA, G.S.; ZHIVOTOVSKY, B. Programmed cell death: past, present and future. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.633, n.1, p. 55–58, 2022.

KRALJEVIĆ, I., SABLJIĆ, S., MARINOVIĆ GUIĆ, M., et al. A importância do aumento dos níveis séricos de GFAP e UCH-L1 na distinção entre oclusão de grandes vasos e pequenos vasos no acidente vascular cerebral isquêmico agudo. *Biomedicamentos* .2024; 12(3):608.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines12030608>

LABOISSIÈRE, P. Organização Mundial do AVC alerta que 90% dos derrames são preveníveis. Disponível em: <<https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2023/10/organizacao-mund-do-avc-alerta-que-90-dos-derrames-sao-preveniveis#:~:q=A%20estimativa%20%C3%A9%20que%20mais>>. Acesso em: 01 mai. 2024.

LAI, T.W.; ZHANG, S.; WANG, Y.T. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. **Progress in Neurobiology**, v. 115, n.1, p.157-188, 2014.

LAMBERTSEN, K.L.; BIBER, K.; Finsen, B. Inflammatory cytokines in experimental in human stroke. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.32, n.1, p. 1677e1698. 2012.

LEE, J.M.; GRABB, M.C.; ZIPFEL, G.J.; CHOI, D.W. Brain tissue responses to ischemia. **Journal of Clinical Investigation**, v.106, n.6, p.723-731, 2000.

LEE, M.; LEE, S. H.; CHOI, S.; CHOI, B. Y.; SUH, S. W. Carvacrol inibe a expressão do potencial receptor transitório de melastatina 7 canais e alivia a neurotoxicidade do zinco induzida por lesão cerebral traumática. **Internacional J. Mol. Ciência**. 23 :13840. doi: 10.3390/ijms232213840. 2022.

LI, L.X.; CHENG, Y.F.; LIN, H.B.; WANG, C.; XU, J.P.; ZHANG, H.T. Prevention of cerebral ischemia-induced memory deficits by inhibition of phosphodiesterase-4 in rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 26, n.1, p.37-47, 2011.

LIANG, D.; LI, F.; FU, Y.; CAO, Y.; SONG, X.; WANG, T.; WANG, W.; GUO, M.; ZHOU, E.; LI, D.; YANG, Z.; ZHANG, N. Thymol inhibits LPS-stimulated inflammatory response via down-regulation of NF- κ B and MAPK signaling pathways in mouse mammary epithelial cells. **Inflammation**, v.37, n.1, p.214-222, 2014.

LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiological Reviews**, v.79, n.1, p. 1434-1568, 1999.

LIPTON, S.A.; ROSENBERG, P.A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **The New England Journal of Medicine**, v.330, n.1, p. 613-622, 1994.

LIU, X.; ZHUANG, L.; GAN, B. Disulfidptosis: disulfide stress-induced cell death. **Trends in Cell Biology**, v. S0962-8924, n. 23, p. 00141–1, 2024.

LIU, R.; BERRY, R.; WANG, L.; CHAUDHARI, K.; WINTERS, A.; SUN, Y.; CABALLERO, C.; AMPOFO, H.; SHI, Y.; THATA, B.; COLON-PEREZ, L.; SUMIEN, N.; YANG, S. H. Experimental Ischemic Stroke Induces Secondary Bihemispheric White Matter Degeneration and Long-Term Cognitive Impairment. **Translational stroke research**, Online ahead of print, 2024.

LO, E.H.; DALKARA, T.; MOSKOWITZ, M.A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. **Nature Reviews Neuroscience**, v.4, n.5. p.399–415, 2003.

- LOBO, P.G.G.A., et al. Epidemiologia do acidente vascular cerebral isquêmico no Brasil no ano de 2019, uma análise sob a perspectiva da faixa etária. **Brazilian Journal of Health Review**, 4(1), 3498–3505. <https://doi.org/10.34119/bjhrv4n1-272>
- LOFRANO, M.M. Acidente Vascular Cerebral. Instituto de Neurologia Diagnóstica, 2024. Disponível em: <https://ind-neuro.com.br/post/acidente-vascular-cerebral/>. Acesso em: 07 abr. 2024.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 512 p, 2002.
- LU, Y.; LI, Z.; ZHANG, S.; ZHANG, T.; LIU, Y.; ZHANG L. Cellular mitophagy: Mechanism, roles in diseases and small molecule pharmacological regulation. **Theranostics**, v.13, n.2, p. 736-766, 2023.
- LUNA, A.; LEMA-ALBA, R.C.; DAMBOLENA, J.S.; ZYGADLO, J.A.; LABAQUE, M.C.; MARIN., R.H. Thymol as natural antioxidant additive for poultry feed: oxidative stability improvement. **Poultry Science**, v.96, n.9, p. 3214-3220, 2017.
- MAKAR, T.K.; NEDERGAARD, M.; PREUSS, A.; GELBARD, A.S.; PERUMAL, A.S.; COOPER, A.J. Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. *J Neurochem.*, v. 62, n. 1, p. 45-53, 1994.
- MALATOVA, Z.; CHAVKO, M.; MARSALA, J. The dynamics of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase changes in dog spinal cord during ischemia, **Gen. Physiol. Biophys.** 3 (1984) 231–238.
- MANOUCHEHRABADI, M.; FARHADI, M.; AZIZI, Z.; TORKAMAN-BOUTORABI, A. Carvacrol protege contra a neurotoxicidade induzida por 6-hidroxi-dopamina em modelos *in vivo* e *in vitro* da doença de Parkinson. **Neurotox. Res.** 37 :156–170. doi: 10.1007/s12640-019-00088-w. 2020.
- MARCHESE, A., et al. Atividades antibacterianas e antifúngicas do timol: uma breve revisão da literatura. **Química Alimentar**. 2016; 210: 402-414.
- MALATOVA, Z.; MARSALA, J. Cholinergic enzymes in spinal cord infarction. Biochemical and histochemical changes, **Mol. Chem. Neuropathol.** 19 (1993) 283–296.
- MARÍN, L.D.; SÁNCHEZ-BORZONE, M.; GARCÍA, D.A. Comparative antioxidant properties of some GABAergic phenols and related compounds, determined for homogeneous and membrane systems. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.7, n.1, p.317-324, 2011.
- MARSHALL, J.C. Sensation and semantics. **Nature**, v.334, n.1. p.378, 1988.
- MARTELLI, G.; GIACOMINI, D. Antibacterial and antioxidant activities for natural and synthetic dual-active compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.158, n.1, p.91-105, 2018.
- MARTÍNEZ-TORRES, N.I.; CÁRDENAS-BEDOYA, J.; TORRES-MENDOZA, B.M. Acute Combined Cerebrolysin and Nicotinamide Administration Promote Cognitive Recovery Through Neuronal Changes in the Hippocampus of Rats with Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion. **Neuroscience**, v. 549, n.1, p. 76-89, 2024.
- MCGAUGH, J.L. Modulation of memory storage processes. In: SOLOMON, P.R. et al. Perspectives of memory research. New York: Springer Verlag; 1988. p. 33-64.
- MORAIS, A.A.; MOURÃO, J.C.; GOTLIEB, O.R.; SILVA, M.L.; MARX, M.C.; MAIA, J.G.S.; MAGALHÃES, E.M.T. Óleos essenciais da Amazônia contendo Timol. **Acta Amazonica**, V.2, N.1,

P. 45-46, 1972.

MOSKOWITZ, M.A.; LO, E.H.; IADECOLA, C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. **Neuron**, v. 67, n. 1, p. 181-198, 2010.

MOUHIEDDINE, T.H.; ITANI, M.M.; et al. Aplicações nanoteragnósticas para acidentes vasculares cerebrais isquêmicos e hemorrágicos: melhor entrega para um melhor prognóstico. **Curr. Neurol. Neurosci.** 2015; 15: 505.

MRSULJA, B. B.; MRSULJA, B. J.; CVEJIC, V.; DJURICIC, B. M.; ROGAC, L. Alterations of putative neurotransmitters and enzymes during ischemia in gerbil cerebral cortex, **J. Neural Transm. Suppl.** 14 (1978) 23-30.

MUIR, K.W. Glutamate-based therapeutic approaches: clinical trials with NMDA antagonists. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, n.1, p. 53-60, 2006.

MUTHURAMAN, A., RAMESH, M., MUSTAFFA, F., NADEEM, A., NISHAT, S., PARAMAKRISHNAN, N., & LIM, K. G. (2023). In Silico and In Vitro Methods in the Characterization of Beta-Carotene as Pharmaceutical Material via Acetylcholine Esterase Inhibitory Actions. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(11), 4358. <https://doi.org/10.3390/molecules28114358>

NAGOOR MEERAN, M.F.; JAVED, H.A.L.; TAEH, H.; AZIMULLAH. S.; OJHA. S.K.; Pharmacological Properties and Molecular Mechanisms of Thymol: Prospects for Its Therapeutic Potential and Pharmaceutical Development. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n.1, p. 1-34, 2017

NASCIMENTO, H.; ALMEIDA, B. Psychotic Disorder after Left Posterior Cerebral Artery Stroke- Na Atypical Event. **Actas Españolas de Psiquiatria**, v.52, n.1, p.60-65, 2024.

NEHA, K.; HAIDER, M.R.; PATHAK, A.; YAR, M.S. Medicinal prospects of antioxidants: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 178, n.1, p. 687-704, 2019.

NIKONENKO, A.G.; RADENOVIC. L.; ANDJUS, P.R.; SKIBO, G.G. Structural features of ischemic damage in the hippocampus. **The Anatomical Record**, v. 292, n.12, p. 1914-1921, 2009.

NOURMOHAMMADI, S.; YOUSEFI, S.; MANOUCHEHRABADI, M.; FARHADI, M.; AZIZI, Z.; TORKAMAN-BOUTORABI, A. Thymol protects against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in *in vivo* and *in vitro* model of Parkinson's disease via inhibiting oxidative stress. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v.22, n.1, p.40, 2022.

OMS, Organização Mundial de Saúde. Longas jornadas de trabalho estão aumentando mortes por doença cardíaca e acidente vascular cerebral, afirmam OMS e OIT. OPAS, 2021. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/17-5-2021-longas-jornadas-trabalho-estao-aumentando-mortes-por-doenca-cardiaca-e-acidente>. Acesso em: 20 de dez. de 2021.

OTT, E. O.; ABRAHAM, J.; MEYER, J. S.; ACHARI, A. N.; CHEE, A. N.; MATHEW, N. T. Disordered cholinergic neurotransmission and dysautoregulation after acute cerebral infarction, **Stroke** 6 (1975) 172-180.

PASPARAKIS, M.; VANDENABEELE, P. Necroptosis and its role in inflammation, **Nature**, v. 517, n.1, p.311-320, 2015.

PETROVIC-DJERGOVIC, D.; GOONEWARDENA, S.N.; PINSKY, D.J. Inflammatory disequilibrium in stroke. **Circulation Research**, v.119, n.1, p. 142e158, 2016.

PING, N.; ZUO, K.; CAI, J.; RONG, C.; YU, Z.; ZHANG, X.; WANG, G.; MA, C.; YANG, H.; LI, J.; WANG, X.; ZHAO, D. Apigenin protects against ischemic stroke by increasing DNA repair. **Frontiers in Pharmacology**, Online ahead of print, 2024.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.97, n.1, p.55–74, 2015.

PLANTON M., SAINT-AUBERT L., RAPOSO N., ET AL. High prevalence of cognitive impairment after intracerebral hemorrhage. **PLoS ONE**. 2017; 12 (6) e0178886.

POLAKA, S.; KATARE, P.; PAWAR, B.; VASDEV, N.; GUPTA, T.; RAJPOOT, K.; SENGUPTA, P.; TEKADE, R.K. Emerging ROS-Modulating Technologies for Augmentation of the Wound Healing Process. **ACS Omega** 2022, v.7, n.1, p.30657–30672, 2022.

POLJSAK, B.; ŠUPUT, D.; MILISAV, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2013, n.1, p.956792, 2023.

POPA-WAGNER, A.; GLAVAN, D.G.; OLARU, A.; OLARU, D.G.; MARGARITESCU, O.; TICA, O.; SURUGIU, R.; SANDU, R. Present status and future challenges of new therapeutic targets in preclinical models of stroke in aged animals with/without comorbidities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n.2, p.E356, 2018.

POZZAN, T.; RIZZUTO, R.; VOLPE, P.; MELDOLESI, J. Molecular and cellular physiology, n. of intracellular calcium stores. **Physiological Reviews**, v.74, n.3, p. 595-636, 1994.

PU, H.; SHI, Y.; ZHANG, L.; LU, Z.; YE, Q.; LEAK, R.K.; XU, F.; MA, S.; MU, H.; WEI, Z.; XU, N.; XIA, Y.; HU, X.; HITCHENS, T.K.; BENNETT, M.V.L.; CHEN, J. Protease-independent action of tissue plasminogen activator in brain plasticity and neurological recovery after ischemic stroke. **Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)**, v. 116, n.18, p. 9115-9124, 2019.

RAMÍREZ, O.M.C., BEDOYA, C.A.G., HENAO, L.M.G., NAVARRO, J.C. Sintomas neuropsiquiátricos como única manifestação aguda de acidente vascular cerebral no hemisfério esquerdo. Relato de caso. **Revista Colombiana De Psiquiatria (Ed. Inglesa)** 2020; 49:194–198. doi: 10.1016/j.rcpeng.2019.02.001.

RIZZI L, ROSSET I, RORIZ-CRUZ M. Global epidemiology of dementia: Alzheimer's and vascular types. *BioMed Res Int*. 2014; 2014: 908915. <https://doi.org/10.1155/2014/908915>.

ROTH, S.; SINGH, V.; TIEDT, S.; SCHINDLER, L.; HUBER, G.; GEERLOF, A.; ANTOINE, D.J.; ANFRAY, A.; ORSET, C.; GAUBERTI, M.; FOURNIER, A.; HOLDT, L.M.; HARRIS, H.E.; ENGELHARDT, B.; BIANCHI, M.E.; VIVIEN, D.; HAFFNER, C.; BERNHAGEN, J.; DICHGANS, M.; LIESZ, A. Brain-released alarmins and stress response synergize in accelerating atherosclerosis progression after stroke. **Science Translational Medicine**, v.10, n. 432, p. eaao1313, 2018.

SACHDEV PS, CHEN X, BRODATY H, THOMPSON C, ALTENDORF A, WEN W. The determinants and longitudinal course of poststroke mild cognitive impairment. *J Int Neuropsychol Soc*. 2009; 15:915–23.

SAHOO, C. R.; PAIDSETTY, S. K.; PADHY, R. N. The recent development of thymol derivative as a promising pharmacological scaffold. **Drug Development Research**, v. 82, n.8. p. 1079-1095, 2021.

SAHOO, J.; SAHOO, C. R.; SARANGI, P. K. N.; PRUSTY, S. K.; PADHY, R. N.; PAIDSETTY, S. K. Molecules with versatile biological activities bearing antipyrinyl nucleus as pharmacophore.

European Journal of Medicinal Chemistry, v.186, n.1, p.111911, 2020b.

SARANAVAN, S.; PARI, L. Role of thymol on hyperglycemia and hyperlipidemia in high fat diet-induced type 2 diabetic C57BL/6J mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 761, n.1, p. 279–287, 2015.

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 Algorithms**, v. 94, n.1, p. 491-495, 1988.

SCORZA, A.F.; ARIDA, M.R.; MONTEAZZO CYSNEIROS, R.; SCORZA, C.A.; ALBUQUERQUE, M.; CAVALHEIRO, E.A. Estudo Qualitativo da Formação Hipocampal de Animais Hipertensos com Epilepsia. **Arquivos em Neuropsiquiatria**, v. 63, n.2a, p. 283–288, 2005.

SELIGMAN, M.E.P. A reinterpretation of dreams. **The Sciences**, v. 27, n.5, p. 46-53, 1987.

SHAH, S.; PUSHPA TRYPHENA, K.; SINGH, G.; KULKARNI, A.; PINJALA, P.; KUMAR KHATRI, D. Neuroprotective role of Carvacrol via Nrf2/HO-1/NLRP3 axis in Rotenone-induced PD mice model. **Brain research**, v.1836, p.148954, 2024.

SHENG, H.; WNAG, Y. Correlation of locomotor activity and brain infarction in rats with transient focal ischemia. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 186, n.1, p. 150-154, 2010.

SIESJÖ, B.K.; KATSURA, K.; ZHAO, Q.; FOLBERGROVÁ, J.; PAHLMARK, K.; SIESJÖ, P.; SMITH, M.L. Mechanisms of secondary brain damage in global and focal ischemia: a speculative synthesis. **Journal of Neurotrauma**, v.12, n.5, p. 943-956, 1995.

SIESJÖ, B.K.; SIESJÖ, P. Mechanisms of secondary brain injury. **European Journal of Anaesthesiology**, v.13, n.1, p. 247-268, 1996.

SILVA LIMA, A.; MILHOMEM, M.N.; SANTOS MONTEIRO, O.; ARRUDA, A.C.P.; DE CASTRO, J.A.M.; FERNANDES, Y.M.L.; MAIA, J.G.S.; COSTA-JÚNIOR, L.M. Seasonal analysis and acaricidal activity of the thymol-type essential oil of *Ocimum gratissimum* and its major constituents against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.117, n.1, p.59–65, 2018.

SILVERMAN, I. E.; RYMER, M. M.; RUILOPE, L. M. Visual Guide for Clinicians – Understanding Stroke. **Clinical Publishing**, Oxford. 2011.

SIVAPRAKASAM, K. Towards a Unifying Hypothesis of Alzheimers Disease: Cholinergic System Linked to Plaques, Tangles and Neuroinflammation. **Curr. Med. Chem.** **2006**, 13, 2179–2188.

SKROBOT OA, BLACK SE, CHEN C, DECARLI C, ERKINJUNTTI T, FORD GA, et al. Progress toward standardized diagnosis of vascular cognitive impairment: guidelines from the Vascular Impairment of Cognition Classification Consensus Study. **Alzheimers Dement.** 2018; 14:280–92.

SKROBOT OA, O'BRIEN J, BLACK S, CHEN C, DECARLI C, ERKINJUNTTI T, et al. The vascular impairment of cognition classification consensus study. **Alzheimers Dement.** 2017; 13:624-33.

SMITH, M.L.; BENDEK, G.; DAHLGREN, N.; ROSÉN, I.; WIELOCH, T.; SIESJÖ, B.K. Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 69, n. 6, p. 385-401, 1984.

SOMMER, C.J. Ischemic stroke: experimental models and reality. **Acta Neuropathologica**, v. 133, n.2, p. 245-261, 2017.

STANGELAND, H.; ORGETA, V.; BELL V. Psicose pós-AVC: uma revisão sistemática. **Jornal de Neurologia, Neurocirurgia e Psiquiatria**, v. 89, n.1, p. 879-885, 2018.

STOLL, G.; NIESWANDT, B. Thrombo-inflammation in acute ischaemic stroke -implications for treatment. **Nature Reviews Neurology**, v.15, n.1, p.473–481, 2019.

STONE TW, ADDAE JI. The pharmacological manipulation of glutamate receptors and neuroprotection. **Eur J Pharmacol**. 2002 Jul 5;447(2-3):285-96. doi: 10.1016/s0014-2999(02)01851-4. PMID: 12151020.

SUGIMOTO, K.; NISHIOKA, R.; IKEDA, A.; MISE, A.; TAKAHASHI, H.; YANO, H.; KUMON, Y.; OHNISHI, T.; TANAKA, J. Activated microglia in a rat stroke model express NG2 proteoglycan in peri-infarct tissue through the involvement of TGF- β 1. **Glia**, v. 62, n. 2, p. 185-198, 2014.

SZALAY, G., MARTINECZ, B., LÉNÁRT, N., KÖRNYEI, Z., ORSOLITS, B., JUDÁK, L., CSÁSZÁR, E., FEKETE, R., WEST, B.L., KATONA, G., RÓZSA, B., DÉNES, Á. Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. **Nature Communications**, v.7, n.1, p. 11499, 2016.

TAKEDA, H.; YAMAGUCHI, T.; YANO, H.; TANAKA, J. Microglial metabolic disturbances and neuroinflammation in cerebral infarction. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.145, n.1, p.130-139, 2021.

TAMURA A, et al. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 1, p. 53-60, 1981.

TAO, T.; LIU, M.; CHEN, M.; LUO, Y.; WANG, C.; XU, T.; JIANG, Y.; GUO, Y.; ZHANG, J. H. Natural medicine in neuroprotection for ischemic stroke: Challenges and prospective. **Pharmacology and Therapeutics**, v.216, 2020.

TARDINI, D. M.S.; YOSHIDA, W. B.; NOVELLI, E. L.B.; SEQUEIRA, J. L. Evaluation of two experimental models of cerebral ischemia and reperfusion in rats with temporary carotid occlusion associated or not with vertebral occlusion. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 6, p. 502-508, 2003.

TCHANTCHOU F, XU Y, WU Y, CHRISTEN Y, LUO Y. EGb 761 enhances adult hippocampal neurogenesis and phosphorylation of CREB in transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **FASEB J**. 2007; 21:2400-8.

TIMALSINA, B.; HAQUE, M.N.; CHOI, H. J.; DASH, R.; MOON, I.S. Thymol in *Trachyspermum ammi* seed extract exhibits neuroprotection, learning, and memory enhancement in scopolamine-induced Alzheimer's disease mouse model. **Phytotherapy Research**, v.37, n.7, p.2811–2826, 2023.

THOMPSON, J. E. The evolution of surgery for the treatment and prevention of stroke: The Willis lecture. **Stroke**, v. 27, n.8, p.1427Y1434, 1996.

TROTMAN-LUCAS, M.; GIBSON, C.L. A review of experimental models of focal cerebral ischemia focusing on the middle cerebral artery occlusion model. **F1000Research**, v.10, n.1, p.242, 2021.

TSIRKA, S.E.; ROGOVE, A.D., BUGGE, T.H.; DEGEN, J.L.; STRICKLAND, S. Na extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v.17, n.1, p. 543-5552, 1997.

TUO, Q.Z.; ZOU, J.J.; LEI, P. Rodent models of vascular cognitive impairment. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 71, n.1, p.1-12, 2021.

UDE C, SCHUBERT-ZSILAVECZ M, WURGLICS M. Ginkgo biloba extracts: a review of the pharmacokinetics of the active ingredients. **Clin Pharmacokinet**. 2013; 52:727–49.

UNAL-CEVIK, I.; KILINÇ, M.; CAN, A.; GÜRISOY-OZDEMIR, Y.; DALKARA, T. Apoptotic and necrotic death mechanisms are concomitantly activated in the same cell after cerebral ischemia. **Stroke**, v. 35, n.2, p. 2189-2794, 2004.

VASCONCELOS, A.C. Patologia geral em hipertexto: Apoptose. Belo Horizonte, 2000. Disponível em: <http://www.icb.ufmg.br/pat/Apoptose.htm>. Acesso em: 30 abr. 2024.

VESTERGAARD, S.B.; DAMSBO, A.G.; PEDERSEN, N.L.; ZACHARIASSEN, K.; DRASBEK, K.R.; ØSTERGAARD, L.; ANDERSEN, G.; DALBY, R.B.; MORTENSEN, J.K. Exploring vascular contributions to cognitive impairment and dementia (ENIGMA): protocol for a prospective observational study. **BMC Neurology**, v. 24, n.1. p.110, 2024.

WANG, J.W.; QIU, Y.R.; FU, Y.; LIU, J.; HE, Z.J.; HUANG ZT. Transplantation with hypoxia,preconditioned mesenchymal stem cells suppresses brain injury caused by cardiac arrest induced global cerebral ischemia in rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 95, n.10, p. 2059-2070, 2017.

WANG, T.Y.; LIBARDO, M.D.J.; ANGELES-BOZA, A.M.; PELLOIS, J.P. Membrane oxidation in cell delivery and cell killing applications. **ACS Chemical Biology**, v.12, n.1, p. 1170-1182, 2017.

WANG, Y.; YAM, K.L. Inhibitory effect of thymol via different modes of delivery on growth of Escherichia coli DH5 α . **Food Packaging Shelf Life**, v.16, n.1, p.92–96, 2018.

WANG, Y.F.; TSIRKA, S.E.; STRICKLAND, S.; STIEG, P.E.; SORIANO, S.G.; LIPTON, S.A. Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. **Nature Medicine**, v.4, n.1, p.228-231, 1998.

WARLOW, C.; GIJN, J.V.; DENNIS, M.; WARDLAW, J.; BAMFORD, J.; HANKEY, G.; SANDERCOCK, P.; RINKEL, G.; LANGHORNE, P.; SUDLOW, C.; ROTHWELL, P. Stroke – Practical Management. **Blackwell Publishing**, Oxford. 2007.

WELLONS, J.C., 3RD; SHENG, H.; LASKOWITZ, D.T.; MACKENSEN, G.B.; PEARLSTEIN, R.D.; WARNER, D.S. A comparison of strain-related susceptibility in two murine recovery models of global cerebral ischemia. **Brain Research**, v. 868, n.1, p.14-21, 2000.

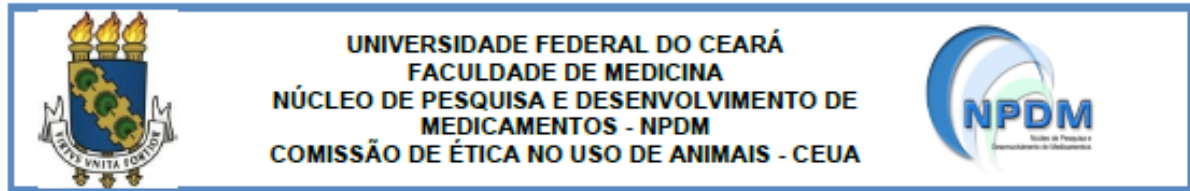
WHITELEY, W. Identificando biomarcadores sanguíneos para melhorar o diagnóstico de acidente vascular cerebral. The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh, v.41, n.1, p, 152-154, 2011.

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

XU, S.; LU, J.; SHAO, A.; ZHANG, J.H.; ZHANG, J. Glial cells: role of the immune response in ischemic stroke. **Frontiers in Immunology**, v.11, n.1, p.294, 2020.

- YAN, C., ZHANG, J., WANG, S., XUE, G., HOU, Y., 2013. Neuroprotective effects of rutaecarpine on cerebral ischemia reperfusion injury. **Neural Regen. Res.** 8, 2030–8.
- YANG, Z.; ZHAO, T.Z.; ZOU, Y.J.; ZHANG, J.H.; FENG, H. Hypoxia Induces autophagic cell death through hypoxia-inducible factor 1alpha in microglia. **PloS One**, v.9, n.1, p.e96509, 2014.
- YOUDIM, K.A.; DEANS, S.G. Effect of thyme oil and thymol dietary supplementation on the antioxidant status and fatty acid composition of the ageing rat brain. **British Journal of Nutrition**, v.83, n.1, p.87–93. 2000.
- YU KH, CHO SJ, OH MS, JUNG S, LEE JH, SHIN JH, et al. Cognitive impairment evaluated with vascular cognitive impairment harmonization standards in a multicenter prospective stroke cohort in Korea. *Stroke*. 2013; 44:786–8.
- ZHANG, C.S.; HAWLEY, S.A.; ZONG, Y.; LI, M.; WANG, Z.; GRAY, A.; MA, T.; CUI, J.; FENG, J.W.; ZHU, M.; WU, Y.Q.; LI, T.Y.; YE, Z.; LIN, S.Y.; YIN, H.; PIAO, H.L.; HARDIE, D.G.; LIN, S.C. Fructose-1,6-bisphosphate and aldolase mediate glucose sensing by AMPK. **Nature**, v.548, n.1, p.112-116, 2017.
- ZHANG, S.; XU, M.; LIU, Z.J.; FENG, J.; MA, Y. Questões neuropsiquiátricas após acidente vascular cerebral: significado clínico e implicações terapêuticas. **Jornal Mundial de Psiquiatria**, v.10, n.1, p. 125-138, 2020.
- ZHAO, H.; HAN, Z.; JI, X.; LUO, Y. Epigenetic regulation of oxidative stress in ischemic stroke. **Aging and Disease**, v. 7, n.1, p. 295–306, 2016.
- ZHU, T.; WANG, L.; WANG, L.; PING WAN, Q. Therapeutic targets of neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke: Applications for natural compounds from medicinal herbs. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.148, p.112719, 2022.
- ZHUO, M.; HOLTZMAN, D.M.; LI, Y.; OSAKA, H.; DEMARO, J.; JACQUIN, M. Role of tissue plasminogen activator receptor LRP in long-term potentiation of hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 542-9, 2000.

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA – NPDM



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO NEUROPROTETOR DO TIMOL EM CAMUNDONGOS SWISS SUBMETIDOS À ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL PERMANENTE" registrada com o protocolo 10230322-0, sob a responsabilidade Geanne Matos de Andrade e Ana Caroline Barros Parente que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, na reunião de 23 / 06 / 2022.

We hereby certify that the project entitled "NEUROPROTECTIVE EFFECT OF THYMOL IN SWISS MICE SUBMITTED TO PERMANENT FOCAL CEREBRAL ISCHEMIA" identified by the protocol number 10230322-0, and conducted by Geanne Matos de Andrade and Ana Caroline Barros Parente which involves the production, maintenance or use of animals belonging to the filo *Chordata*, sub-vertebrate *Vertebrata* (except humans), for the purpose of scientific research - is in accordance with the provisions of the Law number 11,794, from October 8th, 2008, of Decree number 6,899, from July 15th, 2009, and with the regulations issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from the Center for Research and Development of Medicines (NPDM) of the Federal University of Ceará, in the meeting of 06 / 23 / 2022.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: JULHO/2022 Fim: MARÇO/2024
Espécie	Camundongo heterogênico
Linhagem	Swiss
Nº de animais autorizados	420
Peso	25 a 30 gramas
Idade	30 a 60 dias
Sexo	Macho
Origem (fornecedor)	Biotério do NPDM
Local do experimento	Biotério do NPDM

Fortaleza, Ceará, 24 de junho de 2022

Documento assinado digitalmente
 LAYS LACERDA BRASIL DE OLIVEIRA
 Data: 23/06/2022 17:38:53-0300
 Verifique em <https://verificador.br.br>

Coordenação da Comissão de Ética e Uso de Animais
 Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos
 Universidade Federal do Ceará

Rua Coronel Nunes de Melo, 1000, Rodolfo Teófilo - Fortaleza/CE - CEP 60430-275 - Tel: 55 (85) 3366-8338
 Horário de atendimento: Segunda a Sexta, das 9h às 12h e das 13h30 às 18h. E-mail: ceua-npdm@ufc.br