



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

NEILA MARIA ROCHA DE LIMA

**EFEITO PROTETOR DA BOLDINA NO DANO NEURONAL, DÉFICIT DE MEMÓRIA E
RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA
CEREBRAL FOCAL PERMANENTE**

FORTALEZA

2015

NEILA MARIA ROCHA DE LIMA

EFEITO PROTETOR DA BOLDINA NO DANO NEURONAL, DÉFICIT DE MEMÓRIA E
RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA
CEREBRAL FOCAL PERMANENTE

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

Orientadora : Prof^ª. Dr^ª. Geanne M. de Andrade

FORTALEZA

2015

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

-
- L699e Lima, Neila Maria Rocha de.
Efeito protetor da boldina no dano neuronal, déficit de memória e resposta inflamatória em camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente. / Neila Maria Rocha de Lima. – 2015.
108 f.: il. color.
- Dissertação (mestrado). – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Mestrado em Ciências Médicas, Fortaleza, 2015.
Área de Concentração: Medicina I.
Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Geanne Matos de Andrade.
1. Isquemia Encefálica. 2. Inflamação. 3. Memória. I. Título.

CDD 616.81

NEILA MARIA ROCHA DE LIMA

EFEITO PROTETOR DA BOLDINA NO DANO NEURONAL, DÉFICIT DE MEMÓRIA E
RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA
CEREBRAL FOCAL PERMANENTE

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

Aprovada em __27__ / __10__ / __2015__

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Geanne Matos de Andrade
DFF/FM/UFC

Prof. Dr. Pedro Braga Neto
UECE

Prof^ª. Dr^ª. Marta Maria de França Fonteles
UFC

FORTALEZA

2015

“Aquele que habita no esconderijo do Altíssimo, à sombra do Onipotente descansará.
Direi do Senhor: Ele é o meu Deus, meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei”.

Salmos 91: 1-2.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela sua misericórdia e por está sempre à frente em todos os meus momentos de alegria e dificuldades.

Agradeço aos meus pais, Pedro e Cléa, pela minha formação, pelo exemplo de vida, pelos ensinamentos e apoio nas horas mais difíceis da minha vida.

Aos meus irmãos, que são muitos, por me acharem a irmã mais inteligente e dedicada aos estudos.

Ao meu marido, amigo, companheiro, Carlos Jorge, que sempre me deu força para fazer este curso e que me admira e acredita na minha perseverança e dedicação aos conhecimentos.

Agradeço ao meu filho querido e adorável Levi que nunca reclamou da minha ausência e que ainda muito pequeno aprendeu que essa ausência era em busca de um futuro melhor.

À minha orientadora, Prof.^a Geanne Matos de Andrade, pela confiança, dedicação e apoio neste trabalho.

Aos professores da banca examinadora desta dissertação pelas valiosas colaborações e sugestões na melhora deste trabalho.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Neurociência e Comportamento. Obrigado pelos ensinamentos, paciência e cooperação durante todo este trabalho e que sem a ajuda de vocês, jamais conseguiria concluir esta tarefa tão difícil. Sou muito honrada em fazer parte deste grupo no LNC e espero continuar com todos ainda.

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

Aos meus amigos do HUWC, que direta ou indiretamente me ajudaram neste trabalho, sou muito grata, pois sem a compreensão de todos com certeza não teria concluído este trabalho.

“As coisas não são difíceis de fazer, o difícil é nos dispormos a fazê-las”.
Constantin Bracusi

RESUMO

LIMA, N.M. R. EFEITO PROTETOR DA BOLDINA NO DANO NEURONAL, DÉFICIT DE MEMÓRIA E RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL PERMANENTE. DEFESA DA DISSERTAÇÃO, PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ.

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é a terceira maior causa de mortalidade e a primeira causa de incapacidade física em todo o mundo. O processo isquêmico ocasiona depleção de oxigênio e glicose, levando a uma cascata de eventos, incluindo, inflamação, apoptose e estresse oxidativo. Substâncias com propriedade anti-inflamatória e antioxidante vêm sendo consideradas como uma nova abordagem terapêutica para o tratamento farmacológico das doenças cerebrovasculares, em especial, o AVE. A boldina é um alcaloide do grupo da aporfina, encontrado nas folhas e casca do *Peumus boldus* Molina, e tem propriedades anti-inflamatórias e anti-oxidantes. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito neuroprotetor da boldina na neuroinflamação e déficit de memória induzidas pela oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO) em camundongos. Trinta minutos antes da pMCAO e durante cinco dias após, os animais receberam veículo (solução de HCl 0,025M) ou boldina (8, 16 e 25 mg / kg, ip). A quantificação da área de infarto cerebral, escores neurológicos e atividade da mieloperoxidase (MPO) foram avaliados 24 horas após a pMCAO. Atividade locomotora, memória de trabalho e memória aversiva foram avaliados 72 horas após a pMCAO. A memória episódica e espacial foram avaliadas 96 e 120 horas após a pMCAO respectivamente. Foi realizada a coloração de cresil violeta e Fluoro Jade C 120h após a isquemia para visualizar a viabilidade neuronal. Finalmente, 120h após a isquemia foi feito imunohistoquímica para GFAP (proteína ácida glial fibrilar) com objetivo de avaliar a atividade astrocitária, TNF- α e iNOS como marcadores inflamatórios. O tratamento com boldina (25mg/kg) reduziu, significativamente, a área de infarto e melhorou os escores na avaliação neurológica 24h após o insulto isquêmico. O TTC indicou que a percentagem média de volumes de infarto foi de 8% em hemisférios de camundongos tratados com veículo submetidos à pMCAO. Quando os camundongos foram tratados com boldina (25mg/kg), ocorreu uma diminuição significativa do volume de infarto para 3%. O tratamento com a boldina atenuou a morte celular no córtex e estriado de camundongos 120 horas após à pMCAO avaliados pela coloração de Cresil violeta e fluoro-jade C. A pMCAO não alterou a atividade exploratória horizontal dos animais, mas diminuiu a atividade exploratória vertical. A boldina na dose de 25mg/kg diminuiu esse déficit motor nos animais isquemiados. A boldina diminuiu déficits de memória aversiva, espacial, episódica e de trabalho. Além disso, a pMCAO promoveu aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO), sendo o tratamento com a boldina capaz de impedir o aumento da atividade no córtex. Além disso, as análises de imunohistoquímica mostraram que a expressão de TNF- α e de iNOS, que estão relacionadas com o processo inflamatório, aumentaram após o insulto isquêmico e que a boldina preveniu o aumento dessa expressão. Em relação a atividade astrocitária, a pMCAO mostrou um aumento da imunoreatividade do GFAP, e o tratamento com a boldina preveniu esse aumento. Estes resultados sugerem que o efeito neuroprotetor da boldina pode estar relacionado, pelo menos em parte, às suas propriedades anti-inflamatórias; porém, outros mecanismos, como a sua propriedade antioxidante não pode ser descartada.

Palavras-chave: Boldina, inflamação, isquemia cerebral focal, memória, neuroproteção.

ABSTRACT

LIMA, N.M.R. PROTECTIVE EFFECT OF NEURONAL DAMAGE IN BOLDINE, MEMORY DEFICIT AND INFLAMMATORY RESPONSE IN MICE SUBMITTED TO PERMANENT FOCAL CEREBRAL ISCHEMIA. DEFENSE OF THE THESIS. POST GRADUATE IN MEDICAL SCIENCES, FEDERAL UNIVERSITY OF CEARÁ.

Stroke is the second largest cause of death and the leading cause of disability worldwide. The ischemic process causes oxygen and glucose depletion and leads to a cascade of events including inflammation, apoptosis and oxidative stress. Substances having anti-inflammatory and antioxidant properties are being considered a new therapeutic approach for the pharmacological treatment of cerebrovascular diseases, in particular the stroke. Boldine is an alkaloid of the aporphine group found in the leaves and bark of *Peumus boldus*, with anti-inflammatory and anti-oxidants properties. The objective of this study was to investigate the neuroprotective effect of boldine in neuroinflammation and memory deficits induced by permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO) in mice. Thirty minutes before and for 5 days after pMCAO, animals received vehicle (0,025M HCl solution) or boldine (8, 16 and 25 mg / kg, ip). The quantification of cerebral infarction area, neurological scores and myeloperoxidase activity (MPO) were assessed 24 hours after pMCAO. Locomotor activity, working memory and aversive memory were assessed 72 hours after pMCAO. Episodic memory was assessed 96 hours after pMCAO and spatial memory was assessed 120 hours after pMCAO. Cresyl violet and Fluoro Jade C staining was performed 120h after pMCAO to display neuronal viability was carried out. Immunohistochemistry were made for GFAP (glial fibrillary Acid Protein), TNF- α and iNOS as inflammatory markers. Treatment with boldine (25mg / kg) significantly reduced infarct size and improved scores on neurological evaluation 24 hours after the ischemic insult. O TTC showed that the mean percentage of infarct volume was 8% in mice treated with vehicle hemispheres undergoing pMCAO. When mice were treated with boldine (25mg / kg), a significant decrease in the infarct volume to 3%. It was found also observed this treatment with boldine attenuated cell death in the cortex and striatum of mice 120 hours after the pMCAO evaluated by staining Cresil violet and Fluoro-Jade C. Ischemic injury did not alter the horizontal exploratory activity of the animals, but decreased the vertical exploration activity. Boldine at a dose of 25 mg / kg decreased this motor deficits in ischemic animals. Boldine also decreased deficits of aversive memory, spatial, episodic and working. Furthermore, pMCAO promoted increases in myeloperoxidase activity (MPO), treatment with boldine was able to reduce the increase MPO activity in the cortex. Furthermore, immunohistochemical analysis showed that TNF- α expression and iNOS, that are related to inflammation, increased after the ischemic insult and boldine reduces the increase of the expression. The pMCAO showed an increase in the immunoreactivity of GFAP, and treatment with boldine reduced this increase of activity. These results suggest that the neuroprotective effect of boldine may be related, at least in part, to its anti-inflammatory properties, however, other mechanisms, such as its antioxidant property cannot be ruled out.

Keywords: Boldine, inflammation, focal cerebral ischemia, memory, neuroprotection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01.	Imagem representativa da área do <i>core</i> isquêmico e penumbra.....	18
Figura 02.	Aspectos fisiopatológicos da isquemia cerebral, seguida de reperusão. Adaptada de Wahlgrene Ahmed, 2004.....	21
Figura 03.	Resposta inflamatória após isquemia cerebral focal (adaptada de Brouns, Deynn, 2009).....	24
Figura 04.	Principais vias de ativação de caspases na isquemia e reperusão cerebral.....	29
Figura 05.	Representação esquemática do Polígono de Willis.....	31
Figura 06.	Classificação da memória (Bayley e Squire, 2003).....	33
Figura 07.	Estrutura molecular da boldina.....	38
Figura 08.	Arena de campo aberto(LNC).....	49
Figura 09.	Labirinto em Y (LNC).....	50
Figura 10.	Labirinto aquático de Morris (LNC).....	51
Figura 11.	Aparelho de esquiva passiva (Insight LTDA).....	51
Figura 12.	Arena com Objetos (LNC).....	52
Figura 13.	Efeito da boldina sobre o número total de escores obtidos na avaliação neurológica de camundongos submetidos à pMCAO....	56
Figura 14.	Fatias cerebrais de camundongos submetidos à pMCAO, coradas com TTC, representando o dano cerebral isquêmico.....	57
Figura 15.	Efeito da boldina sobre o dano cerebral isquêmico de camundongos submetidos à pMCAO.....	58
Figura 16.	Fotomicrografia representando o efeito da boldina sobre a viabilidade celular evidenciada pela coloração de cresil-violeta no córtex temporal e corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO.....	60
Figura 17.	Efeito da boldina sobre a viabilidade celular evidenciada pela coloração de cresil-violeta no córtex temporal de camundongos submetidos à pMCAO.....	61
Figura 18.	Efeito da boldina sobre a viabilidade celular evidenciada pela coloração de cresil-violeta no corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO.....	61
Figura 19.	Fotomicrografia representando o efeito da boldina sobre a viabilidade celular evidenciada pela coloração de Fluoro Jade C no córtex temporal e corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO.....	63
Figura 20.	Efeito da boldina sobre a viabilidade celular evidenciada pela coloração de Fluoro Jade C no córtex temporal de camundongos submetidos à pMCAO.....	64
Figura 21.	Efeito da boldina sobre a viabilidade celular evidenciada pela coloração de Fluoro Jade C no corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO.....	64
Figura 22.	Efeito da boldina sobre o número de cruzamentos (<i>crossings</i>) de camundongos submetidos à pMCAO avaliados no teste de campo aberto.....	65

Figura 23.	Efeito da boldina sobre o número de levantamentos (<i>rearings</i>) de camundongos submetidos à pMCAO avaliados no teste de campo aberto.....	66
Figura 24.	Efeito da boldina sobre a memória de trabalho de camundongos submetidos a pMCAO avaliados no labirinto em Y.....	67
Figura 25.	Efeito da boldina sobre a memória episódica de camundongos submetidos à pMCAO.....	68
Figura 26.	Efeito da boldina sobre o aprendizado de camundongos submetidos à pMCAO, avaliados no parâmetro: tempo de latência para alcançar a plataforma nas sessões de treino.....	69
Figura 27.	Efeito da boldina sobre a memória espacial de camundongos submetidos à pMCAO, avaliada através do parâmetro: latência para alcançar a plataforma.....	70
Figura 28.	Efeito da boldina sobre a memória espacial de camundongos submetidos à pMCAO, avaliada através do parâmetro: número de cruzamentos.....	70
Figura 29.	Efeito da boldina sobre a memória espacial de camundongos submetidos à pMCAO, avaliada através do parâmetro: tempo de permanência no quadrante.....	71
Figura 30.	Efeito da boldina sobre a memória aversiva de camundongos submetidos à pMCAO.....	72
Figura 31.	Efeito da boldina sobre os níveis da atividade de MPO no córtex temporal e corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO.....	73
Figura 32.	Fotomicrografia da imunoreatividade de iNOS no córtex temporal e corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO e tratados com boldina.....	74
Figura 33.	Efeito da boldina sobre a imunoreatividade de iNOS no córtex temporal e corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO.....	75
Figura 34.	Fotomicrografia da imunoreatividade de TNF- α no córtex temporal e corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO e tratados com boldina.....	76
Figura 35.	Efeito da boldina sobre a imunoreatividade de TNF- α no córtex temporal e corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO.....	77
Figura 36.	Fotomicrografia da astrogliose evidenciada pela imunoreatividade de GFAP no córtex temporal e corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO e tratados com boldina...	78
Figura 37.	Efeito da boldina sobre a astrogliose evidenciada pela imunoreatividade de GFAP no córtex temporal e corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitros
μM	Micromolar
ACM	Artéria cerebral média
ACC	Artéria carótida comum
AChE	Acetil colinesterase
ATP	Trifosfato de Adenosina
ATPase	Adenosina trifosfatase
AVE	Acidente Vascular Encefálico
AVEI	Acidente Vascular Encefálico Isquêmico
AVEH	Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico
BHE	Barreira hemato-encefálica
BID	Proteína pro-apoptótica de família Bcl-2
Ccl-2	Célula-B de linfoma 2
Ca⁺⁺	Cálcio Iônico
CAD	<i>Caspase-activated deoxyribonuclease</i>
Cl⁻	Cloreto
cm	Centímetros
CE	Córtex Entorrinal
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
COX	Clicooxigenase
CypD	Cyclophilina D
CTMs	Células-tronco mesenquimais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DATASUS	Departamento de informática do Sistema Único de Saúde
DNA	Ácido Dexorribonucléico
DAB	Diaminobenzidina
EROS	Espécies reativas de oxigênio
EPM	Erro Padrão Médio
ERK	Kinase regulada por sinal extracelular
FADD	<i>Faz-Associated protein with Death Domain</i>
FO	Falso-operado
FSC	Fluxo sanguíneo cerebral
Fas	<i>First apoptosis signal</i>
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GSHPX	Glutathiona peroxidase
HCL	Ácido clorídrico
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
h	Hora
HTAB	Brometo de cetiltrimetil amônio
huPA	Huperzina A
IL-1	Interleucina-1
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular-1

i.p.	Intraperitoneal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
JNK	Quinase cjun-NH ₂ -terminal
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Kilograma
K⁺	Potássio
LTP	Potenciação de longa duração
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MCP-1	Proteína quimiotática de monócito-1
mA	Miliampere
MIP-1α	Proteína inflamatória de macrófagos-1 α
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MPO	Mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de sódio
Na⁺	Sódio
nm	Nanômetro
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
O₂⁻	Ânion superóxido
O₂	Oxigênio
OH⁻	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
OI	Objeto igual
ON	Objeto novo
OX	Xantina oxidase
ONOO⁻	Radical peroxinitrito
P38	Proteína-38
PBS	Tampão salina-fosfato
pMCAO	Oclusão permanente da artéria cerebral média
PKC	Proteína Quinase C
rtPA	Ativador de plasminogênio tecidual recombinante
RIPK	Receptor-Interação de ProteínaKinase
RN	Necrose Regulada
RNA_m	Ácido Ribonucléico mensageiro
RPM	Rotações por minuto
SUS	Sistema Único de Saude
s	Segundos
SNC	Sistema Nervoso Central
TBS	Tampão trizma base
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α
TTC	Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol
ThrX-Tyr	Treonina-X-tirosina
UFC	Universidade Federal do Ceará
WHO	World Health Organization
V.O	Via oral

LISTA DE TABELA

Tabela 01 Grupos de tratamento.

LISTA DE QUADRO

Quadro 01 Protocolo Experimental

Quadro 02 Avaliação Neurológica

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Acidente Vascular Encefálico.....	17
1.1.1	Definição, Classificação e Conceito de Core e Penumbra.....	17
1.1.2	Dados Epidemiológicos.....	18
1.1.3	Fatores de Riscos, Diagnóstico e Tratamento para o AVE.....	19
1.2	Fisiopatologia do AVE Isquêmico.....	20
1.2.1	Depleção de Oxigênio e ATP	21
1.2.2	Influxo do Cálcio (Ca ⁺⁺).....	22
1.2.3	Excitotoxicidade Glutamatérgica.....	23
1.2.4	Inflamação e Isquemia Cerebral.....	23
1.2.5	Estresse Oxidativo na Isquemia Cerebral.....	26
1.2.6	Morte Celular na Isquemia Cerebral.....	27
1.3	Isquemia cerebral focal: modelos experimentais <i>in vivo</i>	29
1.4	Déficits de Memória Induzidos por Isquemia Cerebral.....	32
1.5	Alcalóides e Neuroproteção.....	35
1.6	Boldina.....	37
2	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	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	Drogas.....	43
4.3	Protocolo experimental.....	43
4.4	Isquemia cerebral focal por oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO)	45
4.5	Avaliação Neurológica.....	46
4.6	Quantificação Dano Isquêmico Através da Coloração com Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol (TTC).....	47
4.7	Avaliação da viabilidade celular (cresil-violeta e FJ C).....	47
4.8	Avaliação da Atividade Locomotora - Teste do Campo Aberto.....	49
4.9	Avaliação sobre a Memória.....	49

4.9.1	Avaliação da Memória de Trabalho - Teste do Labirinto em Y.....	49
4.9.2	Avaliação da Memória Espacial – Labirinto Aquático de Morris.....	50
4.9.3	Avaliação da Memória Aversiva - Teste da Esquiva Passiva.....	51
4.9.4	Avaliação da Memória Episódica – (RO).....	52
4.10	Avaliação da Resposta Inflamatória.....	53
4.10.1	Avaliação da Atividade da Enzima Mieloperoxidase	53
4.10.2	Avaliação da imunoreatividade para TNF- α e iNOS.....	53
4.10.3	Avaliação da astrogilose através da imunoreatividade de GFAP.....	54
4.11	Análise estatística.....	55
5	RESULTADOS	56
5.1	Efeito da boldina sobre o dano neurológico de camundongos submetidos à pMCAO.....	56
5.2	Efeito da boldina sobre o dano cerebral isquêmico de camundongos submetidos à pMCAO.....	57
5.3	Efeito da boldina (25mg/kg) sobre a viabilidade celular evidenciada pela coloração de cresil violeta no córtex temporal e corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO.....	58
5.4	Efeito da boldina (25mg/kg) sobre a viabilidade celular evidenciada pela coloração de Fluoro Jade C no córtex temporal e corpo estriado de camundongo submetidos à pMCAO.....	62
5.5	Efeito da boldina sobre a atividade locomotora de camundongos submetidos à pMCAO.....	65
5.6	Efeito da boldinasobre a memória de trabalho de camundongos submetidos à pMCAO.....	66
5.7	Efeito da boldina sobre a memória episódica de camundongos submetidos à pMCAO.....	67
5.8	Efeito da boldina sobre a memória espacial de camundongos submetidos à pMCAO.....	68
5.9	Efeito daboldina sobre a memória aversiva de camundongos submetidos à pMCAO.....	71
5.10	Efeito da boldina (25mg/kg) sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no córtex temporal e corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO.....	72
5.11	Efeito da boldina (25mg/kg) sobre a imunoreatividadese iNOS no córtex temporal e corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO.....	73
5.12	Efeito da boldina (25mg/kg) sobre a imunoreatividade de TNF- α no córtex temporal e corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO.....	75
5.13	Efeito da boldina (25mg/kg) sobre a astrogilose pela imunoreatividade de GFAP no córtex temporal e corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO.....	77
6.	DISCUSSÃO	80
7.	CONCLUSÃO	91

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INTRODUÇÃO

1.1. Acidente Vascular Encefálico

1.1.1. Definição, Classificação e Conceito de Core e Penumbra

O acidente Vascular Encefálico (AVE) é caracterizado por um déficit neurológico súbito, ocasionado por processos isquêmicos ou hemorrágicos no sistema nervoso central (SNC). O acidente Vascular Encefálico Isquêmico acontece em 85% dos casos. É causado por oclusão vascular cerebral localizada, principalmente por aterosclerose, que leva a uma interrupção do fluxo sanguíneo e conseqüente redução do fornecimento de oxigênio e glicose a sítios cerebrais atingidos, quando a causa é hemorrágica denomina-se Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico, o acometido apresenta hemorragia intraparenquimatosa (10%) ou uma hemorragia subaracnóidea (5%), devido a um rompimento do endotélio vascular (EUSI, 2003; WOODRUFF *et al.*, 2011; WHO, 2015)

A aterosclerose de pequenas e grandes artérias cerebrais é responsável pela maioria dos acidentes vasculares encefálicos isquêmico. A aterosclerose, além de causar processos obstrutivos, também podem predispor ao rompimento da artéria acometida. Entretanto, cerca de 20% dos acidentes vasculares encefálicos são devidos a êmbolos cardiogênicos, mais comumente associados à fibrilação atrial (DONNAN, 2008). Ainda, cerca de 30% dos acidentes vasculares encefálicos permanecem idiopáticos (ALBERS, 2008).

A terapêutica no AVEI visa fundamentalmente conter essa cascata de eventos (depleção de oxigênio e ATP, excesso de cálcio e glutamato, inflamação, estresse oxidativo e peroxidação lipídica) que leva, em última análise, à morte celular. Sabe-se que na fase aguda do AVEi existe uma área central de isquemia (*core*) e, ao redor desta, uma área funcionalmente prejudicada que está estruturalmente intacta (área de penumbra) e que mantém características condizentes com disfunção, pode não resultar em morte celular, sendo alvo da terapia trombolítica (MAULAZ *et al.*, 2005) (Figura 01).

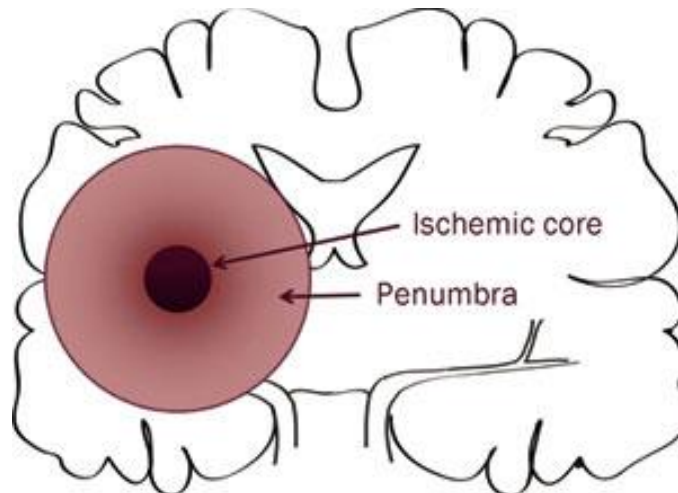


Figura 01. Imagem representativa da área de core e penumbra (Adaptado de Coultrap, *et al.*, 2011).

A penumbra é definida como um tecido com hipoperfusão que envolve o núcleo isquêmico no qual o fluxo sanguíneo é muito baixo para manter a atividade elétrica, mas suficientes para preservar canais iônicos. No entanto, esta zona é submetida a uma onda de processos metabólicos deletérios propagados a partir do núcleo para o tecido vizinho, incluindo falha energética, elevação dos níveis de cálcio intracelular, excitotoxicidade, estresse oxidativo, disfunção da barreira hematoencefálica, resposta inflamatória e apoptose (DURUKAN, TATLISUMAK, 2007), que conduzirá à expansão do núcleo isquêmico e o posterior agravamento clínico. A lesão na penumbra é reversível, e é essa a região alvo das inúmeras pesquisas (LIPTON, 1999).

1.1.2 Dados epidemiológicos

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o AVE, mais conhecido como derrame, é atualmente a terceira principal causa de óbitos no mundo e a principal causa de morte no Brasil (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). Um mal que causa a morte de 100.000 brasileiros por ano, com números de óbitos maiores que a dengue, a AIDS e até mesmo o câncer de mama. O Brasil, nos últimos 20 anos vem mudando o seu perfil de morbimortalidade, com as doenças crônicas não transmissíveis liderando as principais causas de morte. O AVE está entre as mais importantes doenças crônicas, e é uma das principais causas de internações e mortalidade, causando na grande maioria dos pacientes, algum tipo de deficiência, seja parcial ou completa (WHO, 2006). Com base nas informações do DATASUS, de 2005 a 2009 registraram-se no Brasil cerca de 170.000 internações por AVE/ano, com um

percentual de óbitos em torno de 17%. Em 2009, o AVE representou 1,5% das 11.509.485 internações hospitalares registradas no Sistema Único de Saúde (SUS). As estimativas indicam que 18 milhões de novos casos de AVE surgirão em 2015 e em 2030, esse quadro se apresentará com 23 milhões de novas ocorrências. Vinte mil novos casos de AVE são registrados todos os anos no Ceará. Desses, 6 mil morrem e outros 6 mil ficam severamente incapacitados (DE CARVALHO et al., 2011).

O tratamento na primeira hora faz toda a diferença na recuperação dos pacientes. A cada seis segundos uma pessoa morre em decorrência de AVE no mundo. Quando o paciente sobrevive a um AVE, sofre com sequelas que, em muitos casos, incapacitam-no, limitando-o a atividade profissional e até ao convívio social (WHO, 2015).

1.1.3 Fatores de riscos, diagnóstico e tratamento para o AVE.

Os principais fatores de riscos do AVE são hipertensão arterial sistêmica, dislipidemias, sedentarismo, tabagismo, obesidade, diabetes mellitus, idade avançada, hereditariedade, coronariopatia, fibrilação atrial, estenose de carótidas (SUG YOON, 2001 e 2002; ZHENG, 2014). O diagnóstico do AVE baseia-se na avaliação neurológica. Geralmente, as vítimas podem apresentar sinais clínicos como déficits motores, alterações na marcha, na fala, nos músculos da face e déficits de memória. Em casos mais graves, o indivíduo pode apresentar convulsão. Entretanto, a tomografia computadorizada (TC) do crânio é o exame diferencial para o desfecho de diagnóstico (PERSSON *et al.*, 2014).

Atualmente, a intervenção terapêutica no AVE isquêmico fundamenta-se na aplicação de agentes antiplaquetários, anticoagulantes e trombolíticos, bem como, procedimento cirúrgico. A administração de um trombolítico, permite a desobstrução da artéria, esse, dissolve o coágulo e libera o fluxo sanguíneo para a área cerebral isquêmica. Esse tratamento deve ser aplicado em até 4 horas e 30 minutos do início dos sintomas. Isso minimiza as sequelas, ajuda na recuperação do paciente e reduz a taxa de mortalidade. O único agente trombolítico utilizado na terapia do AVE pode-se destacar o ativador de plasminogênio tecidual recombinante (rtPA) (HACKE *et al.*, 2008). A trombólise endovenosa com rtPA para pacientes com AVE isquêmico agudo é um tratamento com eficácia demonstrada em diversos ensaios clínicos e amplamente recomendado(HACKE et al., 2008). Estudos realizados em vários países como Estados Unidos, Canadá e Europa demonstraram que somente 2 a 5% dos pacientes são candidatos para o tratamento com o rtPA (CHAPMAN *et*

al., 2000). No Brasil esse número é ainda menor, como mostrou DE Carvalho e colaboradores, (2011), que apenas 1,1% dos pacientes com AVE isquêmico agudo na cidade de Fortaleza receberam a terapia trombolítica.

O fator fundamental para um bom resultado terapêutico no AVE é o tempo. Quanto menor o tempo entre o surgimento dos sinais clínicos e o tratamento, maiores as chances de recuperação do acometido. As sequelas resultantes do AVE envolvem alterações motoras e sensitivas, déficits nas funções cognitivas, visuais, emocionais, desequilíbrio alimentar e alteração da fala. (HOSSMANN, 1998).

1.2. Fisiopatologia do AVE isquêmico

O Fluxo Sanguíneo Cerebral (FSC) no adulto gira em torno de 50 mL/100 mg de tecido cerebral/min (SMITH, 2004). No AVEI, esse fluxo sanguíneo é interrompido ou reduzido por processos ateroscleróticos ou tromboembólicos. Quando esse fluxo é reduzido (20 a 30%) abaixo do normal, inicia-se a cascata fisiopatológica isquêmica (Figura 02) (OHTAKI *et al.*, 2005).

Os principais aspectos fisiopatológicos envolvidos no AVE envolvem: falência na produção de ATP, acidose láctica devido ativação da via anaeróbica e consequente produção de ácido láctico, excitotoxicidade glutamatérgica, recorrentes despolarizações, estresse oxidativo, inflamação e apoptose. Essa cascata culmina na morte de células neurais, gerando infarto cerebral (MAJID, 2014). A interrupção do fluxo sanguíneo poderá determinar os mais variados graus de lesão celular. Esta lesão vai depender do tempo, da intensidade, da velocidade de instalação, do órgão afetado e da temperatura a que o tecido está submetido (LIMA, 2008).

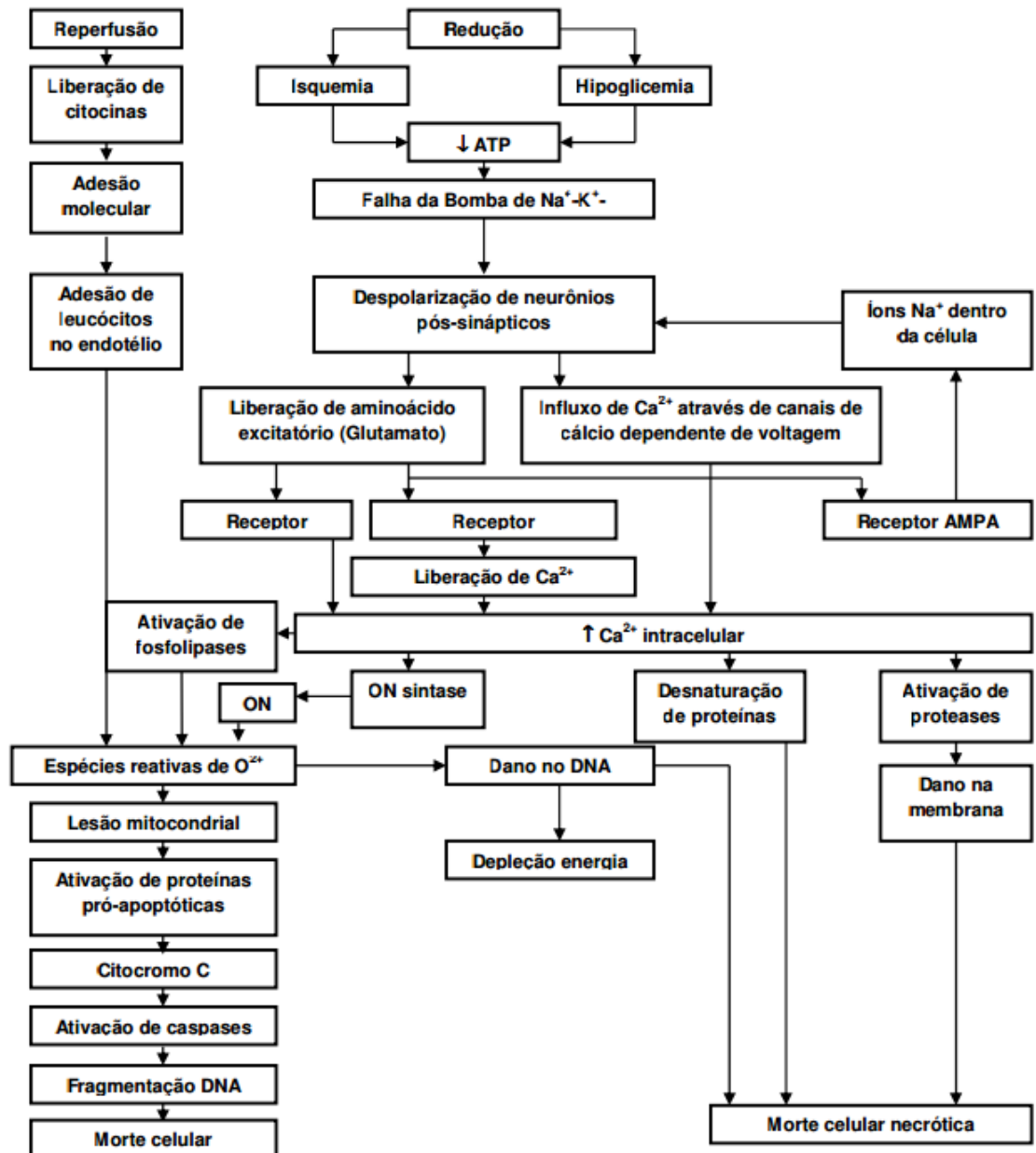


Figura 02. Aspectos fisiopatológicos da isquemia cerebral, seguida de reperfusão. ATP (trifosfato de adenosina), Na^+/K^+ (íons sódio e potássio), Ca^{++} (cálcio iônico), ON (óxido nítrico) (Adaptada de WAHLGREN E AHMED, 2004).

1.2.1 Depleção de oxigênio e ATP

O metabolismo energético normal no cérebro tem algumas características especiais, que incluem uma alta taxa metabólica, estoques de carboidratos limitados, e uma alta dependência do metabolismo aeróbico a partir da glicose. Por essa razão, o cérebro é um órgão muito vulnerável a lesões por hipóxia e pela depleção de glicose. Além disso, o cérebro possui uma capacidade limitada de reparo, fazendo com que mudanças mínimas no

fornecimento de oxigênio e de glicose a esse órgão possam provocar danos irreversíveis (LIPTON, 1999).

A partir da depleção de oxigênio (O_2) e glicose, há falência da fosforilação oxidativa mitocondrial. Esse evento reduz a produção de adenosina trifosfato (ATP), o que induz a célula a iniciar respiração anaeróbica e, assim, a produção de lactato, levando ao desenvolvimento de acidose nos neurônios (LIMA, 2008). Simultaneamente, a depleção de ATP causa a falência da bomba de sódio-potássio (Na^+ / K^+), o que resulta em despolarização da membrana plasmática dos neurônios e de células da glia, rápida perda de potássio (K^+) para o meio extracelular e influxo acentuado de sódio (Na^+), água (H_2O), cálcio (Ca^{++}) e cloreto (Cl^-) intracelular, induzindo ao edema citotóxico (TARDINI e YOSHIDA, 2003; OHTAKI *et al.*, 2005).

Ainda, a falência da bomba Na^+ / K^+ aumenta a produção do radical superóxido (O_2^-) e outros radicais, como, hidroxila (OH^-) e o peróxido de oxigênio (H_2O_2) pelo metabolismo da xantina. Os eventos seguintes, como excitotoxicidade por glutamato, aumento do Ca^{++} intracelular, produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e mediadores inflamatórios contribuirão para o seguimento da fisiopatologia do AVE (MIGUEL *et al.*, 2012).

1.2.2 Influxo do cálcio (Ca^{++})

As concentrações de Ca^{++} no meio extracelular são maiores do que no meio intracelular. No citosol, a maior parte do Ca^{++} está armazenado nas mitocôndrias e retículo endoplasmático. A depleção dos níveis de ATP ocorridos num estado isquêmico causa um prejuízo funcional da bomba de Ca^{++} ATPase, promovendo o influxo exacerbado de Ca^{++} no citosol a partir da membrana plasmática, associada a liberação do cálcio presente nas mitocôndrias e retículo endoplasmático (DOYLE *et al.*, 2008).

O Ca^{++} citosólico promove a ativação de enzimas, como: proteases, lipases e DNAses dependentes de cálcio. A ativação dessas enzimas altera a função celular, desestabiliza a estrutura da membrana plasmática e do citoesqueleto, aumenta a lipólise pelo metabolismo de ácidos graxos livres, induz a produção de radicais superóxido durante a reperfusão e, por fim, levam a morte celular. Qualquer intervenção que atenuar o aumento de Ca^{++} citosólico reduz a disfunção e morte celular (WHITE *et al.*, 2000; GILGUN-SHERKI *et al.*, 2002). Em modelos de isquemia cerebral experimental pela oclusão permanente da artéria cerebral média

(pMCAO), as concentração de Ca^{++} total na região do core da lesão mostrou-se superior a concentração observada na área de penumbra (KIM *et al.*, 1998).

1.2.3 Excitotoxicidade glutamatérgica

Neurônios glutamatérgicos perfazem cerca de 80% da população total de neurônios do córtex cerebral de modo que o referido aminoácido deve possuir um papel importante na fisiologia do SNC (SOMOGYI, 1998). Concomitante ao aumento citosólico de Ca^{++} , um desequilíbrio na liberação e recepção glutamatérgica aumentam o processo de neurotoxicidade (DIRNAGL *et al.*, 1999). Em sinapses glutamatérgicas, o glutamato, como o principal aminoácido excitatório, é liberado no espaço extracelular, onde vai ativar receptores do tipo NMDA, AMPA e receptores metabotrópicos nos neurônios pós-sinápticos, levando ao influxo intracelular dos níveis de Ca^{++} , Na^+ e Cl^- . Após a ativação desses receptores, eles são capturados por células da glia, normalizando assim as suas concentrações no meio extracelular (ALLEN *et al.*, 2004).

Na isquemia, a lesão neuronal mediada por receptores de glutamato ocorre em dois padrões: excitotoxicidade rápida, induzida pela intensa estimulação de um amplo número de receptores do tipo NMDA e lentamente, induzida pela prolongada estimulação de receptores AMPA e Kainato (CHOI, 1992). Quando os níveis de glutamato atingem valores elevados, neurônios respondem a esse neurotransmissor em duas etapas: primeiramente, após alguns minutos de exposição, eles despolarizam-se, na dependência da presença de Na^+ e Cl^- , refletindo o influxo de Na^+ , acompanhado passivamente pelo influxo de Cl^- e água, resultando no aumento do volume celular, porém não sendo um evento letal, pois a maioria das células recupera seu volume homeostático e sobrevive; secundariamente, após algumas horas de exposição, a neurotoxicidade do glutamato leva a desintegração neuronal tardia, mediada pelo influxo excessivo de Ca^{++} . (CHOI, 1992). Esses eventos culminam num processo conhecido como excitotoxicidade glutamatérgica, levando a indução da apoptose ou necrose neuronal (DIRNAGL *et al.*, 1999).

1.2.4 Inflamação e isquemia cerebral

A inflamação é um mecanismo de defesa e reparo que ocorre em resposta a lesão tecidual. O trauma mecânico à barreira hemato-encefálica (BHE) provoca aumento de sua permeabilidade e extravasamento de proteínas plasmáticas para o interior do parênquima medular e atração de células inflamatórias para o local da lesão (MAUTES *et al.*, 2000). O

processo inflamatório participa da cascata isquêmica a partir da gênese de EROS que são produzidos primariamente nos processos de proteólise, lipólise, danos ao DNA e morte neuronal (Figura 03). As células da micróglia e os astrócitos, juntamente com as células sanguíneas do sistema imunológico são ativadas, produzindo mediadores inflamatórios. Estes, incluem: moléculas de adesão endotelial, citocinas e quimioquinas (BROUNS, DEYN, 2009).

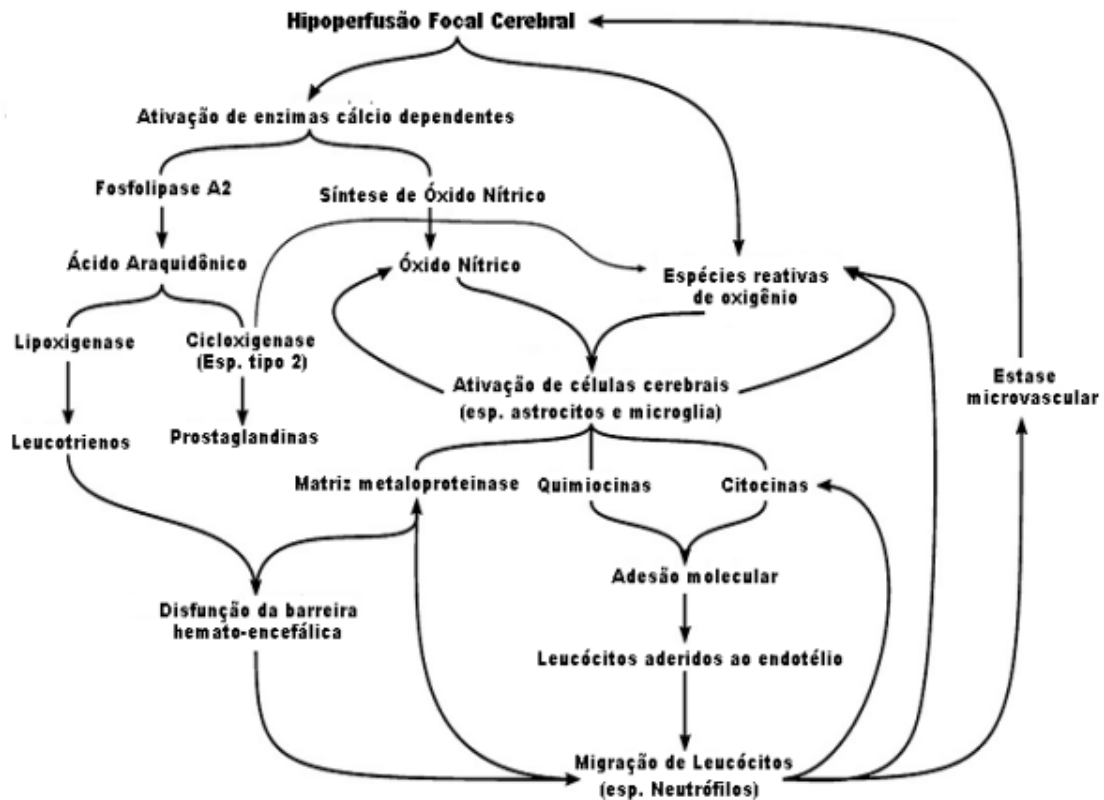


Figura 03- Resposta inflamatória após isquemia cerebral focal (adaptada de BROUNS, DEYN, 2009).

As células da micróglia são macrófagos residentes do SNC. Atuam como células apresentadoras de antígenos, secretam citocinas, bem como, ajudam na eliminação de restos celulares. (MORIOKA *et al.*, 1993). Estas células constituem aproximadamente 5-10% de todas as células do cérebro (KREUTZBERG, 1996). São ativadas em condições de infecções, trauma, isquemia e neurodegeneração (EL KHOURY, 1998). A micróglia ativa sofre uma transformação morfológica. A sua forma ramificada “estado de repouso” passa para uma forma ameboide, estado, onde essas células se tornam virtualmente indistinguível de macrófagos circulantes (KREUTZBERG, 1996). A ativação do receptor toll-like4 (TRL4)

tem sido documentado como um dos mecanismos envolvidos na ativação microglial em infarto cerebral (SAITO, 2000).

Já os astrócitos, são as células da glia que garantem a integridade das sinapses, impedindo a propagação desordenada da comunicação neural. Os astrócitos contêm a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (HOL e PEKNY, 2015). Durante a isquemia cerebral, os astrócitos tanto do *core*, quanto da penumbra, são ativados. Esse evento é denominado astrogliose reativa com significativa expressão de GFAP (LI *et al.*, 2012). Quando ativados, os astrócitos estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que recrutam mais células inflamatórias para o local da lesão (WANG *et al.*, 2004). Essas citocinas atuam por quimiotaxia e, promovem aumento na expressão de moléculas de adesão na superfície endotelial (CARLSON *et al.*, 1998). Vários estudos relacionados à neuroinflamação após isquemia cerebral experimental em animais têm demonstrado astrogliose reativa pelo aumento significativo de expressões de GFAP (HUANG *et al.*, 2015; SONG *et al.*, 2015). Yang *et al.* (2011), demonstraram que terapias anti-inflamatórias diminuíram significativamente a expressão de GFAP em animais isquemiados.

Na zona de isquemia, receptores de adesão celular são ativados e neutrófilos migram através da parede dos vasos sanguíneos, invadem o parênquima e liberam mediadores inflamatórios citotóxicos, iNOS e EROS (OHTAKI *et al.*, 2005). Os mediadores inflamatórios mais importantes desses leucócitos são as enzimas lisossômicas, presentes em grânulos, como a mieloperoxidase (MPO) (WANG *et al.*, 2015), além de metabólitos ativos derivados do oxigênio e produtos do metabolismo do ácido araquidônico, incluindo as prostaglandinas e leucotrienos. Esses produtos são potentes em promover a lesão endotelial e tecidual e aumentam os efeitos do estímulo inflamatório inicial (KAWABORI *et al.*, 2015).

O aumento da atividade de MPO tem sido estabelecido como parâmetro indicativo de infiltração leucocitária em processos isquêmicos (SHI *et al.*, 2014) e terapias anti-inflamatórias tem demonstrado reduzir significativamente a atividade de MPO em animais submetidos a isquemia cerebral experimental (WANG *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2014). TNF- α e iNOS são mediadores inflamatórios que estão presentes na cascata fisiopatológica do dano cerebral (BLANCO *et al.*, 2004). Gaire *et al.* (2015) mostraram o aumento da expressão de TNF- α e iNOS em cérebro de animais isquemiados e a redução dessa expressão quando submetidos a terapia anti-inflamatória. A lesão cerebral isquêmica é multidimensional e oferece uma ampla gama de alvos para a intervenção neuroprotetora (OHTAKI *et al.*, 2005).

Desta forma, estudos que visam a compreensão do mecanismo da inflamação e da ação anti-inflamatória de novas moléculas são de suma importância para estabelecer alvos terapêuticos contra a lesão isquêmica após AVE (GAIRE *et al.*, 2015).

1.2.5 Estresse oxidativo na isquemia cerebral

O estresse oxidativo e nitrosativo são processos que contribuem para a lesão isquêmica. Eles ocorrem quando a produção de radicais livres sobrepõem as defesas antioxidantes endógenas. Várias evidências têm mostrado que o oxigênio reativo e nitrogênio são importantes mediadores da lesão tecidual após AVE isquêmico (CHEN, 2001; KELLY *et al.*, 2008). O cérebro é particularmente vulnerável à lesão mediada por radicais livres devido às suas defesas antioxidantes reduzidas (COYLE ; PUTTFARCKEN, 1993; ADIBHATLA ; HATCHER, 2010).

A isquemia cerebral gera o radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), produzido pela mitocôndria, que é uma grande fonte de espécies reativas de oxigênio (EROS) produzidas durante os processos de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa. O anion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) é o radical primário a partir do qual o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é formado, sendo o H_2O_2 a fonte do radical hidroxila (OH^{\bullet}) (BECKMAN ; KOPPENOL, 1996).

A acumulação excessiva de EROS provoca a destruição das moléculas celulares e participa em mecanismos de sinalização que resultam na morte celular por apoptose (HALLIWELL, 1994; SUGAWARA e CHEN, 2003). O óxido Nitrico (NO) e produtos de oxidação relacionados também são importantes na excitotoxicidade. A isquemia ativa a enzima óxido nítrico sintase (NOS) e aumenta a produção de NO, o qual combina com O_2 para produzir peroxinitrito, um oxidante altamente tóxico (BECKMAN ; KOPPENOL, 1996; IADECOLA, 1997).

O grande influxo do Ca^{++} , que ocorre na fisiopatologia do processo isquêmico, ativa a calpaína, uma protease que quebra uma ponte peptídica da enzima xantina desidrogenase (XD). Essa ação, produz a enzima xantina oxidase (OX). O O_2 juntamente com OX, converte a hipoxantina em xantina. Na reperfusão, o excesso de O_2 , causa hiperprodução de xantina. Esta é oxidada em ácido úrico, formando como subproduto, mais O_2^- , H_2O_2 e OH^{\bullet} (SILVA Jr. *et al.*, 2002). O NO também está presente nas lesões de isquemia-reperfusão pós-AVE. O NO reage com O_2^- originando um radical livre altamente reativo, o peroxinitrito ($ONOO^-$)

(CAMPOS e YOSHIDA, 2004). O estresse causado por radicais livres do óxido nítrico (NO) é chamado de estresse nitrosativo (ALLEN ; BAYRAKTUTAN, 2009).

O estresse oxidativo pode causar danos celulares, como desestruturação do citoesqueleto, peroxidação lipídica, lesão nas proteínas, no DNA e RNA (WARNER *et al.*, 2004), predispondo a morte celular por apoptose ou necrose (KUNZ *et al.*, 2010). O estresse oxidativo está presente na fisiopatologia de várias doenças, tais como, doenças neurodegenerativas, doenças cardíacas, aterosclerose, câncer, diabetes, entre outras (TAYLOR *et al.*, 2013). Na isquemia cerebral, o estresse oxidativo desempenha um papel crucial na sua fisiopatologia pela grande susceptibilidade do cérebro ao estresse, devido a alta taxa de metabolismo de O₂, grande quantidades de ácidos graxos insaturados, altas reservas de ferro e sistema antioxidante ineficiente (ALLEN ; BAYRAKTUTAN, 2009).

Para combater os radicais livres o organismo produz uma série de enzimas antioxidantes. Por exemplo, a glutathione peroxidase (GSHPX) que converte H₂O₂ em H₂O; a superóxido dismutase (SOD), que está presente no citosol, na mitocôndria e no meio extracelular, produz H₂O₂ através de uma reação de dismutação a partir do O₂⁻; e a catalase, que tem como principal função eliminar peróxido formado no peroxissoma, diminuindo o risco da formação de radical hidroxil. Além dos antioxidantes endógenos, o corpo pode se beneficiar de antioxidantes provindos da dieta, como a vitamina C e E (CHAN, 1996).

1.2.6. Morte Celular na Isquemia Cerebral

Quando as lesões isquêmicas se tornam irreversíveis, as células atingidas são induzidas à morte. Coexistem dois tipos de morte celular após a isquemia: necrose e apoptose (DEVARAJAN, 2006). A necrose é caracterizada por edema citoplasmático, destruição de organelas, perda da integridade da membrana celular e liberação de conteúdos celulares para o meio extracelular, através de uma forma passiva de energia, “independente de mecanismos de regulação” que comumente estão presentes na apoptose (JOUAN-LANHOUE *et al.*, 2014).

A apoptose é um processo ordenado de morte celular (LI *et al.*, 2013) e está presente em várias condições fisiológicas e patológicas, como na isquemia, trauma cerebral e outras doenças neurodegenerativas (FRIEDLANDER, 2003). É estimulada por várias vias de sinalização, que podem ser classificadas como vias intrínsecas e extrínsecas. Existem

receptores de membrana celular que quando ativados, sinalizam a ação de proteases, denominadas caspases (NAGATA ; GOLSTEIN, 1995).

O mecanismo desencadeante da apoptose é a ativação das caspases, constituído de caspases iniciadoras e caspases efetoras. Ambas as vias (intrínsecas e extrínsecas) induzem a ativação das caspases. A partir de sinais específicos e indutivos de morte celular, as caspases iniciadoras (8 e 9) ativam as caspases efetoras (3, 6, e 7) (LI *et al.*, 2013). As alterações celulares presentes na apoptose, incluem, fragmentação do DNA, condensação da cromatina e desarranjo dos micro túbulos. Esses processos contribuem para a fragmentação celular, induzindo a formação do que se conhece por “corpos apoptóticos”. Esses corpos são envoltos por membrana celular, contendo no seu interior, citoplasma e massas negras de cromatina. Essas estruturas são removidas do parênquima por fagocitose. No entanto, não estimulam resposta inflamatória. A necrose, por sua vez, estimula a produção de mediadores inflamatórios e consequente quimiotaxia (LI *et al.*, 2013).

No processo de isquemia e reperfusão cerebral, a apoptose é induzida, principalmente, pela ativação de receptores da família TNF ou Fas (*First apoptosis signal*), os quais expõem uma proteína de domínio da morte (p. ex. FADD) que se liga à pró-caspase 8 ativando-a. Uma das vias subsequentes é a clivagem da pró-caspase 3 em caspase 3 ativada, que ativa proteases que causam lesão ao DNA (p. ex. CAD) e morte celular. A caspase-8 ativada também é capaz de ativar uma das proteínas da família Bcl-2, a Bid, que aumenta a permeabilidade mitocondrial e a liberação de citocromo c, iniciando a via mitocondrial de apoptose (Figura 4). A citocromo c é uma proteína que participa da cadeia respiratória mitocondrial, porém quando presente no citosol interage com proteínas ativadoras de proteases apoptóticas (p. ex. Apaf). Esta interação forma um apoptossomo que ativa a caspase-9, a qual cliva caspase-3 seguindo a apoptose (SUGAWARA *et al.*, 2004; KUNZ *et al.*, 2010).

A isquemia cerebral desencadeia a ativação de diferentes vias intracelulares, dentre elas a das proteínas quinase ativadas por mitógeno (*Mitogen Activated Protein Kinases - MAPK*). Essas proteínas regulam os processos de diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (LENNMYR *et al.*, 2002) ou apoptose (LI *et al.*, 2013). Os três maiores subgrupos de MAPKs são: quinase regulada por sinal extracelular (ERK), quinase cjun-NH2-terminal (JNK) e p38 (LENNMYR *et al.*, 2002). A ativação das proteínas quinases ocorre por fosforilação (MORRISON ; DAVIS, 2003) em uma cascata de ativação sequencial, iniciada

por MAPKKK seguida de ativação das MAPKK em resíduos de serina e treonina. As MAPKK, por sua vez, reconhecem e catalisam a fosforilação num motivo treonina-X-tirosina (ThrX-Tyr) na alça de ativação das MAPK, onde X corresponde a diferentes aminoácidos entre os sítios da dupla fosforilação (SIOW *et al.*, 1997). A ativação de MAPK em resposta à isquemia cerebral ainda não está completamente entendida (LENNMYR *et al.*, 2002).

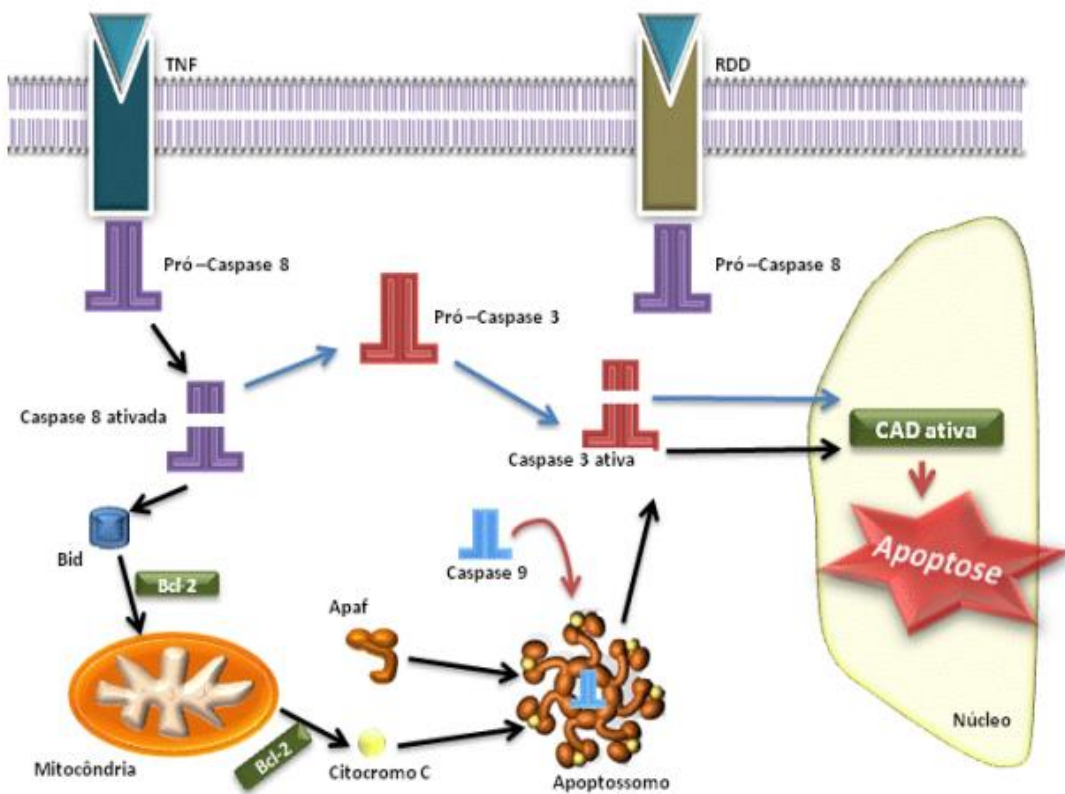


Figura-04. Principais vias de ativação de caspases na isquemia e reperfusão cerebral. Via de ativação direta de caspase3 (seta azul) e via mitocondrial (seta preta). RDD: receptor com domínios de morte, Apaf: fator ativador de proteases apoptóticas.

1.3 Isquemia Cerebral Focal: Modelos Experimentais *in vivo*

O AVE causado por oclusão vascular cerebral pode ser reproduzido por diferentes técnicas: Oclusão permanente da Artéria Cerebral Média (pMCAO), Oclusão transitória da Artéria Cerebral Média (MCAO), oclusão trombótica por meio de injeção de coágulos sanguíneos ou trombina na artéria cerebral média ou por foto-trombose após injeção intravenosa do corante Rosa Bengala. Além de modelos para o curso arterial, têm sido desenvolvidos também modelos animais para trombose de seio venoso cerebral, uma forma rara de acidente vascular cerebral (BACIGALUPPI *et al.*, 2010).

De acordo com a classificação experimental de isquemia cerebral através da distribuição da região de infarto, se conhece dois tipos de modelo de isquemia: a global e a focal. A isquemia global ocorre quando há falência circulatória e a isquemia focal ocorre quando o fluxo sanguíneo cerebral é limitado em uma região específica, geralmente resultado da oclusão de uma artéria cerebral. Existe ainda o modelo multifocal, onde várias pequenas regiões são atingidas (LIPTON, 1999).

A isquemia cerebral focal tem sido produzida por uma variedade de métodos, e as variações na indução do infarto são atribuídas à diversidade de espécies e às técnicas empregadas (TAKAMATSU, 2002). Os modelos não trombóticos são obtidos por abordagem cirúrgica direta, através de craniectomia temporal e oclusão da artéria cerebral média (ACM). Nos modelos trombogênicos, são utilizados agentes como: trombo sanguíneo, microesferas de látex, acetato de polivinil injetados na artéria carótida comum (ACC) ou na artéria cerebral média (ACM). Em testes de comportamento motor, dependendo do modelo, o animal apresenta diferentes graus de comprometimento funcional no lado contralateral à isquemia (OTERO, 2009).

O polígono de Willis é um círculo de artérias que suprem o cérebro. O arranjo das artérias no polígono de Willis cria uma redundância na circulação cerebral. Se uma parte do círculo estiver bloqueada ou estreitada (estenose), ou se uma das artérias que suprem o polígono está estreitada ou bloqueada, o fluxo sanguíneo dos outros vasos sanguíneos pode muitas vezes preservar a perfusão cerebral o suficiente para evitar sintomas de isquemia. As carótidas internas direita e esquerda originam-se das artérias carótidas direita e esquerda. As artérias cerebrais anteriores e médias e as artérias comunicantes posteriores originam-se na trifurcação da artéria carótida interna. As artérias cerebrais posteriores direita e esquerda originam-se da artéria basilar, que é formada pelas artérias vertebrais direita e esquerda. As artérias vertebrais, por sua vez, originam-se nas artérias subclávias. A artéria comunicante anterior conecta as duas artérias cerebrais anteriores (TRAYSTMAN, 2003) (Figura 05).

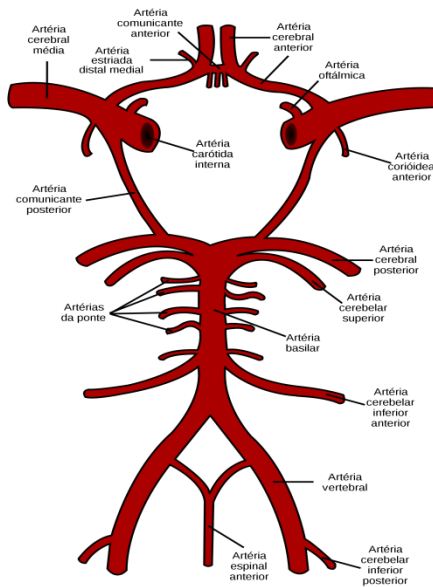


Figura 05- Representação esquemática do Polígono de Willis

A principal diferença entre a isquemia global e a focal está no fluxo sanguíneo, onde nos modelos focais este fluxo é maior na região do core em relação aos dos modelos globais. Nos modelos focais necessita-se de um maior tempo de isquemia para causar o dano, além disso, a lesão aumenta da região do core para a borda da lesão, denominada de penumbra, com características metabólicas diferentes, tornando assim mais complexa a lesão por isquemia focal (LIPTON, 1999).

No AVE humano a principal artéria acometida é a artéria cerebral média (ACM), que irriga a região lateral do hemisfério e estruturas corticais e subcorticais. Por este motivo os modelos de isquemia focal cerebral mais estudados são os da oclusão da artéria cerebral média. A oclusão pode ser permanente (sem reperfusão) ou transitória (reperfusão) (LIPTON, 1999; DURUKAN, TATLISUMAK, 2007).

No presente trabalho foi utilizado o modelo de eletrocauterização da artéria cerebral média (pMCAO), que leva a interrupção permanente do fluxo sanguíneo cerebral. Este modelo foi descrito por Tamura, 1981 e é muito utilizado pois produz uma lesão isquêmica cerebral similar a lesão causada pelo modelo de introdução do fio intraluminal. Este modelo causa dano nas regiões cerebrais do córtex temporal e corpo estriado (LIPTON, 1999; TRAYSTMAN, 2003).

1.4 Memória e isquemia cerebral

O AVE promove problemas de cognição, como déficits de memória (AVIRAM et al., 2001). Alguns trabalhos têm demonstrado déficits na aquisição e retenção da memória após a oclusão da artéria cerebral média em animais, utilizando o teste de esquiwa passiva, Y-maze, reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris (WOOD *et al.*, 1993; MUMBY *et al.*, 1996; CARMO *et al.*, 2014; FERNANDES *et al.*, 2014; SARKAKI *et al.*, 2015).

A memória é um processo cognitivo de armazenamento de informações. O SNC adquire informações constantemente através do aprendizado e demais acontecimentos da vida. Entretanto, apenas uma pequena parte dessas informações é retida de forma duradoura. Existe um processo de seleção para a armazenagem da informação na memória e a sua duração é determinada pelo impacto emocional, grau de atenção e importância dessa informação no processo de sua aquisição. A memória é estudada num processo constituído de fases, respeitando a uma sequência de eventos que corresponde à aquisição, consolidação e evocação da informação (IZQUIERDO, 1998).

Com base nas pesquisas de Xavier (1993, 1996), Izquierdo (1997) e Squire e Kandel (2003) a memória é dividida em três grandes sistemas: memória imediata, operacional e de longo-prazo. A memória de longo-prazo seria subdividida em memória declarativa (ou explícita) e não declarativa (ou implícita) (Figura 06). As memórias episódicas e semânticas estariam incluídas na memória declarativa. Já a memória não declarativa compreenderia as procedurais (habilidades e hábitos), pré-ativação e condicionamento, além das aprendizagens não associativas: habituação e sensibilização.

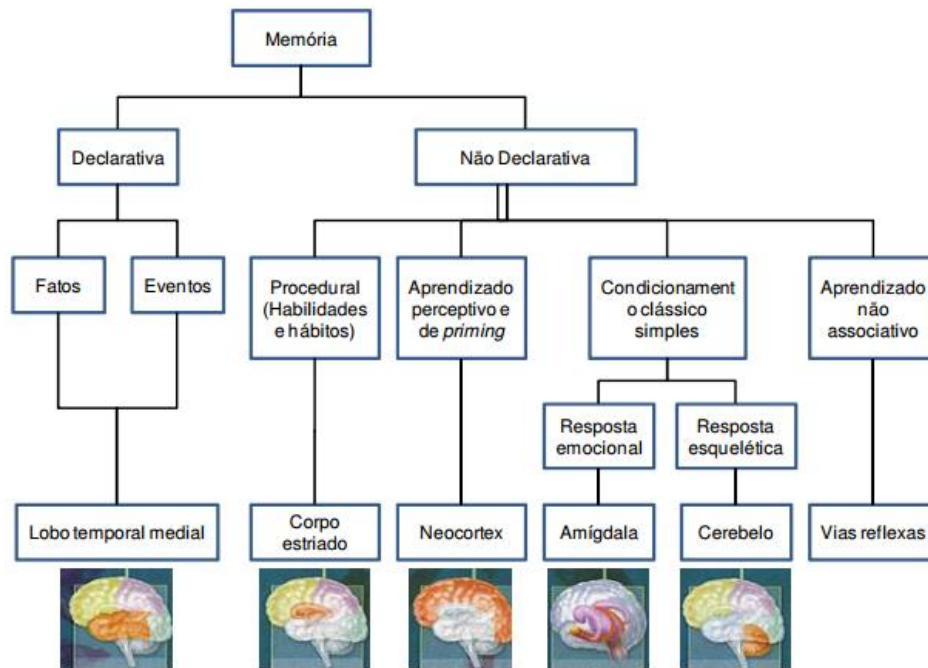


Figura 06. Classificação da memória (Bayley e Squire, 2003).

A memória Imediata, também chamada de memória de curto prazo (XAVIER, 1993) ou memória de trabalho (IZQUIERDO, 1998). Este tipo de memória dura alguns segundos, no máximo alguns minutos, a informação que está sendo processada no momento; sua capacidade é limitada e as informações são mantidas por processos de atenção e ensaio. Esta memória não deixa traços e não produz arquivos. A memória imediata é processada, basicamente, pelo córtex pré-frontal (SQUIRE e KANDEL, 2003).

A memória operacional, também chamada de curta-duração (IZQUIERDO, 1998) ou memória de trabalho (SQUIRE e KANDEL, 2003), retém as informações durante um período de tempo cuja duração é determinada pelo lapso temporal intercalado entre o momento da aquisição da informação e aquele no qual sua evocação deixa de ser útil ou necessária; sua capacidade não é limitada. Esta memória deixa traços e produz arquivos, os quais, em determinado momento, podem desaparecer ou então ser enviados para a memória de longo prazo. Esta memória depende dos respectivos sítios de processamento sensoriais – de acordo com a origem perceptual da informação – e de estruturas do lobo temporal, em especial da formação hipocampal (KANDEL; DUDAI; MAYFORD, 2014; IZQUIERDO, 1997).

A memória de longo prazo é uma memória permanente. As informações são armazenadas após o processo de consolidação. É dividida em memória declarativa ou

explícita e memória não declarativa ou implícita. A memória declarativa ou explícita o acesso a informação é consciente. São processadas as memórias para eventos, fatos, palavras, faces, música – todos os vários fragmentos do conhecimento que fomos adquirindo durante uma vida de experiências e aprendizado, conhecimento que pode potencialmente ser declarado, trazido à mente de uma forma verbal ou como uma imagem mental. Nesta memória são armazenadas as informações sobre as pessoas, os lugares e os eventos da vida diária. O processamento das informações na memória declarativa para sua consolidação e evocação está sujeito à relevância, conteúdo afetivo e número de informações associadas. Nesta memória estão envolvidas as estruturas do lobo temporal medial, diencéfalo e respectivos sítios de processamento sensoriais. É o tipo de memória que está prejudicada nos pacientes amnésicos. A memória declarativa ou explícita é dividida em memória episódica e semântica. A memória episódica são as memórias para eventos, sendo autobiográfica; refere-se à capacidade de experimentar novamente um evento no contexto no qual ele ocorreu e a memória semântica reúne as memórias para fatos; refere-se à capacidade de evocar fatos e conhecimentos gerais acerca do mundo (XAVIER, 1993 e 1996, IZQUIERDO, 1998, SQUIRE e KANDEL, 2003).

A memória não declarativa ou implícita, também chamada de procedimento, as informações são adquiridas gradualmente ao longo de diversas experiências, depende de mudanças cumulativas cuja ocorrência se dá a cada ocasião na qual a memória é acionada. A memória implícita requer treinamento repetitivo para a aquisição do comportamento e que a aquisição ocorre de forma gradual. As informações processadas neste sistema resultam da experiência. Depois de tornada automática, não há acesso consciente ao conteúdo da informação e o processo é independente da atenção. As alterações nos sistemas de processamento para modificação da eficiência sináptica se dá em função de sua utilização repetitiva, ou seja, do treino. O processo de consolidação não depende das estruturas do lobo temporal, mas sim da tarefa, o que provoca a ativação repetida nos sítios de processamento sensoriais. Os subsistemas da memória não declarativa estão associados a diferentes estruturas do sistema nervoso: habilidades e hábitos associam-se aos núcleos basais, pré-ativação ao neocórtex, condicionamento clássico simples relaciona-se à amígdala nas respostas emocionais e ao cerebelo nas respostas da musculatura esquelética, a aprendizagem não-associativa, por seu turno, vincula-se às vias reflexas (CARRILLO-MORA, 2010)

Habilidade motora constitui um conjunto de procedimentos ou sequências motoras para operar no ambiente, elenco este caracterizado por movimentos coordenados das mãos e pés. O treino promove a melhora ou aperfeiçoamento do desempenho motor para realizar determinada tarefa. Na fase de aprendizagem estão envolvidos o cerebelo, córtex pré-frontal e lobo parietal (área para atenção visual). Depois da aprendizagem, as estruturas ativadas para a realização da tarefa são fundamentalmente o neocórtex (núcleo caudado e *putamen*) e os sítios de processamento motores (IZQUIERDO, 1998). A consolidação da memória envolve uma complexa rede de sistemas cerebrais e eventos moleculares seriais e paralelos, mesmo para uma tarefa simples como evitar um julgamento. Izquierdo e colaboradores, (2006) propôs que estes eventos moleculares também pode estar envolvido em muitos outros tipos de memória em animais e humanos.

Hábitos são comportamentos resultantes de treinamento, caracterizados pelas associações simples (tarefas de discriminação simples), associações aprendidas que podem ser utilizadas a qualquer momento dependendo dos aspectos não temporais do contexto. O núcleo caudado tem especial importância no desempenho dos hábitos. Habilidades perceptuais e cognitivas são as habilidades desenvolvidas com o treino da leitura e leitura no espelho; o desempenho depende fundamentalmente dos sítios de processamento sensoriais. Pré-ativação, também chamada de representação perceptual, é caracterizada pelo viés ou facilitação do desempenho em função da apresentação prévia de informações. Sua função seria a de melhorar a percepção de estímulos defrontados recentemente. Os sítios de processamento sensoriais e o córtex pré-frontal estão relacionados ao desempenho deste subsistema da memória não declarativa. O condicionamento clássico simples está relacionado à amígdala nas respostas emocionais e ao cerebelo nas respostas da musculatura esquelética. A aprendizagem não associativa (habituação e sensibilização) está associada às vias reflexas (IZQUIERDO, 1997). Zola-Morgan, Amaral, 1986, relataram o primeiro caso de amnésia humana em que detalhou análises neuropsicológicas e análises neuropatológicas post-mortem ,demonstrando que um dano limitado à formação do hipocampo foi suficiente para produzir o prejuízo da memória anterógrada.

1.5 Alcaloides e Neuroproteção

Alcaloides são moléculas de caráter básico derivadas de plantas, microorganismos e animais. Contém, em sua fórmula, basicamente nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e carbono. Alguns exemplos de alcaloides destacam-se a cafeína (do café, que é chamada de

pseudoalcaloide por ser, na verdade, uma xantina), cocaína (da coca), pilocarpina (do jaborandi), psilocibina do cogumelo *Psilocybecubensis*, heroína, papaverina, morfina, codeína (da papoula). Os alcaloides têm massa molecular entre 100 e 900 dalton. Possuem propriedades terapêuticas, como: neurodepressoras, anestésica, analgésica, psicostimulantes, anti-inflamatórias e antioxidantes (SIMÕES, 1999).

Os alcaloides são divididos em classes, como: isoquinolínico simples, aporfínico, noraporfínico, oxoaporfínico. Particularmente, da classe dos aporfínicos, se destacam: boldina, apomorfina, bracteolina, coridina, glaucina, isodomeesticina, liridina, nuciferina (SIQUEIRA, 2010).

Existem muitas plantas medicinais que contêm alcaloides, como a vinca (*Catharanthus Roseus*) e sua importância como fonte de vincristina, útil na quimioterapia contra o câncer. O ópio originado da papoula (*Papaver Somniferum*) usado medicinalmente há séculos no oriente, em locais como a China, a Índia e países próximos. O ópio contém vários alcaloides, tais como, morfina, papaverina e codeína. O extrato alcoólico de ópio foi muito usado como analgésico durante a guerra civil americana, para aliviar as dores dos feridos em combate, inclusive das numerosas vítimas de amputações. A morfina é o agente do ópio responsável pela atividade anestésica e hipnótica. A cafeína é um estimulante do sistema nervoso central, principalmente do cérebro. Aumenta a capacidade de concentração e de vigília, é um estimulante cardíaco e respiratório, relaxa a musculatura dos brônquios (VILAVERDE, *et al.*, 2003). Pesquisadores da *Harvard School of Public Health* divulgaram estudos, em julho de 2013, que mostram que a cafeína não apenas estimula o sistema nervoso central, mas também pode atuar no organismo como um antidepressivo leve, elevando a produção de determinados neurotransmissores (serotonina, dopamina e noradrenalina) no cérebro. A teobromina, principal alcaloide da semente do cacau, tem atividade estimulante no cérebro e é relaxante dos músculos lisos.

Howes e Houghton, (2003), publicou uma revisão bibliográfica sobre várias plantas utilizadas nas medicinas tradicionais da China e da Índia para melhorar a memória e funções cognitivas, tais como *Clitoria ternatea*, *Ginkgo biloba*, *Poligala tenmifolia*, *Salvia miltiorrhiza*, *Magnolia officinalis*, *Lycoris radiata* e *Huperzia serrata*. Entre os alcaloides se destaca a huperzina A (huPA), um novo alcaloide isolado a partir da erva chinesa *Huperzia serrata*, é um inibidor potente, altamente específica e reversível da acetilcolinesterase (AChE). Em comparação com tacrina, donepezil, e rivastigmina, a huPA tem uma melhor penetração

através da barreira sangue-cérebro, uma maior biodisponibilidade oral e maior duração da ação inibidora de AChE. Os estudos farmacocinéticos em roedores, caninos, e voluntários humanos saudáveis indicam que huPA foi absorvida rapidamente, amplamente distribuída no organismo, e eliminada a uma taxa moderada, com a propriedade de liberação lenta e prolongada após administração oral. Os ensaios clínicos de fase IV na China demonstraram que huPA melhorou significativamente os déficits de memória em idosos com esquecimento senescente benigno. Utilizada no tratamento da doença de Alzheimer por inibir a enzima acetilcolinesterase (WANG; YAN; TANG, 2006). Este alcaloide tem sido submetido ao teste clínico duplo cego controlado por placebo em pacientes com Alzheimer, com significativo aumento na função cognitiva e qualidade de vida (ZANGARA, 2003).

Em estudos clínicos o extrato seco do boldo prolongou o tempo de trânsito oro-cecal quando estudado em 12 voluntários, demonstrando o seu uso medicinal (PANIZZA, 2006). Em combinação com a cáscara sagrada, o boldo tem sido usado para tratar a constipação em idosos. Nenhum dado clínico sobre o uso do boldo como um anti-inflamatório e antipirético foi encontrado.

A boldina causa inibição da agregação plaquetária decorrente da não formação do tromboxano A₂, tanto em modelos animais como em amostras de sangue humano. Pacientes que estão sob a terapia de anticoagulantes não devem ingerir concomitantemente medicamentos contendo Boldo pela ação aditiva à função antiplaquetária de anticoagulantes (TENG *et al.*, 1997).

Estudo tem reportado a capacidade antiinflamatória (GYURKOVSKA *et al.*, 2015) e antioxidante (MUTHNA *et al.*, 2013) dos aporfinóides. Partindo do ponto de vista que a inflamação e o estresse oxidativo são determinantes para a cascata isquêmica, levando a infarto cerebral e aos déficits cognitivos já discutidos, é relevante dar continuidade a investigação dos efeitos neuroprotetores dos aporfinóides, como por exemplo, a boldina, que demonstrou proteger animais do dano cerebral isquêmico. No entanto, não existem na literatura estudos que relatem seus efeitos sobre déficits de memória.

1.6. Boldina

A boldina(S)-2,9- diidroxi-1,10-dimetoxi-aporfina é um alcaloide encontrado na espécie *Peumus boldus* Molina (boldo-do-chile) (Figura. 07). As folhas de boldo contêm entre 0,4 e

0,5% de, pelo menos, 17 alcalóides diferentes da família dos derivados benzilisoquinolínicos, sendo que a boldina representa 12 a 19 % do conteúdo total de alcaloides (O'BRIEN *et al.*, 2006). O Boldo (*Peumus boldus* Molina) é uma espécie arbórea, pertencente à família Monimiaceae e nativa das regiões central e sul do Chile, onde ocorre abundantemente. Suas folhas são usadas na medicina popular para tratamento de problemas digestivos e hepáticos. O boldo é também empregado na medicina homeopática (SPEISKY e CASSELS, 1994; BRANDÃO *et al.*, 2006; AGRA *et al.*, 2007).

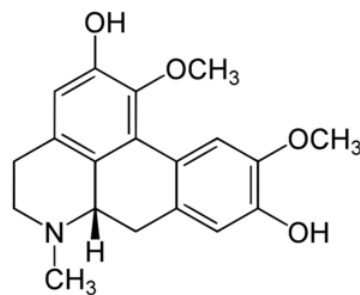


Figura 07. Estrutura molecular da boldina

Aporfinoides formam um importante grupo de metabólitos secundários de plantas. Alguns destes compostos são utilizados há muito tempo na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças, desde síndromes benignas a doenças mais graves. Mais de 500 alcaloides aporfínicos já foram isolados a partir de várias famílias de plantas e muitos destes compostos apresentam atividade citotóxica, podendo ser explorados para o uso como agentes anti-cancerígenos (STÉVIGNY, 2005).

Jiménez *et al.* (2000) realizaram alguns experimentos *in vitro* e *in vivo* a fim de conhecer melhor a farmacocinética da boldina. Os estudos *in vivo* realizados em ratos, eles descreveram que tanto após administração oral quanto intravenosa, a concentração plasmática da boldina decaiu rapidamente, indicando aparentemente uma cinética de primeira ordem. Foi rapidamente absorvida (30 min) e concentrada preferencialmente no fígado, sendo encontradas concentrações bem menores no coração e no cérebro.

Youn e colaboradores, (2002) mostraram que a boldina pode atenuar a disfunção mitocondrial do cérebro de ratos induzida por catecolaminas e diminuir a morte induzida por dopamina de células PC12 através de uma ação captadora de radicais livres. A boldina mostrou-se capaz de atenuar a inativação do citocromo P450 humano e de inibir a peroxidação de lipídios em microsossomos hepáticos tratados com agentes redutores

(KRINGSTEIN; CEDERBAUM, 1995), de abrandar o desenvolvimento de diabetes por estreptozotocina em ratos (JANG *et al.*, 2000) e de proteger células vermelhas da clivagem hemolítica induzida *in vitro* por 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) (JIMÉNEZ *et al.*, 2000).

A boldina também exerce algumas ações inibidoras no sistema nervoso central, estas incluem ações neurolépticas, anticonvulsivantes e antinociceptivas, o que pode provavelmente ser mediada através do bloqueio de dopamina em receptores D2 (ZETLER, 1988). Estudo demonstrou que a boldina é capaz de inibir a perda da atividade catalítica *in vitro* de enzimas como a lisozima, quando em contato com radicais peroxilas (CASSELS *et al.*, 1995). Este efeito está associado com a inibição da oxidação de resíduos de triptofano da enzima, de forma que a boldina pode proteger não somente lipídios, mas também aminoácidos envolvidos na atividade catalítica de determinadas enzimas (JIMÉNEZ *et al.*, 2000).

Considerando a atividade anti-inflamatória, a boldina se mostrou muito efetiva em reduzir edema em pata de cobaias induzido por carragenina e na prevenção do aumento da temperatura retal em coelhos tratados com pirogênios bacterianos, essa ação pode ser devido a sua atividade antioxidante, já que moléculas que podem interferir na geração de EROS podem, também, possuir propriedades anti-inflamatórias (BACKHOUSE, 1994). Segundo Gotteland *et al.* (1997), a boldina tem propriedades antiinflamatórias (redução da extensão dos danos produzidos pela administração intra-retal de ácido acético em animais) e citoprotetoras (redução da infiltração de neutrófilos em animais submetidos à administração de ácido acético via intra-retal)(MOREIRA FILHO e GOUTCHER, 1972).

Em relação a farmacodinâmica e a farmacocinética da boldina, Kang, Cheng e Fu, (1998) mostraram que o bloqueio neuromuscular da boldina em isolado de nervo-frênico do diafragma de rato pode ser devido à sua interação direta com o receptor nicotínico de acetilcolina pós-sináptico. Kang e Cheng, (1998) observaram que a boldina na concentração de 300 μ M pode induzir a contração muscular de duas maneiras, uma pelo influxo de Ca^{++} extracelular e a outra pela indução da liberação de Ca^{++} armazenado internamente no retículo sarcoplasmático onde concluíram que boldina poderia sensibilizar o receptor de rianodina (receptor de canais de cálcio) e induzir a liberação de Ca^{++} , a partir do Ca^{++} interno local de armazenagem do músculo esquelético.

Este alcaloide apresenta baixa toxicidade, mostrado pelas altas doses necessárias para induzir morte em várias espécies de mamíferos (15g de boldina, administradas oralmente,

foram necessárias para matar um cão de 12 kg, da mesma forma, 500 e 1000mg/kg foram requeridos para matar camundongos e porcos da índia), respectivamente (SPEISKY e CASSELS, 1994). Já para administrações intraperitoneais foi encontrado o valor de DL50 de 250mg/kg para ratos (ESCOP, 1997). Estudo confirma que a boldina, administrada intraperitoneal em doses subletais, não induziu sinais de genotoxicidade na medula óssea de ratos no teste de micronúcleo (SPEISKY e CASSELS, 1994).

A ação antioxidante da boldina é responsável por propriedades farmacológicas, como por exemplo, anti-tumoral, anti-diabéticas e anti-aterogênicas. Ainda, a boldina mostrou atividades como vasodilatadoras, antiparasitárias, imuno e neuro-moduladores e coleréticos (O'BRIEN, 2006). No entanto, os efeitos da boldina sobre a neuroinflamação (*in vivo*) e sobre os déficits de memória após a oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO) encontram-se desconhecidos, daí a importância deste estudo.

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Os acidentes vasculares encefálicos foram causa de 172.298 internações em 2011 no país e, em 2010 causaram a morte de 99.159 indivíduos (GARCIA, 2012). A alta incidência de doenças cerebrais isquêmicas e hemorrágicas é devido a mudanças no estilo de vida das pessoas, como o consumo de alimentos ricos em gorduras, o tabagismo e o estresse diário excessivo (OHTAKI *et al.*, 2005). Muitos pacientes após um AVE apresentam consequências crônicas complexas podendo resultar em vários problemas, como atividades do dia-a-dia, na comunicação, na mobilidade e interação interpessoal e social (SCHEPER *et al.*, 2007). Estes dados, por si, justificam a importância da investigação de substâncias neuroprotetoras para a prevenção e tratamento das doenças cerebrovasculares.

O dano inflamatório desempenha um papel importante na patogênese da isquemia cerebral e constitui um alvo para a prevenção e tratamento (ZHAO *et al.*, 2014). Terapias anti-inflamatórias têm mostrado serem eficazes na redução do dano isquêmico e déficits de memória ocasionados por modelos de AVE experimental (HUANG *et al.*, 2014).

Assim, faz-se necessária a busca por substâncias que possam atuar na neuroproteção de pacientes de risco. Apesar de muitos estudos buscarem drogas neuroprotetoras para a isquemia cerebral, poucos se mostraram realmente efetivos (FU *et al.*, 2015). O presente estudo visa investigar se a boldina, por suas ações anti-inflamatórias e antioxidantes possa vir a ser uma estratégia terapêutica no tratamento do acidente vascular encefálico.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Estudar o possível efeito neuroprotetor da boldina sobre o dano neuronal, comportamento, memória e neuroinflamação em camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente.

3.2. Objetivos Específicos

Estudar o possível efeito neuroprotetor da boldina em camundongos submetidos à pMCAO, analisando os seguintes aspectos:

- ✓ Avaliar o dano neuronal através da coloração de fluoro-jade C, coloração de violeta de Cresil e o TTC;
- ✓ Verificar as alterações motoras e déficits de memória através dos seguintes testes comportamentais: campo aberto, labirinto em Y, esQUIVA inibitória, reconhecimento de objetos e labirinto aquático;
- ✓ Examinar a resposta inflamatória através do estudo da atividade da mieloperoxidase, imunohistoquímica para TNF- α e iNOS;
- ✓ Investigar a ativação astrocitária através da imunohistoquímica para GFAP.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos albinos adultos *Swiss* (Espécie: *Mus Musculus*), machos, pesando entre 30 e 40g provenientes do biotério central do Campus do Pici, da Universidade Federal do Ceará (UFC) e transferidos para o biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, UFC. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas apropriadas, forradas com raspa de madeira, com ciclo de claro/escuro de 12h/12h e alimentados com ração padrão e água à vontade. No que se refere aos cuidados com os animais, este estudo seguiu os princípios éticos da experimentação animal, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA), da UFC, sob o número de registro 43/2013.

4.2. Drogas

Boldina (SIGMA, EUA); cloridrato de xilazina 2% (Kensol[®] laboratórios König S.A, Argentina); Cloridrato de Ketamina 5% (Vetanarcol[®], Laboratórios König S.A, Argentina). Todos os reagentes utilizados eram de grau analíticos.

4.3. Protocolo experimental

Foram utilizados 156 animais divididos entre os grupos falso-operados tratados com veículo ou boldina na dose de 25mg/kg, isquemiados tratados com veículo e isquemiados tratados com boldina nas doses 8,16 e 25 mg/kg intraperitoneal (Tabela 1).

A Boldina foi isolada a partir do *Peumus boldus* Molina, da marca Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) e dissolvida com solução de HCl 0,5M (BACKHOUSE *et al.*, 1994). As concentrações da boldina foram escolhidas baseadas em estudos anteriores (BACKHOUSE *et al.*, 1994; JIMÉNEZ, I.; SPEISKY, H., 2000; HERNÁNDEZ-SALINAS *et al.*, 2013).

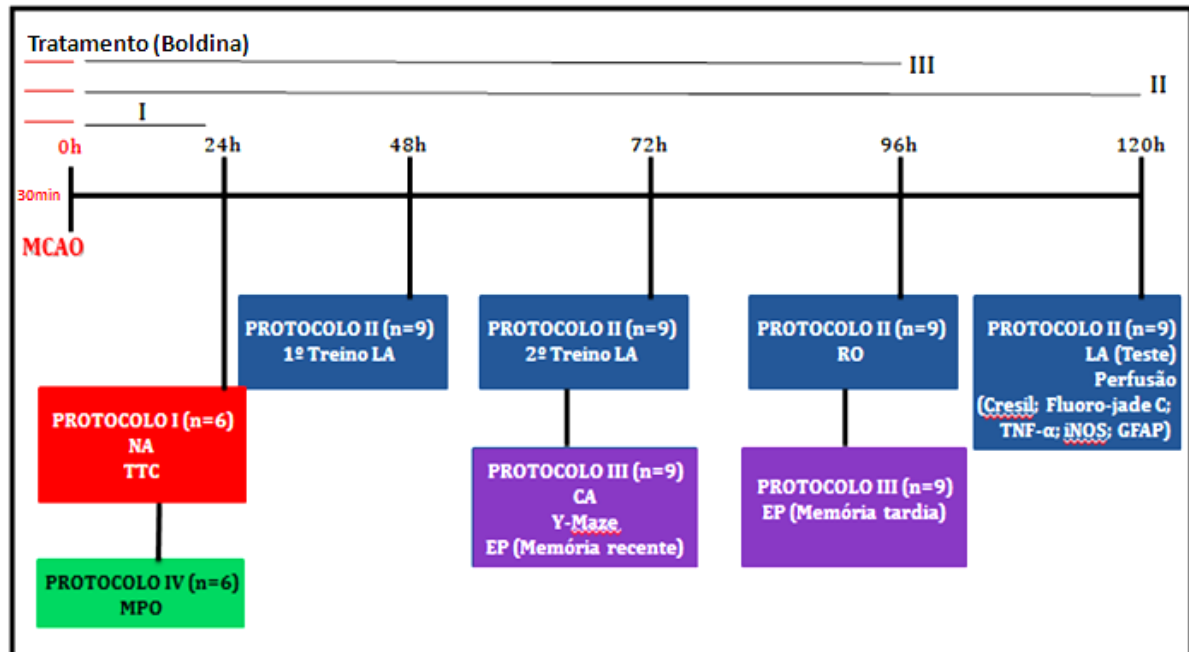
Tabela 1- Grupos de tratamento.

Grupos	Tratamento
1	Animais falso-operados (FO) e tratados com veículo (solução de HCl 0,025M)i.p.
2	Animais falso-operados (FO) e tratados com boldina na dose 25mg/kg i.p.
3	Animais submetidos à pMCAO e tratados com veículo i.p.
4	Animais submetidos à pMCAO e tratados com Boldina na dose de 8mg/kg i.p.
5	Animais submetidos à pMCAO e tratados com Boldina na dose de 16mg/kg i.p.
6	Animais submetidos à pMCAO e tratados com Boldina na dose de 25mg/kg i.p.

Os animais foram tratados com boldina nas doses de 8, 16 e 25 mg/kg, i.p. 30 minutos antes da pMCAO, com tratamento uma vez ao dia, nos dias seguintes, correspondentes aos testes comportamentais (Quadro 1).

Para a realização dos testes comportamentais foram seguidos quatro protocolos experimentais. Protocolo 1: 24 horas após a cirurgia foi realizada a avaliação neurológica e a análise da área do infarto isquêmico pelo método do TTC(n=6/grupo). Protocolo 2: 48 horas após a cirurgia foi realizado o primeiro treino do labirinto aquático, 72 horas após foi realizado o segundo treino do labirinto aquático, 96 horas após foi realizado o teste de reconhecimento de objetos e 120 horas após foi realizado a retenção do labirinto aquático (n=9/grupo). Ao final do protocolo 2 os animais foram perfundidos com paraformaldeído 4% e seus cérebros fixados com formol tamponado, 24 horas após conservados em sacarose a 30%, sendo depois feito imunohistoquímica para GFAP, iNOS, TNF- α e coloração para fluoro-jade C e Cresil (Quadro 1). Protocolo 3: 72 horas após a cirurgia foram realizados os testes de campo aberto, labirinto em Y e esquiiva passiva (memória recente) e 96 horas após o teste da esquiiva passiva (memória tardia) (n=9/grupo). Protocolo 4: 24 horas após a cirurgia foi realizada a atividade da mieloperoxidase (n=4/grupo).

Quadro 1- Protocolo experimental.



Desenho experimental: Administração de veículo (solução de 0,025M de HCl), boldina (nas doses de 8, 16 e 25 mg/kg (i.p)) 30 minutos antes da cirurgia e uma vez ao dia durante os testes de comportamentos. AN- avaliação neurológica; TTC- cloreto 2,3,5- trifeniltetrazólio. LA-labirinto aquático. RO- reconhecimento de objetos; CA- campo aberto; EP- esquiva passiva; MPO- mieloperoxidase; TNF- α - fator de necrose tumoral alfa; iNOS- óxido nítrico sintase induzível; GFAP- proteína ácida fibrilar glial.

4.4. Isquemia cerebral por oclusão permanente da artéria cerebral média em camundongos (Tamura *et al.*, 1981).

Os animais foram anestesiados com xilazina (10mg/kg) e ketamina (90mg/kg), administradas por via intraperitoneal (i.p) para o procedimento cirúrgico. A temperatura foi mantida entre 36 e 37° C com o auxílio de uma lâmpada. Inicialmente foi realizada uma incisão na linha entre o olho esquerdo e a orelha, o músculo temporal foi rebatido e realizada uma craniectomia com uma broca de 1 (mm), seguido da exposição e cauterização da artéria cerebral média. Em seguida a incisão foi suturada com fio de seda agulhado 4.0, e os animais foram colocados em gaiolas para recuperação da cirurgia com livre acesso a água e comida. Os animais falso-operados (FO) foram submetidos aos procedimentos descritos para isquemia, exceto a cauterização da artéria cerebral média.

4.5. Avaliação neurológica

A Avaliação Neurológica foi realizada 24 horas após a isquemia. Os achados neurológicos foram pontuados utilizando uma escala previamente descrita por Garcia *et al.*, (1995).

Quadro 2- Avaliação neurológica

ESCORES/ PARÂMETROS	3	2	1	0
Atividade espontânea	O animal se move por todo o espaço.	O animal estuda minimamente o espaço.	O animal se move sem estudar o espaço.	O animal não se move
Simetria das 4 patas	Simetria total.	Pata contralateral com menor movimento que a ipsilateral	Movimento mínimo da pata contralateral.	A pata contralateral não se move.
Estiramento das patas dianteira	Simetria total.	Pata contralateral com menor movimento que a ipsilateral	Movimento mínimo da pata contralateral.	A pata contralateral não se move.
Escalada/pressão	Sobe e agarra a grade.	A pata contralateral dificulta a escalada e não agarra a grade.	O animal não se move.	-
Propriocepção corpórea	Resposta Simétrica	O lado contralateral com resposta < que o ipsilateral.	O lado contralateral sem resposta.	-
Resposta ao toque da vibrissa	Resposta simétrica.	O lado contralateral com resposta < que o ipsilateral.	O lado contralateral sem resposta.	-

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

A cada parâmetro foi atribuído um score denominado scores neurológicos, de 0 a 3 para os parâmetros 1, 2 e 3, sendo 0 o mínimo de movimento ou de reação do animal, atribuído a animais com déficit motor e 3, o máximo de movimento ou reação do animal, sendo atribuído a animais sem déficit motor. Para os parâmetros 4, 5 e 6 foram atribuídos scores de 1 a 3, sendo 1 o mínimo de movimento ou de reação do animal, atribuído a animais

com déficit motor e sensorial e 3, o máximo de movimento ou reação do animal, sendo atribuído a animais sem déficit motor e sensorial. O somatório dos escores de todos os parâmetros representou o escore final da avaliação neurológica do animal, sendo 3 o menor valor que pode ser atribuído e 18 o maior valor.

4.6. Quantificação do dano isquêmico através da coloração pelo Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol (TTC) (Goldlust *et al.*, 1996).

O TTC é um sal que ganha um próton da succinato desidrogenase na membrana interna mitocondrial. Neste processo, ele é reduzido para uma forma insolúvel, o formazam, fornecendo uma coloração avermelhada ao tecido composto por células viáveis. As células da região de infarto não possuem mitocôndrias viáveis, desta forma, o processo de redução não acontece, a coloração avermelhada não é gerada, permitindo a área de infarto ser caracteristicamente detectada por uma região pálida. Vinte e quatro horas após a indução isquêmica os animais foram eutanasiados e seus cérebros foram removidos. Conservados em salina gelada até o momento dos cortes, os cérebros foram fatiados na espessura de 2 mm e imersos em solução de 2% de TTC à 37°C por 30 minutos. Em seguida, as fatias foram digitalizadas. As imagens foram analisadas a partir das áreas de infarto e das áreas totais das fatias, empregando-se cálculos das respectivas porcentagens. As extensões das áreas foram mensuradas manualmente utilizando o software Osiris TM (University of Geneva, Switzerland).

4.7. Avaliação da viabilidade celular pela coloração de cresil-violeta e Fluoro-Jade C.

A coloração de cresil-violeta é utilizada para evidenciar os corpúsculos de Nissl presentes no citoplasma de neurônios viáveis (SCORZA *et al.*, 2005). Cinco dias após à indução isquêmica, os animais (n=4/grupo), foram anestesiados com xilazina (10mg/kg) e ketamina (90mg/kg) por via intraperitoneal e perfundidos transcárdialmente com salina, seguido por paraformaldeído a 4% em PBS. Os cérebros foram removidos e fixados com formol tamponado durante 24 h e armazenados em sacarose a 30% (4°C), até a realização dos cortes. Os cortes coronais do córtex e estriado foram feitos em um criostato (Leica CM3050 S, Heidelberg, Alemanha) a -21 °C, e armazenados free floating em PBS (4°C) numa série de “um em seis” de 50 µm (300 µm de intervalo).

Para a coloração de cresil-violeta, os cortes cerebrais foram mergulhados em água destilada durante um minuto, posteriormente, foram incubados na solução de cresil-violeta 0,5% em ácido acético, por um período de três minutos. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em álcool (50, 70 e 100%). Em seguida, foram mergulhadas em xilol e montadas com entellan (Merck, Alemanha). As lâminas foram visualizadas em um microscópio (Nikon Elipse E200) com aumento de 40x. Foram selecionadas três fatias de cada animal, aleatoriamente, ao longo da área da lesão e a quantificação das células foi realizada manualmente utilizando o software Image J (NIH, Bethesda, MD, EUA) com um gride de 100.

As células foram consideradas cresil positivas quando apresentaram coloração violeta no citoplasma das células, bem como, aspectos morfológicos normais (células de forma redonda ou oval com núcleos centralizados). As células foram consideradas cresil negativas quando apresentaram ausência da coloração violeta associada a alterações morfológicas, caracterizados por núcleos celulares encolhidos, acompanhados por núcleos picnóticos. Os resultados foram expressos como percentual de células cresil positivas e negativas.

A coloração de Fluoro-Jade C identifica os neurônios em degeneração (SCHMUEDE *et al.*, 1997). Para isso, as fatias foram lavadas três vezes durante 10 min em PBS, montadas em lâminas histológicas e colocadas para secar em temperatura ambiente durante a noite. No dia seguinte, as lâminas foram imersas em etanol absoluto durante 3 minutos, seguido por 1 min em etanol a 70% e 1 min em água destilada. Após a incubação em 0,06% de solução de permanganato de potássio durante 15 minutos, as lâminas foram enxaguadas com água destilada durante 1 min. Logo após, foram transferidas para uma solução contendo 0,0001% de Fluoro-Jade (Histo-Chem Inc., Jefferson, AR) em ácido acético a 0,1%, num agitador durante 30 minutos, e depois lavadas 3 vezes em água destilada por 1 min cada. Depois, foram colocadas para secar. Por fim, foram imersas em xilol durante 10 minutos e em seguida foram montadas. As lâminas foram analisadas utilizando um microscópio de fluorescência (400x), e foram consideradas células Fluoro-Jade C positivas quando apresentaram fluorescência. Os resultados foram expressos como o número de células Fluoro-Jade C positivas.

4.8. Avaliação da atividade locomotora (Teste de campo aberto) (Broadhurst, 1957).

Para verificar se a cirurgia ou tratamento não acarretou alteração da atividade locomotora, o que prejudicaria a realização dos testes de memória, foi realizado o teste da atividade locomotora usando o modelo de Campo Aberto (*Open Field*) (Figura 08). No teste, o animal foi colocado em uma caixa (um aparato de acrílico preto com o piso dividido em nove quadrantes iguais) e durante 5 minutos foram registrados o número de cruzamentos entre os quadrantes (*crossings*) e o número de episódios em que os animais elevam os membros superiores e a cabeça, ficando apoiado somente pelos membros inferiores (*rearings*). A arena foi limpa com álcool a 20% após cada sessão, para evitar interferência do cheiro de urina e fezes no teste.

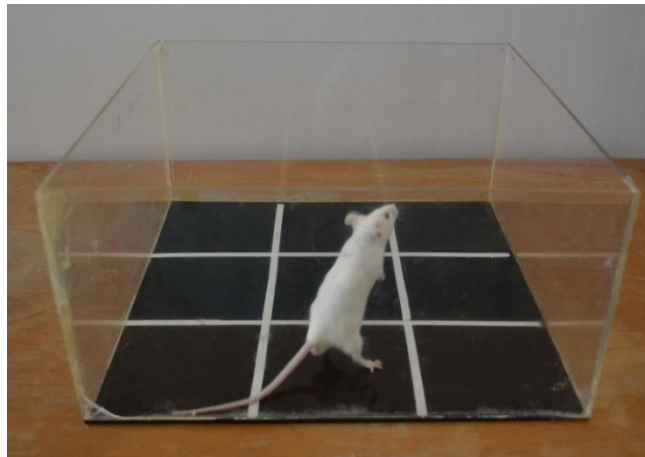


Figura 08: Arena de campo aberto(LNC).

4.9. Avaliação sobre a memória

4.9.1. Avaliação da memória de trabalho- Teste do labirinto em Y (Sarter et al., 1988).

Esse teste avalia o aprendizado e a memória operacional, que tem como principal área envolvida, o córtex pré-frontal. Nesse teste o animal é colocado em um labirinto em forma de Y com os três braços iguais (Sarter et al., 1988). Os animais apresentam forte tendência de alternar a entrada nos diferentes ambientes. O labirinto em Y é composto por 3 braços de madeira com 16 cm de altura, 5 cm de largura e 40 cm de comprimento (Figura 09).



Figura 09. Labirinto em Y (LNC)

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

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

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

4.9.2. Avaliação da memória espacial- Teste do labirinto aquático (Morris , 1984).

Este modelo avalia a memória espacial do animal (participação do hipocampo no processamento de informação espacial). Consiste em um tanque branco circular de acrílico de 91 cm de diâmetro e paredes de 60 cm de altura, em conjunto com uma plataforma de PVC colocada no quadrante nordeste (Figura 10). A água foi deixada turva utilizando tinta atóxica. Após 48 horas da cirurgia foram feitos 2 dias de treino (avaliação do aprendizado) consecutivos. A avaliação da memória espacial foi realizada 120 horas após a indução da isquemia.



Figura 10. Labirinto aquático de Morris (LNC).

No treino o animal foi colocado em 4 locais diferentes do tanque, onde teve 60 segundos para achar a plataforma que ficou submersa a 2 cm da superfície da água. Quarenta e oito horas após o último treino, os animais foram submetidos a avaliação da memória espacial. O animal foi colocado no tanque, sem a plataforma, onde teve 60 segundos para alcançar o local onde estava a plataforma. O tempo de latência, o número de cruzamentos e o tempo de permanências no quadrante da plataforma foram registrados (MORRIS, 1984).

4.9.3 Avaliação da memória aversiva-Teste da Esquiva Passiva (GOLD, 1986).

O teste de esquiva passiva envolve a tendência natural do animal de explorar além da plataforma e envolve o aprendizado de evitar o choque, um componente aversivo que constitui uma resposta condicionada (Figura 11).



Figura 11. Esquiva Passiva (Insight, LTDA).

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

4.9.4 Teste de reconhecimento de objetos (Ennaceur e Delacour, 1988).

O teste de reconhecimento de objetos é baseado na tendência natural dos animais buscarem o novo. Durante o treino o animal foi colocado numa arena quadrada (30 x 30 x 15 cm) de acrílico, contendo dois objetos iguais (OI) e, durante 10 min, o animal pôde explorar o ambiente e os objetos (Figura 12). Após 1h, um dos objetos iguais foi substituído pelo objeto novo (ON) e o animal foi colocado novamente na arena (teste). Durante 5 min o tempo que o animal utilizou explorando cada um dos objetos foi anotado. O resultado foi expresso como índice de reconhecimento e foi obtido através da seguinte fórmula matemática: $(\text{tempo ON} - \text{tempo OI}) / (\text{tempo ON} + \text{tempo OI})$.

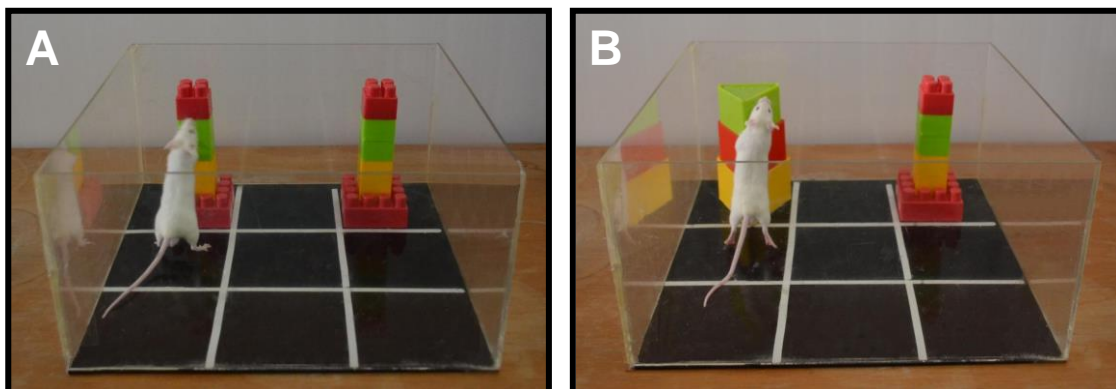


Figura 12. Arena com objetos (LNC).

4.10 Avaliação da Resposta Inflamatória.

4.10.1 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)(Bradley et al., 1982).

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente nos grânulos de neutrófilos. É utilizada como indicador de processo inflamatório, mais especificamente, como marcador de infiltração de neutrófilos para os tecidos. Neste ensaio, o H_2O_2 é clivado por meio da MPO presente nas amostras de tecido. O radical oxigênio (O°) resultante se combina com diidrocloreto de O-dianisidina que é convertido a um composto colorido. O aparecimento deste composto, ao longo do tempo, é medido por espectrofotômetro para determinar o conteúdo de MPO do ensaio.

Vinte e quatro horas após a indução da isquemia os animais foram eutanasiados, seus cérebros rapidamente removidos e amostras do córtex, estriado e hipocampo foram dissecadas e pesadas. As áreas foram homogeneizadas (50mg/mL) em uma solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5 % (HTAB) em tampão fosfato 50 mM, pH 6,0. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm a 4°C por 2 minutos. Adicionou-se 30 μ L do sobrenadante da amostra e 200 μ L da solução contendo 0,167 mg/ml de hidrocloreto de o-dianisidina e 0,0005 % de peróxido de hidrogênio. A absorbância foi medida nos tempos 0,1 e 3 minutos no comprimento de onda 460nm. Os resultados foram dados como unidades de MPO por mg de tecido. E uma unidade de MPO equivale à quantidade de enzima que degrada 1 μ mol/min de peróxido de hidrogênio.

4.10.2. Avaliação da imunoreatividade para TNF- α e iNOS.

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

Para a realização da técnica de imunohistoquímica, as fatias cerebrais foram lavadas três vezes durante 10 min (cada) com PBS e incubadas (PBS + 10% de metanol e 1,05% de peróxido de hidrogênio), durante 40 minutos à temperatura ambiente, para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Depois de lavar 3 vezes durante 10 min (cada) com PBS e

tendo bloqueadas as ligações inespecíficas com soro normal de cabra em PBS a 10% suplementado com Triton X-100 (solução de bloqueio) durante duas horas à temperatura ambiente, as secções foram incubadas com os anticorpos primários (anti-TNF- α , 1: 250 ou anti-iNOS, 1: 400, Santa Cruz Biotechnology) diluída em solução de bloqueio a 4°C durante 48 h. As secções foram então lavadas três vezes durante 10 min, em PBS e subsequentemente incubadas com conjugado de avidina-biotina-peroxidase (coloração Sistema ABC, Santa Cruz Biotechnology), durante 30 min. Após a lavagem, as lâminas foram incubadas com anticorpo de cabra anti-coelho biotilado (anticorpo secundário), diluído 1:500 em solução de bloqueio. Como revelador foi utilizado o DAB e na preparação do TNF- α foi utilizado uma contra coloração com hematoxilina. As fatias foram montadas em entellan (Merck, Alemanha), e visualizadas sob um microscópio (Nikon Elipse E200) com aumento de 400x. Foram selecionadas três fatias de cada animal, aleatoriamente, ao longo da área da lesão e a quantificação das células foi realizada utilizando o software Image J (NIH, Bethesda, MD, EUA). As células foram consideradas positivas para TNF- α e iNOS quando apresentaram uma coloração acastanhada. Os resultados foram expressos como número de células TNF- α e iNOS positivas.

4.10.3 Avaliação da astrogliose através da imunoreatividade de GFAP

Os astrócitos possuem um papel fundamental na manutenção da homeostase cerebral. Eles possuem a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) do inglês *Glial Fibrillary Acidic Protein*, uma proteína exclusiva dos astrócitos que os diferencia dos demais tipos celulares (OCALLAGHAM e SRIRAM, 2005). Essa proteína é expressa em processos neuroinflamatórios (SWANSON et al., 2004). Assim, neste trabalho, a ativação da astrogliose foi evidenciada pela imunoreatividade de GFAP.

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

As fatias foram lavadas três vezes em PBS por 5 min e depois simultaneamente permeabilizadas e bloqueadas com TBS (0,05 M Tampão Trizma base com 150 mM de NaCl, pH 7,2) contendo 0,2 % Triton X-100 e 10 % de soro de cabra, por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, foram incubadas, free-floating, com o anticorpo primário preparado em solução de bloqueio (anti-GFAP, 1:500, rabbit policlonal, Sigma-Aldrich, Portugal) overnight a temperatura ambiente e depois lavadas 3 vezes por 10 min cada em PBS. Posteriormente, foi realizada a incubação por 2 horas com o anticorpo secundário (goat anti-rabbit), conjugado com o fluorocromo Alexa Fluor 594 (Invitrogen, Portugal), diluído a 1:200 em solução de bloqueio. Após serem lavadas mais 3 vezes em PBS e serem contracoradas com DAPI (Vector Laboratories, UK), as fatias foram montadas em lâminas gelatinizadas usando o meio fluoromount (Sigma) e deixadas secar protegidas da luz. A visualização foi realizada no microscópio de fluorescência Zeiss Axiovert 200 (Axiovision software 4.6, PG-Hitec, Portugal).

Foram selecionadas três fatias de cada animal, aleatoriamente, ao longo da área da lesão e a quantificação das células foi realizada utilizando o software Image J (NIH, Bethesda, MD, EUA). Os resultados foram expressos como a média da intensidade de fluorescência (MIF) a partir da % da média dos controles.

4.11 Análise estatística

Antes da realização dos testes estatísticos foi realizado o teste de normalidade D'Agostino e Pearson Omnibus para todos os dados. Para avaliação dos escores neurológicos foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e Dunn e os valores expressos em mediana (mínimo e máximo). Para a análise estatística dos testes comportamentais, bioquímicos, de imunohistoquímica e histologia foram realizados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, sendo os resultados expressos como média \pm erro padrão da média. O critério de significância utilizado foi de $p < 0,05$. O programa de computador usado foi Graph Pad InStat® 5.0.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito da boldina (8, 16 e 25 mg/kg) sobre o dano neurológico de camundongos submetidos à pMCAO.

Os animais submetidos à pMCAO apresentaram déficits neurológicos significativos 24 horas após a indução isquêmica, em relação aos animais falso-operados [FO: 18 (17-18); FO + B 25: 18 (17-18); pMCAO: 15 (11-15)]. Estes animais isquemiados apresentaram perda da habilidade motora, associada à diminuição da capacidade de responder a estímulos no lado contralateral à lesão. O tratamento com boldina na dose de 25 mg/kg diminuiu, significativamente, os animais isquemiados desses déficits sensório-motores [(pMCAO + B 8: 16 (14-16); pMCAO + B 16: 15 (11-16); pMCAO + B 25: 16 (14-17)] (Figura: 13).

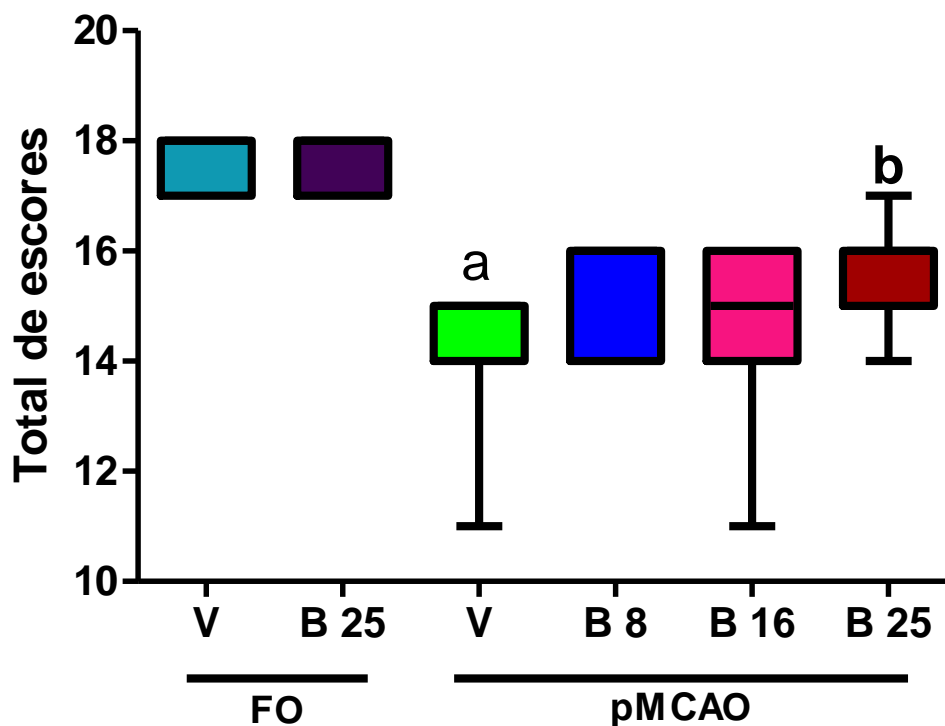


Figura 13. Efeito da boldina (8, 16, 25 mg/kg) sobre o número total de escores obtidos na avaliação neurológica de camundongos submetidos à pMCAO (n=7/grupo). Os valores representam a mediana (mínimo e máximo). a vs FO, b vs pMCAO, $p < 0,05$. Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

5.2 Efeito da boldina (8, 16 e 25 mg/kg) sobre o dano isquêmico de camundongos submetidos à pMCAO.

Os animais submetidos à pMCAO apresentaram significativo dano cerebral isquêmico, representado pelo aumento da área de infarto, 24 horas após a isquemia em relação aos animais falso-operados (FO: $1,14 \pm 0,09$; FO + B 25: $1,21 \pm 0,10$; pMCAO: $8,07 \pm 0,50$). As fotomicrografias representativas mostradas na Fig. 14 indicou que as áreas de infarto foram localizadas principalmente no córtex ipsilateral, e em menor grau no corpo estriado e hipocampo. A boldina na dose de 25 mg/kg diminuiu significativamente os animais isquemiados do dano neuronal (pMCAO + B 8: $6,41 \pm 0,93$, pMCAO + B 16: $6,81 \pm 0,93$, pMCAO + B 25: $2,99 \pm 0,36$). Uma análise quantitativa indicou que a percentagem média de volumes de enfarte foi de 8% em hemisférios de camundongos tratados com veículo submetidos à pMCAO. Quando os camundongos foram tratados com 25 mg / kg de boldina, significativo volumes de enfarte diminuiu para 3% (Fig. 15).

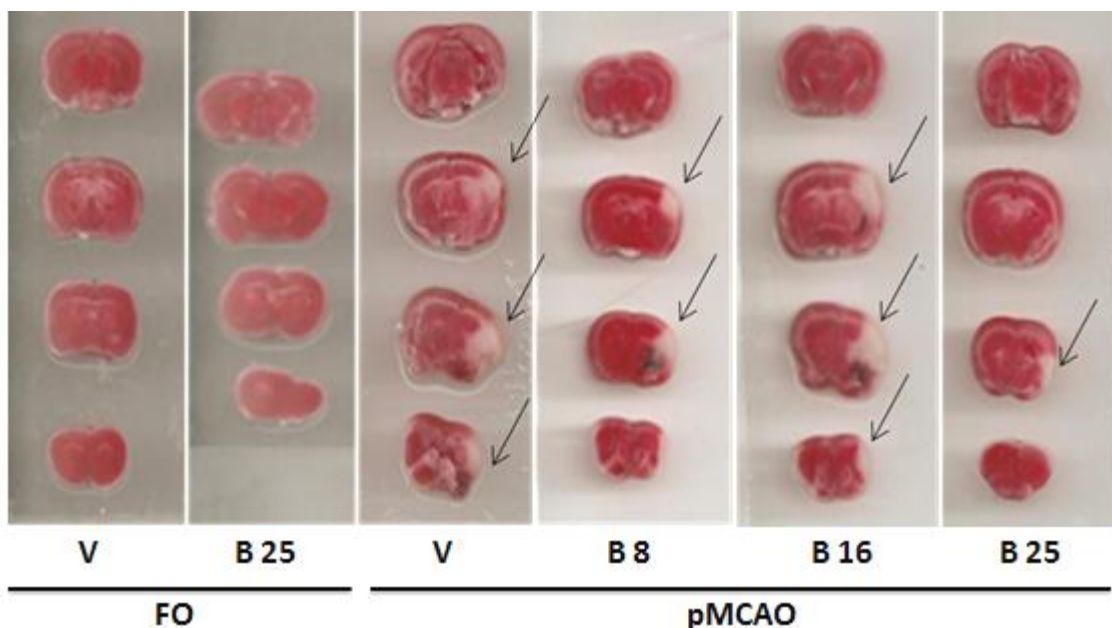


Figura 14: Visualização do dano neuronal isquêmico (n=6/grupo) representado pelas regiões não coradas (setas: extensão da área de infarto) por meio da coloração de TTC. As áreas de infarto apresentaram-se maiores nos animais submetidos à pMCAO em relação aos animais falso-operados. Os animais tratados com boldina na dose de 25 mg/kg apresentaram menores áreas de infarto comparados ao grupo pMCAO.

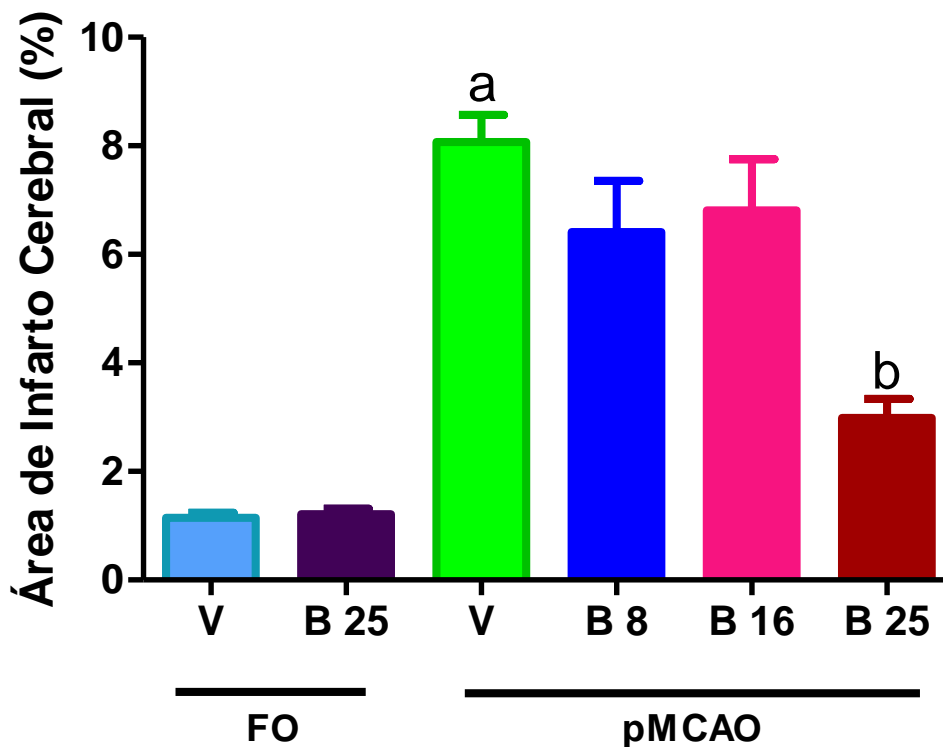


Figura 15: Efeito da boldina (8, 16, 25 mg/kg) sobre o dano cerebral isquêmico de camundongos submetidos à pMCAO (n=6/grupo). Os valores representam a média \pm EPM. a vs FO, b vs pMCAO, $p < 0,05$. Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

5.3 Efeito da boldina (25mg/kg) sobre a viabilidade celular analisada pela coloração de cresil violeta no córtex temporal e corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO.

Os animais do grupo falso-operado mantiveram a viabilidade celular, caracterizada pela presença dos corpúsculos de Nissl no citoplasma de células com morfologia arredondada ou ovalada e núcleo centralizado. Essas características foram determinantes para a identificação das células Cresil (+). As células contadas como Cresil (-), apresentaram alterações morfológicas, como: ausência de corpúsculos de Nissl, relação núcleo-citoplasma diminuída e núcleos picnóticos. Os animais submetidos a pMCAO apresentaram uma redução significativa de células Cresil (+) e um aumento significativo de células Cresil (-), (Cresil (+): Córtex: FO: $83,08 \pm 1,86$; FO + B25: $76,40 \pm 1,47$; pMCAO: $22,95 \pm 2,29$; Estriado: FO: $84,25 \pm 1,43$; FO + B25 : $81,70 \pm 2,40$; pMCAO: $32,43 \pm 5,48$; Cresil (-): Córtex: FO: $16,93 \pm 1,78$; FO + B25: $23,60 \pm 1,58$; pMCAO: $77,05 \pm 2,38$; Estriado: FO: $15,75 \pm 1,43$; FO + B25 : $18,30 \pm 2,43$; pMCAO: $67,58 \pm 5,94$). O tratamento com boldina, na dose de 25 mg/kg

no córtex temporal e corpo estriado preveniu, significativamente, os animais isquemiados da morte neuronal (Cresil (+): Córtex: pMCAO + B25: $68,18 \pm 2,06$; Estriado: pMCAO+B25: $68,18 \pm 1,12$; Cresil (-): Córtex: pMCAO + B25: $31,75 \pm 2,06$; Estriado: pMCAO+B25: $31,83 \pm 1,12$ (Figuras 16, 17 e 18).

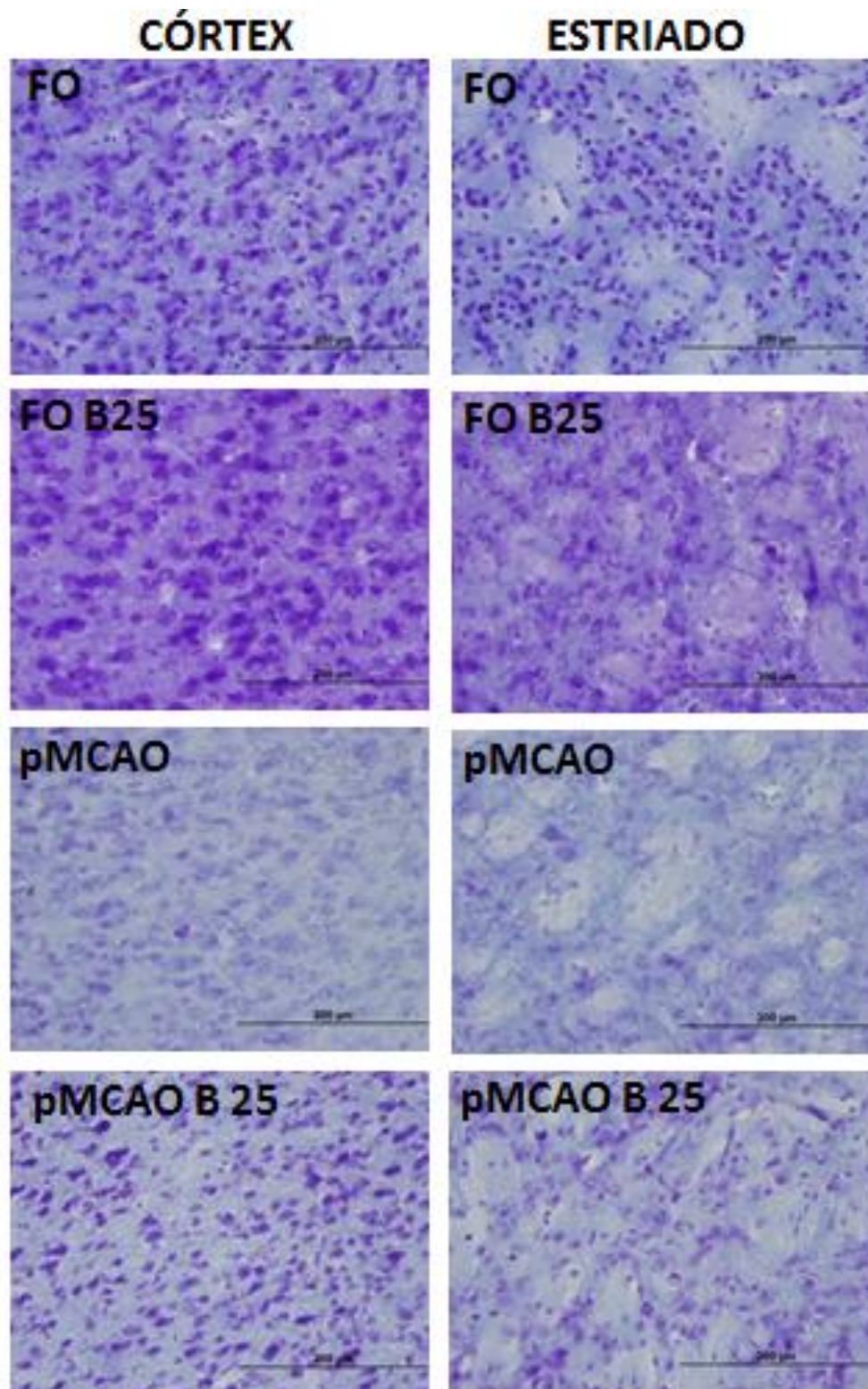


Figura 16. Fotomicrografia (400x) representando o efeito da boldina sobre a viabilidade celular detectada pela coloração de cresil-violeta no córtex temporal e corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO. Pode-se perceber uma redução de células-Cresil (+) no grupo pMCAO e a ação protetora da boldina (25 mg/kg) nos animais isquemiados, (n=4/grupo).

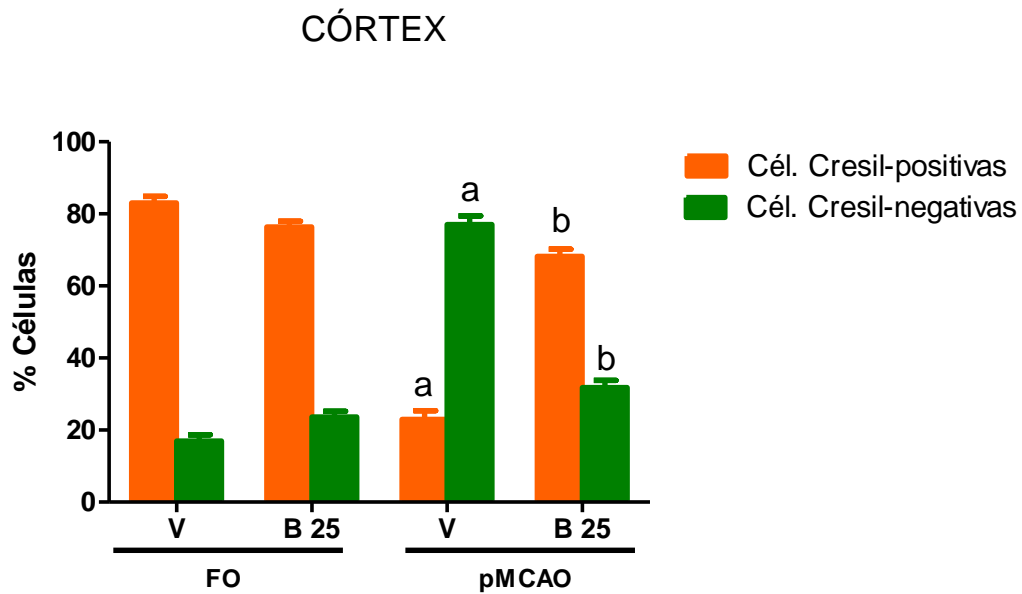


Figura 17. Efeito da boldina (25 mg/kg) sobre a viabilidade celular analisada pela coloração de cresil-violeta no córtex temporal de camundongos submetidos à pMCAO. Foi avaliado em percentagem de células Cresil (+) e (-), (n=4/grupo). Os valores representam a média \pm EPM. a vsFO, b vs pMCAO, $p < 0,05$. Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

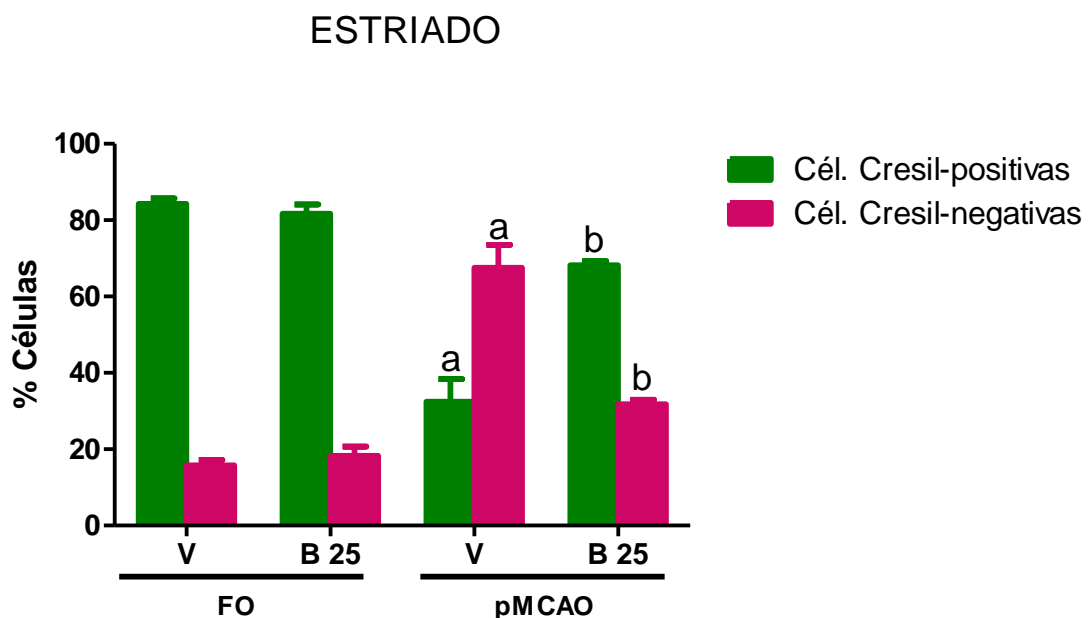


Figura 18. Efeito da boldina (25 mg/kg) sobre a viabilidade celular analisada pela coloração de cresil-violeta no corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO. Foi avaliado em percentagem de células Cresil (+) e (-), (n=4/grupo). Os valores representam a média \pm EPM. a vsFO, b vs pMCAO, $p < 0,05$. Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

5.4 Efeito da boldina (25mg/kg) sobre a viabilidade celular analisada pela coloração de Fluoro-Jade C no córtex temporal e corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO.

Foi observado um número significativo de células Fluoro Jade C-positivas no córtex temporal e corpo estriado dos animais isquemiados em relação aos animais FO, indicando neurodegeneração (Córtex: FO:1,95±0,72 ; FO+B25:0,42±0,13 ; pMCAO: 108,8±14,69; Estriado: FO: 1,25±0,25 ; FO+B25: 1,00±0,00 ; pMCAO: 29,33±4,33;). Os animais tratados com boldina (25 mg/kg) apresentaram uma redução significativa dessa neurodegeneração no córtex temporal (pMCAO+B25: 36,0±5,45), mas não no estriado(Fig. 19, 20 e 21).

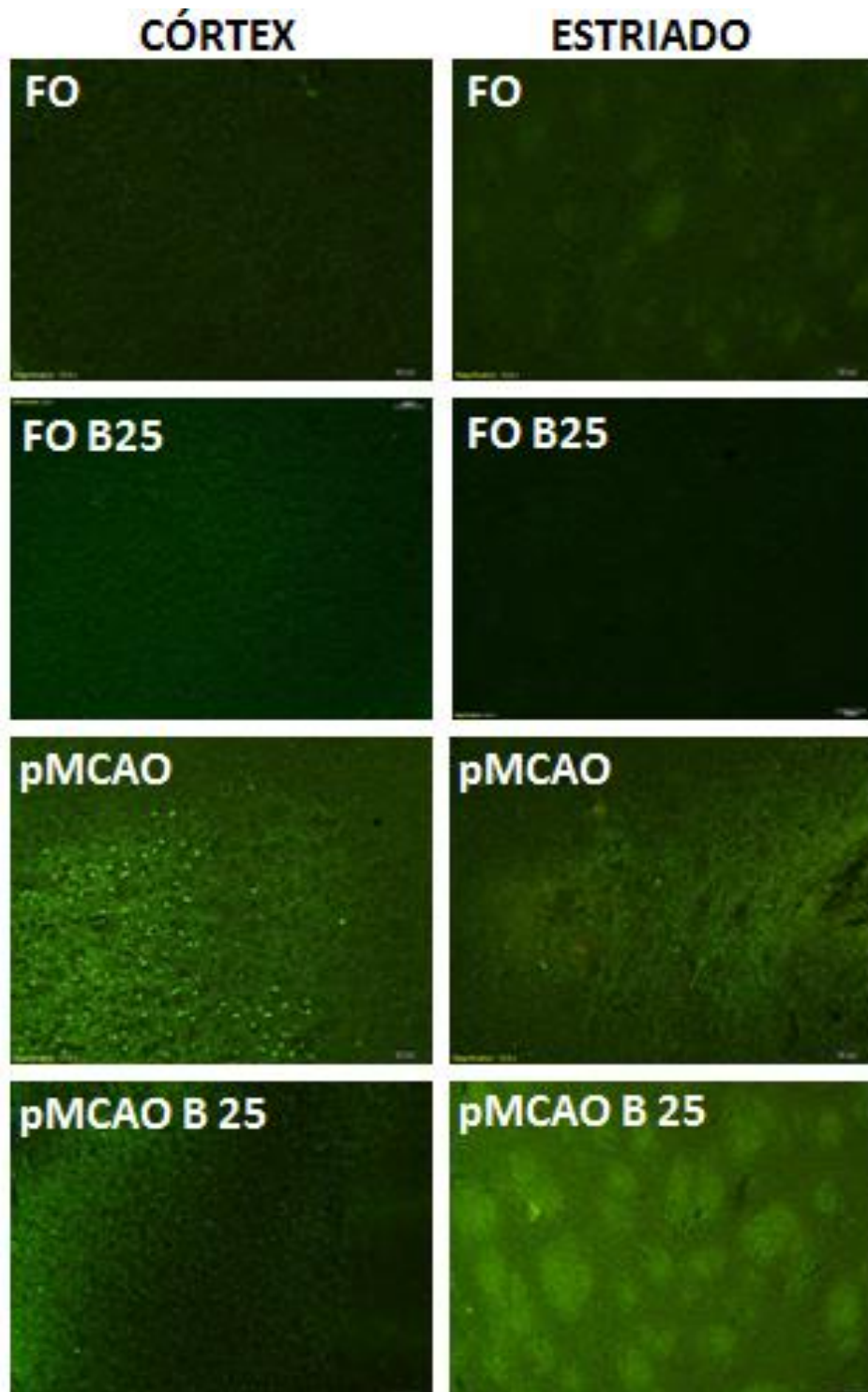


Figura 19. Fotomicrografia (400x) representando o efeito da boldina sobre a viabilidade celular detectada pela coloração de Fluoro-Jade C no córtex temporal e corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO. Pode-se perceber uma neurodegeneração pelo aumento do número de células com fluorescência no grupo pMCAO e a ação protetora da boldina (25 mg/kg) nos animais isquemiados, (n=4/grupo).

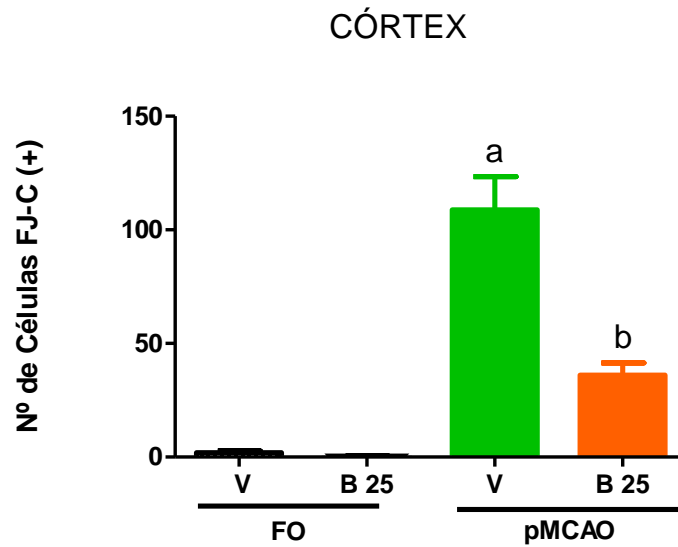


Figura 20. Efeito da boldina (25 mg/kg) sobre a viabilidade celular analisada pela coloração de Fluoro-Jade C no córtex temporal de camundongos submetidos à pMCAO, (n=4/grupo). Os valores representam a média \pm EPM. a vsFO, b vs pMCAO, $p < 0,05$. Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

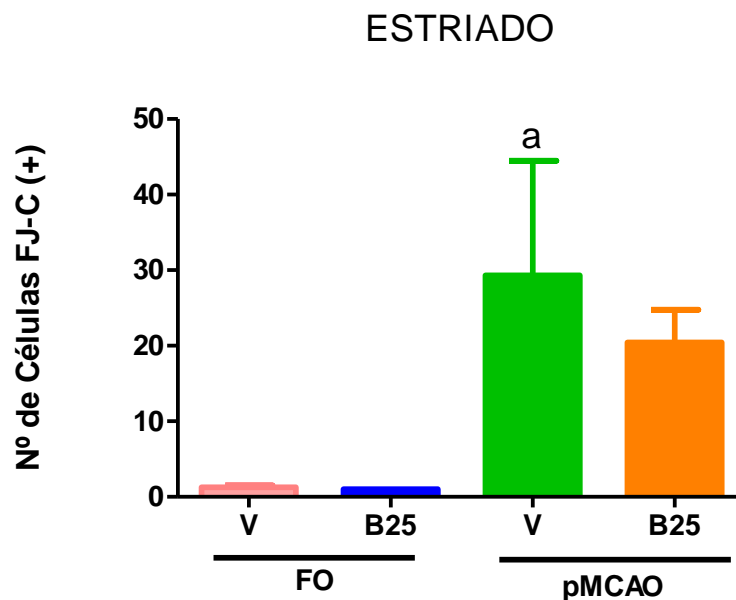


Figura 21. Efeito da boldina (25 mg/kg) sobre a viabilidade celular analisada pela coloração de Fluoro-Jade C no corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO, (n=4/grupo). Os valores representam a média \pm EPM. a vsFO, $p < 0,05$. Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

5.5 Efeito da boldina (8, 16 e 25mg/kg) sobre atividade locomotora de camundongos submetidos à pMCAO.

Na avaliação da atividade locomotora, 72 horas após a isquemia, não foram observadas alterações significativas no número de *crossings* (cruzamentos) (FO: $97,29 \pm 4,9$; FO+B25: $93,78 \pm 11,6$; pMCAO: $84,63 \pm 5,2$; pMCAO+ B8: $92,00 \pm 9,7$; pMCAO +B16: $95,11 \pm 11,2$; pMCAO+ B25: $101,6 \pm 5,3$) (Figura 22). No entanto, foi observada uma redução significativa no número de *rearings* (levantamentos) nos animais isquemiados em comparação com os animais falso-operados (FO: $18,67 \pm 2,3$; FO+ B: $13,11 \pm 2,8$; pMCAO: $7,75 \pm 1,2$). O tratamento com boldina na dose de 25mg/kg diminuiu, significativamente, esse déficit motor (pMCAO+ B25: $11,89 \pm 1,2$), (Figura 23).

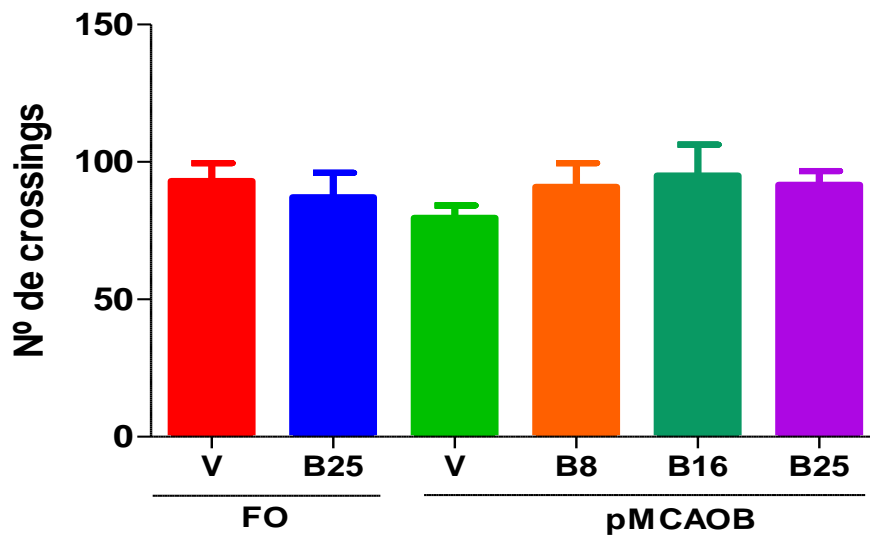


Figura 22: Efeito da boldina (8, 16, 25 mg/kg) sobre o número de *crossings* no teste de campo aberto de camundongos submetidos à pMCAO (n=9/grupo). Os valores representam a média \pm EPM.

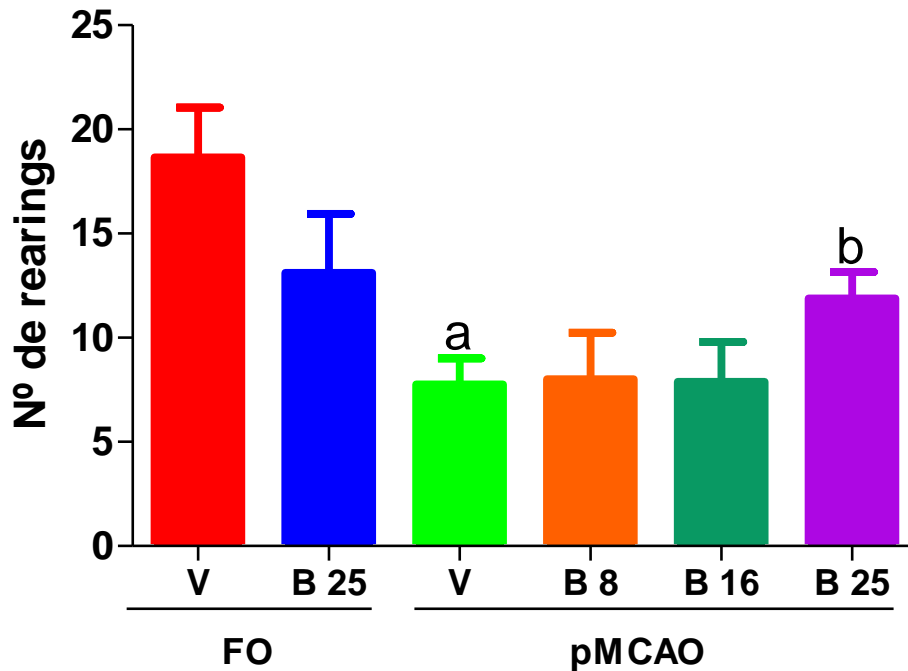


Figura 23. Efeito da boldina (8, 16 e 25 mg/kg) sobre o número de *rearings* de camundongos submetidos à pMCAO, avaliados no teste de campo aberto (n = 9/grupo). Os valores representam a média \pm EPM. a vs FO, b vs pMCAO, $p < 0,05$. Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

5.6 Efeito da boldina (8, 16 e 25mg/kg) sobre a memória de trabalho de camundongos submetidos à pMCAO.

Os animais submetidos à pMCAO apresentaram déficit na memória de trabalho em relação aos animais falso-operados, 72 horas após a isquemia (% de alterações espontâneas: FO: $79,6 \pm 2,0$; FO + B 25: $71,7 \pm 2,7$; pMCAO: $59,4 \pm 2,2$). O tratamento com a boldina nas três doses avaliadas diminuiu, significativamente, os animais isquemiados desses déficits (% de alterações espontâneas: pMCAO + B 8: $73,7 \pm 3,8$; pMCAO + B 16: $70,4 \pm 3,8$; pMCAO + B 25: $74,2 \pm 1,6$) (Figura 24).

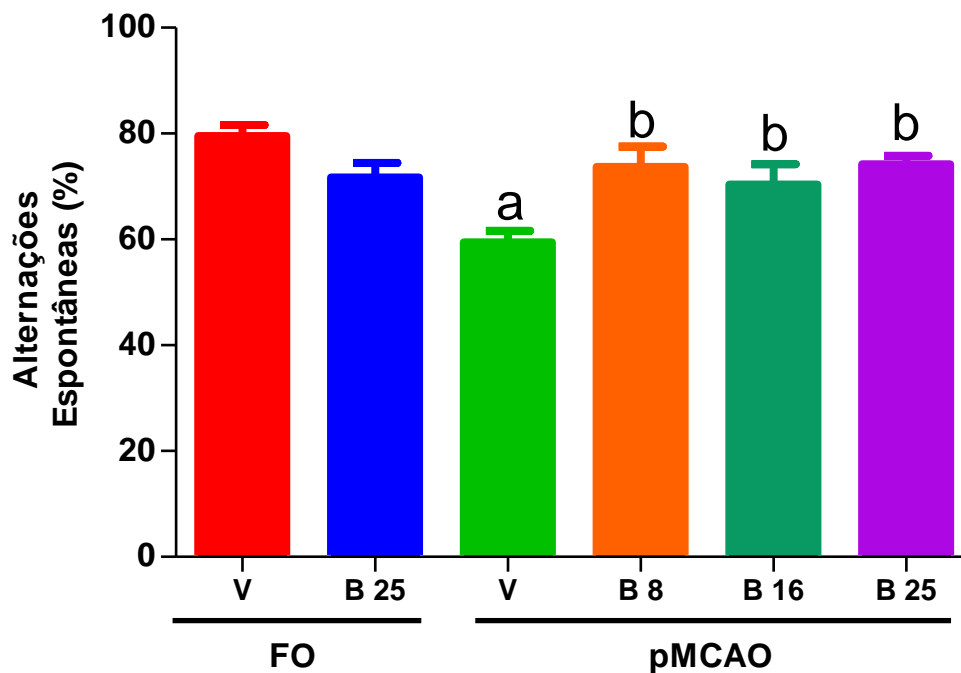


Figura 24. : Efeito da boldina (8, 16, 25 mg/kg) sobre a memória de trabalho de camundongos submetidos à pMCAO (n=9/grupo). Os valores representam a média \pm EPM. a vs FO, b vs pMCAO, $p < 0,05$. Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

5.7 Efeito da boldina (8, 16 e 25 mg/kg) sobre a memória episódica de camundongos submetidos à isquemia pMCAO.

Os animais isquemiados apresentaram déficit na habilidade de reconhecer um novo objeto, 96 horas após a isquemia, em relação aos animais falso-operados (Índice de reconhecimento: FO: $0,26 \pm 0,05$; FO + B 25: $0,36 \pm 0,08$; pMCAO: $0,05 \pm 0,05$), significando um déficit na memória episódica. O tratamento com a boldina na dose de 25 mg/kg diminuiu, significativamente, este déficit comparado com os animais submetidos a pMCAO (Índice de reconhecimento: (pMCAO + B25: $0,46 \pm 0,06$) (Figura 25).

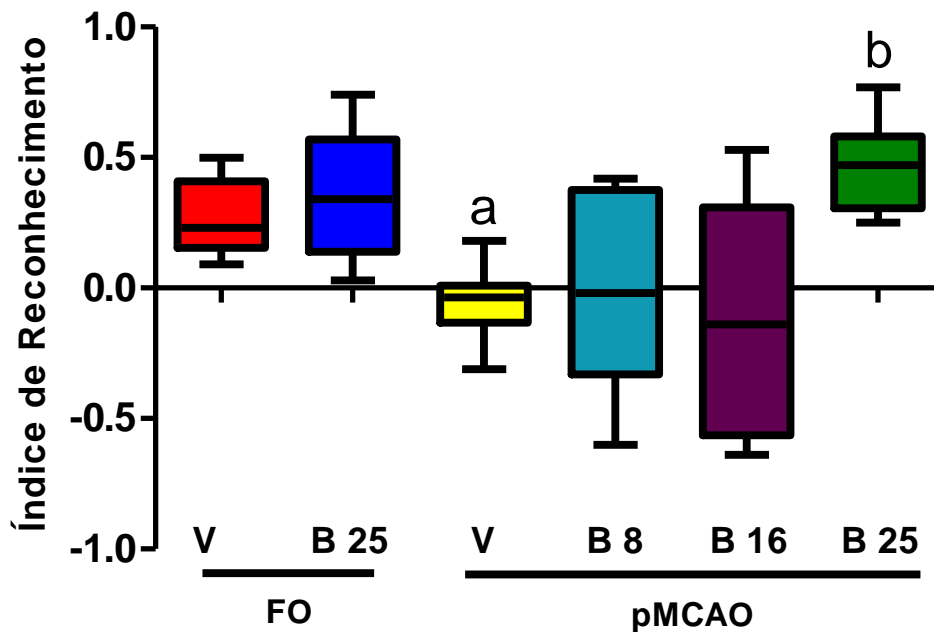


Figura 25. Efeito da boldina (8, 16, 25 mg/kg) sobre a memória episódica de camundongos submetidos à pMCAO (n=9/grupo). Os valores representam a média \pm EPM. a vs FO, b vs pMCAO, $p < 0,05$. Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

5.8 Efeito da boldina (8, 16 e 25mg/kg) sobre a memória espacial de camundongos submetidos à pMCAO.

Na avaliação do aprendizado na memória espacial realizado 48 e 72 horas após a isquemia, não houve diferença significativa entre os grupos. Esse resultado mostra que todos os animais foram capazes de aprender a tarefa. No entanto, foi observado que os animais falso-operados iniciaram o aprendizado a partir do terceiro treino e os animais isquemiados iniciaram o aprendizado somente a partir do sexto treino, indicando um atraso de aprendizagem desses animais, porém sem significância estatística. Os animais submetidos à pMCAO e tratados com a boldina (25 mg/kg) apresentaram um aprendizado semelhante aos animais do grupo FO (Figura 26).

Na avaliação da retenção da memória espacial, 5 dias após a isquemia, os animais isquemiados apresentaram déficits significativos nos parâmetros: latência para alcançar a plataforma, número de cruzamentos e tempo de permanência no quadrante em relação aos

animais falso-operados (Latência: FO: $2,88 \pm 0,26$; FO+B25: $4,11 \pm 0,45$; pMCAO: $10,11 \pm 2,36$. Número de cruzamentos: FO: $7,66 \pm 0,33$; FO+B25: $7,00 \pm 0,81$; pMCAO: $4,88 \pm 0,35$. Tempo de permanência: FO: $30,33 \pm 1,77$; FO+B25: $25,22 \pm 1,54$; pMCAO: $15,33 \pm 1,66$. O tratamento com a boldina (25 mg/kg) preveniu, significativamente, esses déficits (Latência: pMCAO+B8: $5,00 \pm 0,66$; pMCAO+B16: $8,00 \pm 1,11$; pMCAO+B25: $4,11 \pm 0,45$. Número de cruzamentos: pMCAO+B8: $5,87 \pm 0,63$; pMCAO+B16: $5,66 \pm 0,50$; pMCAO+B25: $6,88 \pm 0,35$. Tempo de permanência: pMCAO+B8: $26,63 \pm 2,17$; pMCAO+B16: $25,38 \pm 2,23$; pMCAO+B25: $33,25 \pm 0,88$) (Figuras 27, 28 e 29). No parâmetro tempo de permanência, as doses de 8 e 16 foram efetivas em prevenir o déficit de memória espacial

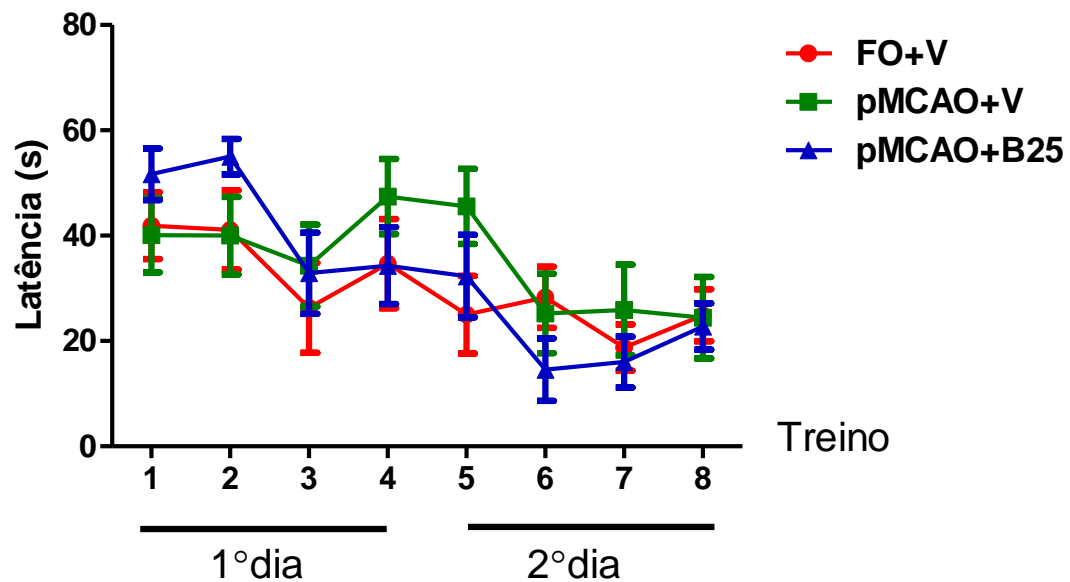


Figura 26. Efeito da boldina sobre o aprendizado de camundongos submetidos a pMCAO, avaliados no parâmetro: tempo de latência para alcançar a plataforma nas sessões de treinos (n=9/grupo). Os valores representam a média \pm EPM. a vs FO, b vs pMCAO, $p < 0,05$. Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, teste de Bonferroni. FO-animais falso-operados; V-veículo; pMCAO- oclusão da artéria cerebral média permanente; B25-boldina na dose de 25mg/kg.

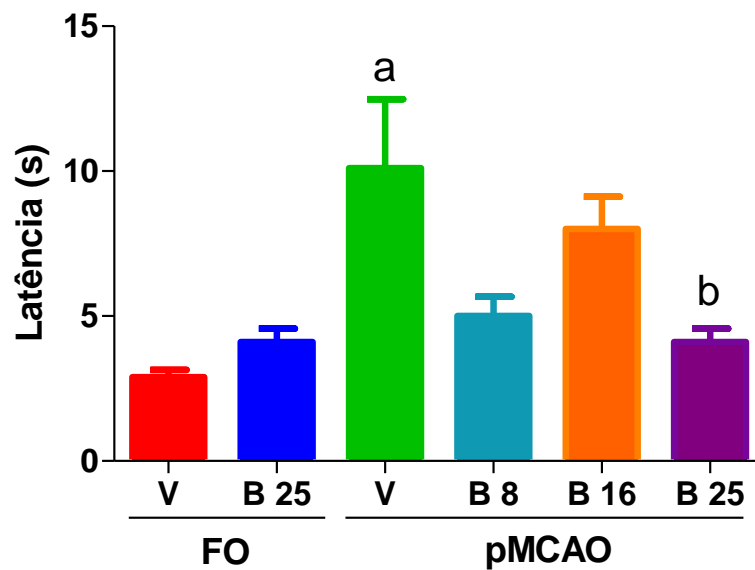


Figura 27. Efeito da boldina (8, 16, 25 mg/kg) sobre a memória espacial de camundongos submetidos à pMCAO, avaliada através do parâmetro: latência para alcançar a plataforma (n=9/grupo). Os valores representam a média \pm EPM. a vs FO, b vs pMCAO, $p < 0,05$. Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

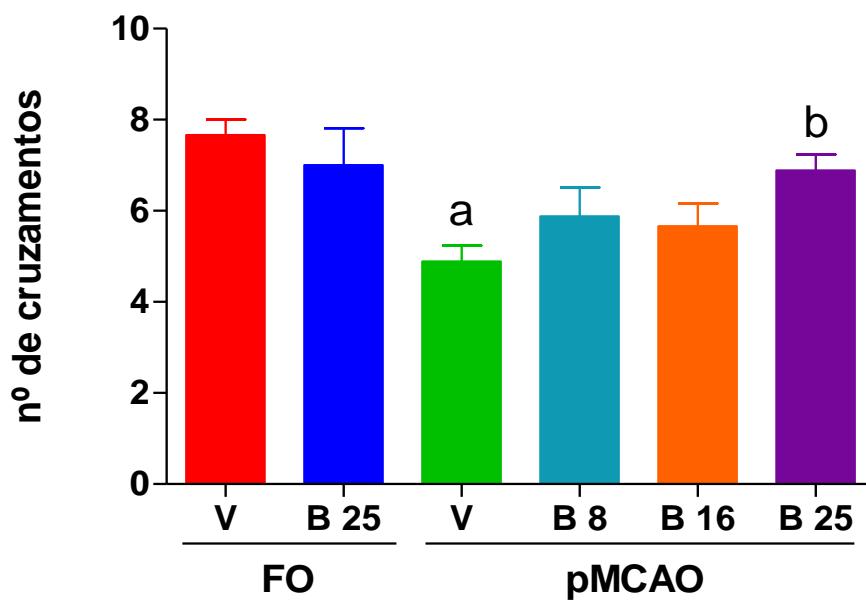


Figura 28. Efeito da boldina (8, 16, 25 mg/kg) sobre a memória espacial de camundongos submetidos a pMCAO, avaliada através do parâmetro: número de cruzamentos (n=9/grupo).

Os valores representam a média \pm EPM. a vs FO, b vs pMCAO, $p < 0,05$. Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

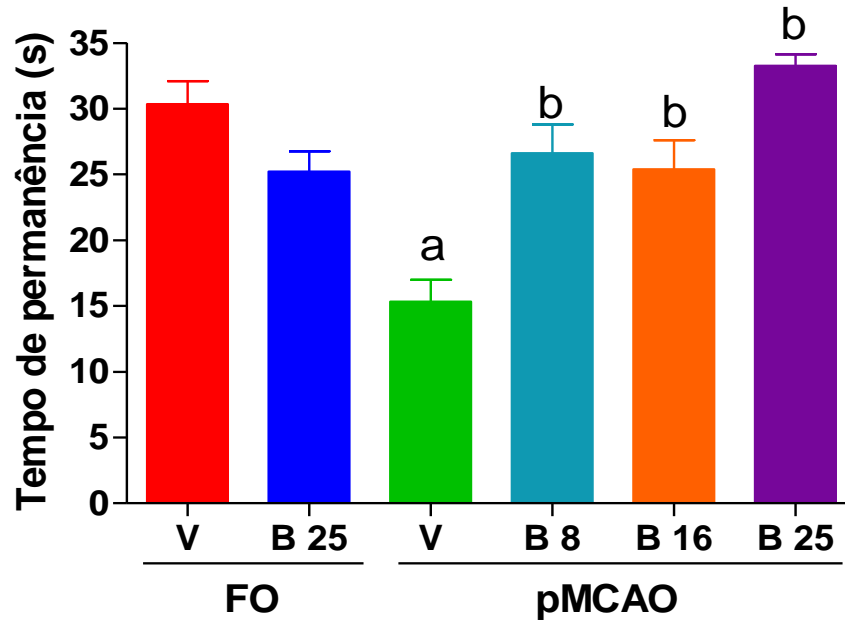


Figura 29. Efeito da boldina (8, 16, 25 mg/kg) sobre a memória espacial de camundongos submetidos a pMCAO, avaliada através do parâmetro: tempo de permanência no quadrante ($n=9$ /grupo). Os valores representam a média \pm EPM. a vs FO, b vs pMCAO, $p < 0,05$. Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

5.9 Efeito da boldina (8, 16 e 25mg/kg) sobre a memória aversiva de camundongos submetidos à pMCAO.

Os animais submetidos à isquemia apresentaram déficits significativos na memória aversiva, recente e tardia, respectivamente, 72 e 96 horas após pMCAO comparados com os animais controle (Mem. Recente: FO: 215,0 \pm 35,19; FO + B25: 251,2 \pm 23,7; pMCAO: 62,1 \pm 17,25; Mem. Tardia: FO: 292,4 \pm 7,5; FO + B25: 251,2 \pm 23,7; pMCAO: 93,78 \pm 27,6). A boldina diminuiu, significativamente, esse déficit na dose de 25mg/kg (Mem. Recente: pMCAO + B25: 215,1 \pm 32,8; Mem. Tardia: pMCAO + B25: 282,9 \pm 17,1) (Figura 30).

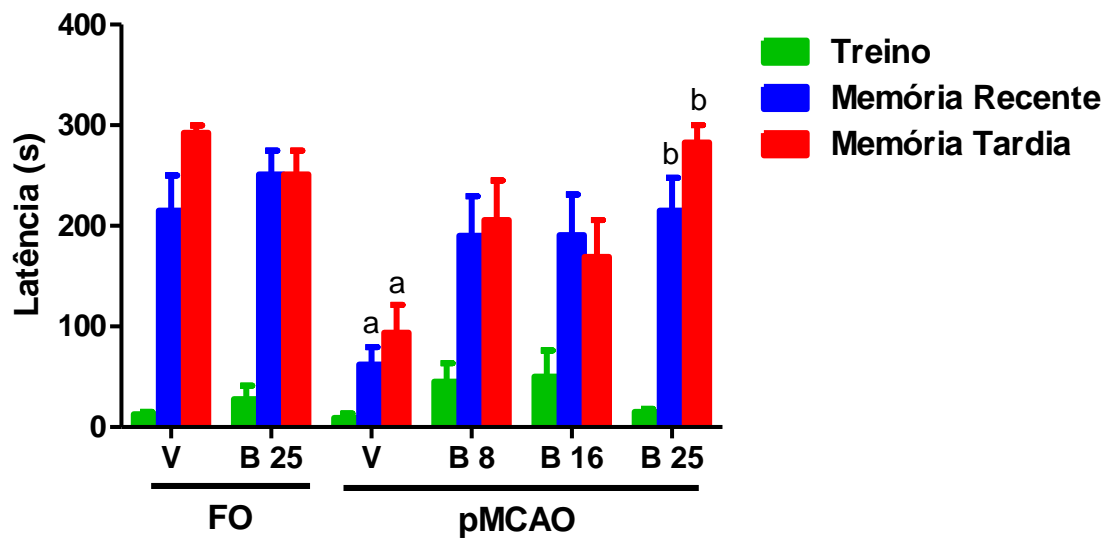


Figura 30. Efeito da boldina (8, 16, 25 mg/kg) sobre a memória aversiva de camundongos submetidos à pMCAO (n=9/grupo). Os valores representam a média \pm EPM. a vs FO, b vs pMCAO, $p < 0,05$. Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

5.10 Efeito da boldina (25mg/kg) sobre a atividade da mieloperoxidase no córtex e estriado de camundongos submetidos à pMCAO.

Na avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase, 24 horas após pMCAO, os animais isquemiados apresentaram um aumento significativo da atividade de MPO no córtex temporal (FO: $7,08 \pm 0,87$ u/mg/tecido; FO + B25: $5,18 \pm 0,94$ U/mg de tecido; pMCAO: $25,56 \pm 3,06$ U/mg de tecido). Não houve alteração significativa da atividade de MPO no corpo estriado. O tratamento com boldina (25mg/kg) reduziu, significativamente, estes valores no córtex (pMCAO+ B25 : $5,87 \pm 1,01$ U/mg de tecido) (Figura 31).

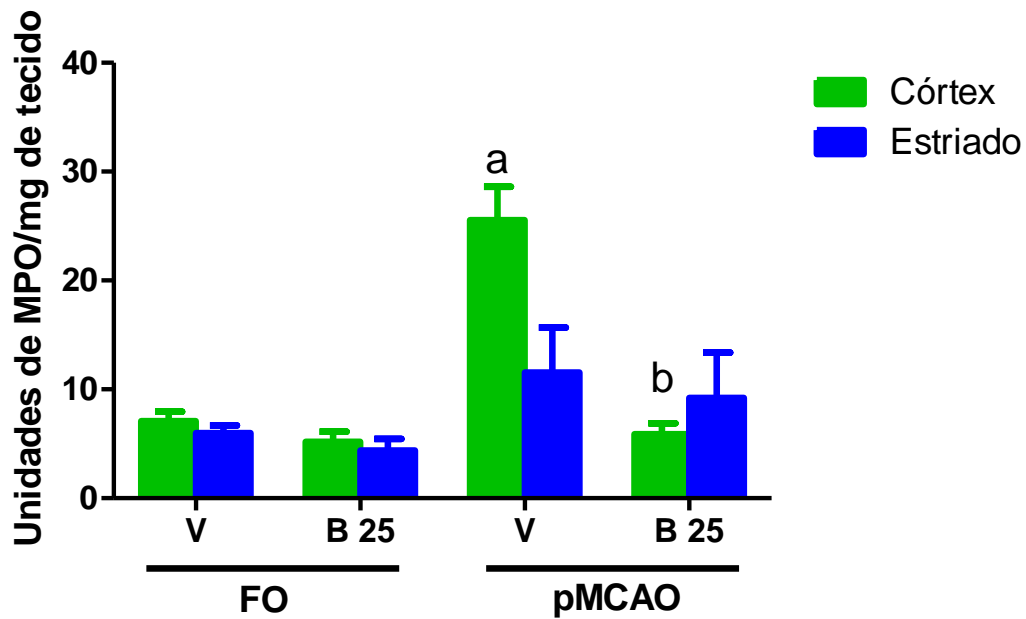


Figura 31. Efeito da boldina (25mg/kg) sobre a atividade da enzima MPO no córtex temporal e no corpo estriado, 24h após pMCAO. Os valores representam a média \pm EPM. a vs FO, b vs pMCAO, $p < 0,05$. Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

5.11 Efeito da boldina (25mg/kg) sobre a imunoreatividade de iNOS no córtex temporal e corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO.

Os animais isquemiados apresentaram um aumento significativo da imunoreatividade para iNOS, 120 horas após a indução isquêmica no córtex temporal e no corpo estriado comparados aos animais falso-operados (N° de células Inos (+) - Córtex: FO: $26,00 \pm 3,87$; FO + B25: $22,50 \pm 4,40$; pMCAO: $229,8 \pm 22,76$); Estriado: FO: $28,25 \pm 5,15$; FO + B25: $22,00 \pm 6,54$; pMCAO: $142,00 \pm 32,04$). A boldina na dose de 25mg/kg diminuiu, significativamente, essa imunoreatividade, tanto no córtex temporal (N° de células Inos (+) - pMCAO + B25: $56,75 \pm 10,27$), quanto no corpo estriado (pMCAO + B25: $38,00 \pm 8,49$) (Figura 32 e 33).

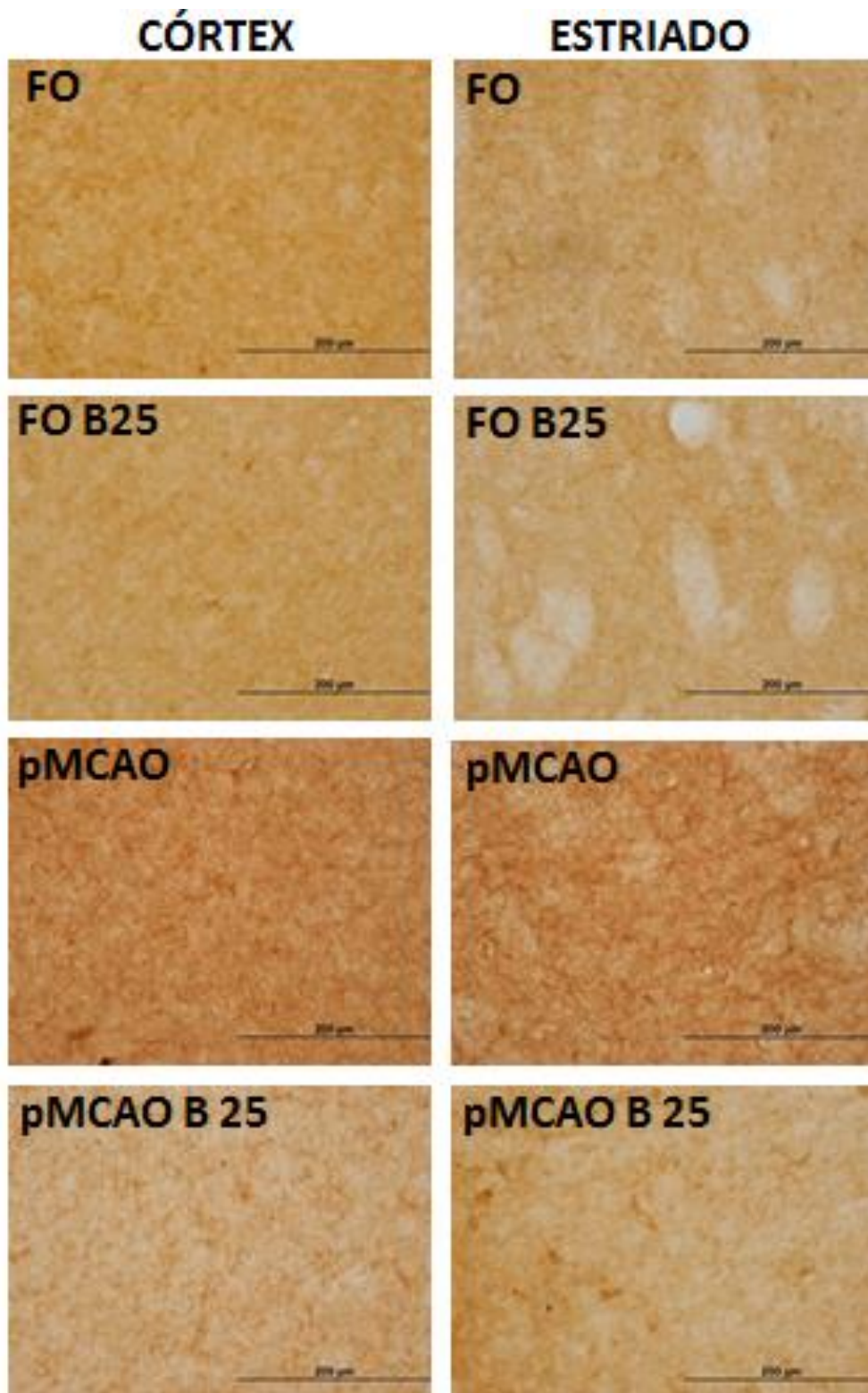


Figura 32. Fotomicrografia (400x) da imunoreatividade de iNOS no córtex temporal e corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO e tratados com boldina na dose de 25 mg/kg, (n=4/grupo).

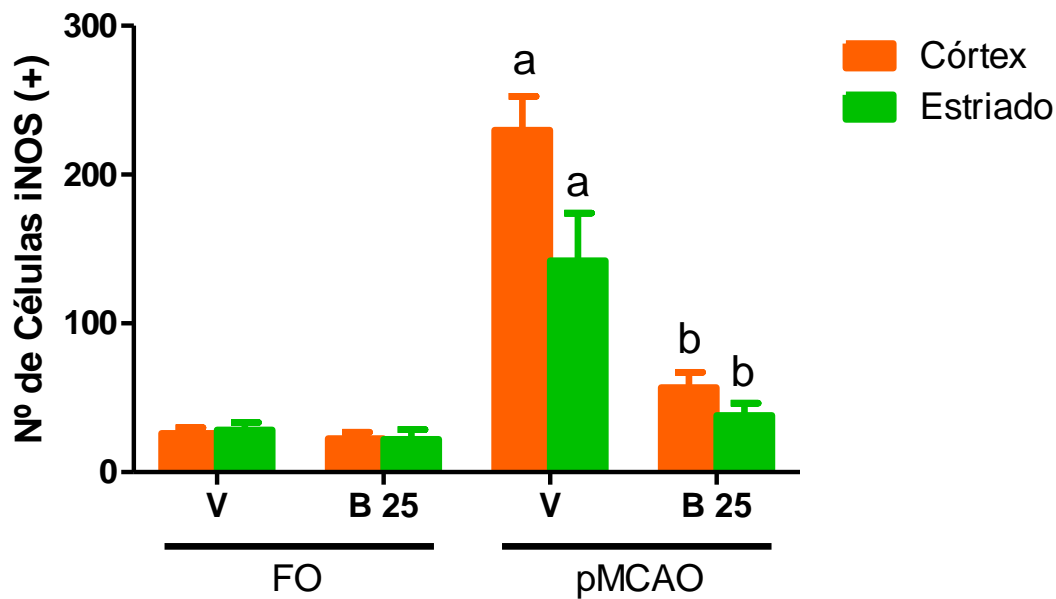


Figura 33. Efeito da boldina (25 mg/kg) sobre a imunoreatividade de iNOS no córtex temporal e estriado de camundongos submetidos à pMCAO, (n=4/grupo). Os valores representam a média \pm EPM. a vs FO, b vs pMCAO, $p < 0,05$. Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

5.12 Efeito da boldina (25mg/kg) sobre a imunoreatividade de TNF- α no córtex temporal e corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO.

Os animais submetidos a pMCAO apresentaram um aumento significativo da imunoreatividade para TNF- α , avaliado pelo número de células TNF- α (+), 120 horas após a indução isquêmica no córtex temporal e no corpo estriado comparados aos animais falso-operados. (Nº de células TNF- α (+) - Córtex: FO: $6,00 \pm 1,22$; FO + B25: $5,00 \pm 1,08$; pMCAO: $40,50 \pm 3,97$); Estriado: FO: $3,00 \pm 0,81$; FO + B25: $4,00 \pm 0,71$; pMCAO: $22,00 \pm 3,76$). O tratamento com a boldina na dose de 25 mg/kg diminuiu, significativamente, essa imunoreatividade, tanto no córtex temporal (Nº de células TNF- α (+) - pMCAO + B25: $19,00 \pm 1,68$), quanto no corpo estriado (pMCAO + B25: $7,75 \pm 0,75$) (Figura 34 e 35).

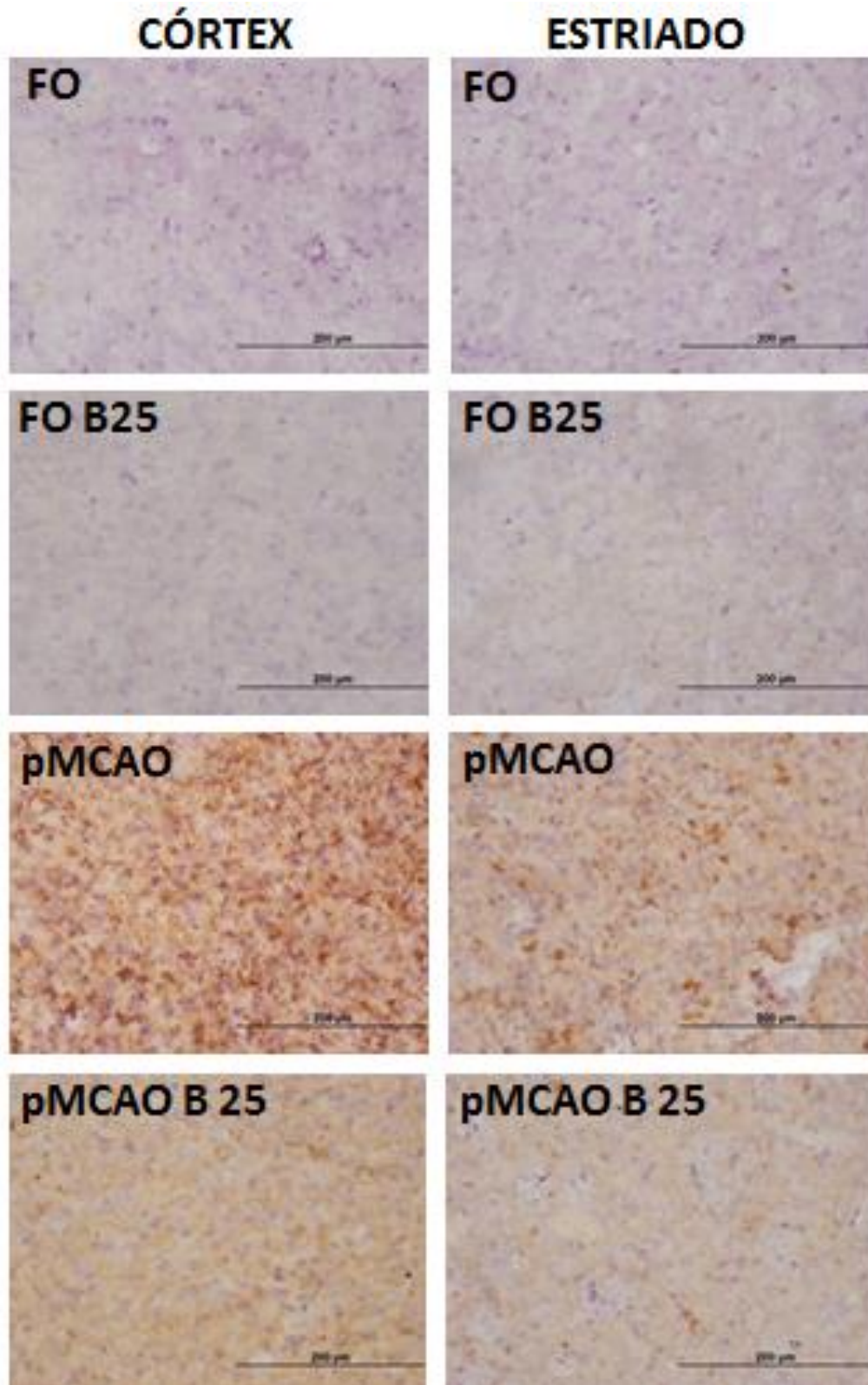


Figura 34. Fotomicrografia (400x) da imunoreatividade de TNF- α no corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO e tratados com boldina na dose de 25 mg/kg, (n=4/grupo).

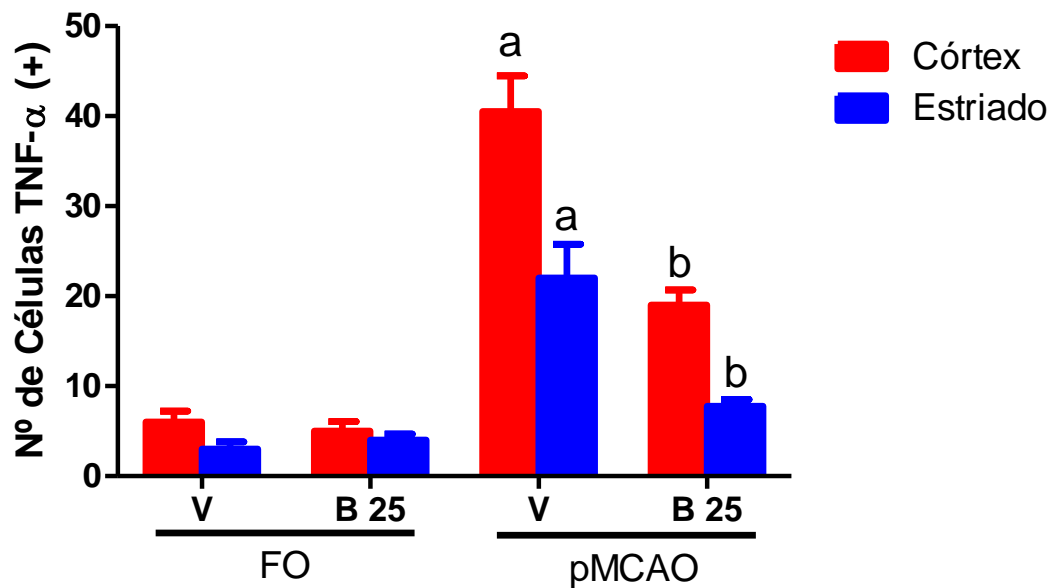


Figura 35. Efeito da boldina (25 mg/kg) sobre a imunoreatividade de TNF- α no córtex temporal e corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO, (n=4/grupo). Os valores representam a média \pm EPM. a vs FO, b vs pMCAO, $p < 0,05$. Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

5.13 Efeito da boldina (25mg/kg) sobre a ativação de astrócitos evidenciada através da imunoreatividade para aGFAP no córtex temporal e no corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO.

Os animais isquemiados apresentaram aumento significativo da média da intensidade de imunofluorescência (MIF) para GFAP, mostrando astrogliose reativa no córtex temporal (MIF - FO: $100,7 \pm 7,19$; FO+B25: $178,8 \pm 19,54$; pMCAO: $1389,00 \pm 228,5$) e corpo estriado (MIF - FO: $61,13 \pm 16,36$; FO+B25: $127,2 \pm 40,26$; pMCAO: $890,8 \pm 80,96$), comparados com os animais falso-operados. O tratamento com a boldina na dose de 25mg/kg diminuiu, significativamente, essa astrogliose reativa, tanto no córtex (MIF - pMCAO+B25: $700,2 \pm 31,67$), quanto no corpo estriado (MIF - pMCAO+B25: $607,1 \pm 48,33$) (Figura 36 e 37).

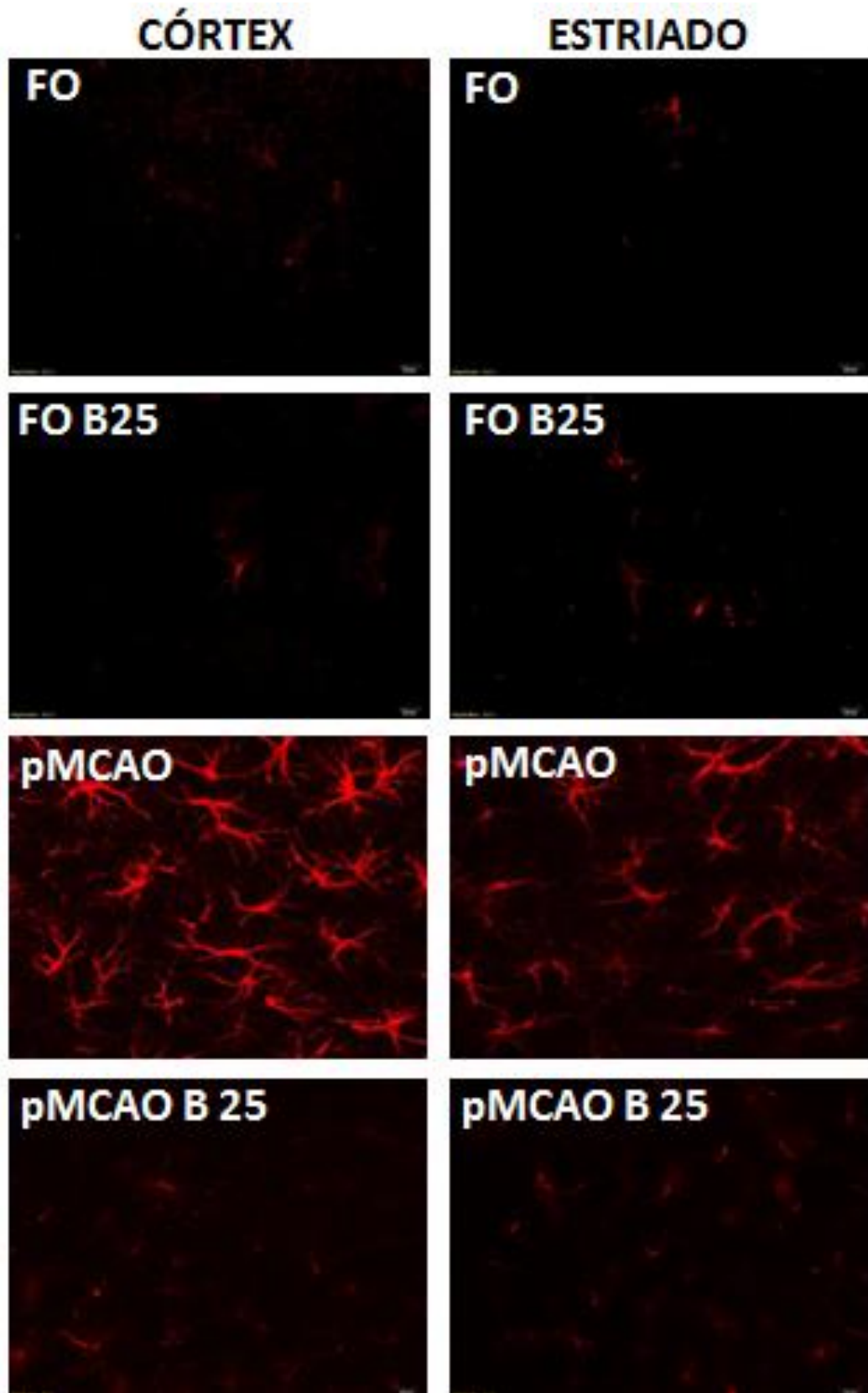


Figura 36. Fotomicrografia (400x) da astrogliose reativa evidenciada pela imunoreatividade de GFAP no córtex temporal e corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO e tratados com boldina, (n=4/grupo).

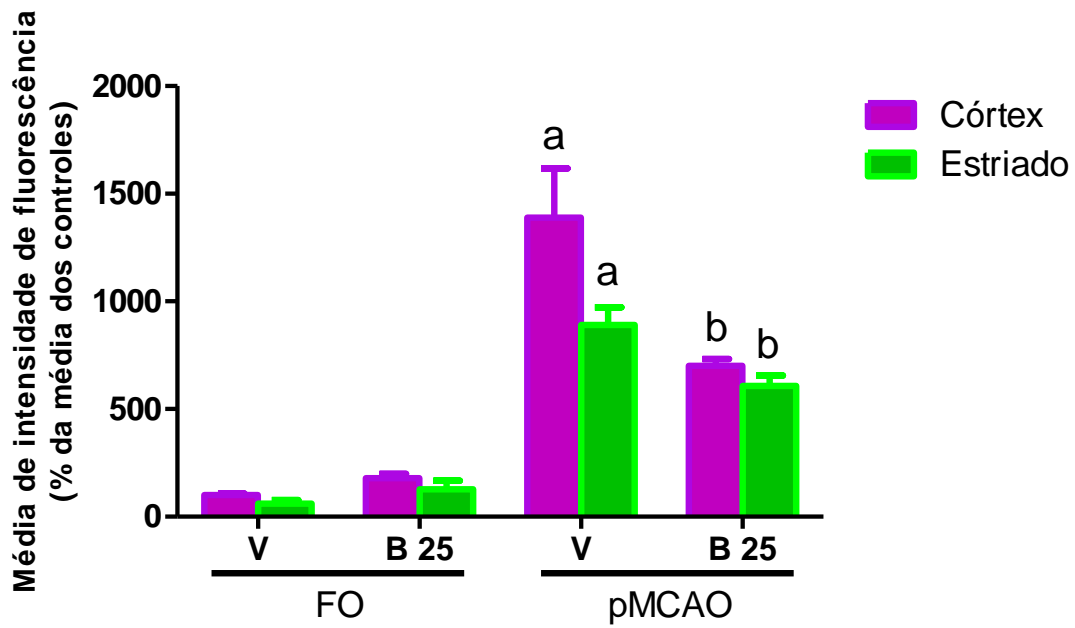


Figura 37. Efeito da boldina (25 mg/kg) sobre a astrogliose reativa evidenciada pela média da intensidade de imunofluorescência (MIF) de GFAP no córtex temporal e corpo estriado de camundongos submetidos à pMCAO. Os valores representam a média \pm EPM. a vs FO, b vs pMCAO, $p < 0,05$. Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

6. DISCUSSÃO

O AVE é causado por oclusão ou ruptura de vasos sanguíneos que comprometem a oxigenação e o fornecimento de nutrientes ao cérebro. É uma das principais causa de morte e incapacidade física e mental em todo o mundo com significativo impacto clínico e socioeconômico. No Brasil, os acidentes vasculares encefálicos promoveram a morte de 99.159 pessoas em 2010 e em 2011, 172.298 foram hospitalizadas por AVE (GARCIA, 2012). Assim, torna-se evidente a necessidade de estudos que visem novas terapias capazes de melhorar a qualidade de vida dessas vítimas.

Este estudo é pioneiro em reportar evidências pré-clínicas do efeito neuroprotetor da boldina sobre a neuroinflamação e déficits de memória em camundongos submetidos à isquemia cerebral focal pela oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO). A boldina ((S)-2,9-dihydroxy-1,10-dimethoxy-aporphine) é um alcaloide aporfínico, abundante nas folhas e casca da espécie *Peumus boldus* Molina (boldo do Chile), com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (BACKHOUSE *et al.*, 1994; LAU *et al.*, 2013; O'BRIEN, 2006). Entretanto, não há registros na literatura de sua ação neuroprotetora por vias anti-inflamatórias (TNF- α , NFkB, IL-6, COX, NO, IL1 β) *in vivo* em modelos de AVE experimental (CHANG *et al.*, 2012).

As vítimas de AVE isquêmico podem apresentar déficits cognitivos (FRERET *et al.*, 2009), assim no presente trabalho foi avaliado o efeito da boldina sobre a extensão do dano cerebral, sobre os déficits mnemônicos e neuroinflamação em animais submetidos ao modelo de isquemia cerebral focal por oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO). A pMCAO é um modelo padronizado para a indução de isquemia cerebral focal em roedores e produz uma lesão isquêmica que envolve as regiões cerebrais do córtex temporal e corpo estriado (LIPTON, 1999; TAMURA *et al.*, 1981).

Vinte e quatro horas após à pMCAO os animais foram submetidos a avaliação neurológica através da escala descrita por Garcia *et al.* (1995). No presente trabalho observamos que os animais isquemiados apresentaram significativos déficits sensório-motores 24 horas após pMCAO. Esses resultados estão de acordo com os achados de Huang e colaboradores (2014) que em seu estudo utilizando o mesmo modelo (pMCAO) e um alcalóide, a Rhynchophylline(Rhy), eles observaram que após a isquemia a Rhy melhorou os déficits neurológicos, área de infarto e o edema cerebral. Os déficits sensório-motores

analisados na escala de Garcia *et al.*, 1995 estão relacionados ao comprometimento de regiões cerebrais específicas, como os núcleos da base (GARCIA *et al.*, 1995). O tratamento intraperitoneal com boldina na dose de 25 mg/kg, diminuiu a extensão da área de infarto e déficits neurológicos após indução isquêmica. Esse efeito neuroprotetor sobre os déficits neurológicos também foi demonstrado por outros alcalóides, como, vinpocetina (WANG *et al.*, 2014) e oximatrina (LIU *et al.*, 2009). No estudo de Wang e colaboradores, (2014) usando um modelo de isquemia-reperfusão eles observaram que o edema cerebral está associado à expressão de NF-kB e TNF- α e Liu e colaboradores, (2009) trabalhando com o mesmo modelo do nosso estudo (pMCAO) eles observaram que a diminuição do volume de infarto pela oximatrina foi por meio da redução da expressão do NFkB.

Nossos resultados mostraram que os animais submetidos à pMCAO apresentaram um percentual de 8% de área de infarto no córtex e corpo estriado, 24 h após a indução isquêmica, comparados aos animais controle, corroborando também com os achados de Zhang e colaboradores, (2012) que usando o mesmo modelo de isquemia (pMCAO) observaram que a berberina reduziu a área de infarto. O tratamento com boldina na dose de 25 mg/kg, reduziu significativamente a extensão da área de infarto (3%) nos animais submetidos à pMCAO, mostrando, assim, efeito neuroprotetor contra a lesão cerebral isquêmica precoce. Esses achados são semelhantes aos encontrados com os alcaloides vinpocetina (WANG *et al.*, 2014) e oximatrina (LIU *et al.*, 2009). No estudo de Liu e colaboradores, (2009), usando o mesmo modelo de isquemia (pMCAO), eles chegaram a conclusão que a oxymatrina reduziu a área de infarto e este efeito pode ter sido devido a diminuição da expressão do NF-kB.

Em lesões cerebrais isquêmicas há uma significativa perda da viabilidade celular nas regiões de core e penumbra. O córtex e o corpo estriado são áreas cerebrais geralmente atingidas (RIVERA *et al.*, 2008). Para avaliar a viabilidade celular nós usamos a coloração de Cresil violeta e Fluoro-Jade C. A coloração de Cresil violeta é empregada para detectar corpúsculos de *Nissl* encontrados no citoplasma dos neurônios. Esses, são compostos por RNA, servindo como indicador de viabilidade neuronal. Durante a morte neuronal promovida por AVE, doença de Parkinson ou traumas, esses corpúsculos desaparecem. Esse fenômeno é denominado cromatólise (SCORZA *et al.*, 2005). O fluoro-jade C é um fluorocromo derivados de fluoresceína, utilizado rotineiramente para detectar neurônios em degeneração. É uma coloração alternativa de métodos tradicionais para análise de morte neuronal, tais como as colorações de hematoxilina e eosina, de Nissl ou de prata. No entanto, o mecanismo de quimiomarcação por Fluoro-jade C permanece desconhecido (SCHMUED *et al.*, 1997).

Neste estudo, os animais submetidos à pMCAO apresentaram uma perda significativa da viabilidade neuronal tanto no córtex, quanto no corpo estriado, 5 dias após a indução isquêmica, comparados aos animais controle. Os animais isquemiados apresentaram 20% de células Cresil violeta positiva. Nossos resultados são consistentes com os de Türeyen e colaboradores, (2004) onde eles observaram que as colorações de TTC e Cresil violeta mostraram um elevado grau de correlação entre a área de infarto e o volume, indicando que ambos os métodos são adequados para a produção de medições precisas de infartos cerebrais experimentais. Os animais tratados com a boldina, 80% das células do córtex e do estriado foram coradas com Cresil violeta, mostrando, assim, o efeito neuroprotetor da boldina e correlação com a coloração do TTC. Nossos resultados corroboram com os de Yoo e colaboradores, (2006) onde foi avaliado o efeito neuroprotetora do extrato de berberry em um modelo de isquemia transitória e eles observaram que os animais isquemiados apresentaram 11,4% de células Cresil positivas e os animais tratados com o extrato de berberry 60-75% de células foram coradas com Cresil violeta quatro dias após o insulto isquêmico. Eles sugeriram que o efeito neuroprotetora do extrato de berberry contra o dano isquêmico seja através da redução da atividade do receptor NMDA (NR1). Vários mecanismos têm sido propostos para explicar como acontece essa morte neuronal, incluindo ativação excessiva de receptores glutamatérgicos, excesso de Ca²⁺ citoplasmático, estresse oxidativo e inflamação. Nosso trabalho mostrou que os animais isquemiados apresentaram uma grande quantidade de células fluoro-jade C positivas cinco dias após a isquemia. No estudo de Liu e colaboradores (2009) eles observaram que o maior número de células fluoro-jade C positivas foi identificado 24h após OACM. A boldina na dose de 25mg/kg diminuiu esse dano neuronal, onde observamos que o número de células coradas com fluoro-jade C reduziu para 30%, em comparação com os animais isquemiados. Nossos resultados corroboram com os de Yang e colaboradores (2011) que trabalhando com modelo de isquemia cerebral observaram a presença de dano neuronal e que o biphalin, agonista de receptor opioide, diminuiu essa neurodegeneração no córtex, estriado e hipocampo após isquemia evidenciada pela redução da coloração de fluoro-jade C. O efeito de proteção da boldina no dano neuronal provavelmente seja devido a sua ação anti-inflamatória e antioxidante comprovada em vários estudos (SPEISKY *et al.*, 1991; LANHERS *et al.*, 1991; BACKHOUSE *et al.*, 1994; ZETLER, 1988).

Os pacientes de AVE apresentam disfunções motoras. A mais evidente é a hemiparesia. A hemiparesia é caracterizada por uma perda significativa da atividade dos músculos que controlam o tronco e os membros, particularmente nos músculos responsáveis pela flexão,

rotação e flexão lateral. O indivíduo com hemiparesia tem dificuldade de manter-se em uma posição de assimetria postural, com distribuição de peso corporal igual. Essa assimetria prejudica a realização de movimentos com o tronco e membros, podendo ocasionar quedas ao portador (GOMES *et al.*, 2006).

No nosso estudo, a atividade locomotora dos animais foi analisada no teste de campo aberto, através da observação da exploração horizontal (*crossings*) e da exploração vertical (*rearings*). Neste teste pode-se avaliar a função mesocorticoestriatal (KALIVAS *et al.*, 1988). Animais submetidos à MCAO geralmente apresentam alterações na atividade locomotora, pois o dano cerebral provocado por esse modelo causa a morte de neurônios no córtex e corpo estriado (SHEN e WANG, 2010).

Não foram observadas alterações significativas na exploração horizontal realizada pelos animais isquemiados. No entanto, esses animais apresentaram uma diminuição significativa da exploração vertical, corroborando com os resultados de SHEN e WANG (2010), os quais concluíram que a atividade locomotora vertical e assimetria corporal são índices comportamentais úteis para estimar o tamanho da lesão em roedores após MCAO. Contudo, essa alteração não comprometeu os animais a realizarem os testes de memória. Esses resultados também são consistentes com os de Carmo *et al.* (2014) e Fernandes *et al.* (2014). O tratamento com a boldina na dose de 25 mg/kg, protegeu os animais da redução do número de *rearings*, estando de acordo com o estudo de Zhou e colaboradores (2008) em que eles observaram que a ação anti-apoptótica da berberina pode indicar o mecanismo da prevenção na diminuição da atividade exploratória vertical.

Além das alterações motoras, o AVE acarreta déficits cognitivos, disfunções somatossensitivas e funcionais, de linguagem e do sono (HERMANN, 2003). Existem vários modelos animais para se estudar a memória em animais. Um deles é o Labirinto em Y (Y-maze), que permite ao pesquisador, avaliar o comportamento de alterações espontâneas em animais, servindo esse como medida de memória de trabalho (KIM *et al.*, 2006). Tem como fundamento a tendência dos animais de explorar “o novo”. Ainda, nesse modelo, são descartadas influências como artifícios motivacionais ou emocionais. Também, esse teste proporciona uma dissociação entre aprendizagem e memória, visto que não é necessário aprender regras (DELLU *et al.*, 1994). As estruturas cerebrais relacionadas nesse tipo de memória são: o córtex pré-frontal e o hipocampo. O córtex pré-frontal está interligado ao hipocampo ventral e indiretamente ao hipocampo dorsal através do tálamo (YOO *et al.*,

2008). A exploração de um novo ambiente nos animais depende da integridade de sistemas límbicos e não límbicos como o hipocampo, prosencéfalo basal, o corpo estriado dorsal, além do sistema vestibular, o córtex pré-frontal, o tálamo e cerebelo (LALOND, 2002).

O modelo animal de pMCAO produz déficits mnemônicos em roedores (WILLING *et al.*, 2003; TAMURA *et al.*, 2001). Zhou *et al.* (2014) observaram que a isquemia seguida de reperfusão (MCAO) induzia déficits na memória de trabalho em ratos avaliados no labirinto em Y. No nosso estudo, os animais submetidos à pMCAO apresentaram déficits na memória de trabalho 72 h após a indução isquêmica. O tratamento com a boldina nas doses de 8, 16 e 25 mg/kg preveniu significativamente esses déficits.

Vários estudos reportaram efeitos de alcaloides sobre a prevenção e tratamento de doenças neurológicas que predisõem os acometidos ao desenvolvimento de demência (SU *et al.*, 2014; GIBBS *et al.*, 2011; DESHMUKH *et al.*, 2009; POLICH e GLÓRIA, 2001). Por exemplo, a vinpocetina melhorou o desempenho de ratos no Y-maze, quando induzidos a déficits de memória por neurotoxicidade por NMDA. Esses efeitos benéficos sobre a memória podem estar relacionados à ação neuroprotetora da vinpocetina contra o dano cerebral e ativação microglial (NYAKAS *et al.*, 2009).

A tarefa de reconhecimentos de objetos foi realizada neste trabalho com o intuito de estudar a memória episódica. Essa tarefa se baseia na tendência natural do animal em buscar o novo (BESHEER, 2006). As áreas cerebrais relacionadas com esse tipo de memória são, principalmente o hipocampo e córtex perirrinal (WINTERS *et al.*, 2008). Vários estudos mostram que essa tarefa é um modelo útil para testar a memória de reconhecimento em camundongos e que o bloqueio do sistema colinérgico central prejudica essa forma de memória (Ennaceur e Delacour, (1988); Dodart *et al.*, 1997; Garcia-Moreno *et al.*, 2002). No nosso trabalho, os animais submetidos à indução isquêmica apresentaram déficit na memória episódica. Esses resultados são consistentes com os de Mcauliffe e colaboradores (2009), que demonstrou que camundongos submetidos à hipóxia/isquemia apresentam baixo desempenho na tarefa de reconhecimento de objetos.

A boldina (25 mg/kg) preveniu, significativamente, os animais isquemiados desse déficit. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Le *et al.* (2013), que demonstraram que o extrato alcoólico de *Bacopa monnieri*, foi capaz de diminuir déficits de memória episódica dos animais, pela capacidade de estimular a transcrição de BDNF, que é um fator neurotrófico intimamente relacionado a sinalização sináptica e envolvido no

processo da memória. O extrato alcoólico de *Bacopa monnieri* é rico em alcaloides como, hidrocotilina, brahmina e herpestina (MATHEW, *et al.*, 2010).

O labirinto aquático de Morris foi utilizado neste trabalho para avaliar a memória espacial, segundo descrito por Morris (1984). As áreas cerebrais relacionadas com esse tipo de memória são especialmente o hipocampo e o corpo estriado (BLOCK *et al.*, 1993). Nosso trabalho mostrou que os animais do grupo pMCAO apresentaram déficit na memória espacial quando avaliamos os parâmetros de latência, número de cruzamentos e tempo de permanência no quadrante, corroborando com o de Yonemori e colaboradores, (1996).

O tratamento com boldina na dose de 25mg/kg preveniu os animais pMCAO dos déficits de memória espacial nos parâmetros de latência, permanência e cruzamentos, e nas doses de 8, 16 e 25 preveniu os animais pMCAO dos déficits de memória espacial no parâmetro de tempo de permanência no quadrante. No modelo de oclusão pMCAO utilizado neste estudo, o córtex cerebral e estriado são lesionados diretamente, mas o hipocampo não é lesionado diretamente (TAMURA *et al.*, 1981; OKADA *et al.*, 1995a), embora tenha possibilidades de danos secundários para o hipocampo contribuindo para a diminuição da retenção da memória espacial. A galantamina, um outro alcaloide, preveniu significativamente o déficit da memória espacial de gerbil submetidos à isquemia-reperusão. Esse resultado deve-se a seu efeito protetor observado nas células da região CA1 do hipocampo, pela capacidade da galantamina em inibir a acetilcolinesterase, inibir o estresse oxidativo pela eliminação de EROS, induzir a proteína anti-apoptótica Bcl-2 e ainda, potencializar a atividade do receptor nicotínico, facilitando a transmissão sináptica (LORRIO *et al.*, 2009).

A esquiva passiva é um modelo clássico para se estudar a memória aversiva em modelos animais (DEVRIES *et al.*, 2001). A esquiva passiva do tipo *step-down* “descer um degrau” é fundamentada no comportamento natural que os animais possuem de explorar além da plataforma, mas também de se esquivar da situação aversiva gerada pelo choque na parte gradeada do aparato (IZQUIERDO e MEDINA, 1997). Animais submetidos à isquemia cerebral por pMCAO apresentam déficits nas memórias recente e tardia avaliadas no teste de esquiva passiva (DENOBLE *et al.*, 1986). No estudo de DeNoble e colaboradores (1986), eles observaram que a vinpocetina administrado 60 minutos antes do teste para a retenção aumentou significativamente o tempo de latência para descer da plataforma para a grade

eletrificada, mostrando que a vinpocetina tem habilidades de ativação de cognição, conforme definido em um modelo animal de recuperação da memória.

Nesse estudo, os animais submetidos à pMCAO apresentaram déficits na memória aversiva 72 h após a indução isquêmica. O tratamento com a boldina nas doses de 25 mg/kg pretegeu esses déficits. Esses resultados são consistentes com os de Ji *et al.*, (2007) que mostraram os efeitos protetores da galantamina sobre os déficits de memória aversiva e recuperação das células da região CA1 do hipocampo em animais submetidos a isquemia cerebral global transitória.

O efeito neuroprotetor da boldina pode estar envolvido tanto a sua ação antioxidante, demonstrada em outros estudos (SPEISKY *et al.*, 1991; CASSELS *et al.*, 1995; FERNÁNDEZ *et al.*, 2009;), quanto a sua ação anti-inflamatória, já que moléculas que podem interferir com a produção de EROS podem, também, possuir propriedades anti-inflamatórias (BACKHOUSE *et al.*, 1994; GOTTELAND *et al.*, 1997). A boldina, diante de um dano neurológico, é neuroprotetora (mostrado pelas colorações onde células dos animais tratados com a boldina são recuperadas), e pelos estudos de memória (onde a boldina diminuiu déficits nos modelos estudados). Essa neuroproteção pode estar relacionada tanto a sua ação antioxidante, quanto a sua ação anti-inflamatória. Deste modo, o presente trabalho propôs estudar a ação anti-inflamatória da boldina em animais submetidos à pMCAO e verificar se esse efeito foi, pelo menos em parte, responsável pela neuroproteção.

A neuroinflamação é um processo determinante para a progressão do dano isquêmico (HOU *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2014). Vários distúrbios circulatórios e outras doenças neurodegenerativas estão relacionados com uma resposta inflamatória generalizada (McGeer, 1992). A hipóxia e conseqüente estresse oxidativo sensibiliza o sistema imunológico residente no cérebro (BROUGHTON *et al.*, 2013). É desencadeada uma regulação positiva de quimiocinas que conduz a quimiotaxia de células do endotélio vascular para o parênquima cerebral isquêmico, promovendo a quebra da barreira hemato-encefálica (BHE), especialmente em torno da penumbra. Essas células liberam vários agentes tóxicos, tais como metaloproteinases de matriz (MMPs), óxido nítrico (NO) e outros mediadores responsáveis pelo processo inflamatório no AVE (HAN e YENARI, 2003).

Os neutrófilos são os primeiros leucócitos a invadirem o foco isquêmico. Em um modelo de isquemia cerebral transitória, os neutrófilos apresentaram-se presentes em torno

das primeiras 4 a 6 horas (NILUPUL *et al.*, 2006). Em outro estudo utilizando o mesmo modelo, foi observado que a redução do infarto cerebral foi relacionada ao bloqueio da migração neutrofílica (YENARI *et al.*, 1998). A MPO é uma enzima presente nos grânulos azulófilos dos neutrófilos (WANG *et al.*, 2013) e sua atividade enzimática elevada foi estabelecida como indicação quantitativa de infiltração leucocitária na neuroinflamação em animais isquemiados (SHI *et al.*, 2014).

Nesse estudo avaliamos a atividade da MPO após 24h a pMCAO e observamos que os animais isquemiados apresentaram um aumento da atividade de MPO no córtex temporal ipsilateral. Tu e colaboradores (2010), trabalhando com o mesmo modelo de isquemia, observou um aumento da atividade da mieloperoxidase, 24h após a isquemia. Os animais isquemiados, quando tratados com a boldina, na dose 25mg/kg, apresentaram esta atividade diminuída. Os efeitos citoprotetores e antiinflamatórios da boldina sobre o aumento da atividade de MPO também foram documentados em um modelo experimental de colite aguda (GOTTELAND *et al.*, 1997).

As células da glia (micróglia e astrócitos) são os principais responsáveis pela resposta inflamatória do sistema nervoso central (SRIRAM e O'CALLAGHAN, 2007). A microglia constitui aproximadamente 5-10% de todas as células do cérebro, e é considerada o sistema imune residente do cérebro. Participam da defesa do cérebro contra a infecção, e são ativadas sob condições de trauma, isquemia, neurodegeneração (EL KHOURY *et al.*, 1998). Os astrócitos são outras células da glia que aparecem ativados no processo inflamatório após AVE, levando a expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), evento esse, conhecido como astrogliose reativa (PEKNY e NILSSON, 2005). Os astrócitos ativados contribuem para a neuroinflamação secretando citocinas e quimiocinas, bem como, a óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) (DONG e BENVENISTE, 2001). Essa cascata imune é crucial para o desenvolvimento do infarto cerebral (IADECOLA e ANRATHER, 2011). Terapias anti-inflamatórias têm demonstrado ser eficaz no combate a progressão da lesão em modelos animais de isquemia através da inibição de mediadores inflamatórios (HUANG *et al.*, 2014).

Neste estudo, os animais submetidos à pMCAO apresentaram um aumento da expressão de GFAP, no córtex e corpo estriado, 5 dias após a indução isquêmica. Zhu e colaboradores (2000) revelaram em ratos submetidos a isquemia cerebral focal transitória, que a expressão de GFAP inicia-se com 4 a 24 horas após o insulto, atingindo um pico em torno de 4 dias, persistindo até 28 dias. No presente trabalho observou-se que os animais

isquemiados (pMCAO) e tratados com a boldina apresentaram uma redução da expressão de GFAP no córtex e no estriado ipsilateral. Este é o primeiro relato da ação da boldina sobre a ativação astrocitária. Estudos anteriores têm demonstrado o efeito neuroprotetor de vários alcaloides contra a ativação astrocitária no AVE isquêmico experimental *in vivo*. Por exemplo, a berberina é um alcaloide isoquinolinico. Sua administração nas doses de 50 e 100 mg/kg, vo, uma vez por dia, reduziu significativamente a atividade astrocítica (GFAP) no hipocampo de ratos com diabetes induzidos por streptozotocina (STZ) (MOGHADDAM *et al.*, 2014). Também a cafeína, um alcaloide antagonista dos receptores de adenosina A(1) e A(2A), diminuiu a astrogliose em ratos diabéticos do tipo 2 (DUARTE *et al.*, 2012).

A resposta glial ativa fatores de transcrição pró-inflamatório como o NF- κ B e subsequente expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e iNOS na região isquêmica ipsilateral (YU *et al.*, 2013). As citocinas têm sido implicadas em diversos mecanismos, que podem potencializar a lesão isquêmica cerebral, tais como a liberação da forma induzível da enzima óxido nítrico sintetase pelos astrócitos; o recrutamento, a ativação e a adesão leucocitárias ao endotélio; a promoção do estado pró-coagulante endotelial e a regulação do processo da apoptose. O TNF- α participa ativamente dos mecanismos de lesão cerebral que ocorrem no AVE (OYGÜR *et al.*, 1998; SHALAK *et al.*, 2002).

O TNF- α , começa a elevar-se na primeira hora após a oclusão da artéria cerebral média, com pico de resposta à isquemia em 6 a 12 horas (BARONE *et al.*, 1997; YAMASAKI *et al.*, 1995). Em modelos animais de AVE o aumento da expressão de TNF- α tem sido observado tanto em neurônios (LIU *et al.*, 1994), quanto em astrócitos (UNO *et al.*, 1997). A inibição da expressão de TNF- α tem demonstrado diminuir o dano cerebral (YANG *et al.*, 1998). Ainda, MCAO induz a um aumento significativo da expressão de NF- κ B, que, por sua vez, faz a mediação da transcrição do TNF- α e expressão do seu mRNA no prazo de 7 dias após o evento isquêmico (TANG *et al.*, 2014).

O óxido nítrico (NO) está envolvido numa variedade de processos biológicos, incluindo, a defesa do hospedeiro, regulação do tônus vascular e modulação da resposta imune. Através da oxido nítrico sintetase o NO é sintetizado a partir da L-arginina. Até então, existem três isoformas da oxido nítrico sintetase: neuronal (nNOS ou NOS-1), NOS induzível (iNOS ou NOS-2) e endotelial (eNOS ou NOS-3). A iNOS é encontrada exclusivamente no processo inflamatório. A expressão de iNOS tem se mostrado em células da micróglia e astrócitos em modelos animais de AVE (IADECOLA *et al.*, 1995).

No presente estudo, os animais submetidos à pMCAO apresentaram imunoreatividade para TNF- α e iNOS no córtex e no estriado ipsilateral. Hou e colaboradores (2012) observaram que a isquemia cerebral provocava um aumento significativo de vários mediadores inflamatórios, tais como, interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF- α), óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), e fator nuclear kappa beta (NF-kB) sendo consistente com os nossos resultados. A boldina reduziu significativamente a expressão de TNF- α e a expressão de iNOS nestes animais. Estudos recentes mostraram a ação de alcaloides contra o aumento de marcadores pró-inflamatórios (NF-kB, TNF- α , iNOS e NO). No estudo de Niu e colaboradores (2014) eles observaram que alcaloides totais de *Corydalis denticulato-bracteata* Fedde pode ter efeito protetor contra lesão pulmonar aguda induzida por LPS. Este efeito protetor dos alcaloides totais parece resultar da inibição da ativação do NF-kB levando a redução dos marcadores inflamatórios tais como TNF- α e iNOS. Nossos resultados corroboram com os de Wang e colaboradores (2014) que estudaram o efeito anti-inflamatório da vinpocetina (alcaloide) em um modelo de isquemia/reperfusão cerebral e observaram que este alcaloide diminuiu a expressão do NF-kB e TNF- α e inibiu a resposta inflamatória após isquemia.

Neoechinulins A, um alcaloide do tipo diketopiperazine, suprimiu significativamente a produção das mesmas citocinas pró-inflamatórias citadas acima, induzidas por LPS em macrófagos RAW264.7 (KIM *et al.*, 2013). Estes resultados sugerem que o efeito neuroprotetor da boldina pode estar relacionado ao efeito anti-inflamatório por diminuição da resposta astrogliar e consequente redução da expressão de TNF- α e iNOS em pMCAO.

Os mecanismos anti-inflamatórios da boldina evidenciados neste estudo, como a redução da atividade de MPO, inativação astrogliar e redução da imunoreatividade de TNF- α e iNOS, podem explicar, pelo menos em parte, o seu efeito neuroprotetor sobre o dano neuronal, déficits sensório-motores e déficits de memória, induzidos por isquemia cerebral focal permanente. Porém, se faz necessário dar continuidade a esta pesquisa para a compreensão dos mecanismos moleculares da ação anti-inflamatória da boldina envolvidas nesta neuroproteção, bem como, descobrir a sua possível relação com as vias promotoras de neuroplasticidade, que elucidarão de forma clara, os seus efeitos sobre a cognição, especificamente, sobre a aprendizagem e a memória.

Além dos dados apresentados no nosso estudo, que demonstram um expressivo efeito neuroprotetor, e que pelo menos em parte, esta ação está atribuída a atividade anti-

inflamatória da boldina, outras características que tornam a boldina atrativa para a terapêutica são a sua capacidade de ser bem distribuída pela circulação sistêmica (JIMENEZ & SPEISKY, 2000) e de atravessar a barreira hematoencefálica (LOGHIN *et al.*, 2003).

7. CONCLUSÃO

No presente estudo foi demonstrado que a boldina no modelo de isquemia cerebral focal permanente em camundongos:

- Diminuiu os déficits neurológicos através da avaliação neurológica;
- Reduziu o dano cerebral e a morte neuronal no córtex temporal e corpo estriado;
- Diminuiu os déficits na memória de trabalho, episódica, espacial e aversiva;
- Diminuiu a atividade da MPO no processo inflamatório no córtex temporal;
- Reduziu a imunoreatividade da citocina pró-inflamatória (TNF- α), da enzima iNOS, e da proteína marcadora de atividade astrocitária (GFAP), no córtex temporal e corpo estriado, de animais submetidos à pMCAO.

Em conclusão, nossos dados mostram que a boldina na dose de 25mg/kg possui um efeito protetor contra a isquemia cerebral focal, induzida por pMCAO no córtex temporal e corpo estriado. Pode atenuar o prejuízo da memória, neurodegeneração e volume do infarto cerebral observada com este insulto. A ação da boldina está provavelmente relacionada com a sua capacidade para modular a atividade astrogliar e regular, negativamente as vias de TNF- α e iNOS. No entanto, a continuação deste estudo deve ser feita para revelar outros mecanismos, que não o anti-inflamatório, que podem estar envolvidos na sua ação neuroprotetora.

REFERÊNCIAS

- ADIBHATLA, R.M.; HATCHER, J.F. Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxid Redox Signal**, v.12, p. 125-169, 2010.
- AGRA, M.F.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-Filho, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev Bras Farmacogn** ., v.17, p. 114-140, 2007.
- ALBERS, G.W.; AMARENCO, P.; EASTON, J.D.; SACCO, R.L.; TEAL, P.; AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS. Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). **Chest**, v.133, p. 630-669, 2008.
- ALLEN, C. L.; BAYRAKTUTAN, U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. **Int J Stroke**. v. 4, p. 461-470, 2009.
- ALLEN, N.J.; KARADOTTIR, R.; ATTWELL, D. Reversal or reduction of glutamate and GABA transport in CNS pathology and therapy. **Pflügers Arch.**, v. 449, p. 132–142, 2004.
- AVIRAM, R.B.; RHUM, M.; LEVIN, F.R. Psychotherapy of adults with comorbid attention-deficit/hyperactivity disorder and psychoactive substance use disorder. **J Psychother Pract Res.**, v.10, p.179-186, 2001.
- BACIGALUPPI, M.; COMI, G.; HERMANN, D.M. Animal Models of Ischemic Stroke. Part Two: Modeling Cerebral Ischemia . **The Open Neurology Journal**, v. 4, p. 34-38, 2010.
- BACKHOUSE, N.; DELPORTE,C.;GIVERNAU,M.;CASSELS, B.K.; VALENZUELA, A.; SPEISKY, H. Anti-inflammatory and antipyretic effects of boldina. **Agents and Actions**, v. 42, p. 114– 117, 1994.
- BARONE, F.C.; ARVIN, B.; WHITE, R.F.; MILLER, A.; WEBB, C.L.; WILLETTE, R.N.; LYSKO, P.G.; FEUERSTEIN, G.Z. Tumor necrosis factor-a - a mediator of focal ischemic brain injury. **Stroke** , v. 28, p. 1233-1244, 1997.
- BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am J Physiol.**, v. 271, p. 1424-1437, 1996.
- BLOCK, F.; KUNKEL, M.; SCHWARZ, M. Quinolinic acid lesion of the striatum induces impairment in spatial learning and motor performance in rats. **Neurosci. Lett**, v. 149, p. 126–128, 1993.
- BRADLEY, P.P.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, p. 618-622,1982.
- BRANDÃO, M.G.L.; COSENZA, G.P.; MOREIRA, R.A.; MONTE-MOR, R.L.M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Rev Bras Farmacogn** ., v.16, p. 408-420, 2006.

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

BROUGHTON, B.R, LIM, R., ARUMUGAM, T.V, DRUMMOND, G.R, WALLACE, E.M, SOBEY, C.G. Post-stroke inflammation and the potential efficacy of novel stem cell therapies: focus on amnion epithelial cells. **Frontiers in Cellular Neuroscience** v.6, p.1-9, 2013.

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

CARRILLO-MORA, P. Sistemas de memoria: reseña histórica, clasificación y conceptos actuales. Primera parte: Historia, taxonomía de la memoria, sistemas de memoria de largo plazo: la memoria semântica. **Salud Mental**, v. 33, p. 85-93, 2010.

CAMPOS, E. B. P.; YOSHIDA, W. B. O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. **Jornal Vascular Brasileiro.** v. 3, p. 357-366, 2004.

CARLSON, S.L.; PARRISH, M.E.; SPRINGER, J.E.; DOTY, K.; DOSSETT, L. Acute inflammatory response in spinal cord injury following impact injury. **Exp. Neurol.**, v.151, p.77-88, 1998.

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

CASSELS, B.K.; ASECIO, M.; CONGET, P.; SPEISKY, H.; VIDELA, L.A.; LISSI, E.A. Structure-antioxidative activity relationships in benzylisoquinoline alkaloids. **Pharm Res.**, v. 31, p.103-107, 1995.

CHANG, C.W.; CHANG, W.T.; LIAO, J.C.; CHIU, Y.J.; HSIEH, M.T.; PENG, W.H.; LIN, Y.C. Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Methanol Extract of *Cissus repens* in Mice. **Evid Based Complement Alternat Med.** v. 2012, p. 1-10, 2012.

CHAPMAN, K.M.; WOOLFENDEN, A.R.; GRAEB, D.; JOHNSTON, D.C.C.; BECKMAN, J.; SCHULZER, M.; TEAL, P.A. Intravenous tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke: A canadian hospital's experience. **Stroke**, v. 31, p. 2920-2924, 2000.

CHAN, P. H. Role of oxidants in ischemic brain damage. **Stroke**, v. 27, p. 1124-1129, 1996.

CHEN, M.; He, H.; ZHAN, S.; KRAJEWSKI, S.; REED, J.C.; GOTTLIEB, R.A. Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. **J Biol Chem.**, v. 276, p. 30724-30728, 2001.

CHEN, Q.; VAZQUEZ, E.J.; MOGHADDAS, S.; HOPPEL, C.L.; LESNEFSKY, E.J. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. **J Biol Chem.** v. 278, p. 36027-36031, 2003.

CHOI, D. W. Excitotoxic cell death. **J. Neurobiol.**, v. 23, p. 1261-1276, 1992.

COYLE, J.T.; PUTTFARCKEN, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. **Science**, v. 262, p. 689-695, 1993.

COULTRAP, S.J.; VEST, R.S.; ASHPOLE, N.M.; HUDMON, A.; BAYE, K.U. CaMKII in cerebral ischemia. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 32, p. 861-872, 2011.

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

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

DENOBLE, V.J.; REPETTI, S.J.; GELPKE, L.W.; WOOD, L.M.; KEIM, K.L. Vinpocetine: nootropic effects on scopolamine-induced and hypoxia-induced retrieval deficits of a step-through passive avoidance response in rats. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 24, p. 1123-1128, 1986.

DESHMUKH, R.; SHARMA, V.; MEHAN, S.; SHARMA, N.; BEDI, K.L. Amelioration of intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive dysfunction and oxidative stress by vinpocetine – a PDE1 inhibitor. **Eur J Pharmacol.**, v. 620, p.49-56, 2009.

DEVARAJAN, P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology, Washington**, v. 17, n. 6, p. 1503- 1520, 2006.

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

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

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

DONNAN, G.A.; FISHER, M.; MACLEOD, M.; DAVIS, SM. Stroke.**Lancet**. v. 371 p. 1612-1623, 2008.

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

DODART, J.C.; MATHIS, C.; UNGERER, A. Scopolamine-induced deficits in a two-trial object recognition task in mice.**Neuroreport.**, v. 8, p. 1173-1178, 1997.

DUARTE, J.M.; AGOSTINHO, P.M.; CARVALHO, R.A.; CUNHA, R.A. Caffeine consumption prevents Diabetes induced memory impairment and synaptotoxicity in the hippocampus of NONcZNO10/LTJ mice. **PLoSOne**, v. 7, p. e21899, 2012.

EL KHOURY, J.; HICKMAN, S.E.; THOMAS, C.A.; LOIKE, J.D.; SILVERSTEIN, S.C. Microglia, scavenger receptors, and the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Neurobiol.Aging**, v.19, p. S81-84, 1998.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behav Brain Res.** , v. 31, p. 47-59, 1988.

EUSI, 2003. AVC Isquêmico, Profilaxia e Tratamento. Informação para médicos hospitalares e medicina ambulatória. Recomendações 2003 – Flyer Portugal. **European Stroke Initiative**. Disponível em: <www.congrex-switzerland.com/.../EUSI_recommendations_flyer_portug>. Acesso em março 2015

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

FRERET, T.; BOUET, V.; LECONTE, C. Behavioral Deficits After Distal Focal Cerebral Ischemia in Mice: Usefulness of Adhesive Removal Test. **Behavioral Neuroscience**, v. 123(1), p. 224-230, 2009.

FRIEDLANDER, R.M. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. **N Engl J Med.**, v. 348, p. 1365–1375, 2003.

FU, Y.; LIU, Q.; ANRATHER, J.; SHI, F.D. Immune interventions in stroke. **Nat Rev Neurol.** 11(9):524-35. 2015.

FUJIMAKI, N.; MUNETSUNAA, S.; SASAKIC, T.; HAYAKAWAA, T.; IHARAA, A.; WEIA, Q.; TERAZONOA, Y.; MURATAA, T. Neural activations correlated with reading speed during reading novels. **Neuroscience Research.** , v. 65, p. 335-342, 2009.

GAIRE, B.P.; KWON, O.W.; PARK, S.H.; CHUN, K.H.; KIM, S.Y.; SHIN, D.Y.; CHOI, J.W. Neuroprotective effect of 6-paradol in focal cerebral ischemia involves the attenuation of neuroinflammatory responses in activated microglia. **PLoS One**, v.10, p. 1-17, 2015.

GARCIA ,J.H.; 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, p. 627-635, 1995.

GARCIA, D.A.; BAGLIN, T.P.; WEITZ, J.I.; SAMAMA, M.M.; AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS. Parenteral anticoagulants: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. **Chest.** , v. 141, p. 24s-48s, 2012 .

GARCIA, N. Ministério amplia assistência a pacientes com AVC. Portal da Saúde, Agência de Saúde, Ministério da Saúde [on line]. 2012. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/4790/162/ministerio-da-saudeamplia-assistencia-a-pacientes-com-avc.html>. Acesso em: 02 março 2015.

- GARCÍA-MORENO, L.M.; CONEJO, N.M.; CAPILLA, A.; GARCÍA-SÁNCHEZ, O.; SENDEREK, K.; ARIAS, J.L. Chronic ethanol intake and object recognition in young and adult rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 26, p. 831-837, 2002.
- GIBBS, R.B., CHIPMAN, A.M., HAMMOND, R., NELSON, D. Galanthamine plus estradiol treatment enhances cognitive performance in aged ovariectomized rats. **Horm Behav.**, v. 60, p. 607-616, 2011.
- GILGUN-SHERKI, Y.; ROSENBAUM, Z.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Antioxidant Therapy in Acute Central Nervous System Injury: Current State. **Pharmacological Reviews, Bethesda**, v. 54, n. 2, p. 271–284, 2002.
- GOLD, P.E. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. **Behav. Neural Biol.** v. 46, p. 87–98, 1986.
- GOLDLUST, E.J., PACZYNSKI, R.P., HE, Y.Y., HSU, C. Y., GOLDBERG, M. P. Automated measurement of infarct size with scanned images of triphenyltetrazolium chloride-stained rat brains. **Stroke**, v. 27, p.:1657-1962, 1996.
- GOMES, B.M.; NARDONI, G.C.G.; LOPES, P.G.; GODOY, E. Efeito da técnica de reeducação postural global em um paciente com hemiparesia após acidente vascular encefálico. **Acta fisiátrica**.13:103-8, 2006.
- GOTTELAND, M., JIMENEZ, I. BRUNSER, O. GUZMAN, L., ROMERO, S., CASSELS, B.K., SPEISKY, H. Protective effect of boldine in experimental colitis. **Planta Med.** V.63; p.311-315, 1997.
- GYURKOVSKA, V.; PHILIPOV, S.; KOSTOVA, N.; IVANOVSKA, N. Acetylated derivative of glaucine inhibits joint inflammation in collagenase-induced arthritis. **Immunopharmacol Immunotoxicol.** 37(1):56-62, 2015.
- HACKE, W; KASTE, M; BLUHMKI, E; BROZMAN, M; DAVALOS, A; GUIDETTI, D; LARRUE, V; LEES, KR; MEDEGHRI, Z; MACHNIG, T; SCHNEIDER, D; VON KUMMER, R; WAHLGREN, N; TONI, D. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. **N Engl J Med.** v. 359, p. 1317-1329, 2008.
- HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?. **Lancet**, v. 344, p. 721-724, 1994.
- HAN, H.S.; YENARI, M.A. Cellular targets of brain inflammation in stroke. **Curr.Opin.Investig.Drugs**, 4(5), 522-529, 2003.
- HERMANN, D.M.; SICCOLI, M.; BASSETTI, C.L. Sleep-wake disorders and stroke. **Schweiz Arch NeurolPsychiatr.** 154:369-73, 2003.
- HERNÁNDEZ-SALINAS, R.; VIELMA, A.Z.; ARISMENDI, M.N.; BORIC, M.P.; SÁEZ, J.C.; VELARDE, V. Boldine prevents renal alterations in diabetic rats. **J Diabetes Res.** v. 13, p. 1-12, 2013.
- HOFFMANN, E. J., RIBEIRO, F.; FARNESE, J. M.; LIMA, E. W. B. Sintomas depressivos e fatores associados entre idosos residentes em uma comunidade no norte de Minas Gerais, Brasil. **J. Bras. Psiquiatr.** v. 59, p. 190-197, 2010.

HOL, E.M.; PEKONY, M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. **Curr Opin Cell Biol.**, v. 32, p. 121-130, 2015.

HOSSMANN, K.A. Experimental models for the investigation of brain ischemia. **Cardiovasc Res.**, v. 39, p. 106-120, 1998.

HOU, S.Z.; LI, Y.; ZHU, X.L.; WANG, Z.Y.; WANG, X.; XU, Y. Ameliorative effects of diammoniumglycyrrhizinate on inflammation in focal cerebral ischemic-reperfusion injury. **Brain Res.**, v. 1447, p. 20-27, 2012.

HUANG, H.; ZHONG, R.; XIA, Z.; SONG, J.; FENG, L. Neuroprotective Effects of Rhynchophylline against Ischemic Brain Injury via Regulation of the Akt/mTOR and TLRs Signaling Pathways. **Molecules**, v. 19, p. 11196-11210, 2014.

HUANG, W.; LV, B.; ZENG, H.; SHI, D.; LIU, Y.; CHEN, F.; LI, F.; LIU, X.; ZHU, R.; YU, L.; JIANG, X. Paracrine factors secreted by mscs promote astrocyte survival associated with gfap downregulation after ischemic stroke via p38 MAPK and JNK. **J Cell Physiol.**, v. 230, p. 2461-2475, 2015.

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

IADECOLA, C.; ZHANG, F.; XU, S.; CASEY, R.; ROSS, M.E. Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** 15(3), 378-384, 1995.

IADECOLA, C.; ANRATHER, J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. **Nat. Med.**, v. 17, p. 796-808, 2011.

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

IZQUIERDO, I.; BARROS, D.M.; MELLO E SOUZA, T.; DE SOUZA, M.M.; IZQUIERDO, L.A.; MEDINA, J.H. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v. 393, p. 635-636, 1998.

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

JANG, Y.Y.; SONG, J.H.; SHIN, Y.K.; HAN, E.S.; LEE, C.S. 2000. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmacol Res.**, v. 42, p. 361-371, 2000.

JIMÉNEZ, I.; SPEISKY, H. Biological disposition of boldine: in vitro and in vivo studies. **Phytother Res.** v.4, p. 254-260, 2000.

JI, X.; LI, C.; LU, Y.; CHEN, Y.; GUO, L. Post-ischemic continuous administration of galantamine attenuates cognitive deficits and hippocampal neurons loss after transient global ischemia in gerbils. **Neurosci Lett.** v.416, p. 92-95,2007.

JOUAN-LANHOUE, S.; RIQUET, F.; DUPREZ, L.; VANDEN B. T.; TAKAHASHI, N.; VANDENABEELE, P. Necroptosis, in vivo detection in experimental disease models. **Seminars in Cell & Developmental Biology.** v. 35, p. 2–13, 2014.

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, p. 485-492, 1988.

KANDEL, E.R. DUDAI, Y. MAYFORD, M.R. The molecular and systems biology of memory. **Cell.** v. 157, p. 163-186, 2014.

KANG, H. C.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. Excitotoxic programmed cell death involves caspase-independent mechanisms. **Acute neuronal injury,** p. 79-88, 2010.

KANG, J.J.; CHENG, Y.W.; FU, W.M. Studies on neuromuscular blockade by boldine in the mouse phrenic nerve-diaphragm. **Jpn J Pharmacol.** v. 76, p. 207-212, 1998.

KANG, J.J.; CHENG, Y.W. Effects of boldine on mouse diaphragm and sarcoplasmic reticulum vesicles isolated from skeletal muscle. **Planta Med.** v. 64, p. 18-21,1998.

KAWABORI, M.; YENARI, M.A. Inflammatory responses in brain ischemia. **Curr Med Chem.,** v. 22, p. 1258-1277, 2015.

KELLY, P.J.; MORROW, J.D.; NING, M.; KOROSHETZ, W.; LO, E.H.; TERRY, E.; MILNE, G.L.; HUBBARD, J.; LEE, H.; STEVENSON, E.; LEDERER, M.; FURIE, K.L. Oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 in acute ischemic stroke: the Biomarker Evaluation for Antioxidant Therapies in Stroke (BEAT-Stroke) study. **Stroke** , v. 39, p. 100-110, 2008.

KIM, D.H.; HUNG, T.M.; BAE, K.H.; JUNG, J.W.; LEE, S.; YOON, B.H.; CHEONG, J.H.; KO, K.H.; RYU, J.H. Gomisin A improves scopolamine-induced memory impairment in mice. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 542, p. 129-135, 2006.

KIM, H.Y.; VAUGHAN, D.K.; GHOSH, S. Pathways of cerebral calcium accumulation in a model of focal ischemia in rats. **Neurol. Res.,** v.20, p. 169–177, 1998.

KIM, K.S.; CUI, X.; LEE, D.S.; SOHN, J.H.; YIM, J.H.; KIM, Y.C.; OH, H. Anti-inflammatory effect of neoechinulin a from the marine fungus Eurotium sp. SF-5989 through the suppression of NF- κ B and p38 APK Pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. **Molecules,** v.18, p. 13245-13259, 2013.

KONRATH, E.L., SANTIN, K., NASSIF, M., LATINI, A., HENRIQUES, A., SALBEGO, C. Antioxidant and pro-oxidant properties of boldine on hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation in vitro. **Neurotoxicology**, v. 29, p. 1136-1140, 2008.

KREUTZBERG, G.W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends Neurosci.**, 19(8), 312-318, 1996.

KRINGSTEIN, P.; CEDERBAUM, A.I. Boldine prevents human liver microsomal lipid peroxidation and inactivation of cytochrome P4502E1. **Free Radical Biol Med.**, v. 18, p. 559-563, 1995

KUNZ, A.; DIRNAGL, U.; MERGENTHALER, P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology, Germany**, v. 24, p. 495-509, 2010.

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

LAU, Y.S., TIAN, X.Y., HUANG, Y., MURUGAN, D., ACHIKE, F.I., MUSTAFA, M.R. Boldine protects endothelial function in hyperglycemia-induced oxidative stress through an antioxidant mechanism. **Biochem Pharmacol.**, v. 85, p. 367-375, 2013.

LANHERS, M.C., JOYEUX, M., SOULIMANI, R., FLEURENTIN, J., SAYAG, M., MORTIER, F., YOUNOS, C. AND PELT, J. M. Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of a traditional medicinal plant of Chile, *Peumus boldus*. **Planta Med.** v.57, p.110–115,1991.

LE, X.T.; PHAM, H.T.; DO, P.T.; FUJIWARA, H.; TANAKA, K.; LI, F.; VAN NGUYEN, T.; NGUYEN, K.M.; MATSUMOTO, K. Bacopa monnieri ameliorates memory deficits in olfactory bulbectomized mice: possible involvement of glutamatergic and cholinergic systems. **Neurochem Res.** , v. 38, p. 2201-2215, 2013.

LENNMYR, F.; KARLSSON, S.; GERWINS, P.; ATA, K. A.; TERÉNT, A. Activation of mitogen-activated protein kinases in experimental cerebral ischemia. *Acta Neurologica Scandinavica*, **Copenhagen**, v. 106, p. 333–340, 2002.

LI, F.; GONG, Q.; WANG, L.; SHI, J. Osthole attenuates focal inflammatory reaction following permanent middle cerebral artery occlusion in rats. **Biol Pharm Bull.** v. 35, p. 1686-1690, 2012.

LI, X.; FANG, P.; MAI, J.; CHOI, E.T.; WANG, H.; YANG, X.F. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. **J. Hematol. Oncol.** , v. 6, p.19. 2013.

LIMA, A. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). 2008. 182p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) –Ciência dos Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, USP – São Paulo.

LIPTON P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiol Rev.**v.79, p. 1431-1568, 1999.

LIU, F.; SCHAFER, D.P.; MCCULLOUGH, L.D. TTC, Fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by Middle Cerebral Artery Occlusion. **J Neurosci Methods**, v. 179, p. 1-8, 2009.

LIU, T.; CLARK, R.K.; MCDONNELL, P.C.; YOUNG, P.R.; WHITE, R.F.; BARONE, F.C.; FEUERSTEIN, G.Z. Tumor necrosis factor-alpha expression. in ischemic neurons. **Stroke**, 25(7), 1481-1488, 1994.

LIU, Y.; TANG, G.; LI, Y.; WANG, Y.; CHEN, X.; GU, X.; ZHANG, Z.; WANG, Y.; YANG, G.Y. Metformin attenuates blood-brain barrier disruption in mice following middle cerebral artery occlusion. **J. Neuroinflammation**, v.11, p. 1-12, 2014.

LIU, Y.; ZHANG, X.J.; YANG, C.H.; FAN, H.G. Oxymatrine protects rat brains against permanent focal ischemia and downregulates NF- κ B expression. **Brain Res.** v. 1268, p. 174-180, 2009.

LORRIO, S.; NEGREDO, P.; RODA, J.M.; GARCÍA, A.G.; LÓPEZ, M.G. Effects of memantine and galantamine given separately or in association, on memory and hippocampal neuronal loss after transient global cerebral ischemia in gerbils. **Brain Res.** v. 13, p. 1254-1280, 2009.

LOGHIN, F.; CHAGRAOUI, A.; ASECIO, M.; COMOY, E.; SPEISKY, H.; CASSELS, B.K.; PROTAIS, P. Effects of some antioxidative aporphine derivatives on striatal dopaminergic transmission and on MPTP-induced striatal dopamine depletion in B6CBA mice. **Eur J Pharm Sci.** v.18, p. 133-140, 2003.

MAJID, A. Neuroprotection in Stroke: Past, Present, and Future. **ISRN Neurol.**, v. 2014, p. 515716, 2014.

MCAULIFFE, J.J.; LOEPKE, A.W.; MILES, L.; JOSEPH, B.; HUGHES, E.; VORHEES, C.V. Desflurane, isoflurane, and sevoflurane provide limited neuroprotection against neonatal hypoxia-ischemia in a delayed preconditioning paradigm. **Anesthesiology**, v.111, p. 533-546, 2009.

MATHEW, J.; PAUL, J.; NANDHU, M.S.; PAULOSE, C.S. Bacopa monnieri and Bacoside-A for ameliorating epilepsy associated behavioral deficits. **Fitoterapia.** 81:315–322, 2010.

MAULAZ, A.; PIECHOWSKI-JÓZWIAK, B.; MICHEL, P.; BOGOUSSLAVSKY, J. Selecting patients for early stroke treatment with penumbra images. **Cerebrovasc Dis.**, v. 20, p.19-24, 2005.

MAUTES, A.E.M.; WEINZIERL, M.R.; DONOVAN, F.; NOBLE, L.J. Vascular events after spinal cord injury: contribution to secondary pathogenesis. **Physical therapy**, v.80, n.7, p.673-687, 2000.

MCGEER, P.L.; ROGERS, J. Anti-inflammatory agents as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. **Neurology.** v. 42, p. 447-449, 1992.

MIGUEL, M. P.; MENEZES, L. B. D.; ARAÚJO, E. G. D. Fisiopatologia do estresse oxidativo após isquemia e reperfusão cerebral e potencial neuroprotetor do pequi (Cariocar brasileiro). **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, p. 1976, 2012.

MOGHADDAM, H.K., BALUCHNEJADMOJARAD, T., ROGHANI, M., KHAKSARI, M., NOROUZI, P., AHOUIE, M., MAHBOOBI, F. Berberine ameliorate oxidative stress and astrogliosis in the hippocampus of STZ-induced diabetic rats. **MolNeurobiol.** v. 49, p. 820-826, 2014.

MORIOKA, T.; KALEHUA, A.N.; STREIT, W.J. Characterization of microglial reaction after middle cerebral artery occlusion in rat brain. **J Comp Neurol.** v.327, p. 123–32, 1993.

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

MORRISON, D. K.; DAVIS, R. J. Regulation of map kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 19, p. 91-118, 2003.

MOREIRA FILHO, H.; GOLTCHER, A. **Plantas medicinais I**. Curitiba: UFPR, 1972. Pp. 19, 40, 73.

MUMBY, D.G.; WOOD, E.R.; DUVA, C.A.; KORNECOOK, T.J.; PINEL, J.P.; PHILLIPS, A.G. Ischemia-induced object-recognition deficits in rats are attenuated by hippocampal ablation before or soon after ischemia. **Behav Neurosci.** , v. 110, p. 266-281,1996.

MUTHNA, D.; CMIELOVA, J.; TOMSIK, P.; REZACOVA, M. Boldine and related aporphines: from antioxidant to antiproliferative properties. **Nat Prod Commun.** 8(12):1797-800, 2013.

NAGATA, S.; GOLSTEIN, P. The Fas death factor. **Science**, v. 247, p. 1449-1456, 1995.

NILUPUL PERERA, M.; MA, H.K.; ARAKAWA, S.; HOWELLS, D.W.; MARKUS, R.; ROWE, C.C.; DONNAN, G.A. Inflammation following stroke. **J. Clin. Neurosci.** 13(1), 1-8, 2006.

NIU, X.; HU, H.; LI, W.; LI, Y.; HUANG, H.; UM, Q.; YAO, H.; LI, H. Protective effect of total alkaloids on lipopolysaccharide-induced acute lung injury . **J Surg Res.** v. 189, p. 126-134, 2014.

NYAKAS, C., FELSZEGHY, K., SZABÓ, R., KEJSER, J.N., LUITEN, P.G., SZOMBATHELYI, Z., TIHANYI, K.,2009. Neuroprotective effects of vinpocetine and its Major metabolite cis-apovincaminic acid on NMDA-induced neurotoxicity in a rat entorhinal cortex lesion model. **CNS Neurosci Ther**, v. 15, p. 89-99, 2009.

O'CALLAGHAN, J.P.; SRIRAM, K. Glial fibrillary acidic protein and related glial proteins as biomarkers of neurotoxicity. **Expert Opin Drug Saf.** ,v. 4, p. 433-442, 2005.

O'BRIEN, P.; CARRASCO-POZO, C.; SPEISKY, H. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. **Chem Biol Interact.** 5;159(1):1-17, 2006.

OHTAKI, H.; DOHI, K.; NAKAMACHI, T.; YOFU, S.; ENDO, S.; KUDO, Y.; SHIODA, S. Evaluation of brain ischemia in mice. **Acta Histochemica et Cytochemica, Kyoto**, v. 38, n. 2, p. 99-106, 2005.

OTERO.R.M; GUIMARAES, A. G.; COELHO, P.M.; FREITAS, G. R. Terapia celular no acidente vascular cerebral . **Rev. Bras. Hematol.Hemoter.** , v. 31, p. 99-103, 2009.

OYGÜR, N.; SÖNMEZ, O.; SAKA, O.; YEĞİN, O. Predictive value of plasma and cerebrospinal fluid tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta concentrations on outcome of full term infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.** , v. 79, p. 190-193, 1998.

PANIZZA, Sylvio - Plantas que Curam - Cheiro de Mato. 1997. SOARES, Carlos Alvez, A cura que vem dos chás. Editora Vozes , 2006.

PEINADO-HERREROS, M.A.; DEL MORAL-LEAL, M.L.; ESTEBAN, F.J.; MARTÍNEZ-LARA, E.; SILES, E.; JIMÉNEZ, A.; HERNÁNDEZ-COBO, R.; BLANCO, S.; RODRIGO, J.; PEDROSA J.A. Envejecimiento y neurodegeneración: bases moleculares y celulares. **REV NEUROL.** , v. 31, p. 1054-1065, 2000.

PEKNY, M.; NILSSON, M. Astrocyte activation and reactive gliosis. **Glia**.50(4), 427-434, 2005.

PERSSON, M. FHAGER, A. ; TREFNA, H.D. ; YINAN YU ; MCKELVEY, T. ; PEGENIUS, G. ; KARLSSON, J.-E. ; ELAM, M. Microwave-Based Stroke Diagnosis Making Global Prehospital Thrombolytic Treatment Possible. **Browse Journals & Magazines>Biomedical Engineering, IEEE ...> Volume:61** , 2014

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

POLICH, J.; GLORIA, R. Cognitive effects of a Ginkgo biloba/vinpocetine compound in normal adults: systematic assessment of perception, attention and memory. **Hum Psychopharmacol.**, v. 16, p. 409–416, 2001.

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

RIVERA, F., COSTA, G., ABIN, A., URBANAVICIUS, J., ARRUTI, C., CASANOVA, G., DAJAS, F. Reduction of ischemic brain damage and increase of glutathione by a liposomal preparation of quercetin in permanente focal ischemia in rats. **Neurotox Res.**, v. 13, p. 105-114, 2008.

SAITO, S.; MATSUURA, M.; TOMINAGA, K.; KIRIKAE, T.; NAKANO, M. Important role of membrane-associated CD14 in the induction of IFN-beta and subsequent nitric oxide

production by murine macrophages in response to bacterial lipopolysaccharide. **Eur. J. Biochem.** 267(1), 37-45, 2000.

SARKAKI, A.; FARBOOD, Y.; HASHEMI, S.; RAFIEI, R.M. Pomegranate seed hydroalcoholic extract improves memory deficits in ovariectomized rats with permanent cerebral hypoperfusion /ischemia. **Avicenna J. Phytomed.** v. 5 p. 43–55, 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**, v. 94, p. 491-505, 1988.

SCHMUED, L.C.; ALBERTSON, C.; SLIKKER, W JR. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. . **Brain Research.** , v. 751, p. 37-46, 1997.

SCORZA, F.A.; ARIDA, R.M.; CYSNEIROS, R.M.; SCORZA, C.A.; ALBUQUERQUE, M.; CAVALHEIRO, E.A. Qualitative study of hippocampal formation in hypertensive rats with epilepsy. **Arq.Neuro-Psiquiatr.**, v. 63, p. 283-288, 2005.

SHALAK, L.F.; LAPTOOK, A.R.; JAFRI, H.S.; RAMILO, O.; PERLMAN, J.M. Clinical chorioamnionitis, elevated cytokines, and brain injury in term infants. **Pediatrics**, v. 110, p. 673-680, 2002.

SCHEPER, V.P.; KETELA, M.; VAN, D.P.I.; VISSER-MEILY, J.M.; LINDEMAN, E. Comparing contents of functional outcome measures in stroke rehabilitation using the international classification of functioning, disability and health. **Disabil Rehabil.** v.29, p. 221-230, 2007.

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

SHI, S.S.; YANG, W.Z.; CHEN, Y.; CHEN, J.P.; TU, X.K. Propofol reduces inflammatory reaction and ischemic brain damage in cerebral ischemia in rats. **Neurochem Res.**, v. 39, p 793-799, 2014.

SILVA Jr, O. C.; CENTURION, S.; PACHECO, E. G.; BRISOTTI, J. L.; OLIVEIRA, A. F.; SASSO, K. D. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirurgica Brasileira.** v. 17, p.96-100, 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; **Farmacognosia: da planta ao medicamento.**UFSC, 821p, 1999.

SIOW, Y. L., KALMAR, G. B.; SANGHERA, J. S.; TAI, G.; OH, S. S.; PELECH, S. L. Identification of two essential phosphorylated threonine residues in the catalytic domain of Mekk1. Indirect activation by Pak3 and protein kinase C. **J Biol Chem.**, v.272, p. 7586-7594, 1997.

SIQUEIRA, C. A. T. **Aspectos químicos e atividade antiprotozoária in vitro de Annona coriácea Mart. (Annonaceae).** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos. Universidade de São Paulo, 2010.

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

SOMOGYI, P.; TAMAS, G.; LUJAN, R. and BUHL, E.H. Salient Features of Synaptic Organisation in the Cerebral Cortex. **Brain Research Reviews**, v. 26, p. 113-135, 1998.

SON, H.; HAWKINS, R.D.; MARTIN, K.; KIEBLER, M.; HUANG, P.L.; FISHMAN, M.C.; KANDEL, E.R. Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. **Cell.**, v. 87, p. 1015-1023, 1996.

SONG, M.; JUE, S.S.; CHO, Y.A.; KIM, E.C. Comparison of the effects of human dental pulp stem cells and human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on ischemic human astrocytes in vitro. **J Neurosci Res.**, v. 93, p. 973-983, 2015.

SPEISKY, H.; CASSELS, B.K. Boldo and boldine: an emerging case of a natural drug development. **Pharmacol Res.**, v. 29, p. 1-12, 1994.

SQUIRE, R.L. ; KANDEL, E.R. Memória da mente às moléculas. (Trad. Dalmaz, C. e Quillfeldt, J.A.). Porto Alegre: Editora Artmed, 2003.

SRIRAM, K.; O'CALLAGHAN, J. P. Divergent roles of Tumor Necrosis Factor- α in the brain. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 2, p. 140-153, 2007.

SMITH, W.S. Pathophysiology of focal cerebral ischemia: a therapeutic perspective. **J Vasc Interv Radiol.** v. 15, P. S3-S12, 2004.

STEVENSON, L., MATESANZ, N., COLHOUN, L., EDGAR, K., DEVINE, A., GARDINER, T.A., MCDONALD, D.M. Reduced nitro-oxidative stress and neural cell death suggests a protective role for microglial cells in TNF α -/- mice in ischemic retinopathy. **Investig. Ophthalmol.** , v. 51, p. 3291–3299, 2010.

STÉVIGNY, C., BAILLY, C., QUETIN-LECLERCQ, J. Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids. **Curr Med Chem Anticancer Agents.** v.5, p. 173-182, 2005.

SU, Y.A., HUANG, R.H., WANG, X.D., LI, J.T., SI, T.M. Impaired working memory by repeated neonatal MK-801 treatment is ameliorated by galantamine in adult rats. **Eur J Pharmacol.** , v. 725, p. 32-39, 2014.

SUG YOON, S.; HELLER, R.F.; LEVI, C.; WIGGERS, J.; FITZGERALD, P.E. Knowledge of stroke risk factors, warning symptoms, and treatment among an Australian urban population. **Stroke**, v.32, p. 1926-1930, 2001.

SUGAWARA, T.; CHAN, P.H. Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia. **Antioxid Redox Signal**, v. 5, p. 597-607, 2003.

SUGAWARA, T.; FUJIMURA, M.; NOSHITA, N.; KIM, G. W.; SAITO, A.; HAYASHI, T.; NARASIMHAN, P.; MAIER, C. M.; CHAN, P. H. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. **The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics, West Hartford**, v. 1, p. 17–25, 2004.

SWANSON, R.A.; YING, W.; KAUPPIEN, T.M. Astrocyte influences on ischemic neuronal death. **Curr Mol Med.** v. 4, p. 193-205, 2004.

TAKAMATSU, H.; TATSUMI, M.; NITTA, S.; ICHISE, R.; MURAMATSU, K.; IIDA, M.; NISHIMURA, S.; UMEMURA, K. Time courses of progress to the chronic stage of middle cerebral artery occlusion models in rats. **Exp Brain Res.** , v. 146, p. 95-102, 2002.

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

TAMURA, M.; AOKI, Y.; SETO, T.; ITOH, Y.; UKAI, Y. Cerebroprotective action of a Na⁺/Ca²⁺ channel blocker NS-7. II. Effect on the cerebral infarction, behavioral and cognitive impairments at the chronic stage of permanent middle cerebral artery occlusion in rats. **Brain Res.** , v. 890, p. 170-176, 2001.

TANG, J., HU, J.J., LU, C.H., LIANG, J.N., JIN-FANGXIAO, J.F., LIU, Y.T, LIN, C.S., QIN, Z.S. Propofol Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Tumor Necrosis Factor-Alpha Expression and Myocardial Depression through Decreasing the Generation of Superoxide Anion in Cardiomyocytes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity.** v. 2014, p. 1-12, 2014.

TARDINI, D. M. S.; YOSHIDA, W. B. Lesões cerebrais decorrentes de isquemia e reperfusão na cirurgia de endarterectomia de carótida. **Jornal Vascular Brasileiro**, Porto Alegre, v. 2, n. 2, p.119-128, 2003.

TAYLOR, J. M.; MAIN, B. S.; CRACK, P. J. Neuroinflammation and oxidative stress: co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. **NeurochemInt**, v. 62, p. 803-19, 2013.

TENG, C.M., HSUEH, C.M., CHANG, Y.L., KO, F.N., LEE, S.S., LIU, K.C.S. Antiplatelet effects of some aporphine and phenanthrene alkaloids in rabbits and man, **J. Pharm. Pharmacol.**, v.49, n.7, p.706-711, 1997.

TIAN, X.S.; ZHOU, F.; YANG, R.; XIA, Y.; WU, G.C.; GUO, J.C. Effects of intracerebroventricular injection of delta-opioid receptor agonist TAN-67 or antagonist naltrindole on acute cerebral ischemia in rat]. **Sheng Li Xue Bao.** , v. 60, p. 475-484, 2008.

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

TÜREYEN, K.; VEMUGANTI, R.; SAILOR, K.A.; DEMPSEY, R.J. Infarct volume quantification in mouse focal cerebral ischemia: a comparison of triphenyltetrazolium chloride and cresyl violet staining techniques. **J Neurosci Methods**, v. 139, p. 203-207, 2004.

TU, X.K.; YANG, W.Z.; WANG, C.H.; SHI, S.S.; ZHANG, Y.L.; CHEN, C.M.; YANG, Y.K.; JIN, C.D.; WEN, S. Zileuton reduces inflammatory reaction and brain damage following permanent cerebral ischemia in rats. **Inflammation**, v. 33, p. 344-352, 2010.

UNO, H.; MATSUYAMA, T.; AKITA, H.; NISHIMURA, H.; SUGITA, M. Induction of tumor necrosis factor-alpha in the mouse hippocampus following transient forebrain ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** 17(5), 491-499, 1997.

WANG, R.; YAN, H.; TANG, X.C. Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine. **Acta Pharmacol Sin.**, v.27, p. 1-26, 2006.

WANG, H., ZHANG, K., ZHAO, L., TANG, J., GAO, L., WEI, Z. Anti-inflammatory effects of vinpocetine on the functional expression of nuclear factor-kappa B and tumor necrosis factor-alpha in a rat model of cerebral ischemia-reperfusion injury. **Neurosci Lett.** v. 566, p. 247-251, 2014.

WANG, W.; TANG, L.; LI, Y.; WANG, Y. Biochanin A protects against focal cerebral ischemia/reperfusion in rats via inhibition of p38-mediated inflammatory responses. **J Neurol Sci.**, v. 15, p. 121-125, 2015.

WANG, X.; ARCUINO, G.; TAKANO, T.; J. P.W.G.; WAN, P.; LI, P.; XU, Q.; LIU, Q.S.; GOLDMAN, S.A.; NEDERGAARD, M. P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. **Nat. Med.**, v.10, n. 8, p. 821-827, 2004.

WARNER, D.S.; SHENG, H.; BATINIC-HARMELE, I. Oxidants, Antioxidants and the Ischemic Brain. **The Journal of Experimental Biology.** v. 207, p. 3221-3231, 2004.

WHITE, B. C.; SULLIVAN, J. M.; DEGRACIA, D. J.; O'NEIL, B. J.; NEUMAR, R. W.; GROSSMAN, L. I.; RAFOLS, J. A.; KRAUSE, G. S. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *Journal of the Neurological Sciences*, **Amsterdam**, v. 179, p. 1-33, 2000.

WHO (World Health Organization). Neurological disorders. Disponível em: http://www.who.int/mental_health/neurology/neurological_disorders_report_web.pdf. Acesso em: 28 de maio de 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The global burden of disease: 2004 update.** Geneva, Switzerland: WHO press, 2008

The WHO stepwise approach to stroke surveillance (endereço na internet). Overview and Manual (version2.0). Local: Noncommunicable Diseases and Mental Health. World Health Organization. (atualizado em: 01/2006 mes/ ano; acessado em 10/15. Disponível em: http://www.who.int/ncd_surveillance/en/steps_stroke_manual_v1.2.pdf

WILLING, A.E.; LIXIAN, J.; MILLIKEN, M.; POULOS, S.; ZIGOVA, T.; SONG, S.; HART, C.; SANCHEZ-RAMOS, J.; SANBERG, P.R. Intravenous versus intrastriatal cord blood administration in a rodent model of stroke. **J. Neurosci. Res.** , v. 73, p. 296-307, 2003.

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

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

WOOD, E.R.; MUMBY, D.G.; PINEL, J.P.; PHILLIPS, A.G. Impaired object recognition memory in rats following ischemia-induced damage to the hippocampus. **Behav Neurosci.**, v. 107, P. 51-62, 1993.

WU, L.; ZHANG, K.; HU, G.; YAN, H.; XIE, C.; WU, X. Inflammatory response and neuronal necrosis in rats with cerebral ischemia. **Neural Regen Res.** , v. 9, p. 1753–1762, 2014.

WU, L.Y.; BAO, X.Q.; SUN, H.; ZHANG, D. Scavenger receptor on astrocytes and its relationship with neuroinflammation. **Zhongguo Yi XueKeXue Yuan XueBao** , v. 36, p. 330-335, 2014.

VILAVERDE,G.M, PAULAJ. R CARNEIRO, D.M. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossamedes (GO) **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 13, supl., p. 64-66, 2003.

XAVIER, G. F. Memória: correlatos anatomo-funcionais. Em R. Nitrini, P. Caramelli & L. L. Mansur (Orgs.), *Neuropsicologia, das bases anatômicas à reabilitação* (pp. 107-126). São Paulo: Clínica Neurológica Hospital de Clínicas FMUSP, 1996.

XAVIER, G.F. A modularidade da memória e o sistema nervoso. **Psicologia USP**. São Paulo, v.4, p.61-115, 1993.

YAMASAKI, Y.; MATSUURA, N.; SHOZUHARA, H.; ONODERA, H.; ITOYAMA, Y.; KOGURE, K. Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. **Stroke** , v. 26, p. 676-681, 1995.

YANG, G.Y.; GONG, C.; QIN, Z.; YE, W.; MAO, Y.; BERTZ, A.L. Inhibition of TNF α attenuates infarct volume and ICAM-1 expression in ischemic mouse brain. **Neuroreport**, 9(9), 2131-2134, 1998.

YANG, Q.; WANG, E.Y.; HUANG, X.J.; QU, W.S.; ZHANG, L.; XU, J.Z.; WANG, W.; TIAN, D.S. Blocking epidermal growth factor receptor attenuates reactive astrogliosis through inhibiting cell cycle progression and protects against ischemic brain injury in rats. **J. Neurochem.**, v. 119, p. 644–653, 2011.

YANG, L. SHAH, K. WANG, H. VARDAN T. KARAMYAN, V. T.;THOMAS J. Characterization of Neuroprotective Effects of Biphalin, an Opioid Receptor Agonist, in a Model of Focal Brain Ischemia. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 339, p. 499-508, 2011.

YENARI, M.A.; KUNIS, D.; SUN, G.H.; ONLEY, D.; WATSON, L.; TURNER, S.; WHITAKER, S.; STEINBERG, G.K. Hu23F2G, an antibody recognizing the leukocyte CD11/CD18 integrin, reduces injury in a rabbit model of transient focal cerebral ischemia. **Exp. Neurol.** 153(2), 223-233, 1998.

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

YOO, K. Y.; HWANG, I. K.; KIM, J. D.; KANG, I. J.; PARK, J.; YI, J. S.; KIM, J. K.; BAE, Y. S.; WON, M. H. Antiinflammatory effect of the ethanol extract of *Berberis koreana* in a gerbil model of cerebral ischemia/reperfusion. **Phytother Res.**, v. 22, p. 1527-1532, 2008.

YOO, K.Y.; HWANG, I.K.; LIM, B.O.; KANG, T.C.; KIM, D.W.; KIM, S.M.; LEE, H.Y.; KIM, J.D.; WON, M.H. Berberry extract reduces neuronal damage and N-Methyl-D-aspartate receptor 1 immunoreactivity in the gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. **Biol Pharm Bull.**, v. 29, p. 623-628, 2006.

YOUN, Y.C.; KWON, O.S.; HAN, E.S.; Song, J.H.; SHIN, Y.K.; LEE, C.S. Protective effect of boldine on dopamine-induced membrane permeability transition in brain mitochondria and viability loss in PC12 cells. **Biochem Pharmacol.** , v. 63, p. 495-505, 2002.

YU, M.H.; CHOI, J.H.; CHAE, I.G.; IM, H.G.; YANG, S.A.; MORE, K.; LEE, I.S.; LEE, J. Suppression of LPS-induced inflammatory activities by *Rosmarinus officinalis* L. **Food Chem.** V. 136, p. 1047-1054, 2013.

ZETLER, G. Neuropeptide-like, anticonvulsant and antinociceptive effects of apomorphine alkaloids: bulbocapnine, corytuberine, boldine and glaucine. **Arch Int Pharmacodyn Ther.** v. 296, p. 255-281, 1988.

ZANGARA, A. The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. **Pharmacol Biochem Behav.** , v. 75, p. 675-686, 2003.

ZHANG, X.; ZHANG, X.; WANG, C.; LI, Y.; DONG, L.; CUI, L.; WANG, L.; LIU, Z.; QIAO, H.; ZHU, C.; XING, Y.; CAO, X.; JI, Y.; ZHAO, K. Neuroprotection of early and short-time applying berberine in the acute phase of cerebral ischemia: up-regulated pAkt, pGSK and pCREB, down-regulated NF- κ B expression, ameliorated BBB permeability. **Brain Res.** v. 1459, p. 61-70, 2012.

ZHANG, J.; SNYDER, S. H. Nitric oxide in the nervous system. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** , v. 35, p. 213-233, 1995.

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

ZHAO, J.; ZHANG, X.; DONG, L.; WEN, Y.; CUI, L. The many roles of statins in ischemic stroke. **Curr Neuropharmacol.** v.12, p. 564-574, 2014.

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

ZHOU, Y.; NIIMI, K.; WEIDONG LI, W.; TAKAHASHI, E. Effects of Cav2.2 inhibitor on hippocampal spatial short term cognition . **Integr Mol Med.** , v. 2, p. 95-98, 2015.

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

ZHU, Y.; ROTH-EICHHORN, S.; BRAUN, N.; CULMSEE, C.; RAMI, A.; KRIEGLSTEIN, J. The expression of transforming growth factor-beta1(TGF-beta1) in hippocampal neurons: a temporary upregulated protein level after transient forebrain ischemia in the rat. **Brain Res.**, v. 866, p. 286-298, 2000.

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