



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR  
LABORATÓRIO DE NEUROPROTEÇÃO E NEURORREGENERAÇÃO EXPERIMENTAL

PAULO RODRIGO OLIVEIRA DA SILVA

EFEITOS NEUROPROTETORES E ANTI-INFLAMATÓRIOS DO ÓLEO DE COPAÍBA  
(*Copaifera reticulata* DUCKE) EM RATOS ADULTOS SUBMETIDOS A ISQUEMIA FOCAL DO CÓRTEX MOTOR POR MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1

BELEM  
2019

PAULO RODRIGO OLIVEIRA DA SILVA

EFEITOS NEUROPROTETORES E ANTI-INFLAMATÓRIOS DO ÓLEO DE COPAÍBA  
(*Copaifera reticulata* DUCKE) EM RATOS ADULTOS SUBMETIDOS A ISQUEMIA FO-  
CAL DO CÓRTEX MOTOR POR MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Área de concentração: Neurociências  
Orientador: Wallace Gomes Leal  
Co-orientadora: Edna Cristina S. Franco

BELÉM  
2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

---

- S586e Silva, Paulo Rodrigo Oliveira da.  
EFEITOS NEUROPROTETORES E ANTI-INFLAMATÓRIOS DO ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera reticulata* DUCKE) EM RATOS ADULTOS SUBMETIDOS A ISQUEMIA FOCAL DO CÓRTEX MOTOR POR MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1 / Paulo Rodrigo Oliveira da Silva, . — 2019.  
51 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof. Dr. Wallace Gomes Leal  
Coorientação: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Edna Cristina Franco  
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.
1. Isquemia, Copaíba, Neuroinflamação, Endotelina-1, Neuroproteção. I. Título.

---

CDD 612.8

PAULO RODRIGO OLIVEIRA DA SILVA

EFEITOS NEUROPROTETORES E ANTI-INFLAMATÓRIOS DO ÓLEO DE COPAÍBA  
(*Copaifera reticulata* DUCKE) EM RATOS ADULTOS SUBMETIDOS A ISQUEMIA FO-  
CAL DO CÓRTEX MOTOR POR MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1

Dissertação de mestrado apresentada ao Progra-  
ma de Pós-Graduação em Neurociências e Biolo-  
gia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal do Pará, como requisito  
para a obtenção do título de Mestre em Neuroci-  
ências e Biologia Celular.

Área de concentração: Neurociências

Orientador: Wallace Gomes Leal

Co-orientadora: Edna Cristina S. Franco

Data da defesa: 15/ 02/2019

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Wallace Gomes Leal - Orientador  
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

---

Profª. Dra. Edna Cristina Franco - Co-orientadora  
Seção de Patologia - IEC

---

Profª. Dra. Soraia Valeria de Oliveira Coelho Lameirão  
Instituto de Educação Matemática e Científica - UFPA

---

Prof. Dr. Marcelo Marques Cardoso  
Instituto de Ciências da Saúde - UFPA

---

Profª. Dra. Vânia Castro Corrêa  
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

BELÉM  
2019

## **Agradecimentos**

Agradeço ao Professor Dr. Wallace Gomes Leal pela oportunidade concedida no espaço do LNNE, pelos conselhos e ensinamentos fundamentais para a finalização deste trabalho.

Agradeço ao Doutorando Ijair Rogério pela amizade, parceria, companheirismo e ajuda nas técnicas desenvolvidas, a estar presente no decorrer de todo o trabalho, sendo de vital importância para a conclusão.

Agradeço a Doutoranda Michelle Nerissa pela amizade e por toda ajuda ofertada na execução das técnicas neste trabalho.

Agradeço ao amigo Mestrando Iury Nunes por suas contribuições e parcerias importantes para a finalização deste mestrado.

Agradeço a amiga Mestranda Kelly Lima por dividir a pressão na reta final dos nossos projetos e ser sempre solícita em ajudar.

Agradeço a amiga Mestranda Giulliana Modesto pelo auxílio na execução das técnicas histológicas presentes neste trabalho.

Agradeço ao Sr. Amarildo por todo o auxílio prestados nos momentos mais críticos deste trabalho e por todos os conselhos sobre cuidados com os animais.

Agradeço especialmente a minha co-orientadora Dra. Edna Cristina Franco, pois sem a sua ajuda este trabalho não teria sido concluído. Agradeço especialmente por ser a luz no fim do túnel em nossos projetos.

Agradeço a minha mãe Regina Oliveira por seu suporte emocional e motivacional, os quais foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

*"Não dou palanque para otário."*  
BOECHAT, R.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. DEFINIÇÕES GERAIS E EPIDEMIOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO (AVE)	11
1.2. FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO	14
1.2.1. Excitotoxicidade	15
1.2.2. Estresse Oxidativo	15
1.2.3. Mecanismos de Morte Celular	16
1.3. NEUROINFLAMAÇÃO	17
1.3.1. Neuroinflamação do Tecido Neural após AVE	17
1.3.2. Astrócitos	17
1.3.3. Linfócitos	17
1.3.4. Neutrófilos	18
1.4. NEUROPROTEÇÃO PARA ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO	18
1.5. Histopatologia	21
1.6. EXTRATOS DE PLANTAS DA AMAZÔNIA COMO AGENTES NEUROPROTECTORES: O ÓLEO DE COPAÍBA	21
1.7. OBJETIVOS	23
1.7.1. Objetivo Geral	23
1.7.2. Objetivos Específicos	23
2. MATERIAIS E MÉTODOS	24
2.1. ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	24
2.2. PROCEDIMENTOS PRÉ-CIRÚRGICOS	24
2.3. INDUÇÃO DE ISQUEMIA FOCAL POR MICROINJEÇÕES DE ET-1	24
2.4. TRATAMENTO COM ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA	26
2.5. PERFUSÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	26
2.6. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	28
2.7. IMUNOHISTOQUÍMICA	28
2.8. ANÁLISE QUALITATIVA	28
2.9. ANÁLISE QUANTITATIVA	28
2.10. Análise estatística	29
3. RESULTADOS	30
3.1. análise da área de lesão pela coloração de nissl	30
3.2. Análise Histopatológica	31
3.3. Imunoistoquímica	32

3.3.1. Análise da Preservação Neuronal	32
3.3.2. Análise da Proliferação de Astrócitos	33
3.3.3. Avaliação Da Morte Celular	35
4. Discussão	37
4.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE O Modelo experimental UTILIZADO	37
4.2. Óleo resina de copaíba como anti-inflamatório: possíveis mecanismos de ação	37
5. Conclusão	39
6. REFERÊNCIAS	40



## RESUMO

O acidente vascular encefálico (AVE) é uma desordem neural causada pela interrupção do fluxo sanguíneo nos vasos que irrigam o encéfalo (AVE isquêmico) ou rompimento destes (AVE hemorrágico), causando déficits cognitivos, sensoriais e/ou motores. Com exceção do uso trombolíticos, o qual possui uma janela terapêutica muito estreita e é pouco utilizado, inexistem outros tratamentos farmacológicos ou terapia celular disponíveis para esta condição patológica. Desse modo, é necessária a busca por novos tratamentos, tais como o desenvolvimento de agentes neuroprotetores. A Amazônia é uma rica fonte de produtos naturais, mas as suas ações terapêuticas para doenças do sistema nervoso central (SNC) foram pouco investigadas. Neste trabalho, investigou-se as ações neuroprotetoras e anti-inflamatórias do óleo-resina de copaíba (ORC). Ratos Wistar adultos foram submetidos à isquemia focal por microinjeções (80pMol/ $\mu$ l) de endotelina-1 (ET-1) diretamente no córtex motor e foram tratados com doses diárias de ORC (400mg/kg) ou tween a 5%. Os animais foram perfundidos 7 dias após a lesão. A análise histopatológica foi realizada pela coloração com violeta de Cresila (cérebro) e com hematoxilina-eosina (fígado e rins). Realizou-se imunistoquímica para a marcação de neurônios (anti-NeuN), astrócitos (anti-S100) e caspase (anti-caspase-3). A morfometria demonstrou redução no tamanho da área de lesão quando comparou-se animais tratados ( $15,96 \pm 1,53 \text{ mm}^2$ ) e controle ( $28,82 \pm 2,65 \text{ mm}^2$ ). O exame histopatológico do fígado e rins não encontrou alterações indicativas de toxicidade. Na análise quantitativa observou-se preservação neuronal, porém, não observou-se diferença estatística entre os grupos referente a análise de astrócitos (células S100+). O grupo tratado com ORC apresentou um aumento na expressão de caspase-3. Conclui-se que o ORC pode ter um papel neuroprotetor ao contribuir com a sobrevivência neuronal na área de penumbra isquêmica, porém, trabalhos futuros são necessários a fim de descobrir por qual(is) via(s) o ORC está agindo para promover a sobrevivência neuronal.

Palavras-Chave: Isquemia, Copaíba, Neuroinflamação, Endotelina-1, Neuroproteção.

## ABSTRACT

Stroke is a neural disorder caused by interruption of blood flow in vessels that irrigate the brain (ischemic stroke) or rupture of these (hemorrhagic stroke), causing cognitive, sensory and / or motor deficits. With the exception of thrombolytic use, which has a very narrow therapeutic window and is little used, there are no other pharmacological treatments or cellular therapy available for this pathological condition. Thus, it is necessary to search for new treatments, such as the development of neuroprotective agents. The Amazon is a rich source of natural products, but its therapeutic actions for diseases of the central nervous system (CNS) have been little investigated. In this work, we have investigated the neuroprotective and anti-inflammatory actions of copaiba oil-resin (COR). Adult Wistar rats were submitted to focal ischemia by microinjections (80pMol/ $\mu$ l) of endothelin-1 (ET-1) directly into the motor cortex and were treated with daily doses of COR (400mg / kg) or 5% tween. The animals were perfused at 7 days after the injury. The histopathological analysis was performed by Nissl staining (brain) and hematoxylin-eosin (liver and kidneys). Immunohistochemistry was performed for labeling of neurons (anti-NeuN), astrocytes (anti-S100) and caspase (anti-caspase-3). Morphometry showed a reduction in the lesion size area (copaiba-treated animals ( $15.96 \pm 1.53$  mm<sup>2</sup>); control animals ( $28.82 \pm 2.65$  mm<sup>2</sup>)). Histopathological examination of the liver and kidneys did not find changes indicative of toxicity. In the quantitative analysis, neuronal preservation was observed, but no statistical difference was noticed between the groups regarding astrocytes analysis (S100+ cells). The COR-treated group showed an increase in caspase-3 expression. It is concluded that COR may play a neuroprotective role, contributing to neuronal survival in the area of ischemic penumbra, but future work is needed to find out the mechanisms underlying this phenomenon.

Keywords: Ischemia, Copaiba, Neuroinflammation, Endothelin-1, Neuroprotection.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. DEFINIÇÕES GERAIS E EPIDEMIOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO (AVE)

O acidente vascular encefálico (AVE) é uma desordem neural aguda que acomete milhões de pessoas no mundo, sendo a segunda maior causa de morte globalmente (Chen e Gao, 2017). Nas últimas décadas, este quadro apresentou certa melhora nos países desenvolvidos devido ao desenvolvimento de técnicas emergenciais para o tratamento nas primeiras horas da desordem, o que é crucial para o quadro clínico do paciente (Guzik e Bushnell, 2017), por exemplo, nos Estados Unidos da América (EUA) o AVE ocupava a segunda maior causa de morte, agora ele ocupa a quinta posição, devido ao desenvolvimento destas técnicas (Guzik e Bushnell, 2017).

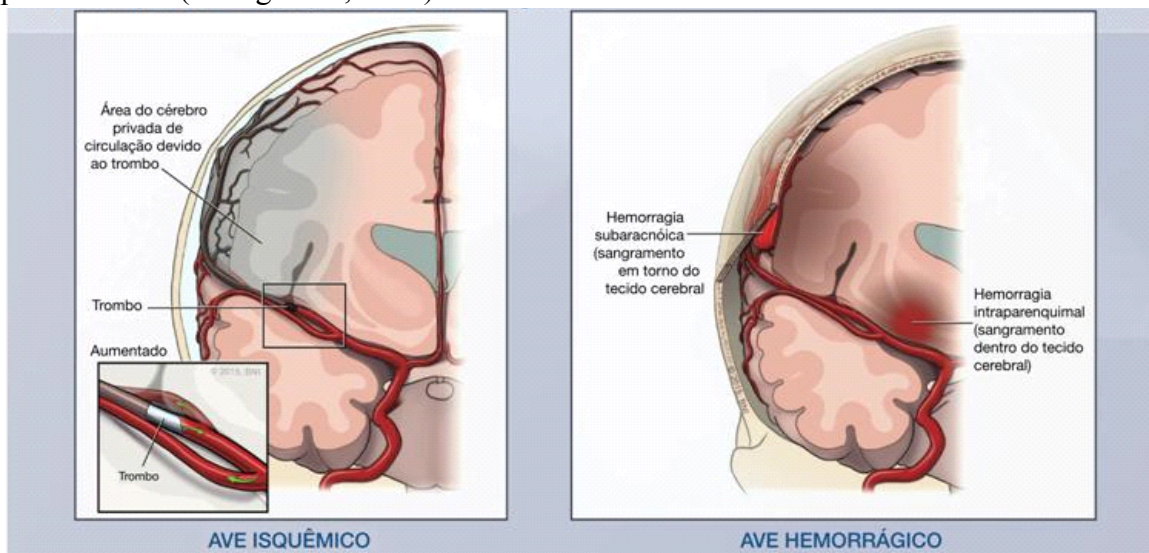
Entretanto, na maioria dos países subdesenvolvidos da África, a incidência, prevalência e fatalidade dos casos de AVE são as maiores do mundo. Os estudos estão concentrados em países como: Egito, Nigéria, África do Sul e Camarões. Antigamente o AVE era documentado como raro, mas estudos recentes revisados por Owolabi *et al.*, (2018) demonstraram que esta desordem é muito mais presente do que era antes documentada, além de que nestes países o AVE não é raro, ocorria de não haver estudos epidemiológicos suficiente nos países do continente para que fosse notado como um problema grave.

No Brasil, existe uma disparidade grande entre as regiões do país. A maior prevalência de AVE ocorre na região nordeste e atribui-se a isso o baixo acesso a recursos médicos e educacionais de grande parte da população. Em contrapartida, o sudeste apresenta a menor prevalência. Nesta região a maioria da população tem melhor acesso a educação sobre prevenção e acesso a tratamentos de saúde mais completos, como logística de atendimento emergencial mais eficaz, disponibilidade de uso de substâncias emergenciais como o rt-Pa (ativador plasminogênico recombinante), sendo estes os principais indicativos de melhor qualidade de vida (Ribeiro *et al.*, 2018).

Mesmo o AVE possui um alto impacto na vida de quem é acometido e das pessoas próximas ao paciente, não recebe total atenção do poder público - muitas das vezes pela falta de estudos epidemiológicos e fisiopatológicos, dificultando a elaboração de respostas eficazes e planejamento que culminem em menos custos ao sistema único de saúde (SUS).

O AVE tem início com uma interrupção parcial ou geral do fluxo sanguíneos das artérias do encéfalo, podendo haver obstrução por trombos ou êmbolos (AVE isquêmico) ou até mesmo rompimento (AVE hemorrágico), sendo este o mais grave, causando maiores déficits e

geralmente a morte do paciente (Figura 1). Ademais, existem quatro tipos de isquemia: focal provisória, focal permanente, global provisória e global permanente. Denomina-se isquemia global quando todo o encéfalo é afetado pela interrupção sanguínea e isquemia local quando apenas um ramo é afetado e, conseqüentemente, apenas uma porção é afetada. A classificação de transitória ou permanente é dada pelo acontecimento de reperfusão sanguínea ou não, respectivamente (Zhang *et al.*, 2016).



**Figura 1** - Tipos de acidente vascular encefálico. AVE isquêmico: oclusão das artérias do encéfalo, causando perda de oxigênio em uma expressiva porção do tecido. AVE hemorrágico: extravasamento sanguíneo no parênquima sanguíneo causando reação inflamatória Adaptado de: *Stroke Education Manual - Barrow Neurological Institute*. Disponível em: <https://www.barrowneuro.org/assets/Stroke-Education-Manual-Final.pdf>

O AVE ocorre principalmente na população com mais idade, devido a senescência dos tecidos dos sistemas cardiovascular e imune. A redução do fluxo sanguíneo também reduz nessa idade, o que contribui para lesões que envolvam a falta de oxigênio (Popa-Wagner *et al.*, 2018). Além disso, a isquemia cerebral é favorecida com idades mais avançadas devido a vulnerabilidade do encéfalo, pois ainda que em condições normais a sua capacidade de reparos e recuperação é limitada, demandando atenção aos fatores de risco que podem potencializar as chances do AVE.

Dentre os principais fatores de risco estão a hipertensão, hiperlipidemia, diabetes mellitus e tabagismo. A hipertensão afeta, nos EUA, cerca de 1/3 dos adultos acima de 20 anos de idade e apenas metade desse grupo faz o controle da pressão sanguínea. A pressão alta acompanha o risco do AVE, tendo a maior prevalência em pessoas negras e dados epidemiológicos mostram que em pessoas negras, os fatores de risco iniciam em menores idades em relação as demais. Somado a fatores como idade e etnia, o sedentarismo e a má alimentação

aumentam os riscos, por isso, é altamente recomendado a atividade física rotineira e bons hábitos alimentares (Xing *et al.*, 2018). Essas práticas evitam não só a hipertensão, mas outros fatores como diabetes, doenças nos rins e hiperlipidemia. A hiperlipidemia é o excesso de lipídeos disponíveis no sangue, com o passar do tempo esses lipídeos podem se depositar em cavidades do coração e quando possuem massa significativa podem se deslocar e entupir vasos e artérias já obstruídas parcialmente com placas de gordura em seu lúmen (placas de ateroma).

Outro fator intimamente relacionado ao AVE é a diabetes. Esta doença possui complicações semelhantes aos quadros de aterosclerose, reduzindo o lúmen dos grandes vasos sanguíneos, levando ao fechamento de certas arteríolas, vênulas e capilares. Por fim, o tabagismo é outro fator que duplica a probabilidade da evolução para o quadro de AVE, pois causa efeito sinérgico com a hipertensão. Este é o único dos fatores de riscos que pode ser revertido, segundo a literatura, cerca de 10 anos de abstinência pode gerar retorno significativo às condições normais (Guzik e Bushnell, 2017).

Embora os fatores de risco descritos sejam válidos para ambos os sexos, a incidência pode variar. As mulheres adultas possuem proteção natural em relação aos homens devido a fatores hormonais, porém, com a chegada da menopausa, esse quadro se inverte e a prevalência para as mulheres aumenta. O risco de uma mulher após a menopausa evoluir para um quadro de AVE duplica após os 42 anos (Shekhar *et al.*, 2017).

A incidência do AVE também possui uma variação baseada na etnia, possui maior ocorrência em pessoas negras. Essas diferenças destacam-se mais em pacientes de 45 a 54 anos e acima dos 85 anos o risco é a proporcional. Apesar das incidências altas, a taxa de mortalidade entre os grupos reduziu cerca de 50% ao longo dos anos, porém a quantidade de óbitos por pacientes negros ainda permanece alta (Guzik e Bushnell, 2017).

Não somente a população idosa está sujeita a um AVE, mas também crianças e adolescentes. Uma vez que, muitas das vezes, não se tem o acompanhamento da pressão sanguínea em exames de rotina e, desse modo, a hipertensão juvenil passa despercebida, ainda que em muitos dos casos as crianças apresentem quadros de obesidade. Nos EUA, a taxa de crianças hospitalizadas em virtude de AVE isquêmico tem aumentado significativamente de 3,1 para 4,7 a cada 10.000 crianças na faixa etária de 5 a 14 anos e, de 3,5 para 4,3 na faixa etária de 15 a 34 anos. Em relação ao AVE hemorrágico, a prevalência da hospitalização subiu de 1,6 para 2,4 nos garotos e de 1,9 a 2,6 nas garotas na faixa etária de 5 a 14 anos. Este quadro torna-se mais grave quando o uso de drogas ilícitas é considerado (Juan *et al.*, 2016).

Diversos estudos têm associado a hipertensão ao uso de drogas e, conseqüentemente, ao AVE. As principais drogas são: a cocaína e as anfetaminas, sendo que a anfetamina aumenta duas vezes mais o risco de ter um AVE em relação a cocaína (Westover e Halm, 2012; Sor-do *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2016). Outras drogas recreativas como a maconha também possuem influência no risco - um aumento de 17% dos casos de hospitalização foi associado com esta droga, que é a mais utilizada nos EUA (Juan *et al.*, 2016).

## 1.2. FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

A oclusão de uma artéria no encéfalo produz uma redução severa no fluxo sanguíneo. A partir desse instante, todo o tecido irrigado por esta artéria sofrerá com a privação de oxigênio e nutrientes, porém nem todas as células morrem imediatamente (Rodrigo *et al.*, 2013). Na principal região irrigada, há a falência energética e dos níveis de ATP. Com a falta de energia, a bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  falha e, assim, o gradiente eletroquímico da membrana despolariza. Em seguida, as vesículas com neurotransmissores começam a liberar seu conteúdo para a fenda sináptica. Dentre esses neurotransmissores está o glutamato cuja liberação no meio causa o que denomina-se de excitotoxicidade (Nguemeni *et al.*, 2015; Chen e Gao, 2017). No AVE isquêmico focal, as células da região periférica ao centro da lesão tendem a sobreviver por mais tempo, devido a irrigação de outros vasos que não foram obstruídos, esta região é conhecida como penumbra isquêmica e é o principal alvo de terapias que buscam preservar no máximo esse tecido, objetivando a redução dos déficits causados pela isquêmica (Chen e Gao, 2017).

A partir dos eventos lesivos primários, uma série de eventos secundários contribui para a expansão da lesão inicial que, em uma fase mais crônica, podem invadir a penumbra isquêmica e causar maiores déficits (Astrup *et al.*, 1981; Heiss e Rosner, 1983). Em humanos, mostrou-se que a penumbra isquêmica pode ser comprometida significativamente em uma fase mais tardia de lesão, com grandes volumes de tecido comprometidos e com o paciente pode apresentar mais déficits motores, sensoriais e cognitivos. (Lo, Eng H. *et al.*, 2003). Esses mecanismos são diversos e incluem excitotoxicidade, neuroinflamação, morte celular programada, estresse oxidativo, entre outros (Lo, E. H. *et al.*, 2003; Moskowitz *et al.*, 2010; Popa-Wagner *et al.*, 2018).

### 1.2.1. Excitotoxicidade

Após a isquemia, o tecido neural começa a perder oxigênio e glicose, que são os principais substratos para a fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, geração de energia. Este déficit energético gera interrupção no funcionamento da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  e, em seguida, despolarização da célula, causando influxo de sódio e abertura dos canais de cálcio. O cálcio livre no terminal pré-sináptico causa liberação das vesículas sinápticas com diversos neurotransmissores entre eles o glutamato (Szydłowska e Tymianski, 2010; Zhang *et al.*, 2016). A concentração patológica do glutamato induz a ativação excessiva dos canais ionotrópicos das células próximas que leva a um influxo maciço de sódio e água para o local devido a sua camada de solvatação - conjunto de moléculas de água que acompanham o sódio e contribuem para a seletividade de íons na membrana celular, e com isso levam a um edema celular (W. Olney e De Gubareff, 1978). Além dos canais de sódio, os canais de cálcio dependentes de voltagem também são abertos em virtude do influxo de sódio e o cálcio presente no terminal pré-sináptico. Esse processo induz a liberação das vesículas com mais neurotransmissores. Além disso, o cálcio atua na ativação de proteases/lipases que degradarão proteínas essenciais para a integridade celular e a parede celular com posterior rompimento da célula (Lucas e Newhouse, 1957). O cálcio também causa disfunção mitocondrial, por meio da despolarização de sua membrana, que leva a um estresse oxidativo e liberação de radicais livres. Demonstrou-se que a administração de antagonistas de glutamato após AVE reduz a área de lesão (Simon *et al.*, 1984; Rothman, 1985). Não só estes antagonistas alcançam estes resultados como também bloqueadores de NMDA, que ao ligar-se aos canais iônicos impede a sua abertura e, com isso, evitam a excitotoxicidade (Lingam e Robertson, 2018). Todos esses processos ocorrem concomitantemente no local de lesão e levam a posterior neuroinflamação e morte neuronal.

### 1.2.2. Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é uma consequência direta dos eventos de excitotoxicidade, pois ocorre após o influxo de cálcio que despolariza a membrana da mitocôndria e libera espécies reativas de oxigênio, que são conhecidas por contribuir com a ativação de caspases apoptóticas, necrose e autofagia que serão determinantes para a área de infarto (Lingam e Robertson, 2018). As espécies reativas de oxigênio podem danificar diretamente as macromoléculas presentes no citosol ou interferir em vias de ativação de oxidação proteica, peroxidação lipídica e fragmentação do DNA. Além disso, a liberação de espécies reativas de oxigênio pode prejudi-

car a integridade funcional da barreira hematoencefálica pela alteração da expressão e organização das junções proteicas, permitindo assim que moléculas maiores e células de defesa do sangue entrem mais facilmente no parênquima neural (Lopez-Neblina *et al.*, 2005; Rodrigo *et al.*, 2013; Chen e Gao, 2017).

### **1.2.3. Mecanismos de Morte Celular**

A lesão isquêmica leva, principalmente, a três tipos de morte celular: apoptose, necrose e autofagia. Cada uma delas histologicamente distintas e com assinatura bioquímica própria (Lo *et al.*, 2005). Após a lesão, há o aumento da disponibilidade de cálcio intracelular e posterior destruição da membrana mitocondrial. Além dos radicais livres liberados, há também a disponibilização de moléculas como o citocromo-C que se conecta com o complexo de calpaínas e ativa algumas caspases efetoras como a caspase-3, 6 e 7, iniciando o processo apoptótico. A morte celular programada, apoptose, possui diversas vias de ativação extrínseca (estímulo extracelular) ou intrínseca (estímulo intracelular). O processo apoptótico é natural e ocorre em todo o organismo, porém quando não controlado ou quando é muito estimulado pode causar danos aos tecidos (Grivicich *et al.*, 2007). Ambas as vias extrínseca e intrínseca iniciam com ativação de caspases, uma família de proteases executoras da apoptose. O genoma humano produz aproximadamente 14 tipos de caspases e metade são destinadas a morte celular (2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10) e outra metade é destinada a resposta imune. Das caspases que participam da morte celular há as iniciadoras do processo (2, 8, 9 e 10) que recebem o estímulo e as efetoras (3, 6, 7) que ao receber o sinal das outras caspases iniciam o processo de clivagem de seus alvos (Dirnagl *et al.*, 1999; Lo, E. H. *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2016). A apoptose afeta todos os tipos celulares do parênquima neural, destacando-se os oligodendrócitos que ao morrer levam a desmielinização de axônios que contribui para a perda de funções cognitivas e déficits cognitivos/sensoriais (Blight e Decrescito, 1986; Blight *et al.*, 1991). Foi constatado que a inibição experimental das caspases induz neuroproteção e o uso de minociclina pode reduzir a ativação das caspases e com isso reduzindo a morte celular e os danos neurológicos (Stirling *et al.*, 2004).



### 1.3. NEUROINFLAMAÇÃO

#### 1.3.1. Neuroinflamação do Tecido Neural após AVE

Após a isquemia, um dos eventos lesivos que também podem ocorrer na área de lesão é a reperfusão sanguínea, que é quando o sangue passa a fluir novamente pelos vasos antes obstruídos. O fluxo sanguíneo restaurado gera glicólise anaeróbia e os metabólitos promovem respostas inflamatórias. A falha da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , a desestabilização das membranas celulares e mitocondriais e a liberação do glutamato excitotóxico estão envolvidos nos processos inflamatórios. Além disso, a glicólise anaeróbia leva a expressão de moléculas de adesão, infiltração de leucócitos, ativação da ciclooxigenase e novamente a novas reações inflamatórias. Este processo inflamatório leva a morte celular por apoptose e necrose. Concomitantemente, algumas moléculas são liberadas como quimiocinas, citocinas, proteases e outros mediadores que influenciam na perpetuação dos processos inflamatórios. Estes eventos são refletidos em todas as células da lesão isquêmica, imediatamente após o AVE e posteriormente nas células da penumbra isquêmica, levando a morte de milhares de células e aumentando os déficits neurológicos (Steinlin, 2017).

#### 1.3.2. Astrócitos

Durante um episódio de AVE, os astrócitos sensibilizados pelas microglias tornam-se reativos e iniciam processos de liberação de fatores tróficos e sinaptogênicos na matriz extracelular. Estes fatores tróficos promovem sobrevivência dos neurônios, formação de novas sinapses e neuroplasticidade, indicando que os astrócitos participam ativamente da remodelação no encéfalo (Allen e Eroglu, 2017). Além disso, alguns estudos mostram que os astrócitos podem também fagocitar fragmentos celulares em eventos como o AVE para limpar a área da lesão (Koizumi *et al.*, 2018). Esta função é geralmente atribuída a microglia, que é a primeira linha de defesa do sistema nervoso contra a expansão da lesão (Morioka *et al.*, 1991; Weinstein *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2018).

#### 1.3.3. Linfócitos

As moléculas de adesão são cruciais para a integração entre o endotélio e os leucócitos sanguíneos que subsequentemente resulta em sua adesão ao endotélio e posteriormente no parênquima cerebral. Além disso, as quimiocinas são importantes na quimiotaxia, direcionando essas células para as regiões isquêmicas do cérebro (Lakhan *et al.*, 2009). O infiltrado de leucócitos geralmente ocorre com um atraso de 4 - 6 horas após o início da isque-

mia e, geralmente, inicia com a infiltração no neuropilo (Wang et al., 2007). A infiltração de linfócitos e monócitos contribui para a reação inflamatória pós-isquemia (Lakhan et al., 2009). Os linfócitos T CD4+ e CD8+ são críticos para a lesão isquêmica por liberarem proteínas pró-inflamatórias e agravar a lesão isquêmica (Iadecola e Alexander, 2001; Yilmaz et al., 2006; Hurn et al., 2007; Shichita et al., 2009). Em contraste a isso, os linfócitos T reguladores podem participar de papéis protetores por reduzir a inflamação pós-isquêmica (Iadecola e Alexander, 2001; Liesz et al., 2009; Planas e Chamorro, 2009).

#### 1.3.4. Neutrófilos

Os neutrófilos são a primeira população de células a chegar no local da lesão. Devido as suas propriedades pró-inflamatórias estas células acabam por aumentar o dano neural. Os neutrófilos liberam citocinas, espécies reativas de oxigênio e proteases que geram edema e formação de trombos secundários (Uhl et al., 2014). Há a interação com as plaquetas durante o processo inflamatório, podendo eventualmente gerar isquemias secundárias (Ruhnau et al., 2017) Além disso, facilitam a entrada de leucócitos no parênquima neural, estas células também liberam citocinas inflamatórias e aumentam a área de lesão (Neumann et al., 2015). Algumas terapias anti-neutrófilos têm alcançado resultados positivos, reduzindo a área de lesão dentro de 24 a 72h após a lesão. Todavia, não se pode descartar as propriedades positivas destas células quanto a recuperação pós-lesão. Essas características envolvem a fagocitose de células mortas e em apoptose, evitando a liberação de moléculas excitotóxicas e diminuindo os déficits neurais. Além disso, promove o recrutamento de monócitos anti-inflamatórios e neuroproteção (Jickling *et al.*, 2015). Evidências demonstram que as células mononucleares derivadas da medula, que invadem o cérebro após a isquemia, atraídas por moléculas de adesão, podem diferenciar em microglia e residir no encéfalo (Priller et al., 2001).

### 1.4. NEUROPROTEÇÃO PARA ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

Muitos trabalhos buscam a neuroproteção da área de penumbra isquêmica - tecido neural que não foi imediatamente comprometido com a isquemia. (Krieger e Yenari, 2004; Van Der Worp et al., 2007; Yenari et al., 2008; Itoh et al., 2016; Lamb et al., 2016; Standring, 2016, Kurisu e Yenari, 2017; Shekhar et al., 2017; Zhu et al., 2017; Lingam e Robertson, 2018; Xing et al., 2018).

Alguns estudos apostam em íons como o magnésio, um bloqueador de canais NMDA. Através desse bloqueio o magnésio pode prevenir uma cascata secundária de danos

celulares que levam a morte celular (Lingam e Robertson, 2018). A incubação de células progenitoras de oligodendrócitos com o íon magnésio parece aumentar a sobrevivência destas células após a privação de glicose. Entretanto, a disponibilização deste magnésio na matriz extracelular da lesão ainda é uma barreira para a formulação desta terapia (Itoh *et al.*, 2016).

A prática de exercício físico tem contribuído para uma melhora na qualidade de vida do paciente em recuperação de um AVE, porém, apesar de benéfico, isso não é suficiente para reduzir significativamente os déficits neuronais que acometem os pacientes (Xing *et al.*, 2018).

Algumas terapias utilizam o princípio do resfriamento do sangue que circula no encéfalo para reduzir a inflamação gerada após o AVE. Essas terapias são baseadas em estudos prévios que demonstraram que uma redução de temperatura na faixa de 30 a 34°C promove proteção (Krieger e Yenari, 2004; Van Der Worp *et al.*, 2007). Uma nova técnica que consiste no resfriamento do sangue e reposição deste pela veia cava inferior para reduzir a temperatura do sangue que circula no encéfalo mostrou eficaz em diminuir o edema cerebral (Lamb *et al.*, 2016; Standring, 2016; Kurisu e Yenari, 2017). Para que estes tratamentos sejam bem sucedidos, eles devem ter início imediato à isquemia, ou seja, o tempo e a duração da hipotermia são fatores fundamentais. Como essa desordem dificilmente é detectada rapidamente outros estudos no modelo de MCAO foram realizados e revelaram que mesmo com um atraso de 24 a 48 horas o resfriamento ainda possuiria um papel neuroprotetor (Yenari *et al.*, 2008). Entretanto, atualmente, os efeitos a longo prazo ainda não estão totalmente esclarecidos e essa terapia ainda está em desenvolvimento não podendo ser utilizada em humanos, pois, mais estudos são necessários para demonstrar os todos os efeitos da hipotermia.

Um dos eventos que causam lesão após o AVE é a produção de radicais livres. Os fenóis presentes no óleo de oliva são antioxidantes potentes e combatem o estresse oxidativo no tecido neural (Angeloni *et al.*, 2017). Estudos utilizando modelos animais de hipóxia-reperfusão em camundongos demonstraram que a administração dos compostos extraídos desse óleo, tais como tirosol, hidroxitirosol, acetato de hidroxitirosol geraram um efeito neuroprotetor caracterizado pela redução da morte celular, dos níveis de peróxidos, a superprodução de prostaglandinas (PGE2) e de óxido nítrico, além de aumentar a concentração de oxidantes endógenos no tecido nervoso (Gonzalez-Correa *et al.*, 2007). Em modelos de isquemia por oclusão da artéria cerebral média (MCAO), a administração desses compostos por trinta dias reduziu o infarto cerebral, o edema cerebral, a permeabilidade da BHE e as disfunções neurológicas (Mohagheghi *et al.*, 2010). Em outro estudo com este mesmo modelo, os animais apre-

sentaram significativos resultados positivos em testes comportamentais, exibindo um efeito protetor contra a disfunção motora (Bu *et al.*, 2007). Em estudos utilizando o modelo de isquemia por oclusão da artéria carótida comum, os camundongos apresentaram redução na morte de neurônios hipocâmpais de CA1 após uma semana de consumo destes compostos (Rabiei *et al.*, 2013; Angeloni *et al.*, 2017).

Uma das terapias mais promissoras é o uso da minociclina, um derivado da tetraciclina que atua na redução da ativação das caspases (Stirling *et al.*, 2004). A administração de minociclina é capaz de atenuar a morte celular, porém, isso ainda não é suficiente para evitar déficits neurológicos. Uma das formas possíveis de potencializar este efeito seria a administração de a minociclina com outros fármacos neuroprotetores, mas inexistem trabalhos que realizaram estes testes a fim de averiguar se uma combinação de fármacos poderia ser uma terapia mais eficaz. Franco *et al.* (2012), estudaram a ação concomitante dos efeitos da minociclina concomitante com o uso de terapia celular em modelo de isquemia por microinjeções de endotelina- 1(ET-1), um potente vasoconstritor, e encontraram ação neuroprotetora e recuperação funcional.

Apesar de todos esses efeitos benéficos, estudos visando o desenvolvimento de uma terapia eficaz e concreta para o AVE ainda são necessários. Por exemplo, a dificuldade em implementar em humanos as terapias propostas nos inúmeros estudos publicados deve-se as nuances entre espécies, pois nem todos os resultados que são positivos em ratos e camundongos são observados quando testados em humanos (Cook *et al.*, 2012). Tagaya *et al.* (1997), demonstraram que em roedores a morte celular alcança o seu pico em torno de 20h após o início do AVE, contudo, em primatas não humanos isso ocorre em aproximadamente 5h, tornando a janela terapêutica ainda mais curta. Na tentativa de se obter resultados significativos e mais semelhantes ao que pode ser encontrado em humanos, tem-se apostado em estudos utilizando modelos de AVE em primatas não humanos (Cook e Tymianski, 2012). Entretanto, diferente de roedores, o número de animais disponíveis para a realização destes estudos é extremamente limitado devido ao tempo, custos, atenção e questões éticas envolvidas. Dessa maneira, estudos em roedores ainda podem ser muito úteis principalmente na fase inicial em que se procuram moléculas candidatas a novos fármacos como, por exemplo, aqueles advindos da fitoterapia.

O uso de fitoterápicos vem crescendo nos últimos anos. A flora Amazônica, associada ao conhecimento empírico de seu povo, tem sido um celeiro promissor na descoberta de novos fármacos (Miguel, 2007). Estudos utilizando extratos obtidos a partir de plantas oriun-

das da Amazônia vêm investigando o potencial terapêutico das mesmas em tratar doenças do SNC.

### 1.5. HISTOPATOLOGIA

A administração de fitoterápicos pela população tradicional nem sempre é acompanhada pela medicina contemporânea, oferecendo riscos aos consumidores por não haver padronização da dosagem. Com o uso excessivo de fitoterápicos, muitos problemas podem surgir devido ao uso indiscriminado, tais como toxicidade de fígado e rim, que são os principais órgãos de filtragem e processamento de substâncias ingeridas. O uso dessas substâncias deve ser acompanhado pela ANVISA, pois somente o uso desses fitoterápicos não é suficiente para serem considerados seguros e/ou eficazes, sendo assim, os estudos toxicológicos são necessários a fim de que a dose utilizada não cause prejuízos (Almeida *et al.*, 2009). Estes testes são essenciais para preencher a lacuna de conhecimento que existe entre o uso de fitoterápicos e seu custo/benefício. Atualmente existem estudos que não encontraram toxicidade aguda e reprodutiva nas dosagens de 300 e 2000mg/kg e 500, 1000 e 1250 mg/kg de ORC, respectivamente (Sachetti *et al.*, 2009; Sachetti *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*, 2014). Deste modo, uma avaliação histopatológica deve ser acompanhada de estudos que visem investigar possíveis substâncias neuroprotetoras em modelos de AVE, a fim de acompanhar eventuais efeitos colaterais dos possíveis tratamentos, principalmente em fitoterápicos bastante utilizadas pela população.

### 1.6. EXTRATOS DE PLANTAS DA AMAZÔNIA COMO AGENTES NEUROPROTETORES: O ÓLEO DE COPAÍBA

A Amazônia é uma rica fonte de produtos naturais, mas as suas ações terapêuticas para doenças do sistema nervoso central (SNC) foram pouco investigadas. Entre os fitoterápicos investigados, pode-se citar o óleo de copaíba, que é removido de uma espécie de planta do gênero *Copaifera* que é encontrada em toda a América Latina (Veiga Junior e Pinto, 2002). A espécie *Copaifera reticulata* DUCKE é encontrada desde o norte da Amazônia até a Venezuela (Dwyer, 1951). O óleo extraído desta planta é largamente utilizado pela medicina popular como anti-inflamatório e como antimicrobiano (Veiga Junior e Pinto, 2002).

Dentre as espécies pertencentes ao gênero *Copaifera*, existem variações das principais substâncias encontradas em seus óleos, tais como  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -bisaboleno,  $\alpha$ -cariofileno ( $\alpha$ -humuleno),  $\alpha$  e  $\beta$  selineno,  $\beta$ -elemeno, cis- $\alpha$ -bergamoteno, dentre outros (Veiga Junior

et al., 2005). Diversos estudos têm sido realizados utilizando o óleo extraído dessas plantas e que revelam resultados promissores, por exemplo, efeito antimicrobiano contra os gêneros *Staphylococcus*, *Escherichia* e *Pseudomonas* (Biavatti et al., 2006; Mendonça e Onofre, 2009; Souza et al., 2011; Alencar, 2013), ação antifúngica contra fungos do gênero *Candida* e *Aspergillus* (Deus et al., 2011), anti-*Leishmania* (Dos Santos et al., 2012) anti-inflamatória (Basile et al., 1988; Gomes Nde et al., 2008), antinociceptiva (Gomes et al., 2007), larvicida (Silva et al., 2007), antineoplásica (Gomes Nde et al., 2008) entre outras (Veiga Junior et al., 2005). O óleo de copaíba também é conhecido pela medicina contemporânea como antisséptico, anti-inflamatório e cicatrizante (Lorenzetti, 1992).

Em relação a doenças do SNC, Guimarães-Santos et al (2012), demonstraram efeito neuroprotetor do óleo-resina de *Copaifera reticulada* DUCKE no córtex motor de ratos adultos submetidos à lesão excitotóxica aguda. No entanto, inexistem estudos que tenham investigado o efeito do óleo resina de copaíba após lesão isquêmica no SNC. Neste estudo, investigamos os possíveis efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores do óleo resina da *C. reticulata* DUCKE em animais submetidos à isquemia focal induzida por microinjeções de ET-1 no córtex motor.

## 1.7. OBJETIVOS

### 1.7.1. Objetivo Geral

Investigar os possíveis efeito neuroprotetores e anti-inflamatórios do óleo resina de copaíba (*Copaifera reticulata* DUCKE) em um modelo experimental de isquemia focal do córtex motor por microinjeções de endotelina-1.

### 1.7.2. Objetivos Específicos

1. Descrever a histologia da lesão isquêmica e a perda tecidual, bem como a neuroinflamação e o infiltrado celular após as microinjeções de ET-1 em animais tratados com copaíba e controle;
2. Investigar qualitativamente e quantitativamente os padrões de astrocitose e morte celular em animais isquêmicos tratados e controle;
3. Investigar o efeito do tratamento com óleo resina de copaíba sobre a densidade de neurônios corticais no modelo experimental proposto.
4. Realizar a histopatologia de fígado e rins dos animais do grupo tratado e controle.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados oito ratos machos e adultos da raça Wistar, pesando entre 250-350g. Os animais foram alojados em gaiolas contendo 4 animais cada, com água e comida à vontade. Os procedimentos experimentais foram executados conforme as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará, objetivando reduzir ao máximo o sofrimento e a ansiedade nos animais. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração experimental, os procedimentos histológicos e imunoistoquímicos realizados no Instituto Evandro Chagas - Seção de Patologia. O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da UFPA sob o número de protocolo 137-13 (ANEXO 1).

### 2.2. PROCEDIMENTOS PRÉ-CIRÚRGICOS

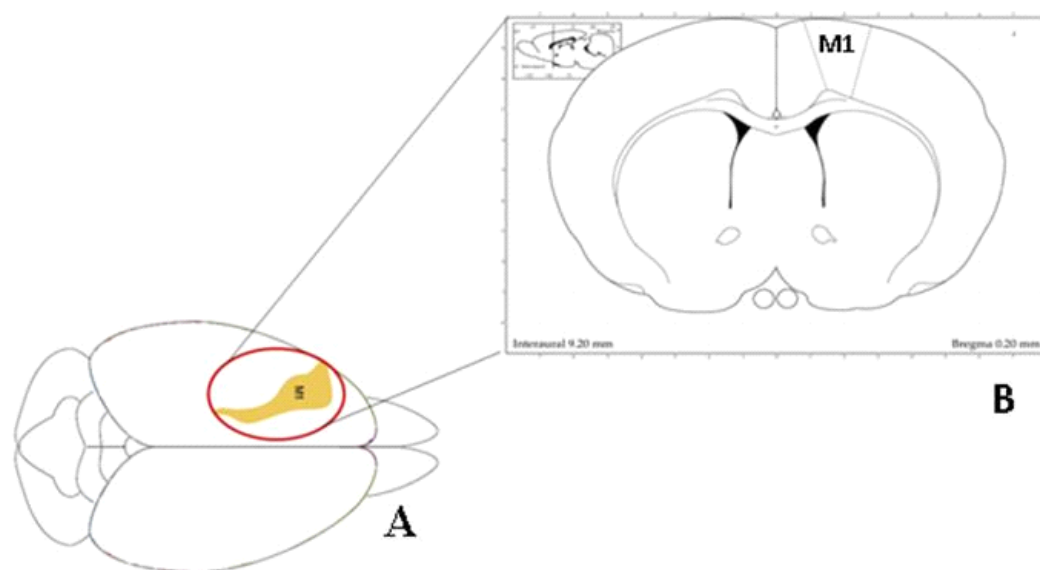
Os animais foram adquiridos com dois meses de antecedência à data prevista para o início das cirurgias. Eles foram alojados em gaiolas-padrão no biotério do Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental (LNNE/UFPA) e pesados para acompanhamento do ganho de peso ideal (250 a 300g) ao momento da cirurgia.

### 2.3. INDUÇÃO DE ISQUEMIA FOCAL POR MICROINJEÇÕES DE ET-1

O protocolo adotado foi adaptado do estudo de Fuxe *et al* (1997). Este estudo publicado há pouco mais de 20 anos atrás demonstrou que o uso de endotelina-1 (ET-1) gera contração considerável dos vasos sanguíneos. Quando aplicados no córtex de ratos esta droga gera um quadro de isquemia, semelhante a encontrada em humanos (Fuxe et al., 1997). Antes dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (Vetanarcol®, Köning. 72 mg/kg) e cloridrato de xilazina (Kensol®, Köning. 9 mg/kg) seguindo as indicações dos fabricantes. Verificada a ausência dos reflexos de retirada da pata, os animais foram colocados sobre um aparelho estereotáxico (Insight® EFF-336). Uma incisão longitudinal a 45° foi feita com bisturi para expor a caixa craniana. No ponto especificado por coordenadas estereotáxicas (+1,2 mm, anteroposterior, +2,3 mm, mediolateral e - 0,5 mm, dorsoventral), a partir do “bregma” (ponto de união entre os ossos craniais frontal e parietal) foi realizada craniotomia com auxílio de broca cirúrgica odontológica de baixa rotação para exposição da superfície cortical, com estas coordenadas foi possível aplicar a ET-



1 no córtex motor primário (M1), conforme esquematizado na figura 2. O córtex motor M1 foi escolhido por, após a lesão e a recuperação dos movimentos do animal, ser possível visualmente observar o sucesso da lesão devido ao animal apresentar movimentos característicos de rotação ao lado contralateral da lesão. Além disso, esta é uma região que é bastante explorada em trabalhos recentes do grupo do laboratório, originando diversos trabalhos publicados (Souza-Rodrigues et al., 2008; Franco et al., 2012; Cardoso et al., 2013; Lopes et al., 2016; Carvalho et al., 2017; Souza et al., 2017; Salazar et al., 2018). Este protocolo foi adaptado de estudos prévios publicados por Franco *et al* (2012).



**Figura 2** - Desenho esquemático do encéfalo do rato. A - Local estimado do córtex motor primário (M1). B - Corte transversal e local esquemático da área cortical do hemisfério esquerdo correspondente ao M1, em destaque o box, com um corte esquemático coronal delimitando a área motora M1. Fonte: Adaptado de Kirkcaldie, 2012.

Com auxílio de capilares de vidro com graduações de 1  $\mu$ l e ponta com diâmetro interno em torno de 20  $\mu$ m (Sigma-Aldrich) foram injetados 80  $\mu$ Mols de ET-1, diluída em 1  $\mu$ l do corante azul de colanil, de modo a permitir a localização do centro de lesão durante o procedimento histológico e imunohistoquímico. A micropipeta permaneceu fixa por cinco minutos no parênquima neural para evitar possíveis refluxos e assim causar insucesso em promover a isquemia. Após os procedimentos cirúrgicos, os ratos foram mantidos em gaiolas-padrão individuais e foram observados em intervalos regulares visando o monitoramento da recuperação e da diminuição dos déficits motores, tais como melhora na mobilidade e redução dos movimentos giratórios, causados pelo dano isquêmico. Esse acompanhamento ocorreu durante o tempo de sobrevivência de sete dias para ambos os grupos.

## 2.4. TRATAMENTO COM ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA

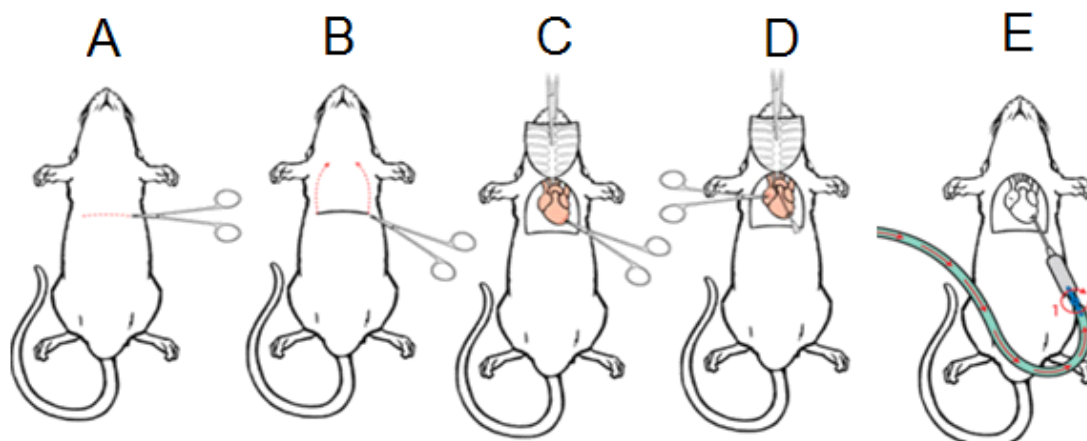
O óleo-resina de copaíba (ORC) foi obtido de espécimes localizados no campus experimental da EMBRAPA, as exsicatas estão localizadas no herbário da instituição sob o número 183939. A administração do ORC foi realizada adaptando o protocolo descrito anteriormente em publicação do grupo, utilizando modelo de lesão excitotóxica do córtex motor, assim como o mesmo ORC armazenado (Guimarães-Santos et al., 2012). O tratamento foi realizado administrando-se 400 mg/kg, via gavagem, fracionado em duas doses de 200mg/kg (Figura 3). Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: (i) animais isquêmicos (N = 5) tratados com ORC diluído em tween 5% e (ii) animais isquêmicos (N=3) nos quais foi administrado somente o tween a 5%. O início dos tratamentos (ORC + Tween 5% ou Tween 5%) ocorreram seis horas após a indução isquêmica e os animais foram perfundidos 7 dias após a lesão.



**Figura 3** - Imagem representativa do procedimento de gavagem. Doses diárias de 400mg/kg foram administradas duas vezes ao dia (200mg/kg e 200mg/kg) diretamente no lúmen do esôfago, impedindo regurgitação da solução. Fonte: Disponível em <https://oacu.oir.nih.gov/sites/default/files/uploads/training-resources/rodentadministration.pdf> acessado em 06/2018.

## 2.5. PERFUSÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Ao término do período de sobrevida, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (Vetanarcol®, König 72mg/kg) e cloridrato de xilazina (Kensol®, König. 9 mg/kg). Na ausência de reflexos de retirada da pata, os animais foram perfundidos na região do ventrículo esquerdo do coração com 300-400 ml de solução salina tamponada heparinizada (PBS 0,9% 0,1M pH 7,2 – 7,4 + 1ml/L de heparina), seguido de 300-400 ml de solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (PFA 4% 0,1M pH 7,2 – 7,4), conforme detalhado na Figura 4.



**Figura 4** - Desenho esquemático da toracotomia realizada para a perfusão. A - Corte transversal do peritônio. B - Corte perpendicular ao corte transversal, expondo a caixa torácica. C – Exposição do coração e localização do ventrículo esquerdo. D – Inserção da agulha interligada a bomba infusora. E - Início da passagem de solução salina pelos principais vasos sanguíneos. F – Transfusão do paraformaldeído pelas principais vias circulatórias. Fonte: Adaptado de Gage *et al.*, 2012.

Após o término da perfusão, os encéfalos foram retirados e pós-fixados por 24 horas em solução de PFA 4%. Em seguida, foram crioprotetidos em soluções com concentrações crescentes de sacarose a 25%, 50%, 100% diluídos em glicerina e tampão fosfato 0,05M (pH = 7,4). Após a crioproteção, os encéfalos foram inclusos em TissueTek® (Sakura) para congelamento a  $-35^{\circ}\text{C}$  em câmara de criostato e, posteriormente, foram obtidas secções de  $40\mu\text{m}$  com auxílio de criostato (Leica CM1850). As secções foram guardadas no freezer em potes de 4 ml contendo meio anticongelante e montadas em lâminas previamente gelatinizadas (Easy-Path EP-51-30185) para serem utilizadas.

Retiraram-se também amostras do fígado e dos rins para proceder análise histopatológica. Essas amostras foram pós-fixadas em solução de formaldeído 10%. Em seguida, foram processadas no processador automático de tecido a vácuo (Leica ASP 300S) e inclusas em blocos de parafina com auxílio de o sistema modular de inclusão de tecidos HistoCore Arcadia (Leica). O material foi cortado com espessura de  $5\mu\text{m}$  com auxílio de micrótomo (Micron HM 340E) e as secções foram montadas em laminas de vidro para posterior utilização.

## 2.6. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

A análise histopatológica do fígado e rins foi realizada pela coloração de Hematoxilina e Eosina (HE), seguindo o protocolo de rotina do laboratório de anatomia patológica da SAPAT/IEC. Esta coloração permite a observação de achados patológicos (quando existentes) na maioria dos tecidos (Fuxe et al., 1997; Souza-Rodrigues et al., 2008). A opção por esta análise se deu devido a possível toxicidade que a administração do óleo de copaíba possa causar em órgãos filtradores como fígado e rins, uma vez que a copaíba foi administrada via gavagem. A análise histopatológica dos encéfalos foi feita pela coloração de Nissl utilizando violeta de cresila a qual permite a visualização dos corpos neuronais (Prophet et al., 1992).

## 2.7. IMUNOHISTOQUÍMICA

A presença de astrócitos ativos foi identificada pela imunomarcação com anticorpo policlonal feito em coelho Anti-S100 (Abcam, ab868) na diluição de 1:100. Para marcação de microglia ativa, utilizou-se anticorpo policlonal feito em coelho Anti-CD68 (Abcam, ab125212) na diluição de 1:100. Os neurônios maduros foram marcados com anticorpo monoclonal feito em camundongo Anti-NeuN (clone A60) (LSBio, LS-C312122) na diluição de 1:50 e, por fim, a marcação de caspase-3 foi feita com anticorpo policlonal feito em coelho Anti-caspase-3 (Abcam, ab4051) na diluição 1:100.

## 2.8. ANÁLISE QUALITATIVA

As secções de todos os grupos experimentais marcadas pelos métodos imunohistoquímicos e histológicos foram analisadas em microscópio óptico binocular (Zeiss Imager.Z1). As imagens dos campos representativos foram obtidas com auxílio de uma câmera digital (AxioCam HRc - Zeiss) acoplada a um microscópio óptico Zeiss Imager.Z1.

## 2.9. ANÁLISE QUANTITATIVA

A área de lesão foi analisada com fotomicrografias das lâminas de violeta de cresila de ambos os grupos controle e tratados. Para isso, as lâminas previamente identificadas foram fotografadas realizar o cálculo de área (mm<sup>2</sup>) utilizando o software livre ImageJ ®.

Para a avaliação quantitativa do número de células marcadas para cada imunohistoquímica, contaram-se três campos/secção e três secções/animal. A contagem foi feita usando microscópio binocular (Olympus BX41) em objetiva de 40x/Plan cuja ocular contém uma gradícula de contagem de 245 µm<sup>2</sup> utilizada neste estudo. Os campos de contagem estavam

dispostos ao longo da borda da lesão, sempre respeitando o plano cartesiano e objetivando a aleatoriedade da coleta de dados. Este protocolo foi adaptado de Schnell et al (1999). Os resultados foram expressos em gráficos da média e o erro padrão.

#### 2.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

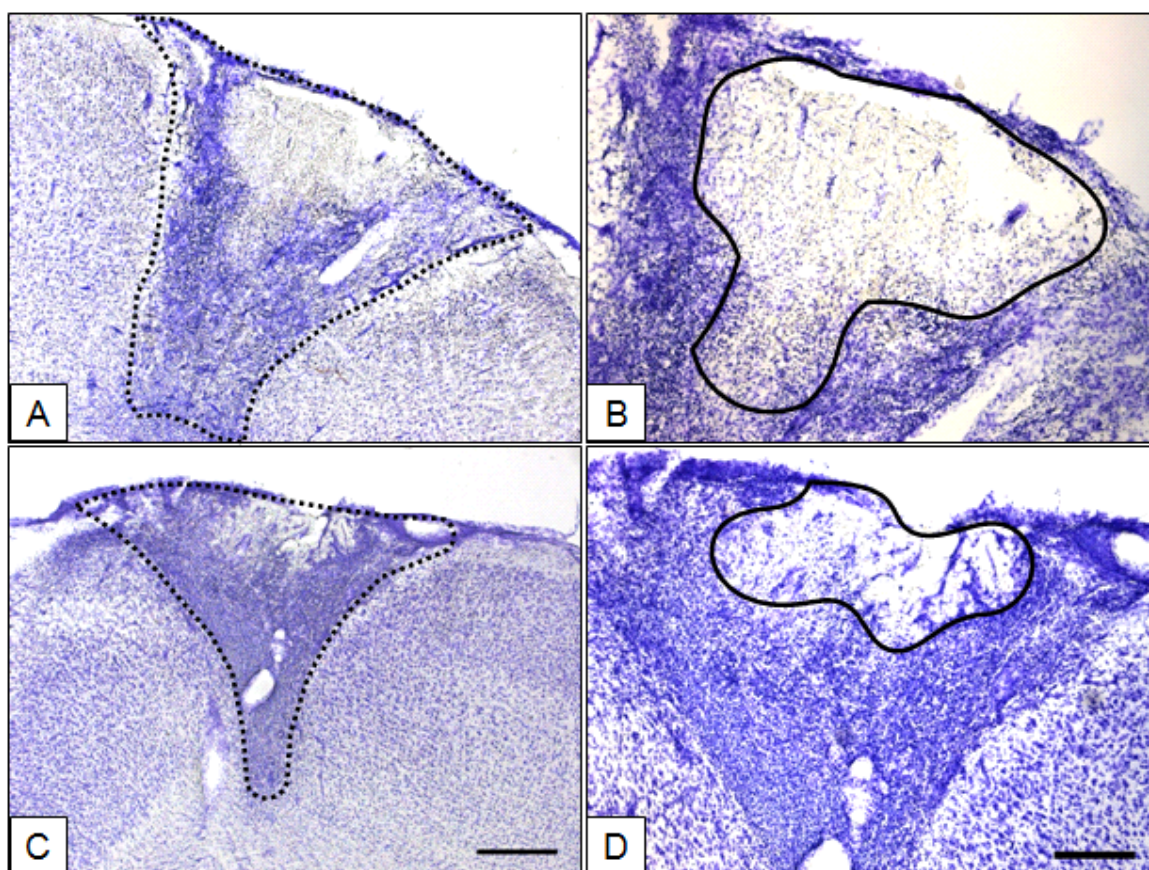
Utilizou-se o software Bioestat ® 5.4. para realização das análises de estatística descritiva e teste ANOVA de um critério com pós-teste em Tukey, com  $\alpha = 0.05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. ANÁLISE DA ÁREA DE LESÃO PELA COLORAÇÃO DE NISSL

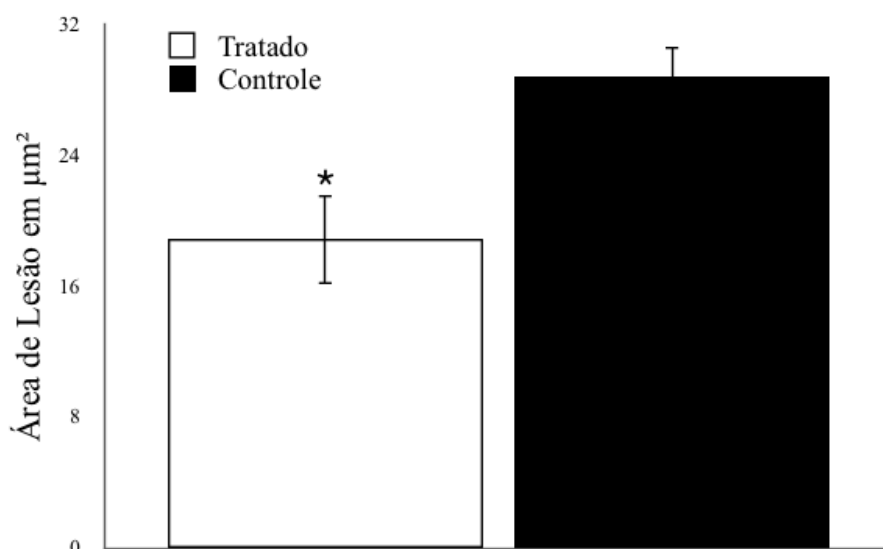
A injeção de 80 pMoles de ET-1 foi capaz de produzir uma área de infarto significativa, caracterizada por uma região de palor tecidual, consequência da morte celular por necrose, delimitada por um aglomerado de células polimorfonucleares. Observa-se que a área de lesão e do palor tecidual nos animais tratados com ORC é menor que nos animais controle nos quais a perda tecidual foi mais intensa (Figura 5).

A morfometria da área de lesão nos animais tratados foi de  $15,96 \pm 1,53 \mu\text{m}^2$  enquanto que nos animais controle essa área foi de  $28,82 \pm 2,65 \mu\text{m}^2$ . A diferença entre os grupos mostrou ser estatisticamente significativa ( $p < 0.01$ ) (Gráfico 1).



**Figura 5** - Fotomicrografia da área de lesão no córtex motor primário de ratos adultos corados com violeta de cresila. Grupo controle (A e B) e tratado com ORC (C e D). Área de infarto destacada pela linha pontilhada e local do palor tecidual com a ausência de corpos celulares (área de necrose) destacada pela linha contínua. Área de lesão reduzida no grupo tratado com ORC quando comparada ao controle. Escala: = 400  $\mu\text{m}$  (A e C) e 200  $\mu\text{m}$  (B e D).

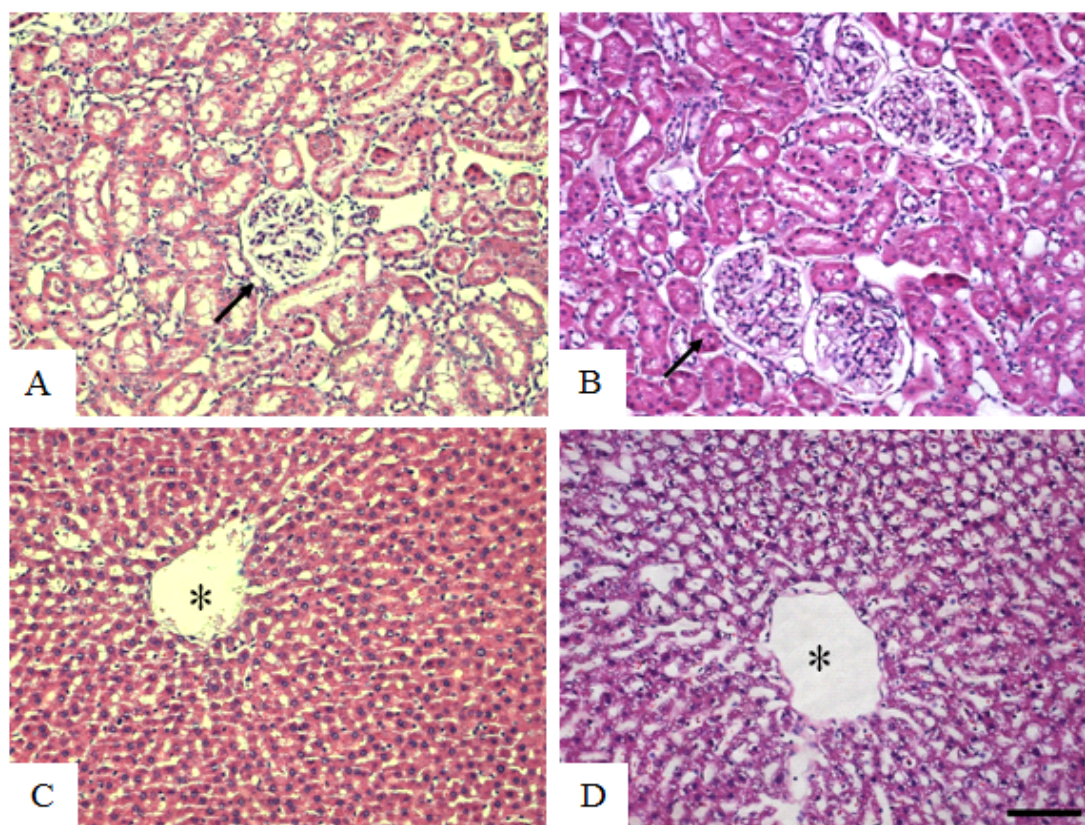




**Gráfico 1.** Área de lesão em  $\mu\text{m}^2$  dos grupos controle e tratado no tempo de sobrevivência de 7 dias ( $p < 0.01$ ).

### 3.2. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

No exame histopatológico, as amostras de fígado e rins de animais tratados por gavagem com uma dose de 400mg/kg de ORC permaneceram dentro dos parâmetros de normalidade (Figura 6).

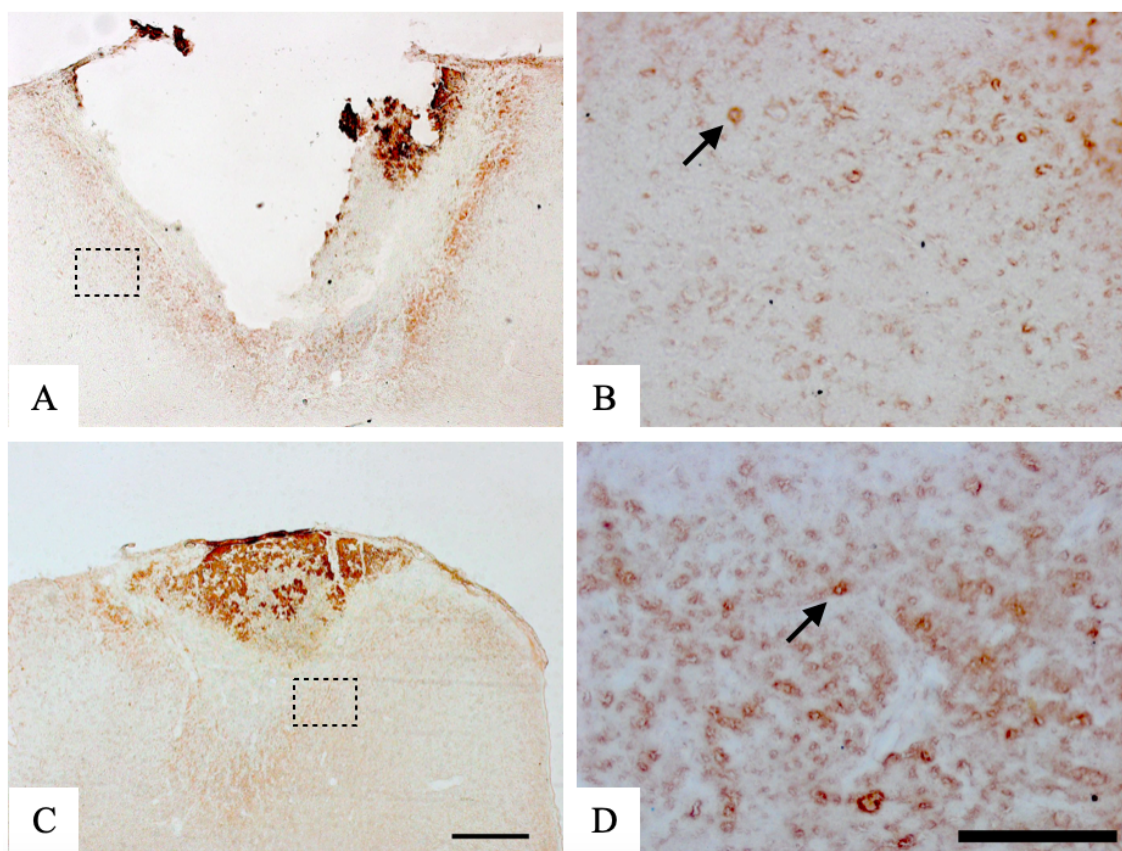


**Figura 6** - Fotomicrografia do rim (A e B) e fígado (C e D) de animais controle (A e C) e tratados (B e D). A análise histopatológica não encontrou alterações. Seta = néfron; asterisco = lúmen da veia centro lobular. Escala: 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.3. IMUNOISTOQUÍMICA

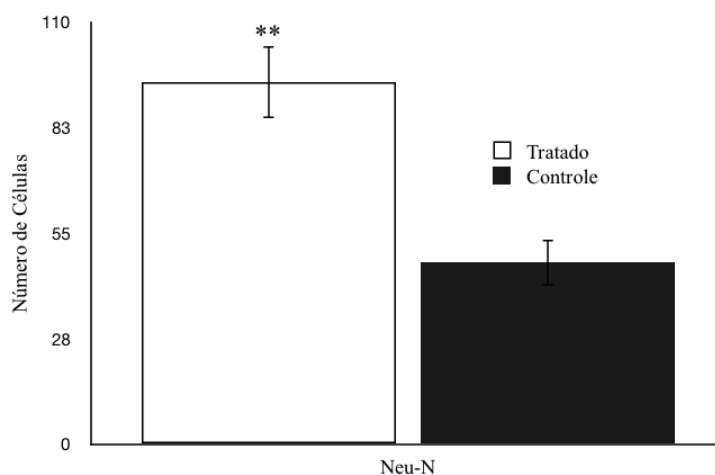
#### 3.3.1. Análise da Preservação Neuronal

Para avaliar os efeitos do tratamento com ORC sobre a preservação de neurônios corticais, realizou-se imunohistoquímica para NeuN, um marcador específicos de neurônios diferenciados. Como as células neurais são perdidas rapidamente no centro isquêmico, a análise foi realizada na área de penumbra isquêmica. Os resultados da imunohistoquímica para Neu-N demonstraram que a sobrevivência dos neurônios na área de penumbra foi maior em animais tratados em relação aos animais controle (Figura 7). Esta sobrevivência neuronal foi confirmada pela contagem de neurônios: animais tratados os quais apresentaram uma média de  $94,37 \pm 9,42$  células por campo de contagem *versus*  $47,33 \pm 6,11$  encontrada nos animais controle. A diferença entre grupos foi estatisticamente significativa ( $p < 0.01$ ) (Gráfico 2).



**Figura 7** - Fotomicrografia da imunohistoquímica anti Neu-N nos grupos controle (A e B) e tratados (C e D). O retângulo destaca o local da área de penumbra isquêmica e a seta revela a marcação neuronal. Área da lesão é menor e o número de células NeuN+ na área da penumbra isquêmica é maior no grupo tratado com ORC comparado ao controle. Escala (A, C) = 200  $\mu\text{m}$  e (B, D) = 100  $\mu\text{m}$ .

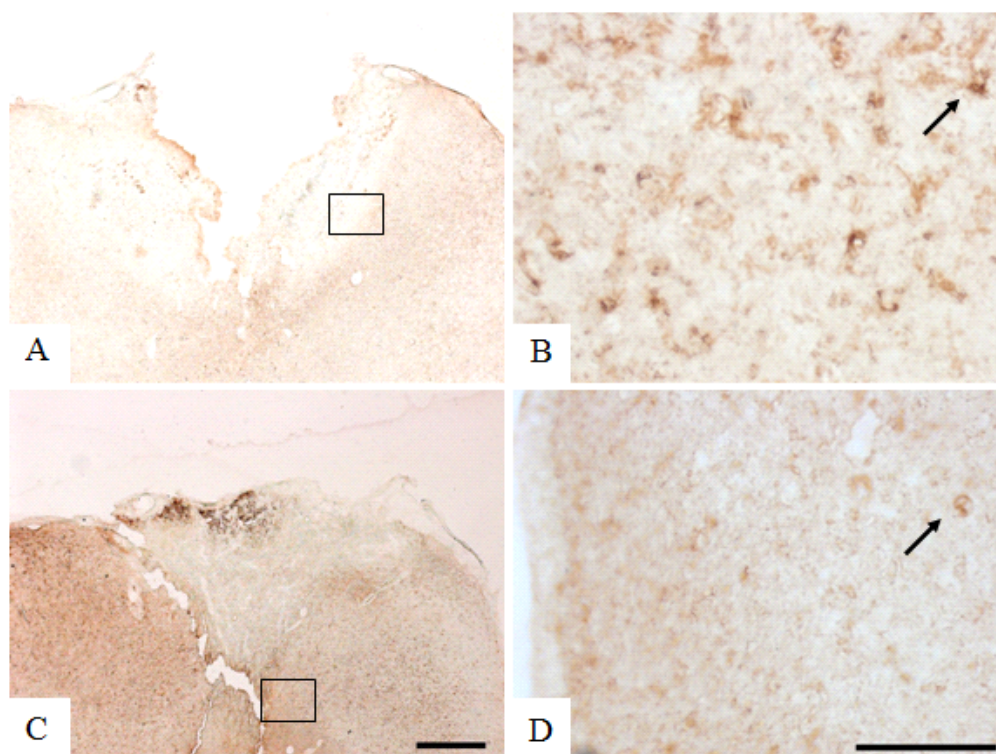




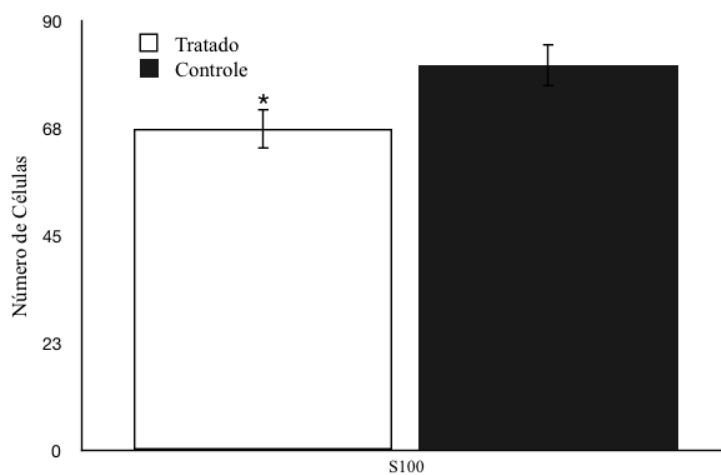
**Gráfico 2.** Contagem de neurônios na área da penumbra isquêmica demonstrando uma maior sobrevivência neuronal nos animais tratados com ORC ( $p < 0.01$ ).

### 3.3.2. Análise da Proliferação de Astrócitos

A análise dos astrócitos foi realizada através da marcação com o anticorpo anti-S100, uma proteína da família de proteínas ligantes de cálcio, produzida e secretada por astrócitos no SNC (Figura 8). A média do número de células anti-S100+ por campo de contagem foi de  $67,30 \pm 4,13$  e  $80,65 \pm 4,44$  nos animais tratados e controle, respectivamente, com diferença estatística entre os grupos (Gráfico 3) ( $p < 0.05$ ).



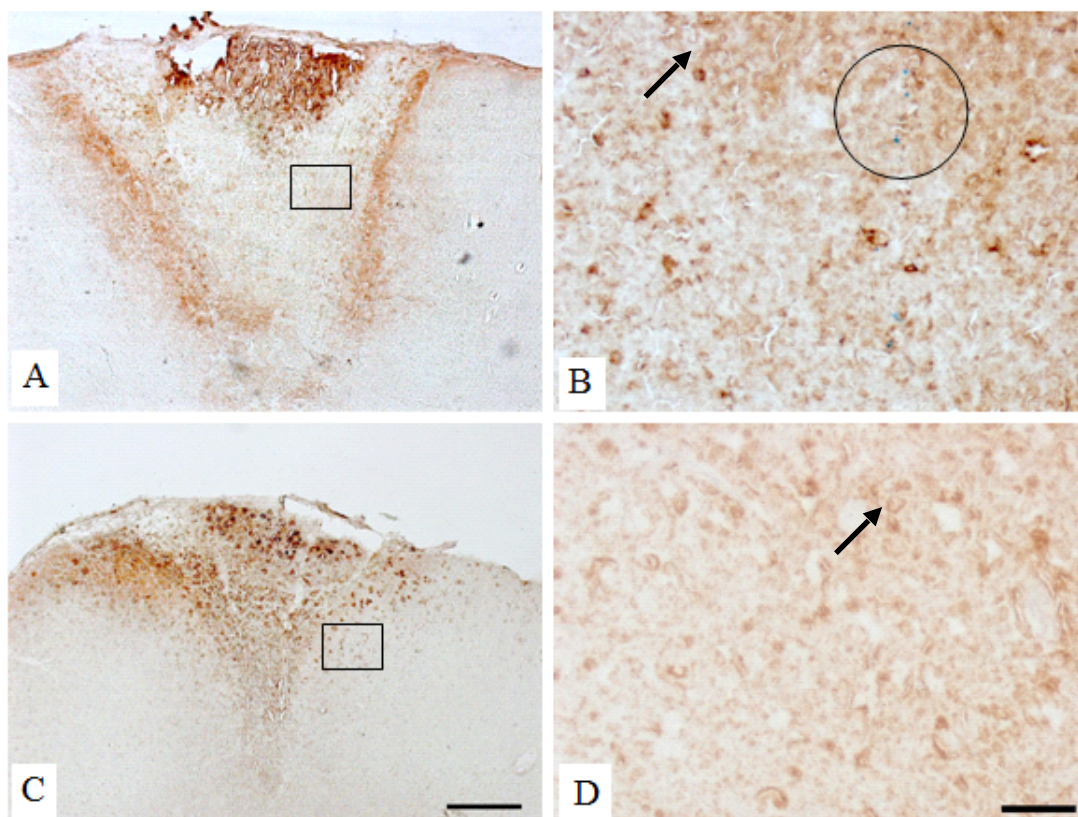
**Figura 8** - Fotomicrografia da imunomarcagem com anticorpo anti-S100. Grupo controle (A e B) e tratados (C e D). O retângulo destaca o local de penumbra isquêmica e as setas destacam a marcação de astrócitos. Escala (A, C) = 200  $\mu$ m e (B, D) = 100  $\mu$ m.



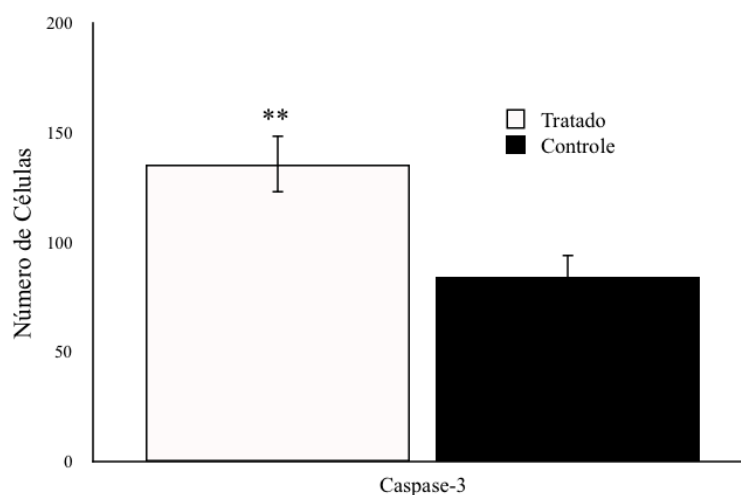
**Gráfico 3.** Contagem de astrócitos na região da penumbra isquêmica. Animais tratados apresentaram menos células anti-S100<sup>+</sup> por campo de contagem comparado aos animais controle ( $p < 0.05$ ).

### 3.3.3. Avaliação Da Morte Celular

Avaliou-se o efeito do ORC sobre os padrões de morte celular através da imunomarcacão para anti-caspase-3. Encontrou-se mais células caspase-3+ no grupo tratado quando este foi comparado ao grupo controle (Figura 9). O numero de células caspase-3+ por campo de contagem foi de  $135,66 \pm 13,07$  e  $84,50 \pm 9,88$  no grupo tratado e controle, respectivamente (Gráfico 4). A análise estatística mostrou diferença significativa entre estes dois grupos ( $p < 0.01$ ).



**Figura 9** - Fotomicrografia da imunomarcacão com anticorpo anti-caspase-3. Grupo controle (A e B) e tratado (C e D). O retângulo destaca o local de penumbra isquêmica, o círculo mostra a presença do azul de colanil injetado junto a ET-1 para induzir a lesão isquêmica e as setas revelam a marcação de células caspase-3+. Escala (A e C) = 200  $\mu$ m e (B e D) = 50  $\mu$ m.



**Gráfico 4.** Contagem de células apoptóticas na região da penumbra isquêmica revelando aumento no número destas células em animais tratados comparado ao controle ( $p < 0.01$ ).

O quadro abaixo sumariza os resultados encontrados no presente estudo:

IMUNOHISTOQUÍMICA	MÉDIA E ERRO PADRÃO		Análise estatística (Tukey)
	Tratado	Controle	
NeuN (NEURÔNIOS)	94,37 ± 9,42	47,33 ± 6,11	$p < 0.01$
S100 (ASTRÓCITOS)	67,30 ± 4,13	80,65 ± 4,44	$p < 0.05$
Caspase-3 (CÉLULAS APOPTÓTICAS)	135,66 ± 13,07	84,50 ± 9,88	$p < 0.01$

**Quadro 1** – Resumo dos dados quantitativos.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE O MODELO EXPERIMENTAL UTILIZADO

O modelo de isquemia por injeção de endotelina (ET-1) utilizado no presente estudo, está bem estabelecido na literatura, obtendo resultados que mimetizam os principais efeitos observados após um AVE, os quais são a área de infarto celular imediato, volume de lesão, déficits sensoriomotores e perda tecidual (Fuxe et al., 1989; Sharkey e Butcher, 1995; Gilmour et al., 2004); (Frost et al., 2006; Windle et al., 2006).

Este modelo é vantajoso em relação ao modelo de oclusão da artéria cerebral média (do inglês, middle cerebral artery occlusion, MCAO), um procedimento cirúrgico bastante invasivo que, inevitavelmente, danifica o músculo temporal sobrejacente ao local da craniectomia resultando em dificuldades de alimentação no período de recuperação, além de apresentar alta taxa de mortalidade e, conseqüentemente, o uso de mais animais (Sharkey e Butcher, 1995). Por sua vez, o modelo de ET-1, além de sua simplicidade em execução, apresenta-se como um modelo de AVE confiável ao reproduzir os mesmos efeitos observados no MCAO sem os danos inerentes à este (Gilmour et al., 2004). Além disso, o modelo de ET-1 tem sido utilizado com sucesso no Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração da UFPA e os resultados destes estudos têm sido publicados desde 2008 (Souza-Rodrigues et al., 2008; Franco et al., 2012; Cardoso et al., 2013; Lopes et al., 2016; Carvalho et al., 2017; Souza et al., 2017; Salazar et al., 2018).

### 4.2. ÓLEO RESINA DE COPAÍBA COMO ANTI-INFLAMATÓRIO: POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO

O ORC é popularmente conhecido por sua ação anti-inflamatória. Di Rosa et al (1972) demonstraram que os mecanismos de ação deste composto assemelha-se ao observado em drogas como aspirina atuando na inibição da liberação de prostaglandinas e na migração de leucócitos dos vasos sanguíneos para os tecidos lesados. Em estudos com outras espécies de copaíba, a inibição da permeabilidade vascular pelo oleoresina foi semelhante à inibição demonstrada pela administração de fenilbutazona de cálcio – um fármaco que apresenta propriedades antirreumáticas, anti-inflamatórias e antipiréticas (Gomes Nde et al., 2008). Esses estudos descreveram que, no sistema periférico, o oleoresina inibe a migração de leucócitos, células polimorfonucleadas e mononucleadas. É possível que o ORC tenha efeito direto sobre no processo inflamatório de modo geral por impedir a migração de neutrófilos nas primeiras 24 – 72h após a lesão, como demonstrado por Guimarães et al (2012) em um modelo de lesão

excitotóxica por NMDA. Neste estudo, observou-se uma redução de células mononucleares ED-1+ no sítio da lesão em animais tratados com ORC com sobrevivência de 72h.

No presente estudo, observou-se que o ORC possui efeito neuroprotetor, pois, além de reduzir a área de lesão tecidual, o tratamento foi eficaz em promover a preservação neuronal (Gráficos 1 e 2) e atenuar a resposta astrocitária (astroglíose) (Gráfico 4). Estes achados estão de acordo com estudos prévios que utilizaram outros compostos, como, por exemplo, o Apelin 13 - um hormônio peptídico, e o bioisótopo do piruvato, os quais foram capazes de reduzir a área de infarto em modelo de MCAO (Lee et al., 2017)(Duan et al., 2019).

Apesar dos astrócitos poderem apresentar efeitos benéficos por sua capacidade de fagocitar restos de células mortas, a presença de astrócitos reativos na área de lesão contribui para a formação da cicatriz glial que impede a entrada de substâncias neuroprotetoras e eventos regenerativos. Deste modo, a redução destas células no sítio da lesão, como observado no presente estudo, é extremamente benéfica (Rao et al., 2001)(Al-Ahmad et al., 2011).

A administração de 400 mg/kg de ORC por um período de 7 dias exacerbou a morte celular por apoptose (Gráfico 5). Quando analisou-se o efeito do ORC sobre a apoptose, um dos eventos que poderiam estar sendo combatidos, a apoptose, estava com expressão aumentada, nos animais do grupo tratado havia mais expressão de caspase-3 do que no grupo controle. Nos estudos de Park et al (2011) e Amiel et al (2012) usando modelos *in vivo* e *in vitro* observaram que o  $\beta$ -cariofileno, principal composto da copaíba, diminuiu a expressão de genes anti-apoptóticos, conseqüentemente, promovendo a liberação de citocromo C e ativação das vias das caspases. Desse modo, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho. Não é possível afirmar quais células estão em processo de morte celular programada. Estudos com dupla marcação (NeuN + Caspase-3 e GFAP + Caspase-3) e seriam necessários para responder a esta pergunta.

Devido à redução da área de lesão nos animais tratados e a preservação neuronal, é possível afirmar que o ORC é um agente neuroprotetor. A sobrevivência neuronal é um fator importante na redução dos déficits após o AVE e a morte neuronal é correlacionada diretamente com défices neurológicos Arumugam *et al* (2007) utilizaram imunoglobulina intravenosa no tratamento de animais isquêmicos e obtiveram uma maior sobrevivência neuronal. Estudos futuros são necessários para elucidar as vias pelas quais o ORC age, bem como, a dose e o tempo de tratamento mais adequados. Além de realização de estudos de HPLC a fim de descobrir se o ORC atravessa a BHE e se positivo, descrever quanto de ORC está presente no local da lesão.

## 5. CONCLUSÃO

Neste estudo, observamos que o tratamento com ORC na concentração de 400mg/kg reduz a área de lesão isquêmica e aumenta a sobrevivência de neurônios 7 dias após lesão isquêmica do córtex motor induzida por microinjeções de ET-1. Além disso, observou-se redução de astrocitose e aumento do número de morte celular programada, apesar de não termos estabelecido a identidade das células marcadas. Não houve efeito sobre a ativação microglial. Estudos futuros são necessários para elucidar os mecanismos pelos quais o ORC está atuando para promover a sobrevivência dos neurônios, reduzir a área de lesão e, provavelmente, atenuar os déficits após AVE isquêmico.

## 6. REFERÊNCIAS

- AL-AHMAD, A. J. et al. Perlecan domain V modulates astrogliosis in vitro and after focal cerebral ischemia through multiple receptors and increased nerve growth factor release. **Glia**, v. 59, n. 12, p. 1822-40, Dec 2011. ISSN 0894-1491.
- ALENCAR, É. D. N. Avaliação da atividade antimicrobiana de sistemas emulsionados contendo óleos naturais para o tratamento de infecções cutâneas. **Universidade Federal do Rio Grande do Norte**, 2013. Disponível em: < <http://repositorio.ufrn.br:8080/jspui/handle/123456789/13490> >.
- ALLEN, N. J.; EROGLU, C. Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. **Neuron**, v. 96, n. 3, p. 697-708, Nov 1 2017. ISSN 0896-6273.
- ALMEIDA, A. C.; SOBRINHO, E. M.; PINHO, L.; SOUZA, P. N. S.; MARTINS, E. R.; DUARTE, E. R.; SANTOS, H. O.; BRANDIL, I. V.; CANGUSSU, A. S.; COSTA, J. P. R. Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e bártimo e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n.1, p. 200-203, 2009.
- AMIEL, E. et al. beta-Caryophyllene, a Compound Isolated from the Biblical Balm of Gilead (*Commiphora gileadensis*), Is a Selective Apoptosis Inducer for Tumor Cell Lines. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 872394, 2012. ISSN 1741-427x.
- ANGELONI, C. et al. Bioactivity of Olive Oil Phenols in Neuroprotection. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 11, Oct 25 2017. ISSN 1422-0067.
- ARUMUGAM, T. V. et al. Intravenous immunoglobulin (IVIG) protects the brain against experimental stroke by preventing complement-mediated neuronal cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 35, p. 14104, 2007. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/104/35/14104.abstract> >.
- ASTRUP, J.; SIESJO, B. K.; SYMON, L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. **Stroke**, v. 12, n. 6, p. 723-5, Nov-Dec 1981. ISSN 0039-2499 (Print) 0039-2499.
- BASILE, A. C. et al. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *Copaifera*. **J Ethnopharmacol**, v. 22, n. 1, p. 101-9, Jan 1988. ISSN 0378-8741 (Print)
- BIAVATTI, M. W. et al. Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 230-235, 2006. ISSN 0102-695X. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2006000200017&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2006000200017&nrm=iso) >.
- BLIGHT, A. R.; DECRESCITO, V. Morphometric analysis of experimental spinal cord injury in the cat: the relation of injury intensity to survival of myelinated axons. **Neuroscience**, v. 19, n. 1, p. 321-41, Sep 1986. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522.



BLIGHT, A. R. et al. The effects of 4-aminopyridine on neurological deficits in chronic cases of traumatic spinal cord injury in dogs: a phase I clinical trial. **J Neurotrauma**, v. 8, n. 2, p. 103-19, Summer 1991. ISSN 0897-7151 (Print) 0897-7151.

BU, Y. et al. Neuroprotective effect of tyrosol on transient focal cerebral ischemia in rats. **Neurosci Lett**, v. 414, n. 3, p. 218-21, Mar 13 2007. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940.

CARDOSO, M.M.; FRANCO, E.C.S.; SOUZA, C.C.; SILVA, M.C.; GOUVÊIA, A.; GOMES-LEAL, W. Minocycline Treatment and Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation After Endothelin-1 Induced Striatal Ischemia. **Inflammation**, v. 36, p. 197-205, 2013.

CARVALHO, WA.; BAHIA, CP.; TEIXEIRA, JC.; GOMES-LEAL, W; PEREIRA, A. Interlimb Dynamic after Unilateral Focal Lesion of the Cervical Dorsal Corticospinal Tract with Endothelin-1. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 11, p. 0.0-0.0, 2017. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00089>

CHEN, L.; GAO, X. The application of nanoparticles for neuroprotection in acute ischemic stroke. **Ther Deliv**, v. 8, n. 10, p. 915-928, Oct 2017. ISSN 2041-5990.

CHENG, Y. C. et al. Cocaine Use and Risk of Ischemic Stroke in Young Adults. **Stroke**, v. 47, n. 4, p. 918-22, Apr 2016. ISSN 0039-2499.

COOK, D. J.; TEVES, L.; TYMIANSKI, M. A translational paradigm for the preclinical evaluation of the stroke neuroprotectant Tat-NR2B9c in gyrencephalic nonhuman primates. **Sci Transl Med**, v. 4, n. 154, p. 154ra133, Oct 3 2012. ISSN 1946-6234.

COOK, D. J.; TYMIANSKI, M. Nonhuman primate models of stroke for translational neuroprotection research. **Neurotherapeutics**, v. 9, n. 2, p. 371-9, Apr 2012. ISSN 1878-7479.

DEUS, R. J. A.; ALVES, C. N.; ARRUDA, M. S. P. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 01-07, 2011. ISSN 1516-0572. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-05722011000100001&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722011000100001&nrm=iso) >.

DIJKSTRA CD, VAN VLIET E, DOPP EA, VAN DER LELIJ AA, KRAAL G. Marginal zone macrophages identified by a monoclonal antibody: characterization of immuno- and nzyme-histochemical properties and functional capacities. **Immunology**, v. 55, p.:23-30, 1985.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends Neurosci**, v. 22, n. 9, p. 391-7, Sep 1999. ISSN 0166-2236 (Print) 0166-2236.

DOS SANTOS, A. O. et al. Copaiba Oil: An Alternative to Development of New Drugs against Leishmaniasis. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, 2012. ISSN 1741-427X (Print).

DUAN, J. et al. Neuroprotective effect of Apelin 13 on ischemic stroke by activating AMPK/GSK-3 $\beta$ /Nrf2 signaling. **Journal of Neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 24, 2019/02/01 2019. ISSN 1742-2094. Disponível em: < <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1406-7> >.

DWYER, J. D. The Central American, West Indian, and South American Species of Copaifera (Caesalpiniaceae). **Brittonia**, v. 7, n. 3, p. 143-172, 1951. ISSN 0007196X, 1938436X. Disponível em: < <http://www.jstor.org/stable/2804703> >.

FRANCO, E. C. et al. Modulation of microglial activation enhances neuroprotection and functional recovery derived from bone marrow mononuclear cell transplantation after cortical ischemia. **Neurosci Res**, v. 73, n. 2, p. 122-32, Jun 2012. ISSN 0168-0102.

FUXE, K. et al. Endothelin-1 induced lesions of the frontoparietal cortex of the rat. A possible model of focal cortical ischemia. **Neuroreport**, v. 8, n. 11, p. 2623-9, Jul 28 1997. ISSN 0959-4965 (Print) 0959-4965.

GAGE, G. J.; KIPKE, D. R.; SHAIN, W. Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. **J Vis Exp**, n. 65, 2012.

GOMES NDE, M. et al. Antineoplastic activity of Copaifera multijuga oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. **J Ethnopharmacol**, v. 119, n. 1, p. 179-84, Sep 2 2008. ISSN 0378-8741 (Print)

GOMES, N. M. et al. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **J Ethnopharmacol**, v. 109, n. 3, p. 486-92, Feb 12 2007. ISSN 0378-8741 (Print)

GONZALEZ-CORREA, J. A. et al. Dietary virgin olive oil reduces oxidative stress and cellular damage in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. **Lipids**, v. 42, n. 10, p. 921-9, Oct 2007. ISSN 0024-4201 (Print)

GRIVICICH, Ivana et al. Morte celular por apoptose. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GUIMARAES-SANTOS, A. et al. Copaiba oil-resin treatment is neuroprotective and reduces neutrophil recruitment and microglia activation after motor cortex excitotoxic injury. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 918174, 2012. ISSN 1741-4288 (Electronic)

GUIMARÃES-SANTOS, A. et al. Copaiba oil-resin treatment is neuroprotective and reduces neutrophil recruitment and microglia activation after motor cortex excitotoxic injury. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2012, p. 918174-918174, 2012. ISSN 1741-4288 1741-427X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3291111/> >.

GUZIK, A.; BUSHNELL, C. Stroke Epidemiology and Risk Factor Management. **Continuum (Minneapolis)**, v. 23, n. 1, Cerebrovascular Disease, p. 15-39, Feb 2017. ISSN 1080-2371.

HEISS, W. D.; ROSNER, G. Functional recovery of cortical neurons as related to degree and duration of ischemia. **Ann Neurol**, v. 14, n. 3, p. 294-301, Sep 1983. ISSN 0364-5134 (Print) 0364-5134.

HURN, P. D. et al. T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 27, n. 11, p. 1798-805, Nov 2007. ISSN 0271-678X (Print).

IADECOLA, C.; ALEXANDER, M. Cerebral ischemia and inflammation. **Curr Opin Neurol**, v. 14, n. 1, p. 89-94, Feb 2001. ISSN 1350-7540 (Print)

ITOH, K. et al. Magnesium sulfate protects oligodendrocyte lineage cells in a rat cell-culture model of hypoxic-ischemic injury. **Neurosci Res**, v. 106, p. 66-9, May 2016. ISSN 0168-0102.

JICKLING, G. C. et al. Targeting neutrophils in ischemic stroke: translational insights from experimental studies. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 35, n. 6, p. 888-901, Jun 2015. ISSN 0271-678x.

JUAN, C. K. et al. Stroke and Hypertension in Children and Adolescents. **Journal of Child Neurology**, v. 32, n. 4, p. 408-417, 2017/03/01 2016. ISSN 0883-0738. Disponível em: < <https://doi.org/10.1177/0883073816685240> >. Acesso em: 2018/02/20.

KIRKCALDIE, M. T. K. Chapter 4 - Neocortex A2 - Watson, Charles. In: PAXINOS, G. e PUELLES, L. (Ed.). **The Mouse Nervous System**. San Diego: Academic Press, 2012. p. 52-111. ISBN 978-0-12-369497-3.

KOIZUMI, S.; HIRAYAMA, Y.; MORIZAWA, Y. M. New roles of reactive astrocytes in the brain; an organizer of cerebral ischemia. **Neurochem Int**, Feb 2 2018. ISSN 0197-0186.

KRIEGER, D. W.; YENARI, M. A. Therapeutic Hypothermia for Acute Ischemic Stroke. **Stroke**, v. 35, n. 6, p. 1482, 2004. Disponível em: < <http://stroke.ahajournals.org/content/35/6/1482.abstract> >.

KURISU, K.; YENARI, M. A. Therapeutic hypothermia for ischemic stroke; pathophysiology and future promise. **Neuropharmacology**, Aug 19 2017. ISSN 0028-3908.

LAKHAN, S. E.; KIRCHGESSNER, A.; HOFER, M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. **J Transl Med**, v. 7, p. 97, Nov 17 2009. ISSN 1479-5876.

LAMB, J. A.; RAJPUT, P. S.; LYDEN, P. D. Novel method for inducing rapid, controllable therapeutic hypothermia in rats using a perivascular implanted closed-loop cooling circuit. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 267, p. 55-61, 2016/07/15/ 2016. ISSN 0165-0270. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165027016300632> >.

LEE, H.-K. et al. Anti-inflammatory and anti-excitotoxic effects of diethyl oxopropanamide, an ethyl pyruvate bioisoster, exert robust neuroprotective effects in the postischemic brain. **Sci-**

**entific reports**, v. 7, p. 42891-42891, 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC5318887/> >.

LIESZ, A. et al. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. **Nat Med**, v. 15, n. 2, p. 192-9, Feb 2009. ISSN 1078-8956.

LINGAM, I.; ROBERTSON, N. J. Magnesium as a Neuroprotective Agent: A Review of Its Use in the Fetus, Term Infant with Neonatal Encephalopathy, and the Adult Stroke Patient. **Dev Neurosci**, Feb 7 2018. ISSN 0378-5866.

LO, E. H.; DALKARA, T.; MOSKOWITZ, M. A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 5, p. 399-414, 05//print 2003. ISSN 1471-003X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1106> >.

LO, E. H.; DALKARA, T.; MOSKOWITZ, M. A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 5, p. 399-415, May 2003. ISSN 1471-003X (Print) 1471-003x.

LO, E. H.; MOSKOWITZ, M. A.; JACOBS, T. P. Exciting, radical, suicidal: how brain cells die after stroke. **Stroke**, v. 36, n. 2, p. 189-92, Feb 2005. ISSN 0039-2499.

LOPES, R.S.; CARDOSO, M.M.; SAMPAIO, A.O.; BARBOSA, M.S.; SOUZA, C.C.; DA SILVA, M.C.; FERREIRA, E.M.N.; FREIRE, M.A.M.; R.R.; GOMES-LEAL, W. Indomethacin treatment reduces microglia activation and increases numbers of neuroblasts in the sub-ventricular zone and ischaemic striatum after focal ischemia. **Journal of Biosciences**, v. 01, p. 1-10, 2016.

LOPEZ-NEBLINA, F.; TOLEDO, A. H.; TOLEDO-PEREYRA, L. H. Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. **J Invest Surg**, v. 18, n. 6, p. 335-50, Nov-Dec 2005. ISSN 0894-1939 (Print) 0894-1939.

LORENZETTI, H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Editora Plantarum**, 1992.

LUCAS, D. R.; NEWHOUSE, J. P. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. **AMA Arch Ophthalmol**, v. 58, n. 2, p. 193-201, Aug 1957. ISSN 0096-6339 (Print) 0096-6339.

MENDONÇA, D. E.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaiba - Copaifera multijuga Hayne (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 577-581, 2009. ISSN 0102-695X. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2009000400012&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2009000400012&nrm=iso) >.

MIGUEL, Laís Mourão. **Uso sustentável da biodiversidade na Amazônia Brasileira: experiências atuais e perspectivas das bioindústrias de cosméticos e fitoterápicos**. 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MOHAGHEGHI, F. et al. Dietary virgin olive oil reduces blood brain barrier permeability, brain edema, and brain injury in rats subjected to ischemia-reperfusion. **ScientificWorld-Journal**, v. 10, p. 1180-91, Jun 29 2010. ISSN 1537-744x.

MORIOKA, T.; KALEHUA, A. N.; STREIT, W. J. The microglial reaction in the rat dorsal hippocampus following transient forebrain ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 11, n. 6, p. 966-73, Nov 1991. ISSN 0271-678X (Print) 0271-678x.

MOSKOWITZ, M. A.; LO, E. H.; IADECOLA, C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. **Neuron**, v. 67, n. 2, p. 181-98, Jul 29 2010. ISSN 0896-6273.

NEUMANN, J. et al. Microglia provide neuroprotection after ischemia. **Faseb j**, v. 20, n. 6, p. 714-6, Apr 2006. ISSN 0892-6638.

NEUMANN, J. et al. Very-late-antigen-4 (VLA-4)-mediated brain invasion by neutrophils leads to interactions with microglia, increased ischemic injury and impaired behavior in experimental stroke. **Acta Neuropathol**, v. 129, n. 2, p. 259-77, Feb 2015. ISSN 0001-6322.

NGUEMENI, C. et al. Time course of neuronal death following endothelin-1 induced focal ischemia in rats. **J Neurosci Methods**, v. 242, p. 72-6, Mar 15 2015. ISSN 0165-0270.

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F.; HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, v. 308, n. 5726, p. 1314-8, May 27 2005. ISSN 0036-8075.

OWOLABI, M. et al. The epidemiology of stroke in Africa: A systematic review of existing methods and new approaches. **J Clin Hypertens (Greenwich)**, v. 20, n. 1, p. 47-55, Jan 2018. ISSN 1524-6175.

PARK, K.-R. et al.  $\beta$ -Caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. 2011. 178-88.

PLANAS, A. M.; CHAMORRO, A. Regulatory T cells protect the brain after stroke. **Nature Medicine**, v. 15, p. 138, 02/01/online 2009. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nm0209-138> >.

POPA-WAGNER, A. et al. Present Status and Future Challenges of New Therapeutic Targets in Preclinical Models of Stroke in Aged Animals with/without Comorbidities. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 2, Jan 25 2018. ISSN 1422-0067.

PRILLER, J. et al. Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. **Nat Med**, v. 7, n. 12, p. 1356-61, Dec 2001. ISSN 1078-8956 (Print) 1078-8956.

PROPHET, Edna B. **Laboratory methods in histotechnology**. Amer Registry of Pathology, 1992.

RABIEI, Z.; BIGDELI, M. R.; RASOULIAN, B. Neuroprotection of dietary virgin olive oil on brain lipidomics during stroke. **Curr Neurovasc Res**, v. 10, n. 3, p. 231-7, Aug 2013. ISSN 1567-2026.

RAO, V. L.; BOWEN, K. K.; DEMPSEY, R. J. Transient focal cerebral ischemia down-regulates glutamate transporters GLT-1 and EAAC1 expression in rat brain. **Neurochem Res**, v. 26, n. 5, p. 497-502, May 2001. ISSN 0364-3190 (Print) 0364-3190.

RIBEIRO, I. J. S. et al. Determinants of Stroke in Brazil: A Cross-Sectional Multivariate Approach from the National Health Survey. **J Stroke Cerebrovasc Dis**, v. 27, n. 6, p. 1616-1623, Jun 2018. ISSN 1052-3057.

RODRIGO, R. et al. Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 12, n. 5, p. 698-714, Aug 2013. ISSN 1871-5273.

ROTHMAN, S. M. The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx. **J Neurosci**, v. 5, n. 6, p. 1483-9, Jun 1985. ISSN 0270-6474 (Print) 0270-6474.

RUHNAU, J. et al. Thrombosis, Neuroinflammation, and Poststroke Infection: The Multifaceted Role of Neutrophils in Stroke. **J Immunol Res**, v. 2017, p. 5140679, 2017. ISSN 2314-7156.

SACHETTI, C. G.; FASCINELI, M. L.; SAMPAIO, J L.; LAMEIRA, O. A.; CASLDAS, E. D. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmagnosia**, São Paulo, v. 19, n. 4, -, 937-941, 2009.

SACHETTI, C. G.; FASCINELI, M. L.; SAMPAIO, J L.; LAMEIRA, O. A.; CASLDAS, E. D. Development toxicity os copaiba tree (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae) oleoresin in rat. *Food Chemical Toxicology, Oxford*, v.49, n.5, p. 1080-1085, 2011.

SALAZAR, M.A.R.; COSTA, .V. ; URBINA, G.R.O. ; CUNHA, V.M.B.; SILVA, M.P.; BEZERRA, P.N.; PINHEIRO, W.B.S.; GOMES-LEAL, W.; LOPES, A.S.; CARVALHO JUNIOR, R.N. Chemical composition, antioxidant activity, neuroprotective and anti-inflammatory effects of cipó-pucá ( *Cissus sicyoides* L.) extracts obtained from supercritical extraction. **JOURNAL OF SUPERCRITICAL FLUIDS**, v. 138, p. 36-45, 2018.

SCHNELL, L. et al. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. **Eur J Neurosci**, v. 11, n. 10, p. 3648-58, Oct 1999. ISSN 0953-816X (Print) 0953-816x.

SHEKHAR, S. et al. Menopause and Ischemic Stroke: A Brief Review. **MOJ Toxicol**, v. 3, n. 4, 2017. ISSN 2379-6294 (Print) 2379-6294.

SHICHITA, T. et al. Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury. **Nat Med**, v. 15, n. 8, p. 946-50, Aug 2009. ISSN 1078-8956.

SILVA, H. H. G. D. et al. Larvicidal activity of oil-resin fractions from the Brazilian medicinal plant *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae-Caesalpinoideae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 264-267, 2007. ISSN 0037-8682. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822007000300002&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822007000300002&nrm=iso) >.

SIMON, R. P. et al. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. **Science**, v. 226, n. 4676, p. 850-2, Nov 16 1984. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075.

SORDO, L. et al. Cocaine use and risk of stroke: a systematic review. **Drug Alcohol Depend**, v. 142, p. 1-13, Sep 1 2014. ISSN 1879-0046 (Electronic) 0376-8716 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25066468> >. Acesso em: 2018/02/20.

SOUZA, A. B. et al. Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. **Phytother Res**, v. 25, n. 2, p. 215-20, Feb 2011. ISSN 0951-418x.

SOUZA, C.C.; SILVA, M.C.; LOPES, R.T.; CARDOSO, M.M.; SOUZA, L.L.; SANTOS, A.G.; SANTOS, I.R.; FRANCO, E.C.S.; GOMES-LEAL, W. Comparative Therapeutic Effects of Minocycline Treatment and Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation following Striatal Stroke. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1-16, 2017.

SOUZA-RODRIGUES, R. D. et al. Inflammatory response and white matter damage after microinjections of endothelin-1 into the rat striatum. **Brain Res**, v. 1200, p. 78-88, Mar 20 2008. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993.

STANDRING, S. **Gray's anatomy : the anatomical basis of clinical practice**. 2016. ISBN 9780702052309 0702052302 9780702063060 0702063061.

STEINLIN, M. Neuroinflammation in Ischemic Pediatric Stroke. **Semin Pediatr Neurol**, v. 24, n. 3, p. 201-206, Aug 2017. ISSN 1071-9091.

STIRLING, D. P. et al. Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury. **J Neurosci**, v. 24, n. 9, p. 2182-90, Mar 3 2004. ISSN 0270-6474.

SZYDŁOWSKA, K.; TYMIANSKI, M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. **Cell Calcium**, v. 47, n. 2, p. 122-9, Feb 2010. ISSN 0143-4160.

TAGAYA, M. et al. DNA scission after focal brain ischemia. Temporal differences in two species. **Stroke**, v. 28, n. 6, p. 1245-54, Jun 1997. ISSN 0039-2499 (Print)

UHL, B. et al. Tissue plasminogen activator promotes postischemic neutrophil recruitment via its proteolytic and nonproteolytic properties. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 34, n. 7, p. 1495-504, Jul 2014. ISSN 1079-5642.

VAN DER WORP, H. B. et al. Hypothermia in animal models of acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis. **Brain**, v. 130, n. Pt 12, p. 3063-74, Dec 2007. ISSN 0006-8950.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, p. 273-286, 2002. ISSN 0100-4042. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422002000200016&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000200016&nrm=iso) >.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005. ISSN 0100-4042. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422005000300026&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000300026&nrm=iso) >.

W. OLNEY, J.; DE GUBAREFF, T. Glutamate neurotoxicity and Huntington's Chorea. 1978. 557-9.

WANG, Q.; TANG, X. N.; YENARI, M. A. The inflammatory response in stroke. **J Neuroimmunol**, v. 184, n. 1-2, p. 53-68, Mar 2007. ISSN 0165-5728 (Print)

WEINSTEIN, J. R.; KOERNER, I. P.; MÖLLER, T. Microglia in ischemic brain injury. **Future neurology**, v. 5, n. 2, p. 227-246, 2010. ISSN 1479-6708 1748-6971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2853969/> >.

WESTOVER, A. N.; HALM, E. A. Do prescription stimulants increase the risk of adverse cardiovascular events?: A systematic review. **BMC Cardiovasc Disord**, v. 12, p. 41, Jun 9 2012. ISSN 1471-2261.

XING, Y. et al. The beneficial role of early exercise training following stroke and possible mechanisms. **Life Sci**, Feb 13 2018. ISSN 0024-3205.

YENARI, M. et al. Metabolic Downregulation. **Stroke**, v. 39, n. 10, p. 2910, 2008. Disponível em: < <http://stroke.ahajournals.org/content/39/10/2910.abstract> >.

YILMAZ, G. et al. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. **Circulation**, v. 113, n. 17, p. 2105-12, May 2 2006. ISSN 0009-7322.

YRJANHEIKKI, J. et al. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 23, p. 13496-500, Nov 9 1999. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

ZHANG, H. et al. 5 - Molecular and Cellular Mechanisms of Ischemia-Induced Neuronal Death A2 - Grotta, James C. In: ALBERS, G. W.; BRODERICK, J. P., et al (Ed.). **Stroke (Sixth Edition)**. London: Elsevier, 2016. p.60-79.e5. ISBN 978-0-323-29544-4.



ZHAO, X. et al. Microglial interactions with the neurovascular system in physiology and pathology. **Dev Neurobiol**, Jan 10 2018. ISSN 1932-8451.

ZHU, X. et al. A Role of Endogenous Progesterone in Stroke Cerebroprotection Revealed by the Neural-Specific Deletion of Its Intracellular Receptors. **J Neurosci**, v. 37, n. 45, p. 10998-11020, Nov 8 2017. ISSN 0270-6474.

## ANEXO

**PARECER 137-13**

**Projeto: EXTRATOS DE PLANTAS DA AMAZONIA E SEUS PRINCÍPIOS ATIVOS COMO AGENTES ANTI-INFLAMATORIOS E NEUROPROTETORES EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE ACIDENTE VASCULAR ENCEFALICO E TRAUMAS CRANIOENCEFALICO E DA MEDULA ESPINHAL**

**Coordenador: Prof. Dr. Wallace Gomes Leal**

**Area Temática: Neurociências**

**Vigência: 04/2014 a 04/2016**

**Nº no CEPAE-UFPA: 137-13**

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 3988/2011 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação (Ratos Wistar, N= 200) nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido.

As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 05 de março de 2013

  
Prof. Dr. Wallace Gomes Leal  
Presidente do CEPAE-UFPA