



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

JONABETO VASCONCELOS COSTA

**EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E NEUROPROTETORES DO
EXTRATO DE CIPÓ-PUCÁ (*Cissus verticillata*) APÓS ISQUEMIA
FOCAL INDUZIDA POR MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1 (ET-1)
NO CÓRTEX MOTOR DE RATOS ADULTOS.**

**BELÉM - PARÁ
2018**

JONABETO VASCONCELOS COSTA

**EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E NEUROPROTETORES DO
EXTRATO DE CIPÓ-PUCÁ (*Cissus verticillata*) APÓS ISQUEMIA
FOCAL INDUZIDA POR MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1 (ET-1)
NO CÓRTEX MOTOR DE RATOS ADULTOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de mestre em Neurociências e Biologia Celular, sob orientação do Prof. Dr. Wallace Gomes Leal.

**BELÉM - PA
2018**

-
- C837e COSTA-VASCONCELOS, JONABETO VASCONCELOS COSTA.
EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E NEUROPROTETORES DO EXTRATO DE CIPÓ-PUCÁ
(*Cissus verticillata*) APÓS ISQUEMIA FOCAL INDUZIDA POR MICROINJEÇÕES DE
ENDOTELINA-1 (ET-1) NO CÓRTEX MOTOR DE RATOS ADULTOS / JONABETO
VASCONCELOS COSTA COSTA-VASCONCELOS. — 2018.
73 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof. Dr. WALLACE GOMES LEAL GOMES LEAL
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia celular,
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.
1. Acidente vascular encefálico. 2. cipó cupá. 3. anti-inflamatório. 4. Endotelina 1. 5. Córtex
motor. I. Título.

CDD 616.8

JONABETO VASCONCELOS COSTA

**EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E NEUROPROTETORES DO
EXTRATO DE CIPÓ-PUCÁ (*Cissus verticillata*) APÓS ISQUEMIA
FOCAL INDUZIDA POR MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1 (ET-1)
NO CÓRTEX MOTOR DE RATOS ADULTOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de mestre em Neurociências e Biologia Celular, sob orientação do Prof. Dr. Wallace Gomes Leal.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. **Wallace Gomes Leal**, UFPA.
(Presidente da banca examinadora, sem direito a voto).



Prof.^a Dra. **Vânia Castro Correa**, UFPA.
(Membro Titular)



Prof. Dr. **Geiso Rafael Fonseca Oliveira**, UNIFESSPA
(Membro Titular)

Prof. Dr. **Rafael Rodrigues Lima**, UFPA.
(Membro Suplente)

*Aos meus pais **João** e **Nazaré**,*

*À minha esposa **Márcia** e filhos **Laura**, **João** e **Eduardo**.*

Essa conquista é nossa!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo que vivenciei e aprendi esses anos na pós-graduação.

Ao Professor Wallace pela orientação em todas as fases deste trabalho, pela compreensão e formação científica por mim adquirida.

Ao professor Raul pela colaboração nas análises, ao colega Botelho e toda equipe do laboratório de extração pela ajuda.

À professora Vânia, Ênio e Adriano pelas orientações e sugestões e ao professor Rafael pelo aceite ao convite.

Aos meus colegas de laboratório, em especial ao Ijair, amigo e companheiro sempre, Michelle, Carol, Rodrigo, Iury, Amanda, Lucas, Adriano, Nelson, Mozaniel, Rafael, Marielba e todos aqueles que colaboraram, por todos os momentos e conhecimentos compartilhados.

Ao meu amigo Reginaldo e toda a equipe do biotério, em especial o sr. Amarido, Irmão e Sérgio pelo suporte e apoio essencial.

A todos os professores da pós-graduação, em especial aqueles que mais convivi e aprendi nestes anos, professor Rafael Lima, Carlomagno, Gilmara, Manoel Filho e Antônio Pereira, meu muito obrigado pelo conhecimento compartilhado.

A senhora Socorro e toda sua equipe da secretária do programa, pelo apoio e orientação nas horas duvidosas.

À Márcia, pela presença, amor e compreensão em todos os momentos de ausência.

Aos meus queridos filhos, pela dedicação na família em minha ausência.

Aos meus queridos irmãos Jonaelson e Najomary e cunhado Geraldo, pela paciência e ajuda nestes anos.

Aos meus pais, pelo amor, pelas as orações e formação em toda a vida. O carinho, a orientação e as virtudes por vocês passados, sempre foram meus pilares na busca do crescimento intelectual e humano.

RESUMO

A resposta inflamatória pode exacerbar o processo lesivo após desordens neurais agudas como no acidente vascular encefálico. Alternativas de se obter uma diminuição na resposta inflamatória no acidente celular encefálico vem sendo amplamente estudada com o uso de compostos fitoterápicos, nesta hipótese o cipó pucá (*Cissus verticillata*), uma planta medicinal amazônica popularmente utilizada como anti-inflamatório e anti-hipoglicêmico vem sendo utilizada pela medicina popular no tratamento de doenças agudas inflamatórias. Entretanto, não existem investigações sobre os possíveis efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores do extrato da planta em modelos experimentais de desordens neurais agudas. Neste estudo, investigou-se os efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores do extrato da planta por extração supercrítica em ratos adultos submetidos a lesão aguda induzida por endotelina-1 (ET-1) no córtex motor. Dois grupos experimentais foram delineados: O primeiro com animais do grupo controle com um tempo de sobrevida de vinte e quatro horas e de sete dias (Grupo N= 3 para cada tempo de sobrevida), submetidos a isquemia focal com ET-1, porém injetados apenas solução salina e tween 5% via intraperitoneal (i.p), e o segundo grupo de animais tratados com doses de 100 mg/Kg (i.p) de extrato da planta logo após a cirurgia com os mesmos tempos de sobrevida (Grupo N=5 para cada tempo de sobrevida). Em seguida perfundidos vinte quatro horas e sete dias após a indução da lesão isquêmica. A análise histopatológica geral foi realizada em secções coradas pela violeta de cresila e hematoxilina. Neutrófilos e macrófagos foram identificados por imunoistoquímica com anticorpos específicos (anti-MBS1 e IBA-1, respectivamente), astrócitos marcados com anticorpo anti-GFAP. Realizou-se contagem microglia/macrófagos ativados e corpos neuronais nos grupos experimentais mencionados e avaliou-se a atividade de astrócitos após a lesão. O tratamento com o extrato de *Cissus verticillata* induziu efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores nos animais tratados, bem como a diminuição da cavitação tecidual, ativação de astrócitos no centro da lesão e diminuição de infiltrado de células inflamatórias polimorfonucleares e/ou microglia/macrófago.

Palavras-chave: Acidente vascular encefálico, cipó cupá, anti-inflamatório, Endotelina 1, Córtex motor.

ABSTRACT

The inflammatory response may exacerbate the damaging process after acute neural disorders such as in stroke. Alternatives to obtain a decrease in the inflammatory response in the encephalic cell accident have been widely studied with the use of herbal compounds, in this hypothesis the pucá cucó (*Cissus verticillata*), an Amazonian medicinal plant popularly used as anti-inflammatory and antihyperglycemic used by folk medicine in the treatment of acute inflammatory diseases. However, there are no investigations into the possible anti-inflammatory and neuroprotective effects of plant extract in experimental models of acute neural disorders. In this study, we investigated the anti-inflammatory and neuroprotective effects of plant extract by supercritical extraction in adult rats submitted to acute injury induced by endothelin-1 (ET-1) in the motor cortex. Two experimental groups were delineated: the first with animals of the control group with a survival time of twenty-four hours and seven days (Group N = 3 for each survival time), submitted to focal ischemia with ET-1, but injected 5% tween intraperitoneal (ip), and the second group of animals treated with doses of 100 mg / kg (ip) of plant extract after surgery with the same survival times (Group N = 5 for each survival time). Then perfused twenty four hours and seven days after induction of ischemic injury. General histopathological analysis was performed in sections stained by cresyl violet and hematoxylin. Neutrophils and macrophages were identified by immunohistochemistry with specific antibodies (anti-MBS1 and IBA-1, respectively), astrocytes labeled with anti-GFAP antibody. Activated microglia/macrophages and neuronal bodies were counted in the mentioned experimental groups and the astrocyte activity after the lesion was evaluated. Treatment with *Cissus verticillata* extract induced anti-inflammatory and neuroprotective effects in treated animals, as well as decreased tissue cavitation, astrocyte activation at the center of the lesion and decreased infiltration of polymorphonuclear and/or microglia/macrophage inflammatory cells.

Key-Words: Stroke, cipó cupá, anti-inflammatory, endothelin 1, motor cortex.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Núcleo e penumbra isquêmica após o AVE. Desde o aparecimento do déficit de perfusão sanguínea, tanto no núcleo quanto na penumbra o dinamismo da lesão progride no espaço e no tempo, o qual, na maioria dos casos resulta no aumento da área lesionada. Núcleo isquêmico (em azul); penumbra isquêmica (em verde).....	16
Figura 02	Desenho esquemático dos eventos envolvidos no processo de estresse oxidativo durante a progressão do acidente vascular encefálico (AVE).	20
Figura 03	Representação de um encéfalo isquêmico e os principais compostos mediadores de inflamação e morte celular programada (apoptose).....	24
Figura 04	Ativação das microglias após AVE isquêmico	29
Figura 05	Processos celulares dos astrócitos em resposta a lesão isquêmica.	31
Figura 06	Gráfico cartesiano, mostrando a progressão dos eventos relacionados à progressão da lesão após o AVE	33
Figura 07	<i>Cissus verticillata</i> (L.) Nicolson and C.E. Jarvis, aspectos das folhas, flores e fruto.....	35
Figura 08	Estação supercrítica LABEX-UFPA.....	38
Figura 09	HPTLC do extrato de <i>Cissus verticillata</i>	46
Figura 10	Histopatologia básica revelada pela coloração por Hematoxilina ...	48

Figura 11	Histopatologia básica revelada pela coração com violeta de cresila.....	48
Figura 12	Recrutamento de neutrófilos 24 horas após a lesão isquêmica.....	49
Figura 13	Reatividade de astrócitos após lesão isquêmica focal.....	50
Figura 14	Recrutamento de microglia/magrofágo após lesão isquêmica focal.	52
Figura 15	Visualização de corpos neuronais em animais tratados com 100 mg/Kg de extrato de <i>C. verticillata</i>	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA	α -amino-3- hidroxi-5-metil-4-propionato
ATP	Adenosina trifosfato
AVE	Acidente vascular encefálico
APAF-1	Moléculas pró-apoptóticas citoplasmáticas
BHE	Barreira hematoencefalica
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
Cito C	Citocromo C
COX	Ciclooxigenase
COX- 2	Ciclooxigenase- 2
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EtOH	Etanol
eNOS	Óxido nítrico endotelial sintase
GDNF	Fator neurotrófico derivado de células gliais
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GAE	Equivalente de ácido gálico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPTLC	Cromatografia de camada fina de alto desempenho
ICAM- 1 e 2	Moléculas de adesão intracelular 1 e 2
IL-1	Interleucina- 1
IL- 1 β	Interleucina-1 beta
IL-1ra	Receptor antagonista da Interleucina-1 beta
IL-2	Interleucina- 2
IL-6	Interleucina- 6
IL-8	Interleucina- 8
IL-10	Interleucina- 10
iNOS	Oxido nítrico sintase induzida
IFN- γ	Interferon gama

MCP-1	Proteína quimioatrativa de monócitos
MHC I e II	Complexo principal de histocompatibilidade I e II
MMPs	Metaloproteinase da matriz
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato
NMDA	N-metil D-aspartato
NeuN	Proteína nuclear específica de neurônios
OACM	Oclusão da artéria cerebral média
NO	Oxido Nítrico
NOS	Oxido nítrico sintase
NOSn	Oxido nítrico sintase neuronal
nm	Nanometros
(NF)-kb	Fator nuclear
OMS	Organização mundial de saúde
HO ⁻	Hidroxila
O ²⁻	Superóxido
PARP	Enzima poli (ADP-ribose) polimerase
PEG	polietilenoglicol 4000
pMols	Picomols
rt-PA	Ativador do plasminogênio tecidual recombinante
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNC	Sistema Nervo Central
TGF- β	Fator beta de crescimento transformador
TNF- α	Fator de Necrose tumoral alfa
T _{EC50}	Montante inicial do radical DPPH- em 50%
VCAM- 1	Moléculas de adesão vascular- 1
μ l	Microlitro
XO	xantina oxidase
ZO	<i>Zonula occludens</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Considerações gerais sobre o acidente vascular encefálico (AVE)	14
1.2. Consequências sobre o parênquima cerebral após o acidente vascular encefálico	17
1.2.1. Excitotoxicidade.....	17
1.2.2. Estresse oxidativo e nitrosativo	19
1.2.3. Ruptura da barreira hematoencefálica	20
1.2.4. Resposta inflamatória após o acidente vascular encefálico	22
1.2.4.1. Células polimorfonucleares	24
1.2.4.2. Linfócitos T	25
1.2.4.3. Células gliais (microglia/macrófagos)	26
1.2.4.3.1. Astrócitos	29
1.2.4. Apoptose	31
1.3. JUSTIFICATIVA	34
1.4. HIPÓTESE EXPERIMENTAL	35
1.5. OBJETIVOS.....	36
1.5.1. Objetivo geral.....	36
1.5.2. Objetivos específicos.....	36
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1. Caracterização da matéria prima	37
2.2. Fracionamento e isolamento do extrato	37
2.3.Cromatografia de camada fina de alto desempenho (HPTLC)	38
2.3.1. Compostos fenólicos totais (CFT)	39
2.3.2. Total de flavonoides (TF)	40
2.3.3. Atividade antioxidante	40
2.4. animais de experimentação	41
2.5. grupos experimentais	41
2.7. perfusão e processamento histológico.....	43
2.8. análise histopatológica e imunohistoquímica	43
2.8.1. Visualização da área de lesão	43

2.8.2. Imunohistoquímica	44
2.8.2.1. Neurônios	44
2.8.2.2. Células gliais	44
2.9. Análise qualitativa	44
2.10. Análise quantitativa	45
2.12. Análise estatística	45
3. RESULTADOS	46
3.1. Cromatografia de camada fina de alto desempenho (HPTLC)	46
3.2. Resposta inflamatória induzidas por endotelina-1 são minimizadas pelo tratamento com cipó cupá	47
3.2.1. Análise histológica da lesão isquêmica no córtex cerebral de ratos machos wistar após tratamento com extrato de cipó pucá (<i>cissus verticillata</i>)	47
3.2.2. Inibição do recrutamento de neutrófilos pelo tratamento com extrato de <i>cissus verticillata</i> após lesão focal do córtex motor.....	49
3.2.3. Distribuição e reatividade de astrócitos no centro e na região de penumbra da lesão isquêmica após microinjeções de endotelina-1	50
3.2.4. O tratamento com extrato de <i>cissus verticillata</i> reduz o recrutamento de microglia/macrófago após lesão focal do córtex motor.	51
3.2.5. O tratamento com extrato de <i>cissus verticillata</i> reduz a perda neuronal após lesão focal do córtex motor de ratos adultos.	53
4. DISCUSSÃO	55
5. CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais sobre acidente vascular encefálico

A organização mundial de saúde (OMS) define acidente vascular encefálico (AVE) como o surgimento súbito focal ou global de déficits da função neurológica de duração superior a 24 horas ou que leve a morte, cuja única causa reside na origem vascular (MARKUS, 2008; WOLFE, 2000).

O acidente vascular encefálico caracteriza-se como uma neuropatologia que atinge mais de quinze milhões de pessoas por ano em todo o planeta, sendo que um terço dos acometidos podem vir a óbito e/ou adquirem sequelas irreversíveis, tornando-os incapazes e dependentes de profissionais de saúde especializados ou de familiares (JOHNSTON; MENDIS; MATHERS, 2009; MOZAFFARIAN et al., 2015). As principais causas do AVE, em 80% dos acometidos, envolvem a obstrução de um vaso sanguíneo que irriga determinada região do parênquima cerebral, e geralmente ocorre por obstrução de um vaso sanguíneo por placas de ateroma, resultando no acidente vascular isquêmico (IADECOLA; ANRATHER, 2011b).

O acidente vascular encefálico isquêmico caracteriza-se por eventos patológicos complexos que duram algumas horas ou muitos dias (IADECOLA; ANRATHER, 2011b; WOODRUFF et al., 2011a). Resulta de uma redução permanente ou transitória no fluxo sanguíneo encefálico comumente causada pela oclusão de uma artéria cerebral, seja através de um êmbolo ou de uma trombose local, gerando isquemia e consequentemente lesão tecidual (IADECOLA; ANRATHER, 2011b; WOODRUFF et al., 2011a). A entrada de fluxo sanguíneo para área isquêmica ocorre através de anastomose de artérias adjacentes, que normalmente sofrem perfusão, em consequência do aumento da pressão arterial (LIEBESKIND, 2010). A maioria dos acidentes vasculares cerebrais isquêmicos não costumam causar oclusão completa do vaso e suprimento de sangue, no entanto, mesmo uma oclusão parcial para um período prolongado pode causar efeitos nocivos devido à deterioração do gradiente iônico e subprodutos como o ácido láctico e íons de hidrogênio do metabolismo anaeróbico (KARASZEWSKI et al., 2009).

Outra causa menos comum de acidente vascular encefálico é a ruptura do vaso sanguíneo com extravasamento de sangue no parênquima neural, constituindo-se o acidente vascular encefálico hemorrágico que representa cerca de quinze a vinte por cento dos casos (IADECOLA; ANRATHER, 2011b; PORCELLO MARRONE et al., 2013; WOODRUFF et al., 2011a). Em ambos os casos, a faixa etária mais acometida é de indivíduos acima de 50 anos de idade (NEDELTCHEV et al., 2005). Embora, tenha se observado um aumento na incidência de AVE em indivíduos jovens, por causas associadas a fatores de risco diferentes observados em indivíduos de maior idade, no entanto, estes fatores se ligam aos ricos vasculares ocasionais, como hipertensão, dislipidemia, diabetes e sobre peso (KISSELA et al., 2012)

Devido aos inúmeros casos, a Organização Mundial de Saúde (OMS) posiciona o Brasil como a sexta nação no mundo com maior índice de acidente vascular encefálico (MARRONE; MARRONE, 2013). Por conseguinte, em relação à América latina, os dados são ainda preocupantes, pois o maior percentual de casos registrados nessa área é contabilizado no Brasil, sendo que os padrões de tratamento e os estudos epidemiológicos relatados são de pesquisas publicadas isoladamente por cidades, portanto, dados não generalizados (CABRAL et al., 2009; GOULART et al., 2010; LOTUFO, 2005; MINELLI; FEN; MINELLI, 2007). Um estudo com pacientes acometidos com AVE isquêmico na cidade de Porto Alegre, RS, Brasil mostrou que a aterosclerose de grandes vasos seguidos por cardioembolismo, microangiopatia e etiologias desconhecidas representam a principal causa da doença (PORCELLO MARRONE et al., 2013).

Após acidente vascular encefálico, eventos bioquímicos complexos que duram algumas horas ou muitos dias são verificados no parênquima cerebral, resultando em ativação de substâncias que contribuem para exacerbação dos danos teciduais, formação de edema e morte celular (IADECOLA; ANRATHER, 2011b; WOODRUFF et al., 2011b). Neste ambiente, duas áreas são bem evidenciadas: uma central chamada núcleo isquêmico e outra periférica que recebe a denominação de penumbra isquêmica (Fig. 1) (PEKNY, MILOS; WILHELMSSON; PEKNA, 2014; VANNUCCI et al., 2001; WISE et al., 2001). A gravidade do evento isquêmico é mais evidenciada no núcleo, região mais afetada do parênquima cerebral onde as células sofrem morte imediata, enquanto a área adjacente de penumbra isquêmica é parcialmente comprometida com possibilidades de recuperação (DEB; SHARMA; HASSAN, 2010). A obstrução do fluxo sanguíneo, a supressão no fornecimento de oxigênio e glicose,

impossibilita o cérebro de gerar o ATP (MOSKOWITZ; LO; IADECOLA, 2010). Na área da penumbra isquêmica os eventos deletérios são menos acentuados, ondas de despolarização conduzem a liberação de neurotransmissores, que em conjunto com os danos na diminuição da recaptação das células da glia, geram concentração excessivas de glutamato extracelular e outros neurotransmissores excitatórios alterando o ambiente em uma condição citotóxica (IADECOLA; ANRATHER, 2011b).

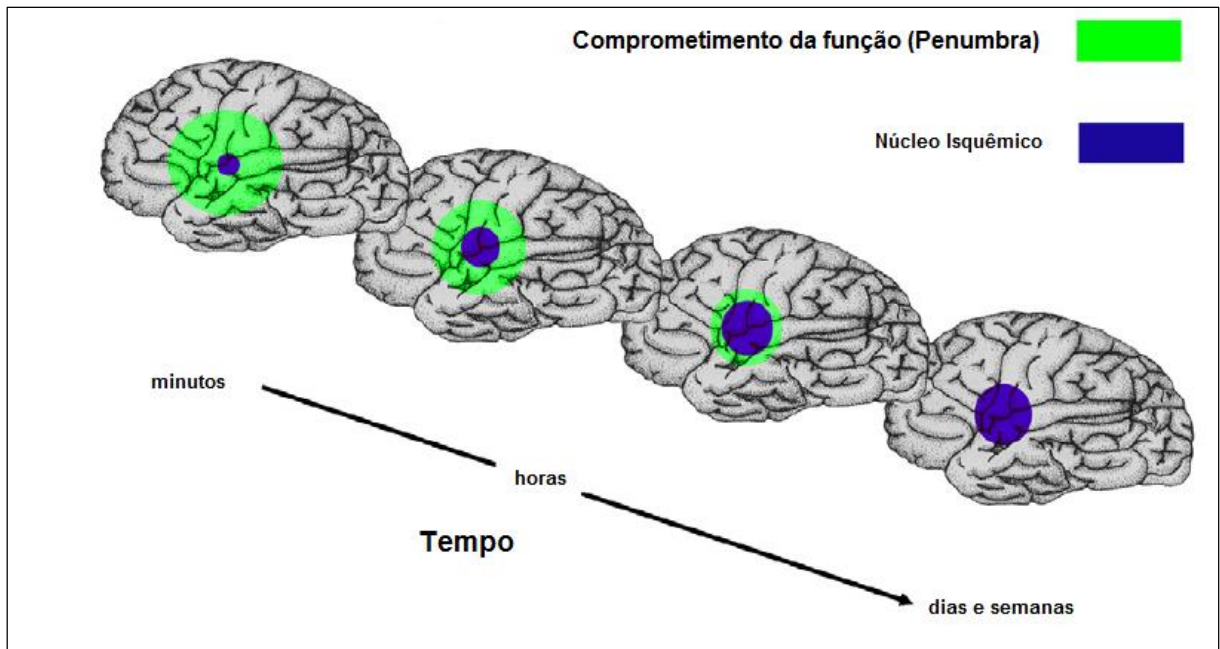


Figura 1. Núcleo e penumbra isquêmica após o acidente vascular encefálico. Tanto no núcleo quanto na penumbra o dinamismo da lesão progride no espaço e no tempo, resultando no aumento da área lesionada, resultando em um crescimento do núcleo comprometendo a área de penumbra, com terapia esta área pode se recuperar minimizando os sintomas no indivíduo. Núcleo isquêmico (em azul); penumbra isquêmica (em verde). Adaptado (KUNZ; DIRNAGL; MERGENTHALER, 2010).

Diversos modelos experimentais de isquemia cerebral em roedores e primatas não-humanos são utilizados em trabalhos científicos na busca de consistente avaliação e tratamento dessa patologia. Esses modelos procuram uma aproximação do padrão de lesão após isquemia, semelhante às encontradas em humanos que são imprevisíveis e de estudos clínicos de difícil interferência (ALKAYED et al., 1998; HOSSMANN, 1998; VANNUCCI et al., 2001), sendo o modelo mais utilizado o da oclusão da artéria cerebral média (OACM) (HOSSMANN, 1998).

A clínica médica aponta para a hipertensão, dislipidemia, obesidade, alcoolismo, tabagismo, diabetes e fatores relacionados à pré-disposição genética como sendo os principais fatores de risco à ocorrência do AVE (MOSKOWITZ et al., 2010). Independente da causa que resulta o acidente vascular encefálico, a progressão dos danos para a área lesionada está diretamente relacionada à:

excitotoxicidade, o estresse oxidativo e nitrosativo, a ruptura da barreira hematoencefálica, a resposta inflamatória e apoptose que culmina na lesão e morte celular (BROUNS; DE DEYN, 2009; DOYLE; SIMON; STENZEL-POORE, 2008; MARKUS, 2008; MOSKOWITZ et al., 2010)

1.2. Consequências sobre o parênquima cerebral após acidente vascular encefálico

A fisiopatologia do acidente vascular encefálico isquêmico é um evento extremamente complexo resulta em uma cascata bioquímica que termina em perdas de função e morte neuronal (DEB et al., 2010). A oclusão ou ruptura no vaso sanguíneo induz o colapso metabólico com alterações na fisiologia da membrana plasmática envolvendo alterações iônicas, inversões de bombas metabólicas que resultam em influxo excessivo de sódio e cálcio que culminarão em edema e morte celular tardia (IADECOLA; ANRATHER, 2011b; WOODRUFF et al., 2011a). A morte celular é uma consequência de diversos eventos patológicos incluindo excitotoxicidade, estresse oxidativo, despolarização periinfarto e neuroinflamação (CARDOSO et al., 2013; IADECOLA; ANRATHER, 2011a). A consequência mais acentuada da isquemia cerebral é o déficit energético, a redução do suprimento sanguíneo na área afetada, o consumo de ATP continua apesar de diminuição de sua síntese, causando queda nos níveis totais de ATP, ácido láctico e perda da homeostase iônica nos neurônios. Uma cascata de eventos bioquímicos e mecanismos multicelulares iniciam-se dando origem a eventos específicos que resultam em morte neuronal (CANDELARIO-JALIL, 2009; DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999).

1.2.1. Excitotoxicidade

Após o acidente vascular encefálico ocorre a instalação de eventos bioquímicos que ocasionam desequilíbrios no funcionamento de vias bem estabelecidas quando a rede neuronal está em pleno funcionamento (CHOI, 1988; MELDRUM et al., 1985). O resultado da ativação de receptores de glutamato causa excitotoxicidade e leva o acúmulo intracelular de Ca^{+2} , que desencadeia uma série de eventos nocivos, como, ativação de enzimas líticas, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e nitrosativo

(Fig. 2) (MOSKOWITZ et al., 2010). A isquemia provoca a sinalização de proteínas pro inflamatórias, disfunção mitocondrial e apoptose que contribuem para o aumento da lesão (IADECOLA; ANRATHER, 2011a). Com o aumento no influxo de cálcio inicia-se uma série de eventos citoplasmáticos e nucleares, ativação de radicais livres bem como enzimas proteolíticas que degradam proteínas do citoesqueleto e da matriz extracelular, fosfolipase A₂, endonucleases, ATP, ciclo oxigenase, óxido nítrico sintase, resultando em extenso dano celular (BROUNS; DE DEYN, 2009; CHEN; STRICKLAND, 1997; CHOI, 1995; FURUKAWA et al., 1997).

O glutamato é essencial para a plasticidade neuronal, no entanto, uma liberação descontrolada media a transmissão sináptica excitotóxica através da ativação de vias de N-metil- D -aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi 5-metil-4-isoxazolpropanóico (AMPA) permitindo o influxo de Na⁺ e Ca²⁺ (DEB et al., 2010). A falha na reabsorção do glutamato liberado na fenda pré-sináptica resulta no acúmulo desse neurotransmissor no local de lesão, podendo ocasionar danos secundários e/ou imediatos nessa área. Esse acúmulo de glutamato estende-se ao meio extracelular ocasionando a excitação excessiva de neurônios subsequentes ao centro de lesão pela ativação de vias de NMDA e AMPA que se relacionam ao influxo de Na⁺ e Ca²⁺, respectivamente (DEB et al., 2010). Alterações no fluxo desses íons após AVE contribuem à entrada de água resultando no edema citotóxico, bem como na ativação de endonucleases e liberação de radicais livres (MERGENTHALER; DIRNAGL; MEISEL, 2004). Especificamente, a ativação de endonucleases e a produção de radicais livres levam a morte celular por necrose induzida por mecanismo excitotóxico e apoptose (BROUNS; DE DEYN, 2009; CHEN; STRICKLAND, 1997; CHOI, 1995; FURUKAWA et al., 1997). Outros mecanismos de excitotoxicidade podem gerar eventos bioquímicos moleculares e induzir a célula a iniciar a apoptose, a ativação das vias de sinalização intracelular durante este evento bioquímico pode levar a expressão de genes que desencadeiam a inflamação pós-isquêmica contribuindo para o aumento da lesão (BROUNS; DE DEYN, 2009). Em estudos utilizando o modelo de oclusão da artéria cerebral média, demonstrou-se que o oxaloacetato é capaz de reduzir as concentrações de glutamato no sangue e no encéfalo, indicando um efeito neuroprotetor após isquemia cerebral (CAMPOS et al., 2012).

1.2.2. Estresse oxidativo e nitrosativo

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de radicais livres supera a capacidade de eliminação endógena de agentes celulares antioxidantes, moléculas reativas de oxigênio e nitrogênio, importantes mediadores de lesão tecidual no AVE isquêmico (LOVE, 1999). A produção mitocondrial em altos níveis intracelular de Ca^{+2} , Na^+ e ADP causam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), consideradas destrutivas para o encéfalo, por possuir níveis baixos de agentes antioxidantes, os neurônios são sensíveis e vulneráveis a este evento, assim como outras células (Fig. 2) (COYLE; PUTTFARCKEN, 1993; PRADEEP et al., 2012). Durante a isquemia ocorre o aumento da atividade de óxido nítrico sintase (NOS), responsável pela liberação do neurotransmissor excitatório glutamato nas fendas sinápticas, ativando os receptores de N-metil- D-aspartato (NMDA) elevando os níveis intracelulares de Ca^{2+} e podendo gerar a liberação de superóxidos entre outros produtos como subunidades constituintes da NADPH oxidase (NOX), xantina oxidase (XO), ciclo oxigenase (COX) e extravasamento de transportadores de elétrons mitocondriais dentre outros mecanismos (CHOI, 1995; IADECOLA et al., 1997; PRADEEP et al., 2012; SIESJO, 1988).

Em condições fisiológicas normais a rede neuronal elimina substâncias oxidantes endógenas produzidas em reações bioquímicas necessárias ao funcionamento do encéfalo (DOYLE et al., 2008). Na condição de AVE esse mecanismo se torna falho, e a perda da polaridade da membrana leva ao influxo de íons cálcio e sódio que se acumulam na célula modificando o funcionamento da mitocôndria que passa a produzir espécies reativas de oxigênio. Um desse produto de reação, após AVE, é o ânion superóxido (O^{2-}) bastante instável e, no citoplasma celular, liga-se aos prótons hidrogênicos formando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que sofre cisão liberando o radical hidroxila ($\text{OH}^{\cdot}$) (BECKMAN; KOPPENOL, 1996; NAKKA et al., 2008). Esses ânions são prejudiciais a parênquima cerebral lesionado por ativarem cascatas enzimáticas que destroem macromoléculas e levam à morte celular (COYLE; PUTTFARCKEN, 1993; PRADEEP et al., 2012).

O aumento na concentração do íon cálcio após AVE também eleva a produção de óxido nítrico (NO) que tem efeito deletério sobre neurônios e células gliais no ambiente isquêmico, ampliando mais a lesão (PRADEEP et al., 2012). O óxido nítrico é também um radical livre, durante a hipóxia isquêmica e são elevadas suas

concentrações. Na reperfusão e reoxigenação o NO pode ser catalisado por três enzimas, óxido nítrico neuronal sintase (nNOS), óxido nítrico induzível sintase (iNOS) e óxido nítrico endotelial sintase (eNOS) (SAMDANI; DAWSON; DAWSON, 1997). Essas enzimas são expressas no encéfalo por células endoteliais, astrócitos e neurônios e podem também induzir o perfil da microglia, pesquisas mostram que o eNOS apresenta uma melhora na reperfusão no encéfalo, demonstrando um possível efeito neuroprotetor (CIMINO et al., 2005; FAN et al., 2010).

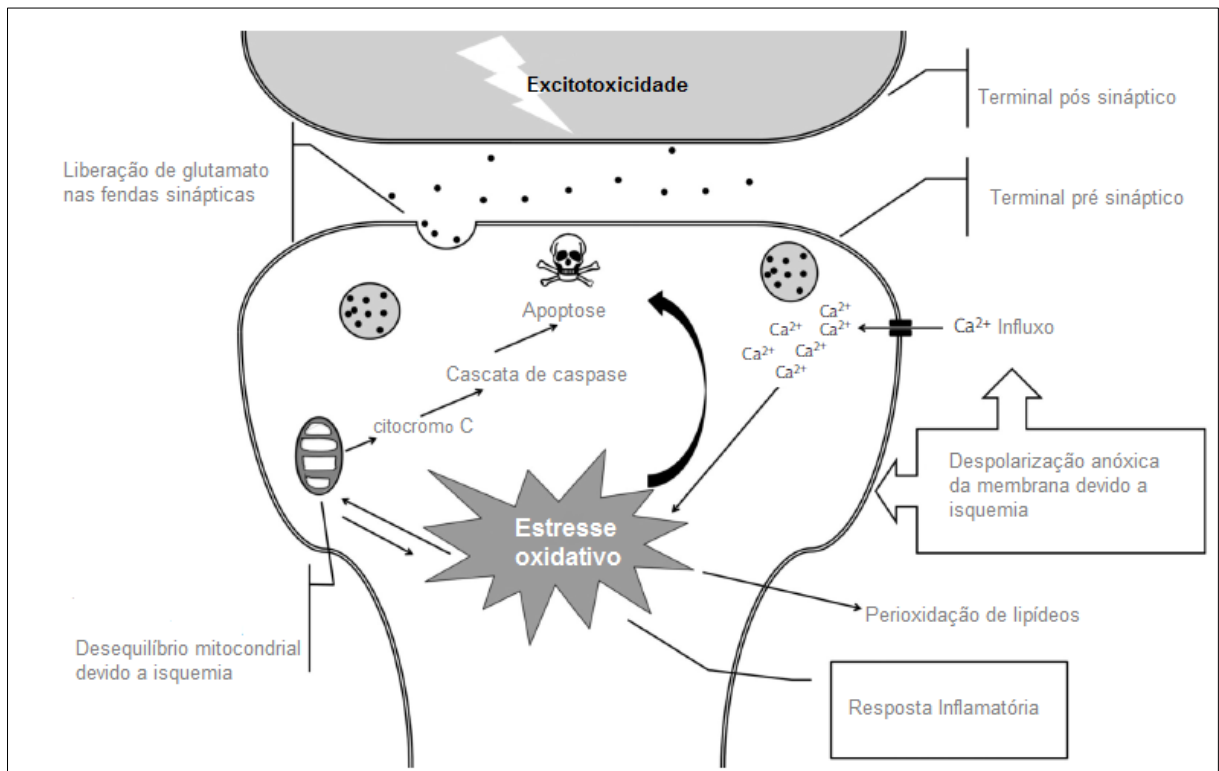


Figura 2 - Desenho esquemático dos eventos envolvidos no processo de estresse oxidativo durante a progressão do acidente vascular encefálico (AVE). O excesso de glutamato na fenda sináptica, aumenta o influxo de cálcio para o meio intracelular desencadeando a liberação de espécies reativas de oxigênio, iniciando o processo de estresse oxidativo. A liberação do citocromo C pela mitocôndria causa a ativação de caspases que levam a célula a iniciar o mecanismo de apoptose. Adaptado. (PRADEEP et al., 2012)

1.2.3. Ruptura da barreira hematoencefálica (BHE)

Constitui a barreira hematoencefálica: as junções de células endoteliais aderentes, pericito, astrócitos perivasculares, membrana basal e várias junções endoteliais aderentes. Essas últimas são as principais reguladoras da permeabilidade celular, sendo formadas por vários componentes proteicos, entre eles: proteínas

integrais de membrana (occludina, claudinas e moléculas de adesão juncionais) que se ligam ao citoesqueleto de actina e inúmeras proteínas citoplasmáticas acessórias, incluindo a *zonula occludens* (ZO), cingulina e outras proteínas como a guanilato quinase associadas a membrana (BAUER et al., 2010; HAWKINS; DAVIS, 2005; ZLOKOVIC, 2008).

A barreira hematoencefálica protege o microambiente neuronal, porém vários mecanismos contribuem para seu rompimento após o acidente vascular encefálico (BROUNS; DE DEYN, 2009; HORNIG et al., 1983; LORBERBOYM; LAMPL; SADEH, 2003). A dissolução da lâmina basal ocorre cerca de duas horas após o início da isquemia e seguida pelo aumento da permeabilidade (BELAYEV et al., 1996; HAMANN et al., 1995). O afastamento da lamina basal, bem como o aumento da sua permeabilidade, após AVE, pode elevar o acúmulo de substâncias no local de lesão, como: bradicininas, fator de crescimento endotelial vascular, trombina e metaloproteinase da matriz (MMP) (ABUMIYA et al., 1999; ASCHNER et al., 1997; BELAYEV et al., 1996; BROUNS; DE DEYN, 2009; HAMANN et al., 1995). As MMPs agem sobre a lâmina basal degradando moléculas e fibras colágenas prejudicando a coesão entre as células endoteliais, aumentando a permeabilidade local que favorece o extravasamento do plasma, a transmigração de leucócito e a entrada de hemácias (DEL ZOPPO, G. J.; HALLENBECK, 2000).

O estresse oxidativo pode estimular precocemente a ruptura da barreira hematoencefálica desencadeando a liberação de MMP-9 expressa por neurônios, células endoteliais e células da glia, ocasionando a digestão da lâmina basal e parede endotelial (BROUNS; DE DEYN, 2009; GASCHE et al., 2001; GIDDAY et al., 2005; HEO et al., 1999) proteínas da matriz extracelular, proteínas de junções e consequentemente aumentando os danos na integridade da BHE (FUKUDA et al., 2004; ROSENBERG, 2009; YANG et al., 2007), podendo também, potencializar hemorragias cerebrais voluntárias (BELL; ZLOKOVIC, 2009). Dentro da janela temporal de vinte e quatro a setenta e duas horas após a lesão isquêmica ocorre a maior liberação de MMP-9 devido ao aumento do infiltrado de neutrófilos e consequentemente o aumento do dano tecidual (BROUNS; DE DEYN, 2009; GIDDAY et al., 2005; KASTRUP et al., 1999; LORBERBOYM et al., 2003).

1.2.4. Resposta inflamatória após Acidente Vascular Encefálico

Extremamente importante à fisiopatologia do AVE, principalmente quando se investiga a reperfusão do ambiente isquêmico, a resposta inflamatória tem sido objeto de inúmeros trabalhos que visam possibilitar melhor entendimento à aplicação de uma terapia ao reestabelecimento do fluxo sanguíneo cerebral, imediatamente após ao insulto isquêmico (MACREZ et al., 2011). O AVE pode desencadear lesões secundárias associadas à produção de radicais livres, ruptura da barreira hematoencefálica e a morte celular programada (apoptose). Associado a esses mecanismos celulares, estão: o recrutamento de células polimorfonucleares, microglias/macrófagos que contribuem para exacerbação da lesão isquêmica e para sinalização à ativação de vias pró-inflamatória (IADECOLA; ANRATHER, 2011a; MACREZ et al., 2011).

Na lesão isquêmica, o encéfalo responde a um processo agudo e inflamatório prolongado, ocorrendo uma rápida ativação da microglia, produção de proteínas pró-inflamatórias, infiltração de neutrófilos, macrófagos, diferentes tipos de células T, dentre outras. Durante a isquêmica são expressas citocinas como a IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β e quimiocinas, que contribuem para o aumento da lesão, assim como as citocinas induzem a quimio-atração de neutrófilos e monócitos, células endoteliais, microglia, neurônios, plaquetas, leucócitos e fibroblastos se ativam e produzem proteínas sinalizadoras. Dependendo do grau e de quando ocorre a resposta inflamatória, o processo inflamatório pode ser agudo ou secundário, gerando um processo de alta complexibilidade e difícil de se elucidar os mecanismos exatos que envolvem as células inflamatórias e as interações moleculares, as quais podem ser prejudiciais e/ou benéficas (Figura 3). Inibidores de amplo espectro reduzem os processos inflamatórios agudos em modelos experimentais de isquêmica cerebral (IADECOLA; ANRATHER, 2011b; TOBIN et al., 2014).

As consequências moleculares no encéfalo isquêmico incluem mudanças temporais de sinalização celular, transdução de sinal, modificação no metabolismo e regulação e expressão de genes, assim como a liberação de interleucina 1 β e TNF α pela microglia, astrócitos, células endoteliais e neurônios, sinalizando o recrutamento e ativação de leucócitos que aderem ao endotélio da microvasculatura cerebral, obstruindo o canal vascular e migrando para área da lesão juntamente com monócitos e/ou macrófagos desencadeando a resposta inflamatória (DEB et al., 2010).

Durante o evento isquêmico ocorre um aumento na regulação da expressão de fatores de transcrição de genes que expressão as proteínas pró-inflamatórias, a exemplo das citocinas, proteínas *heat shock* (A desnaturação ocorre em temperaturas elevadas), quimiocinas e moléculas de adesão, entre os fatores de transcrição, estão o fator nuclear (NF)- κ B, responsável pela expressão de TNF- α , IL-1 β , IL-6, NOS, COX-2 e moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1) (TOBIN et al., 2014). Na região periférica o (NF)- κ B, também expressa a ativação de macrófagos, monócitos, linfócitos, células endoteliais, fibroblastos, plaquetas, microglia e células gliais (ADIBHATLA; HATCHER, 2008; DEB et al., 2010; DEL ZOPPO, G. et al., 2000), enquanto que a IL-10 e IL-1 antagonista do receptor (IL-1ra) desenvolve um papel anti-inflamatório e neuroprotetor, estudos mostram que baixos níveis de IL-10 estão diretamente associados a aumentos de riscos de AVE (DEB et al., 2010). Após ativação dessas vias pró-inflamatórias, esses compostos ativam células imunes e induzem a expressão de moléculas de adesão na parede endotelial, seletinas, integrinas e imunoglobulinas (IADECOLA; ANRATHER, 2011b; TOBIN et al., 2014).

No centro e periferia da lesão isquêmica, interleucina-1 (IL-1) e/ou fator de necrose tumoral (TNF- α) contribuem para exacerbação da lesão e ativação de células imunes periféricas ou residentes, além de induzir a expressão de moléculas de adesão e produção de óxido nítrico (NO) (WANG, Q.; TANG; YENARI, 2007). Entretanto, nesse mesmo ambiente isquêmico, a interleucina-10 (IL-10) e o fator beta de crescimento transformador (TGF- β) tem ação benéfica à lesão (BEMEUR; STE-MARIE; MONTGOMERY, 2007).

Durante o processo inflamatório células, incluindo neutrófilos, macrófagos, microglia e células T, são recrutados para locais de lesão isquêmica. O mecanismo pelo qual estas células diminuem a neurogênese após a lesão isquêmica e a forma que afetam o sistema nervoso central (SNC) é objeto de estudos constantes. Na fase aguda, mediadores inflamatórios como espécies reativas de oxigênio provocam a expressão de leucócitos e moléculas de adesão endotelial, estabelecendo adesão e migração rápida de leucócitos que aumentam o estado inflamatório, liberando mais citocinas pró-inflamatórias que elevam os danos teciduais no centro da lesão e na área de penumbra (Fig. 3) (JIN; YANG; LI, 2010; TANAKA et al., 2003).

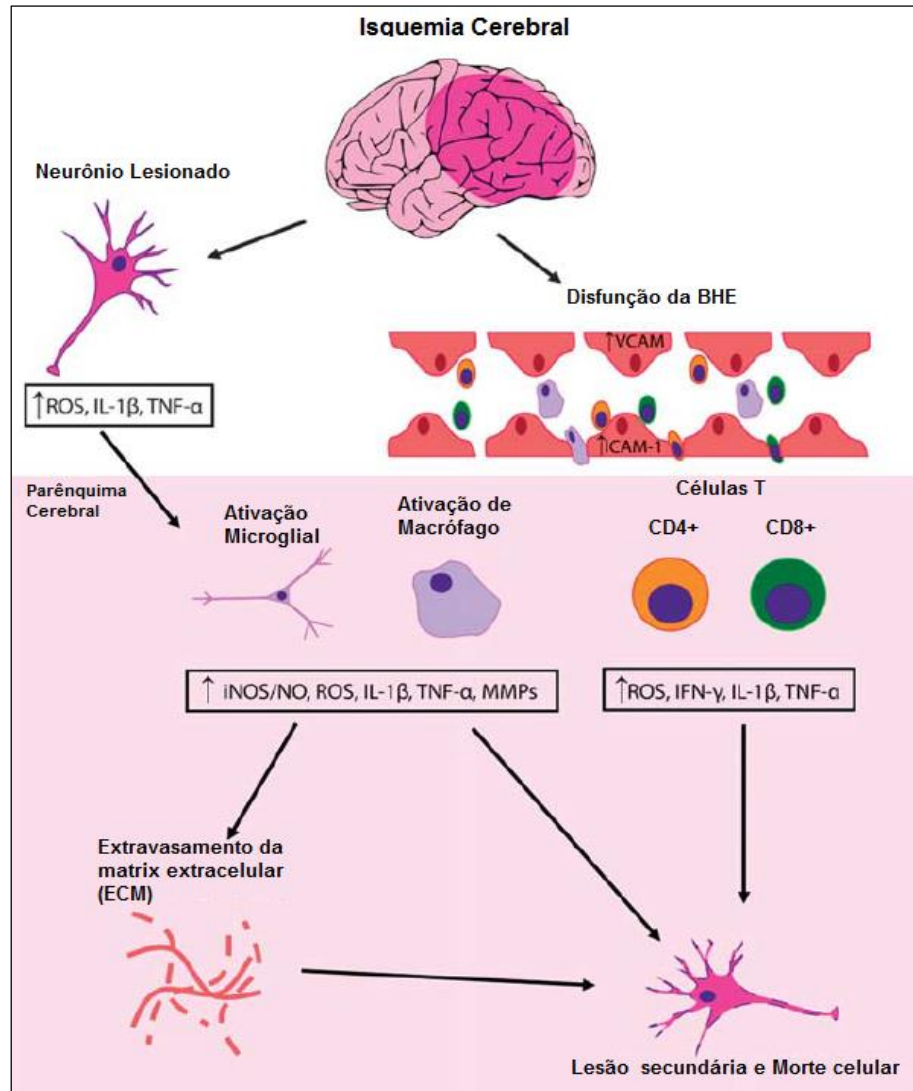


Figura 3 - Representação de um encéfalo isquêmico e os principais compostos mediadores de inflamação e morte celular programada (apoptose). O evento isquêmico leva ao início da necrose celular e geração de espécies reativas de oxigênio e proteínas pró-inflamatórias com interleucina -1 Beta ($\text{IL-1}\beta$) e fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$) lesionando o neurônio, a destruição da barreira hematoencefálica (BHE) com a passagem de células pró-inflamatórias para o parênquima neural, como células T citotóxicas (CD4^+ e CD8^+), além, da ativação da microglia para o perfil M1 culminando na morte celular. Adaptado (TOBIN et al., 2014).

1.2.4.1. Células Polimorfonucleares

A inflamação aguda ocorre até vinte quatro horas após a lesão isquêmica, células imunes circulam pelo infiltrado inflamatório e começam a aderir no endotélio vascular cerebral danificando-o, por consequência, o rompimento da barreira hematoencefálica fazem com que o infiltrado de células se estenda até o parênquima

cerebral (STEVENS et al., 2002). A expressão de vários fatores, a exemplo da IL-8 que se liga as moléculas de adesão celular, células endoteliais e neutrófilos que se infiltram no parênquima cerebral liberando grânulos de secreção, várias moléculas pró-inflamatórias, óxido nítrico, matriz de metaloproteinases, mieloperoxidases e elastase desencadeando uma série de efeitos citotóxicos (ENZMANN et al., 2013; IADECOLA; ANRATHER, 2011a; YILMAZ; GRANGER, 2010).

Os neutrófilos são os primeiros leucócitos a se infiltrarem no encéfalo isquêmico, cerca de trinta minutos após a isquemia cerebral focal persistindo por um pico máximo de um a três dias, após, diminuem rapidamente com o tempo de lesão e depois dos três primeiros dias sua presença é em grande parte mascarada pelo recrutamento em larga escala de microglia ativada na área da inflamação (KRIZ, 2006; WESTON et al., 2007; YILMAZ; GRANGER, 2008). O pico máximo de recrutamento de neutrófilos em tecidos não neurais, como a pele, ocorre em torno de seis horas, no SNC inicia-se dentro das primeiras vinte e quatro horas após lesão (BOLTON; PERRY, 1998; GOMES-LEAL; CORKILL; PICANCO-DINIZ, 2005; KATO et al., 1996).

Weston e colaboradores em um modelo experimental de isquemia cerebral induzida por micro injeções de endotelina-1 em ratos, observaram que aumento da infiltração de neutrófilos ocorre entre o primeiro e terceiro dia após a lesão é contínua de forma reduzida a partir do sétimo e estendendo-se ao quinquagésimo dia (WESTON et al., 2007). Outro modelo experimental em ratos por oclusão da artéria cerebral média, utilizando análise de citometria de fluxo mostrou neutrófilos isolados após três dias da lesão isquêmica, observou-se também, que outras células inflamatórias como macrófagos, linfócitos e células dendríticas no encéfalo isquêmico precedem o influxo de neutrófilos (GELDERBLUM et al., 2009).

1.2.4.2. Linfócitos T

O recrutamento de linfócitos T na isquemia cerebral se manifesta dentro das primeiras vinte e quatro horas após o início da lesão (HURN et al., 2007; YILMAZ; GRANGER, 2010). Estas células estão diretamente envolvidas na patogenicidade do AVE, em animais experimentais mediam a fase da lesão pós-isquêmica, observações de análises de citometria de fluxo e histopatológica demonstraram o aparecimento no tecido cerebral dezoito horas após o evento isquêmico, persistindo até sete dias após a lesão, essas evidências sugerem que os linfócitos podem exercer uma influência

significativa na evolução da inflamação e no agravamento da lesão (GELDERBLOM et al., 2009; JANDER et al., 1995; STEVENS et al., 2002).

Em um modelo experimental transitório de oclusão da artéria cerebral média, examinando análise de citometria de fluxo foi observado o infiltrado de células T CD3⁺, CD11b⁺ e microglia no cérebro isquêmico três a quatro dias após a lesão. No entanto, em outro modelo experimental com camundongos foi evidenciado células T dentro das primeiras vinte quatro horas após a lesão isquêmica focal (HURN et al., 2007; YILMAZ et al., 2006).

1.2.4.3. Células Gliais (microglia/macrófagos)

As células gliais são efetoras centrais nas respostas imunes e fornecem suporte estrutural e metabólico, são responsáveis pela sinalização de citocinas e quimiocinas, atuando também na fagocitose de restos celulares (TIAN et al., 2012), a sinalização é parácrina e influencia as vias pró e anti-inflamatórias entre outras células da glia, neurônios e células imunitárias, a sobrevivência celular e as vias de sinalização da apoptose e mecânicos eletrofisiológicos são ativadas através de neurotransmissores (CROWLEY et al., 2016; LIU; TANG; FENG, 2011; SHASTRI; BONIFATI; KISHORE, 2013).

A origem da microglia provém de células de linhagem eritromielóide que adentram no SNC através de um padrão complexo de infiltração e ocupação durante o desenvolvimento embrionário. Nestas circunstâncias, o córtex cerebral e a zona subventricular são primeiramente ocupados, em seguida o parênquima neural também é ocupado (NEUMANN; WEKERLE, 2013; SWINNEN et al., 2013). Monócitos circulantes e células precursoras emergem no desenvolvimento cerebral, mudando sua morfologia ameboide e formando a microglia ramificada no cérebro maduro (KIM; DE VELLIS, 2005). Em modelos experimentais com ratos utilizando-se de técnicas de transplante de medula óssea, demonstrou-se que a microglia deriva de monócitos do sangue e que invadem o SNC contribuindo para o repovoamento da microglia no encéfalo após algum tipo de lesão (MILDNER et al., 2007; VARVEL et al., 2012).

A microglia estão constantemente em movimento mapeando o microambiente encefálico (NIMMERJAHN; KIRCHHOFF; HELMCHEN, 2005). Perturbações como homeostase podem induzir a ativação microglial, uma vez ativada, estas células

sofrem mudanças morfológicas típicas, caracterizadas por retração, espessamento e hipertrofia do corpo celular, marcadores como CD45, MCH II e CD86 são reguladores positivos para ativação da microglia (KREUTZBERG, 1996; PONOMAREV; VEREMEYKO; WEINER, 2013; RANSOHOFF; PERRY, 2009). Outros marcadores de superfície celular com Iba1, IB4, F4/80 e CD68 (ED-1) são comumente utilizados para identificar a ativação da microglia. Após a isquemia cerebral, a microglia exibe diferentes padrões de expressão, independente se estarem localizadas na região de penumbra ou no núcleo da lesão, na região de penumbra a microglia é positiva para Iba1 mais negativa para CD68, enquanto que na região do núcleo isquêmico ambas são positivas tanto para Iba1 como para o CD68 e exibindo considerada expressão de CD11b (ITO et al., 2001; MORRISON; FILOSA, 2013).

A ativação da microglia é um dos primeiros passos da resposta inflamatória no encéfalo, seguida de infiltração de células imunes, como neutrófilos, macrófagos/monócitos, células matadoras naturais, células T dentre outras células do ambiente encefálico (IADECOLA; ANRATHER, 2011a; JIN et al., 2010). Estudos vem demonstrando o importante papel das vias de ativação da microglia relacionadas com os processos neuroinflamatórios e doenças neurodegenerativas, a combinação desta ativação, a expressão de citocinas pró-inflamatórias e a associação com distúrbios neuroimunológicos, mostram-se como um fator preponderantes na patogenicidade desses eventos e doenças neurológicas (HONG; KIM; IM, 2016).

Ativadas durante a progressão da lesão isquêmica, as células microgliais e astrócitos expressam quimiocinas que, associadas às citocinas, induzem a expressão de moléculas que provocam mudanças na permeabilidade da barreira hematoencefálica, favorecendo a migração de células ao local da lesão (DEB et al., 2010; DEL ZOPPO, G. et al., 2000; WANG, Q. et al., 2007). Na fase aguda da lesão, neutrófilos e linfócitos são recrutados ao sitio de lesão, mas, o pico de neutrófilos se verifica após vinte quatro horas. Esse acúmulo de neutrófilos torna-se prejudicial ao parênquima cerebral devido essas células serem associadas com a produção de radicais livres, enzimas proteolíticas, citocinas e, ainda, causarem a obstrução de pequenos vasos, dificultando a restauração do fluxo sanguíneo e prolongando a hipóxia tecidual. Neste contexto, neutrófilos exercem papel prejudicial à fisiopatologia do AVE semelhante às células microgliais ativadas (BROUNS; DE DEYN, 2009).

As células microgliais são expressas no centro e periferia da lesão isquêmica (NAPOLI; NEUMANN, 2009). Essas células, quando ativadas, apresentam

prolongamentos curtos e grossos que auxiliam em sua função fagocitária dentro do ambiente lesionado. As microglias sintetizam substâncias e aumentam a expressão de moléculas de membrana da família MHC classes I e II, receptores CD₄ e CD₈ e receptores do complemento (STOLL; JANDER, 1999; STREIT; GRAEBER, 1993) (PERRY; ANDERSSON; GORDON, 1993).

As respostas celulares imunitárias tornam-se importante nas observações da neuroinflamação, a microglia responde rapidamente a lesões encefálicas podendo contribuir para lesão expressando proteínas pró-inflamatórias, no entanto, a ativação do perfil da microglia M₂ fazem com que esses macrófagos produzam citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, com isto é observado uma redução da área de lesão, ressaltando a hipótese de que muitas células do sistema imune podem ser benéficas e/ou prejudiciais. Nas lesões cerebrais ocorre o fluxo de células T pró-inflamatórias (Th1, Th17) e células Treg anti-inflamatórias, o equilíbrio entre quantidade destas células determinará a magnitude da lesão ou a reparação do tecido, as células B que se infiltram no tecido lesionado também são prejudiciais, por produzem anticorpos contra antígenos locais, e também proteínas anti-inflamatórias como citocinas a exemplo da IL-10, evidências indicam que alterações nas células vasculares endoteliais desencadeiam um papel importante na regulação do infiltrado celular no encéfalo lesionado, concomitantemente por conta de disfunções na barreira hematoencefálica (Fig. 4) (QUILLINAN; HERSON; TRAYSTMAN, 2016).

Microglia ativada, em resposta as lesões cerebrais, induzem a expressão de proteínas inflamatórias: citocinas, interleucina-1(IL-1), interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), provocando uma exacerbação na área de lesão (REUS et al., 2015; STERTZ; MAGALHAES; KAPCZINSKI, 2013; ZHAO et al., 2014). Em situações de doenças neurodegenerativas agudas e crônicas, essas células desempenham papel neurotóxico que contribui à morte neuronal, podendo dificultar a neurogênese endógena nas doenças neurodegenerativas (GOMES-LEAL et al., 2004) (BLOCK; HONG, 2005) (EKDAHL; KOKAIA; LINDVALL, 2009). Iadecola e colaboradores, relataram a importância da ativação da microglia durante a resposta inflamatória no encéfalo, após AVE, associando-a à infiltração de células polimorfonucleares, linfócitos, dentre outras (IADECOLA; ANRATHER, 2011a). Atualmente, tem-se dado muita ênfase as vias pró-inflamatórias por serem preponderantes no entendimento da fisiopatologia das doenças neurológicas (HONG et al., 2016).

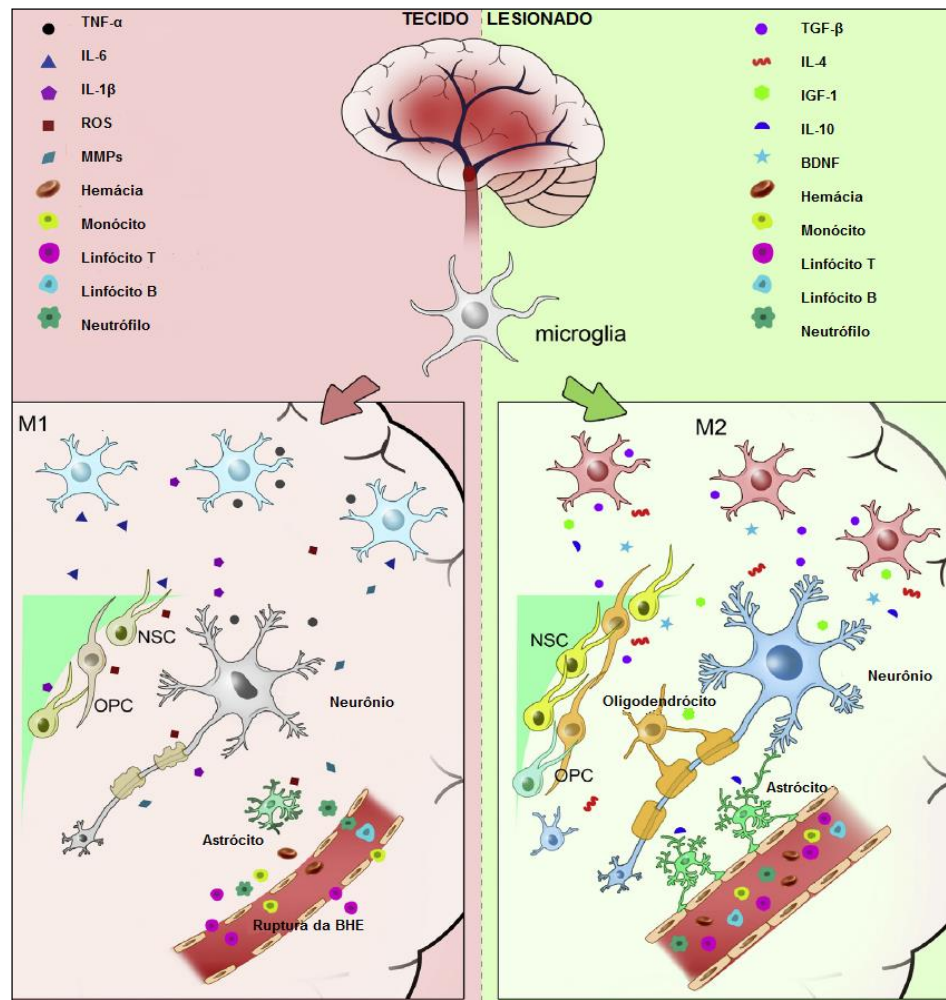


Figura 4 – Ativação das microglias após AVE isquêmica. A figura ilustra o papel da microglia M1 ou M2 na lesão encefálica isquêmica. A isquemia provoca morte e dano tecidual neural associados pela liberação de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio, causando a ativação da microglia para o perfil M1 ou M2. A Microglia M1 contribui para a exacerbação da lesão, apoptose e morte neuronal, a interrupção através da liberação de IL-6, TNF- α , IL-1 β , MMPs, e iNOS. Por outro lado, a microglia M2 exerce um papel neuroprotetor após a isquemia através da liberação de fatores neurotróficos, incluindo BDNF, IGF-1, IL-4 e IL-10. A Microglia M2 mantém a integridade da BHE, promovendo a proliferação e diferenciação de células troncos neurais (NSCs e células progenitoras de oligodendrócito (OPCs), e facilitam a regeneração e a mielinização do tecido. Adaptado (MA et al., 2016)

1.2.4.3.1. Astrócitos

Os astrócitos são o tipo celular mais abundante no encéfalo, respondem a todas as patologias do sistema nervoso central, infecções, lesões isquêmicas encefálicas e doenças neurodegenerativas, por um processo conhecido como astrocitose. Durante este processo, os astrócitos submetem-se a mudanças em sua expressão, padrões

moleculares e morfológicos acarretando efeitos benéficos e/ou prejudiciais em torno de células neurais e não neurais (KANG et al., 2005).

A macroglia do Sistema Nervoso Central é formada por um conjunto de astrócitos e oligodendrócitos. Os astrócitos em condições fisiológicas normais possuem funções proliferativas e estruturais, apresentam um fenótipo de glia radial participando diretamente da neurogênese, apresentando função estrutural com um fenótipo mais maduro formando um arcabouço de sustentação e proteção para a migração de neuroblastos na via migratória rostral (IHRIE; ALVAREZ-BUYLLA, 2011; ZHANG; ZHANG; CHOPP, 2008). Em certas condições fisiológicas os astrócitos desenvolvem função neuroprotetora, podem estar em contato íntimo com o endotélio vascular, associados a uma rica rede de matriz extracelular em conjunto com neurônios na constituição da barreira hematoencefálica (LO; DALKARA; MOSKOWITZ, 2003).

Nas lesões encefálicas, os astrócitos têm sua fisiologia alterada aumentando a síntese de mediadores para sinalização parácrina e autócrina, assumem uma morfologia hipertrófica, elevando a síntese de filamentos intermediários, proliferação e migração para a área lesionada além da formação de uma barreira física, conhecida como cicatriz glial, envidando o aumento da área de lesão (BUFFO; ROLANDO; CERUTI, 2010). Estudos evidenciam que os astrócitos em um ambiente inflamatório possuem a capacidade de modular a dinâmica intracelular de Ca^{+2} da microglia, fazendo com que um complexo do sistema de sinalização onde participam NO, ATP e PGE_2 ajudem a compor a ativação da microglia, onde a partir de então a célula glial passaria a apresentar um perfil anti-inflamatório (ORELLANA; MONTERO; VON BERNHARDI, 2013). Em experimentos com ratos foram observados que a intensa proliferação de astrócitos maduros não ocorre após o AVE isquêmico na área do núcleo e penumbra isquêmica, no núcleo isquêmico, localizam-se em diferentes distâncias da borda para o centro e respondem gradualmente à lesão, evidências mostraram que outros astrócitos se proliferam na fronteira da cicatriz glial (BARRETO et al., 2011).

Após AVE, os astrócitos são responsáveis pela síntese de mediadores inflamatórios, além de assumir uma morfologia hipertrófica e elevar a síntese de filamentos intermediários associados com a proliferação e migração à área lesionada (Fig. 5) (BUFFO et al., 2010). Estudos com animais experimentais demonstraram que no ambiente isquêmico a proliferação (ativação) de astrócitos ocorre em maior

intensidade próxima à unidade neurovascular e que possuem a capacidade de modular a dinâmica intracelular de Ca^{+2} da microglia, bem como participar na formação da cicatriz glial no local da lesão (BARDEHLE et al., 2013; BUFFO et al., 2010; PEKONY, MILOS et al., 2018). Ainda no ambiente isquêmico, a resposta dos astrócitos funciona como um marcador de resposta celular, sendo a passagem ao estado ativado dessas células associado à forte expressão de GFAP (PEKONY, M.; NILSSON, 2005; STOLL; JANDER; SCHROETER, 1998).

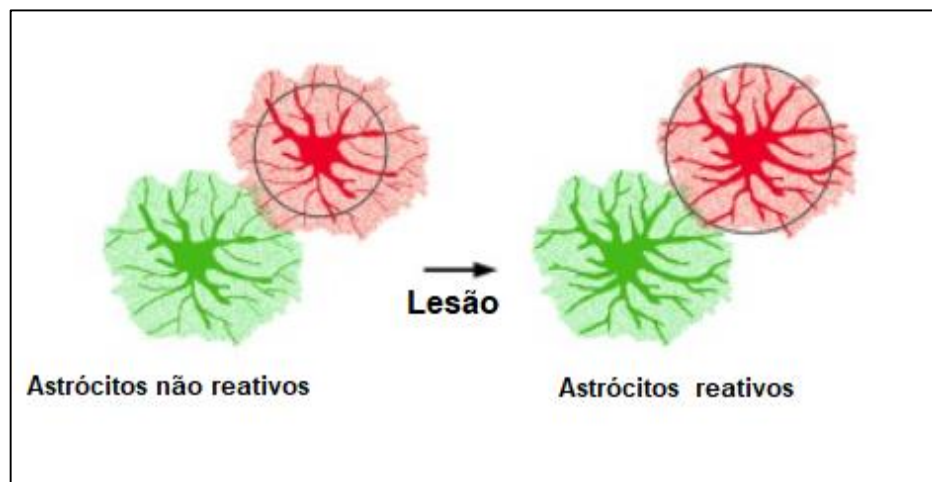


Figura 5 - Em resposta a lesão isquêmica os processos celulares dos astrócitos atingem a condição de reativos e mostram sinais de hipertrofia, se tornam mais espessos e visíveis a uma distância maior (círculos), contudo, dentro dos seus domínios originais. Adaptado (PEKONY, MILOS et al., 2018).

1.2.5. Apoptose

A morte celular programada (apoptose) após AVE ocorre concomitantemente ao desencadeamento dos processos de excitotoxicidade, liberação de espécies reativas de oxigênio, desequilíbrio iônico e a resposta inflamatória (Fig. 6) (BROUNS; DE DEYN, 2009). Esse mecanismo de morte celular pode ser desencadeado por sinais extrínsecos à célula e/ou envolver vias bioquímicas internas relacionadas ao funcionamento da mitocôndria (DOYLE et al., 2008; KIMURA-OHBA; YANG, 2016).

Apoptose requer um conjunto de expressão de genes, proteínas e características internucleosômicas de clivagem do DNA, condensação do agregado de cromatina, encurtamento citoplasmático, preservação da integridade de membrana e ultraestrutura mitocondrial, originando os corpos apoptóticos (BENN; WOOLF, 2004; SYNTICHAKI; TAVERNARAKIS, 2003). Os genes Bcl-2 e p53 seguidos por liberação

de moléculas pró-apoptóticas, a exemplo do citocromo C e fatores de indução de apoptose mitocondrial, levam a ativação de caspases e outros genes que exacerbam a morte celular (DEB et al., 2010; EKSHYYAN; AW, 2004). A ativação de caspase podem ocorrer por uma via intrínseca composta de um receptor mitocondrial de morte independente e uma via dependente de receptor de morte programada ou via extrínseca (DEB et al., 2010; DOYLE et al., 2008; ELDADAH; FADEN, 2000). Ativação de enzimas líticas, a exemplo das catepsinas, interferem na integridade da membrana plasmática promovendo ruptura osmótica gerando edema celular, os mecanismos de morte celular podem ser desencadeados por estimulação de receptores específicos de membrana, como TNF- α (DEGTEREV; YUAN, 2008).

Após o acidente vascular encefálico a estabilidade da membrana mitocondrial e as reações bioquímicas internas a ela são comprometidas, ao ponto de ocorrer desequilíbrio na cadeia transportadora de elétrons havendo a liberação da enzima citocromo-C e outros fatores de indução (smac/diablo; IAPs - inibidores de proteínas anti-apoptóticas) (DEB et al., 2010; EKSHYYAN; AW, 2004). No citosol a citocromo-C se liga a moléculas pró-apoptóticas citoplasmáticas (APAF-1) ativando a caspase-9 que, em seguida, ativa a caspase 3 (SUGAWARA et al., 2004). Essa enzima vai atuar sobre o citoesqueleto celular, degradando-o e ativando endonucleases que reagem danificando o DNA nuclear levando à célula a morte (DEB et al., 2010; DOYLE et al., 2008; ELDADAH; FADEN, 2000).

A via intrínseca inicia-se pela liberação do citocromo C e ativação de caspases, formando o apoptossomo, um conglomerado formado por ATP, citocromo C, pró-caspase 9 e moléculas pró-apoptóticas específicas (APAF-1). As caspases 3 e 7 direcionam substratos que promovem a clivagem homeostática, sinalização de proteínas, dentre outros processos, causam também fragmentação do DNA pela ativação da caspase desoxiribonuclease ativada (CAD) por clivagem da proteína inibidora ICAD. A ativação de caspase pode ser regulada por proteína inibidora de apoptose (IAP) e/ou ativada por derivados secundários mitocondriais ativados por caspase (SMAC/DIABLO) (DOYLE et al., 2008).

A via extrínseca inicia-se por sinalização de receptores de morte celular (DOYLE et al., 2008). Nesta via, membros das famílias FAS/CD95 e TNF-R1 e seus respectivos ligantes de morte (FAS) e TNF- α são responsáveis pela ativação da caspase-8 que ativam caspase-3 ocasionando a sinalização para ativação da poli (ADP-ribose) polimerase, sendo que o excesso dessa enzima acarretará na

diminuição na produção de NADP e ATP (SUGAWARA et al., 2004; VILA; PRZEDBORSKI, 2003). Essa depleção de ATP ocasiona falência energética e danos ao DNA nuclear (DEGTEREV; YUAN, 2008; MIFSUD et al., 2014). Ademais, genes Bcl-2 e p53 associados à liberação de moléculas pró-apoptóticas a exemplo do citocromo C e fatores de indução de apoptose mitocondrial, levam a ativação de caspases e outros genes que exacerbam a morte celular (DEB et al., 2010; EKSHYYAN; AW, 2004).

A apoptose em neurônios após o evento isquêmico está diretamente associada a um aumento da atividade intranuclear de MMP, em consequência da ocorrência do reparo proteolítico no DNA (KIMURA-OHBA; YANG, 2016). Apoptose, disfunção endotelial e a destruição da barreira hematoencefálica, desempenham um papel fisiopatológico extremamente importante nos processos de lesão de isquemia e/ou reperfusão, estas vias não funcionam isoladamente, mas se sobrepõem e interagem de forma sinérgica (WANG, Y. et al., 2016). A liberação excessiva de glutamato, a ativação de receptores de ATP, o stress oxidativo, inflamação e apoptose, todos esses eventos contribuem também para a morte de oligodendrocitos e lesão axonal após a lesão isquêmica (MIFSUD et al., 2014).

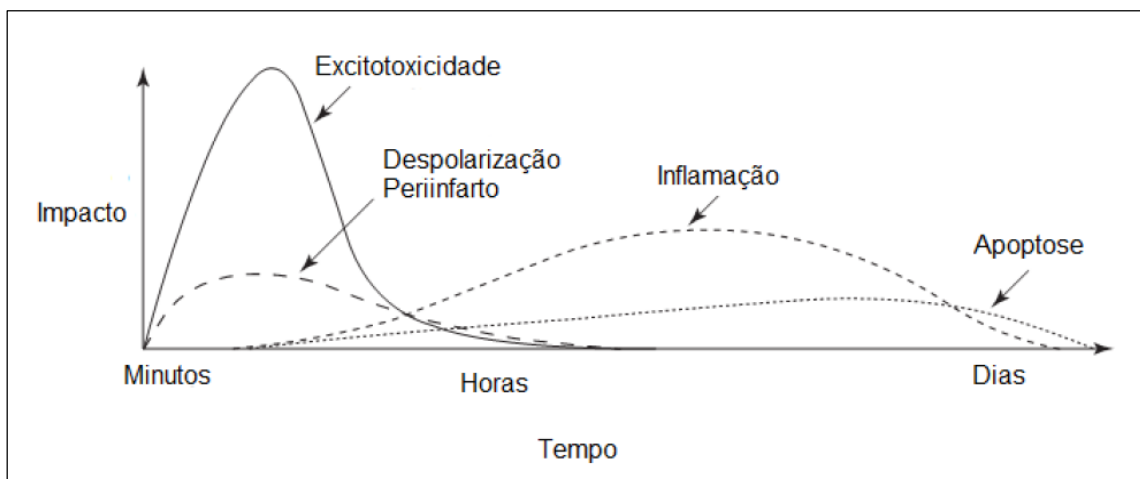


Figura 6 – Gráfico cartesiano, mostrando a progressão dos eventos relacionados à evolução da lesão após AVE. Ordenada: crescimento e/ou decaimento exponencial dos eventos; Abscissa: relação temporal a cada evento instalado após o acidente vascular encefálico. Adaptado (DIRNAGL et al., 1999).

1.3 JUSTIFICATIVA

Investigações sobre os possíveis efeitos neuroprotetores, neurorregenerativos e anti-inflamatórios dos extratos de plantas da Amazônia brasileira são incipientes. As principais doenças neurodegenerativas agudas e crônicas permanecem sem cura. No caso do acidente vascular encefálico, que se configura juntamente com trauma da medula espinhal e cranioencefálico, como a terceira causa mundial de morte só perdendo para o Câncer e doenças do coração (CABRAL et al., 1997; LOTUFO; BENSON, 2007a;2007b; LOTUFO; DE LOLIO, 1993; TAYLOR et al., 1996), inexistem abordagens terapêuticas (com exceção do trombolítico ativador de plasminogênio tecidual recombinante para AVE isquêmico) que diminui a lesão neural secundária após o início dos sintomas. No entanto, poucos pacientes se beneficiam do uso de trombolíticos, devido à sua estreita janela terapêutica (FONAROW et al., 2011) (CARPENTER et al., 2011; LINDGREN et al., 1996; RYMNER et al., 2010). Neste caso, o medicamento deve ser aplicado em até três horas após o início dos sintomas, sob o risco de ocorrer à transformação hemorrágica, ou seja, o rompimento do vaso sanguíneo pelo tratamento (CARPENTER et al., 2011; LINDGREN et al., 1996; RYMNER et al., 2010). Em estudo com a utilização do fármaco (*Dabigatrano* – inibidor direto de trombina) em pacientes idosos, observou-se um resultado normal para os testes de coagulação, dando uma boa resposta a terapia (MARRONE; MARRONE, 2013). O fator ativador de plasmiogênio tecidual recombinante associado ao fármaco (*Dabigatrano*) não apresentou riscos de eventos hemorrágicos em estudos experimentais (PFEILSCHIFTER et al., 2012).

A ineficácia das mais de mil drogas testadas em animais para as desordens neurais agudas (O'COLLINS et al., 2006; SACCHETTI, 2008) enfatizam a necessidade da busca de novos e mais eficazes agentes neuroprotetores e/ou anti-inflamatórios para doenças do SNC, o principal propósito deste projeto. Portanto, em comum acordo com as novas diretrizes do Ministério da Saúde, que considera o AVE um problema de saúde pública.

Cissus verticillata (L.) Nicholson & C.E. Jarvis conhecida popularmente como, insulina-vegetal, cipó-pucá, anil-trepador, é um espécime nativa da região Amazônica utilizada normalmente como ornamentação em jardins e diversos fins medicinais (Fig. 7) (LORENZI, 2008). Apresenta como sinônimo botânico o nome *Cissus sicyoides* L. (LOMBARDI, 2000). A infusão das folhas ou partes aéreas de *C. verticillata* são

utilizadas na medicina popular e possuem um efeito anti-inflamatório (BESERRA et al., 2016), antiepilético, anti-hipertensivo, antitêrmico, antidiabético, antirreumático (BELTRAME, F. L. S., J. L. ; BAZOTTE, R. B.; CUMAN, R. N.; CORTEZ, D. A. G., 2001). Estudos com animais experimentais com o extrato da planta, também, demonstraram uma atividade antibacteriana, propriedades anticonvulsivante utilizadas contra epilepsia e atividades citotóxicas (SAENZ et al., 2000).



Figura 7 - *Cissus verticillata* (L.) Nicolson and C.E. Jarvis, aspectos das folhas, flores e fruto. Adaptado (DROBNIK; DE OLIVEIRA, 2015)

As folhas e o caule da planta apresentam composição química caracterizadas por compostos bioativos com grande atividade antioxidante, presença de carotenoides (α -caroteno e β - caroteno) (SILVA, 1996) e compostos fenólicos (flavonoides, estilbenos, taninos e cumarinas), também, apresentam na sua composição esteroides e óleos essenciais (BELTRAME, F.; FERREIRA; CORTEZ, 2002; QUILEZ et al., 2004; XU et al., 2009). Em estudos com um edema induzido em ratos adultos, a atividades anti-inflamatória é comprovada e associada a presença de grande quantidade de compostos fenólicos presentes no extrato da planta, indicando que esses compostos são os principais responsáveis pelos efeitos farmacológicos da planta (BESERRA et al., 2016; GARCIA et al., 2000; QUILEZ et al., 2004).

1.4. HIPÓTESE EXPERIMENTAL

Neste estudo investigou-se, utilizando um modelo experimental de acidente vascular encefálico (AVE), os possíveis efeitos neuroprotetores, neuroregenerativos e anti-inflamatórios de uma planta considerada com propriedades anti-inflamatórias pela medicina popular: cipó pucá (*Cissus verticillata*) para as quais existem evidências científicas de seus possíveis efeitos.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. Objetivo geral

Verificar os possíveis efeitos neuroprotetores, neurorregenerativos e anti-inflamatórios do extrato do cipó pucá (*Cissus verticillata* (L.) Nicholson & C.E. Jarvis) após lesão isquêmica focal, induzida por microinjeções de Endotelina-1 (ET-1), no córtex motor de ratos machos adultos.

1.5.2. Objetivos específicos

Investigar ação neuroprotetora pela preservação tecidual do extrato de *Cissus verticillata*;

Investigar os possíveis efeitos anti-inflamatórios do extrato de *Cissus verticillata*, sendo indicado pela redução do infiltrado inflamatório de células polimorfonucleares e macrófagos/ micróglias por imunohistoquímica;

Associar os componentes ativos do extrato utilizados na extração supercrítica, após lesão isquêmica focal por cromatografia.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Caracterização da matéria prima

As folhas e caules de *Cissus verticillata* foram coletadas no município de Salinópolis, Estado do Pará, Brasil com o modelo de *voucher* n ° 194.17, depositado no Herbário do Centro de Pesquisas Agroflorestal da Amazônia Oriental (EMBRAPA). As amostras foram secas a 35°C durante 48 h em um forno com circulação de ar (Fabbe-Primar®, modelo 225, Brasil) e moídas utilizando um moinho de facas (Marconi®, modelo ma048, China). A umidade foi determinada de acordo com o método de destilação de solvente imiscível de Jacobs (JACOBS, 1973). O tamanho de partícula foi analisado utilizando peneiras Tyler (Bertel, Brasil) variando de 20 a 60 *mesh* e o diâmetro médio geométrico foi determinado de acordo com o método recomendado pela Sociedade Americana de Engenheiros Agrônomos (ASAE) ((ASAE), 1993). A densidade real das partículas foi determinada utilizando um picnômetro de hélio do Centro Analítico do Instituto de Química da Universidade de Campinas (Unicamp), a densidade aparente do leito foi calculada usando o volume da cama e a massa de alimentação sólida acomodada dentro dela.

2.2. Fracionamento e isolamento do extrato

As extrações foram realizadas usando o *Spe-ed*™ SFE (Applied Separations, modelo 7071, USA) (Fig. 8). Este equipamento foi descrito anteriormente por Salazar e colaboradores (SALAZAR et al., 2018) e Oliveira e colaboradores (DE OLIVEIRA et al., 2016). Uma bomba de co-solvente (LabAlliance, modelo 1500, USA) foi acoplada ao equipamento, a capacidade de volume do vaso extrator utilizado foi de $1 \times 10^{-4} \text{ m}^3$ (altura de 0,1254 m e 0,0320 m de diâmetro interno), os solventes utilizados foram dióxido de carbono (CO₂) (99,9%, White Martins®, Brasil) e Etanol (EtOH) (99,8% Neon, Brasil), e a massa da amostra foi de 0,010 kg. Os ensaios foram realizados com base na metodologia de superfície de resposta (RSM) com um design experimental *Box-Behnken*, a fim de determinar a melhor condição de operação da extração. As variáveis independentes foram: pressão (400 bar),

temperatura (50°C) e porcentagem de co-solvente (EtOH) (10%) para um melhor rendimento e retirada de compostos hidrofílicos.

As respostas correspondentes foram: compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante. Os parâmetros operacionais constantes foram o tempo de extração estático de 0,5 h, o tempo de extração dinâmico de 3 h e o fluxo de CO₂ de 4,52 g/minuto. O extrato obtido com CO₂ + EtOH foi coletado em frascos de vidro até o final de cada extração. A massa extraída foi medida em balança analítica (Quimis, modelo AS 210, Brasil) e evaporados sob vácuo a 40°C usando um CentriVap (Labconco®, USA) para evaporar antes de pesado. Os extratos foram armazenados, protegidos da luz, oxigênio e temperaturas abaixo de 5°C até suas análises e aplicações (SALAZAR et al., 2018).



Fig.8 - Estação supercrítica do Laboratório de Extração – UFPA.

2.3. Cromatografia de camada fina de alto desempenho (HPTLC)

A triagem fitoquímica dos extratos de *Cissus verticillata* foi realizada por cromatografia em camada delgada de alto desempenho (HPTLC), segundo o método de Wagner e Bladt (H. WAGNER, 1996) e Srivastava (SRIVASTAVA, 2011), utilizando o CAMAG-TLC/HPTLC (CAMAG, Suíça) equipado com um mostrador TLC automático

(ATS 4) e automatizador de desenvolvimento múltiplo (AMD 2). Os extratos foram dissolvidos em diclorometano (99,9%, Tedia®, Brasil) a uma concentração de 5000 ppm, aplicou-se um volume de aproximadamente 15 µl em forma de banda em placas de sílica gel *Plates* 60 Å (SiliCycle Inc, Canadá). Foi utilizado o diclorometano (99,9%, Tedia®, Brasil) como fase móvel e metanol (99,9%, Tedia®, Brasil) acidificado com 1% de ácido fórmico (85%, Isofar®, Brasil) a uma proporção de (95:4:1) (v/v/v). As placas foram derivadas com: a) ácido vanilina-sulfúrico (VS) (Merck®, Brasil) específico para identificação de terpenos, esteroides e ácidos graxos; b) cloreto férrico (FeCl₃) (97%, Sigma-Aldrich®, Brasil) para identificação de compostos fenólicos; c) difenilboriloxietilamina (NP) (Sigma-Aldrich®, Brasil) e polietilenoglicol 4000 (PEG) (Sigma-Aldrich®, Brasil) (NP/PEG) para identificação de flavonoides; d) uma solução metanólica (99,9%, Tedia®, Brasil) do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•) (Sigma-Aldrich®, Brasil) para avaliação qualitativa da atividade antioxidante. As placas foram visualizadas sob luz visível e sob luz UV a um comprimento de onda de λ 366 nm.

2.3.1. Compostos fenólicos totais (CFT)

A determinação total de compostos fenólicos foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu de acordo com descrito por Singleton e colaboradores (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999) e Georgé e colaboradores (GEORGÉ et al., 2005). Os extratos foram dissolvidos em etanol (EtOH) (96%, Dinamica®, Brasil) a 7% (v/v) na concentração de 140 mg/l, um volume de 0,5 mL desta solução foi submetido à reação com 2,5 mL de Folin-Ciocalteu (Tedia®, Brasil) a 10% (v/v) e 2 mL de solução de carbonato de sódio (99,5%, Vetec®, Brasil) a 7,5% (m/v). Após 1 h de incubação em temperatura ambiente em condições escuras, as medidas de absorbância foram realizadas a um comprimento de onda de 760 nm em um espectrofotômetro UV-VIS (Thermo Scientific, modelo Evolution 60, USA). O teor de compostos fenólicos foi expresso em miligramas de equivalente de ácido gálico (GAE) (98%, Vetec®, Brasil) por grama de extrato seco (db) (mg GAE/g de extrato) usando a equação da curva de calibração ($y = 0.0099x - 0,0277$; $R^2 = 0,9971$). A análise foi realizada em triplicata.

2.3.2. Total de flavonoides (TF)

A determinação dos flavonoides totais (TF) foi realizada utilizando o procedimento descrito por Dowd (DOWD, 1959) e Meda e colaboradores (MEDA et al., 2005). Os extratos foram dissolvidos em EtOH (96%, Dinamica®, Brasil) na concentração de 140 mg/l. Um volume de solução da amostra de 0,5 ml foi misturado com 0,5 ml de solução etanólica de cloreto de alumínio (AlCl_3) (99%, Fluka, Alemanha) a 2% (m/v). Após dez minutos de incubação à temperatura ambiente no escuro, a absorbância foi medida a um comprimento de onda de 425 nm usando um espectrofotômetro UV-VIS (Thermo Scientific, modelo Evolution 60, USA). O conteúdo total de flavonoides foi expresso em miligramas de Quercetina Equivalente (QE) (95%, Sigma-Aldrich®, Brasil) por grama de extrato em base seca (db) (mg QE/g extrato) usando a equação da curva de calibração ($y = 0,0355x + 0,0127$; $R^2 = 0,9983$). A análise foi realizada em triplicata.

2.3.3. Atividade antioxidante

A determinação quantitativa da atividade antioxidante (AA) do extrato de *Cissus verticillata* foi realizada pelo método proposto por Brand-Williams e colaboradores (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995) e Sánchez-Moreno e colaboradores (SÁNCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1998). Uma solução de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) (Sigma-Aldrich, Brasil) foi preparada a 60 μM em EtOH (96%, Dinamica®, Brasil). Em seguida, 3,9 ml desta solução foram adicionadas em 0,1 ml do extrato em diferentes concentrações (10, 7, 6, 5 e 4 mg/ml). Estas soluções foram mantidas à temperatura ambiente e em condições de pouca luz. Após a estabilização do tempo necessário para reduzir o montante inicial do radical DPPH- em 50% (TEC_{50}), a absorbância foi medida em λ 515 nm utilizando o espectrofotômetro UV-VIS (Thermo Scientific, modelo Evolution 60, USA). O valor da EC_{50} (Quantidade de antioxidante necessária para reduzir a quantidade inicial do radical DPPH- em 50%) foi então calculada a atividade antioxidante e expressa como grama de extrato por grama de DPPH em base seca (db) (EC_{50} expresso em grama de extrato por grama de DPPH). A análise foi feita em triplicata.

2.4. Animais de experimentação

Para o presente estudo, utilizou-se ratos adultos da raça Wistar do sexo masculino (n= 08 por tempo de sobrevida/grupo experimental, sendo 05 animais isquêmicos e 03 animais controle), cedidos pelo biotério central da Universidade Federal do Pará. Todos os procedimentos experimentais foram realizados em obediência às normas sugeridas pela Society for Neuroscience, National Institute of Health (NIH, USA), Conselho Nacional de Controle de Animais de Experimentação (CONCEA, resolução normativa nº 30, de 02 de fevereiro de 2016, Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE – UFPA: 137-13).

2.5. Grupos experimentais

Foram utilizados dezesseis ratos WISTAR machos adultos pesando entre 250-300 g. Os animais foram alojados em gaiolas contendo entre 4-5 animais, com água e comida na proporção ideal a cada animal. Os procedimentos experimentais foram executados conforme aprovado 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.

Neste estudo foi planejado a formação de dois Grupos de Animais Experimentais, um grupo chamado de Tratado, composto de cinco animais isquêmicos que receberam todos os procedimentos cirúrgicos e indução da isquemia focal com microinjeções de endotelina-1 (ET-1) e com um tempo de sobrevida de vinte e quatro horas; um grupo de cinco animais isquêmicos que receberam todos os procedimentos cirúrgicos e indução da isquemia focal com microinjeções de endotelina-1 e com um tempo de sobrevida de sete dias, onde todos foram tratados com uma dose na concentração de 100 mg/kg de extrato de *Cissus verticillata* (cipó pucá) de acordo com estudo de Viana e colaboradores (VIANA et al., 2004). Um grupo chamado de Controle, composto de três animais isquêmicos que receberam todos os procedimentos cirúrgicos e indução da isquemia focal com microinjeções de endotelina-1 e com um tempo de sobrevida de vinte e quatro horas; um grupo de três animais isquêmicos que receberam todos os procedimentos cirúrgicos e indução da

isquemia focal com microinjeções de endotelina-1 e com um tempo de sobrevivência de sete dias, todos eles tratados via intraperitoneal (ip) com solução salina 5% twenn.

2.6. Indução de isquemia focal por microinjeções de Endotelina-1

A isquêmica focal foi induzida através da administração do peptídeo vasoconstritor endotelina 1 (ET-1) (sigma Brasil) na região do córtex motor no encéfalo dos animais. O modelo experimental utilizando ET-1 foi demonstrado por (FUXE et al., 1997; FUXE et al., 1989) e aplicado com sucesso no ano de 2003 por (HUGHES et al., 2003). Em estudos prévios, implementou-se o modelo experimental proposto (CARDOSO et al., 2013; FRANCO et al., 2012; SOUZA-RODRIGUES et al., 2008). 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). Após a ausência dos reflexos de retirada de pata e corneano, os animais foram colocados sobre o aparelho estereotáxico (Insight® EFF-336), sob a proteção de uma manta térmica. As coordenadas adotadas a partir do bregma foram: médio-lateral: 2,3; anteroposterior: 1,2; dorsoventral: 0,5; a partir da superfície cortical (PAXINOS; WATSON; EMSON, 1980). Uma incisão longitudinal foi feita com bisturi, para exposição da caixa craniana e no ponto especificado pelas coordenadas estereotáxicas, realizada craniotomia com auxílio de broca cirúrgica odontológica de baixa rotação para exposição da superfície cortical. A concentração de endotelina-1 foi injetada com auxílio de uma micropipeta de vidro graduada (Sigma-Aldrich, Hirschmann) foi de 80 pMols, diluída em 1 µl de corante azul colanil, de modo a permitir a localização da área de injeção. A micropipeta permaneceu fixa por cinco minutos no parênquima neural visando evitar possíveis refluxos. Após os procedimentos cirúrgicos, os ratos foram observados, em intervalos regulares, visando o monitoramento da recuperação e da evolução dos sintomas causados pelo dano isquêmico, sendo mantidos em gaiolas-padrão individuais durante o tempo de sobrevivência e mantidos com água e comida à vontade, temperatura controlada em 24°C, ciclo circadiano 12-12 claro-escuro.

2.7. Perfusão e processamento histológico

Após os tempos de sobrevivência, os animais foram profundamente anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (72 mg/Kg) e xilazina (9 mg/Kg) via intraperitoneal (i.p.). Os testes do reflexo corneano e de retirada da pata foram avaliados para garantir que os animais foram bem anestesiados. Logo em seguida, foi feita a toracotomia e a exposição do saco pericárdico que foi aberto para a visualização do coração. Uma pequena incisão na aurícula direita foi realizada e uma cânula foi introduzida no ventrículo esquerdo e direcionada até a porção inicial da aorta; os animais foram perfundidos com solução salina 0,9% contendo heparina seguida pelo fixador Paraformaldeído a 4%. Os encéfalos foram dissecados e pós-fixados por vinte e quatro horas no mesmo fixador. Após a pós-fixação, os encéfalos foram crioprotégidos utilizando o seguinte protocolo: i) solução crio protetora a 25% (30 minutos); ii) solução crio protetora a 50% (4 – 6 horas); iii) solução crio protetora a 100% (24 – 48 horas). Após a crio proteção, o tecido foi congelado em gel de imersão para criostato (Tissue Tek) a -55°C em criostato provido de efeito Peltier (Carl Zeiss, Mícron, Alemanha). Secções coronais com espessura de 20 e 50 μm foram obtidas. Os cortes foram colocados em lâminas previamente gelatinizadas e mantidas a temperatura ambiente por um período mínimo de 24 horas, sendo logo em seguida guardadas em freezer à -20°C para imunohistoquímica ou outros procedimentos histoquímicos.

2.8. Análise histopatológica e imunohistoquímica

2.8.1. Visualização da Área da Lesão

A área da lesão foi visualizada nos cortes com espessura de 50 μm corados pela violeta de cresila e/ou Hematoxilina, de acordo com o realizado em estudos prévios (FRANCO et al., 2012; GOMES-LEAL et al., 2004).

2.8.2. Imunohistoquímica

Para avaliar os possíveis efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores do extrato de *C. Verticillata*, foi realizado análises imunohistoquímicas com o uso dos seguintes anticorpos.

2.8.2.1. Neurônios

Os corpos neuronais foram marcados com anticorpo anti-NeuN (1:100, Chemicon), um marcador específico de corpos celulares de neurônios maduros (MULLEN; BUCK; SMITH, 1992).

2.8.2.2. Células Gliais

Para o estudo de astrócitos utilizou-se o anticorpo anti-proteína ácida fibrilar glial (anti-GFAP) (1:1000, Dako) (GOMES-LEAL et al., 2004). A presença de macrófagos e microglia ativados na área da lesão e nas regiões circunvizinhas foi identificado com anticorpo Iba1 (1:1000, Wako) (ITO et al., 1998).

2.8.2.3. Neutrófilos

Os neutrófilos foram marcados com anticorpo policlonal MBS-1 (1:1000, CNS Inflammation Group, Southampton University, UK), o qual reconhece epítomos presentes na maioria da população de neutrófilos. Este anticorpo foi uma doação do Professor Victor Hugh Perry, da Universidade de Southampton.

2.9. Análise qualitativa

Todas as secções coradas pelos diferentes métodos histológicos e imunohistoquímicos foram inspecionadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse 50i). Imagens de secções com campos ilustrativos, obtidas de animais perfundidos em todos os tempos de sobrevida e grupos experimentais, foram obtidas com o programa de computador Motic 2.5 com Câmera Digital acoplada a um microscópio óptico (THORED et al., 2009).

2.10. Análise quantitativa

Para avaliação quantitativa da área de lesão primária foi considerado o número de macrófagos/micróglia, neurônios e astrócitos reativos. O número de micróglia/macrófagos e neurônios foram contados com o uso de uma gradícula de contagem de 0,0625 mm² acoplada à ocular de um microscópio óptico (NIKON ECLIPSE E200) com uso da objetiva de 40x. As contagens foram realizadas em três campos: um central, um à cima e outro localizado a baixo da lesão. As médias das contagens e os desvios padrão foram obtidos e plotados em coordenadas cartesianas.

2.11. Análise estatística

Utilizou-se os parâmetros de estatística descritiva média, erro padrão e desvio padrão para todos os dados quantitativos. Foi utilizado análise de variância (ANOVA) um critério com correção a posterior de Tukey para fazer a avaliação das diferenças entre os grupos. O nível de significância foi de $p < 0.05$ = significativo e $p < 0.01$ = altamente significativo.

3. RESULTADOS

3.1. Cromatografia de camada fina de alto desempenho (HPTLC)

A partir da triagem fitoquímica de HPTLC dos extratos de *Cissus verticillata* obtidos por extração supercrítica na condição de 400 bar de pressão e 50°C de temperatura apresentaram uma concentração 65,20 mg de equivalente de ácido gálico (GAE) que fornece a estimativa do conteúdo de todos os compostos que pertencem às subclasses de compostos fenólicos presentes nos extratos e de terpenos; 9,01 mg de Quercetina Equivalente (QE) por grama de extrato, que expressa a quantidade total de flavonoides e EC₅₀ 379,60 g de extrato/g de DPPH• (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) que indica a quantitativo da atividade antioxidante.

Após a derivatização das placas que continham os diferentes reagentes, a reação cromatográfica determinou cores características para as classes de compostos químicos específicos (Fig. 9).

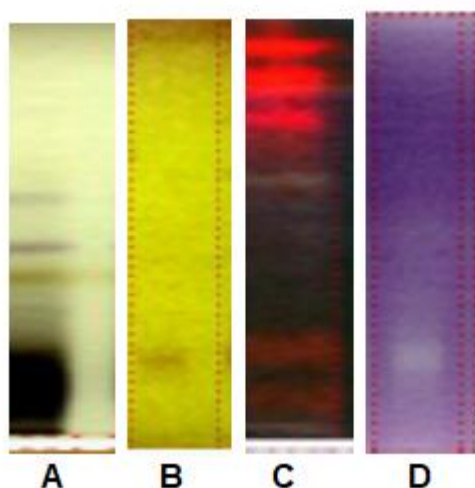


Fig. 9 – HPTLC do extrato de *Cissus verticillata*. (A) Derivatização de placas com Ácido vanilina sulfúrico (VS), presença de terpenos, esteroides e ácidos graxos; (B) Cloreto Férrico (FeCl₃) presença de compostos fenólicos; (C) difenilboriloxietilamina, polietileno glicol 4000 (NP/PEG) presença de flavonoides; (D) DPPH, atividade antioxidante.

3.2. Resposta inflamatória após o tratamento com extrato de *Cissus verticillata*.

3.2.1. Perda tecidual e resposta inflamatória induzidas por endotelina-1 são minimizadas com o tratamento com o extrato.

As microinjeções de ET-1 no córtex motor de ratos adultos induziram isquemia focal com características histopatológicas, incluindo palidez de tecido, perda de células e resposta inflamatória, como revelado pela coloração com hematoxilina eosina vinte quatro horas após a lesão (Fig.10) e a coloração violeta cresila sete dias após a lesão (Fig. 11), observa-se também, uma considerável área de infarto (Fig.10 A), conforme relatado em investigações anteriores pelo grupo do laboratório (BOTELHO et al., 2014). Células polimorfonucleares (Fig. 10 B) são visíveis na área de lesão vinte e quatro horas após a isquemia focal. Células mononucleares inflamatórias estavam presentes em altas densidades dentro e em núcleo da lesão (Fig.11 B). O tratamento dos animais isquêmicos com o extrato de *C. verticillata* (100 mg/kg) durante a primeira semana pós-lesão, reduziu a área de infarto (Fig. 11 C e D) e a inflamação (Fig. 10 D) em comparação com animais controle tratados apenas com solução salina e tween a 5% (Fig. 10 A-B). A quantidade de células mononucleares no local da lesão foi claramente reduzida nos animais tratados com o extrato da planta sete dias após a lesão isquêmica (Fig. 11 D).

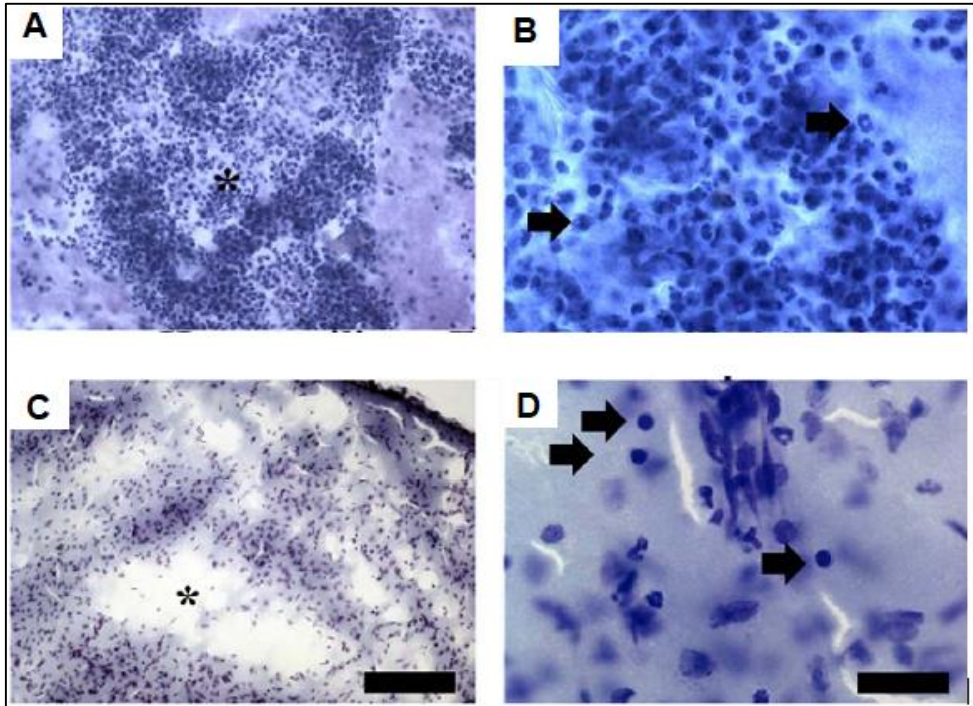


Figura 10. Histopatologia básica revelada pela coloração por Hematoxilina em animais isquêmicos tratados com solução twenn 5% (A e B) e com 100 mg/kg de Cipó Pucá (C e D) vinte quatro horas após a lesão. O infiltrado inflamatório é menor nos animais tratados com o extrato da planta. O asterisco aponta para o centro da lesão e as setas indicam células polimorfonucleares. Escalas: 100 µm (A,C); 20 µm (B,D).

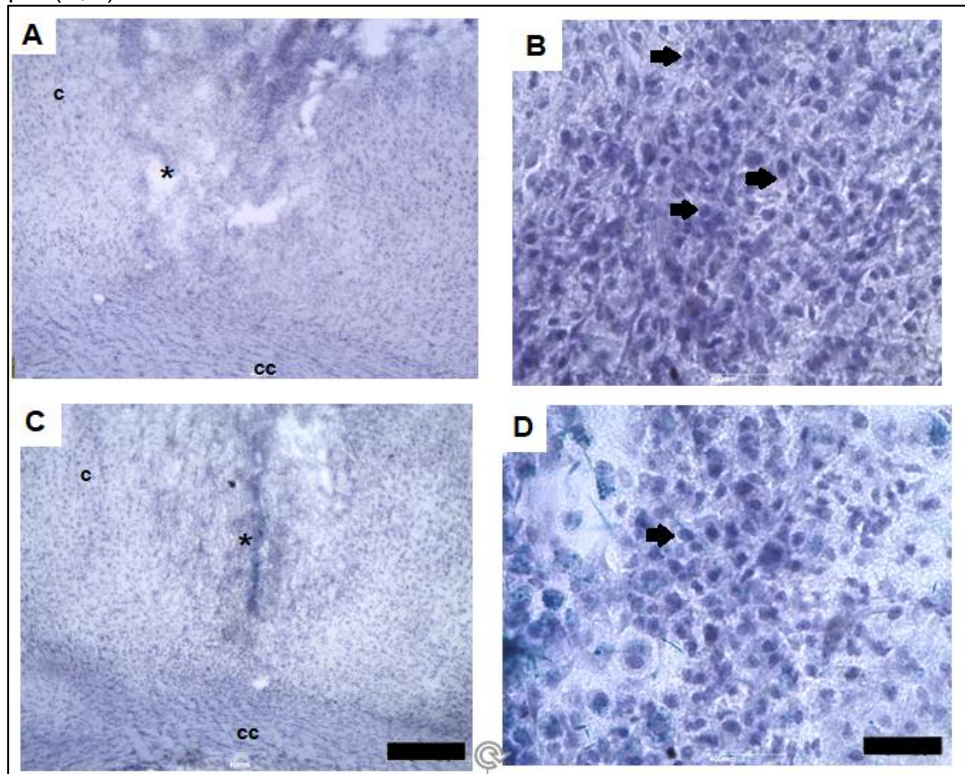


FIGURA 11 - Histopatologia básica revelada pela coloração com violeta de cresila em animais isquêmicos tratados com solução salina (A e B) e com 100 mg/kg de extrato *C. verticillata* (C e D) sete dias após a lesão. Infiltrado de células inflamatórias é menor nos animais tratados. O asterisco aponta para o centro da lesão e as setas indicam células mononucleares. Córtex motor (CO) e corpo caloso (CC). Escalas: 100 µm (A,C); 20 µm (B,D).

3.2.2. Inibição do recrutamento de neutrófilos pelo tratamento com extrato de *Cissus verticillata* após lesão focal do córtex motor.

A presença de neutrófilos no córtex motor isquêmico foi avaliada realizando ensaio imunohistoquímico para MBS1, um anticorpo que marca a população geral de neutrófilos. A micro injeção de ET-1 no córtex motor induziu intenso recrutamento de neutrófilos, vinte quatro horas após o início do processo isquêmico (Fig. 12 A e B). Contudo, o tratamento com 100 mg/kg de extrato de cipó pucá via intraperitoneal induziu uma diminuição significativa do recrutamento destes neutrófilos na área de lesão (Figura 12 C e D).

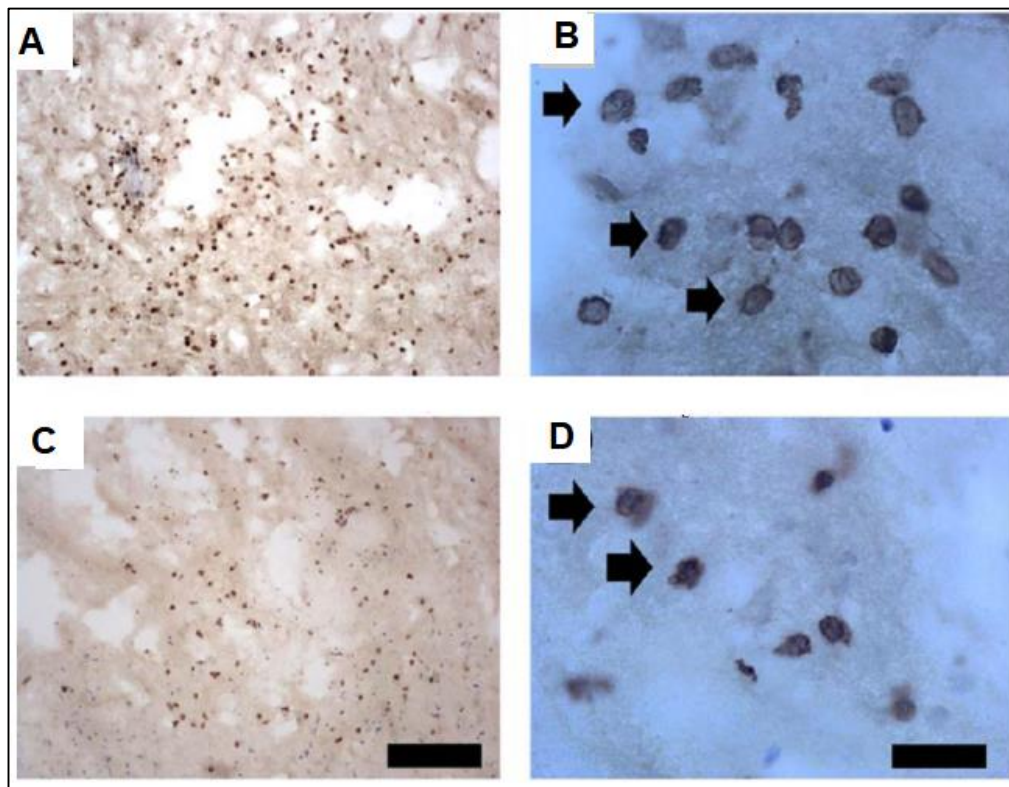


Figura 12. Recrutamento de neutrófilos em animais isquêmicos tratados com solução salina estéril (A e B) e com 100 mg/Kg de extrato cipó pucá (C e D) vinte e quatro horas após a lesão. O infiltrado inflamatório é menor nos animais tratados com extrato de *C. verticillata*. As setas apontam para neutrófilos em B e D. Escalas: 100 µm (A,C); 20 µm (B,D).

3.2.3. Reatividade de astrócitos no centro e na região de penumbra da lesão isquêmica após microinjeções de endotelina-1 e tratamento com extrato de *Cissus verticillata*.

Após lesão isquêmica por endotelina-1 em todos os grupos experimentais a reatividade dos astrócitos foi evidenciada pelo método imunohistoquímico específico com utilização do anticorpo da proteína glial fibrilar (anti-GFAP). Essa marcação mostrou que a distribuição das células GFAP⁺ que foram evidenciadas na região periférica e centro de lesão (Fig. 13 A e B; C e D). Aparentemente houve diferença na reatividade dos astrócitos próximo ao centro de lesão, bem como na área periférica, no grupo experimental que foi tratado com o extrato da planta após uma janela temporal de sete dias. (Fig. 13 C e D).

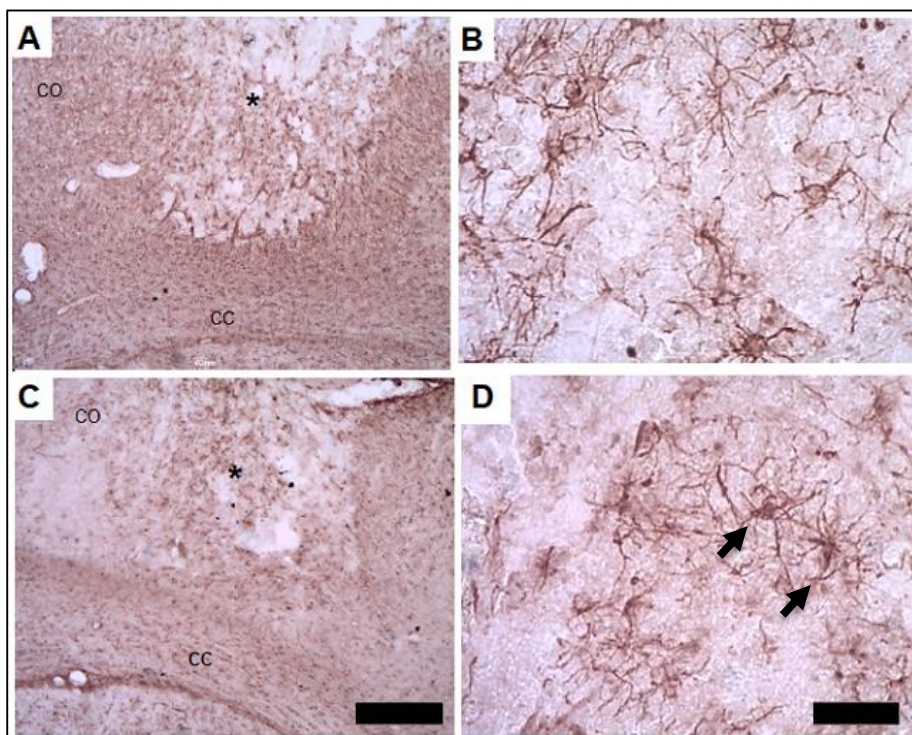


FIGURA 13 - Reatividade de astrócitos após lesão isquêmica focal. Grupo controle (A e B), Grupo tratado (C e D). O asterisco aponta para o centro da lesão e as setas indicam os astrócitos reativos. Córtex motor (CO) e corpo caloso (CC). Escalas: 100 μ m (A,C); 20 μ m (B,D).

3.2.4. O tratamento com extrato de *Cissus verticillata* reduz o recrutamento de microglia/macrófago após lesão focal do córtex motor.

A avaliação da presença de células mononucleares no córtex motor lesado, foi evidenciado na janela temporal de sete dias após realização de imunohistoquímica para IBA-1, um anticorpo que marca a população geral de microglia/macrófagos. A microinjeção de ET-1 no córtex motor também promoveu a perda tecidual e a infiltração intensa de macrófagos e/ou microglia ativados (Figura 14 A e B) no grupo tratado apenas com solução salina e twenn 5%. Entretanto, o grupo tratado com extrato de *C. verticillata* (Figura 14 C e D) apresentou uma significativa diminuição do recrutamento destas células mononucleares, uma redução do infiltrado inflamatório e uma diminuição da cavitação tecidual, na figura 14 D observa-se ainda a presença do corante azul de colonil indicando o local exato da injeção de Endotelina 1. A quantidade de células microglia/macrófagos ativadas no grupo controle foi cerca de 31% menor comparando com o grupo tratado com o extrato da planta ($71,22 \pm 1,30EP$; $37,25 \pm 0,81EP$, respectivamente); desvio padrão 13,20; 7,90 no grupo controle e tratado, respectivamente, também apresentando um $p < 0,01$ indicando um índice de alta significância.

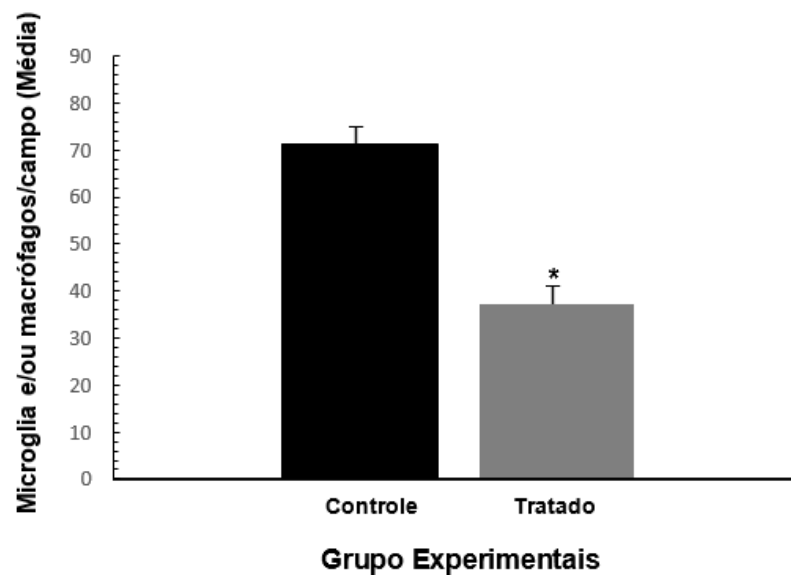
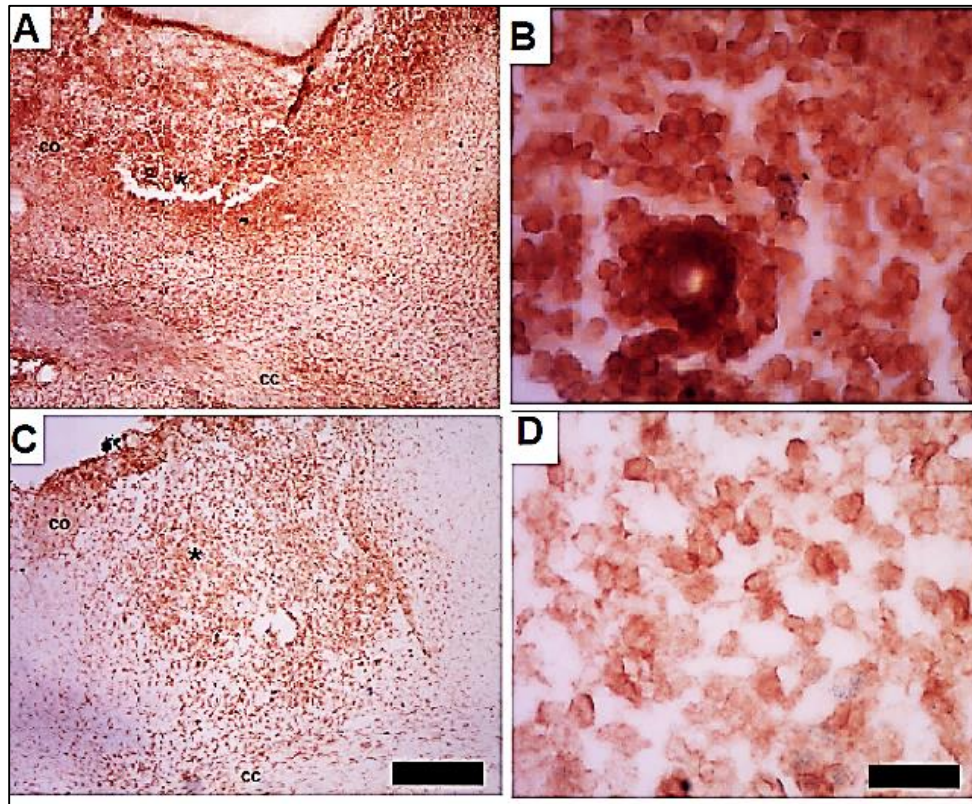


Figura 14. Recrutamento de microglia/magrofágo em animais isquêmicos tratados com solução salina (A e B) e com 100 mg/Kg de extrato de cipó pucá (C e D). O infiltrado inflamatório e o recrutamento de mononucleares é menor nos animais tratados com extrato de *C. verticillata*. O asterisco aponta para o centro da lesão. Córtex motor (CO) e corpo caloso (CC). Escalas: 100 μ m (A,C); 20 μ m (B,D).

3.2.5. O tratamento com extrato de *Cissus verticillata* reduz a perda neuronal após lesão focal do córtex motor de ratos adultos.

A imunohistoquímica para o anticorpo NeuN mostrou que houve perda de neurônios nos grupos experimentais em todos os tempos de sobrevivência, principalmente nos animais isquêmicos tratados com solução salina e Tween 5% (Fig. 15 A e B), contudo, foi evidenciado no grupo tratado com o extrato da planta uma quantidade significativa de corpos neuronais indicado pelas células Neu N⁺ sete dias após a indução da isquemia focal (Fig. 15 C e D). A quantidade de células Neu N⁺ no grupo tratado foi cerca de 17% maior que no grupo controle ($35,77 \pm 2,42EP$; $25,40 \pm 2,37EP$, respectivamente) com um $p < 0,01$ indicando um índice de alta significância.

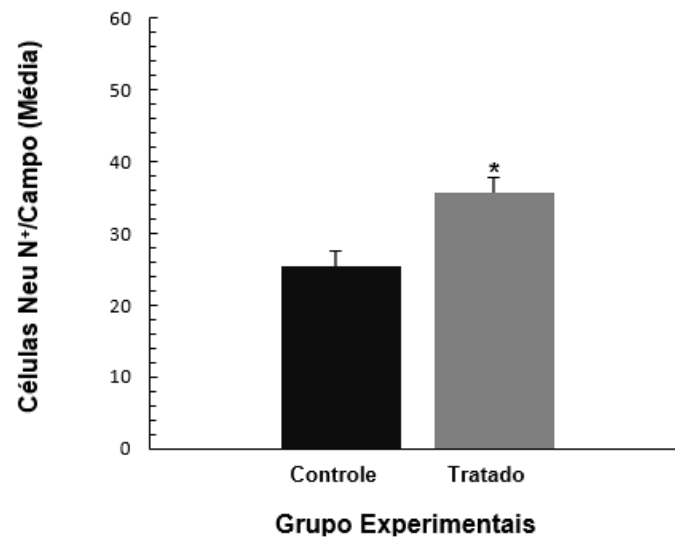
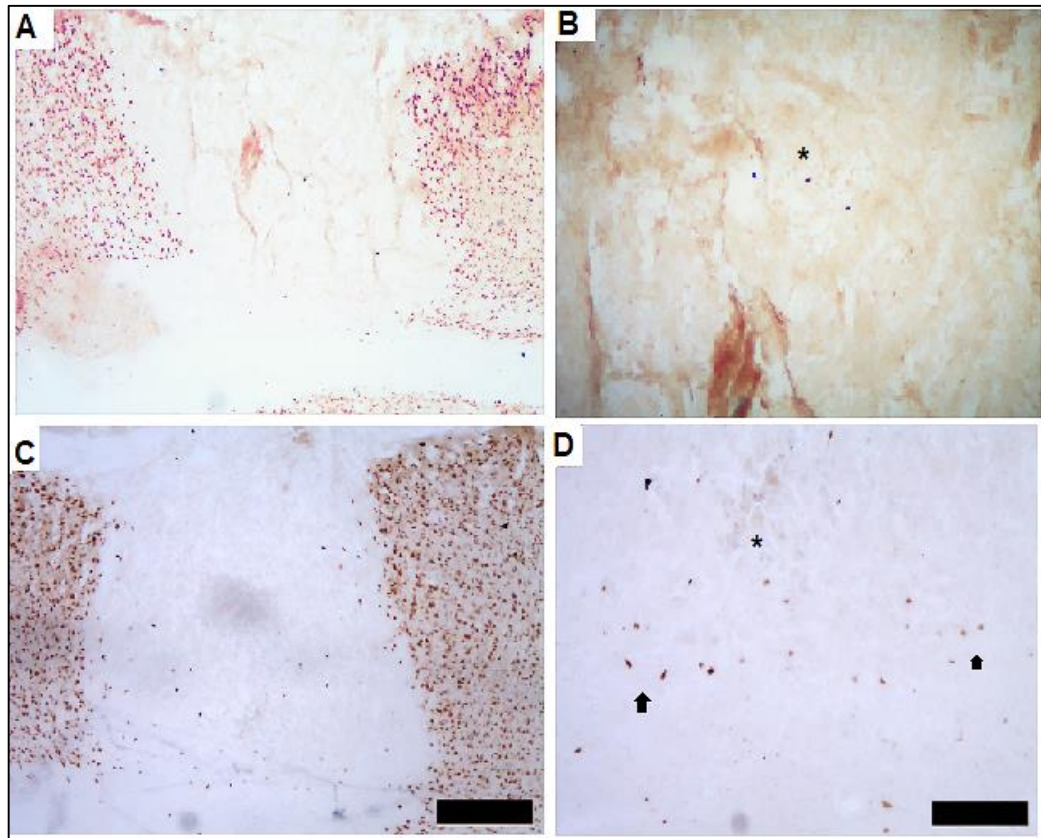


Figura 15. Animais isquêmicos tratados com solução salina (A e B) grupo controle e visualização de corpos neuronais em animais tratados com 100 mg/Kg de extrato de *C. verticillata* (C e D) sete dias após a lesão. O asterisco aponta para o centro da lesão (observar a presença do corante azul de colôn) e as setas indicam células Neu N⁺. Escalas: 100 μ m (A,C); 60 μ m (B,D).

4.0 DISCUSSÃO

A derivatização das placas com ácido vanilina-sulfúrico (VS) (Fig. 9 A) mostram a formação de bandas com coloração púrpura/lilás indicando a presença de terpenos de acordo com dados publicados por H. Wagner e Jork e colaboradores (H. WAGNER, 1996; JORK et al., 1990). A derivatização fotoquímica da placa contendo FeCl_3 (Fig. 9 B) apresentou uma coloração laranja-castanho indicando a presença de compostos fenólicos de acordo com dados publicados (H. WAGNER, 1996).

As placas contendo NP/PEG (Fig. 9 C) foram visualizadas com luz UV, comprimento de onda de 366 nm, os compostos presentes no extrato tornaram-se fluorescentes após a excitação com esta radiação justificando a presença de flavonoides pela coloração característica da banda, o resultado estima o conteúdo de todos os subgrupos desta classe de compostos, tais como flavonóis, flavonas, flavanas, isoflavonoides e antocianinas que estão presentes no extrato (H. WAGNER, 1996; JORK et al., 1990). Na derivatização da placa contendo DPPH (Fig. 9 D) a presença de manchas amareladas na parte inferior roxo da placa indica a redução dos radicais DPPH- (KEDARE; SINGH, 2011). A ocorrência da reação é explicada pelo fato do DPPH ser reduzido na presença de substâncias antioxidantes, perdendo assim sua coloração roxa (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; RAMADAN et al., 2012). Os resultados da atividade antioxidante do extrato estão relacionados aos resultados obtidos pelos compostos fenólicos totais e seus rendimentos de extração, confirmando que a atividade antioxidante de plantas é dependente da quantidade de compostos fenólicos (DO et al., 2014; GARCIA-SALAS et al., 2010). Portanto, este composto caracteriza-se como uma fonte natural com potencial antioxidante que pode vir a serem úteis na prevenção de doenças associadas ao estresse oxidativo (AKOMOLAFE et al., 2013), entretanto, a atividade antioxidante pode ser atribuída aos compostos fenólicos presentes nos extratos, de acordo com dados publicados por Khalil e colaboradores (KHALIL; PEPATO; BRUNETTI, 2008) para extratos aquosos de *C. sicyoides* e similares, Prabhavathi e colaboradores (PRABHAVATHI; PRASAD; JAYARAMU, 2016) também relataram que extratos de plantas pertencentes à família Vitaceae possuem a mesma atividade, assim como para algumas espécies como *Cissus quadrangulares* e *Cissus populnea* (AKOMOLAFE et al., 2013) e ainda a espécie *Cissus cornifolia* (CHIPITI et al., 2015). Os resultados evidenciam a presença

(reação positiva) de radicais químicos característicos da planta, tais como terpenos, compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante. Achados semelhantes foram relatados por Viana e colaboradores (VIANA et al., 2004) em extratos aquosos de *Cissus sicyoides* analisados pelo método de cromatografia de camada delgada (TLC).

Compostos fenólicos agem prevenindo ou retardando o estresse oxidativo, atuando assim como sequestrantes de radicais livres e reduzindo o aparecimento de diferentes doenças crônicas (MUSTAFA et al., 2010). No entanto, eles possuem uma grande capacidade de inibir mediadores inflamatórios, tais como o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e proteína ativadora 1, assim esta identificação, desempenha um papel importante na progressão e desenvolvimento nas doenças inflamatórias.

As células mononucleares presentes no local da lesão são compostas principalmente por macrófagos cerebrais derivados da micróglia residente e de células transportadas pelo sangue (SCHILLING et al., 2003). Existem evidências consideráveis de que a ativação exacerbada da microglia contribui para o dano secundário após o acidente vascular encefálico, a inibição da ativação da microglia com o uso de minociclina reduz a área de infarto e a inflamação após a isquemia focal, tanto no córtex como no corpo estriado (CARDOSO et al., 2013; SOUZA et al., 2017; YRJANHEIKKI et al., 1999).

Os mecanismos subjacentes aos efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores de *Cissus verticillata* ainda são desconhecidos. No entanto, a modulação da ativação da microglia pode estar envolvida. Tem sido demonstrado que ambas as microglia, a prejudicial (M1) e a benéfica (M2) são fenótipos presentes após o acidente vascular cerebral (HU et al., 2012). É possível que o extrato da planta contenha compostos com propriedades imunomoduladoras, induzindo assim uma mudança em direção a um fenótipo M2 preferencialmente no ambiente isquêmico. Além disso, os efeitos neuroprotetores de *Cissus verticillata* podem estar relacionados com a sua atividade antioxidante e a presença de compostos fenólicos em sua composição química (BESERRA et al., 2016; GARCIA et al., 2000; QUILTZ et al., 2004).

O extrato da planta aumentou os efeitos anti-inflamatórios e atividade antioxidante, indicando um potencial agente neuroprotetor, considerando que o estresse oxidativo e exacerbação da inflamação são os principais componentes da fisiopatologia no acidente vascular cerebral (GOMES-LEAL, 2012; MOSKOWITZ et al., 2010).

A ativação dos astrócitos é considerado uma das funções benéficas após o acidente vascular encefálico e outros distúrbios neurais (BARRETO et al., 2011; BUFFO et al., 2010), representa um fator determinante após a o AVE isquêmico (PEKNY, MILOS et al., 2018). Os astrócitos contribuem para a migração de neuroblastos para o estriado após o AVE, liberando o fator-1 α derivado do estroma (SDF-1) e proteína 1 quimiotática de monócitos (MCP-1) (THORED et al., 2006; YAN et al., 2006). Os astrócitos reativos são neuroprotetores na fase aguda da lesão, no entanto, na fase pós aguda até a fase crônica eles atuam como reguladores positivos e negativos da plasticidade neural, incluindo geração de novos neurônios, brotamentos de axônios e controle do número e da função das sinapses, todas essas características podem ser associadas a melhoria do resultado funcional (PEKNY, MILOS et al., 2018).

Em estudos anteriores publicados pelo grupo do Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental do instituto de ciências biológicas da Universidade Federal do Pará, foi publicado evidências de que os extratos obtidos a partir de plantas da região amazônica e extraídas pelo método supercrítico possuem consideráveis efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores em modelos experimentais de excitotoxicidade, observou-se que o óleo resina de copaíba possui um efeito anti-inflamatório e neuroprotetor para modelo de lesão isquêmica excitotóxica com NMDA no encéfalo em animais experimentais, caracterizada por uma diminuição do infiltrado inflamatório de células mononucleares, cavitação tecidual e redução de microglia e/ou macrófagos ativados após quatro dias de administração do extrato, redução de neutrófilos, infiltrado de células polimorfonucleares e perda tecidual após um dia da aplicação do extrato (BOTELHO et al., 2015; GUIMARAES-SANTOS et al., 2012), em acidente vascular cerebral (BOTELHO et al., 2014) e diminuição da cavitação tecidual e redução do recrutamento de células mononucleares sete dias após a lesão isquêmica (SALAZAR et al., 2018).

No presente estudo apresentamos novas informações sobre os potenciais efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores de *Cissus verticillata*. A redução exacerbada da resposta inflamatória no sistema nervoso central é de importância considerável, como se acredita, que este fenômeno patológico possa contribuir para a lesão do tecido, embora também pode induzir neuroproteção (GOMES-LEAL, 2012).

5 CONCLUSÃO

O tratamento com o extrato de *Cissus verticillata* extraído com o método supercrítico, na concentração de dose 100 mg/kg em animais com isquemia focal induzida por micro injeções de endotelina 1, diminui significativamente o recrutamento de neutrófilos e/ou células polimorfonucleares para o córtex motor de ratos adultos após a lesão isquêmica. O tratamento destes animais com sete doses diárias do extrato diminuiu em cerca de 31% a ativação de micróglia/macrófago no modelo experimental proposto, também foi percebida a ativação de astrócitos no centro da lesão e área periférica e o aumento de cerca de 17% do número de neurônios na área de lesão. Os efeitos anti-inflamatórios foram associados à conspícua neuroproteção, evidenciada pela diminuição da perda tecidual e a preservação de neurônios no centro da lesão como também na sua periferia. O extrato da planta possui componentes ativos, como compostos fenólicos, flavonoides, terpenos, esteroides, ácidos graxos e propriedades antioxidantes que contribuem para a atividade neuroprotetora.

Os efeitos do tratamento com extrato de cipó puçá, com diferentes concentrações e tempos de sobrevida, sobre outras células inflamatórias, a exemplo de linfócitos, bem como os eventos moleculares envolvidos, devem ser investigados em estudos futuros para a compreensão dos mecanismos sinérgicos de ação da planta no sistema nervoso central lesionado.

REFERÊNCIAS

(ASAE), A. S. O. A. E. Method of Determining and Expressing Fineness of Feed Materials by Sieving. 1993.

ABUMIYA, T. et al. Activated microvessels express vascular endothelial growth factor and integrin $\alpha(v)\beta 3$ during focal cerebral ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 19, n. 9, p. 1038-50, Sep 1999.

ADIBHATLA, R. M.; HATCHER, J. F. Tissue plasminogen activator (tPA) and matrix metalloproteinases in the pathogenesis of stroke: therapeutic strategies. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 7, n. 3, p. 243-53, Jun 2008.

AKOMOLAFE, S. F. et al. Inhibitory Effect of Aqueous Extract of Stem Bark of *Cissus populnea* on Ferrous Sulphate- and Sodium Nitroprusside-Induced Oxidative Stress in Rat's Testes In Vitro. **ISRN Pharmacol**, v. 2013, p. 130989, 2013.

ALKAYED, N. J. et al. Gender-linked brain injury in experimental stroke. **Stroke**, v. 29, n. 1, p. 159-65; discussion 166, Jan 1998.

ASCHNER, J. L. et al. Bradykinin- and thrombin-induced increases in endothelial permeability occur independently of phospholipase C but require protein kinase C activation. **J Cell Physiol**, v. 173, n. 3, p. 387-96, Dec 1997.

BARDEHLE, S. et al. Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation. **Nat Neurosci**, v. 16, n. 5, p. 580-6, May 2013.

BARRETO, G. E. et al. Astrocyte proliferation following stroke in the mouse depends on distance from the infarct. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27881, 2011.

BAUER, H. et al. The dual role of zonula occludens (ZO) proteins. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 402593, 2010.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am J Physiol**, v. 271, n. 5 Pt 1, p. C1424-37, Nov 1996.

BELAYEV, L. et al. Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. **Brain Res**, v. 739, n. 1-2, p. 88-96, Nov 11 1996.

BELL, R. D.; ZLOKOVIC, B. V. Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. **Acta Neuropathol**, v. 118, n. 1, p. 103-13, Jul 2009.

BELTRAME, F.; FERREIRA, A.; CORTEZ, D. Coumarin Glycoside from *Cissus Sicyoides*. **Natural Product Letters**, v. 16, n. 4, p. 213-216, 2002/01/01 2002.

BELTRAME, F. L. S., J. L. ; BAZOTTE, R. B.; CUMAN, R. N.; CORTEZ, D. A. G. ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIDIABÉTICO DO CISSUS SICYOIDES L. (VITACEAE). **Quim. Nova**, v. 24, n. 6, 8/2/2001 2001.

BEMEUR, C.; STE-MARIE, L.; MONTGOMERY, J. Increased oxidative stress during hyperglycemic cerebral ischemia. **Neurochem Int**, v. 50, n. 7-8, p. 890-904, Jun 2007.

BENN, S. C.; WOOLF, C. J. Adult neuron survival strategies--slamming on the brakes. **Nat Rev Neurosci**, v. 5, n. 9, p. 686-700, Sep 2004.

BESERRA, F. P. et al. Cissus sicyoides: Pharmacological Mechanisms Involved in the Anti-Inflammatory and Antidiarrheal Activities. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 2, p. 149, 2016.

BLOCK, M. L.; HONG, J. S. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. **Prog Neurobiol**, v. 76, n. 2, p. 77-98, Jun 2005.

BOLTON, S. J.; PERRY, V. H. Differential blood-brain barrier breakdown and leucocyte recruitment following excitotoxic lesions in juvenile and adult rats. **Exp Neurol**, v. 154, n. 1, p. 231-40, Nov 1998.

BOTELHO, J. R. S. et al. Black sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds extracts by CO₂ supercritical fluid extraction: Isotherms of global yield, kinetics data, total fatty acids, phytosterols and neuroprotective effects. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 93, p. 49-55, 9// 2014.

BOTELHO, J. R. S. et al. Copaíba (*Copaifera* sp.) leaf extracts obtained by CO₂ supercritical fluid extraction: Isotherms of global yield, kinetics data, antioxidant activity and neuroprotective effects. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 98, p. 167-171, 3// 2015.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995/01/01/ 1995.

BROUNS, R.; DE DEYN, P. P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. **Clin Neurol Neurosurg**, v. 111, n. 6, p. 483-95, Jul 2009.

BUFFO, A.; ROLANDO, C.; CERUTI, S. Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. **Biochem Pharmacol**, v. 79, n. 2, p. 77-89, Jan 15 2010.

CABRAL, N. L. et al. Trends in stroke incidence, mortality and case fatality rates in Joinville, Brazil: 1995-2006. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 80, n. 7, p. 749-54, Jul 2009.

CABRAL, N. L. et al. Epidemiology of cerebrovascular disease in Joinville, Brazil. An institutional study]. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 55, n. 3A, p. 357-63., 1997.

CAMPOS, F. et al. Oxaloacetate: a novel neuroprotective for acute ischemic stroke. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 44, n. 2, p. 262-5, Feb 2012.

CANDELARIO-JALIL, E. Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: considerations for the development of novel neurotherapeutics. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 10, n. 7, p. 644-54, Jul 2009.

CARDOSO, M. M. et al. Minocycline Treatment and Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation After Endothelin-1 Induced Striatal Ischemia. **Inflammation**, v. 36, n. 1, p. 197-205, 2013.

CARPENTER, C. R. et al. Thrombolytic therapy for acute ischemic stroke beyond three hours. **The Journal of emergency medicine**, v. 40, n. 1, p. 82-92, Jan 2011.

CHEN, Z. L.; STRICKLAND, S. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. **Cell**, v. 91, n. 7, p. 917-25, Dec 26 1997.

CHIPITI, T. et al. In vitro antioxidant activity and GC-MS analysis of the ethanol and aqueous extracts of *Cissus cornifolia* (Baker) Splanck (Vitaceae) parts. **Acta Pol Pharm**, v. 72, n. 1, p. 119-27, Jan-Feb 2015.

CHOI, D. W. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. **Trends Neurosci**, v. 11, n. 10, p. 465-9, Oct 1988.

_____. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. **Trends Neurosci**, v. 18, n. 2, p. 58-60, Feb 1995.

CIMINO, M. et al. Neuroprotective effect of simvastatin in stroke: a comparison between adult and neonatal rat models of cerebral ischemia. **Neurotoxicology**, v. 26, n. 5, p. 929-33, Oct 2005.

COYLE, J. T.; PUTTFARCKEN, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. **Science**, v. 262, n. 5134, p. 689-95, Oct 29 1993.

CROWLEY, T. et al. Inhibiting neuroinflammation: The role and therapeutic potential of GABA in neuro-immune interactions. **Brain Behav Immun**, v. 54, p. 260-77, May 2016.

DE OLIVEIRA, M. S. et al. Chemical composition and phytotoxic activity of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil obtained with supercritical CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 118, p. 185-193, 2016/12/01/ 2016.

DEB, P.; SHARMA, S.; HASSAN, K. M. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. **Pathophysiology**, v. 17, n. 3, p. 197-218, Jun 2010.

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

DEL ZOPPO, G. et al. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. **Brain Pathol**, v. 10, n. 1, p. 95-112, Jan 2000.

DEL ZOPPO, G. J.; HALLENBECK, J. M. Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. **Thromb Res**, v. 98, n. 3, p. 73-81, May 1 2000.

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.

DO, Q. D. et al. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. **J Food Drug Anal**, v. 22, n. 3, p. 296-302, Sep 2014.

DOWD, L. E. Spectrophotometric Determination of Quercetin. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 7, p. 1184-1187, 1959/07/01 1959.

DOYLE, K. P.; SIMON, R. P.; STENZEL-POORE, M. P. Mechanisms of ischemic brain damage. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 310-8, Sep 2008.

DROBNIK, J.; DE OLIVEIRA, A. B. *Cissus verticillata* (L.) Nicolson and C.E. Jarvis (Vitaceae): Its identification and usage in the sources from 16th to 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 171, p. 317-329, 2015/08/02/ 2015.

EKDAHL, C. T.; KOKAIA, Z.; LINDVALL, O. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. **Neuroscience**, v. 158, n. 3, p. 1021-9, Feb 6 2009.

EKSHYYAN, O.; AW, T. Y. Apoptosis: a key in neurodegenerative disorders. **Curr Neurovasc Res**, v. 1, n. 4, p. 355-71, Oct 2004.

ELDADAH, B. A.; FADEN, A. I. Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. **J Neurotrauma**, v. 17, n. 10, p. 811-29, Oct 2000.

ENZMANN, G. et al. The neurovascular unit as a selective barrier to polymorphonuclear granulocyte (PMN) infiltration into the brain after ischemic injury. **Acta Neuropathol**, v. 125, n. 3, p. 395-412, Mar 2013.

FAN, X. et al. Pharmacological neuroprotection after perinatal hypoxic-ischemic brain injury. **Curr Neuropharmacol**, v. 8, n. 4, p. 324-34, Dec 2010.

FONAROW, G. C. et al. Timeliness of tissue-type plasminogen activator therapy in acute ischemic stroke: patient characteristics, hospital factors, and outcomes associated with door-to-needle times within 60 minutes. **Circulation**, v. 123, n. 7, p. 750-8, Feb 22 2011.

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.

FUKUDA, S. et al. Focal cerebral ischemia induces active proteases that degrade microvascular matrix. **Stroke**, v. 35, n. 4, p. 998-1004, Apr 2004.

FURUKAWA, K. et al. The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. **J Neurosci**, v. 17, n. 21, p. 8178-86, Nov 1 1997.

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.

FUXE, K. et al. Centrally administered endothelin-1 produces lesions in the brain of the male rat. **Acta Physiol Scand**, v. 137, n. 1, p. 155-6, Sep 1989.

GARCIA-SALAS, P. et al. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8813-26, Dec 3 2010.

GARCIA, M. D. et al. Anti-inflammatory activity of Agave intermixta Trel. and Cissus sicyoides L., species used in the Caribbean traditional medicine. **J Ethnopharmacol**, v. 71, n. 3, p. 395-400, Aug 2000.

GASCHE, Y. et al. Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 21, n. 12, p. 1393-400, Dec 2001.

GELDERBLOM, M. et al. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. **Stroke**, v. 40, n. 5, p. 1849-57, May 2009.

GEORGÉ, S. et al. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1370-1373, 2005/03/01 2005.

GIDDAY, J. M. et al. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 289, n. 2, p. H558-68, Aug 2005.

GOMES-LEAL, W. Microglial physiopathology: how to explain the dual role of microglia after acute neural disorders? **Brain Behav**, v. 2, n. 3, p. 345-56, May 2012.

GOMES-LEAL, W. et al. Astrocytosis, microglia activation, oligodendrocyte degeneration, and pyknosis following acute spinal cord injury. **Exp Neurol**, v. 190, n. 2, p. 456-67, Dec 2004.

GOMES-LEAL, W.; CORKILL, D. J.; PICANCO-DINIZ, C. W. Systematic analysis of axonal damage and inflammatory response in different white matter tracts of acutely injured rat spinal cord. **Brain Res**, v. 1066, n. 1-2, p. 57-70, Dec 20 2005.

GOULART, J. M. et al. Ischemic stroke in an adult with glycogen storage disease type I. **J Clin Neurosci**, v. 17, n. 11, p. 1467-9, Nov 2010.

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.

H. WAGNER, S. B. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. **Springer-Verlag**, v. 2 Ed., 1996.

HAMANN, G. F. et al. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. **Stroke**, v. 26, n. 11, p. 2120-6, Nov 1995.

HAWKINS, B. T.; DAVIS, T. P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. **Pharmacol Rev**, v. 57, n. 2, p. 173-85, Jun 2005.

HEO, J. H. et al. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 19, n. 6, p. 624-33, Jun 1999.

HONG, H.; KIM, B. S.; IM, H. I. Pathophysiological Role of Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases and Psychiatric Disorders. **Int Neurol J**, v. 20, n. Suppl 1, p. S2-7, May 2016.

HORNIG, C. R. et al. Changes in CSF blood-brain barrier parameters in ischaemic cerebral infarction. **J Neurol**, v. 229, n. 1, p. 11-6, 1983.

HOSSMANN, K. A. Experimental models for the investigation of brain ischemia. **Cardiovasc Res**, v. 39, n. 1, p. 106-20, Jul 1998.

HU, X. et al. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. **Stroke**, v. 43, n. 11, p. 3063-70, Nov 2012.

HUGHES, P. M. et al. Focal lesions in the rat central nervous system induced by endothelin-1. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 62, n. 12, p. 1276-86, Dec 2003.

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.

IADECOLA, C.; ANRATHER, J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. **Nat Med**, v. 17, n. 7, p. 796-808, Jul 2011a.

_____. Stroke research at a crossroad: asking the brain for directions. **Nat Neurosci**, v. 14, n. 11, p. 1363-8, Nov 2011b.

IADECOLA, C. et al. Local and propagated vascular responses evoked by focal synaptic activity in cerebellar cortex. **J Neurophysiol**, v. 78, n. 2, p. 651-9, Aug 1997.

IHRIE, R. A.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Lake-front property: a unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain. **Neuron**, v. 70, n. 4, p. 674-86, May 26 2011.

ITO, D. et al. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 57, n. 1, p. 1-9, Jun 1 1998.

ITO, D. et al. Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. **Stroke**, v. 32, n. 5, p. 1208-15, May 2001.

JACOBS, M. B. **The chemical analysis of foods and food products**. 3d. Huntington, N.Y.: R. E. Krieger Pub. Co., 1973. xxiv, 970 p. ISBN 088275131X.

JANDER, S. et al. Lymphocytic infiltration and expression of intercellular adhesion molecule-1 in photochemically induced ischemia of the rat cortex. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 15, n. 1, p. 42-51, Jan 1995.

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

JOHNSTON, S. C.; MENDIS, S.; MATHERS, C. D. Global variation in stroke burden and mortality: estimates from monitoring, surveillance, and modelling. **Lancet Neurol**, v. 8, n. 4, p. 345-54, Apr 2009.

JORK, H. et al. Thin-layer chromatography. Reagents and detection methods. Physical and chemical detection methods: fundamentals, reagents I. Volume 1a: VCH, Weinheim, 1990 (ISBN 3-527-27834-6). xv + 464 pp. Price DM 148.00. **Analytica Chimica Acta**, v. 237, p. 511-512, 1990/01/01/ 1990.

KANG, D. C. et al. Cloning and characterization of HIV-1-inducible astrocyte elevated gene-1, AEG-1. **Gene**, v. 353, n. 1, p. 8-15, Jun 20 2005.

KARASZEWSKI, B. et al. Early brain temperature elevation and anaerobic metabolism in human acute ischaemic stroke. **Brain**, v. 132, n. Pt 4, p. 955-64, Apr 2009.

KASTRUP, A. et al. Dynamics of cerebral injury, perfusion, and blood-brain barrier changes after temporary and permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. **J Neurol Sci**, v. 166, n. 2, p. 91-9, Jul 1 1999.

KATO, H. et al. Progressive expression of immunomolecules on activated microglia and invading leukocytes following focal cerebral ischemia in the rat. **Brain Res**, v. 734, n. 1-2, p. 203-12, Sep 23 1996.

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 412-422, August 01 2011.

KHALIL, N. M.; PEPATO, M. T.; BRUNETTI, I. L. Free radical scavenging profile and myeloperoxidase inhibition of extracts from antidiabetic plants: *Bauhinia forficata* and *Cissus sicyoides*. **Biol Res**, v. 41, n. 2, p. 165-71, 2008.

KIM, S. U.; DE VELLIS, J. Microglia in health and disease. **J Neurosci Res**, v. 81, n. 3, p. 302-13, Aug 1 2005.

KIMURA-OHBA, S.; YANG, Y. Oxidative DNA Damage Mediated by Intranuclear MMP Activity Is Associated with Neuronal Apoptosis in Ischemic Stroke. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 6927328, 2016.

KISSELA, B. M. et al. Age at stroke: temporal trends in stroke incidence in a large, biracial population. **Neurology**, v. 79, n. 17, p. 1781-7, Oct 23 2012.

KREUTZBERG, G. W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends Neurosci**, v. 19, n. 8, p. 312-8, Aug 1996.

KRIZ, J. Inflammation in ischemic brain injury: timing is important. **Crit Rev Neurobiol**, v. 18, n. 1-2, p. 145-57, 2006.

KUNZ, A.; DIRNAGL, U.; MERGENTHALER, P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 24, n. 4, p. 495-509, 12// 2010.

LIEBESKIND, D. S. Reperfusion for acute ischemic stroke: arterial revascularization and collateral therapeutics. **Curr Opin Neurol**, v. 23, n. 1, p. 36-45, Feb 2010.

LINDGREN, A. et al. Tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in stroke patients. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 27, n. 6, p. 1066-71, Jun 1996.

LIU, W.; TANG, Y.; FENG, J. Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. **Life Sci**, v. 89, n. 5-6, p. 141-6, Aug 1 2011.

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.

LOMBARDI, J. A. **Vitaceae: gêneros Ampelocissus, Ampelopsis e Cissus**. . New York: Flora Neotropica Monograph 80, 2000.

LORBERBOYM, M.; LAMPL, Y.; SADEH, M. Correlation of 99mTc-DTPA SPECT of the blood-brain barrier with neurologic outcome after acute stroke. **J Nucl Med**, v. 44, n. 12, p. 1898-904, Dec 2003.

LORENZI, H. M., F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. 2008. 829 ISBN 85-86714-28-3.

LOTUFO, P. A. Stroke in Brazil: a neglected disease. **Sao Paulo Med J**, v. 123, n. 1, p. 3-4, Jan 2 2005.

LOTUFO, P. A.; BENSENOR, I. M. Improving WHO STEPS Stroke in Brazil. **Lancet neurology**, v. 6, n. 5, p. 387-8; author reply 388-9, May 2007a.

_____. Improving WHO STEPS Stroke in Brazil. **Lancet Neurol**, v. 6, n. 5, p. 387-8; author reply 388-9, May 2007b.

LOTUFO, P. A.; DE LOLIO, C. A. Trends of mortality from cerebrovascular disease in the State of Sao Paulo: 1970 to 1989. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 51, n. 4, p. 441-6, Dec 1993.

LOVE, S. Oxidative stress in brain ischemia. **Brain Pathol**, v. 9, n. 1, p. 119-31, Jan 1999.

MA, Y. et al. The biphasic function of microglia in ischemic stroke. **Prog Neurobiol**, Feb 2 2016.

MACREZ, R. et al. Stroke and the immune system: from pathophysiology to new therapeutic strategies. **Lancet Neurol**, v. 10, n. 5, p. 471-80, May 2011.

MARKUS, H. Stroke: causes and clinical features. **Medicine**, v. 36, n. 11, p. 586-591, 11// 2008.

MARRONE, L. C.; MARRONE, A. C. Acute ischemic stroke and new anticoagulants - how to act in the acute phase of stroke? **Cerebrovasc Dis**, v. 35, n. 1, p. 91, 2013.

MEDA, A. et al. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, n. 3, p. 571-577, 2005/07/01/ 2005.

MELDRUM, B. et al. Ischaemic brain damage: the role of excitatory activity and of calcium entry. **Br J Anaesth**, v. 57, n. 1, p. 44-6, Jan 1985.

MERGENTHALER, P.; DIRNAGL, U.; MEISEL, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. **Metab Brain Dis**, v. 19, n. 3-4, p. 151-67, Dec 2004.

MIFSUD, G. et al. Oligodendrocyte pathophysiology and treatment strategies in cerebral ischemia. **CNS Neurosci Ther**, v. 20, n. 7, p. 603-12, Jul 2014.

MILDNER, A. et al. Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. **Nat Neurosci**, v. 10, n. 12, p. 1544-53, Dec 2007.

MINELLI, C.; FEN, L. F.; MINELLI, D. P. Stroke incidence, prognosis, 30-day, and 1-year case fatality rates in Matao, Brazil: a population-based prospective study. **Stroke**, v. 38, n. 11, p. 2906-11, Nov 2007.

MORRISON, H. W.; FILOSA, J. A. A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. **J Neuroinflammation**, v. 10, p. 4, 2013.

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.

MOZAFFARIAN, D. et al. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 131, n. 4, p. e29-322, Jan 27 2015.

MULLEN, R. J.; BUCK, C. R.; SMITH, A. M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. **Development**, v. 116, n. 1, p. 201-11, Sep 1992.

MUSTAFA, R. A. et al. Total Phenolic Compounds, Flavonoids, and Radical Scavenging Activity of 21 Selected Tropical Plants. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 1, p. C28-C35, 2010.

NAKKA, V. P. et al. Molecular mechanisms of apoptosis in cerebral ischemia: multiple neuroprotective opportunities. **Mol Neurobiol**, v. 37, n. 1, p. 7-38, Feb 2008.

NAPOLI, I.; NEUMANN, H. Microglial clearance function in health and disease. **Neuroscience**, v. 158, n. 3, p. 1030-8, Feb 6 2009.

NEDELTCHEV, K. et al. Ischaemic stroke in young adults: predictors of outcome and recurrence. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 76, n. 2, p. 191-5, Feb 2005.

NEUMANN, H.; WEKERLE, H. Brain microglia: watchdogs with pedigree. **Nat Neurosci**, v. 16, n. 3, p. 253-5, Mar 2013.

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.

O'COLLINS, V. E. et al. 1,026 experimental treatments in acute stroke. **Annals of neurology**, v. 59, n. 3, p. 467-77, Mar 2006.

ORELLANA, J. A.; MONTERO, T. D.; VON BERNHARDI, R. Astrocytes inhibit nitric oxide-dependent Ca(2+) dynamics in activated microglia: involvement of ATP released via pannexin 1 channels. **Glia**, v. 61, n. 12, p. 2023-37, Dec 2013.

PAXINOS, G.; WATSON, C. R.; EMSON, P. C. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. **J Neurosci Methods**, v. 3, n. 2, p. 129-49, Dec 1980.

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

PEKKNY, M.; WILHELMSSON, U.; PEKKNY, M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. **Neuroscience Letters**, v. 565, p. 30-38, 2014/04/17/ 2014.

PEKKNY, M. et al. Astrocyte activation and reactive gliosis—A new target in stroke? **Neuroscience Letters**, 2018/07/17/ 2018.

PERRY, V. H.; ANDERSSON, P. B.; GORDON, S. Macrophages and inflammation in the central nervous system. **Trends Neurosci**, v. 16, n. 7, p. 268-73, Jul 1993.

PFEILSCHIFTER, W. et al. Thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator under dabigatran anticoagulation in experimental stroke. **Ann Neurol**, v. 71, n. 5, p. 624-33, May 2012.

PONOMAREV, E. D.; VEREMEYKO, T.; WEINER, H. L. MicroRNAs are universal regulators of differentiation, activation, and polarization of microglia and macrophages in normal and diseased CNS. **Glia**, v. 61, n. 1, p. 91-103, Jan 2013.

PORCELLO MARRONE, L. C. et al. Risk factors among stroke subtypes in Brazil. **J Stroke Cerebrovasc Dis**, v. 22, n. 1, p. 32-5, Jan 2013.

PRABHAVATHI, R. M.; PRASAD, M. P.; JAYARAMU, M. In-vitro antioxidant studies of *Cissus quadrangularis* (L) extracts. **Euro. J. Exp. Bio.**, v. 6, p. 1-6, 2016.

PRADEEP, H. et al. Oxidative stress--assassin behind the ischemic stroke. **Folia Neuropathol**, v. 50, n. 3, p. 219-30, 2012.

QUILEZ, A. M. et al. Phytochemical analysis and anti-allergic study of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L. **J Pharm Pharmacol**, v. 56, n. 9, p. 1185-9, Sep 2004.

QUILLINAN, N.; HERSON, P. S.; TRAYSTMAN, R. J. Neuropathophysiology of Brain Injury. **Anesthesiol Clin**, v. 34, n. 3, p. 453-64, Sep 2016.

RAMADAN, A. et al. Evaluation of the safety and antioxidant activities of *Crocus sativus* and Propolis ethanolic extracts. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 16, n. 1, p. 13-21, 2012/01/01/ 2012.

RANSOHOFF, R. M.; PERRY, V. H. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 119-45, 2009.

REUS, G. Z. et al. The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. **Neuroscience**, v. 300, p. 141-54, Aug 6 2015.

ROSENBERG, G. A. Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. **Lancet Neurol**, v. 8, n. 2, p. 205-16, Feb 2009.

RYMNER, M. M. et al. Management of acute ischemic stroke: time is brain. **Missouri medicine**, v. 107, n. 5, p. 333-7, Sep-Oct 2010.

SACCHETTI, M. L. Is it time to definitely abandon neuroprotection in acute ischemic stroke? **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 39, n. 6, p. 1659-60, Jun 2008.

SAENZ, M. T. et al. Cytotoxic activity of *Agave intermixta* L. (Agavaceae) and *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Phytother Res**, v. 14, n. 7, p. 552-4, Nov 2000.

SALAZAR, M. A. R. et al. Chemical composition, antioxidant activity, neuroprotective and anti-inflammatory effects of cipó-pucá (*Cissus sicyoides* L.) extracts obtained from supercritical extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 138, p. 36-45, 2018/08/01/ 2018.

SAMDANI, A. F.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. **Stroke**, v. 28, n. 6, p. 1283-8, Jun 1997.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n. 2, p. 270-276, 1998.

SCHILLING, M. et al. Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. **Exp Neurol**, v. 183, n. 1, p. 25-33, Sep 2003.

SHASTRI, A.; BONIFATI, D. M.; KISHORE, U. Innate immunity and neuroinflammation. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 342931, 2013.

SIESJO, B. K. Historical overview. Calcium, ischemia, and death of brain cells. **Ann N Y Acad Sci**, v. 522, p. 638-61, 1988.

SILVA, V. D. O. F. L. B. D. A.-M. G. A. G. A. D. Padronização do extrato de *Cissus sicyoides* L. (insulina vegetal) e identificação de carotenos. **Rev. Bras. Farmacologia**, v. 5, n. 1, p. 9, 1996.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v.299, 1999. p.152-178. ISBN 0076-6879.

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.

SOUZA, C. C. et al. Comparative Therapeutic Effects of Minocycline Treatment and Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation following Striatal Stroke. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2017, p. 1976191, 2017.

SRIVASTAVA, M. High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC). **Springer-Verlag**, 2011.

STERTZ, L.; MAGALHAES, P. V.; KAPCZINSKI, F. Is bipolar disorder an inflammatory condition? The relevance of microglial activation. **Curr Opin Psychiatry**, v. 26, n. 1, p. 19-26, Jan 2013.

STEVENS, S. L. et al. The use of flow cytometry to evaluate temporal changes in inflammatory cells following focal cerebral ischemia in mice. **Brain Res**, v. 932, n. 1-2, p. 110-9, Apr 5 2002.

STOLL, G.; JANDER, S. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. **Prog Neurobiol**, v. 58, n. 3, p. 233-47, Jun 1999.

STOLL, G.; JANDER, S.; SCHROETER, M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. **Prog Neurobiol**, v. 56, n. 2, p. 149-71, Oct 1998.

STREIT, W. J.; GRAEBER, M. B. Heterogeneity of microglial and perivascular cell populations: insights gained from the facial nucleus paradigm. **Glia**, v. 7, n. 1, p. 68-74, Jan 1993.

SUGAWARA, T. et al. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. **NeuroRx**, v. 1, n. 1, p. 17-25, Jan 2004.

SWINNEN, N. et al. Complex invasion pattern of the cerebral cortex by microglial cells during development of the mouse embryo. **Glia**, v. 61, n. 2, p. 150-63, Feb 2013.

SYNTICHAKI, P.; TAVERNARAKIS, N. The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 8, p. 672-84, Aug 2003.

TANAKA, R. et al. Migration of enhanced green fluorescent protein expressing bone marrow-derived microglia/macrophage into the mouse brain following permanent focal ischemia. **Neuroscience**, v. 117, n. 3, p. 531-9, 2003.

TAYLOR, T. N. et al. Lifetime cost of stroke in the United States. **Stroke**, v. 27, n. 9, p. 1459-66, Sep 1996.

THORED, P. et al. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. **Stem Cells**, v. 24, n. 3, p. 739-47, Mar 2006.

THORED, P. et al. Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. **Glia**, v. 57, n. 8, p. 835-49, Jun 2009.

TIAN, L. et al. Neuroimmune crosstalk in the central nervous system and its significance for neurological diseases. **J Neuroinflammation**, v. 9, p. 155, 2012.

TOBIN, M. K. et al. Neurogenesis and inflammation after ischemic stroke: what is known and where we go from here. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 34, n. 10, p. 1573-84, Oct 2014.

VANNUCCI, S. J. et al. Experimental stroke in the female diabetic, db/db, mouse. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 21, n. 1, p. 52-60, Jan 2001.

VARVEL, N. H. et al. Microglial repopulation model reveals a robust homeostatic process for replacing CNS myeloid cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 44, p. 18150-5, Oct 30 2012.

VIANA, G. S. et al. Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. **BMC Pharmacology**, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2004.

VILA, M.; PRZEDBORSKI, S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 5, p. 365-75, May 2003.

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.

WANG, Y. et al. White matter injury in ischemic stroke. **Progress in Neurobiology**, 2016.

WESTON, R. M. et al. Inflammatory cell infiltration after endothelin-1-induced cerebral ischemia: histochemical and myeloperoxidase correlation with temporal changes in brain injury. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 27, n. 1, p. 100-114, Jan 2007.

WISE, P. M. et al. Estradiol is a protective factor in the adult and aging brain: understanding of mechanisms derived from in vivo and in vitro studies. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 37, n. 1-3, p. 313-9, Nov 2001.

WOLFE, C. D. The impact of stroke. **Br Med Bull**, v. 56, n. 2, p. 275-86, 2000.

WOODRUFF, T. M. et al. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. **Molecular neurodegeneration**, v. 6, n. 1, p. 11, 2011a.

_____. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. **Mol Neurodegener**, v. 6, n. 1, p. 11, 2011b.

XU, F. et al. Structures of New Flavonoids and Benzofuran-Type Stilbene and Degranulation Inhibitors of Rat Basophilic Leukemia Cells from the Brazilian Herbal Medicine *Cissus sicyoides*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, n. 10, p. 1089-1095, 2009.

YAN, Y. P. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 plays a critical role in neuroblast migration after focal cerebral ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 27, n. 6, p. 1213-1224., Dec 27 2006.

YANG, Y. et al. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 27, n. 4, p. 697-709, Apr 2007.

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.

YILMAZ, G.; GRANGER, D. N. Cell adhesion molecules and ischemic stroke. **Neurol Res**, v. 30, n. 8, p. 783-93, Oct 2008.

_____. Leukocyte recruitment and ischemic brain injury. **Neuromolecular Med**, v. 12, n. 2, p. 193-204, Jun 2010.

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.

ZHANG, R. L.; ZHANG, Z. G.; CHOPP, M. Ischemic stroke and neurogenesis in the subventricular zone. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 345-52, Sep 2008.

ZHAO, Q. et al. Maternal sleep deprivation inhibits hippocampal neurogenesis associated with inflammatory response in young offspring rats. **Neurobiol Dis**, v. 68, p. 57-65, Aug 2014.

ZLOKOVIC, B. V. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. **Neuron**, v. 57, n. 2, p. 178-201, Jan 24 2008.