



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Tassiane Emanuelle Servare Andrade Nascimento

Efeito neuroprotetor do extrato hidroalcoólico de *Polygala paniculata* em modelos experimentais de isquemia cerebral

Florianópolis
2021

Tassiane Emanuelle Servare Andrade Nascimento

Efeito neuroprotetor do extrato hidroalcoólico de *Polygala paniculata* em modelos experimentais de isquemia cerebral

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de doutor em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares Santos (*in memoriam*)

Coorientadora: Profa. Dra. Cristina Martins e Silva

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Nascimento, Tassiane Emanuelle Servare Andrade
Efeito neuroprotetor do extrato hidroalcoólico de
Polygala paniculata em modelos experimentais de isquemia
cerebral / Tassiane Emanuelle Servare Andrade Nascimento ;
orientador, Adair Roberto Soares Santos, coorientadora,
Cristina Martins e Silva, 2021.
120 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Isquemia cerebral. 3.
Neuroproteção. 4. Plantas medicinais. I. Santos, Adair
Roberto Soares. II. Martins e Silva, Cristina . III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Neurociências. IV. Título.

Tassiane Emanuelle Servare Andrade Nascimento

Efeito neuroprotetor do extrato hidroalcoólico de *Polygala paniculata* em modelos experimentais de isquemia cerebral

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. André Ricardo Massensini, Dr.
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof.a Helena Iturvides Cimarosti, Dr.a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.a Michele Rechia Fighera, Dr.a
Universidade Federal de Santa Maria

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Neurociências.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

In memoriam

Prof. Adair Roberto Soares Santos, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2021

Este trabalho é dedicado a Deus, o Autor da vida, e à minha querida família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o Criador, por fazer muito mais do que pedimos, pensamos e sonhamos; pelo sustento, força e coragem para embarcar nessa jornada. Por sua graça, nada me faltou. Por sua graça, encontrei o amor que lança fora o medo. Por sua graça, nunca estive sozinha.

À minha família, que sempre foi a minha base, o meu lar, o meu maior apoio. Por sempre torcerem por mim e acreditarem que eu conseguiria chegar em um lugar desconhecido e distante e fazer dele minha morada. Por lidarem junto comigo com a saudade. Por serem o lugar para onde eu sempre posso voltar.

Ao Daniel, que me encontrou e me contagiou com seu sorriso, tornou meus dias mais leves e encheu meu estômago de borboletas. Por sua paciência, por seu apoio, por segurar minha mão e secar muitas lágrimas. Por compreender minhas ausências e minha ansiedade. Por seu abraço que agora é o meu lar.

Ao Prof. Dr. Adair Santos, meu orientador, pela oportunidade de trabalhar com ele e ser por ele direcionada à conclusão desse trabalho. Por seu estímulo ao aprendizado e à superação de limites. Por sua contribuição valiosa em minha vida acadêmica e por me permitir fazer parte do Landi e contribuir com esse maravilhoso grupo de pesquisa.

À Prof. Dr. Cristina Martins e Silva, coorientadora desse trabalho e minha mentora de vida acadêmica. Por seus ensinamentos, por seu tempo investido em esclarecer dúvidas, por seu auxílio na interpretação de dados e resolução de problemas. Por nunca duvidar da minha habilidade e capacidade. Por abrir caminhos e me ajudar a passar por eles. Por ser o modelo de mestre que eu quero ser.

Ao Dr. Sean Cregan, à Universidade de Western Ontario e ao Instituto de Pesquisa Robarts, pela oportunidade e orientação durante o período de doutorado sanduíche. Através deles tive acesso a um novo mundo de pesquisa e tecnologia, além de conhecer canadenses adoráveis e acolhedores.

Às minhas queridas amigas Jhenifer, Larissa e Gleici, pelas infindáveis horas de trabalho, cansaço, esforço e fome. Pelo tempo investido apoiando meus experimentos, limpando materiais, aparatos e bancadas. Por tornarem tudo melhor com sua presença, seu humor, sua parceria, sua amizade. Por sua contribuição valiosa em todos os momentos. Esse trabalho tem nosso sangue, suor e lágrimas. Juntas somos invencíveis.

Aos colegas do Landi, pelos momentos de descanso e café, pelas discussões que me fizeram enxergar a ciência de forma mais clara, pela parceria, pela paciência. Por dividirem a bancada comigo e compartilharem o conhecimento que possuem. Sou muito grata por ter feito parte de um grupo de pesquisa maravilhoso, cheio de pessoas íntegras, comprometidas e dedicadas. Esse trabalho só foi possível porque vocês sempre se colocaram à disposição para ajudar.

À Katia Louzada e sua família, por terem me recebido em sua casa no Canadá, por terem sido meu refúgio brasileiro e meu lar durante os quase 6 meses em que estive lá. Pelas noites de cineminha na sala, pelas guloseimas, pelos passeios maravilhosos, pelos jantares mais divertidos. Por me permitirem abraçar e apertar a Polly. Por terem tornado meu primeiro natal na neve inesquecível.

Ao Dr. Válber e Lucélia, pelo apoio profissional que me manteve sã durante esse período.

À dona Vilma, seu Carlos e Nivaldo, por terem me acolhido de maneira tão amorosa. Por me apresentarem a tradição local, principalmente a culinária. Por terem tornado a UFSC um ambiente agradável e amigável.

Aos funcionários responsáveis pela limpeza das caixas do biotério. Seu trabalho trouxe grande alívio.

Aos funcionários do LAMEB e do laboratório de histologia (em especial a Prof. Dr. Juçara), pela instrução no uso de equipamentos e ensinamentos de técnicas e protocolos apropriados.

Aos camundongos, que auxiliam pesquisadores no mundo inteiro no estudo de graves doenças que acometem o ser humano. Por sua contribuição para o desenvolvimento desse trabalho e por serem a base de longos caminhos em busca de cura para os males que nos afetam.

À UFSC e ao programa de pós-graduação em Neurociências, por todos os ensinamentos.

À CAPES pelo financiamento do doutorado, inclusive o período sanduíche.

“Não devemos ter como lema ‘Seja boa, doce menina, e deixe a inteligência para quem a possui’, mas sim ‘Seja boa, doce menina, e não se esqueça de ser o mais inteligente que puder’. Deus não detesta menos os intelectualmente preguiçosos do que qualquer outro tipo de preguiçoso. Se você está pensando em se tornar cristão, eu lhe aviso que estará embarcando em algo que vai ocupar toda a sua pessoa, inclusive o cérebro”. (C. S. Lewis)

RESUMO

A isquemia cerebral, tanto causada por acidente vascular encefálico isquêmico (AVEi) quanto por parada cardíaca, é uma das principais causas de morte e incapacidade, sendo motivo de preocupação em saúde pública mundialmente. Considera-se o AVEi como causador de isquemia focal, por reduzir o aporte sanguíneo à uma região encefálica específica, enquanto a parada cardíaca leva à isquemia cerebral global, por promover redução do fluxo sanguíneo por insuficiência cardíaca. O risco de ser acometido aumenta com o envelhecimento, mas pode ocorrer em indivíduos de qualquer idade, afetando sua vida produtiva. Diversos mecanismos são responsáveis pela lesão cerebral decorrente de evento isquêmico, como falha bioenergética, disfunção da barreira hematoencefálica, excitotoxicidade, inflamação e estresse oxidativo, os quais podem levar a morte neuronal. As intervenções são limitadas. Para o AVEi o único medicamento atualmente aprovado é um trombolítico (Alteplase®), que possui curta janela terapêutica e restrições em sua utilização. Além disso, foi demonstrada a efetividade da trombectomia mecânica utilizando dispositivos como *stent retrievers* para remoção de coágulos, com resultante melhora funcional do paciente e diminuição da mortalidade. Já em casos de parada cardíaca, a ressuscitação deve acontecer o mais rápido possível. Plantas medicinais são utilizadas pela humanidade desde os tempos antigos e são consideradas importante fonte de compostos com atividade biológica. Em particular, a espécie *Polygala paniculata* L. demonstrou efeitos protetores em modelos animais de diversas doenças. Portanto, investigou-se o efeito do extrato hidroalcoólico dessa planta (EHPp) em modelos de isquemia cerebral *in vitro* e *in vivo*. Culturas de neurônios corticais foram tratadas com EHPp (10 – 100 µg/mL) e expostas à privação de oxigênio e glicose por 90 min. Observou-se diminuição da apoptose nos neurônios tratados com EHPp, em comparação ao grupo que recebeu veículo. Adicionalmente, camundongos machos C57bl/6 (8-12 semanas) foram submetidos a oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (BCCAo) por 30 min e posteriormente tratados com EHPp (1 mg/kg). Os animais que passaram por BCCAo apresentaram déficits motores, cognitivos e emocionais, os quais foram avaliados por um período de até seis dias. Após 48h de BCCAo, observou-se neurodegeneração hipocampal, aumento de expressão de citocinas inflamatórias no córtex e hipocampo e ativação microglial e astrocitária. O tratamento com EHPp reduziu os prejuízos motores, cognitivos e emocionais desencadeados pela isquemia cerebral global, reduziu a inflamação através da diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias e da ativação microglial, mitigou parcialmente a expressão do marcador astrocitário GFAP, aumentou a expressão gênica e proteica dos fatores neurotróficos BDNF e GDNF e reduziu a morte de neurônios hipocampais, demonstrando que o EHPp contém compostos capazes de atuar em múltiplos alvos e processos importantes no evento isquêmico. Assim, esse trabalho sugere o potencial neuroprotetor da *P. paniculata*, a qual pode vir a ser opção eficaz para intervenção terapêutica nessa condição patológica. Estudos clínicos devem ser conduzidos objetivando demonstrar a utilização dessa planta como tratamento coadjuvante na isquemia cerebral.

Palavras-chave: Isquemia cerebral. Neuroproteção. Plantas medicinais.

ABSTRACT

Cerebral ischemia, caused by both stroke and cardiac arrest, is a major cause of death and disability worldwide. The risk of being affected increases with aging, but it can occur in individuals of any age, affecting their productive life. Stroke causes focal ischemia, since it reduces blood supply to a localized brain area, while cardiac arrest leads to global cerebral ischemia for causing reduction in blood flow due to heart failure. Several mechanisms are responsible for brain injury resulting from an ischemic event, such as bioenergetic failure, blood-brain barrier dysfunction, excitotoxicity, inflammation and oxidative stress, which can lead to neuronal death. Treatments are limited according to type of stroke. For ischemic stroke, the only approved drug is a thrombolytic (Alteplase®), which has a short therapeutic window and usage restrictions. In addition, the effectiveness of mechanical thrombectomy using devices such as stent retrievers to remove clots has been demonstrated, resulting in functional improvement and reduced mortality. For cardiac arrest, resuscitation should happen as soon as possible. Medicinal plants have been used by mankind since ancient times and are considered an important source of compounds with biological activity. In particular, *Polygala paniculata* L. has shown protective effects on animal models of various diseases. Based on that, this work investigated the effect of the hydroalcoholic extract of this plant (HEPp) in models of cerebral ischemia in vitro and in vivo. Neuronal cultures were treated with HEPp (10 – 100 µg/mL) and exposed to oxygen and glucose deprivation for 90 min. A decrease in apoptosis was observed in neurons treated with HEPp, compared to the group that received a vehicle. Additionally, male C57bl / 6 mice (8-12 weeks) were submitted to bilateral common carotid arteries occlusion (BCCAO) for 30 min and subsequently treated with HEPp (1 mg/kg). Animals that underwent BCCAO showed motor, cognitive and emotional deficits, which were evaluated for a period of up to six days. After 48h of BCCAO, hippocampal neurodegeneration, increased expression of inflammatory cytokines in cortex and hippocampus and microglial and astrocytic activation were observed. HEPp treatment reduced motor, cognitive and emotional damage triggered by global cerebral ischemia, reduced inflammation by decreasing the expression of pro-inflammatory cytokines and microglial activation, partially mitigated GFAP expression, increased gene and protein expression of factors neurotrophic BDNF and GDNF and reduced hippocampal neurons death, demonstrating that HEPp contains compounds able to act on multiple targets and important processes in the ischemic event. Thus, this work highlights the neuroprotective potential of *P. paniculata*, which may become an effective option for therapeutic intervention in this pathological condition. Clinical trials must be conducted aiming to demonstrate benefits in using this plant as an adjunct treatment in cerebral ischemia.

Keywords: Cerebral ischemia. Neuroprotection. Medicinal plants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Área de lesão cerebral após evento isquêmico.....	23
Figura 2. Eventos celulares envolvidos na fisiopatologia da isquemia cerebral.	25
Figura 3. Perfil temporal dos principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos na lesão por isquemia cerebral.....	28
Figura 4. Lesão e concentração intracelular de Ca^{2+}	34
Figura 5. Esquema evidenciando semelhança entre a estrutura vascular de humanos e roedores.	39
Figura 6. <i>Polygala paniculata</i>	46
Figura 7. Estrutura da 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona e rutina.....	51
Figura 8. Protocolo utilizado para investigação do efeito <i>in vitro</i> de EHPp sobre células corticais expostas à privação de oxigênio e glicose (POG).	52
Figura 9. Desenho esquemático de uma placa de cultura de neurônios corticais e cálculo da porcentagem de sobrevivência celular.....	53
Figura 10. Protocolo experimental I: determinação da curva dose-resposta do extrato hidroalcoólico de <i>P. paniculata</i> no modelo de isquemia cerebral global.....	55
Figura 11. Protocolo experimental II: investigação do efeito do extrato hidroalcoólico de <i>P. paniculata</i> na força, memória de curta duração e ansiedade no modelo de isquemia cerebral global.	56
Figura 12. Protocolo experimental III: investigação dos efeitos moleculares e histológicos do extrato hidroalcoólico de <i>P. paniculata</i> no modelo de isquemia cerebral global.....	57
Figura 13. Desenho esquemático da oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (BCCAo).	58
Figura 14. Representação esquemática do teste de força.	60
Figura 15. Representação esquemática do teste de resistência de agarre (<i>wire hanging test</i>).	61
Figura 16. Representação esquemática do teste do campo aberto.....	62
Figura 17. Representação esquemática do teste de reconhecimento de objetos.....	63
Figura 18. Representação esquemática do teste da caixa claro-escuro.	64
Figura 19. Figura representativa da coloração de Nissl evidenciando as regiões CA1 (A) e CA3 (B) do hipocampo de camundongos.	67
Figura 20. Efeito do tratamento de neurônios corticais com extrato hidroalcoólico de <i>Polygala paniculata</i> (10-100 μ g/mL).	69

Figura 21. Efeito da adição de extrato hidroalcoólico de <i>P. paniculata</i> (10-100 µg/mL) a culturas de neurônios corticais expostos a privação de oxigênio e glicose.	70
Figura 22. Força dos animais antes e após isquemia cerebral global.	72
Figura 23. Avaliação da força de resistência de agarre (<i>wire hanging test</i>) de animais submetidos à BCCAO e tratados com extrato hidroalcoólico de <i>P. paniculata</i>	73
Figura 24. Avaliação da atividade locomotora de animais submetidos à BCCAO e tratados com extrato hidroalcoólico de <i>P. paniculata</i> através do teste do campo aberto.	74
Figura 25. Avaliação do desempenho cognitivo de animais submetidos à BCCAO e tratados com extrato hidroalcoólico de <i>P. paniculata</i> no teste de reconhecimento de objetos.	75
Figura 26. Avaliação do desempenho cognitivo de animais submetidos à BCCAO e tratados com extrato hidroalcoólico de <i>P. paniculata</i> através dos índices de discriminação e preferência no teste de reconhecimento de objetos.	76
Figura 27. Avaliação de comportamento tipo ansioso de animais submetidos à BCCAO e tratados com extrato hidroalcoólico de <i>P. paniculata</i> através do teste da caixa claro-escuro.	78
Figura 28. Expressão gênica de marcadores de células gliais no córtex (A–B) e hipocampo (C–D) de animais submetidos à BCCAO e tratados com extrato hidroalcoólico de <i>P. paniculata</i> (1 mg/kg).	79
Figura 29. Análise de expressão gênica de citocinas no córtex (A–C) e no hipocampo (D–F) de animais submetidos à BCCAO e tratados com extrato hidroalcoólico de <i>P. paniculata</i> (1 mg/kg).	81
Figura 30. Expressão gênica e proteica de GDNF no córtex (A–B) e no hipocampo (C–D) de animais submetidos à BCCAO e tratados com extrato hidroalcoólico de <i>P. paniculata</i> (1 mg/kg).	83
Figura 31. Expressão gênica e proteica de BDNF no córtex (A–B) e no hipocampo (C–D) de animais submetidos à BCCAO e tratados com extrato hidroalcoólico de <i>P. paniculata</i> (1 mg/kg).	84
Figura 32. Imagens histológicas de sub-regiões de CA1 e CA3 no hipocampo dos animais e contagem de neurônios piramidais viáveis nessas regiões.	86
Figura 33. Comparação entre o microambiente cerebral normal, afetado pela isquemia cerebral global e as modificações promovidas pelo tratamento com extrato hidroalcoólico de <i>P. paniculata</i>	99

Figura 35. Principais mecanismos de lesão isquêmica e possíveis interações de *Polygala paniculata*..... 105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividades biológicas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de <i>Polygala paniculata</i>	48
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados para qPCR	65
Tabela 3. Tempo de exploração dos objetos nas fases de treino e teste.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 2VO Método de oclusão de dois vasos
- 4VO Método de oclusão de quatro vasos
- acc Artéria carótida comum
- ACC Artérias carótidas comuns
- ACM Artéria cerebral média
- AMPA Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
- AVE Acidente vascular encefálico
- BCCAO Oclusão bilateral das artérias carótidas comuns
- BDNF Fator neurotrófico derivado do cérebro
- BHE Barreira hematoencefálica
- BMP Proteína morfogenética óssea (BMP)
- CL Lado contralateral
- EHPp Extrato hidroalcoólico de *Polygala paniculata*
- FO Falso-operado
- GAPDH Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- GDNF Fator neurotrófico derivado da glia
- GFAP Proteína glial fibrilar ácida (*glial fibrillary acidic protein*)
- Iba-1 Proteína adaptadora de cálcio ionizado ligado – 1 (*ionized calcium-binding adaptor protein-1*)
- IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- ID Índice de discriminação
- iGluRs Receptores glutamatérgicos ionotrópicos
- IL Interleucina
- IP Índice de preferência
- IPSI Lado ipsilateral
- LPS Lipopolissacarídeo
- mGLURs Receptores glutamatérgicos metabotrópicos
- MRI Imagem de ressonância magnética
- NMDA N-metil-d-aspartato
- NO Óxido nítrico

OMS Organização Mundial da Saúde
PCR Reação em cadeia da polimerase
PICs Prática Integrativa Complementar em Saúde
PNPM Política Nacional de Plantas Medicinais
PNS Pesquisa Nacional de Saúde
POG Privação de oxigênio e glicose
RNS Espécies reativas de nitrogênio
ROS Espécies reativas de oxigênio
SGZ Zonas subgranular do hipocampo
SNC Sistema Nervoso central
SUS Sistema único de saúde
SVZ Zona subventricular
TNF Fator de necrose tumoral
tPA Ativador do plasminogênio tecidual recombinante
UTI Unidade de terapia intensiva
V Veículo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Fisiopatologia da isquemia e reperfusão	22
1.1.1	Eventos celulares.....	24
1.1.2	Células gliais.....	28
1.1.3	Neuroinflamação.....	32
1.1.4	Excitotoxicidade.....	32
1.1.5	Fatores neurotróficos.....	35
1.2	Modelos experimentais de isquemia cerebral.....	37
1.2.1	<i>In vitro</i>	38
1.2.2	<i>In vivo</i>	38
1.3	Abordagem terapêutica atual	40
1.4	Da bancada para os leitos hospitalares	41
1.5	Plantas medicinais na terapêutica da isquemia cerebral	44
1.5.1	Família <i>Polygalaceae</i> e plantas do gênero <i>Polygala</i>.....	45
2	OBJETIVO.....	49
2.1	Objetivo geral	49
2.2	Objetivos específicos	49
3	MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1	Material vegetal e obtenção do extrato hidroalcoólico de <i>Polygala paniculata</i> ...	50
3.2	Modelo experimental <i>in vitro</i>	51
3.3	Modelo experimental <i>in vivo</i>	53
3.3.1	Animais	53
3.3.2	Desenho experimental	54
3.3.3	Procedimento cirúrgico	58
3.3.4	Testes comportamentais.....	59

3.3.5	Análise de expressão gênica	64
3.3.6	Análise da abundância proteica por imunoblot.....	65
3.3.7	Análises histológicas	66
3.3.8	Análises estatísticas.....	67
4	RESULTADOS	68
4.1	Modelo experimental <i>in vitro</i>	68
4.2	Modelo experimental <i>in vivo</i>	71
4.2.1	Efeito do tratamento com extrato hidroalcoólico de <i>P. paniculata</i> sobre a redução da força muscular de camundongos submetidos à isquemia cerebral global	71
4.2.2	Efeitos do tratamento com extrato hidroalcoólico de <i>P. paniculata</i> sobre os déficits motores, cognitivos e emocionais desencadeados por isquemia cerebral global .	72
4.2.3	Efeitos do tratamento com extrato hidroalcoólico de <i>P. paniculata</i> na neuroinflamação desencadeada por isquemia cerebral global.....	78
4.2.4	Efeitos do tratamento com extrato hidroalcoólico de <i>P. paniculata</i> na expressão de fatores neurotróficos após isquemia global	81
4.2.5	Efeitos do tratamento com extrato hidroalcoólico de <i>P. paniculata</i> na neurodegeneração hipocampal após isquemia global	85
5	DISCUSSÃO	87
6	CONCLUSÃO	103

1 INTRODUÇÃO

A isquemia cerebral, tanto provocada por acidente vascular encefálico (AVE) quanto por parada cardíaca, é um dos principais motivos de preocupação em saúde pública mundialmente (ESCOBAR et al., 2019). O AVE é apontado como a segunda maior causa de morte pela Organização Mundial da Saúde (OMS), atrás apenas de doenças cardíacas (FEIGIN; NORRVING; MENSAH, 2017; JOHNSON et al., 2016; OMS, 2020). Já a parada cardíaca tem alta incidência mundial todos os anos, sendo apontada como principal causa de coma e admissão na unidade de terapia intensiva (UTI) em hospitais (REIS et al., 2017).

Os fatores de risco que predisõem a um evento isquêmico podem ser categorizados como modificáveis e não-modificáveis (BOEHME; ESENWA; ELKIND, 2017). Idade, sexo, raça/etnia são fatores não-modificáveis, enquanto hipertensão, tabagismo, dieta e sedentarismo estão entre os fatores modificáveis mais comuns. Modificações comportamentais e no estilo de vida, como alimentação saudável e prática de atividades físicas, não apenas reduzem o risco de AVE, mas também reduzem o risco de outras doenças cardiovasculares. Algumas estratégias adicionais de prevenção incluem identificar e tratar condições médicas como hipertensão e diabetes (BOEHME; ESENWA; ELKIND, 2017).

O AVE é causado pela falta de irrigação sanguínea em uma área do cérebro gerada por obstrução de uma artéria, no caso do AVE isquêmico, ou ruptura, no caso do AVE hemorrágico. Há poucos dados sobre a prevalência de AVE no Brasil, sendo que vários estudos foram conduzidos em cidades ou regiões isoladas e não refletem a realidade do país como um todo, evidenciando apenas realidades locais (BENSENOR et al., 2015). Bensenor et al. avaliaram os dados epidemiológicos obtidos durante a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) pelo Instituto Brasileiro de Geografia e estatística (IBGE), em 2013. Os autores constataram que cerca de 2 milhões de brasileiros sofreram AVE naquele ano (aproximadamente 1% da população nacional), dos quais mais de 500 mil permaneceram com sequelas graves ou limitações funcionais importantes. Essa pesquisa evidenciou, ainda, que a prevalência de AVE no país é maior em idosos, em brasileiros menos escolarizados, em residentes da zona urbana, sem diferenças pela cor da pele autodeclarada.

Já no ano de 2016, cerca de 107 mil brasileiros sofreram AVE (0,05% da população nacional naquele ano) (DE SANTANA et al., 2018). Apesar dessa diminuição do número de

eventos, o risco de morte prematura devido ao AVE no Brasil é um dos mais altos no mundo (LOTUFO, 2015).

Sabe-se que, embora o risco de um evento isquêmico aumente com a idade, de 10 a 15% de todas as pessoas acometidas mundialmente são consideradas adultos jovens (idade inferior a 45-49 anos) (SMAJLOVIC, 2015), levando a grande impacto econômico por afetar indivíduos em seus anos mais produtivos. No Brasil, estatísticas mostram dados semelhantes, em que indivíduos mais velhos são mais acometidos pelo AVE quando comparados aos indivíduos jovens (BENSENOR et al., 2015; DE SANTANA et al., 2018). Entretanto, em 2013, dos brasileiros que tiveram sequelas graves após o AVE, cerca de 44% tinham entre 18-64 anos de idade (BENSENOR et al., 2015) e, em 2016, a mortalidade maior aconteceu entre pessoas de 15-49 anos (DE SANTANA et al., 2018).

É essencial que a intervenção seja feita dentro do menor tempo possível para tratar um indivíduo acometido por essa doença, sendo, portanto, fundamental que a população em geral saiba reconhecer os sinais e como agir quando estiver próximo a alguém sofrendo AVE. A conscientização da população foi uma das principais medidas tomadas durante a luta para melhoria desse quadro no Brasil. Em 2008, Pontes-Neto e colaboradores mostraram dados alarmantes sobre AVE que foram coletados entre 2004-2005 em uma pesquisa conduzida em locais públicos de São Paulo, Salvador, Fortaleza e Ribeirão Preto. Nesse estudo, 801 indivíduos foram apresentados a um relato de caso fictício, no qual um familiar idoso estaria apresentando sinais claros de AVE, como súbita dificuldade de falar e andar e fraqueza no lado direito do corpo, e após responderam a um questionário específico. Dos entrevistados, cerca de 51% responderam que ligariam para o serviço de resgate e emergência e 38% levariam o idoso ao hospital; contudo, 22% não reconheceram os sinais como sendo AVE e sugeriram um diagnóstico alternativo; 2% levariam a uma clínica e 7% deixariam o paciente descansar ou dariam medicações anti-hipertensivas. Ao serem questionados sobre os números de telefone de serviços de resgate e emergência no Brasil, apenas 34% dos entrevistados responderam corretamente (192 ou 193), enquanto 65% não sabiam o número correto (PONTES-NETO et al., 2008).

O manejo do AVE no Brasil passou por avanços nas últimas décadas. O número de centros especializados no país aumentou de 35 em 2008 para 149 em 2017 (MARTINS et al., 2013; SILVA et al., 2018). Diversos foram os desafios enfrentados para a implementação desses centros. Martins e colaboradores (2013) enumeraram os principais, como a superlotação de alas

hospitalares de emergência, falta de leitos de UTI, carência de treinamento adequado para profissionais da saúde e estoque limitado de medicamentos na maioria dos hospitais públicos.

Todavia, mudanças significativas deste cenário de combate ao AVE foram obtidas por meio da implantação do projeto de mobilização nacional para melhoria do manejo do AVE, bem como pela aprovação do protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para essa doença pelo Ministério da Saúde, ocorrido em 2012. Hoje, os cuidados começam na prevenção primária, com medicamentos para tratamento de diabetes e hipertensão sendo distribuídos gratuitamente em todo país através do programa do governo federal Farmácia Popular, além de terem sido firmados acordos entre governo e companhias farmacêuticas para a aquisição do ativador do plasminogênio tecidual recombinante (Alteplase®), medicamento de alto custo aprovado para terapia de pacientes com AVE isquêmico agudo. De grande importância foi também a ampliação do orçamento para custear construção de novos centros especializados e abastecê-los com mais leitos de UTI, medicamentos e equipamentos necessários para diagnóstico, intervenção e reabilitação (MARTINS et al., 2013; SILVA et al., 2018). Na cidade de Florianópolis/SC, o Hospital Governador Celso Ramos (HGCR) possui uma unidade especializada para atendimento dos casos com AVE em sua fase aguda, com uma equipe multidisciplinar que atende esses casos desde sua abordagem inicial (SANTA CATARINA, 2020).

Por outro lado, não se pode negligenciar a parada cardíaca como importante causa de isquemia cerebral. É conhecido que sobreviventes de parada cardíaca sofrem com importantes sequelas motoras, cognitivas e até mesmo emocionais, como ansiedade e depressão (BOYCE et al., 2019; LIM et al., 2004). A principal causa de parada cardíaca é de origem cardiovascular e é, frequentemente, imprevisível. Em torno de 5 minutos após cessarem os batimentos cardíacos, células cerebrais começam a sofrer danos que culminam em morte celular (KWON, 2019). A incidência global de parada cardíaca é de 55 adultos a cada 100 mil pessoas por ano (BERDOWSKI et al., 2010) e dessas 8,8% sobrevivem e recebem alta hospitalar (YAN et al., 2020). Grande parte dos pacientes mostram problemas funcionais assim que recebem alta, contudo, a maioria dos sobreviventes retorna aos níveis funcionais normais ou melhora significativamente dentro de um ano (GRAVES et al., 1997; RISTO; LIFE, 1993). É recomendado, todavia, que testes que detectam déficits cognitivos e emocionais sejam incorporados à rotina médica. Essa conduta leva a um planejamento adequado do tratamento, levando em conta as adaptações necessárias na vida diária do paciente e de seus familiares

(BOYCE et al., 2019). Além disso, ao contrário da isquemia cerebral provocado por AVE, que é normalmente classificada como focal, a isquemia provocada por parada cardíaca é global, havendo hipoperfusão sanguínea em todo o cérebro. Existem áreas cerebrais mais susceptíveis à lesão isquêmica, tais como hipocampo, cerebelo, tálamo e estriado. Assim, ainda que tenha duração breve, a parada cardíaca pode comprometer um grande número de neurônios em quase todo o encéfalo (STAMENOVA et al., 2018).

Stamenova et al. (2018) avaliaram os efeitos de hipóxia (< 7 min) provocada por parada cardíaca na integridade cerebral e na performance cognitiva (aprendizagem e memória) e funcional de pacientes que aparentavam não ter sequelas neurológicas durante a alta hospitalar. Em 3-4 anos após o evento, foi detectada redução de 10-20% do volume hipocampal nesses pacientes quando comparados a indivíduos controles, associada com pior desempenho em testes de memória. É importante ter em mente que déficits na memória induzidos por parada cardíaca são geralmente acompanhados por déficits motores e executivos, tornando-se essencial uma abordagem do paciente em sua totalidade (GRAVES et al., 1997; LIM et al., 2004; STAMENOVA et al., 2018).

Independentemente de sua origem, a isquemia cerebral é, juntamente com a Doença de Alzheimer, uma das causas mais comuns de demência e pesquisas relacionando essas duas condições focam nos fatores de risco vasculares compartilhados, os quais podem ser reduzidos por atividades cotidianas mais saudáveis ou por medicação (VIJAYAN; REDDY, 2016).

De grande relevância clínica também é o fato de que sintomas de depressão e ansiedade são comuns após evento isquêmico e estão associados a diminuição da qualidade de vida e piora em avaliações físicas e sociais e, embora tenham alta prevalência e consequências negativas na recuperação do paciente, há poucos estudos sobre esses transtornos psiquiátricos quando comparados àqueles sobre disfunções físicas após isquemia (VICENTINI et al., 2017).

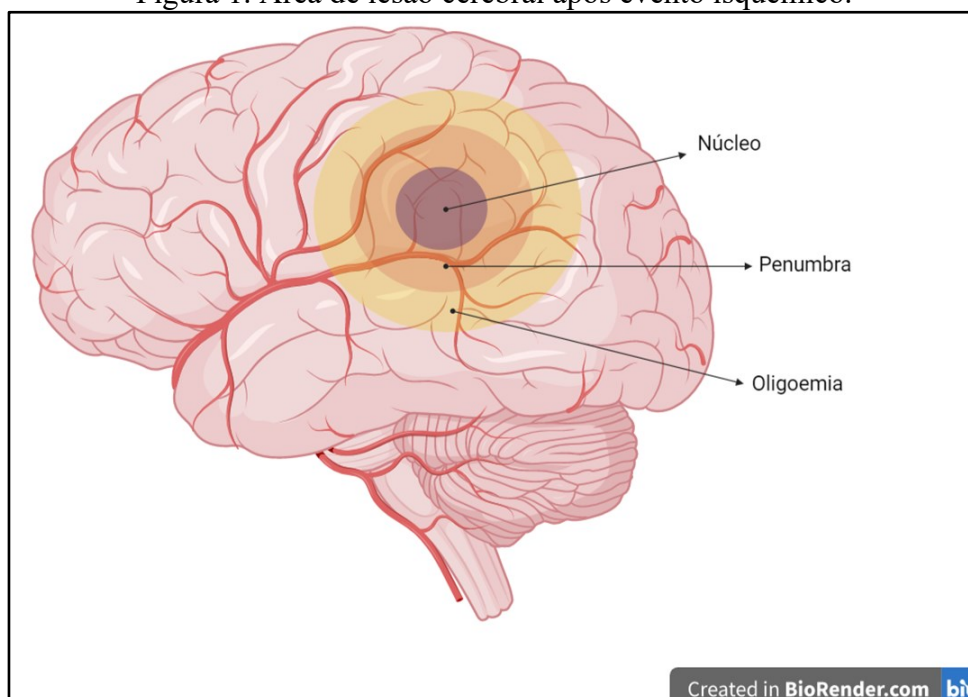
1.1 FISIOPATOLOGIA DA ISQUEMIA E REPERFUSÃO

A isquemia cerebral leva a redução/perda do fluxo sanguíneo ao encéfalo, comprometendo o suprimento de substratos necessários para a produção de energia e manutenção da integridade do tecido, tais como oxigênio e glicose. Essa falha bioenergética desencadeia uma cascata de eventos moleculares prejudiciais, podendo resultar em morte e dano celular caso o fluxo sanguíneo não seja restabelecido devido a diversos mecanismos, como

excitotoxicidade, estresse oxidativo, produção de radicais livres de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) e inflamação (BARONE; FEUERSTEIN, 1999; ESCOBAR et al., 2019; HUANG; UPADHYAY; TAMARGO, 2006; KIM; KIM; YENARI, 2015; ROCHA, 2008). Por outro lado, embora a reperfusão restaure o fluxo sanguíneo, ela pode levar a danos secundários devido ao influxo de células inflamatórias, aumento de ROS, edema cerebral, hemorragia e outras condições associadas à lesão (HARUKUNI; BHARDWAJ, 2006; JIN; YANG; LI, 2010; KIM et al., 2016).

A redução dos níveis energéticos resultante do evento isquêmico leva a perda neuronal em regiões mais susceptíveis (STAMENOVA et al., 2018; WAHUL et al., 2018) e a área de lesão resultante (figura 1) pode ser dividida em núcleo isquêmico, onde ocorre a perda mais grave do aporte de suprimentos, em penumbra (HEISS, 2000; KIEWERT et al., 2010; LEE et al., 2005) e em oligoemia (JUNG et al., 2017). A área de oligoemia consiste na faixa entre penumbra e o tecido normal. Nessa área ocorre hipoperfusão sem, no entanto, desencadear lesão tecidual. A área de penumbra é aquela em que o tecido cerebral ainda recebe irrigação sanguínea, entretanto, a quantidade de sangue pode ser limitada, o que pode gerar comprometimento funcional ou da integridade morfológica (HEISS, 2000).

Figura 1. Área de lesão cerebral após evento isquêmico.



Legenda: Desenho esquemático exemplificando a área da lesão cerebral dividida em núcleo, penumbra e oligoemia. Fonte: BioRender.

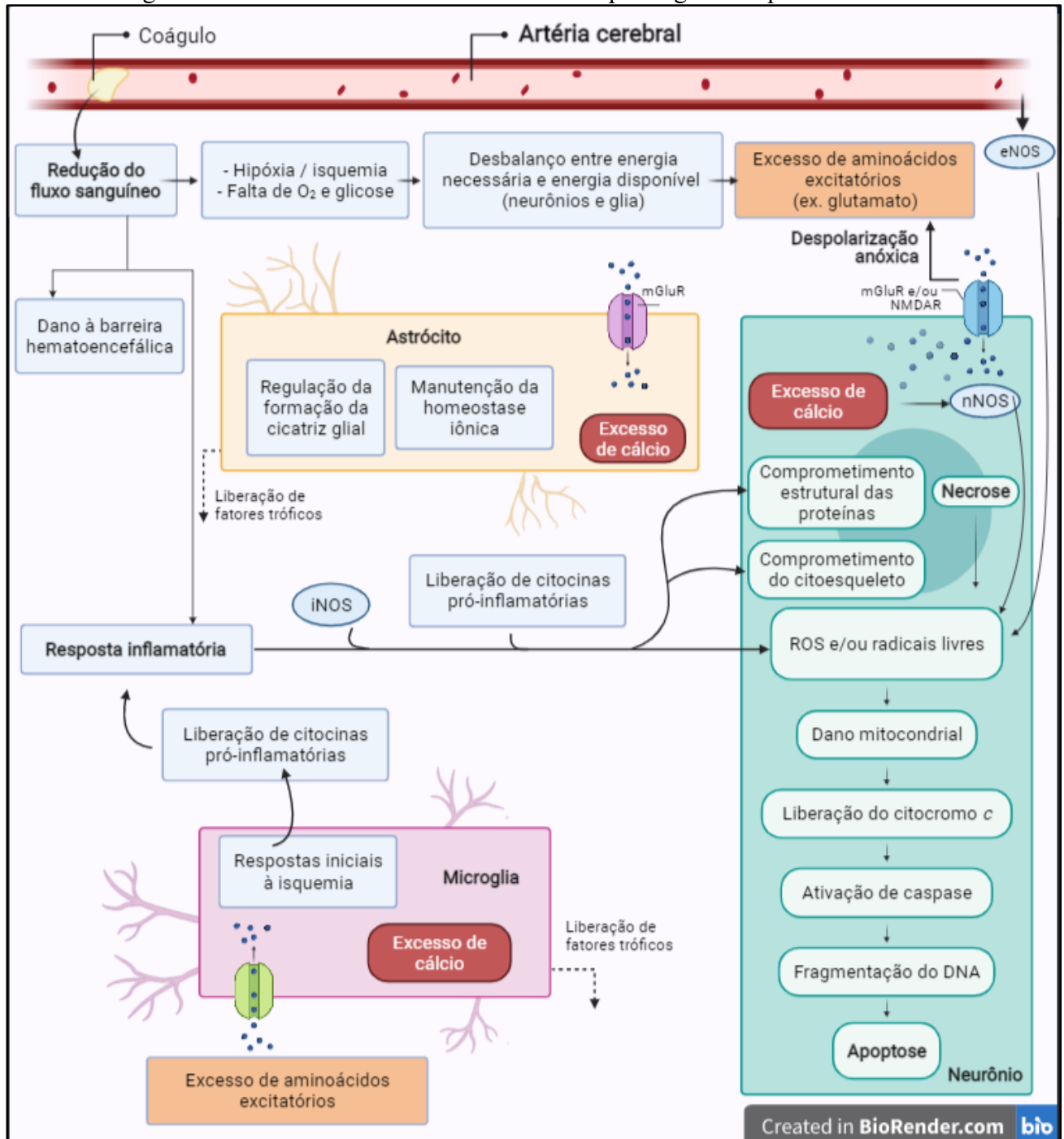
A penumbra isquêmica é uma área dinâmica, potencialmente recuperável e sua extensão depende do fluxo residual e duração do evento, criando uma região sensível a uma intervenção terapêutica que promoverá recuperação do tecido com risco eminente de morte. Com o tempo, caso o fluxo sanguíneo não seja restabelecido, a morte neuronal que ocorre principalmente por necrose no núcleo isquêmico se estabelece (CAMPBELL et al., 2019).

1.1.1 Eventos celulares

A figura 2 mostra os eventos e as consequências celulares e moleculares que afetam as funções de neurônios e de células gliais, bem como as alterações vasculares e inflamatórias (BROUGHTON; REUTENS; SOBEY, 2009; CAMPBELL et al., 2019; GEORGE; STEINBERG, 2015).

A função neuronal depende da disponibilidade contínua de ATP, a qual está restrita já no início da isquemia e, assim, os neurônios perdem seu gradiente iônico transmembrana, culminando na despolarização dessas células. A progressiva despolarização neuronal durante estados de hipoperfusão é conhecida como *despolarização anóxica* e leva à liberação massiva de neurotransmissores em terminais pré-sinápticos, especialmente de aminoácidos excitatórios. A recaptação dos neurotransmissores excitatórios é um processo dependente de energia, estando comprometido em situações isquêmicas; portanto, os níveis extracelulares de glutamato aumentam, levando à ativação de seus receptores (LO; DALKARA; MOSKOWITZ, 2003).

Figura 2. Eventos celulares envolvidos na fisiopatologia da isquemia cerebral.



Legenda: A oclusão de uma artéria cerebral inicia uma cascata de respostas. A redução do fluxo sanguíneo leva a redução da disponibilidade de glicose e oxigênio, ocasionando falha energética em neurônios, células gliais e endoteliais. A despolarização anóxica e a redução da captação de glutamato levam ao aumento desse neurotransmissor no espaço extracelular, acarretando a ativação de seus receptores, o que culmina no influxo de cálcio. A disfunção da barreira hematoencefálica e a liberação de moléculas de sinalização inicia a resposta inflamatória. A morte celular desencadeada por esses eventos ocorre tanto por necrose, quanto por apoptose. eNOS, óxido nítrico sintase endotelial; iNOS, óxido nítrico sintase induzível; nNOS, óxido nítrico sintase neuronal. Fonte: adaptada de George & Steinberg, 2015.

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC e atua através da ativação de seus receptores tanto ionotrópicos quanto metabotrópicos. Existem três tipos de receptores glutamatérgicos ionotrópicos (iGluRs), os quais foram nomeados de acordo com os agonistas que, originalmente, foram utilizados para ativá-los seletivamente: N-metil-D-aspartato (NMDA), receptor ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) e cainato (KEW; KEMP, 2005). Os iGluRs são canais de cátions não-seletivos, que permitem a passagem de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} , sendo compostos pela associação de várias subunidades proteicas que se combinam de diferentes formas, produzindo um grande número de isoformas (PURVES et al., 2001).

Adicionalmente, até o momento, foram identificados oito subtipos de receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR 1-8), sendo expressos nas regiões pré e pós-sinápticas e em células gliais. Quando esses receptores são ativados pelos ligantes, ocorre a tradução intracelular desse primeiro sinal via segundos mensageiros, levando a modulação da função de várias moléculas efetoras, como enzimas, canais iônicos e fatores de transcrição (NISWENDER; CONN, 2010). Dados clínicos e pré-clínicos demonstram que, no SNC, esses receptores modulam a neurotransmissão pré-sináptica através de ajuste fino do disparo neuronal e liberação de neurotransmissores de maneira dinâmica e dependente da atividade (CRUPI; IMPELLIZZERI; CUZZOCREA, 2019). Em adição a essas funções, mGluRs desempenham outras funções importantes, incluindo regulação do metabolismo, transcrição gênica, e múltiplos aspectos da função glial e comunicação glia-neurônio (NISWENDER; CONN, 2010). Durante a isquemia cerebral, a ativação de mGLURs presentes na glia leva ao aumento de cálcio dentro dessas células, reduzindo a expressão de transportadores gliais de glutamato, aumentando ainda mais os níveis extracelulares desse neurotransmissor (CAMPBELL et al., 2019; KIM et al., 2016).

Assim, com a subsequente estimulação dos receptores NMDA e AMPA, tem-se a entrada excessiva de cálcio na célula (WEILINGER et al., 2013). Ao mesmo tempo, ocorre liberação de cálcio de seus estoques intracelulares, levando ao aumento significativo da concentração desse íon, o que inicia uma série de eventos citoplasmáticos e nucleares, como ativação de enzimas proteolíticas, gerando ROS, cuja presença altera o balanço oxidativo celular ocasionando disfunção mitocondrial (CAMPBELL et al., 2019).

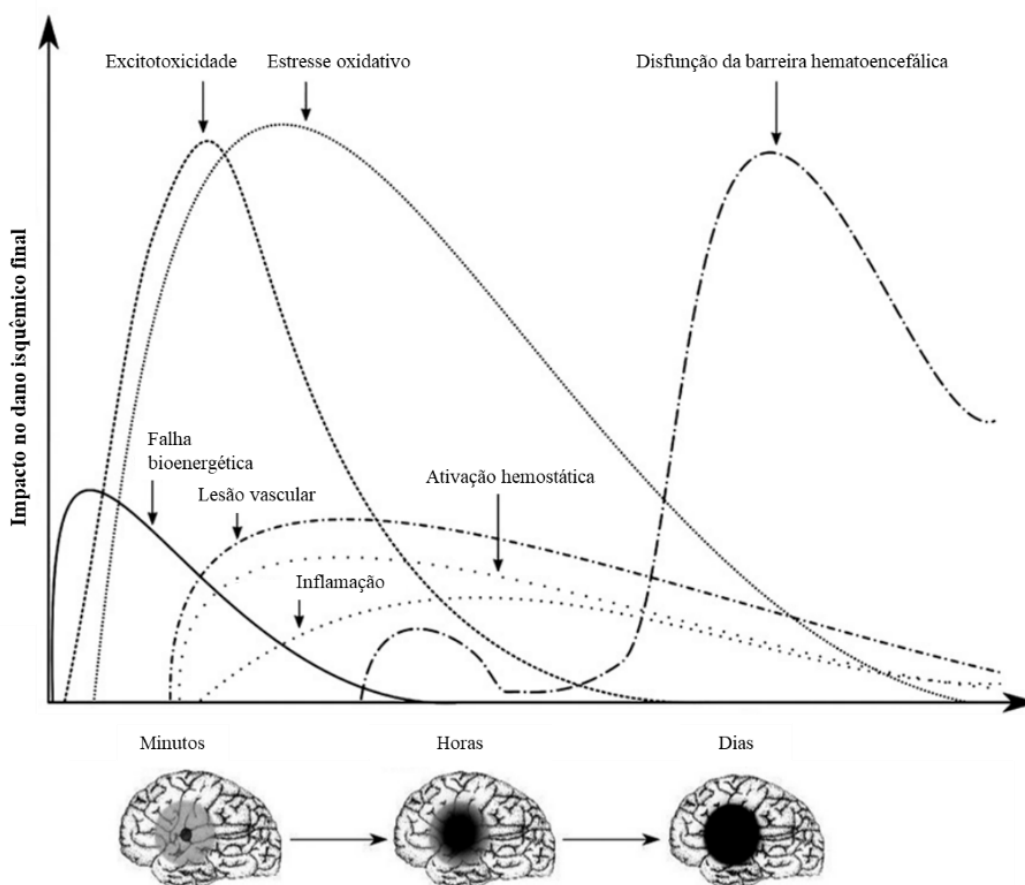
O evento isquêmico também gera uma resposta inflamatória no tecido cerebral, a qual pode ser ativada independentemente do tipo da lesão. Muitos aspectos da inflamação são

benéficos e levam à restauração da homeostase tecidual, entretanto, como dano colateral, a resposta inflamatória aguda pode contribuir para amplificar o dano tecidual (ANRATHER; IADECOLA, 2016).

A presença de células necróticas, debris celulares, e aumento de ROS e RNS podem resultar na neuroinflamação por ativarem micróglia e astrócitos, que são as primeiras células de defesa do tecido cerebral, as quais liberam mediadores químicos que promovem a quimiotaxia e infiltração de leucócitos da circulação sanguínea (DURUKAN; TATLISUMAK, 2007). Minutos após a oclusão, ocorre um aumento da expressão de genes pró-inflamatórios e amplificação da produção de mediadores da inflamação e ativação endotelial, com a consequente expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular, atraindo neutrófilos do sangue para o parênquima cerebral, seguidos de macrófagos e monócitos (BROUNS; DE DEYN, 2009).

Em suma, existe uma série complexa de processos neuroquímicos que são desencadeados ao longo do tempo e espaço pela isquemia (figura 3). Um evento dessa cascata heterogênea pode causar e/ou ser causado por múltiplos outros eventos. Esse processo pode durar de horas a dias, mesmo após a restauração do fluxo sanguíneo (BECERRA-CALIXTO; CARDONA-GÓMEZ, 2017; XU et al., 2020).

Figura 3. Perfil temporal dos principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos na lesão por isquemia cerebral.



Legenda: Gráfico representando o perfil temporal dos principais mecanismos fisiopatológicos da isquemia cerebral, mostrando a expansão das áreas de penumbra e núcleo isquêmico com o decorrer do tempo. Fonte: Adaptado de Brouns & Deyn, 2009.

1.1.2 Células glias

1.1.2.1 Astrócitos

Os astrócitos participam de muitos processos críticos no sistema nervoso central (SNC), incluindo a manutenção da homeostase, desenvolvimento de sinapses, suporte neuronal, regulação do fluxo sanguíneo cerebral, formação da barreira hematoencefálica (BHE) e manutenção de sua integridade funcional, remoção do excesso de glutamato na fenda sináptica, limitando a atividade neuronal e liberação de fatores tróficos e moléculas antioxidantes (BECERRA-CALIXTO; CARDONA-GÓMEZ, 2017).

Essas células são menos vulneráveis à excitotoxicidade glutamatérgica e à redução do aporte de energia que os neurônios durante a isquemia cerebral, entretanto, passam por mudanças metabólicas, morfológicas, bioquímicas e transcricionais, que levam ao estado definido como *astrogliose reativa*, o qual é um marcador fundamental de patologias e alterações no SNC (BECERRA-CALIXTO; CARDONA-GÓMEZ, 2017; CAMPBELL et al., 2019; ESCARTIN et al., 2021; XU et al., 2020).

Os astrócitos se tornam reativos dentro de 48-96h após a isquemia, tornando-se hipertróficos, se proliferando e regulando o processo de formação da cicatriz glial, uma barreira física que separa a área de tecido lesionado de áreas saudáveis, impedindo a difusão e ampliação da neuroinflamação (SOFRONIEW, 2009, 2015). Esses astrócitos exibem expressão aumentada de proteínas de filamentos intermediários, incluindo o GFAP (do inglês *glial fibrillary acidic protein*, traduzido como proteína glial fibrilar ácida), vimentina e nestina, assim como expressão alterada de muitos outros genes (LIU, 2014).

Embora o GFAP seja amplamente utilizado como marcador astrocitário, o aumento dessa proteína nos astrócitos reativos geralmente é paralelo com a gravidade da lesão, mas nem sempre é proporcional em todas as áreas cerebrais, devido a diferenças entre subpopulações dessas células que incluem, por exemplo, o conteúdo inicial dessa proteína (ESCARTIN et al., 2021). Para exemplificar, no cérebro de um camundongo saudável, astrócitos hipocâmpais apresentam maior conteúdo de GFAP que astrócitos corticais, talâmicos e estriatais, mas isso não os torna mais reativos (ESCARTIN et al., 2021). Dessa forma, considerando que cada área cerebral possui um microambiente diferente, é plausível que haja divergências na susceptibilidade e nos padrões de tolerância à lesão entre elas. Sabe-se que existem regiões cerebrais mais susceptíveis a danos isquêmicos, e que mesmo entre essas áreas há uma resposta diferenciada (WAHUL, 2018).

Existe um consenso na literatura que a astrogliose e a formação de cicatriz glial são respostas predominantemente prejudiciais e devem ser inibidas. A astrogliose pode exacerbar a inflamação, aumentando os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β e IFN γ , e de radicais livres, como NO, superóxido e peroxinitrito, bem como interferir do brotamento sináptico ou no crescimento e regeneração axonal (SOFRONIEW, 2009, 2015; XU et al., 2020). Contudo, pesquisas mais recentes têm descrito que os astrócitos são capazes de exercer tanto funções pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias, como contenção da lesão, reparo da BHE, proteção neuronal, resolução dos danos, entre outros (XU et al., 2020).

Liddelow e colaboradores (2017), descreveram que a neuroinflamação e a isquemia induzem dois diferentes tipos de astrócitos reativos, os quais denominaram A1 e A2 em analogia a nomenclatura M1/M2 de macrófagos (LIDDELOW et al., 2017). Vários pesquisadores utilizam esse conceito binário de fenótipos dos astrócitos, definindo como A1 o fenótipo adotado por essas células quando expostas a citocinas inflamatórias secretadas pela micróglia, assumindo potencial de danificar sinapses, e o fenótipo A2 adotado mediante exposição a fatores neurotróficos, sendo neuroprotetor (CAMPBELL et al., 2019; LIDDELOW et al., 2017).

Em artigo publicado em 2021, 81 pesquisadores alcançaram consenso em vários conceitos amplamente utilizados sobre classificações binárias de astrócitos “bons/maus”, fornecendo definições e recomendações atualizadas para futuros estudos sobre astrócitos reativos (ESCARTIN et al., 2021). Essa divisão foi desencorajada por vários motivos, dentre eles o fato de que muitos dos genes utilizados como marcadores de cada fenótipo não tem sua função bem conhecida, além de que existe diversidade entre os fenótipos assumidos pelos astrócitos entre as diversas doenças que acometem o SNC.

Por executarem funções cruciais como suporte ao metabolismo energético, efeitos antioxidantes, modulação da resposta imune, participação da neurogênese, regeneração tecidual, liberação de fatores tróficos e proteção aos neurônios, os astrócitos são importantes alvos de manipulação terapêutica.

1.1.2.2 Oligodendrócitos

Oligodendrócitos, as células formadoras de mielina no SNC, formam uma unidade funcional com os axônios desempenhando papel crucial na integridade axonal (MIFSUD et al., 2014). Essas células são vulneráveis na fase aguda da isquemia e, em fases crônicas, formam bainhas de mielina nos axônios em regeneração. A nível basal, a substância branca recebe menor aporte sanguíneo que a substância cinzenta, o que a predispõe a danos isquêmicos mesmo com variações mínimas no fluxo sanguíneo (MIFSUD et al., 2014; SOMMER, 2017; XU et al., 2020). Embora o destino dos oligodendrócitos após isquemia não seja tão bem estudado quanto o destino das demais células gliais (MIFSUD et al., 2014), sabe-se que grande número de oligodendrócitos morre dentro de 3h após a isquemia e não possuem capacidade de autorregeneração; entretanto, são derivados principalmente de células precursoras localizadas

no corpo caloso, estriado e zona subventricular, as quais se proliferam após evento isquêmico e migram aos locais de lesão, contribuindo para geração de oligodendrócitos maduros, o que facilita a recuperação neuronal (MIFSUD et al., 2014).

Os mecanismos celulares que levam a morte dos oligodendrócitos são semelhantes aos que ocorrem no neurônio, como superativação de receptores glutamatérgicos e purinérgicos, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial. A consequente desmielinização acarreta graves defeitos no transporte, estrutura, metabolismo e sobrevivência axonal (MIFSUD et al., 2014). Estratégias terapêuticas que visam a proteção dos oligodendrócitos têm o potencial de atenuar lesões à substância branca. Portanto, a terapia restaurativa não deve focar apenas nos neurônios, mas deve alcançar também as células da glia.

1.1.2.3 Micróglia

Células microgliais são moduladores importantes da resposta imunológica e consideradas as células imunes do SNC. Embora envolvidas primariamente com poda sináptica e reparo, podem transformar rapidamente sua morfologia em caso de lesão, passando de um estado de repouso caracterizado pela presença de muitas ramificações e prolongamentos, para um estado ativado, caracterizado por morfologia ameboide e móvel, a qual não se distingue de macrófagos provenientes da circulação sanguínea (IADECOLA; ANRATHER, 2011; KREUTZBERG, 1996).

A ativação de micróglia geralmente precede as reações de quaisquer outros tipos de células no cérebro. Ela responde não apenas a mudanças na integridade estrutural do cérebro, mas também às alterações sutis no microambiente cerebral, como desequilíbrios da homeostase de íons, que precedem mudanças patológicas que são histologicamente detectáveis (KIM et al., 2016; KIM; KIM; YENARI, 2015). Dados mostram que a micróglia ativada apresenta predominantemente efeitos deletérios nas fases agudas de isquemia cerebral, enquanto seus efeitos benéficos aparecem em fases mais tardias (JIN; YANG; LI, 2010; KIM; KIM; YENARI, 2015; ZHENG; YENARI, 2004).

1.1.3 Neuroinflamação

A neuroinflamação secundária à isquemia promove tanto lesão, resultando em morte celular, quanto efeitos benéficos, promovendo recuperação. Células neurais no núcleo isquêmico morrem como resultado da redução abrupta no fluxo sanguíneo, enquanto neurônios localizados na região de penumbra são afetados pelo rápido influxo de células imunes (neutrófilos, monócitos/macrófagos, diferentes subtipos de células T e outras células inflamatórias), espécies reativas de oxigênio e mediadores inflamatórios (JAYARAJ et al., 2019).

No SNC saudável, a entrada de componentes celulares e moleculares provenientes da circulação periférica é regulada pela BHE. Após lesão, as junções entre células endoteliais da BHE se tornam permeáveis, permitindo a infiltração de células inflamatórias ao parênquima cerebral. O processo inflamatório é amplificado graças a células imunes residentes, principalmente micróglia.

Dentre os principais mediadores de processos inflamatórios estão as citocinas, pequenas proteínas secretadas por diversas células cerebrais e imunológicas, as quais influenciam a interação e a comunicação entre células. Sua sinalização contribui para alteração da permeabilidade da BHE, recrutamento de outros tipos celulares inflamatórios e pode influenciar o metabolismo de neurotransmissores como as monoaminas, serotonina, dopamina e glutamato (CHAMORRO et al., 2012; IADECOLA; ANRATHER, 2011; KIM et al., 2016; TOBIN et al., 2014). O aumento dessas moléculas é suficiente para induzir apoptose, ampliando a lesão. Ainda, em presença dessas moléculas, há aumento da liberação de NO, que é neuroprotetor quando em baixos níveis, mas pró-apoptótico em níveis elevados por aumentar a produção de ROS (BROUNS; DE DEYN, 2009).

1.1.4 Excitotoxicidade

Excitotoxicidade é o dano secundário causado pela excitabilidade anormal dos neurônios gerada pela ativação intensa de receptores ionotrópicos e consequente aumento do influxo de cálcio que culmina com a liberação anormal de neurotransmissores excitatórios por células em processo de morte (BROUNS; DE DEYN, 2009; DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999; WEILINGER et al., 2013). Como dito anteriormente,

neurotransmissores excitatórios, especialmente o glutamato, acumulam-se no espaço extracelular, ocasionando superestimulação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos em neurônios vizinhos, com conseqüente influxo de cátions, despolarizando esses neurônios – processo conhecido como despolarização anóxica –, causando influxo desregulado de cálcio, perda da capacidade de produção de ATP pelo neurônio e maior liberação de glutamato. Há, portanto, amplificação local do insulto isquêmico inicial. O aumento de Ca^{2+} intracelular inicia uma série de eventos citoplasmáticos e nucleares, nos quais há geração de radicais livres e ativação de enzimas dependentes de Ca^{2+} , incluindo enzimas proteolíticas que degradam proteínas do citoesqueleto e proteínas da matriz extracelular, fosfolipase A_2 , calpaina, endonucleases, ATPase, ciclooxigenase, e NO sintase, resultando em dano celular extenso. Esses processos promovem rapidamente a morte celular através de necrose, mas os mecanismos excitotóxicos também ativam eventos moleculares que levam a apoptose.

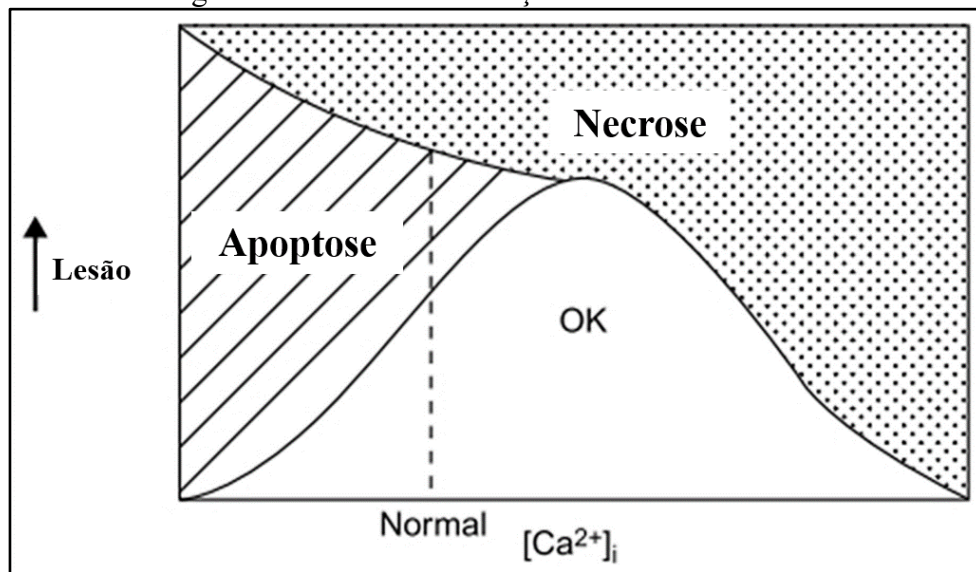
A demonstração de efeitos neuroprotetores de antagonistas glutamatérgicos contra os efeitos deletérios de hipóxia/isquemia tanto *in vitro* quanto *in vivo*, juntamente com a identificação da superativação de receptores NMDA e influxo excessivo de Ca^{2+} como mediadores primários de toxicidade aguda, encorajaram pesquisas e testes de drogas antagonistas de NMDA em vários modelos animais de isquemia cerebral e desenvolvimento de drogas para uso humano (CHOI, 2020).

Os receptores NMDA são canais iônicos com diversas funções fisiológicas cruciais, espalhados por todo SNC. Sua ativação contribui para a plasticidade da força sináptica e contribui com mecanismos de algumas formas de aprendizagem e memória (CHOI, 2020). Embora ensaios pré-clínicos tenham sido bem-sucedidos, os testes clínicos com antagonistas desses receptores apresentaram várias limitações, principalmente envolvendo dose e a janela temporal de administração após início da isquemia. Algumas drogas precisavam ser administradas em baixas doses para evitar importantes efeitos adversos, como por exemplo alucinações, ou só eram administradas tardiamente, devido à dificuldade de acesso aos pacientes no início do evento isquêmico (CHOI, 2020). Em testes clínicos, todas essas drogas com esse mecanismo falharam, tanto por não serem eficazes como por possuírem efeitos adversos graves (WEILINGER et al., 2013).

Ademais, é indiscutível que existem efeitos benéficos em reduzir a necrose decorrente de excitotoxicidade aguda e a ativação de vias que levam à apoptose, contudo, o bloqueio prolongado de receptores NMDA aumenta o risco de manter a concentração intracelular de Ca^{2+}

abaixo do nível necessário para sobrevivência celular, considerando, por exemplo, que muitas vias de sinalização que promovem sobrevivência necessitam de níveis moderados de Ca^{2+} para acontecer (figura 4). Dessa forma, se antagonistas de NMDA são benéficos ou prejudiciais ao cérebro isquêmico depende do tipo de insulto e especificidade do tratamento, como tempo, localização e redução dos níveis de Ca^{2+} intracelular promovido pela droga (CHOI, 1995, 2020).

Figura 4. Lesão e concentração intracelular de Ca^{2+} .



Legenda: Diagrama ilustrando a relação entre gravidade da lesão, concentração intracelular de Ca^{2+} e a tríade sobrevivência/apoptose/necrose. Um único insulto pode levar tanto a apoptose quanto à necrose, ou mesmo aos dois processos simultaneamente. A gravidade da lesão pode determinar qual dos processos de morte celular predomina. Insultos moderados ou baixo influxo de Ca^{2+} favorecem apoptose. Níveis ótimos de Ca^{2+} podem favorecer processos de regeneração. Fonte: Adaptado de Choi, 1995.

A perda do suprimento energético aos neurônios induz à despolarização anóxica, a qual resulta em estresse fisiológico nessas células devido a desregulação do fluxo iônico. Muitos outros receptores ionotrópicos e canais iônicos contribuem para a despolarização anóxica e, subsequentemente, para a ativação de cascatas de sinalização que levam a morte celular. Os receptores ionotrópicos de glutamato e ATP que funcionam como canais para influxo de cátions são críticos na morte e disfunção de neurônios. Interessantemente, tem-se demonstrado que dois desses receptores (P2X7 e NMDAR) estão acoplados ao canal iônico panexina-1 (Panx1). Os receptores de canais de potencial transitório (TRPs) e canais iônicos sensíveis a ácidos (ASICs) também possuem papel importante em respostas a isquemia (WEILINGER et al., 2013).

Um desafio atual é elucidar interrelações mecânicas e temporais desses canais iônicos para completo entendimento de seu impacto nos neurônios durante isquemia. O que se sabe é, como descrito anteriormente, que a isquemia desencadeia o aumento de liberação de glutamato no espaço pré-sináptico, aumentando dramaticamente a sinalização glutamatérgica via receptores NMDA e AMPA. O influxo de cálcio por meio destes pode estimular a produção de NO através da nNOS Ca^{2+} -dependente, o qual interage com ROS, formando intermediários altamente prejudiciais (peroxinitrito, por exemplo). NO e produtos da reação ROS-NO podem ativar os canais TRPM2/7 e panexina-1. A difusão do NO para o meio extracelular pode aumentar a liberação de glutamato, exacerbando a excitotoxicidade. Durante esse processo, o pH do meio extracelular diminui levando a abertura de ASICs e maior influxo de Ca^{2+} , o que contribui ainda mais para a morte celular. Aumentos das concentrações de ATP extracelulares estimulam a abertura de receptores purinérgicos P2X7, possibilitando ativação de canais Panx1 via família de cinases Src, assim como estimulando ERK1/2, induzindo morte celular. A ativação de quaisquer/todos esses canais iônicos mencionados levarão ao aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , estando intimamente associados em disfunção neuronal, apoptose e/ou necrose (WEILINGER et al., 2013).

Choi (2020) comenta em seu artigo que a inibição de fases individuais de indução da excitotoxicidade, ou a diminuição da ativação/amplificação de uma via molecular específica, são abordagens protetoras em modelos animais de isquemia cerebral, porém podem ser a maior causa de falha no desenvolvimento de drogas na indústria farmacêutica. A translação para clínica de drogas que possuem um único alvo farmacológico é questionável, pois outras vias e moléculas não bloqueadas podem se sobrepor, tornando a abordagem ineficaz, especialmente devido a variabilidade de apresentações de isquemia cerebral em humanos. Para alcançar efeito neuroprotetor robusto em humanos, a terapia deve inibir múltiplos mecanismos.

1.1.5 Fatores neurotróficos

No SNC vários fatores de crescimento têm emergido como candidatos com interessante potencial neuroprotetor e com função restaurativa importante no tratamento de distúrbios psiquiátricos e neurológicos (MARQUES et al., 2019; NAGAHARA; TUSZYNSKI, 2011), sendo amplamente estudados devido à sua participação no processo de neurogênese durante a fase embrionária e recuperação após dano patológico (NAGAHARA; TUSZYNSKI,

2011). Esses fatores e seus receptores estão expressos no SNC de adultos, além de crescentes evidências de sua efetividade em modelos animais de doenças, nos quais previnem morte celular e estimulam a função neuronal (IADECOLA; ANRATHER, 2011).

Após a isquemia cerebral, a produção de fatores de crescimento auxilia no estabelecimento de um ambiente favorável ao brotamento neural, neurogênese, angiogênese, gliogênese e reorganização tecidual. Tanto células inflamatórias, quanto neurônios e astrócitos são capazes de produzir grande variedade dessas moléculas (MARQUES et al., 2019). Dentre os diversos fatores que têm sido identificados por exercerem essa função de proteger células tronco neurais e melhorar a neurogênese após isquemia cerebral encontram-se o fator de crescimento de fibroblasto básico, o fator de crescimento epidermal, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), a proteína morfogenética óssea (BMP), o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), entre outros (ZHOU et al., 2018).

Estudos demonstram que a administração sistêmica de BDNF após evento isquêmico melhora a recuperação sensoriomotora sem afetar o tamanho da área de infarto e sugerem que essa melhora funcional se deve a mudanças no início do evento e tardias (SCHÄBITZ et al., 2004, 2007). Inicialmente, durante a isquemia, há um desbalanço entre os sistemas de neurotransmissão excitatória e inibitória, o qual pode ser prevenido pela administração exógena de BDNF, enquanto mudanças tardias incluem regeneração axonal, brotamento sináptico e melhora das funções motoras e cognitivas (SCHÄBITZ et al., 2004).

O processo de neurogênese também é conhecido por sua importância na recuperação do SNC após uma lesão. A neurogênese em adultos ocorre apenas em regiões específicas, sob condições específicas. Evidências mostram que isquemia cerebral induz a neurogênese nas zonas subgranular do hipocampo (SGZ) e subventricular (SVZ). Entretanto, a neurogênese endógena não é suficiente para realizar o reparo tecidual e funcional. A maioria dessas células sofre morte celular programada nos períodos de proliferação, migração ou integração, e isso pode ser devido à falta de suporte trófico apropriado, bem como microambiente desfavorável devido às lesões e falha na sinalização com outros neurônios (KOH; PARK, 2017; LU; MANAENKO; HU, 2017; ZHANG; ZHANG; CHOPP, 2005; ZHOU et al., 2018). Melhorar a neurogênese desencadeada pela isquemia cerebral e promover sobrevivência celular são alvos interessantes na busca por alternativas terapêuticas.

1.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE ISQUEMIA CEREBRAL

Modelos pré-clínicos de isquemia cerebral contribuem significativamente para a compreensão de mecanismos de ação de novas abordagens terapêuticas, assim como seus potenciais efeitos em parâmetros fisiológicos. Atualmente, a pesquisa pré-clínica agrega modelos tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Alguns aspectos da isquemia são impossíveis de mimetizar em modelos animais, como as estratégias de prevenção primária, entretanto, essa é uma ferramenta que permite regular variáveis específicas, como duração da isquemia, tempo desde o início da lesão, gravidade, as quais são impossíveis controlar em humanos (HOLLOWAY et al., 2016; NEUHAUS et al., 2017).

A utilização de modelos *in vivo* permitiu grandes descobertas sobre a fisiopatologia de doenças humanas. Roedores são normalmente a espécie mais utilizada em pesquisas, entretanto, mesmo com a pouca variação genética em relação aos humanos, há profundas discrepâncias estruturais, celulares e moleculares. Até mesmo primatas não-humanos apresentam diferenças bioquímicas importantes. Dessa forma, sistemas humanos *in vitro* podem agregar valiosas informações sobre a segurança de um determinado fármaco, por exemplo, assim como possibilitar ensaios pré-clínicos iniciais a custo relativamente baixo (HOLLOWAY et al., 2016; TASCA; DAL-CIM; CIMAROSTI, 2015).

Adicionalmente, avanços recentes em bioinformática e sistemas biológicos têm possibilitado o modelamento e simulação de processos celulares e doenças utilizando métodos teóricos. Nessa abordagem, a interação entre todos os componentes de um sistema é descrita matematicamente e modelos computacionais são estabelecidos, permitindo codificar e testar hipóteses sobre funções celulares e patogênese de diversas doenças, contribuindo para identificar novas drogas e alvos terapêuticos (BARH et al., 2014). Através de modelos estatísticos que descrevem os principais achados clínicos na maioria dos pacientes que sofreram isquemia cerebral, é possível gerar pacientes virtuais, os quais podem receber o tratamento a ser pesquisado, estimando os efeitos (KONDURI et al., 2020). Modelos computacionais *in silico* têm sido criados como alternativa a estudos *in vivo*, contribuindo de forma significativa no desenvolvimento de produtos biomédicos em ensaios pré-clínicos.

1.2.1 *In vitro*

Condições isquêmicas podem ser mimetizadas *in vitro* pela remoção de oxigênio e glicose ou por inibição enzimática do metabolismo. A condição de anóxia pode ser obtida substituindo o meio de cultura equilibrado com níveis normais de O₂/CO₂ por meio equilibrado com N₂/CO₂ e mantendo as células em câmara de hipóxia, causando alterações dramáticas no citoesqueleto de células endoteliais e em modelos de barreira hematoencefálica. Contudo, a relevância fisiológica da anóxia em ausência de depleção de glicose é mais relevante em condições em que o fluxo sanguíneo é mantido, como o que ocorre durante o envenenamento por monóxido de carbono (HOLLOWAY et al., 2016; TASCA; DAL-CIM; CIMAROSTI, 2015).

Com objetivo de mimetizar a interrupção do suprimento de oxigênio e nutrientes ao cérebro que ocorre durante um evento isquêmico, linhagens celulares, células primárias, fatias organotípicas e fatias de tecido cerebral são tipicamente incubadas em meio celular sem glicose, em câmara de hipóxia (TASCA; DAL-CIM; CIMAROSTI, 2015). Os experimentos de privação de oxigênio e glicose (POG) podem ser seguidos por uma fase de reoxigenação, em que as culturas retornam às condições padronizadas, simulando a reperfusão que acontece em eventos de isquemia transitória, quando o fluxo sanguíneo cerebral é restabelecido (HOLLOWAY et al., 2016). A excitotoxicidade também pode ser estudada isoladamente em sistemas *in vitro*, através da aplicação de agonistas glutamatérgicos, por exemplo (HOLLOWAY et al., 2016).

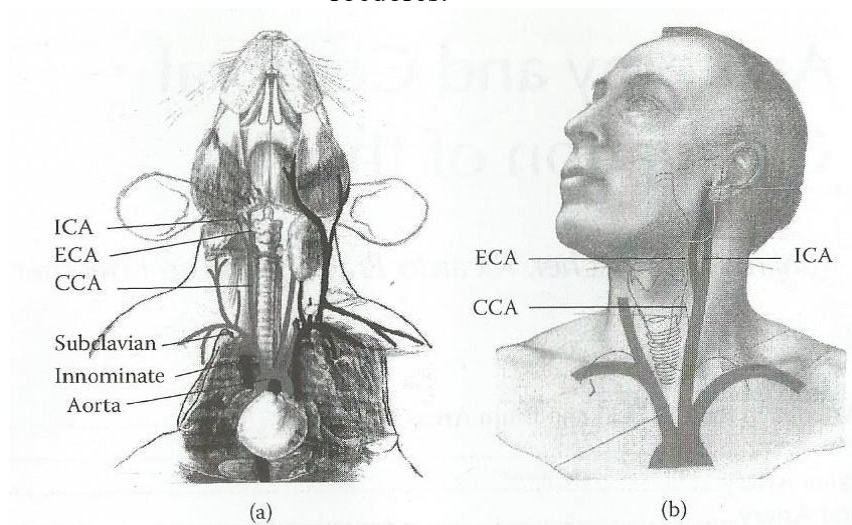
Sommer et al. (2017) defendem que, embora apresentem limitações quanto a replicação da complexidade do evento isquêmico, quando utilizados apropriadamente estudos *in vitro* auxiliam a compreensão de mecanismos bioquímicos e celulares e respondem diversas perguntas científicas, sendo importante ferramenta de descoberta de novas moléculas com potencial terapêutico.

1.2.2 *In vivo*

Devido à complexidade do encéfalo e de sua resposta a danos, a isquemia cerebral e suas consequências não podem ser avaliadas em modelos *in vitro* isoladamente e, por isso, modelos animais são de extrema importância (WANG-FISCHER, 2008). No início da pesquisa experimental, espécies maiores eram utilizadas para mimetizar isquemia cerebral. Atualmente,

camundongos e ratos são escolhidos mais frequentemente como modelos *in vivo*, devido ao seu baixo custo de aquisição e manutenção, facilidade de monitoramento, técnicas de manipulação mais simples (BACIGALUPPI; COMI; HERMANN, 2010; CARMICHAEL, 2005; SOMMER, 2017) e semelhanças anatômicas e neuroquímicas (WANG-FISCHER, 2008) (figura 5).

Figura 5. Esquema evidenciando semelhança entre a estrutura vascular de humanos e roedores.



Legenda: Mamíferos em geral e humanos possuem estruturas vasculares e neurais similares, bem como mecanismos bioquímicos e moleculares semelhantes. Fonte: WANG-FISCHER, 2008.

Os modelos *in vivo* de isquemia cerebral podem ser divididos em modelos focais e globais. A isquemia focal é caracterizada por uma redução do fluxo sanguíneo em uma região específica do cérebro, enquanto na isquemia global a redução do fluxo sanguíneo afeta o cérebro inteiro. A isquemia focal pode ser realizada através de diferentes técnicas, como a oclusão mecânica tanto da artéria cerebral média (ACM) proximal quanto da distal, ou por oclusão trombótica por injeção de coágulos sanguíneos ou trombina diretamente na ACM, ou por fototrombose após injeção do corante fotossensível rosa de bengala (BACIGALUPPI; COMI; HERMANN, 2010; CARMICHAEL, 2005; SOMMER, 2017).

A isquemia global pode ser induzida através do método de oclusão de quatro vasos (4VO), que consiste na oclusão reversível das artérias carótidas comuns juntamente com a oclusão permanente das artérias vertebrais por eletrocoagulação, ou pelo método de oclusão de dois vasos (2VO), o qual é produzido pela oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (BCCAo) (BACIGALUPPI; COMI; HERMANN, 2010).

1.3 ABORDAGEM TERAPÊUTICA ATUAL

O restabelecimento do fluxo sanguíneo em uma artéria obstruída é fundamental para salvar o tecido neuronal em risco. Em caso de isquemia cerebral iniciada por parada cardíaca, é essencial que seja feita ressuscitação cardiopulmonar apropriada para que haja retorno da circulação (YAN et al., 2020).

Em casos de AVE agudo, a agência de regulação de drogas e alimentos dos Estados Unidos da América (FDA), aprovou o uso do ativador do plasminogênio tecidual recombinante (tPA, Alteplase) como trombolítico em 1996 (KÜLKENS; HACKE, 2007). Entretanto, existe uma janela terapêutica de poucas horas para intervir nos processos patológicos desencadeados pela isquemia cerebral, no sentido de minimizar o dano ao SNC e, conseqüentemente na sobrevivência e na presença de sequelas (MICIELI; MARCHESELLI; TOSI, 2009). Adicionalmente, nem todos os indivíduos podem fazer uso do Alteplase, embora sua ação anticoagulante seja bastante eficaz (FONAROW et al., 2011; IADECOLA; ANRATHER, 2011). A administração endovenosa do trombolítico tPA deve ser feita nas primeiras 3–4,5 horas após o início dos sintomas, com a exclusão de hemorragia intracraniana através de técnicas de imageamento como a tomografia computadorizada e ressonância magnética de crânio (CAMPBELL; KHATRI, 2020). As suas contraindicações são para casos em que haja risco aumentado de hemorragia. Todos esses fatores contribuem para que o tPA seja utilizado em apenas 5% dos pacientes que sofrem AVE (MICIELI; MARCHESELLI; TOSI, 2009).

Em 2003, a Associação Americana de AVE (*American Stroke Association*), em parceria com a Associação Americana do Coração (*American Heart Association*), iniciou uma campanha denominada “*Get with the Guidelines*”, a qual inclui o programa “*Target Stroke*” (FONAROW et al., 2011, 2014; XIAN et al., 2014). O objetivo é a melhora dos cuidados aos pacientes, incentivando a redução do tempo entre a sua chegada ao serviço de saúde e o tratamento com o tPA – processo chamado originalmente *door-to-needle* 60, traduzido como tempo porta-agulha. No Brasil, o Hospital Israelita Albert Einstein adotou o programa e demonstrou, nos últimos anos, eficiência em diminuir o tempo médio porta-agulha, mantendo-o abaixo de 60 minutos desde 2015 (Hospital Israelita Abert Einstein, 2018).

Além do trombolítico Alteplase, o medicamento Edaravone (Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation, Tóquio, Japão) foi a primeira droga neuroprotetora implantada para tratamento de pacientes com AVE agudo (AMARO; CHAMORRO, 2011; KIKUCHI et al.,

2010; LAPCHAK, 2010). Essa droga tem sido utilizada em alguns países asiáticos, principalmente no Japão desde 2001. Embora seu uso no AVE não esteja aprovado em países ocidentais, que o utilizam no tratamento de esclerose lateral amiotrófica (ENOMOTO et al., 2019), apresenta como principal mecanismo de ação a sua atividade antioxidante. Edaravone é uma molécula hidrofóbica, que atravessa rapidamente a BHE e é capaz de atuar em diversos alvos farmacológicos, regulando várias vias de sinalização, além de suprimir a morte neuronal tardia, conter a neurotoxicidade induzida pela ativação microglial, reduzir a neuroinflamação, inibir a enzima lipoxigenase e atenuar os efeitos deletérios de cascatas que culminariam no aumento do edema cerebral após isquemia (AMARO; CHAMORRO, 2011; KIKUCHI et al., 2013, 2017).

Adicionalmente, desde 2014, uma série de estudos foram realizados na Europa, América do Norte e Austrália demonstrando a efetividade da trombectomia mecânica utilizando dispositivos como *stent retrievers* para remoção de coágulos com resultante melhora funcional do paciente e diminuição da mortalidade. As evidências sugerem que a janela de tratamento pôde ser estendida por aproximadamente 24h após o início dos sintomas (BHOGAL et al., 2018; SAVITZ et al., 2017).

É urgente, portanto, o desenvolvimento de novos fármacos neuroprotetores que melhorem a qualidade de vida de pessoas acometidas pela isquemia cerebral. Atualmente, existem poucas terapias adjuvantes aprovadas para o tratamento dessa enfermidade. Tais terapias focam na redução de danos secundários ao tecido na área da penumbra, minimizando a lesão tecidual antes e após a reperfusão, enquanto promovem recuperação e plasticidade neuronal (RAJAH; DING, 2017). Apesar da identificação de muitos alvos terapêuticos e da demonstração de efeito neuroprotetor em modelos animais de isquemia cerebral de diversas drogas, o sucesso em ensaios clínicos permanece impreciso (CAMPBELL et al., 2019). Sendo assim, esforços têm sido feitos para assegurar que os modelos animais estudados reflitam a realidade de ensaios clínicos tanto quanto possível, utilizando medidas funcionais/comportamentais relevantes na avaliação do potencial benéfico (STAIR, 1999).

1.4 DA BANCADA PARA OS LEITOS HOSPITALARES

Por definição, o termo *neuroproteção* se refere a “qualquer estratégia, ou combinação de estratégias, que antagonize, interrompa ou retarde a sequência de eventos bioquímicos e

moleculares prejudiciais que, sem intervenção, podem levar a dano isquêmico irreversível” (GINSBERG, 2008). Enquanto a trombólise permite a restauração do fluxo sanguíneo ao local afetado, a neuroproteção visa limitar o dano por prevenir a morte de neurônios principalmente na área da penumbra isquêmica. De acordo com essa definição, a neuroproteção se origina na célula neuronal, não englobando, portanto, agentes terapêuticos que agem na vasculatura cerebral, como trombolíticos, antitrombóticos e antiplaquetários, os quais apresentam mecanismos de ação relacionados ao sistema vascular e não ao parênquima cerebral diretamente (GINSBERG, 2008).

Muitos agentes e estratégias neuroprotetoras foram estudados durante anos, incluindo antioxidantes, antagonistas de receptores glutamatérgicos, hipotermia, barbitúricos, bloqueadores de canais de cálcio, fatores de crescimento e outros, sendo considerados efetivos em estudos pré-clínicos. Entretanto, nenhum deles demonstrou conclusivamente ser efetivo em seres humanos (STROKE THERAPY ACADEMIC INDUSTRY ROUNDTABLE (STAIR), 1999). Algumas possíveis razões para essa falha estão relacionadas às propriedades inerentes aos fármacos utilizados e/ou ao modelo animal específico utilizado em sua avaliação (NEUHAUS et al., 2017; STROKE THERAPY ACADEMIC INDUSTRY ROUNDTABLE (STAIR), 1999; SUTHERLAND et al., 2012).

Inicialmente, os estudos clínicos eram planejados para avaliar a neuroproteção induzida por monoterapias, e não para determinar se a intervenção poderia aumentar a janela terapêutica para reperfusão ou mitigar as consequências desta. Atualmente, os protocolos disponíveis para reperfusão são altamente efetivos e experimenta-se nova era, utilizando-se trombólise intravascular pela ação do ativador do plasminogênio tecidual recombinante e/ou, adicionalmente, trombectomia mecânica (BHOGAL et al., 2018; SAVITZ et al., 2017). Com o avanço de técnicas de imageamento, é possível avaliar os pacientes em detalhes, permitindo que agentes neuroprotetores possam ser testados como terapias adjuntas à recanalização (NEUHAUS et al., 2017). Um dos modelos propõe que se inicie a terapia de neuroproteção o mais rápido possível após início da isquemia, tanto na ambulância ou no pronto-atendimento do hospital, para estender a janela temporal da terapia intravenosa ou intra-arterial. Um segundo modelo propõe a terapia durante, após início ou assim que completa a reperfusão, para reduzir as consequências das lesões provocadas pelo evento (SAVITZ et al., 2017).

É necessário um planejamento adequado na comunidade científica, de modo que terapias neuroprotetoras sejam investigadas de maneira mais colaborativa para aumentar a

reprodutibilidade, melhorar a qualidade das publicações na área, e adotar modelos experimentais mais próximos ao que acontece na prática clínica (NEUHAUS et al., 2017).

Nesse contexto, um grupo de especialistas em avaliações pré-clínicas de terapias para isquemia cerebral criou o modelo STAIR, propondo recomendações de como otimizar a pesquisa pré-clínica e de avaliar drogas neuroprotetoras e restauradoras para o tratamento de isquemia (STROKE THERAPY ACADEMIC INDUSTRY ROUNDTABLE (STAIR), 1999).

As recomendações da STAIR para estudos de novas drogas se referem à realização de curva dose-resposta adequada, definição da janela temporal em um modelo animal bem-caracterizado, realização de estudos randomizados reprodutíveis cegos, realização de avaliação funcional e histológica a curto e longo prazo, considerar o uso de espécies giroencefálicas após realização do estudo em roedores e diferenciar intervenções em oclusões permanentes e transitórias (FISHER et al., 2009; STROKE THERAPY ACADEMIC INDUSTRY ROUNDTABLE (STAIR), 1999).

Outro esclarecimento importante trazido pela STAIR é que nenhum modelo animal mimetiza a clínica completamente (FISHER et al., 2009). Os principais estudos utilizam animais saudáveis para induzir a isquemia cerebral que, naturalmente, não sofreriam esse evento, enquanto nos humanos a isquemia resulta habitualmente da progressão natural de doenças pré-existentes ou fatores de risco. Geralmente, em humanos, a isquemia acontece no contexto de envelhecimento, hipertensão, diabetes, doenças cardíacas como fibrilação atrial, e o uso concomitante de medicamentos. Outro fator importante é o gênero, que influencia tanto os mecanismos da lesão quanto as respostas à intervenção (FISHER et al., 2009).

Embora os estudos *in vivo* e *in vitro* demonstrem a eficácia de vários agentes neuroprotetores, em sua maioria focam apenas na sobrevivência neuronal. Entretanto, múltiplos tipos celulares cerebrais devem ser considerados. Não apenas neurônios, mas células gliais e elementos vasculares devem ser preservados, bem como a comunicação entre esses elementos. Assim, múltiplas avaliações são consideradas importantes para STAIR e, principalmente, a condução de avaliações histológicas e comportamentais por, pelo menos, 2 a 3 semanas são encorajadas (FISHER et al., 2009).

1.5 PLANTAS MEDICINAIS NA TERAPÊUTICA DA ISQUEMIA CEREBRAL

A utilização das plantas como medicamento para o tratamento das enfermidades que acometem a espécie humana remonta à idade antiga. O uso da papoula (*Papaver somniferum*), por exemplo, tem sido relatado há muitos anos, culminando no isolamento da morfina, em 1806, da codeína, em 1824, e do alcaloide anti-espasmódico papaverina, em 1848, todos da mesma planta (DUTRA et al., 2016).

O emprego de plantas medicinais na recuperação da saúde tem evoluído ao longo dos tempos desde as formas mais simples de tratamento local, com aplicações tópicas, até as formas tecnologicamente sofisticadas. Vasto campo com potencial ação terapêutica pode ser encontrado nas plantas medicinais. Além de ser uma alternativa facilmente acessível e barata quando comparada com medicamentos sintéticos, tem-se mostrado a efetividade de plantas medicinais em alterar funções imunológicas e modular processos inflamatórios sem causar efeitos colaterais como imunossupressão (DUTRA et al., 2016; HORINOUCI et al., 2013).

Nos últimos tempos, multiplicaram-se as informações sobre as vantagens das plantas medicinais e fitoterápicos e o desenvolvimento de fitoterápicos tem recebido muita atenção tanto por parte da comunidade científica, quanto pelas indústrias farmacêuticas. Apesar da grande aceitação e seu extenso uso terapêutico pela população em geral, principalmente a de baixa renda, as plantas medicinais têm sido relativamente pouco avaliadas cientificamente, sendo, dessa forma, necessários estudos mais detalhados no sentido de verificar e assegurar sua qualidade, segurança e eficácia (DUTRA et al., 2016).

Em países como o Brasil, esses aspectos revestem-se de singular importância por vários motivos, dentre eles a grande biodiversidade e que uma grande parcela da população não tem acesso a medicamentos e pelo fato de o país ser extremamente dependente de importações de matérias-primas farmacêuticas (DUTRA et al., 2016). O governo brasileiro tem adotado medidas para encorajar a utilização da fitoterapia pelo Sistema Único de Saúde (SUS), de maneira a aumentar o acesso público a essa forma de tratamento, de maneira segura (LEITE; CAMARGOS; CASTILHO, 2021; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012; RODRIGUES, 2006). Baseado no uso racional de plantas medicinais e do uso sustentável da biodiversidade brasileira, a fitoterapia pode melhorar a qualidade de vida da população, a economia nacional e o desenvolvimento tecnológico do país.

Assim, considerando o limitado tratamento preconizado para o AVE, as plantas medicinais se apresentam como valiosa alternativa e fonte de novos compostos com atividade biológica.

1.5.1 Família *Polygalaceae* e plantas do gênero *Polygala*

As plantas da família *Polygalaceae* são predominantemente encontradas em regiões tropicais e são conhecidas por conter grande diversidade de compostos químicos, muitos dos quais exibem significativa atividade biológica. Entre as plantas desta família, incluem-se as do gênero *Polygala*, que compreende cerca de 500 espécies, apresentando-se a maior parte das vezes na forma de arbustos ou de pequenas trepadeiras que cobrem galhos de árvores (GENTRY, 1996). Investigações fitoquímicas em diferentes espécies de *Polygala* revelaram vários compostos, incluindo lignanas citotóxicas (DALL'ACQUA et al., 2002), saponinas (CHUNG et al., 2002; DESBÈNE et al., 1999; ESTRADA et al., 2000), xantonas (CRISTIANO et al., 2003; DALL'ACQUA et al., 2002; EL SAYAH et al., 1999; MAK et al., 2001), cumarinas e flavonóides (CRISTIANO et al., 2003).

Sabe-se que *Polygala paniculata* L. (figura 6) é a espécie mais amplamente distribuída do gênero, originária da América tropical, América Central até o México e Texas (EUA) (LÜDTKE; SOUZA-CHIES; MIOTTO, 2013). Encontrada em beiras de estradas, em solos úmidos, secos, arenosos, em restingas, beiras de matas de planície, no interior e na orla de capoeiras, campos arbustivos e, mais raramente, em banhados, *P. paniculata* L. apresenta-se como uma erva ereta, bastante ramificada, de aparência delicada e é conhecida popularmente como barba-de-são-joão, barba-de-são-pedro, bromil, arrozinho e alecrim-de-santa-catarina. Vem sendo utilizada na medicina popular em doenças estomacais como vomitiva e purgativa, diurética, bem como no tratamento da asma, bronquite crônica e demais afecções do aparelho respiratório (LORENZI; MATOS, 2002). Além disso, as raízes dessa planta possuem forte aroma devido a presença de salicilato de metila, o que permite o uso de seu extrato alcoólico em aplicações locais em casos de torceduras, machucados ou reumatismos das articulações (LORENZI; MATOS, 2002).

Figura 6. *Polygala paniculata*.



Fonte: Reflora – Herbário virtual; Flora do Brasil 2020; Tiago Tizziani (arquivo pessoal).

Alguns estudos científicos demonstraram ação importante dessa planta, incluindo potenciais efeitos benéficos no SNC (Tabela 1). Utilizando-se um modelo animal de neurotoxicidade induzida por metilmercúrio, Farina et al. (2005) avaliaram o efeito do extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* (EHPp) sobre atividade das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase e glutathione reductase, responsáveis pela detoxificação endógena de produtos gerados pelo estresse oxidativo, no córtex cerebral e cerebelo de camundongos expostos a esse tipo de envenenamento, bem como seu desempenho motor (FARINA et al., 2005). Os autores demonstraram que a administração oral do EHPp preveniu as alterações provocadas pelo envenenamento causado pelo metilmercúrio. Adicionalmente, avaliou-se *in vitro* a atividade de três compostos isolados de espécies de *Polygala* (FRANCO et al., 2007), destacando-se a quercetina como molécula crucial contra a toxicidade induzida por metilmercúrio por sua capacidade de conter a formação de peróxido de hidrogênio, o qual contribui com o mecanismo molecular de proteção.

O EHPp também apresentou efeito tipo-antidepressivo em animais submetidos ao teste do nado forçado, aparentemente mediado por uma interação entre os sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico (BETTIO et al., 2011). Foi encontrada, ainda, atividade antitumoral importante do EHPp, juntamente com o extrato de outras espécies de *Polygala* encontradas no sul do Brasil (TIZZIANI et al., 2017).

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram efeito antinociceptivo de EHPp em modelos de nocicepção provocada por estímulos químicos e térmicos em camundongos, no qual destacou-se sua maior potência e eficácia na prevenção da nocicepção induzida por glutamato e por inibir a ação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-1 β (LAPA et al., 2009). Os mesmos autores demonstraram que a administração via oral de EHPp a ratos normotensos causou uma redução significativa dose dependente da pressão arterial, quando comparada ao nível basal. Ao observar o comportamento do tecido isolado, relatou-se também um efeito vasorrelaxante de concentrações acumulativas do extrato apenas na preparação com o endotélio intacto (LAPA et al., 2011).

Relatou-se, ainda, que a administração de EHPp protegeu os animais contra a úlcera gástrica induzida por etanol e indometacina (LAPA et al., 2007). Outros estudos descrevem que o EHPp apresenta importante efeito no tratamento da neuroinflamação associada ao transtorno de estresse pós-traumático (BARROS, 2016), na melhora de alterações comportamentais de camundongos submetidos ao modelo de fibromialgia induzido pela reserpina, tanto sensoriais quanto emocionais (BEPPLER, 2018) e reduziu a hiperalgesia e acelerou a regeneração nervosa periférica em camundongos com lesão compressiva do nervo isquiático (BATISTI, 2018). Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que *P. sabulosa* reduz danos motores e cognitivos em modelo de isquemia cerebral global (MARTINS-SILVA et al., 2021). Adicionam-se, ainda, evidências de ação central importante de *P. tenuifolia*, inclusive em modelos animais de isquemia cerebral (KIM et al., 2008; PARK et al., 2002, 2006), reforçando o potencial promissor dessa espécie no tratamento de diversas enfermidades.

Dessa forma, sabe-se que a lesão cerebral decorrente de um evento isquêmico é desenvolvida a partir de uma série complexa de eventos fisiopatológicos. Qualquer intervenção a ser feita no intuito de preservar o tecido deve ocorrer dentro de uma pequena faixa terapêutica, inicialmente objetivando a reperfusão do tecido e, por fim, visando a proteção das células envolvidas. Considerando-se que muitos componentes moleculares importantes são comuns

entre as doenças acima mencionadas e à lesão por isquemia cerebral, este trabalho investigou o efeito protetor de EHPp em modelos *in vitro* e *in vivo* de isquemia cerebral.

Tabela 1. Atividades biológicas *in vivo* e *in vitro* de *Polygala paniculata*.

Estudos <i>in vivo</i>					
Atividade biológica	Modelo estudado	Animal	Doses efetivas	Mecanismo	Referência
Neuroprotetor	Toxicidade induzida por metilmercúrio	Camundongos <i>Swiss</i> machos	100 mg/kg, v.o.	Antioxidante	Farina, 2005
Antiinflamatório e antiedematogênico	Modelos de nocicepção térmica e química e indução de edema de orelha	Camundongos <i>Swiss</i> fêmeas	100-400 mg/kg, v.o.	Interação com sistema opióide	Nogueira, 2005
Antiinflamatório	Injeção intraplantar de carragenina	Ratos <i>Wistar</i>	30-300 mg/kg, v.o.	-	Lapa, 2006
	Injeção intrapleural de carragenina	Camundongos <i>Swiss</i> fêmeas	3-30 mg/kg, v.o.	-	
Gastroprotetor	Lesões agudas induzidas por etanol e indometacina	Ratos <i>Wistar</i> fêmeas	3-30 mg/kg, i.p. e 30-300 mg/kg, v.o.	Interação com prostaglandinas, antioxidante, manutenção da produção de muco gástrico	Lapa, 2007
Antinociceptivo	Modelos de nocicepção térmica e química	Camundongos <i>Swiss</i> machos	0,01-10 mg/kg, v.o.	Interação com sistema glutamatérgico e inibição de citocinas pró-inflamatórias	Lapa, 2009
Antidepressivo	Teste do nado forçado	Camundongos <i>Swiss</i> fêmeas	0,01-30 mg/kg, v.o.	Interação com sistemas serotoninérgico, dopaminérgico e noradrenérgico	Bettio, 2011
Redução da pressão arterial	Ratos normotensos	Ratos <i>Wistar</i> machos	30-300 mg/kg, v.o.	Ativação da via NO-guanilato ciclase e abertura de canais de potássio ativados por cálcio	Lapa, 2011
Antidepressivo	Modelo de estresse pós-traumático	Camundongos <i>Swiss</i> fêmeas	0,01-1 mg/kg, v.o.	Diminuição da neuroinflamação	Barros, 2016
Antidepressivo e analgésico	Modelo de fibromialgia induzida por reserpina	Camundongos <i>Swiss</i> fêmeas	10-100 mg/kg, v.o.	-	Beppler, 2018
Anti-hiperalgesia e regeneração nervosa periférica	Esmagamento do nervo isquiático	Camundongos <i>Swiss</i> machos	0,1-10 mg/kg, v.o.	Diminuição de citocinas pró-inflamatórias	Batisti, 2018
Estudos <i>in vitro</i>					
Atividade biológica	Célula/tecido		Concentração	Referência	
Antiparasitário	<i>Trypanosoma cruzi</i> Y		50 µg/mL	Pizzolatti, 2002	
Vasorelaxante	Anéis de aorta intactos		30-1000 µg/mL	Lapa, 2011	
Antifúngico	<i>Candida tropicalis</i>		250 µg/mL	Johann, 2011	
	<i>Sporothrix schenckii</i>		1000 µg/mL		
Antitumoral	Leucemia linfóide aguda de células T (Jurkat)		50 µg/mL	Tizziani, 2017	

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito protetor do extrato hidroalcoólico de *Polygala paniculata* em modelos de isquemia cerebral *in vitro* e *in vivo*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Investigar o efeito da adição de extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* à cultura de neurônios corticais em privação de oxigênio e glicose;
- ii. Avaliar se o tratamento com extrato hidroalcoólico do *P. paniculata* reduz déficits motores causados pela isquemia global;
- iii. Avaliar se o tratamento com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* mitiga déficits cognitivos causados pela isquemia global;
- iv. Avaliar se o tratamento com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* ameniza o comportamento do tipo ansioso causado pela isquemia global;
- v. Investigar se o tratamento com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* altera a expressão de marcadores de astrócitos e micróglia no córtex e hipocampo após isquemia global;
- vi. Investigar se o tratamento com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* altera a expressão de citocinas inflamatórias no córtex e hipocampo após isquemia global;
- vii. Investigar se o tratamento com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* afeta a expressão de fatores neurotróficos no córtex e hipocampo após isquemia global;
- viii. Avaliar se o tratamento com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* diminui a neurodegeneração hipocampal após isquemia global.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

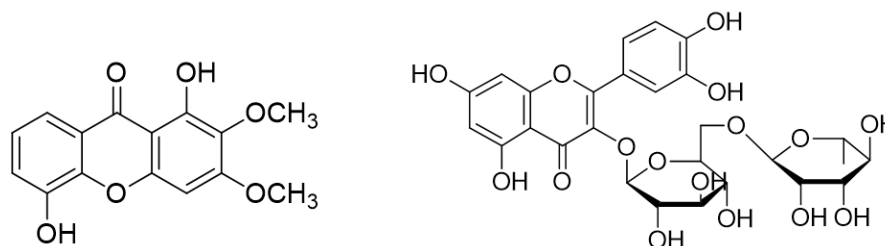
O estudo foi realizado em modelos de isquemia cerebral *in vitro* e *in vivo*. Os estudos *in vitro* foram realizados no Instituto de Pesquisa Robarts, na Universidade de Western Ontario, Canadá, durante a realização do Programa de Doutorado Sanduíche da pesquisadora (bolsa concedida pela CAPES, edital 47/2017), no período de outubro de 2018 a março de 2019. Os estudos *in vivo* foram realizados no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI), na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os estudos moleculares foram realizados em parceria com o Laboratório de Neuroquímica e Comportamento (LabNeC), na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). O processamento e as análises histológicas foram realizados no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) da UFSC.

3.1 MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *POLYGALA PANICULATA*

Polygala paniculata foi coletada em fevereiro de 2013, na praia da Daniela, Ilha de Santa Catarina (27°26'55"S 48°31'53"W), e depositada no Herbário da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob o número FLOR 66481. O extrato hidroalcoólico foi obtido segundo Tizziani e colaboradores (TIZZIANI et al., 2017). A planta inteira passou por processo de secagem e maceração exaustiva (três vezes por sete dias) com etanol 96° GL a temperatura ambiente. O extrato resultante foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida, a 50 °C.

É importante pontuar que esse extrato passou por processo de padronização, no qual foi validada a autenticidade do perfil químico dessa planta. Após análise, comprovou-se a presença dos compostos 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona e rutina (figura 7) na amostra, nas concentrações de 11,2153 mg/L e 8,8047 mg/L, respectivamente.

Figura 7. Estrutura da 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona e rutina.



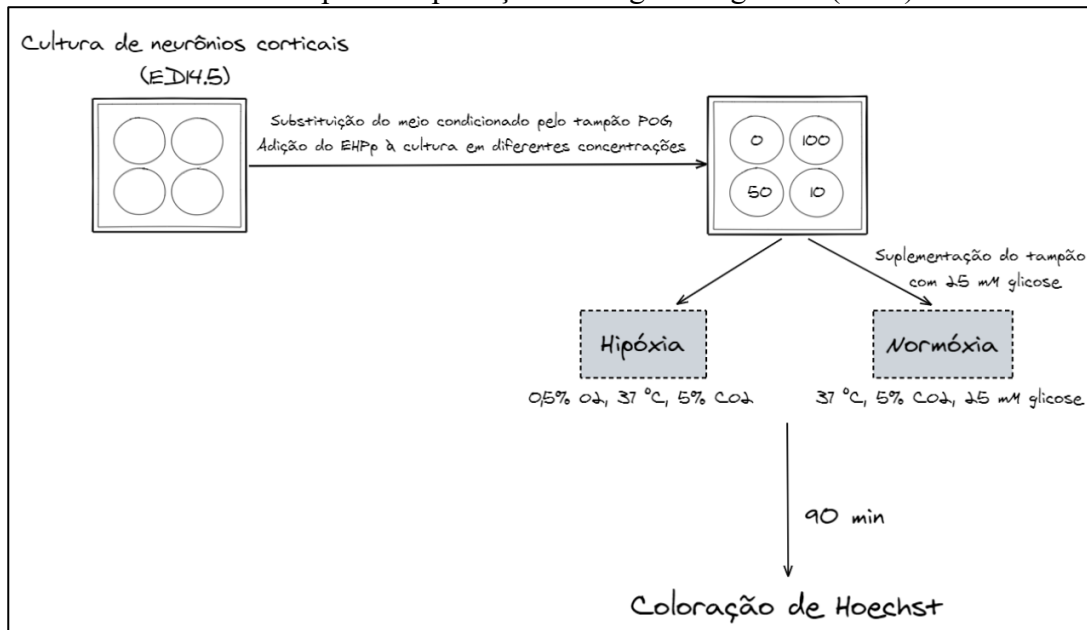
3.2 MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO*

As culturas primárias de células neurais foram preparadas a partir da dissecação do córtex cerebral de embriões de camundongos da linhagem CD1 em seu 14º dia embrionário (ED14.5). Após a dissecação do cérebro, realizada em solução HBSS® (*Hank's Balanced Salt Solution*, Gibco) livre de cálcio e magnésio, o tecido foi submetido a digestão enzimática por tripsina e dissociado mecanicamente com pipeta Pasteur polida. Os neurônios corticais foram dispostos em placas com 4 poços próprias para cultivo celular previamente tratadas com poli-L-ornitina® (Sigma-Aldrich) em meio Neurobasal Plus® (Thermo Fisher Scientific) suplementado com B-27® (Gibco), GlutaMAX® (Gibco), e antibióticos penicilina e estreptomicina (Gibco). As células foram incubadas a 37 °C e 5% CO₂ durante 7 dias, quando foram realizados os experimentos.

As células foram expostas à privação de oxigênio e glicose (POG) segundo Guirao et al. (2017), com algumas modificações (figura 8). O meio condicionado foi removido da cultura e substituído por tampão adequado contendo 116 mM NaCl 116; 5,4 mM KCl; 0,8 mM MgSO₄; 1,0 mM NaH₂PO₄; 1,8 mM CaCl₂-2H₂O; 20 mM NaHCO₃ e 0,02 mM vermelho de fenol. O EHPp foi dissolvido nesse tampão e colocado nos poços nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL. As placas foram, então, divididas em dois grupos, sendo um mantido em condições de hipóxia (0,5% O₂, 37 °C, 5% CO₂) e o outro em condições de normóxia (37 °C, 5% CO₂) suplementado com 25 mM glicose. Após 90 minutos, as células foram fixadas para avaliação da sobrevivência celular através da coloração por Hoechst, corante que se liga ao DNA possibilitando a visualização da condensação nuclear por meio do microscópio de fluorescência (CREGAN et al., 2002). Células apoptóticas podem ser diferenciadas de células normais por apresentarem núcleo fragmentado e que se cora mais intensamente devido à condensação da

cromatina, enquanto as células saudáveis apresentam núcleos mais arredondados e uniformemente corados (CREGAN et al., 2002; CROWLEY; MARFELL; WATERHOUSE, 2016).

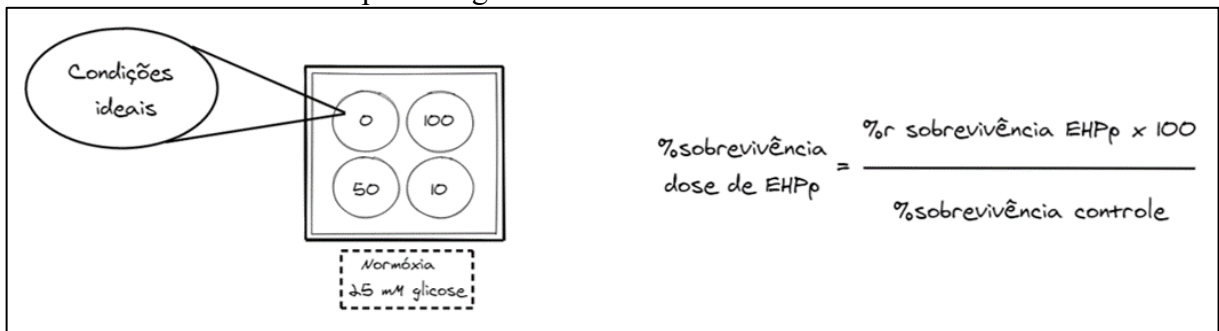
Figura 8. Protocolo utilizado para investigação do efeito *in vitro* de EHPp sobre células corticais expostas à privação de oxigênio e glicose (POG).



Legenda: Após 7 dias de incubação das culturas de neurônios corticais obtidos de camundongos CD1 (ED14.5), os meios condicionados foram substituídos por tampão adequado. O EHPp foi adicionado em diferentes concentrações nos poços (0 – 100 µg/mL). Enquanto metade das placas foi suplementada com glicose e mantida em condições de normóxia por 90 minutos, a outra metade foi mantida em câmara de hipóxia pelo mesmo período. Em seguida, as placas foram imediatamente fixadas e coradas com Hoechst para análise posterior.

A avaliação da morte celular por apoptose foi realizada através da análise de imagens obtidas em fotomicroscópio. A cada imagem foram contadas as células vivas e as células apoptóticas, gerando um valor percentual de sobrevivência celular relativo a cada concentração do extrato. Os resultados foram expressos como média de 4 imagens por poço. Como o manuseio das placas durante o experimento pode comprometer a sobrevivência das células, considerou-se como controle (condições ideais) a sobrevivência de neurônios corticais mantidos em normóxia sem adição de EHPp que tiveram os meios de cultura substituídos por solução tampão suplementada com glicose. Para comparação do efeito do EHPp, calculou-se a sobrevivência celular em cada concentração como porcentagem do controle (figura 9).

Figura 9. Desenho esquemático de uma placa de cultura de neurônios corticais e cálculo da porcentagem de sobrevivência celular.



Legenda: Esquema apontando a distribuição de EHPp em várias concentrações na placa de 4 poços da cultura de neurônios corticais mantidas em normóxia, destacando o poço controle que recebeu apenas solução tampão, considerado como representativo das condições ideais do experimento (100% de sobrevivência celular). Utilizou-se a média de sobrevivência no controle para normalizar os dados, conforme descrito na equação.

3.3 MODELO EXPERIMENTAL IN VIVO

O presente estudo caracteriza-se como uma pesquisa experimental com abordagem quantitativa e de natureza básica-aplicada. Todos os protocolos experimentais envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC), sob número 8977231216.

3.3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos C57bl/6 com idade variando entre 8-12 semanas e pesando em média 25 – 35 g. Os animais foram provenientes de colônias mantidas no Biotério Setorial do LANDI, mantidos em mini isoladores Ventilife (Alesco®) que fornece melhor qualidade de vida aos animais, uma vez que o sistema de circulação do ar vinculado a este tipo de sistema injeta o ar diretamente no mini-isolador, em fluxo contínuo e de baixa velocidade, garantindo uma troca de ar ideal e bem-estar dos animais.

Os animais permaneceram em mini isoladores Ventilife (Alesco®), sendo colocados 4 camundongos por caixa. Em todas as caixas foi colocado um objeto que servia de abrigo aos animais, criando microambientes adequados para descanso e bem-estar. Os animais receberam água e ração *ad libitum* e tiveram controlado o ciclo de 12 horas claro/escuro, bem como, a temperatura (22±2°C) e a umidade (60±10%) do local onde permaneceram.

A ração fornecida era industrial, proveniente do biotério central da UFSC; a água para os animais era filtrada; a exaustão de ar/ventilação foi por meio de ar-condicionado. Todas as caixas foram limpas e trocadas 3 vezes por semana, colocando maravalha limpa fornecida pelo biotério central. A cada troca de caixa foi avaliada a necessidade de repor a ração industrial e sempre houve o cuidado de manter o local limpo e evitar contaminação.

Houve perda de aproximadamente 30% dos animais durante os experimentos entre procedimento cirúrgico, recuperação da anestesia e seguimento dos dias seguintes. Por esse motivo, e tendo como principal objetivo avaliar o efeito do EHPp no modelo animal de isquemia cerebral e não *per se*, optou-se por reduzir o número de animais utilizados excluindo-se, em alguns experimentos, o grupo falso-operado tratado com extrato. Assim, 133 camundongos chegaram ao final do estudo e 40 morreram durante a execução dos experimentos, totalizando 173 animais.

3.3.2 Desenho experimental

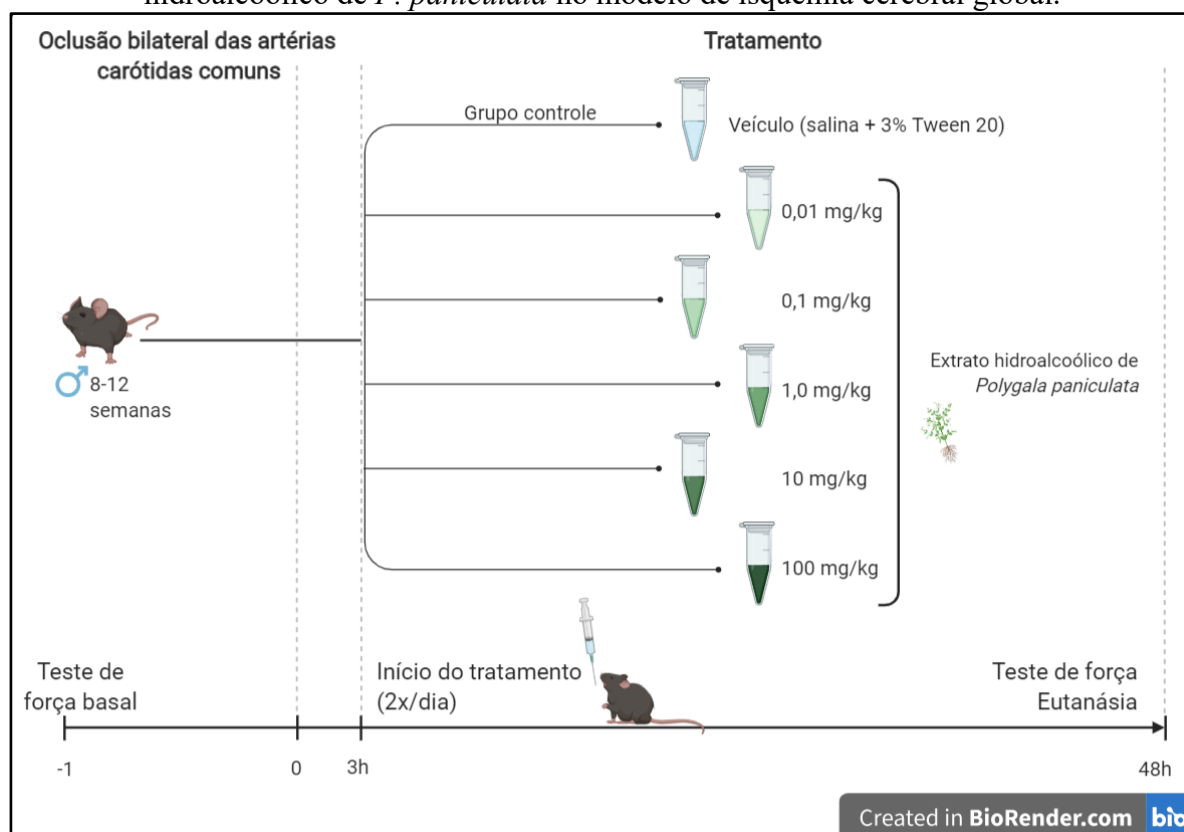
Três protocolos experimentais foram utilizados para investigar se o tratamento com extrato hidroalcoólico de *Polygala paniculata* exerce efeito protetor em modelo animal de isquemia global. As figuras 10, 11 e 12 mostram os detalhes e sequência dos procedimentos experimentais adotados neste estudo.

Sabendo-se que a isquemia cerebral global promove redução expressiva da força muscular dos animais, no protocolo I (figura 10) o teste de força de agarre foi utilizado como parâmetro para investigar o efeito do EHPp (0,01–100 mg/kg) sobre a recuperação funcional da força muscular. A escolha das doses foi baseada nas evidências de sua eficácia demonstradas em vários estudos conduzidos em diferentes modelos animais (BARROS, 2016; BATISTI, 2018; BEPPLER, 2018; BETTIO et al., 2011; LAPA et al., 2011; LAPA et al., 2007, 2009) que objetivavam avaliar o efeito do EHPp de maneira dependente da dose. Assim, a força muscular basal dos animais foi avaliada antes da cirurgia e, após 48h da oclusão, ela foi novamente avaliada. Os camundongos foram tratados com EHPp (0,01 mg/kg; 0,1 mg/kg; 1 mg/kg; 10 mg/kg; 100 mg/kg) ou veículo (grupo controle, salina + 3% Tween 20, 10 mL/kg) via oral

gavagem), duas vezes ao dia, iniciando-se 3h após a oclusão das artérias carótidas comuns, totalizando 4 doses até a eutanásia.

O protocolo I foi iniciado no ano de 2015, no LabNeC (UFES, Vitória/ES). O teste de força foi executado por experimentador cego aos grupos de tratamento. A partir de 2016, os experimentos foram conduzidos no LANDI (UFSC, Florianópolis/SC). O protocolo I foi repetido 5 vezes, em momentos diferentes, totalizando o uso de 51 animais. Em cada repetição, os animais foram distribuídos, após a cirurgia, nos 6 grupos de tratamento por um experimentador diferente daquele que realizou o procedimento cirúrgico, seguindo a recomendação da STAIR sobre a ocultação da distribuição por grupos. Também seguindo a recomendação da STAIR, a avaliação da força muscular foi realizada por experimentador cego aos grupos experimentais.

Figura 10. Protocolo experimental I: determinação da curva dose-resposta do extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* no modelo de isquemia cerebral global.

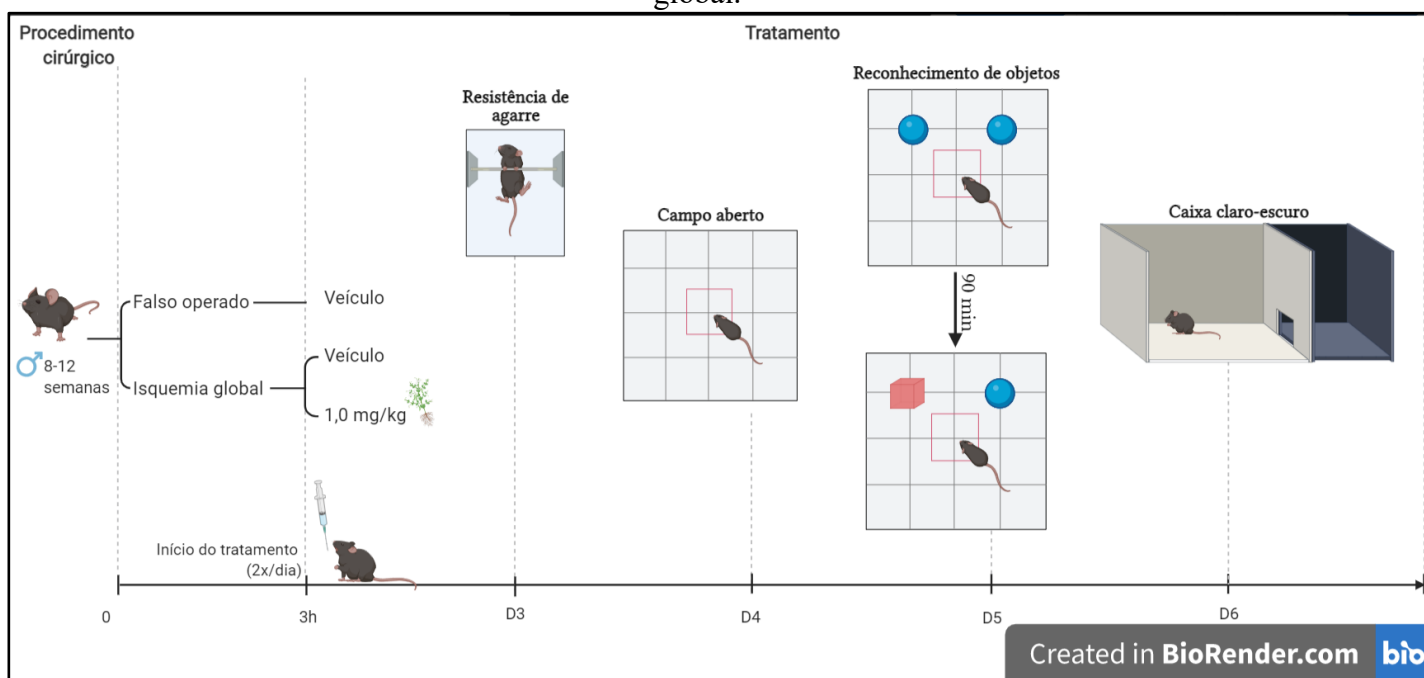


Legenda: A força basal de camundongos C57bl/6 machos (8-12 semanas) foi testada. Em seguida, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (BCCAO). O tratamento com EHPp em diferentes doses (veículo, 0,01–100 mg/kg) foi feito por via oral (gavagem), duas vezes ao dia, iniciando 3h após a oclusão e seguindo até eutanásia, totalizando 4 administrações por animal. A força dos animais foi novamente testada 48h após BCCAO.

De acordo com os resultados obtidos no protocolo I, os experimentos subsequentes foram conduzidos com a dose do EHPp que apresentou melhor efeito na recuperação funcional da força muscular dos animais. Assim, procuramos observar o efeito do tratamento com EHPp (1 mg/kg) no protocolo II (figura 11), por um período de no mínimo 6 dias, sobre os déficits motores, cognitivos e emocionais induzidos pela isquemia global.

O protocolo II foi repetido 4 vezes, em momentos diferentes, totalizando o uso de 30 animais. Em cada repetição, os animais foram distribuídos, após a cirurgia, nos 3 grupos de tratamento por experimentador diferente daquele que executou o procedimento cirúrgico.

Figura 11. Protocolo experimental II: investigação do efeito do extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* na força, memória de curta duração e ansiedade no modelo de isquemia cerebral global.



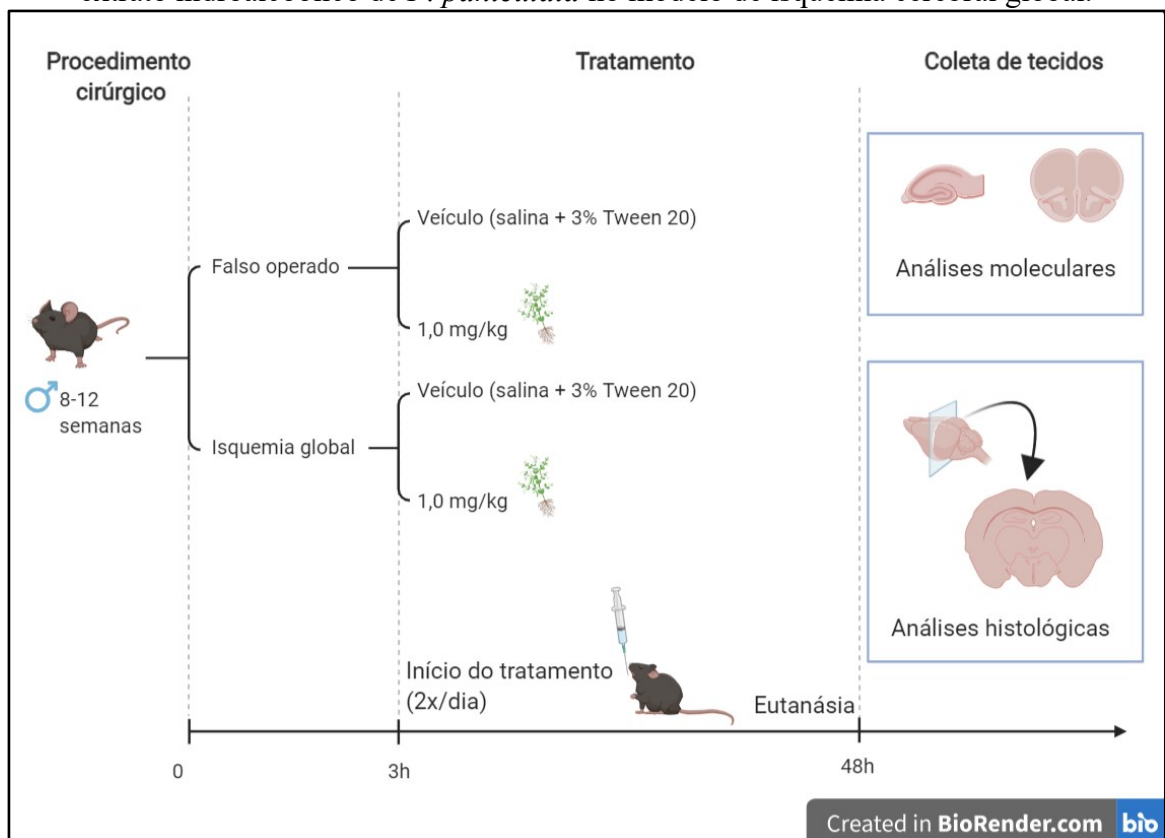
Legenda: Para avaliar o efeito do EHPp em parâmetros comportamentais, camundongos foram divididos em três grupos no dia 0 (D0): falso-operados administrados com veículo (FO+V); submetidos à BCCAO administrados com veículo (BCCAO+V); e submetidos à BCCAO tratados com EHPp 1 mg/kg (BCCAO+EHPp). O tratamento foi feito por via oral (gavagem), duas vezes ao dia, iniciando 3h após a oclusão e seguindo até eutanásia. O teste de resistência de agarre foi realizado 3 dias após cirurgia (D3); o campo aberto foi realizado em D4; o teste de reconhecimento de objetos (treino e teste) foi realizado em D5; o teste da caixa claro-escuro foi realizado em D6.

No protocolo III, alterações moleculares e histológicas foram avaliadas após isquemia (figura 12). Considerando o papel fundamental desempenhado por células gliais na patogênese da morte neuronal, foram avaliados os efeitos do EHPp na resposta astrocitária e microglial à isquemia cerebral experimental. Adicionalmente, foi avaliada a expressão gênica de citocinas

inflamatórias e fatores neurotróficos. Para a coleta do córtex e hipocampo processados para a avaliação molecular foram utilizados 40 animais. Para isso, o procedimento cirúrgico foi realizado em 5 momentos diferentes, sendo que em cada repetição os animais foram distribuídos, após a cirurgia, nos 4 grupos de tratamento.

Ademais, foram feitas análises histológicas para detectar neurodegeneração hipocampal. Para isso, o procedimento cirúrgico foi realizado em 3 em momentos diferentes, sendo que em cada repetição os animais foram distribuídos nos 3 grupos de tratamento, totalizando 12 animais.

Figura 12. Protocolo experimental III: investigação dos efeitos moleculares e histológicos do extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* no modelo de isquemia cerebral global.

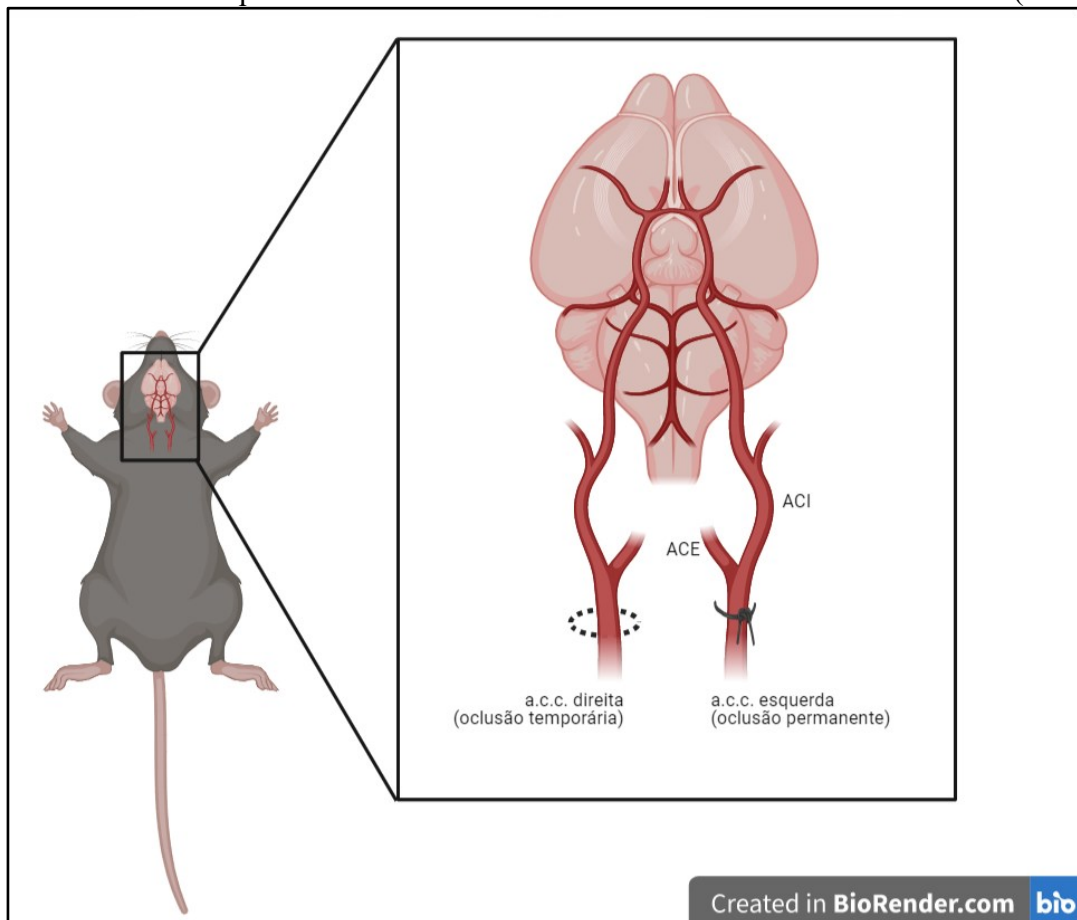


Legenda: Para avaliar o efeito do EHPp na neuroinflamação e degeneração hipocampal, camundongos foram divididos em quatro grupos: falso-operados administrados com veículo (FO+V); falso-operados tratados com EHPp 1 mg/kg (FO+EHPp); submetidos à BCCAO administrados com veículo (BCCAO+V); submetidos à BCCAO tratados com EHPp 1 mg/kg (BCCAO+EHPp). O tratamento foi feito por via oral (gavagem), duas vezes ao dia, iniciando 3h após a oclusão e seguindo até eutanásia (48h após cirurgia), totalizando 4 administrações por animal. Para análises moleculares, foram dissecados córtex e hipocampo dos animais. Para avaliações histológicas, os animais foram perfundidos com paraformaldeído em PBS (pH=7,4) e seus cérebros foram posteriormente processados para análise.

3.3.3 Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol (250 mg/kg, i.p.; Sigma-Aldrich) e o protocolo utilizado foi descrito previamente por Gonçalves et al. (2018), no qual a isquemia global foi induzida por oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (BCCAo) (Figura 13). Uma incisão mediana foi realizada na região ventral do pescoço dos animais, com exposição de ambas as artérias carótidas comuns (ACC), para oclusão temporária da acc direita com uma linha de algodão e oclusão permanente da acc esquerda com um monofilamento de nylon 6-0 (figura 13). A reperusão da acc direita foi realizada após 30 minutos e confirmada visualmente. A pele foi, então, suturada para finalização do procedimento. Nos animais falso-operados, as ACC foram expostas, porém não ocluídas.

Figura 13. Desenho esquemático da oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (BCCAo).



Legenda: Oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (BCCAo). Foi feita oclusão temporária da acc direita com uma linha de algodão por 30 minutos e oclusão permanente da acc esquerda com um monofilamento de nylon 6-0. ACC, artéria carótida comum; ACE, artéria carótida externa; ACI, artéria carótida interna.

Durante o procedimento e até a recuperação total da anestesia, os animais foram observados e mantidos aquecidos com uso de lâmpada para evitar hipotermia. Além disso, foi injetado 1 mL de salina aquecida via subcutânea para reposição de fluidos e evitar queda brusca de temperatura. Os animais permaneceram sob observação em caixas limpas, sem maravalha, minimizando o risco de obstrução traqueal, até retornarem da anestesia, quando foram colocados em suas gaiolas moradia, com acesso imediato a água e ração.

3.3.4 Testes comportamentais

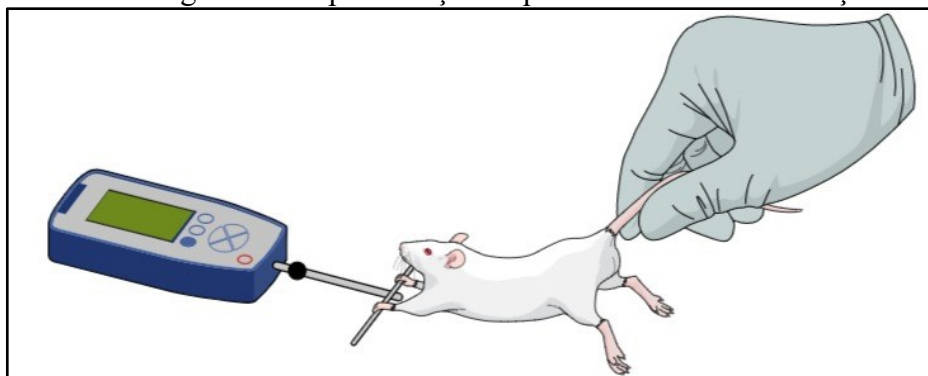
3.3.4.1 *Teste de força*

Os indivíduos acometidos por AVE ou parada cardíaca frequentemente apresentam déficits motores que afetam diretamente suas atividades diárias (HESHMATOLLAH et al., 2020; LIM et al., 2004). Essa característica também é observada em modelos animais de isquemia cerebral e pode ser avaliada através de testes comportamentais que comparam sua força muscular basal e após procedimento cirúrgico para indução do modelo (BALKAYA et al., 2013).

Para realizar o teste de força dos membros anteriores (BALKAYA et al., 2013; FOWLER et al., 2002; MORAES et al., 2016), utilizou-se um transdutor de força (Force Gauge, Instrutherm, Brasil) conectado a um suporte metálico. Durante a avaliação, o experimentador segurou o camundongo pela cauda, permitindo que o animal agarrasse o suporte com as patas dianteiras e, após 2 segundos nessa posição, o examinador exerceu uma leve força (sempre paralela à superfície) até que o animal soltasse o suporte (figura 14). O pico de força máxima foi registrado automaticamente no aparelho quando o animal soltou o suporte e a força de agarre foi expressa em gramas força (gf). Foi calculada a média de 5 tentativas por camundongo, com um período máximo de 60 segundos para cada animal. O resultado foi expresso como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) dos valores dos animais.

Adicionalmente, foi calculada a diferença entre a força final e basal dos camundongos, sendo expressa como valor de delta ($\Delta = \text{força final} - \text{força basal}$). Os dados foram apresentados como média \pm E.P.M.

Figura 14. Representação esquemática do teste de força.



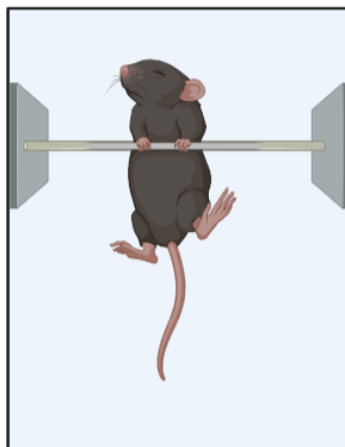
Legenda: Os camundongos foram manipulados pela cauda de maneira a segurar um suporte acoplado ao transdutor de força. O experimentador exerceu uma leve força paralela à superfície de modo a avaliar a força de agarre máxima dos animais. No momento em que o animal soltou o suporte, a força foi registrada no aparelho. Fonte: *Mind the graph*.

3.3.4.2 Teste de resistência de agarre (*wire hanging test*)

O teste de resistência de agarre foi realizado para avaliar força, equilíbrio e resistência dos animais, parâmetros comprometidos após evento isquêmico (BALKAYA et al., 2013).

Para adquirir as medidas basais, os camundongos foram treinados a sustentar o próprio corpo em uma haste horizontal de 4 mm de diâmetro suspensa a 60 cm da superfície, por até 30 segundos, utilizando apenas os membros dianteiros (figura 15). Foi calculada a média de 3 tentativas por animal, com intervalos de 10 segundos entre cada uma. Três dias após BCCAO, os animais foram avaliados novamente por esse teste. Os resultados da latência de queda (em segundos) foram apresentados como média \pm erro padrão da média. Para evitar danos aos animais durante o experimento, foi colocada uma caixa com maravalha embaixo do aparato durante a execução do teste.

Figura 15. Representação esquemática do teste de resistência de agarre (*wire hanging test*).



Legenda: Os camundongos foram treinados a sustentar o peso do próprio corpo em uma barra de 4 mm de diâmetro suspensa a 60 cm da superfície. A latência de queda em 3 tentativas consecutivas foi registrada em segundos. Fonte: *BioRender*.

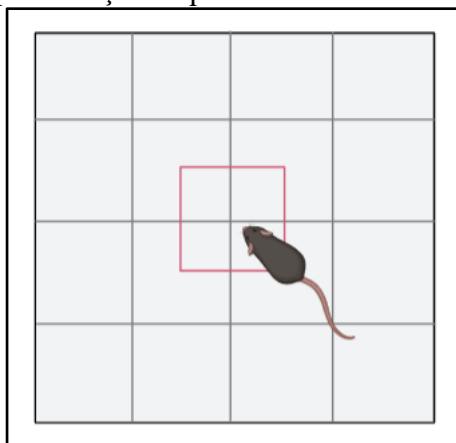
3.3.4.3 Campo aberto

Quatro dias após BCCAo, a atividade locomotora dos animais foi avaliada no teste do campo aberto (ANTUNES; BIALA, 2012; BALKAYA et al., 2013; LEGER et al., 2013). Esse teste é comumente utilizado para avaliar função motora e locomoção exploratória dos animais. Os camundongos foram colocados individualmente no centro de um aparato de madeira consistindo em uma arena vazia (50x50x40 cm), com o fundo dividido em 16 quadrantes, para 10 min de ambulação livre (figura 16). O número de cruzamentos nos quadrantes foi contabilizado manualmente.

Sabe-se que os padrões de exploração são influenciados pelo estado emocional dos animais, o qual pode estar alterado após isquemia cerebral, assim como acontece em humanos acometidos por essa doença (LEPPÄVUORI et al., 2003; NEIGH et al., 2009; SOARES et al., 2013). Para verificar se os animais apresentavam alguma indicação de comportamento tipo ansioso, o tempo de permanência no centro e na periferia (em segundos) foram também contabilizados. Em geral, o campo aberto é um ambiente não-familiar para os camundongos, e níveis aumentados de ansiedade reduzem o comportamento exploratório e/ou levam os animais a evitarem o centro do aparato (BALKAYA et al., 2013; SEIBENHENER; WOOTEN, 2015).

Ademais, esse teste foi utilizado como período de habituação dos animais à arena para a posterior execução do teste de reconhecimento de objetos (LEGER et al., 2013).

Figura 16. Representação esquemática do teste do campo aberto.



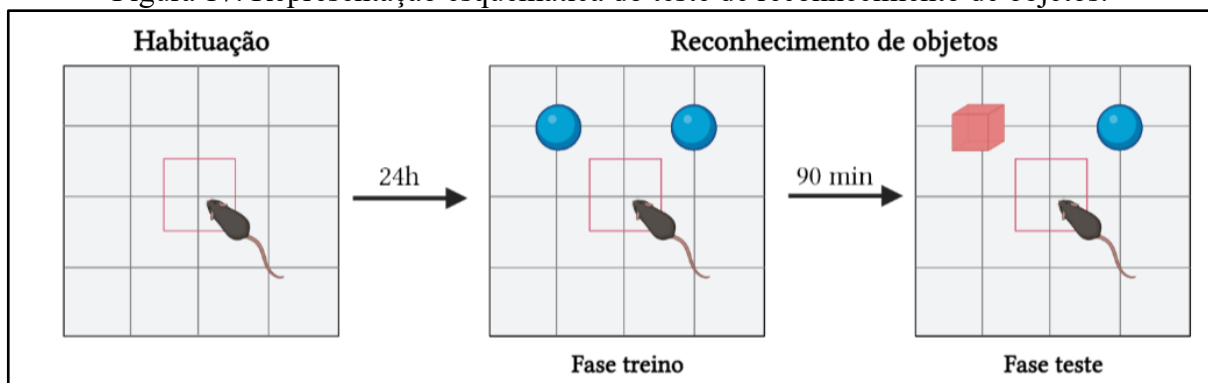
Legenda: Os camundongos foram colocados no centro de uma arena vazia, dividida em 16 quadrantes iguais. Contabilizou-se o número de cruzamentos nos quadrantes por um período de 10 minutos, assim como o tempo de permanência do animal no centro e na periferia.

Fonte: BioRender.

3.3.4.4 Reconhecimento de objetos

Considerando o déficit cognitivo que acomete pacientes que sofreram isquemia cerebral (KALARIA; AKINYEMI; IHARA, 2016; LIM et al., 2004), avaliou-se alterações da memória de curta duração dos animais após cinco dias de BCCAO pelo paradigma de reconhecimento de objetos (ANTUNES; BIALA, 2012; LEGER et al., 2013), no qual foi medida a diferença entre o tempo de exploração de um objeto novo e um familiar (figura 17). Para isso, os animais foram recolocados individualmente no campo aberto, sendo apresentados dois objetos idênticos por um período de 10 min (fase de treino). Após intervalo de 90 min, o animal retornou à arena com dois objetos, um familiar e um novo (fase de teste). A livre exploração foi permitida por 10 minutos. O tempo gasto pelo animal na exploração dos objetos individuais foi registrado manualmente, sendo expresso em porcentagem do tempo total de exploração. Além disso, foram calculados os índices de discriminação (ID) e preferência (IP). O índice de discriminação permite medir a diferença entre o tempo de exploração do objeto novo (T_n) e o tempo de exploração do objeto familiar (T_f), dividindo-se esse valor pelo tempo total de exploração [$ID = (T_n - T_f) / (T_n + T_f)$], que resulta em um valor entre +1 e -1. O índice de preferência foi calculado a partir da relação entre o tempo de exploração do objeto novo sobre o tempo total de exploração dos objetos [$IP = (T_n \times 100) / (T_n + T_f)$].

Figura 17. Representação esquemática do teste de reconhecimento de objetos.



Legenda: Os animais foram colocados no aparato vazio para habituação durante o teste do campo aberto. Após 24h, os camundongos retornaram à arena para a fase de treino, no qual dois objetos idênticos foram dispostos para livre exploração dos animais durante 10 min. Foi feito um intervalo de 90 min, em que os animais voltaram para suas caixas moradias. A fase de teste durou 10 min, e os camundongos exploraram o objeto familiar e um objeto novo.

Fonte: BioRender.

3.3.4.5 Caixa claro-escuro

Uma grande parte dos sobreviventes de isquemia cerebral sofre de transtornos emocionais, como a ansiedade, que representam desafios à vida diária dos pacientes, afetando seus relacionamentos interpessoais e diminuindo sua qualidade de vida (LEPPÄVUORI et al., 2003). O comportamento tipo ansioso também é identificado em modelos animais de isquemia cerebral (SOARES et al., 2013).

Para avaliar esse comportamento, foi realizado o teste da caixa claro-escuro (CRAWLEY; GOODWIN, 1980) seis dias após BCCAo. O aparato consiste em uma caixa com dois compartimentos (figura 18). O compartimento escuro, feito com acrílico preto, possui 1/3 da dimensão total da caixa e uma tampa também na cor preta. Já o compartimento claro foi construído em acrílico branco, com tampa transparente. A passagem entre as duas câmaras possui 7 cm de altura e 7 cm de largura.

Os animais foram colocados individualmente no centro do compartimento claro com a face voltada para a entrada do compartimento escuro. Durante o período de 5 minutos, foi contabilizado o tempo de permanência no compartimento claro e o número de cruzamentos realizados com as quatro patas entre os compartimentos. A latência para a primeira entrada no compartimento escuro também foi registrada.

Figura 18. Representação esquemática do teste da caixa claro-escuro.



Legenda: Os animais foram colocados no centro do compartimento claro com a face voltada para a entrada do compartimento escuro. Durante o período de 5 minutos, o tempo de permanência no claro e o número de cruzamentos entre os compartimentos foram registrados, assim como a latência para primeira entrada no compartimento escuro.

Fonte: BioRender.

3.3.5 Análise de expressão gênica

Para avaliar alterações moleculares provocadas pela isquemia global a curto prazo, os animais foram eutanasiados por decapitação 48h após BCCAO, os cérebros foram retirados para dissecação do córtex total e hipocampus. As amostras foram mantidas em solução de estocagem RNAlater® (Sigma-Aldrich), reagente que estabiliza e protege o RNA celular em tecidos não congelados. Como descrito previamente por Areal et al., (2015), o RNA total foi extraído utilizando TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) e o cDNA foi sintetizado utilizando as instruções do fabricante do kit iScript cDNA® (Biorad). A subsequente reação em cadeia da polimerase (qPCR) foi feita utilizando o equipamento PCR em tempo real CFX96® (Biorad) e iQ SYBR Green Supermix® (Biorad). A quantificação relativa da expressão gênica foi analisada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, com a normalização usando a expressão do gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Os genes escolhidos para as análises foram IBA-1 e GFAP (marcadores gliais), BDNF e GDNF (fatores neurotróficos), IL-1 β , TNF α e IL-6 (citocinas). As sequências iniciadoras (*primers*) para cada gene estão descritas na tabela 2.

Tabela 2. *Primers* utilizados para qPCR

Gene	Sequência do <i>primer</i>
<i>GAPDH</i>	5'CCT CGT CCC GTA GAC AAA ATG 3' 5'TTG ACT GTG CCG TTG AAT TTG 3'
<i>BDNF</i>	5'GCG CCC ATG AAA GGA GTA AA 3' 5'TCG TCA GAC CTC TCG AAC CT 3'
<i>GDNF</i>	5'AAC GGT GTG GAT GTA TCT GAC 3' 5'TTT TCT GTA GCT GGG CCT TC 3'
<i>GFAP</i>	5'GAA AAC CGC ATC ACC ATT CC 3' 5'CAT CTC CAC AGT CTT TAC CAC G 3'
<i>IBA</i>	5'GGA GAT TTC AAA AGC TGA TGT GGA 3' 5'CCT CAG ACG CTG GTT GTC TT 3'
<i>IL-1β</i>	5'ACG GAC CCC AAA AGA TGA AG 3' 5'CAC GGG AAA GAC ACA GGT AG 3'
<i>IL-6</i>	5'GTC CTT CCT ACC CCA ATT TCC A 3' 5'TAA CGC ACT AGG TTT GA 3'
<i>TNFα</i>	5'GAG GTC AAT CTG CCC AAG TAC 3' 5'CCT GAG CCA TAA TCC CCT TTC 3'

3.3.6 Análise da abundância proteica por imunoblot

Após 48h da isquemia global, os animais foram eutanasiados e hipocampo e córtex foram dissecados e armazenados a -80 °C até o processamento.

Hipocampo e córtex previamente dissecados foram homogeneizados em tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 e inibidor de protease), sendo mantido em gelo por 30 minutos. Seguiu-se uma centrifugação, com a posterior coleta do sobrenadante (AREAL et al., 2015). As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Vinte microgramas de proteína foram separadas por SDS-PAGE e, então, transferidos para membrana de PVDF (*polyvinylidene fluoride*). A expressão da proteína GAPDH foi usada como controle interno. Os anticorpos utilizados foram anti-BDNF e anti-GDNF. As imagens foram adquiridas usando ChemiDoc (Bio-rad) e analisadas pelo software Image Lab (Bio-rad).

3.3.7 Análises histológicas

O evento isquêmico resulta na perda neuronal em regiões cerebrais mais susceptíveis. Assim, para avaliação do efeito do tratamento com EHPp após isquemia sobre os neurônios piramidais do hipocampo, foram realizadas análises histológicas.

Os animais foram anestesiados com solução de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), 48h após a isquemia global, para eutanásia por perfusão cardíaca. Cada animal foi perfundido com PBS 1X, pH 7,4, por 5 min; seguido de solução de formalina 4% em PBS 1X, pH 7,4, por 10 min. Os encéfalos foram dissecados e mantidos por 24h em solução de formalina 4% em PBS 1X, pH 7,4, a 4°C. Em seguida, os encéfalos foram transferidos para uma solução de sacarose 30% em formalina 4% e incubados por até 48h, a 4°C. O processamento dos tecidos foi realizado automaticamente utilizando o processador de amostras Leica TP1020 e os tecidos foram incluídos em parafina utilizando o emblocador de amostras Leica EG1150H. Posteriormente, utilizando micrótomo rotativo (Leica RM2255), foram preparados cortes coronais seriados entre bregma -1,755mm e -2,78mm de 10 µm de espessura, os quais foram montados em lâminas gelatinizadas. Os cortes histológicos foram corados com violeta de cresil (sistema de coloração de lâminas Leica Autostainer XL), permitindo a visualização do núcleo e corpúsculos de Nissl das células neuronais. As imagens foram obtidas através do digitalizador de lâminas Axio Scan (objetiva 40x), permitindo a visualização do hipocampo de ambos os hemisférios cerebrais.

O número de neurônios intactos nas regiões CA1 (figura 19A) e CA3 (figura 19B) do hipocampo foi estimado através de contagem no programa ImageJ. Células que apresentaram formato esférico bem delimitado, com núcleo e nucléolo evidentes foram contados como neurônios viáveis. Células com corpos celulares encolhidos ou circundados por espaços vazios foram considerados como necróticos ou apoptóticos, sendo excluídos da contagem. Considerou-se que a redução do número de neurônios viáveis relativa ao grupo falso operado como degeneração hipocampal (MORI et al., 2017).

Para cada animal foram contadas células em sub-regiões de CA1 e CA3 de ambos os hemisférios (contralateral e ipsilateral) em 3–5 fatias. Os resultados foram normalizados com a média do grupo falso operado + veículo (100%).

Figura 19. Figura representativa da coloração de Nissl evidenciando as regiões CA1 (A) e CA3 (B) do hipocampo de camundongos.



Fonte: Allen Mouse Brain Atlas, 2004.

3.3.8 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas e confecção dos gráficos, foi utilizado o software GraphPad Prism versão 8.0. Todos os dados foram analisados quanto à sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Comparações entre grupos experimentais e controles foram feitas por ANOVA de uma ou duas vias seguido pelo teste de Bonferroni quando apropriado. Em alguns experimentos foi utilizado teste t de Student para a comparação da média entre dois grupos. Para todas as análises foi empregado um nível de significância para $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO*

O protocolo utilizado se baseia na privação de oxigênio e glicose (POG) em cultura neuronal, o que mimetiza *in vitro* o evento isquêmico. Para a coloração de Hoechst, células mortas são identificadas pela morfologia nuclear, por evidenciar a condensação da cromatina (CREGAN et al., 2002).

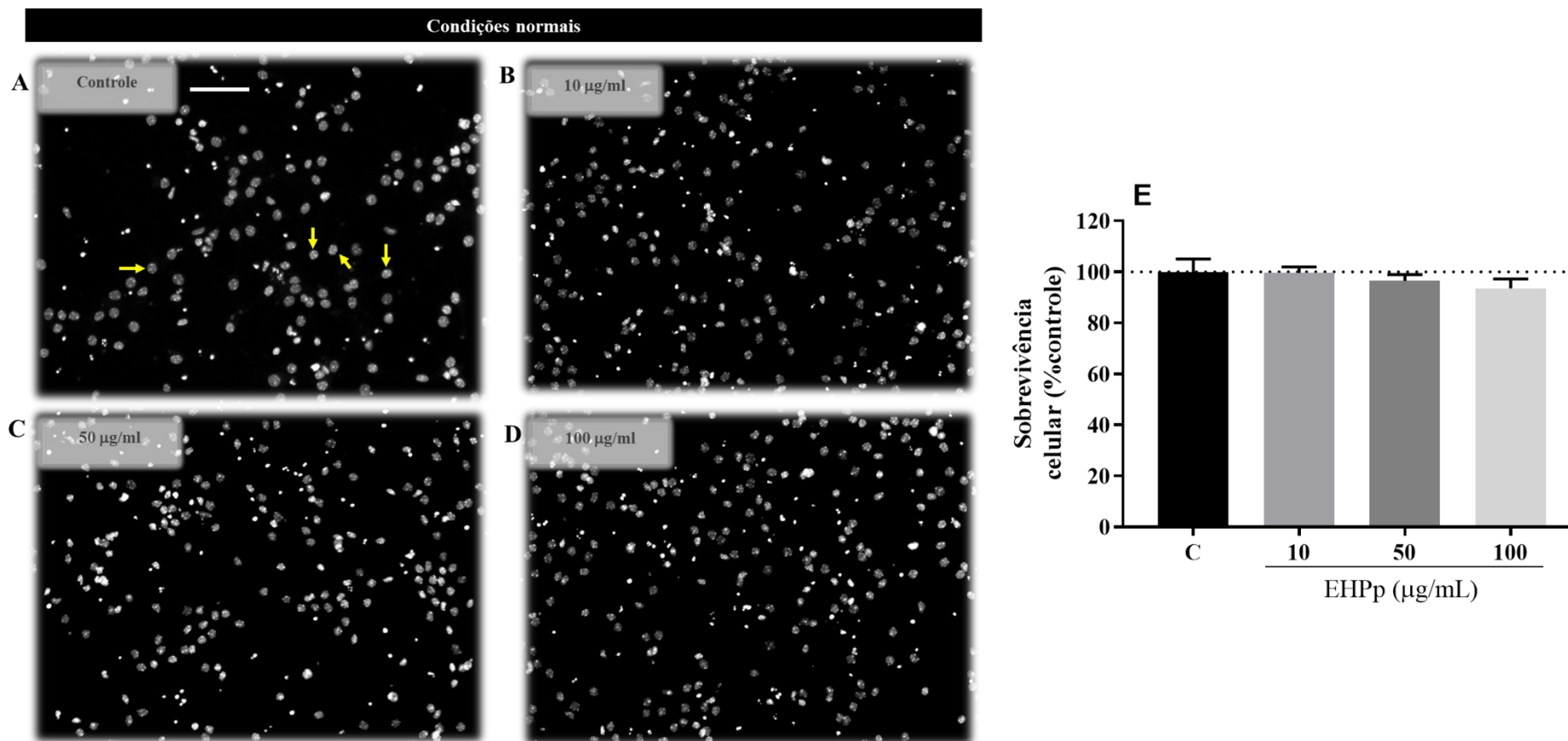
Inicialmente, foi avaliado se a adição do extrato, nas concentrações de 10 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL, poderia afetar a viabilidade das células neuronais em cultivo e observou-se que, nas concentrações usadas, a adição de EHPp não promove dano e nem alterações estatisticamente significativas [(F (3,11)=0,6824; p=0,5811)] dos neurônios corticais (figura 20) (ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni).

Na sequência, procedeu-se a avaliação da viabilidade dos neurônios corticais sob condições de POG. Em comparação com o grupo controle (condições ideais), observou-se que nos poços em que foi adicionado apenas solução tampão houve diminuição significativa da sobrevivência celular, com aumento de apoptose [F(4,15)=7,937; p=0,0012] (ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni).

Por outro lado, a sobrevivência celular nas culturas tratadas com EHPp nas doses de 10 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL não diferem da sobrevivência detectada no grupo controle, indicando ação protetora do EHPp em todas as doses testadas. Importante achado foi que nos poços adicionados com 100 µg/mL de EHPp, a sobrevivência celular foi significativamente maior que em culturas de neurônios não tratados (p=0,0008) (figura 21).

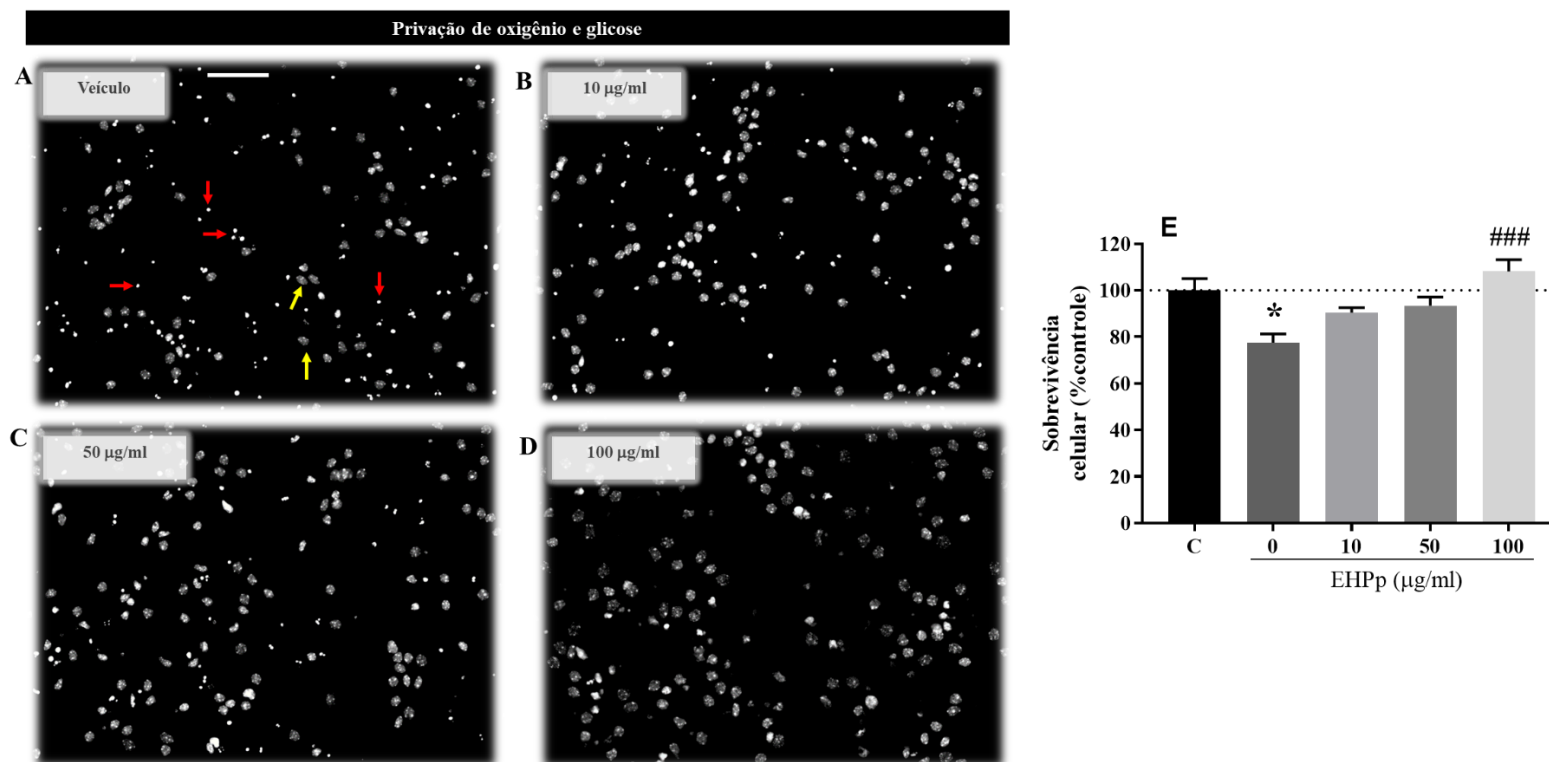
Notou-se ainda que na dose 100 µg/mL houve sobrevivência celular sutilmente maior que nos poços controle. Isso se deve ao fato de que a própria manipulação das culturas durante o experimento acarreta dano, o que pode comprometer a viabilidade das células, como explicado anteriormente. Sugere-se que a adição do extrato nessa dose previne a morte celular desencadeada pela manipulação.

Figura 20. Efeito do tratamento de neurônios corticais com extrato hidroalcoólico de *Polygala paniculata* (10-100 $\mu\text{g/mL}$).



Legenda: Em A observa-se o poço controle (condições ideais). O tratamento de neurônios corticais com EHPp (10-100 $\mu\text{g/mL}$, B-D) por 90 min não afeta a sobrevivência dessas células. As setas amarelas exemplificam células vivas; as setas vermelhas exemplificam células apoptóticas. Através da contagem do número de células vivas e apoptóticas, foi calculada a porcentagem de sobrevivência celular (E). A aquisição das imagens foi feita em fotomicroscópio na ampliação de 40x, e a barra de escala representa 50 μm .

Figura 21. Efeito da adição de extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* (10-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a culturas de neurônios corticais expostos a privação de oxigênio e glicose.



Legenda: Em condições de privação de oxigênio e glicose (POG), há aumento de células apoptóticas (A) e observa-se que a sobrevivência de neurônios corticais tratados previamente com EHPp (10–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, B-D) é semelhante ao controle (figura 20A). Na dose mais alta utilizada (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a sobrevivência foi estatisticamente maior que a de neurônios não tratados. As setas amarelas exemplificam células vivas; as setas vermelhas exemplificam células apoptóticas. Através da contagem do número de células vivas e apoptóticas, foi calculada a porcentagem de sobrevivência celular (E). (*) diferença significativa quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). (#) diferença significativa quando comparado ao grupo submetido à POG sem adição de EHPp. A aquisição das imagens foi feita em fotomicroscópio na ampliação de 40x, e a barra de escala representa 50 μm .

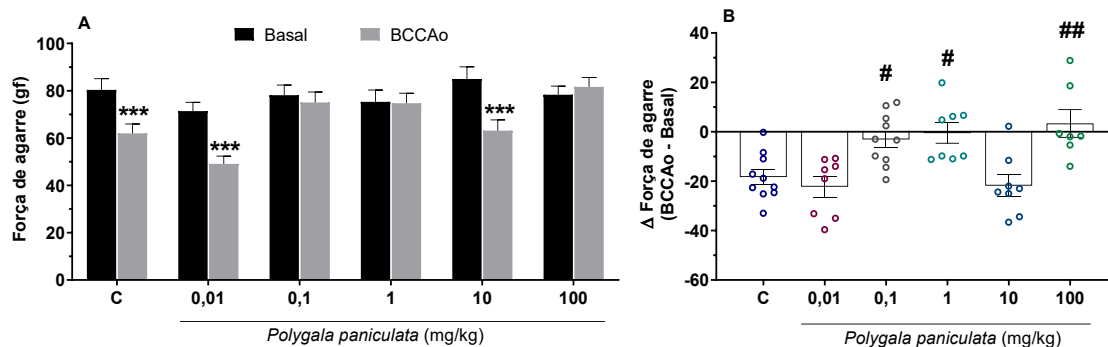
4.2 MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

4.2.1 Efeito do tratamento com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* sobre a redução da força muscular de camundongos submetidos à isquemia cerebral global

A figura 22A claramente mostra que a oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (BCCAO) é capaz de promover redução significativa [$F(1,45)=40,29$; $p<0,0001$] da força muscular dos animais, quando observadas as respostas obtidas antes e após a cirurgia (ANOVA de duas vias). Os animais do grupo controle (BCCAO+veículo) perderam $22\pm 3\%$ da força muscular ($p<0,0001$), enquanto os animais tratados com a dose mais baixa (0,01 mg/kg) do EHPp tiveram perda de $30\pm 4\%$ ($p<0,0001$) e aqueles tratados com a dose de 10 mg/kg perderam $25\pm 5\%$ de sua força ($p<0,0001$). Por outro lado, os animais tratados com as doses de 0,1 mg/kg, 1 mg/kg e 100 mg/kg do EHPp não apresentaram redução significativa da força muscular ($p>0,9999$, pós teste de Bonferroni), indicando importante ação protetora do extrato sobre o déficit motor.

Tal observação pode ser confirmada por meio da avaliação da variação de força muscular através do delta (força pós BCCAO – força basal) (figura 22B). A ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni demonstra diferença estatística entre os grupos [$F(5, 45)=7,967$; $p<0,0001$]. A variação de força nos animais tratados com EHPp 0,1 mg/kg; 1 mg/kg e 100 mg/kg foi significativamente menor quando comparados ao grupo controle ($p=0,0275$; $p=0,0122$ e $p=0,0024$, respectivamente). Esses achados indicam que as doses de 0,1 mg/kg, 1 mg/kg e 100 mg/kg do EHPp são eficazes em prevenir o declínio da força muscular causada pela BCCAO. Entretanto, a dose de 1 mg/kg do EHPp apresentou eficácia semelhante quando comparada a outros estudos que utilizaram a mesma dose do extrato em outros modelos experimentais (BARROS, 2016; BATISTI, 2018; LAPA et al., 2009), sendo essa dose escolhida para o prosseguimento deste trabalho.

Figura 22. Força dos animais antes e após isquemia cerebral global.



Legenda: Em A, teste de força realizado antes da cirurgia para indução da isquemia global e 48h após. Iniciou-se o tratamento 2 vezes ao dia com EHPp em diferentes doses (0,01 – 100 mg/kg) 3h após a oclusão. Houve diminuição da força muscular após BCCAO nos animais do grupo controle e tratados com as doses de 0,01 mg/kg e 10 mg/kg, comparado à avaliação basal. Evidencia-se esse resultado ao avaliar-se a variação da força (B). Cada grupo representa a média de 7-10 animais e as barras verticais o E.P.M. (*) mostra diferença significativa quando comparado ao basal. (#) mostra diferença significativa quando comparado ao grupo BCCAO + veículo. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao basal.

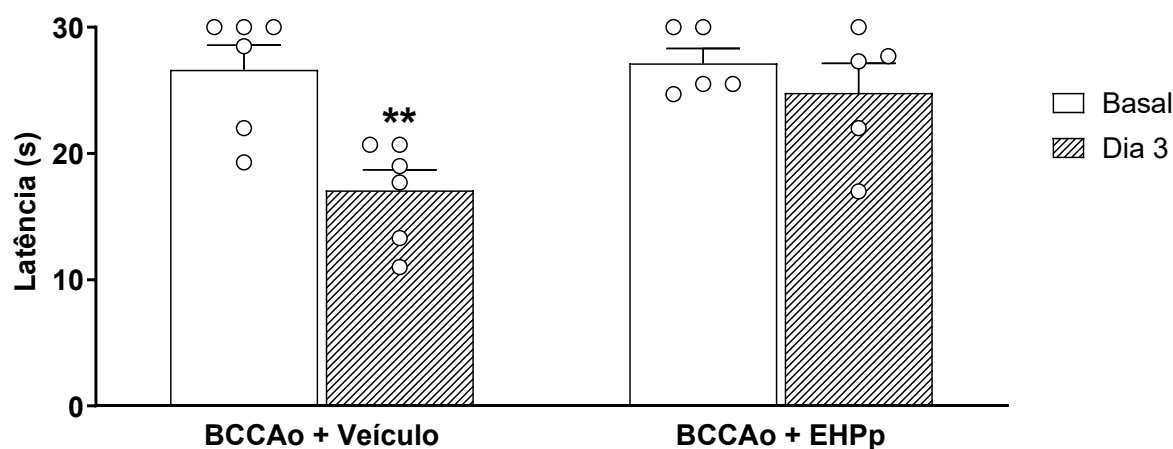
4.2.2 Efeitos do tratamento com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* sobre os déficits motores, cognitivos e emocionais desencadeados por isquemia cerebral global

4.2.2.1 Teste de resistência de agarre

Com o objetivo de avaliar força, resistência e equilíbrio dos animais, utilizou-se o teste de resistência de agarre (*wire hanging test*) (figura 23). De acordo com ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni, observou-se que, após isquemia global, a latência de queda dos animais foi menor quando comparada à latência basal [$F(1,9)=6,572$; $p=0,0305$], o que significa que os animais suportam por menos tempo o peso do próprio corpo em uma haste suspensa, demonstrando o impacto da isquemia sobre os parâmetros avaliados por esse teste.

Além disso, utilizando esta ferramenta de avaliação da função motora dos animais, evidenciou-se que a resistência de agarre dos animais tratados com extrato de *P. paniculata* (1 mg/kg) após isquemia global foi capaz de manter a resistência de agarre ($p=0,5803$) dos animais semelhante aos níveis basais ($p=0,5803$), apontando efeito protetor do extrato (Figura 23).

Figura 23. Avaliação da força de resistência de agarre (*wire hanging test*) de animais submetidos à BCCAo e tratados com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata*.



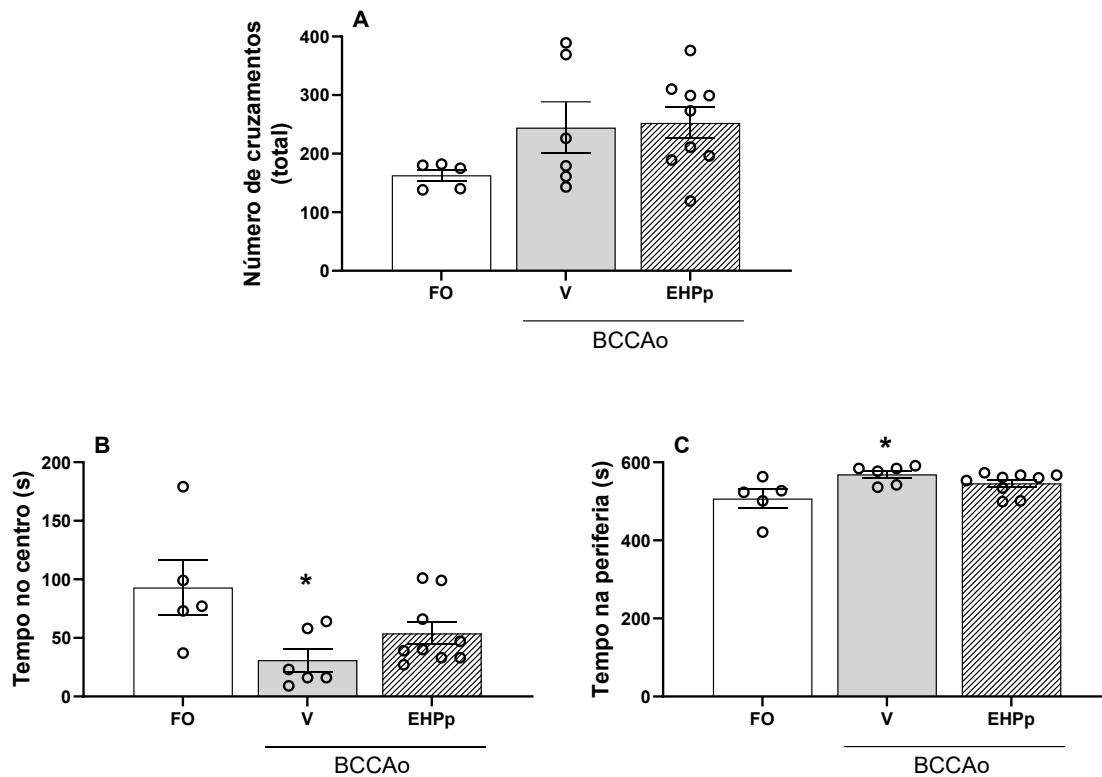
Legenda: Os animais administrados com veículo após isquemia global apresentaram diminuição da força de resistência de agarre, evidenciada pela diminuição da latência de queda. Essa diminuição não foi evidente nos animais tratados com EHPp. As colunas representam média \pm EPM nos diferentes grupos (n=5–6 animais/grupo). (*) mostra diferença significativa quando comparado aos valores basais. **p<0,01.

4.2.2.2 Teste do campo aberto

A atividade locomotora dos animais foi avaliada quatro dias após isquemia global. A análise estatística realizada por ANOVA de uma via não demonstrou diferença significativa na locomoção dos animais submetidos à BCCAo, independente do tratamento, quando comparados ao grupo falso-operado [$F(2,17)=2,168$; $p=0,1450$] (figura 24A), indicando que a isquemia global não afeta a atividade locomotora exploratória dos camundongos.

Quanto ao padrão de exploração, demonstrou-se que os animais administrados com veículo após lesão isquêmica permaneceram menos tempo no centro do campo aberto quando comparados aos animais falso-operados [$F(2,17)=4,405$; $p=0,0288$] (figura 24B) e, portanto, permaneceram mais tempo na periferia do aparato [$F(2,17)=4,405$; $p=0,0288$] (figura 24C), podendo indicar aumento da ansiedade nesses animais. Em contrapartida, os camundongos tratados com EHPp apresentaram padrão de exploração semelhante ao grupo falso-operado (FO) ($p=0,1785$), indicando que o tratamento com extrato reduziu as alterações provocadas pela isquemia.

Figura 24. Avaliação da atividade locomotora de animais submetidos à BCCAo e tratados com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* através do teste do campo aberto.



Legenda: Não foram observadas diferenças significativas na atividade locomotora dos animais (A). Entretanto, houve diminuição do tempo no centro (B) e aumento do tempo na periferia (C) nos animais administrados com veículo após lesão. Tais diferenças não foram observadas nos animais tratados com EHPp. As colunas representam média \pm EPM nos diferentes grupos (n=5–9 animais/grupo). (*) mostra diferença significativa quando comparado ao grupo falso-operado. *p=0,05. FO, falso operado; BCCAo, oclusão bilateral das artérias carótidas comuns.

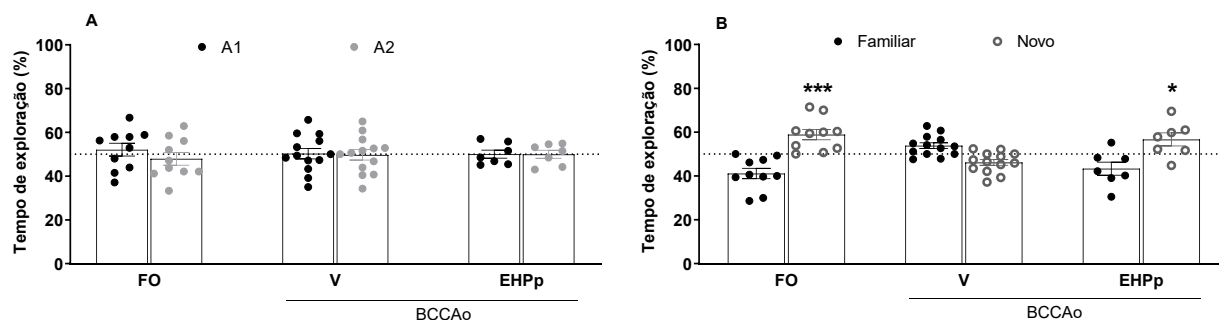
4.2.2.3 Teste do reconhecimento de objetos

No campo aberto, não foram observadas alterações na locomoção que prejudicassem a performance dos camundongos durante a realização do teste do reconhecimento de objetos. Adicionalmente, verificou-se que não houve diferença significativa no tempo de exploração dos objetos entre os animais na fase de treino [$F(2,27)=1,128$; $p=0,3385$] e na fase de teste [$F(2,27)=1,859$; $p=0,1752$] (Tabela 3), segundo análise por ANOVA de duas vias.

Tabela 3. Tempo de exploração dos objetos nas fases de treino e teste.

Tempo de exploração (média ± EPM)	Treino (s)	Teste (s)
Falso operado + Veículo	51,2 ± 15,8	35,2 ± 11,0
BCCAO + Veículo	75,5 ± 15,4	54,9 ± 10,1
BCCAO + EHPp 1 mg/kg	86,9 ± 16,4	70,1 ± 16,4

Ao avaliar o padrão de exploração dos objetos, ANOVA de duas vias demonstrou que, durante o treino (figura 25A), os animais exploraram ambos os objetos (denominados A1 e A2) de modo semelhante [F(2,27)=0,1869; p=0,8306]. Como esperado, ao comparar a exploração dos objetos na fase de teste (figura 25B) [F(2,27)=12,35; p=0,0002], observou-se que os animais falso-operados exploraram mais o objeto novo que o familiar (p=0,0006). Os animais submetidos à isquemia global e que não foram tratados com extrato exploraram os objetos igualmente (p=0,1307). Por outro lado, os animais que foram tratados com EHPp (1 mg/kg) após isquemia tiveram desempenho semelhante ao grupo falso-operado, explorando mais o objeto novo que o familiar (p=0,0340).

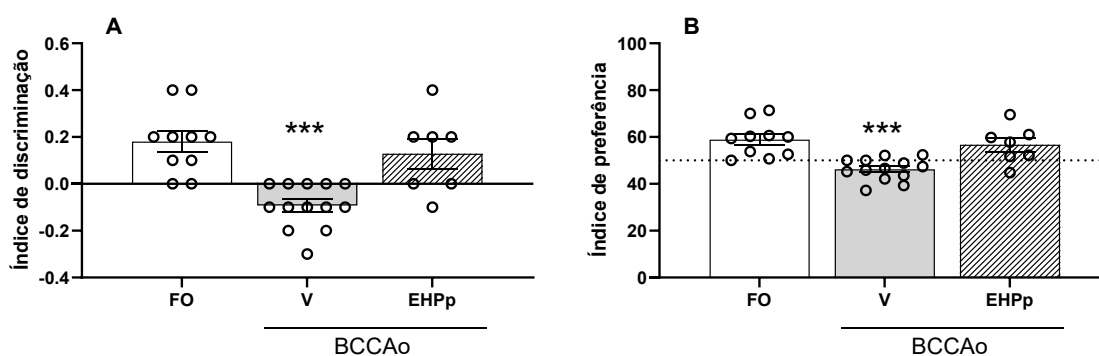
Figura 25. Avaliação do desempenho cognitivo de animais submetidos à BCCAO e tratados com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* no teste de reconhecimento de objetos.

Legenda. Em A, observa-se que não há preferência por nenhum dos lados/objetos na fase de treino. Na fase de teste (B), o grupo BCCAO administrado com veículo não apresentou diferença na exploração dos objetos novo e familiar, enquanto os animais falso-operados e os animais tratados com EHPp após a lesão exploram mais o objeto novo (B). Cada grupo representa a média de 7–13 animais e as barras verticais o E.P.M. Foi considerado significativo *p<0,05 e ***p<0,001 quando comparada a exploração dos objetos familiar e novo, em cada grupo. FO, falso operado; BCCAO, oclusão bilateral das artérias carótidas comuns.

O cálculo do índice de discriminação (figura 26A) permitiu detectar diferença estatística entre os grupos [F(2,27)=13,97; $p<0,0001$]. Os animais submetidos à BCCAO e administrados com veículo apresentaram valores negativos e próximos a zero, indicando maior exploração do objeto familiar em relação ao novo e/ou ausência de discriminação entre os objetos. Os animais falso-operados e os animais com lesão tratados com EHPp apresentaram índices de discriminação positivos, indicando não haver prejuízo em sua memória de curta duração.

Similarmente, ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa no índice de preferência [F(2, 27)=12,32; $p=0,0002$]. Valores próximos a 50% no índice de preferência (Figura 26B) foram encontrados nos animais que sofreram lesão e administrados com veículo, reforçando não haver preferência pela exploração do objeto novo. Valores acima de 50% indicam preferência à exploração do objeto novo, sendo estes encontrados no grupo falso-operado e no grupo tratado com EHPp após BCCAO. Sugere-se, a partir desses achados, que a isquemia cerebral global leva a prejuízo cognitivo nos animais e que o tratamento com EHPp protege os animais desse dano.

Figura 26. Avaliação do desempenho cognitivo de animais submetidos à BCCAO e tratados com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* através dos índices de discriminação e preferência no teste de reconhecimento de objetos.



Legenda: O índice de discriminação (A) e o índice de preferência (B) menor nos animais administrados com veículo após BCCAO indicam prejuízo em sua memória de curta duração. Não foi detectada diferença estatística entre o grupo falso-operado e tratado com EHPp após isquemia, indicando efeito protetor do extrato. Cada grupo representa a média de 7–13 animais e as barras verticais o E.P.M. A diferença foi considerado significativa (***) quando comparado ao grupo falso operado. FO, falso operado; BCCAO, oclusão bilateral das artérias carótidas comuns.

4.2.2.4 Teste da caixa claro-escuro

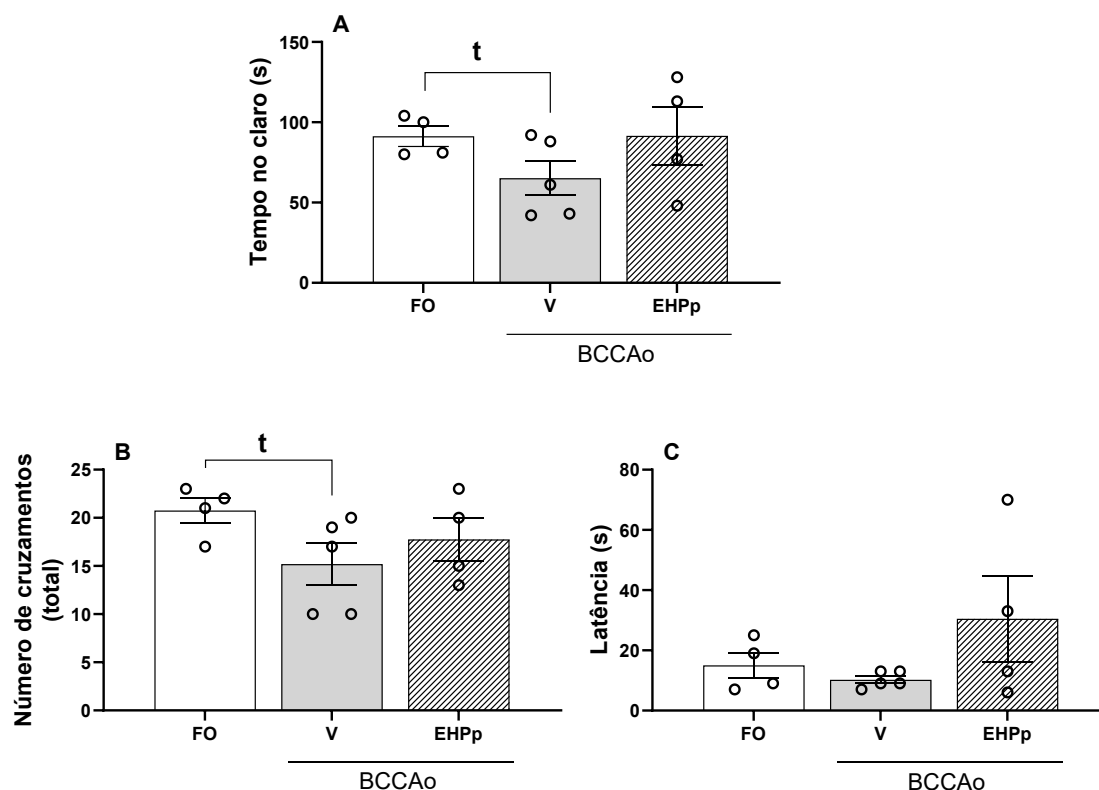
Considerando que o teste do campo aberto indicou que os animais apresentaram comportamento do tipo ansioso após submetidos à BCCAO, realizou-se o teste da caixa claro-escuro para melhor explorar o padrão de comportamento desses animais (figura 27). Observou-se diminuição de $29\pm 12\%$ do tempo de permanência no compartimento claro apenas nos animais do grupo BCCAO administrados com veículo quando comparados ao grupo falso-operado ($p=0,0456$, teste t unicaudal), entretanto, a diferença não foi significativa estatisticamente através de análise por ANOVA de uma via [$F(2,10)=1,584$; $p=0,2526$] (figura 27A).

De maneira semelhante, observou-se redução de $27\pm 10\%$ no número de cruzamentos dos animais administrados com veículo após lesão ($p=0,0406$, teste t unicaudal), sugerindo que os animais desse grupo exploraram menos o aparato durante o teste quando comparados ao grupo falso-operado (figura 27B).

Houve um discreto aumento da latência para entrada no compartimento escuro pelos animais tratados com EHPp após lesão, entretanto ANOVA de uma via não aponta diferença significativa entre os grupos [$F(2,10)=1,776$; $p=0,2188$] (figura 27C).

Esses dados, juntamente com os resultados do campo aberto, sugerem que os animais submetidos a isquemia global podem apresentar comportamento do tipo ansioso, e o tratamento com EHPp pode reverter esse efeito.

Figura 27. Avaliação de comportamento tipo ansioso de animais submetidos à BCCAo e tratados com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* através do teste da caixa claro-escuro.



Legenda: Os animais que submetidos ao modelo de isquemia global permanecem menos tempo no compartimento claro (A) e apresentaram redução no número de cruzamentos (B) quando comparados ao grupo falso operado. Não houve diferença entre os grupos na latência para entrada no compartimento escuro. Cada coluna representa a média de 4–5 animais e as barras verticais o E.P.M. Foi considerado significativo $p=0,05$ quando comparado ao grupo falso operado.

4.2.3 Efeitos do tratamento com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* na neuroinflamação desencadeada por isquemia cerebral global

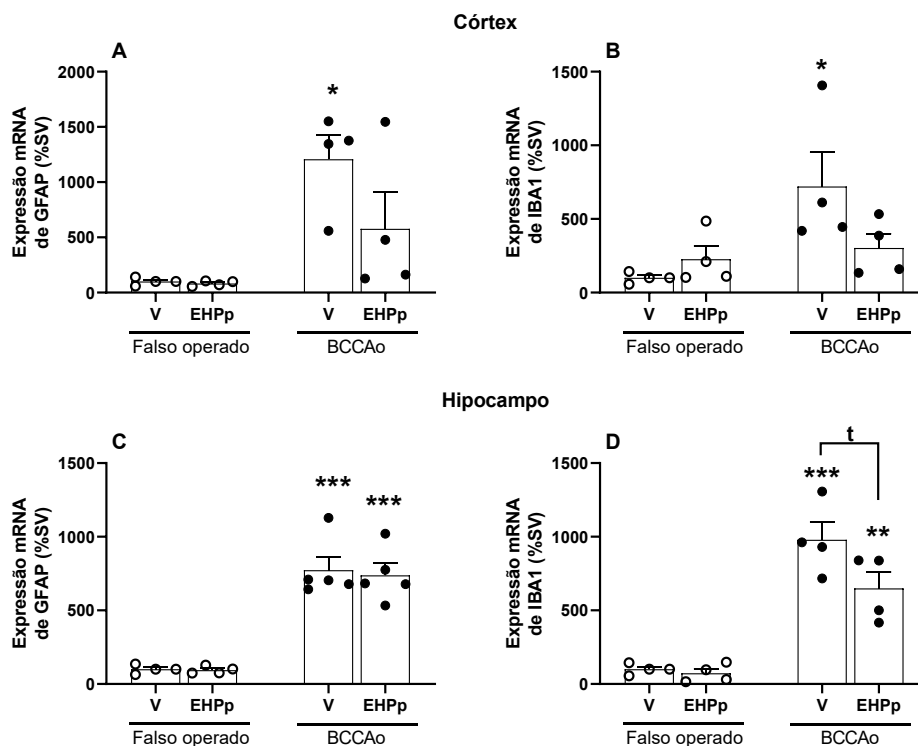
Parâmetros relacionados à neuroinflamação foram avaliados através da análise da expressão gênica de GFAP (astrócitos) (Figura 28A e C), Iba-1 (microglia) (Figura 28B e D) e das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Figura 29).

Utilizando ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Bonferroni, observou-se que, nos animais submetidos à BCCAo, houve aumento da expressão de GFAP tanto no córtex [F(1,12)=16,12; $p=0,0017$] (Figura 28A), quanto no hipocampo [F(1,14)=91,52; $p<0,0001$]

(Figura 28C), quando comparados aos animais falso-operados. Notou-se que no córtex esse aumento não foi significativo nos animais tratados com o EHPp ($p=0,6971$) após isquemia.

Em relação à micróglia, houve aumento da expressão gênica de Iba1 no córtex apenas dos camundongos submetidos à BCCAo que receberam veículo [$F(1,12)=6,790$; $p=0,0230$]; sendo que este aumento foi prevenido nos camundongos que sofreram lesão e foram tratados com EHPp (Figura 28B). No hipocampo (Figura 28D), houve aumento da expressão desse gene nos animais submetidos a BCCAo independente do tratamento [$F(1,12)=74,30$; $p<0,0001$]. Utilizou-se teste t unicaudal para comparar os dois grupos que sofreram BCCAo, sendo observada dessa forma redução da expressão de Iba1 nos animais que receberam extrato ($p=0,0463$).

Figura 28. Expressão gênica de marcadores de células gliais no córtex (A–B) e hipocampo (C–D) de animais submetidos à BCCAo e tratados com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* (1 mg/kg).



Legenda: Os animais submetidos à BCCAo apresentaram aumento da expressão de marcadores de remodelamento de células gliais no córtex e no hipocampo, tanto de astrócitos (GFAP – A e C) quanto de micróglia (Iba1 – B e D). No córtex (A–B), o tratamento com EHPp reduziu o remodelamento dessas células. No hipocampo, o tratamento não reduziu a expressão de GFAP (C). Em relação à Iba1 (D), quando foram comparados entre si apenas os animais submetidos a BCCAo, houve redução da ativação microglial no grupo tratado com EHPp. Cada grupo representa a média de 4–5 animais e as barras verticais o E.P.M. Foi considerado significativo $*P<0,05$, $**P<0,01$ e $***P<0,001$ quando comparado ao grupo controle (falso operado+veículo); $\#P<0,05$ quando comparado ao grupo BCCAo+V; $^tP<0,05$ por análise com teste t unicaudal.

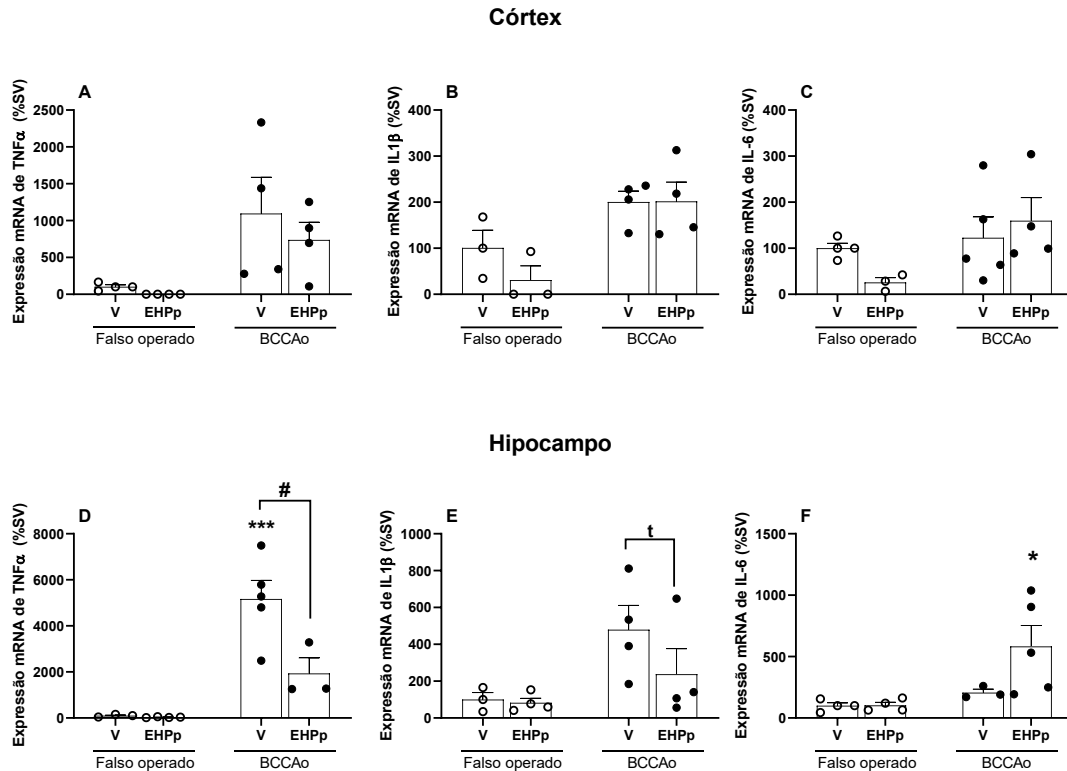
Considerando sua importância em influenciar mudanças morfológicas que ocorrem nas células gliais em resposta à dano e para investigar o microambiente em que estas e neurônios se encontravam, foi analisada a expressão gênica de citocinas após 48h da BCCAO (figura 29).

A partir de análise por ANOVA de duas vias, detectou-se aumento, no córtex, da expressão da citocina pró-inflamatória TNF α nos grupos submetidos à BCCAO [F(1,12)=10,07; p=0,0080]; o pós-teste de Bonferroni não apontou entre quais grupos estava essa diferença (figura 29A). No hipocampo verificou-se aumento de TNF α provocado pela BCCAO [F(1,11)=30,27; p=0,0002] (figura 29D), o qual foi reduzido significativamente pela administração de EHPp [F(1,11)=6,233; p=0,0297)].

Em seguida, avaliou-se a expressão gênica de IL-1 β . De maneira semelhante, ANOVA de duas vias demonstrou diferença significativa entre os animais após BCCAO no córtex [F(1,10)=14,92; p=0,0031] (figura 29B) e no hipocampo [F(1,11)=6,434; p=0,0277] (figura 29E), porém sem distinção entre os grupos pelo pós-teste de Bonferroni. Quando comparados apenas os animais submetidos à isquemia através do teste t unicaudal, não houve redução da expressão de IL-1 β no córtex após tratamento com extrato (p=0,0741), mas nota-se redução da expressão dessa citocina no hipocampo dos animais que receberam extrato (p=0,0463).

Por fim, foi avaliada a expressão gênica de IL-6. No córtex (figura 29C), ANOVA de duas vias apontou não haver diferença estatística após BCCAO [F(1,12)=3,966; p=0,0697]. Quando a análise foi realizada no hipocampo (figura 29F), ANOVA apontou diferença após lesão [F(1,12)=6,725; p=0,0235] e o pós-teste de Bonferroni indicou que essa diferença está entre o grupo falso operado e os animais com lesão que receberam EHPp (p=0,0428).

Figura 29. Análise de expressão gênica de citocinas no córtex (A–C) e no hipocampo (D–F) de animais submetidos à BCCAO e tratados com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* (1 mg/kg).



Legenda: Houve diferença significativa entre os grupos na expressão gênica de TNF α no córtex (A) após BCCAO, entretanto no pós-teste não foi possível identificar entre quais grupos; no hipocampo esse aumento foi significativo nos animais após lesão e não tratados, enquanto no tratamento com EHPp a expressão dessa citocina foi reduzida (D). A expressão gênica de IL-1 β no córtex (B) e no hipocampo (E) estava discretamente aumentada após BCCAO. Comparando-se apenas os animais com lesão, identificou-se que o tratamento com EHPp diminuiu a expressão dessa citocina no hipocampo, mas não no córtex. A expressão de IL-6 não foi alterada no córtex (C), apenas no hipocampo de animais submetidos a BCCAO e tratados com EHPp (F). Cada grupo representa a média de 4–5 animais e as barras verticais o E.P.M. Foi considerado significativo * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ quando comparado ao grupo controle (falso operado+veículo); # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo BCCAO+V; † $P < 0,05$ por análise com teste t unicaudal.

4.2.4 Efeitos do tratamento com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* na expressão de fatores neurotróficos após isquemia global

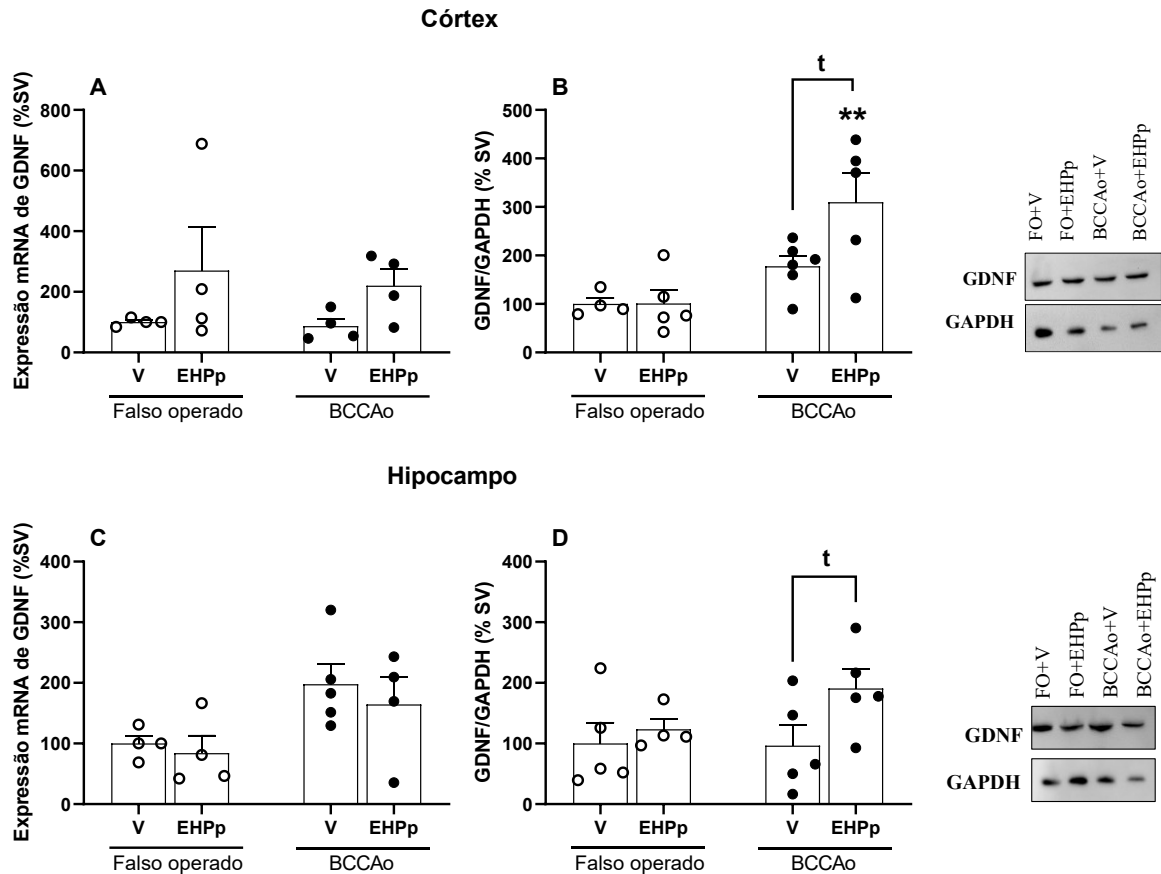
Prosseguindo com a análise do córtex e do hipocampo após evento isquêmico, investigou-se a expressão gênica e proteica dos fatores neurotróficos GDNF (figura 30) e BDNF (figura 31).

ANOVA de duas vias apontou que não há diferença estatística da expressão gênica de GDNF no córtex [$F(1,12)=0,05881$; $p=0,8125$] (figura 30A) e nem mesmo no hipocampo (figura 30C) [$F(1,13)=0,07290$; $p=0,7914$].

Ao avaliar sua expressão proteica, foi observado que GDNF estava aumentado apenas no córtex de animais que foram tratados com EHPp após a lesão, quando comparado aos demais grupos (figura 30B) [$F(1,16)=15,71$; $p=0,0011$]. No hipocampo, ANOVA apontou que não há diferença entre os grupos (figura 30D) [$F(1,15)=1,237$; $p=0,2835$].

Para uma análise mais específica do efeito do tratamento com extrato após isquemia, utilizou-se teste t unicaudal para comparar apenas os grupos de animais que sofreram lesão. Nessa análise, foi visto que a expressão proteica de GDNF encontrava-se aumentada tanto no córtex ($p=0,0261$), quanto no hipocampo ($p=0,0399$), dos animais tratados com EHPp quando comparados aos administrados com veículo.

Figura 30. Expressão gênica e proteica de GDNF no córtex (A–B) e no hipocampo (C–D) de animais submetidos à BCCAO e tratados com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* (1 mg/kg).

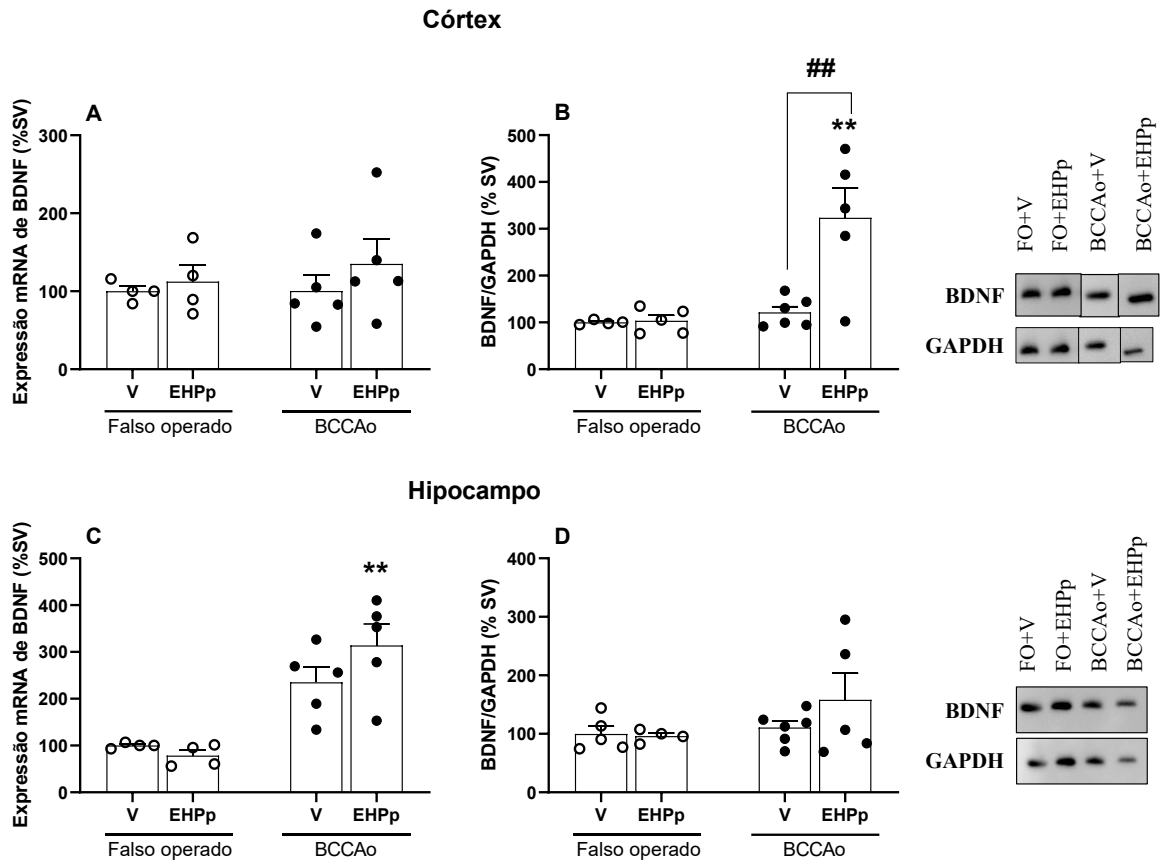


Legenda: Não foi encontrada diferença estatística da expressão gênica de GDNF no córtex e no hipocampo de animais submetidos à lesão quando comparados aos animais falso-operados. Quando avaliada sua expressão proteica no córtex, detectou-se aumento significativo do grupo operado e tratado com EHPp quando comparado aos demais grupos (ANOVA de duas vias) e quando comparados apenas entre os grupos com lesão (teste t unicaudal); já no hipocampo, entre os grupos BCCAO, GDNF está aumentado no grupo tratado com EHPp (teste t unicaudal). Cada grupo representa a média de 4–6 animais e as barras verticais o E.P.M. Foi considerado significativo $**P < 0,01$ quando comparado ao grupo falso operado e $^{\dagger}P < 0,05$ quando comparado ao grupo BCCAO+V.

Em seguida, avaliou-se a expressão gênica e proteica de BDNF. Não ocorreu diferença estatística da expressão gênica de BDNF no córtex (figura 31A) entre os grupos submetidos à BCCAO ou falso operados [$F(1,14)=0,2418$; $p=0,6305$], mas em presença da lesão, o tratamento com EHPp aumentou sua expressão proteica (figura 31B) nessa região [$F(1,16)=8,714$; $p=0,0094$].

Já no hipocampo, a expressão gênica de BDNF (figura 31C) encontrou-se aumentada nos animais submetidos a lesão e tratados com EHPp [$F(1,14)=32,47$; $p < 0,0001$], mesmo na ausência de alteração em sua expressão proteica (figura 31D) [$F(1,16)=1,058$; $p=0,3189$].

Figura 31. Expressão gênica e proteica de BDNF no córtex (A–B) e no hipocampo (C–D) de animais submetidos à BCCAO e tratados com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* (1 mg/kg).



Legenda: Não foi demonstrada diferença estatística da expressão gênica de BDNF no córtex de grupos submetidos à BCCAO ou falso operados; por outro lado, quando avaliada sua expressão proteica, observou-se que, em presença da lesão, BDNF apresentou-se aumentado em animais tratados com EHPP. Já no hipocampo, a expressão gênica de BDNF encontrou-se aumentada nos animais submetidos a lesão e tratados com EHPP, mesmo na ausência de alteração em sua expressão proteica. Cada grupo representa a média de 4–6 animais e as barras verticais o E.P.M. Foi considerado significativo $**P < 0,01$ quando comparado ao grupo falso operado e $##P < 0,01$ quando comparado ao grupo BCCAO+V.

4.2.5 Efeitos do tratamento com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* na neurodegeneração hipocampal após isquemia global

A neurodegeneração hipocampal foi avaliada pela redução do número de neurônios piramidais com aparência intacta visualizados pela coloração de Nissl 48h após a cirurgia nas regiões analisadas (figura 32).

Essa redução aconteceu de maneira diferente nos dois hemisférios cerebrais, dependendo se o hemisfério permaneceu ocluído (ipsilateral) ou se foi reperfundido (contralateral) após 30 minutos de oclusão durante a cirurgia.

Na região de CA1 (figura 32C), a análise estatística feita por ANOVA de uma via seguida de pós teste de Bonferroni apontou que a isquemia reduziu o número de neurônios tanto no hemisfério contralateral [$F(2,9)=8,827$; $p=0,0076$], quanto no hemisfério ipsilateral [$F(2,9)=60,97$; $p<0,0001$] dos camundongos que receberam veículo comparados ao grupo falso operado.

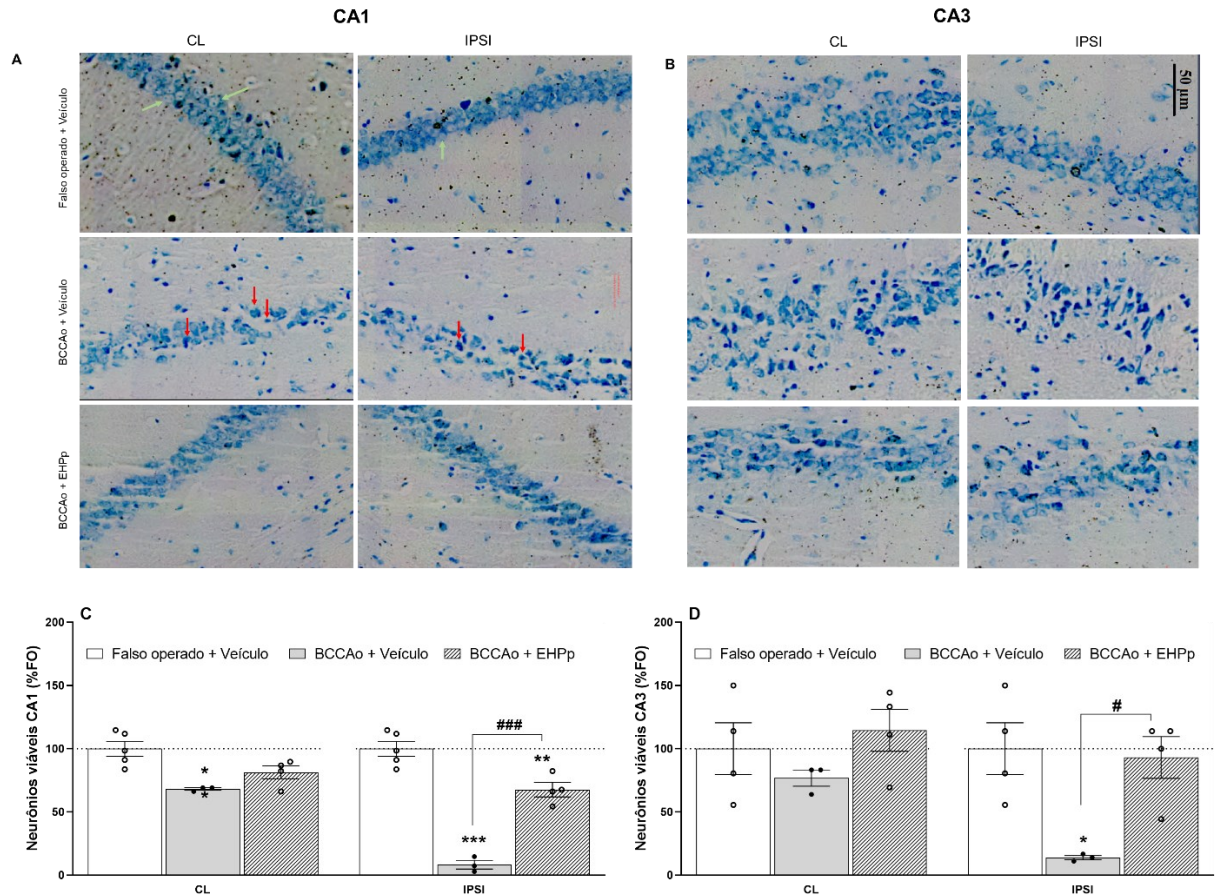
Observou-se facilmente que, nos animais tratados com EHPp após a isquemia, não houve redução significativa do número de neurônios intactos no hemisfério contralateral ($p=0,0855$), onde a circulação sanguínea foi reestabelecida após 30 min de oclusão.

No hemisfério ipsilateral, ocorreu redução do número de neurônios viáveis tanto nos animais com lesão administrados com veículo quanto nos animais com lesão tratados com extrato. Todavia, verificamos que o tratamento com EHPp claramente reduziu a neurodegeneração, pois observou-se aumento significativo de neurônios intactos em comparação ao grupo de animais com isquemia administrados com veículo ($p=0,0002$).

Outra região altamente sensível a danos isquêmicos é CA3. Não houve diferença significativa entre os grupos [$F(2,8)=1,139$; $p=0,3669$] no número de neurônios viáveis nessa região (Figura 32D) no hemisfério contralateral.

Por outro lado, no hemisfério ipsilateral houve perda neuronal significativa nos animais tratados com veículo após lesão [$F(2,8)=7,192$; $p=0,0163$], mas não nos animais tratados com EHPp ($p>0,9999$) quando comparados ao grupo falso operado. A análise estatística demonstrou que a perda neuronal vista nessa região nos animais administrados com veículo após isquemia foi prevenida com o tratamento com EHPp ($p=0,0373$).

Figura 32. Imagens histológicas de sub-regiões de CA1 e CA3 no hipocampo dos animais e contagem de neurônios piramidais viáveis nessas regiões.



Legenda: Extrato hidroalcoólico de *Polygala paniculata* reduz a neurodegeneração hipocampal em camundongos após isquemia cerebral global. Imagens representativas de cortes coronais ao nível do hipocampo em sub-regiões de CA1 (A) e CA3 (B) (coloração de Nissl), em ambos os hemisférios cerebrais (contralateral e ipsilateral), indicando neurônios piramidais aparentemente viáveis (setas verdes) e neurônios encolhidos e mais corados (setas vermelhas), indicando morte celular. Imagens obtidas em digitalizador de lâminas Axio Scan (objetiva 40x), a barra de escala corresponde a 50 μ m. Os neurônios viáveis foram contados em sub-regiões de CA1 (C) e CA3 (D) 48h após isquemia. Os resultados foram normalizados com a média do grupo falso operado + veículo (100%). As colunas representam média \pm EPM nos diferentes grupos (n=3-4 animais/grupo). Foi considerado significativo *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001 quando comparado ao grupo controle (falso operado+veículo); #P<0,05 quando comparado ao grupo BCCAO+V. CL, contralateral; IPSI, ipsilateral.

5 DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que a adição de extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* (EHPp) em diferentes doses afeta a morte neuronal induzida por isquemia tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Considerou-se o experimento *in vitro* como primeiro indicador se o EHPp induz proteção significativa em evento de isquemia cerebral. O tratamento diminuiu a morte de neurônios corticais cultivados *in vitro* submetidos à privação de oxigênio e glicose (POG). Além disso, o modelo animal de isquemia cerebral global utilizado neste trabalho desencadeou déficits motores, cognitivos e emocionais em camundongos, refletindo o que ocorre em indivíduos que sofrem AVE ou parada cardíaca. O tratamento via oral (gavagem) com EHPp (1 mg/kg) atenuou essas alterações comportamentais nos animais, bem como mitigou a neuroinflamação exacerbada subsequente à isquemia cerebral, aumentou a expressão de fatores neurotróficos e reduziu a lesão hipocampal encontrada nos animais após o evento isquêmico. Em conjunto, esses dados indicam que o tratamento com EHPp apresenta-se como favorável intervenção terapêutica em indivíduos acometidos por isquemia cerebral numa janela terapêutica mais ampla.

A terapia da isquemia cerebral permanece um enorme desafio. Embora tragam informações epidemiológicas importantes, dados sobre a taxa de sobrevivência a eventos isquêmicos não fornecem informações sobre o sucesso da recuperação do paciente (MOULAERT et al., 2010). Vários estudos relatam que a qualidade de vida de sobreviventes de ataques cardíacos é geralmente de aceitável a boa a longo prazo. Entretanto, muitos indivíduos relatam experimentar dificuldades funcionais (BOYCE et al., 2019; LIM et al., 2004; MOULAERT et al., 2010; SULZGRUBER et al., 2015), assim como indivíduos que sobrevivem ao AVE (KALARIA; AKINYEMI; IHARA, 2016; KIMURA; TATENO; ROBINSON, 2003; KNAPP et al., 2020; LEPPÄVUORI et al., 2003; LI et al., 2019; WONG; MOK, 2015), o que traz impacto negativo em sua vida, afetando sua reabilitação.

Existe uma disparidade entre os benefícios promissores de diversas drogas que agem como neuroprotetoras em modelos animais e falham em fases clínicas (IADECOLA; ANRATHER, 2011; KIKUCHI et al., 2014). É imprescindível, portanto, que estudos pré-clínicos reflitam a realidade clínica tanto quanto possível, reunindo dados que abranjam os diversos alvos farmacológicos envolvidos na patologia da isquemia cerebral. Dessa maneira, modelos de isquemia cerebral *in vitro* e *in vivo* são importantes ferramentas para estudo do

mecanismo de ação de candidatos a drogas neuroprotetoras, validando-os a nível molecular e celular (NEUHAUS et al., 2017).

Choi publicou, em 2020, interessante ponto de vista sobre intervenções terapêuticas para reduzir o dano isquêmico. Pode-se intervir em diversos pontos na cascata de eventos desencadeados pela isquemia cerebral, desde o acúmulo excessivo de glutamato no meio extracelular à ativação de vias de morte celular e destruição de estruturas celulares. De acordo com esse autor, modificar os processos iniciais tem a vantagem de bloquear múltiplos níveis divergentes dessa cascata, porém é necessária intervenção precoce, o que pode ser problemático em termos de efeitos adversos ou interferência em eventos benéficos que aconteceriam mais adiante. Em compensação, intervir apenas nos processos mais tardios dessa cascata de eventos tem a vantagem de prolongar a janela terapêutica, maior especificidade e menos efeitos adversos; entretanto corre-se o risco de serem intervenções ineficazes, pois vias não bloqueadas podem, ainda assim, provocar morte celular.

Esse autor defende ainda que, para a intervenção apresentar efeito protetor robusto em humanos, é necessário inibir múltiplos mecanismos, por isso encoraja a combinação de terapias. Nesse contexto, extratos obtidos de plantas medicinais são fontes vantajosas de compostos com atividade biológica (JURIC et al., 2020; TIWARI; RANA, 2015), podendo atuar satisfatoriamente em diversos níveis da cascata de eventos após isquemia cerebral, considerando a multiplicidade de moléculas que podem conter.

Neste trabalho, procurou-se seguir as recomendações da STAIR, com a realização de experimento cego para definição de curva dose-resposta do extrato, avaliou-se parâmetros funcionais e histológicos, bem como marcadores moleculares importantes na clínica, para inferir sobre a efetividade do extrato. Foram consideradas na análise as células gliais em adição às células neuronais. Ademais, o desenho experimental contemplou o tratamento com extrato após reperusão, atuando em diversos alvos farmacológicos por possuir diferentes componentes com ação biológica em sua composição (FISHER et al., 2009; SAVITZ et al., 2017; STROKE THERAPY ACADEMIC INDUSTRY ROUNDTABLE (STAIR), 1999).

Assim, o modelo animal escolhido para induzir isquemia cerebral produz morte neuronal robusta e alterações comportamentais e histológicas importantes que se assemelham à clínica (GONÇALVES et al., 2018; MARTINS-SILVA et al., 2021; SOARES et al., 2013; WAHUL et al., 2018), possibilitando futuros estudos translacionais. Deve-se, todavia, realizar-se experimentos que avaliem a eficácia do tratamento com EHPp a longo prazo, acompanhando

por mais tempo os animais após a isquemia, para certificar-se de que este tratamento promove neuroproteção duradoura e não apenas retarde a maturação da lesão (FISHER et al., 2009).

Nossos achados vão ao encontro de diversos relatos na literatura sobre outras espécies do gênero *Polygala*, as quais são amplamente utilizadas no tratamento de doenças neurodegenerativas e a diversos estudos importantes sobre os mecanismos pelos quais essas plantas promovem esse efeito (LACAILLE-DUBOIS; DELAUDE; MITAINE-OFFER, 2020).

Inicialmente, demonstramos efeito protetor de EHPp em modelo *in vitro* de privação de oxigênio e glicose. Em países como Coreia e China, *Polygala tenuifolia* é conhecida principalmente por *Polygalae Radix* (PR, que nada mais é do que raízes de *P. tenuifolia* que passaram por processo de secagem) e vem sendo utilizada como sedativo e tranquilizante, estimulante de contrações uterinas, expectorante e anti-inflamatório (LEE et al., 2004). No estudo de Lee et al. (2009), células de neuroblastoma humano foram expostas à POG seguida de reoxigenação, tendo sido tratadas no início da privação com *P. tenuifolia* em concentrações variando entre 0,032–20 µg/mL. A viabilidade celular foi avaliada por análise por citometria de fluxo, sendo demonstrada ação neuroprotetora do extrato, com o valor de EC50 (concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo) de $4,5 \pm 0,6$ µg/mL (LEE et al., 2009). Outro estudo levou em consideração o papel importante que a liberação massiva de glutamato desempenha em processos neurodegenerativos e demonstrou ação neuroprotetora dessa planta contra a morte celular induzida pela adição de NMDA a culturas primárias de neurônios cerebelares de ratos, numa concentração entre 0,05 – 5 µg/mL (LEE et al., 2004). Esses dados contribuíram para que *P. tenuifolia* fosse incluída juntamente com outras plantas em preparações de misturas medicinais, produzidas para melhorar sinergicamente o efeito neuroprotetor demonstrado por cada planta isoladamente, inclusive com efeito comparado ao edaravone (MAHESH et al., 2011), droga utilizada no Japão para o tratamento do AVE .

Além disso, polygalasaponina F, um dos componentes de *Polygala japonica*, também apresentou efeito anti-apoptótico durante POG em culturas primárias de neurônios corticais de ratos (XIE et al., 2020). Todos esses dados demonstram o potencial protetor de espécies de *Polygala* em modelos *in vitro* de POG.

Embora amplamente utilizada na medicina oriental, a única espécie do gênero *Polygala* registrada no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011) é a *P. senega* L., ainda que esta não seja a única representante do gênero no Brasil (LÜDTKE;

SOUZA-CHIES; MIOTTO, 2013). Até o momento, não existem estudos que avaliaram a ação de *P. paniculata* em modelos de isquemia cerebral.

A quimiotaxonomia da família *Polygalaceae* é caracterizada pela presença de xantonas, sendo caracterizadas pelo menos três na *P. paniculata*: 1,5- dihidroxi-2,3-dimetoxixantona, 1-hidroxi-2,3,5-trimetoxixantona e 1-hidroxi-5-metoxi-2,3- metilenedioxi xantona (CRISTIANO et al., 2003). Em 2008, Missau e colaboradores apresentaram estudo fitoquímico de *P. paniculata*, isolando e caracterizando os metabólitos secundários dessa espécie utilizando técnicas cromatográficas e análises espectroscópicas (MISSAU, 2008). Diversos constituintes voláteis foram também encontrados nessa planta: nas flores, foram encontrados 25 compostos, e nas raízes identificou-se 13 compostos, sendo que o salicilato de metila foi o composto majoritário. Outros compostos foram também identificados, dentre eles espinasterol, aurapteno, febalosina e rutina, sendo o último um flavonóide glicosilado relativamente abundante em várias plantas e com importante atividade biológica.

Existem dados minuciosos apontando que o efeito antinociceptivo do extrato de *P. paniculata* e seus constituintes depende da interação entre receptores ionotrópicos de glutamato (NMDA e cainato). Entre os diversos modelos agudos de dor utilizados por Lapa et al. (2009) para demonstrar a ação dessa planta, o efeito da administração oral de *P. paniculata* foi mais evidente na inibição da resposta de nocicepção induzida por injeção intraplantar de glutamato e por injeção intratecal de glutamato, NMDA, IL-1 β e TNF- α . A interação entre *P. paniculata* e doenças neurodegenerativas relacionadas à excitotoxicidade, homeostase glutamatérgica e estresse oxidativo também foi demonstrada por Farina et al. (2005), em modelo animal de intoxicação por metil-mercúrio (MeHg), no qual o tratamento com o extrato dessa planta aboliu as alterações provocadas por esse agente sem, no entanto, atuar como quelante de MeHg, e sim por mecanismos antioxidantes. Estratégias que visam inibir a liberação de glutamato, aumentar o sistema de captação desse neurotransmissor e/ou antagonizar seus receptores têm-se mostrado eficientes em pesquisas experimentais de tratamento da isquemia cerebral (ZHOU ET AL 2018).

O presente estudo demonstrou que o tratamento com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* (1 mg/kg) atenuou o déficit motor, cognitivo e emocional desencadeado pela isquemia cerebral em camundongos.

Inicialmente, os déficits sensorio-motores são mais proeminentes na avaliação clínica de pacientes que sofreram isquemia cerebral (BAUMGARTNER et al., 2018) e, por isso, foram

os primeiros sintomas avaliados por nosso estudo. Foi demonstrada perda de força muscular e de força de resistência de agarre nos animais submetidos à BCCAO, as quais foram atenuadas pelo tratamento com EHPp. Para avaliação cognitiva, foi escolhido o teste do reconhecimento de objetos, utilizando o protocolo para avaliação de memória de curta duração. Os animais apresentam prejuízo nessa tarefa após BCCAO e o tratamento com EHPp foi eficaz em proteger os animais contra esse dano.

Estudos têm demonstrado a ação protetora da rutina, um dos componentes principais do EHPp, em diversas doenças, incluindo em modelos de isquemia cerebral (GANESHPURKAR; SALUJA, 2017). Utilizando um modelo de isquemia focal, Liu et al. (2018) demonstraram a ação da rutina em diminuir a área de infarto e atenuar a perda neuronal, assim como melhorar a performance sensório-motora e a memória de reconhecimento de ratos submetidos à lesão. O tratamento com rutina ainda aumentou os níveis de mediadores de sobrevivência celular, tais como BDNF, NGF e os receptores TrkA e TrkB no córtex e no hipocampo de ratos. Jang e colaboradores (2014) utilizaram um modelo de isquemia cerebral fototrombótica em ratos e demonstraram que a administração de rutina, iniciada 1h após a lesão, reduz o dano à barreira hematoencefálica por reduzir a expressão de metaloprotease-9, uma enzima que desempenha papel fundamental no dano tecidual. Rodrigues e colaboradores (2013) avaliaram a ação da rutina em modelo de isquemia cerebral focal, no qual provocaram lesão no córtex motor e somatossensorial, e obtiveram dados que apontam para a recuperação funcional dos animais tratados com 50 mg/kg desse composto.

Adicionalmente, *P. tenuifolia* foi estudada em modelo animal de isquemia cerebral global através da oclusão de 4 vasos (4-VO), sendo eficaz em prevenir o dano neuronal e os déficits motor e cognitivo resultantes da lesão (KIM et al., 2008). Em modelo de oclusão bilateral das artérias carótidas comuns, demonstrou reduzir o dano cerebral por prevenir a peroxidação lipídica e preservar o metabolismo energético (PARK et al., 2006). Ainda, em modelo animal de déficits cognitivos induzidos por escopolamina em ratos, no qual a sinalização colinérgica encontra-se alterada, essa planta demonstrou efeito neuroprotetor significativo, assim como em neurotoxicidade induzida em culturas de neurônios corticais pela adição de glutamato e proteína precursora amiloide (APP), de maneira dose-dependente (PARK et al., 2002).

Outra espécie desse gênero foi também recentemente estudada por Martins-Silva et al. em modelo de isquemia cerebral global. *P. sabulosa* exerceu efeito neuroprotetor no modelo de

BCCAO, reduzindo a área de infarto e a expressão gênica das citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF α . O tratamento com *P. sabulosa* preveniu também a fraqueza muscular e alterações cognitivas promovidas pela lesão isquêmica (MARTINS-SILVA et al., 2021).

Dentre as áreas mais susceptíveis do SNC estão as regiões CA1 e CA3 do hipocampo. Através da contagem de células viáveis marcadas pelo corante violeta de Cresil, demonstramos que o tratamento com EHPp previne significativamente a degeneração hipocampal provocada pela isquemia cerebral nessas regiões. O hipocampo é parte central do sistema límbico e desempenha papel fundamental no processamento de memórias. Sabe-se que danos, como aqueles desencadeados por evento isquêmico, afetam desde a transmissão e plasticidade sináptica a circuitarias locais dentro do encéfalo, podendo alterar a atividade de redes neurais, as quais são essenciais para a comunicação adequada entre grupos distintos de neurônios e integração da informação (ESCOBAR et al., 2019). Como descrito anteriormente, indivíduos que sobrevivem à isquemia cerebral podem apresentar déficits cognitivos importantes.

Em pacientes tratados dentro das primeiras 3h após AVE pelo trombolítico Alteplase e em pacientes que receberam intervenções de ressuscitação bem-sucedida pode haver declínio cognitivo. Assim, é crucial que sejam estudadas intervenções terapêuticas que auxiliem na recuperação cognitiva desses pacientes, melhorando a plasticidade sináptica e promovendo a reorganização de circuito neuronais.

Além disso, transtornos de ansiedade acometem cerca de 25% dos sobreviventes do AVE (CHUN et al., 2018; KNAPP et al., 2020; LI et al., 2019) e cerca de 13–61% dos sobreviventes da parada cardíaca (NABER; BULLINGER, 2018), e o mecanismo pelo qual eles ocorrem ainda não está completamente elucidado. A primeira hipótese é que as estruturas cerebrais diretamente comprometidas durante o infarto estejam envolvidas na ansiedade (por exemplo, estruturas relacionadas a modulação emocional) (ÅSTRÖM, 1996; TANG et al., 2012), mas estudos de neuroimagem não demonstram que haja associação entre a localização da lesão e o desenvolvimento de ansiedade (LI et al., 2019). Li et al. avaliaram a localização das lesões cerebrais em pacientes que sofreram AVE através de imagens obtidas por ressonância magnética (MRI) e não encontraram correlação entre a localização e o aparecimento do transtorno de ansiedade; contudo, encontraram que pacientes com infarto agudo na substância branca dos hemisférios cerebrais eram mais propensos a apresentar ansiedade. A substância branca inclui várias regiões de fibras neurais conectadas nos hemisférios cerebrais, como corpo caloso e coroa radiada. A segunda hipótese é, portanto, que

a ansiedade não esteja associada com a localização do infarto, mas esteja correlacionada com a conectividade entre vários circuitos e redes neurais (LI et al., 2019; VICENTINI et al., 2017).

Estudos demonstram que modelos animais de isquemia cerebral também apresentam comportamento do tipo-ansioso em vários testes, como labirinto em cruz elevado, campo aberto e interação social (NAKASHIMA et al., 2003; NEIGH et al., 2009; SOARES et al., 2013). Nossos dados demonstraram comportamento do tipo-ansioso nos animais submetidos à isquemia global quando comparados aos falso-operados e que o tratamento com EHPp atenuou tal alteração. A lesão isquêmica não alterou a ambulação dos animais no teste do campo aberto, apenas o padrão de exploração, em que os animais com lesão administrados com veículo exploraram menos o centro do aparato quando comparados aos animais falso-operados, permanecendo mais tempo nos quadrantes periféricos. No teste da caixa claro-escuro, os animais desse grupo permaneceram menos tempo no compartimento claro e exploraram menos o aparato, indicando comportamento ansiogênico. Os animais tratados com EHPp após a lesão apresentaram comportamento semelhante aos animais falso-operados, sugerindo que o extrato pode ter efeito ansiolítico nesse modelo. Isso corrobora com outros estudos que utilizaram como tratamento outras espécies de *Polygala*, como *P. sabulosa* (DUARTE et al., 2018) e *P. tenuifolia* (LEE et al., 2015), e demonstraram seu efeito ansiolítico.

Danos e doenças no SNC desencadeiam respostas multicelulares coordenadas que envolvem glia, neurônios e células não-neurais. A regulação fina da inflamação é essencial para balancear o acúmulo de debris e a fagocitose excessiva, os quais podem ser igualmente prejudiciais. Assim, existem diversos mecanismos celulares e moleculares regulatórios em áreas de lesões e tecidos adjacentes no SNC que contribuem para esse equilíbrio visando maximizar a preservação do tecido saudável e restringir o espalhamento da inflamação citotóxica (SOFRONIEW, 2015).

Além de exercerem funções primordiais no SNC saudável, os astrócitos respondem a eventos anormais no SNC, incluindo doenças neurodegenerativas e desmielinizantes, epilepsia, trauma, isquemia, infecções, câncer, entre outros, através de um processo denominado astrogliose (ESCARTIN et al., 2021; SOFRONIEW, 2015). Em resposta a patologias, os astrócitos passam por mudanças heterogêneas, determinadas pelo contexto e por moléculas sinalizadoras, que variam de acordo com a natureza e gravidade dos distúrbios do SNC. Essas mudanças se devem a programas moleculares envolvendo mudanças na regulação transcricional, bioquímica, morfológica, metabólica e remodelamento fisiológico, os quais

resultam em ganho de novas funções ou perda/redução das funções homeostáticas (ESCARTIN et al., 2021). Astrócitos reativos têm o potencial de liberar diversas moléculas que afetam quaisquer células adjacentes de diferentes maneiras. Desse modo, é fundamental que tanto as funções benéficas da astrogliose quanto seus efeitos prejudiciais sejam finamente regulados, por mecanismos de sinalização específica, o que representa alvo para potencial manipulação terapêutica (SOFRONIEW, 2015).

Estudos com camundongos transgênicos demonstram a importância da formação da cicatriz glial para a regulação temporal e espacial da inflamação após lesão no SNC (SOFRONIEW, 2005). Dentro da área demarcada pela cicatriz há uma resposta inflamatória robusta que se mantém isolada de tecidos neurais viáveis adjacentes, de maneira a viabilizar a resolução da inflamação rapidamente. Para evidenciar a importância dos astrócitos, camundongos transgênicos foram criados, promovendo a ablação gênica do GFAP, selecionando especificamente os astrócitos reativos após lesão ao SNC, considerando que a expressão desse gene é um dos marcadores de reatividade astrocitária (ESCARTIN et al., 2021; LIU et al., 2014; SOFRONIEW, 2005). Nos camundongos transgênicos as células não se organizam, não formam cicatriz que demarca o limite entre tecido danificado e tecido viável, e a inflamação se espalha por uma área grande e permanece sem ser resolvida por tempo prolongado após o dano inicial (BUSH et al., 1999; SOFRONIEW, 2005). Além disso, há evidências de que a ablação gênica de astrócitos reativos após lesão cerebral leva a edema tecidual local massivo, e que aumenta a degeneração tecidual tanto na substância cinzenta quanto na substância branca, aumentando a morte de neurônios e oligodendrócitos e aumentando a desmielinização (BUSH et al., 1999; SOFRONIEW, 2005). A nível de resultados funcionais, a ablação de astrócitos reativos previne a recuperação motora após dano leve ou moderado à medula espinal, transformando pequenas lesões com consequentes déficits motores leves em lesões com degeneração tecidual evidente e grave comprometimento da função motora (FAULKNER, 2004; SOFRONIEW, 2005).

Embora mudanças no conteúdo proteico de GFAP e nos níveis de sua expressão gênica sejam utilizados amplamente como marcadores de reatividade astrocitária em modelos animais de lesões e doenças e em análises de tecidos humanos *postmortem* (LIDDELOW; BARRES, 2017), marcadores melhores desse evento são necessários, havendo atualmente o consenso de que a análise de GFAP não é critério suficiente para qualificar astrócitos como reativos (ESCARTIN et al., 2021).

Neste estudo, demonstramos que a BCCAo provocou aumento da expressão gênica de GFAP no córtex e no hipocampo dos camundongos. Em concordância com a literatura, sugere-se que possíveis alterações nos astrócitos estejam acontecendo em resposta ao dano cerebral nas regiões estudadas. O tratamento com EHPp não alterou a expressão desse gene no hipocampo, mas preveniu seu aumento no córtex dos animais submetidos à isquemia global. Mudanças no microambiente local devem ser levadas em consideração para inferir sobre o remodelamento que ocorre nessas células e o possível fenótipo que estão adotando.

Pontua-se, portanto, que para orquestrar e implementar seus vários papéis e funções, os astrócitos respondem a uma grande variedade de moléculas sinalizadoras que derivam tanto de células neurais quanto de células não-neurais, por expressarem receptores em sua superfície celular para diversas citocinas, mediadores inflamatórios e fatores de crescimento, por exemplo (SOFRONIEW, 2014). Citocinas são proteínas que funcionam como moléculas sinalizadoras intercelulares envolvidas na regulação da inflamação e de respostas imunológicas. Vários estudos demonstraram que astrócitos exibem mudanças no perfil de transcrição em resposta a estimulação por diferentes citocinas e mediadores inflamatórios, tanto sozinhos quanto em combinação, pois essas células estão expostas a múltiplos mediadores simultaneamente (HAMBY et al., 2012; JOHN; LEE; BROSNAN, 2003; SOFRONIEW, 2014). Entre os principais efeitos do tratamento de astrócitos com determinados mediadores inflamatórios *in vitro*, em particular IL-1 β , TNF α , IFN γ ou LPS, está o achado de que muitos dos genes expressos mediante estimulação por esses são quimiocinas, citocinas ou fatores de crescimento, e análises por bioinformática indicam que muitas das vias ou conjunto de genes expressos são referentes a funções imunológicas ou inflamatórias (HAMBY et al., 2012; JOHN et al., 2005; MEEUWSEN et al., 2003; SOFRONIEW, 2014). É cada vez mais conhecido que astrócitos reativos adotam perfis moleculares distintos em diferentes modelos de doenças, em diferentes regiões cerebrais (SOFRONIEW, 2014). Estudos também sugerem que mudanças funcionais complexas acontecem, incluindo a aquisição de funções regenerativas (ITOH et al., 2018), proliferativas, e mesmo com propriedades de células tronco (SIRKO et al., 2015).

Na área de lesão pode-se encontrar micróglia com características morfológicas distintas: micróglia ramificada são normalmente encontradas em regiões com fluxo sanguíneo normal e micróglia ameboide são encontradas normalmente no núcleo isquêmico. São também encontradas células microgliais com poucas ou curtas ramificações, representando o estado de transição dessas células, no qual há ainda mudança em sua transcrição gênica e/ou função. Após

isquemia, a micróglia ativada pode produzir e ser influenciada por uma variedade de moléculas efetoras incluindo citocinas pró- e anti-inflamatórias e fatores de crescimento, além de ser afetada pelas células da região, como neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e células endoteliais (QIN et al., 2019). Estudos antigos tentaram classificar essas células em dois principais fenótipos, M1 e M2, entretanto, estudos recentes revelam que os estados polarizados da micróglia são mais diversos do que se pensava. O papel exato dessa polarização e suas contribuições relativas em todo o processo relacionado à lesão isquêmica ainda não está completamente elucidado, mas se sabe que essas células podem tanto promover dano quanto facilitar o reparo, dependendo dos sinais que recebem (QIN et al., 2019). Assim, sabendo-se que grande variedade de receptores estão presentes na micróglia e sua ativação por sinais imunológicos, neurotransmissores, neuropeptídeos e metabólitos orientam a transição dessas células para diferentes fenótipos e funções, encontrar moléculas que favoreçam a transição para fenótipos restauradores pode ser alvo para intervenção terapêutica (QIN et al., 2019; WANG et al., 2018).

Interessantemente, Silva e colaboradores (2017) demonstraram que o flavonoide rutina modula a ativação microglial, favorecendo fenótipo protetor. Esse grupo investigou o efeito da rutina em cultura de células microgliais, tanto no estado de repouso quanto ativada por LPS. A adição de rutina (50 μ M e 100 μ M) às culturas aumentou os níveis de IL10, reduziu os níveis de IL6 e TNF, reduziu a expressão gênica de IL1 β , TNF e IL6 e aumentou a expressão gênica de GDNF. Em seguida, os autores avaliaram alguns marcadores relacionados à ativação microglial (Iba1) e aos fenótipos pró-inflamatório (iNOS e CD68) e anti-inflamatório (CD150 e CD206) em presença de LPS. Os dados demonstraram que a adição de LPS às culturas aumentou a ativação microglial, favorecendo o fenótipo pró-inflamatório (aumento de Iba1, iNOS e CD68). A adição concomitante de rutina promoveu redução da ativação microglial (redução de Iba1) e favoreceu o fenótipo anti-inflamatório (aumento de CD150 e CD206, juntamente com redução de iNOS e CD68). Os autores discutem que a adição de rutina parece neutralizar os efeitos das citocinas pró-inflamatórias, limitando a inflamação presente. Além disso, destacam a importância de promover, *per se*, o aumento da expressão de GDNF, pois simulam que *in vivo* o tratamento com rutina poderia não apenas prover suporte trófico aos neurônios, mas também atuar de maneira autócrina, de maneira a manter o status anti-inflamatório da micróglia. Outro achado importante foi que a adição de rutina reduziu a

expressão de prostaglandina mesmo em presença do estímulo pelo LPS. Em conclusão, os autores sugerem que a rotina contribui para estabelecer um microambiente favorável a polarização para um fenótipo anti-inflamatório, o qual possui papéis cruciais na manutenção da homeostase e reparação tecidual.

No presente trabalho demonstrou-se também que o tratamento com EHPp atenuou a ativação microglial no córtex e no hipocampo de camundongos que sofreram isquemia cerebral, verificado através da diminuição da expressão gênica de Iba1. Considerando que, quando ativada, a micróglia libera uma variedade de mediadores inflamatórios e citotóxicos (KIM; KIM; YENARI, 2015), a redução observada do marcador de ativação microglial pode estar relacionada à redução da expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias TNF α e IL-1 β demonstrada também neste trabalho.

Muitos estudos mencionam TNF α e IL-1 β como as primeiras citocinas aumentadas após isquemia cerebral, o que as tornam importantes alvos terapêuticos. A liberação de citocinas inflamatórias por neurônios e glia leva à expressão de moléculas de adesão na vasculatura cerebral, tais como selectinas e integrinas, o que resulta na ruptura da barreira hematoencefálica e na formação de edema cerebral e, somando-se à secreção de proteases, levam a dano na matriz extracelular. A permeabilidade aumentada da BHE permite a entrada de leucócitos, proteases, imunoglobulinas e trombina ao SNC, facilitando o dano celular (DUGUE et al., 2017; LO; DALKARA; MOSKOWITZ, 2003).

A superfamília dos receptores à qual se liga o TNF α regula os processos de morte celular relacionada à caspase após lesão no SNC (LO; DALKARA; MOSKOWITZ, 2003). Essa citocina está envolvida diretamente na regulação da ativação microglial, assim como na sinalização glial e em sinapses glutamatérgicas (DUGUE et al., 2017). Há relatos de estudos que mostram marcação de TNF α em células apoptóticas no núcleo isquêmico e na região de penumbra nos primeiros dias após isquemia cerebral, se espalhando para regiões mais distais nos dias seguintes, e sendo também encontrada na circulação sanguínea (BOTCHKINA et al., 1997). Sabe-se que TNF α está aumentada localmente em astrócitos, micróglia, células do plexo coroide, células endoteliais e polimorfonucleares; neurônios expressam níveis máximos de TNF α em algumas horas após isquemia cerebral e são circundados por micróglia ativada (BOTCHKINA et al., 1997; DUGUE et al., 2017). Maiores níveis de TNF α estão geralmente relacionados a piores resultados em indivíduos que sofrem evento isquêmico. Camundongos modificados geneticamente para superexpressarem TNF α tem volumes maiores de área de

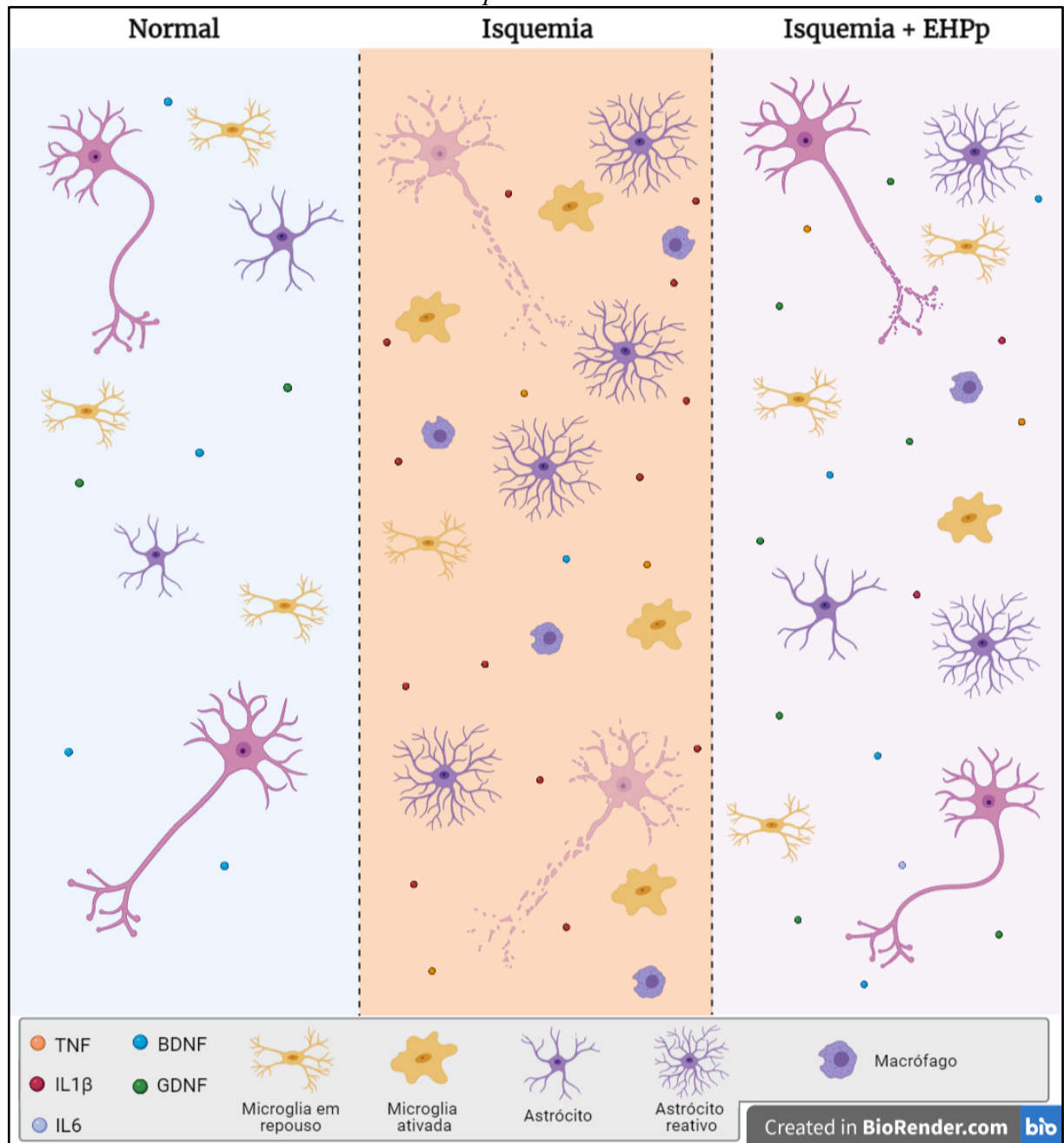
lesão, assim como maior número de células neuronais em apoptose (BECHER; SPATH; GOVERMAN, 2017; DUGUE et al., 2017; LAMBERTSEN; BIBER; FINSSEN, 2012; LO; DALKARA; MOSKOWITZ, 2003; PETTIGREW et al., 2008).

Semelhantemente ao TNF α , os níveis de IL-1 β e IL-6 estão elevados em pacientes com AVE grave (JAYARAJ et al., 2019). IL-1 β é um mediador essencial na resposta neuroinflamatória, sendo constitutivamente expresso no SNC e aumentado minutos após o dano. Caspase-1 é ativada e inicia uma cascata inflamatória envolvendo a clivagem de pró-IL-1 β em sua forma ativa. O potencial efeito deletério de IL-1 β na isquemia cerebral é evidenciado por estudos que demonstram que a inibição da caspase-1 diminui a área de lesão em roedores. A transcrição e a tradução de pró-IL-1 β são moduladas por moléculas que estão alteradas em resposta a lesão neuronal (DUGUE et al., 2017; LAMBERTSEN; BIBER; FINSSEN, 2012; ORMSTAD et al., 2011; SOBOWALE et al., 2016).

Ali e colaboradores (2000) demonstraram que durante isquemia cerebral e outras lesões relacionadas a excitotoxicidade, neurônios podem sintetizar e liberar IL-6 em resposta ao aumento da concentração intracelular de cálcio mediada pela ativação de receptores NMDA. Essa indução de IL-6 pode servir como mecanismo protetor endógeno, prevenindo neurônios da degeneração. Adicionalmente, não há evidências demonstrando que IL-6 desempenha papel nocivo em fases agudas de isquemia cerebral, mas controlando a inflamação por diminuir os níveis de citocinas pró- e aumentar as citocinas anti-inflamatórias (SUZUKI; TANAKA; SUZUKI, 2009). Por aumentar a expressão gênica dessa citocina no hipocampo de animais submetidos à BCCAO, esse mecanismo pode contribuir para o efeito neuroprotetor de *P. paniculata*.

Levando todas essas informações em consideração, juntamente com os dados obtidos neste trabalho, diz-se que a avaliação do potencial neuroprotetor do EHPp deve considerar as modificações que as moléculas contidas no extrato podem induzir no microambiente da isquemia cerebral global, o que inclui tanto neurônios quanto células gliais (figura 33).

Figura 33. Comparação entre o microambiente cerebral normal, afetado pela isquemia cerebral global e as modificações promovidas pelo tratamento com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata*.



Legenda: O tecido cerebral saudável é constituído por células neuronais e gliais, com a participação de moléculas que sinalizam a sobrevivência dessas células. Em presença de dano, moléculas pró-inflamatórias são produzidas, levando à modificação dessas células em resposta à lesão isquêmica. O tratamento com EHPp estimula a produção de fatores neurotróficos e reduz os níveis de citocinas pró-inflamatórias, criando um microambiente favorável à sobrevivência e regeneração.

De maneira geral, a oclusão bilateral das artérias carótidas comuns por 30 min aumentou a expressão das citocinas IL1β e TNFα, potentes moléculas na indução de processos

inflamatórios, as quais podem promover ativação e recrutamento de células que atuam na defesa do SNC. Não bastando, essas citocinas podem também ser liberadas por essas células, aumentando a inflamação local. Embora a inflamação seja fundamental para conter o dano e remover debris, é importante que seja um evento finamente controlado, diminuindo assim consequências nocivas ao tecido, que levariam a graves sequelas ao indivíduo acometido por essa doença. A redução dessas citocinas promovida pelo tratamento com EHPp iniciado 3h após a lesão contribui grandemente para atenuar os processos inflamatórios.

Em conjunto, observou-se redução da ativação microglial, células que, no início do evento, levam à ampliação da inflamação. Nossa análise foi realizada 48h após lesão e, considerando que o decurso temporal é essencial na resolução do processo, é essencial conter sua superativação no início do evento. É fundamental também que a regulação dessas células promova, em momentos mais tardios, a transição para um fenótipo anti-inflamatório.

Somando-se a esses achados, vimos que o tratamento com EHPp não altera a expressão gênica de GFAP no hipocampo. Infere-se que o processo de formação da cicatriz esteja ocorrendo, de maneira a evitar o espalhamento de mediadores tóxicos para o tecido saudável adjacente. No córtex, observamos redução de GFAP nos animais tratados com extrato, indicando que o remodelamento dos astrócitos aconteça de maneira diferente nessa região. Tendo em vista seu papel dual, é importante controlar finamente o processo de reatividade astrocitária da mesma forma que a ativação microglial, influenciando a expressão de moléculas que contribuam para um microambiente favorável à proteção e redução de morte celular, em que essas células assumam mais o fenótipo anti-inflamatório, em contrapartida ao fenótipo pró-inflamatório. Por isso a importância dos dados sobre aumento da produção de fatores neurotróficos promovido pelo tratamento com EHPp, os quais são mediadores que favorecem sobrevivência e regeneração.

Mais estudos são necessários para elucidar completamente o mecanismo pelo qual o EHPp exerce seu efeito protetor em modelos de isquemia cerebral, todavia inferimos que o extrato contribui na promoção do microambiente necessário para favorecer a transição das células gliais em um fenótipo protetor, além de atuar em múltiplos alvos.

Ademais, como descrito anteriormente, há evidências de que podem acontecer eventos modificadores diretamente na célula neuronal, como visto pela análise em culturas primárias de neurônios corticais, em que moléculas que promovem sobrevivência dessas células sejam

também produzidas, reduzindo assim sua morte por apoptose, visto que a coloração de Hoechst marca apoptose, e foi reduzida pela adição de EHPp em cultura.

Há evidências, também, sobre a atuação de moléculas do extrato em receptores cuja ativação aumenta a lesão isquêmica, como os receptores glutamatérgicos. Bloquear canais iônicos é um ponto de intervenção fundamental para impedir influxo de cálcio, por exemplo, que favorece diversas vias de sinalização que culminam em morte celular.

Foi demonstrado que a isquemia leva a degeneração de neurônios hipocâmpais, os quais são sensíveis a esse evento e que o tratamento com EHPp reduziu significativamente a degradação desse tecido.

Todos esses efeitos celulares e moleculares contribuíram para que os animais tratados com extrato após a lesão tivessem um desempenho melhor em avaliações comportamentais nas quais os animais não tratados apresentaram graves déficits. A diminuição de sequelas funcionais é fundamental para que uma intervenção terapêutica seja considerada bem-sucedida.

Dessa maneira, em um contexto em que não há terapias que protegem o tecido cerebral de maneira eficaz após isquemia e em que várias drogas falharam em estudos clínicos por provocarem efeitos adversos mais graves do que efeitos benéficos, o tratamento com extrato hidroalcoólico de *Polygala paniculata* pode vir a ser uma opção eficiente para uma intervenção terapêutica também em humanos.

A extrapolação da dose de animais para humanos deve levar em consideração parâmetros como a área de superfície corporal e farmacocinética para aumentar a segurança em ensaios clínicos. Existem diferentes métodos para calcular a dose equivalente em humanos (BAUMGARTNER et al., 2018). Assim, estima-se que a dose de 1 mg/kg, utilizada em camundongos, seria equivalente a 0,081 mg/kg em humanos. Considera-se, desse modo, que um adulto pesando aproximadamente 70 kg, deveria ingerir 5,7 mg da planta para obter o efeito. Entretanto, essa informação deve ser interpretada cautelosamente, devido a variação da farmacocinética e farmacodinâmica entre as espécies. Segundo a STAIR, a curva dose-resposta deve envolver diversos parâmetros, sendo avaliada após isquemia em diferentes espécies (FISHER et al., 2009).

São necessários, ainda, estudos que identifiquem métodos de obtenção sustentável dessa planta, levando em consideração a quantidade necessária para produção, sua disponibilidade e qualidade, de maneira a não causar grande impacto ambiental, preservando essa espécie.

É conhecido que a população brasileira utiliza plantas medicinais há bastante tempo. Por longo período os órgãos sanitários não se atentavam para a regulamentação desse uso apropriadamente. A implantação da Política Nacional de Plantas Medicinais (PNPM), em 2006, foi fundamental para a melhora da orientação dessa prática, tendo como objetivo “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (BRASIL, 2006). Esse decreto englobou ações que visavam ampliar as opções terapêuticas aos usuários do SUS, de maneira segura e eficaz, regulamentando a produção, a distribuição e o uso de plantas medicinais. Ademais, a promoção da pesquisa e do desenvolvimento de tecnologias e inovações foram garantidos, através da criação e do apoio a centros de pesquisa em fitoterapia e capacitação de profissionais, fortalecendo a indústria farmacêutica nacional nesse campo. Uma preocupação importante foi sobre o uso sustentável da biodiversidade. Neste sentido, é evidente que este trabalho contribui para o fortalecimento das Políticas Públicas relacionadas ao uso de plantas medicinais e Prática Integrativa Complementar em Saúde (PICs) (BRASIL, 2006) por apresentar resultados experimentais que indicam o potencial terapêutico da *P. paniculata* para condição e sintomas clínicos observados em pessoas acometidas por isquemia cerebral. Além de indicar, pelo menos em parte, os mecanismos neurobiológicos associado aos benefícios do uso do extrato da *P. paniculata* no modelo experimental de isquemia cerebral.

6 CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que:

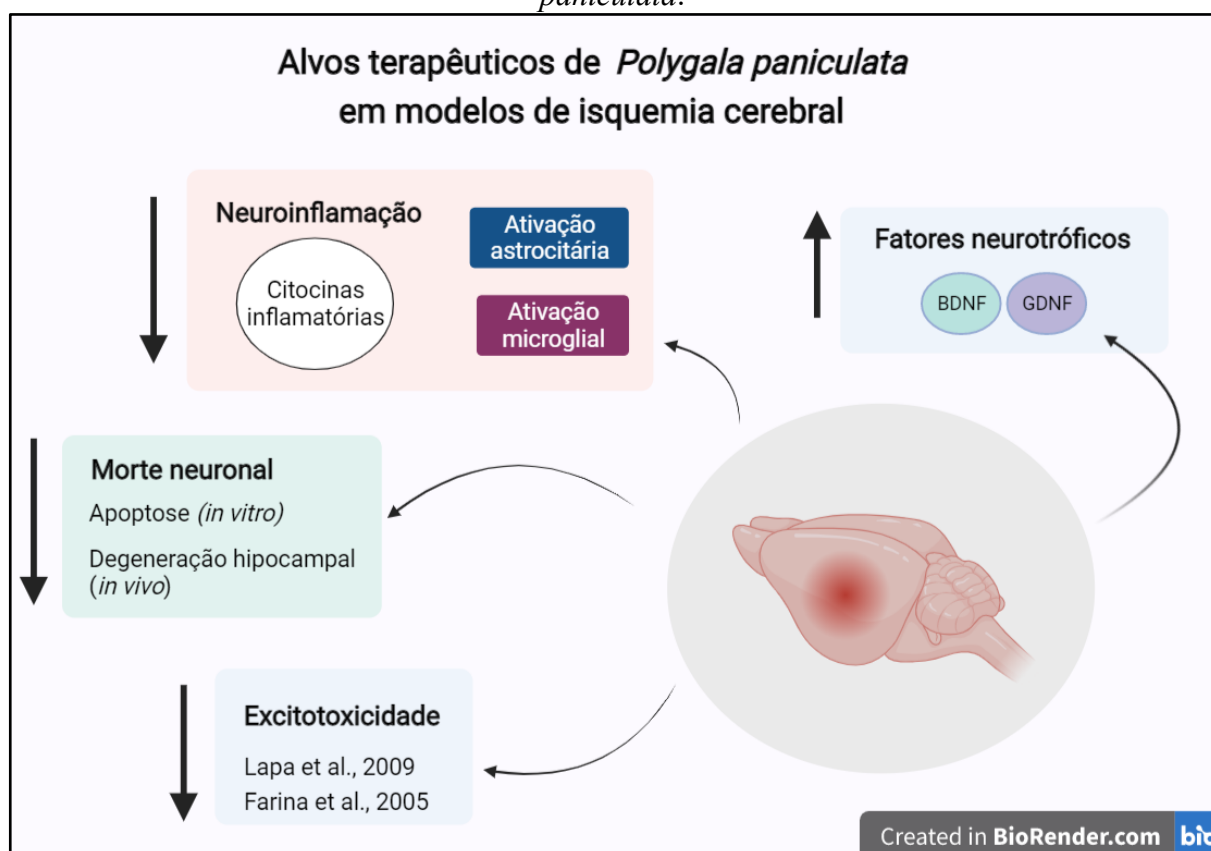
- a) A adição de extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* à cultura de neurônios corticais previne a apoptose dessas células em condições de privação de oxigênio e glicose.
- b) O tratamento com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* reduz os déficits motores e cognitivos desencadeados pela isquemia cerebral global em camundongos.
- c) O tratamento com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* ameniza o comportamento do tipo ansioso causado pela isquemia cerebral global em camundongos.
- d) A isquemia cerebral global provocou aumento da expressão gênica de GFAP no córtex e no hipocampo dos camundongos, indicando possíveis alterações nos astrócitos em resposta ao dano cerebral nessas regiões. O tratamento com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* não alterou a expressão desse gene no hipocampo, mas preveniu seu aumento no córtex de animais submetidos à BCCAO.
- e) A isquemia cerebral global provocou aumento da ativação microglial no córtex e no hipocampo dos camundongos. O tratamento com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* preveniu esse aumento em ambas as regiões.
- f) O tratamento com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* diminuiu a expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF α e IL-1 β no hipocampo dos camundongos, as quais estavam aumentadas nessa região após a lesão. No córtex, houve apenas aumento sutil da expressão dessas citocinas nos animais após lesão, embora não tenha sido estatisticamente significativo. A expressão de IL-6 não foi alterada no córtex dos animais; no hipocampo, todavia, houve aumento dessa citocina apenas em animais tratados com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* após isquemia.
- g) O tratamento com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* aumentou a expressão proteica de GDNF e BDNF no córtex dos animais submetidos à lesão isquêmica. No hipocampo, houve

aumento da expressão proteica de GDNF e da expressão gênica de BDNF nos animais tratados após isquemia cerebral global.

g) O tratamento com extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* diminuiu a morte de neurônios hipocampais após isquemia cerebral global em camundongos.

Em conjunto, nossos dados demonstram que o extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* promove a redução dos prejuízos motores, cognitivos e emocionais desencadeados pela isquemia cerebral global no modelo experimental em camundongos. O seu mecanismo de ação parece envolver a redução da neuroinflamação provocada pela lesão, através de redução da ativação microglial e redução da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias em áreas mais susceptíveis, como hipocampo e córtex; além de aumentar a expressão gênica e proteica de fatores neurotróficos reduzindo a degeneração hipocampal (figura 35). Esses achados fornecem evidências científicas que contribuem para a validação e valorização do potencial terapêutico da *Polygala paniculata* para condições de doenças com incidência e relevância mundial, como a isquemia cerebral.

Figura 34. Principais mecanismos de lesão isquêmica e possíveis interações de *Polygala paniculata*.



Legenda: Diferentes mecanismos são responsáveis pela lesão durante a isquemia cerebral. O extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* pode interferir em vários desses processos, promovendo melhora do quadro. O mecanismo de ação dessa planta parece ser dependente da redução da ativação de células gliais, redução da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, bem como do aumento da expressão de fatores neurotróficos. Fonte: criado pela autora através do Biorender.

REFERÊNCIAS

- ALI, C. et al. Ischemia-induced interleukin-6 as a potential endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor-mediated excitotoxicity in the brain. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 20, n. 6, p. 956–966, 2000.
- AMARO, S.; CHAMORRO, A. Translational stroke research of the combination of thrombolysis and antioxidant therapy. **Stroke**, v. 42, n. 5, p. 1495–1499, 2011.
- ANRATHER, J.; IADECOLA, C. Inflammation and Stroke: An Overview. **Neurotherapeutics**, v. 13, n. 4, p. 661–670, 2016.
- ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive Processing**, v. 13, n. 2, p. 93–110, 2012.
- AREAL, L. B. et al. Behavioural, biochemical and molecular changes induced by chronic crack-cocaine inhalation in mice: The role of dopaminergic and endocannabinoid systems in the prefrontal cortex. **Behavioural Brain Research**, v. 290, n. 1, p. 8–16, 2015.
- ÅSTRÖM, M. Generalized Anxiety Disorder in Stroke Patients. **Stroke**, v. 27, n. 2, p. 270–275, 1996.
- BACIGALUPPI, M.; COMI, G.; HERMANN, D. M. Animal Models of Ischemic Stroke. Part Two: Modeling Cerebral Ischemia. **The Open Neurology Journal**, v. 4, n. 1, p. 34–38, 2010.
- BALKAYA, M. et al. Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, v. 33, n. 3, p. 330–338, 2013.
- BARH, D. et al. In Silico Models: from networks to complex diseases. **Animal Biotechnology**, v. 21, p. 385–404, 2014.
- BARONE, F. C.; FEUERSTEIN, G. Z. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 19, n. 8, p. 819–834, 1999.
- BARROS, T. F. **Avaliação comportamental e bioquímica do efeito do extrato de *Polygala paniculata* na neuroinflamação induzida pelo modelo de transtorno de estresse pós-traumático em camundongos**. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2016.
- BATISTI, A. P. **Efeitos do extrato hidroalcoólico de *Polygala paniculata* L. sobre a regeneração funcional e morfológica em um modelo animal de lesão compressiva do nervo isquiático**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade do Sul de Santa Catarina. Florianópolis, 2018.
- BAUMGARTNER, P. et al. Sensorimotor stroke alters hippocampo-thalamic network activity. **Scientific Reports**, v. 8, n. 15770, p. 1–11, 2018.

BECERRA-CALIXTO, A.; CARDONA-GÓMEZ, G. P. The role of astrocytes in neuroprotection after brain stroke: potential in cell therapy. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, n. 88, p. 1–12, 2017.

BECHER, B.; SPATH, S.; GOVERMAN, J. Cytokine networks in neuroinflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 1, p. 49–59, 2017.

BENSENOR, I. M. et al. Prevalence of stroke and associated disability in Brazil: National Health Survey - 2013. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 73, n. 9, p. 746–750, 2015.

BEPPLER, L. M. **Efeito do extrato hidroalcoólico da planta *Polygala paniculata* no modelo de fibromialgia induzido pela reserpina em camundongos: avaliação sensorial e emocional**. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2018.

BERDOWSKI, J. et al. Global incidences of out-of-hospital cardiac arrest and survival rates: Systematic review of 67 prospective studies. **Resuscitation**, v. 81, n. 11, p. 1479–1487, 2010.

BETTIO, L. E. B. et al. Antidepressant-like effect of extract from *Polygala paniculata*: Involvement of the monoaminergic systems. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 12, p. 1277–1285, 2011.

BHOGAL, P. et al. Mechanical Thrombectomy—A Brief Review of a Revolutionary new Treatment for Thromboembolic Stroke. **Clinical Neuroradiology**, v. 28, n. 3, p. 313–326, 2018.

BOEHME, A. K.; ESENWA, C.; ELKIND, M. S. V. Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention. **Circulation Research**, v. 120, n. 3, p. 472–495, 2017.

BOTCHKINA, G. I. et al. Expression of TNF and TNF receptors (p55 and p75) in the rat brain after focal cerebral ischemia. **Molecular Medicine**, v. 3, n. 11, p. 765–781, 1997.

BOYCE, L. W. et al. Out-of-hospital cardiac arrest survivors need both cardiological and neurological rehabilitation! **Current Opinion in Critical Care**, v. 25, n. 3, p. 240–243, 2019.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. - Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília.

BROUGHTON, B. R. S.; REUTENS, D. C.; SOBEY, C. G. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. **Stroke**, v. 40, n. 5, 2009.

BROUNS, R.; DE DEYN, P. P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 111, n. 6, p. 483–495, 2009.

BUSH, T. G. et al. Leukocyte Infiltration, Neuronal Degeneration, and Neurite Outgrowth after Ablation of Scar-Forming, Reactive Astrocytes in Adult Transgenic Mice. **Neuron**, v. 23, n. 2, p. 297–308, 1999.

CAMPBELL, B. C. V. et al. Ischaemic stroke. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 70, 2019.

CAMPBELL, B. C. V.; KHATRI, P. Stroke. **The Lancet**, v. 396, n. 10244, p. 129–142, 2020.

CARMICHAEL, S. T. Rodent models of focal stroke: Size, mechanism, and purpose. **NeuroRX**, v. 2, n. 3, p. 396–409, 2005.

CHAMORRO, Á. et al. The immunology of acute stroke. **Nature Reviews Neurology**, v. 8, n. 7, p. 401–410, 2012.

CHOI, D. W. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. **Trends in neurosciences**, v. 18, n. 2, p. 58–60, 1995.

CHOI, D. W. Excitotoxicity: Still Hammering the Ischemic Brain in 2020. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, p. 1–27, 2020.

CHUN, H. Y. Y. et al. Anxiety after stroke the importance of subtyping. **Stroke**, v. 49, n. 3, p. 556–564, 2018.

CHUNG, I.-W. et al. Behavioural pharmacology of polygalasaponins indicates potential antipsychotic efficacy. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 71, n. 1–2, p. 191–195, 2002.

CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 13, n. 2, p. 167–170, 1980.

CREGAN, S. P. et al. Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. **Journal of Cell Biology**, v. 158, n. 3, p. 507–517, 2002.

CRISTIANO, R. et al. Two Xanthones from *Polygala paniculata* and Confirmation of the 1-Hydroxy- 2,3,5-trimethoxy-xanthone at Trace Level by HRGC-MS. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 58, n. 7–8, p. 490–494, 2003.

CROWLEY, L. C.; MARFELL, B. J.; WATERHOUSE, N. J. Analyzing cell death by nuclear staining with Hoechst 33342. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 1, n. 9, p. 778–781, 2016.

CRUPI, R.; IMPELLIZZERI, D.; CUZZOCREA, S. Role of Metabotropic Glutamate Receptors in Neurological Disorders. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, n. 20, p. 1–11, 2019.

DALL'ACQUA, S. et al. Cytotoxic Compounds from *Polygala vulgaris*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 11, 2002.

DE SANTANA, N. M. et al. The burden of stroke in Brazil in 2016: An analysis of the Global Burden of Disease study findings. **BMC Research Notes**, v. 11, n. 735, p. 2–5, 2018.

DESBÈNE, S. et al. Biologically Active Triterpene Saponins from Callus Tissue of *Polygala marella*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 6, p. 923–926, 1999.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends in Neurosciences**, v. 22, n. 9, p. 391–397, 1999.

DUARTE, F. S. et al. Psychopharmacological effects and safety of styryl-2-pyrones and dihydrostyryl-2-pyrones-rich fraction from *Polygala sabulosa*: absence of withdrawal syndrome and tolerance to anxiolytic-like and anticonvulsant effects. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 9, p. 1272–1286, 2018.

DUGUE, R. et al. Roles of pro- and anti-inflammatory cytokines in traumatic brain injury and acute ischemic stroke. **Intech**, 2017.

DURUKAN, A.; TATLISUMAK, T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 87, n. 1, p. 179–197, 2007.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.

EL SAYAH, M. et al. *In vitro* effect of the extract and the 1,7-dihydroxy-2,3-dimethoxy xanthone from *Polygala cyparissias* on the contractions induced by inflammatory mediators and ovalbumin in normal and actively sensitised trachea from guinea pig. **Inflammation Research**, v. 48, n. 4, p. 218–223, 1999.

ENOMOTO, M. et al. Clinical Effects of Early Edoxaban Use in Acute Ischemic Stroke Patients Treated by Endovascular Reperfusion Therapy. **Stroke**, v. 50, n. 3, p. 652–658, 2019.

ESCARTIN, C. et al. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. **Nature Neuroscience**, v. 24, n. 1, p. 312–325, 2021.

ESCOBAR, I. et al. Altered Neural Networks in the Papez Circuit: Implications for Cognitive Dysfunction after Cerebral Ischemia. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 67, n. 2, p. 425–446, 2019.

ESTRADA, A. et al. Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 27–43, 2000.

FARINA, M. et al. Protective effects of *Polygala paniculata* extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 57, n. 11, p. 1503–8, 2005.

FAULKNER, J. R. Reactive Astrocytes Protect Tissue and Preserve Function after Spinal Cord Injury. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 9, p. 2143–2155, 2004.

FEIGIN, V. L.; NORRVING, B.; MENSAH, G. A. Global burden of stroke. **Circulation Research**, v. 120, n. 3, p. 439–448, 2017.

FISHER, M. et al. Update of the Stroke Therapy Academic Industry Roundtable Preclinical Recommendations. **Stroke**, v. 40, n. 6, p. 2244–2250, 2009.

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. 750–758, 2011.

FONAROW, G. C. et al. Door-to-Needle Times for Tissue Plasminogen Activator Administration and Clinical Outcomes in Acute Ischemic Stroke Before and After a Quality Improvement Initiative. **JAMA**, v. 311, n. 16, p. 1632, 2014.

FOWLER, S. C. et al. Motor and associative deficits in D2 dopamine receptor knockout mice. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 20, p. 309–321, 2002.

FRANCO, J. L. et al. Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain mitochondria: Protective effects of quercetin. **Chemical Research in Toxicology**, v. 20, n. 12, p. 1919–1926, 2007.

GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A. K. The pharmacological potential of rutin. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 2, p. 149–164, 2017.

GENTRY, A. H. A field guide to the families and genera of woody plants of northwest south America (Colombia, Ecuador e Peru). **Chicago: The University of Chicago Press**, p. 689–693, 1996.

GEORGE, P. M.; STEINBERG, G. K. Novel Stroke Therapeutics: Unraveling Stroke Pathophysiology and Its Impact on Clinical Treatments. **Neuron**, v. 87, n. 2, p. 297–309, 2015.

GINSBERG, M. D. Neuroprotection for ischemic stroke: Past, present and future. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 363–389, 2008.

GONÇALVES, L. V. et al. Environmental enrichment cognitive neuroprotection in an experimental model of cerebral ischemia: biochemical and molecular aspects. **Behavioural Brain Research**, v. 348, p. 171–183, 2018.

GRAVES, J. R. et al. Survivors of out of hospital cardiac arrest: Their prognosis, longevity and functional status. **Resuscitation**, v. 35, n. 2, p. 117–121, 1997.

GUIRAO, V. et al. Specific rescue by ortho-hydroxy atorvastatin of cortical GABAergic neurons from previous oxygen/glucose deprivation: role of pCREB. **Journal of Neurochemistry**, v. 143, n. 3, p. 359–374, 2017.

HAMBY, M. E. et al. Inflammatory Mediators Alter the Astrocyte Transcriptome and Calcium Signaling Elicited by Multiple G-Protein-Coupled Receptors. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 42, p. 14489–14510, 2012.

HARUKUNI, I.; BHARDWAJ, A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. **Neurologic Clinics**, v. 24, n. 1, p. 1–21, 2006.

HEISS, W. D. Ischemic penumbra: Evidence from functional imaging in man. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 20, n. 9, p. 1276–1293, 2000.

HESHMATOLLAH, A. et al. Cognitive and physical impairment and the risk of stroke – A prospective cohort study. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 2020.

HOLLOWAY, P. M. et al. Modeling ischemic stroke in vitro: status quo and future perspectives. **Stroke**, v. 47, n. 2, p. 561–569, 2016.

HORINOUCI, C. D. D. S. et al. *Combretum leprosum* Mart. (*Combretaceae*): potential as an antiproliferative and anti-inflammatory agent. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 311–319, 2013.

HUANG, J.; UPADHYAY, U. M.; TAMARGO, R. J. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. **Surgical Neurology**, v. 66, n. 3, p. 232–245, 2006.

IADECOLA, C.; ANRATHER, J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. **Nature Medicine**, v. 17, n. 7, p. 796–808, 2011.

ITOH, N. et al. Cell-specific and region-specific transcriptomics in the multiple sclerosis model: Focus on astrocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 2, p. E302–E309, 2018.

JANG, J. W. et al. Rutin improves functional outcome via reducing the elevated matrix metalloproteinase-9 level in a photothrombotic focal ischemic model of rats. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 339, n. 1–2, p. 75–80, 2014.

JAYARAJ, R. L. et al. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke. **Journal of Neuroinflammation**, v. 16, n. 142, p. 1–24, 2019.

JIN, R.; YANG, G.; LI, G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. **Journal of leukocyte biology**, v. 87, n. 5, p. 779–789, 2010.

- JOHANN, S. et al. Antifungal activity of five species of *Polygala*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1065–1075, 2011.
- JOHN, G. R. et al. IL-1-regulated responses in astrocytes: Relevance to injury and recovery. **Glia**, v. 49, n. 2, p. 161–176, 2005.
- JOHN, G. R.; LEE, S. C.; BROSNAN, C. F. Cytokines: Powerful Regulators of Glial Cell Activation. **The Neuroscientist**, v. 9, n. 1, p. 10–22, 2003.
- JOHNSON, W. et al. Stroke: a global response is needed. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 9, p. 634– 634A, 2016.
- JUNG, S. et al. Relevance of the cerebral collateral circulation in ischaemic stroke: time is brain, but collaterals set the pace. **Swiss medical weekly**, v. 147, p. w14538, 2017.
- JURIĆ, S. et al. The enhancement of plant secondary metabolites content in *Lactuca sativa* L. by encapsulated bioactive agents. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 3737, 2020.
- KALARIA, R. N.; AKINYEMI, R.; IHARA, M. Stroke injury, cognitive impairment and vascular dementia. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1862, n. 5, p. 915–925, 2016.
- KEW, J. N. C.; KEMP, J. A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology**, v. 179, n. 1, p. 4–29, 2005.
- KIEWERT, C. et al. Metabolic and transmitter changes in core and penumbra after middle cerebral artery occlusion in mice. **Brain Research**, v. 1312, p. 101–107, 2010.
- KIKUCHI, K. et al. Edaravone: A new therapeutic approach for the treatment of acute stroke. **Medical Hypotheses**, v. 75, n. 6, p. 583–585, 2010.
- KIKUCHI, K. et al. The efficacy of edaravone (Radicut), a free radical scavenger, for cardiovascular disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 7, p. 13909–13930, 2013.
- KIKUCHI, K. et al. Clinical trials in acute ischemic stroke. **CNS Drugs**, v. 28, n. 10, p. 929–938, 2014.
- KIKUCHI, K. et al. Edaravone, a synthetic free radical scavenger, enhances alteplase-mediated thrombolysis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, n. 6873281, p. 1–14, 2017.
- KIM, J. Y. et al. Inflammation after Ischemic stroke: The role of leukocytes and glial cells. **Experimental Neurobiology**, v. 25, n. 5, p. 241–251, 2016.

KIM, J.-Y.; KIM, N.; YENARI, M. A. Mechanisms and Potential Therapeutic Applications of Microglial Activation after Brain Injury. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 21, n. 4, p. 309–319, 2015.

KIM, Y.-O. et al. Protective effects of *Polygala tenuifolia* on ischemia-induced 4 vessel occlusion in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, n. 5, p. 564–568, 2008.

KIMURA, M.; TATENO, A.; ROBINSON, R. G. Treatment of poststroke generalized anxiety disorder comorbid with poststroke depression: Merged analysis of nortriptyline trials. **American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 11, n. 3, p. 320–327, 2003.

KNAPP, P. et al. Frequency of anxiety after stroke: An updated systematic review and meta-analysis of observational studies. **International Journal of Stroke**, v. 15, n. 3, p. 244–255, 24 abr. 2020.

KOH, S. H.; PARK, H. H. Neurogenesis in Stroke Recovery. **Translational Stroke Research**, v. 8, n. 1, p. 3–13, 2017.

KONDURI, P. R. et al. In-Silico Trials for Treatment of Acute Ischemic Stroke. **Frontiers in Neurology**, v. 11, 2020.

KREUTZBERG, G. W. Microglia: A sensor for pathological events in the CNS. **Trends in Neurosciences**, v. 19, n. 8, p. 312–318, 1996.

KÜLKENS, S.; HACKE, W. Thrombolysis with alteplase for acute ischemic stroke: review of SITS-MOST and other phase IV studies. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 7, n. 7, p. 783–788, 2007.

KWON, O. Y. The changes in cardiopulmonary resuscitation guidelines: From 2000 to the present. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 15, n. 6, p. 738–746, 2019.

LACAILLE-DUBOIS, M.-A.; DELAUDE, C.; MITAINE-OFFER, A.-C. A review on the phytopharmacological studies of the genus *Polygala*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 249, p. 112417, 2020.

LAMBERTSEN, K. L.; BIBER, K.; FINSEN, B. Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 32, n. 9, p. 1677–1698, 2012.

LAPA, F. DA R. **Avaliação da atividade antinociceptiva, antiinflamatória e protetora gástrica do extrato hidroalcoólico bruto da *Polygala paniculata* L.** Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2006.

LAPA, F. DA R. et al. Gastroprotective activity of the hydroalcoholic extract obtained from *Polygala paniculata* L. in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 10, p. 1413–1419, 2007.

LAPA, F. DA R. et al. Antinociceptive Properties of the Hydroalcoholic Extract and the Flavonoid Rutin Obtained from *Polygala paniculata* L. in Mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 104, n. 4, p. 306–315, 2009.

LAPA, F. R. et al. Vasorelaxant and hypotensive effects of the extract and the isolated flavonoid rutin obtained from *Polygala paniculata* L. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 6, p. 875–881, 2011.

LAPCHAK, P. A. A critical assessment of Edoxaban acute ischemic stroke efficacy trials: is Edoxaban an effective neuroprotective therapy? **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 11, n. 10, p. 1753–1763, 2010.

LEE, B. et al. *Polygala tenuifolia* prevents anxiety-like behaviors in mice exposed to repeated restraint stress. **Animal Cells and Systems**, v. 19, n. 1, p. 1–7, 2015.

LEE, D. H. et al. Imaging of the ischemic penumbra in acute stroke. **Korean Journal of Radiology**, v. 6, n. 2, p. 64–74, 2005.

LEE, H. J. et al. *Polygalae Radix* extract protects cultured rat granule cells against damage induced by NMDA. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 32, n. 4, p. 599–610, 2004.

LEE, J.-Y. et al. Effects of BT-11 on memory in healthy humans. **Neuroscience Letters**, v. 454, n. 2, p. 111–114, 2009.

LEGER, M. et al. Object recognition test in mice. **Nature Protocols**, v. 8, n. 12, p. 2531–2537, 2013.

LEITE, P. M.; CAMARGOS, L. M.; CASTILHO, R. O. Recent progress in phytotherapy: A Brazilian perspective. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 41, n. August 2020, p. 101270, 2021.

LEPPÄVUORI, A. et al. Generalized anxiety disorders three to four months after ischemic stroke. **Cerebrovascular Diseases**, v. 16, n. 3, p. 257–264, 2003.

LI, W. et al. Anxiety in patients with acute ischemic stroke: Risk factors and effects on functional status. **Frontiers in Psychiatry**, v. 10, n. APR, 2019.

LIDDELOW, S. A. et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. **Nature**, v. 541, n. 7638, p. 481–487, 2017.

LIDDELOW, S. A.; BARRES, B. A. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. **Immunity**, v. 46, n. 6, jun. 2017.

LIM, C. et al. The neurological and cognitive sequelae of cardiac arrest. **Neurology**, v. 63, n. 10, p. 1774–1778, 2004.

LIU, H. et al. Rutin attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury in ovariectomized rats via estrogen-receptor-mediated BDNF-TrkB and NGF-TrkA signaling. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 96, n. 5, p. 672–681, 2018.

LIU, Z. et al. Beneficial effects of gfap/vimentin reactive astrocytes for axonal remodeling and motor behavioral recovery in mice after stroke. **Glia**, v. 62, n. 12, p. 2022–2033, 2014.

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

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP, 2002.

LOTUFO, P. A. Stroke is still a neglected disease in Brazil. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 133, n. 6, p. 457–459, 2015.

LU, J.; MANAENKO, A.; HU, Q. Targeting Adult Neurogenesis for Poststroke Therapy. **Stem Cells International**, v. 2017, n. 5868632, p. 1–10, 2017.

LÜDTKE, R.; SOUZA-CHIES, T. T. DE; MIOTTO, S. T. S. O gênero *Polygala* L. (*Polygalaceae*) na região Sul do Brasil. **Hoehnea**, v. 40, n. 1, p. 1–50, 2013.

MAK, N. K. et al. Expression of Protein Kinase C Isoforms in Euxanthone-Induced Differentiation of Neuroblastoma Cells. **Planta Medica**, v. 67, n. 5, 2001.

MARQUES, B. L. et al. The role of neurogenesis in neurorepair after ischemic stroke. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 9, p. 98–110, 2019.

MARTINS, S. C. O. et al. Past, present, and future of stroke in middle-income countries: The Brazilian experience. **International Journal of Stroke**, v. 8, n. 100 A, p. 106–111, 2013.

MARTINS-SILVA, C. et al. *Polygala sabulosa* A.W. Bennett extract mitigates motor and cognitive deficits in a mouse model of acute ischemia. **Metabolic Brain Disease**, v. 36, n. 3, p. 453–462, 2021.

MEEUWSEN, S. et al. Cytokine, chemokine and growth factor gene profiling of cultured human astrocytes after exposure to proinflammatory stimuli. **Glia**, v. 43, n. 3, p. 243–253, 2003.

MICIELI, G.; MARCHESELLI, S.; TOSI, P. A. Safety and efficacy of alteplase in the treatment of acute ischemic stroke. **Vascular Health and Risk Management**, v. 5, p. 397–409, 2009.

MIFSUD, G. et al. Oligodendrocyte pathophysiology and treatment strategies in cerebral ischemia. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 20, n. 7, p. 603–612, 2014.

MISSAU, F. C. **Estudo das propriedades químicas, estruturais e biológicas das espécies *Polygala paniculata* e *Polygala pulchella***. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2008.

MORAES, L. S. et al. Medicinal plant *Combretum leprosum* Mart ameliorates motor, biochemical and molecular alterations in a Parkinson's disease model induced by MPTP. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 185, p. 68–76, 2016.

MORI, M. A. et al. Cannabidiol reduces neuroinflammation and promotes neuroplasticity and functional recovery after brain ischemia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 75, p. 94–105, 2017.

MOULAERT, V. et al. Determinants of quality of life in survivors of cardiac arrest. **Journal of Rehabilitation Medicine**, v. 42, n. 6, p. 553–558, 2010.

NABER, D.; BULLINGER, M. Psychiatric sequelae of cardiac arrest. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 20, n. 1, p. 73–77, 2018.

NAGAHARA, A. H.; TUSZYNSKI, M. H. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 3, p. 209–219, 2011.

NAKASHIMA, M. N. et al. Possible Role of Nitric Oxide in Anxiety Following Transient Cerebral Ischemia in Mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 91, n. 1, p. 47–52, 2003.

NEIGH, G. N. et al. Anxiety After Cardiac Arrest/Cardiopulmonary Resuscitation. **Stroke**, v. 40, n. 11, p. 3601–3607, 2009.

NEUHAUS, A. A. et al. Neuroprotection in stroke: The importance of collaboration and reproducibility. **Brain**, v. 140, n. 8, p. 2079–2092, 2017.

NISWENDER, C. M.; CONN, P. J. Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 50, n. 1, p. 295–322, 2010.

NOGUEIRA, F. L. P. et al. Atividade analgésica e antiedematogênica de *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) selvagem e obtida por micropropagação. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 310–315, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **The top 10 causes of death**. Geneva: WHO, 2020.

ORMSTAD, H. et al. Serum levels of cytokines and C-reactive protein in acute ischemic stroke patients, and their relationship to stroke lateralization, type, and infarct volume. **Journal of Neurology**, v. 258, n. 4, p. 677–685, 2011.

PARK, C. H. et al. Novel cognitive improving and neuroprotective activities of *Polygala tenuifolia* Willdenow extract, BT-11. **Journal of Neuroscience Research**, v. 70, n. 3, p. 484–492, 2002.

PARK, J.-H. H. et al. Effect of *Polygala tenuifolia* root extract on cerebral ischemia and reperfusion. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 34, n. 1, p. 115–123, 2006.

PETTIGREW, L. C. et al. Focal cerebral ischemia in the TNFalpha-transgenic rat. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, n. 47, p. 1–19, 2008.

PIZZOLATTI, M. G. et al. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. **Phytomedicine**, v. 10, n. 5, p. 422–426, 2003.

Polygala in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB20566>>. Acesso em 15/06/2021.

PONTES-NETO, O. M. et al. Stroke awareness in Brazil: Alarming results in a community-based study. **Stroke**, v. 39, n. 2, p. 292–296, 2008.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D. **Neuroscience. Glutamate receptors**. 2ª ed. Sunderland, EUA.: Sinauer Associates, 2001.

QIN, C. et al. Dual Functions of Microglia in Ischemic Stroke. **Neuroscience Bulletin**, v. 35, n. 5, p. 921–933, 2019.

RAJAH, G. B.; DING, Y. Experimental neuroprotection in ischemic stroke: A concise review. **Neurosurgical Focus**, v. 42, n. 4, p. 1–8, 2017.

Reflora. Herbário Virtual. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/ConsultaPublicoHVUC/ConsultaPublicoHVUC.do?idTestemunho=3185327>. Acesso em 15/06/2021

REIS, C. et al. Pathophysiology and the monitoring methods for cardiac arrest associated brain injury. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, 2017.

RISTO, O.; LIFE, A. Neuropsychological sequelae of cardiac arrest. **JAMA**, v. 269, p. 237–242, 1993.

ROCHA, S. I. M. **Doença Cerebrovascular Isquêmica Aguda: Avaliação de Protocolo de Trombólise**. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) – Faculdade e Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior. Covilhã, 2008.

RODRIGUES, A. M. G. et al. Therapeutic potential of treatment with the flavonoid rutin after cortical focal ischemia in rats. **Brain Research**, v. 1503, p. 53–61, 2013.

SANTA CATARINA. Secretaria de Estado da Saúde. Risco de AVC é reduzido com prevenção e atividade física. Florianópolis, SC, 2020.
Disponível em <<https://www.saude.sc.gov.br/index.php/noticias-geral/11747-risco-de-avc-e-reduzido-com-prevencao-e-atividade-fisica>>. Acesso em 01 de abril de 2021.

SAVITZ, S. I. et al. Reconsidering Neuroprotection in the Reperfusion Era. **Stroke**, v. 48, n. 12, p. 3413–3419, 2017.

- SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 96, p. 1–6, 2015.
- SILVA, A.B. et al. The flavonoid rutin modulates microglial/macrophage activation to a CD150/CD206 M2 phenotype. **Chemico-Biological Interactions**, v. 274, p. 89–99, 2017.
- SILVA, G. S. et al. Stroke Care Services in Brazil. **Journal of Stroke Medicine**, v. 1, n. 1, p. 51–54, 2018.
- SIRKO, S. et al. Astrocyte reactivity after brain injury—: The role of galectins 1 and 3. **Glia**, v. 63, n. 12, p. 2340–2361, 2015.
- SOARES, L. M. et al. Cognitive impairment and persistent anxiety-related responses following bilateral common carotid artery occlusion in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 249, p. 28–37, 2013.
- SOBOWALE, O. A. et al. Interleukin-1 in Stroke. **Stroke**, v. 47, n. 8, p. 2160–2167, 2016.
- SOFRONIEW, M. V. Reactive Astrocytes in Neural Repair and Protection. **The Neuroscientist**, v. 11, n. 5, p. 400–407, 2005.
- SOFRONIEW, M. V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 12, p. 638–647, 2009.
- SOFRONIEW, M. V. Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators. **Neuroscientist**, v. 20, n. 2, p. 160–172, 2014.
- SOFRONIEW, M. V. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 5, p. 249–263, 2015.
- SOMMER, C. J. Ischemic stroke: experimental models and reality. **Acta Neuropathologica**, v. 133, n. 2, p. 245–261, 2017.
- STAIR. Recommendations for Standards Regarding Preclinical Neuroprotective and Restorative Drug Development Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR). **Stroke**, v. 30, p. 2752–2758, 1999.
- STAMENOVA, V. et al. Long-term effects of brief hypoxia due to cardiac arrest: Hippocampal reductions and memory deficits. **Resuscitation**, v. 126, p. 65–71, 2018.
- SULZGRUBER, P. et al. Survivors of cardiac arrest with good neurological outcome show considerable impairments of memory functioning. **Resuscitation**, v. 88, p. 120–125, 2015.
- SUTHERLAND, B. A. et al. Neuroprotection for Ischaemic Stroke: Translation from the Bench to the Bedside. **International Journal of Stroke**, v. 7, n. 5, p. 407–418, 2012.

SUZUKI, S.; TANAKA, K.; SUZUKI, N. Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: Inflammatory versus neurotrophic aspects. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 29, n. 3, p. 464–479, 2009.

TANG, W. K. et al. Frontal Infarcts and Anxiety in Stroke. **Stroke**, v. 43, n. 5, 2012.

TASCA, C. I.; DAL-CIM, T.; CIMAROSTI, H. In Vitro Oxygen-Glucose Deprivation to Study Ischemic Cell Death. In: LOSSI, L.; MERIGHI, A. (Eds.). **Methods in Molecular Biology**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2015. v. 1254p. 197–210.

Tempo Porta-Agulha AVCI. **Hospital Israelita Albert Einstein**, 2018. Disponível em: <<https://www.einstein.br/especialidades/neurologia/conheca-neurologia/indicadores-qualidade/tempo-porta-agulha-avci/>>. Acesso em: 28 de abril de 2021.

TIWARI, R.; RANA, C. S. Plant secondary metabolites: a review. **International Journal of Engineering Research and General Science**, v. 3, n. 5, 2015.

TIZZIANI, T. et al. Antitumor screening of crude extracts of ten medicinal plants of *Polygala* genus from Southern Brazil. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 10, p. 79–83, 2017.

TOBIN, M. K. et al. Neurogenesis and inflammation after ischemic stroke: what is known and where we go from here. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, v. 34, n. 10, p. 1573–1584, 2014.

VICENTINI, J. E. et al. Depression and anxiety symptoms are associated to disruption of default mode network in subacute ischemic stroke. **Brain Imaging and Behavior**, v. 11, n. 6, p. 1571–1580, 2017.

VIJAYAN, M.; REDDY, P. H. Stroke and vascular dementia and Alzheimer's Disease - molecular links. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 54, n. 2, p. 427–443, 2016.

WAHUL, A. B. et al. Transient global cerebral ischemia differentially affects cortex, striatum and hippocampus in Bilateral Common Carotid Arterial occlusion (BCCAO) mouse model. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 92, n. 1, p. 1–15, 2018.

WANG, J. et al. Treatment targets for M2 microglia polarization in ischemic stroke. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 105, p. 518–525, 2018.

WANG-FISCHER, Y. **Manual of stroke models in rats**. [s.l.] CRC Press, 2008.

WEILINGER, N. L. et al. Ionotropic receptors and ion channels in ischemic neuronal death and dysfunction. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 1, p. 39–48, 2013.

WONG, A.; MOK, V. Stroke: Poststroke cognitive impairment - What are we measuring? **Nature Reviews Neurology**, v. 11, n. 9, p. 487–488, 2015.

XIAN, Y. et al. Strategies Used by Hospitals to Improve Speed of Tissue-Type Plasminogen Activator Treatment in Acute Ischemic Stroke. **Stroke**, v. 45, n. 5, p. 1387–1395, 2014.

XIE, W. et al. Polygalasaponin F inhibits neuronal apoptosis induced by oxygen-glucose deprivation and reoxygenation through the PI3K/Akt pathway. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 127, n. 3, p. 196–204, 2020.

XU, S. et al. Glial Cells: Role of the Immune Response in Ischemic Stroke. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. February, p. 1–16, 2020.

YAN, S. et al. The global survival rate among adult out-of-hospital cardiac arrest patients who received cardiopulmonary resuscitation: A systematic review and meta-analysis. **Critical Care**, v. 24, n. 1, p. 8–13, 2020.

ZHANG, R. L.; ZHANG, Z. G.; CHOPP, M. Neurogenesis in the adult ischemic brain: Generation, migration, survival, and restorative therapy. **Neuroscientist**, v. 11, n. 5, p. 408–416, 2005.

ZHENG, Z.; YENARI, M. A. Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications. **Neurological Research**, v. 26, n. 8, p. 884–892, 2004.

ZHOU, Z. et al. Advances in stroke pharmacology. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 191, p. 23–42, 2018.