



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
FACULDADE DE MEDICINA

AMANDA SILVA DA SILVA

EFEITOS NEUROPROTETORES DO EXTRATO SUPERCRÍTICO DE *PIPER  
DIVARICATUM* EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA CORTICAL  
EM RATOS ADULTOS

Belém – Pará

2019

AMANDA SILVA DA SILVA

EFEITOS NEUROPROTETORES DO EXTRATO SUPERCRÍTICO DE *PIPER  
DIVARICATUM* EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA CORTICAL  
EM RATOS ADULTOS

Trabalho de Conclusão de Curso enviado ao  
colegiado de Medicina para como requisito parcial  
para obtenção da graduação em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Wallace Gomes Leal

Co-Orientador: MSc Michelle Nerissa Coelho Dias

Belém – Pará

2019

AMANDA SILVA DA SILVA

EFEITOS NEUROPROTETORES DO EXTRATO SUPERCRÍTICO DE *PIPER  
DIVARICATUM* EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA CORTICAL  
EM RATOS ADULTOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do grau em Medicina  
pela Universidade Federal do Pará.

Banca examinadora:

---

Orientador: Prof Dr. Wallace Gomes Leal

---

Co-orientador Msc. Michelle Nerissa Coelho Dias

---

Prof. Msc. Ijair Rogério Costa dos Santos/Faculdade Cosmopolita

---

Prof. Msc. Romulo Augusto Feio Farias/Universidade Federal do Pará

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Conceito: \_\_\_\_\_

À minha mãe, Alda, que trabalhou incansavelmente para minha educação, sendo a luz que me guiou até aqui. Sem dúvida, sua coragem é impar.

Aos meus pais, Pedro, por seu apoio e incentivo a minha educação, e Darinaldo, pelo zelo e exemplo de generosidade.

À minha tia, Edna, e à minha prima, Kelly, pelo amor, confiança e auxílio.

À Ana Helena, minha filha amada, motor que impulsiona esta e minhas futuras conquistas.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, pois fortalecimento espiritual foi importante para conclusão desta jornada.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. Wallace Gomes Leal pela sábia orientação e pelo valioso suporte a este trabalho.

À minha co-orientadora, Msc. Michelle Nerissa, e ao Prof. Msc. Ijair Rogério por seus ensinamentos, paciência e amizade. A generosidade de vocês é inspiradora e jamais será esquecida.

Ao amigo, Ricardo Sobrinho, por sua especial cumplicidade e incentivo ao meu crescimento acadêmico durante a formação médica.

## RESUMO

O acidente vascular encefálico (AVE) é uma das principais causas de incapacidade e morte no mundo, sendo o AVE do tipo isquêmico o mais prevalente. Atualmente, o único tratamento farmacológico disponível para o AVE isquêmico é o ativador do plasminogênio tecidual recombinante (rt-PA), um fármaco que tem sua abrangência limitada pela curta janela terapêutica e graves efeitos colaterais. Diante disso, surgem estudos visando a descoberta de novas fármacos neuroprotetores capazes de recuperar o tecido neuronal danificado e controlar os eventos fisiopatológicos da cascata isquêmica, tais quais a inflamação exacerbada, ainda na fase aguda da doença. A planta *Piper divaricatum* tem efeitos anti-inflamatórios e anti-oxidantes atribuídos pela medicina popular, e com algumas evidências científicas, sendo utilizada no tratamento de doenças reumáticas. Entretanto, ainda não foram investigados os seus potenciais efeitos anti-inflamatório e neuroprotetor em modelos experimentais de isquemia cortical. Neste estudo, investigou-se o potencial anti-inflamatório e neuroprotetor do extrato supercrítico de *Piper divaricatum* (100 mg/kg) na lesão isquêmica cortical induzida por microinjeções de endotelina – 1 (ET-1) em ratos wistar adultos. Foram utilizados 6 animais divididos em 2 grupos experimentais: grupo controle (ET-1 + tween a 5%, n=3) e grupo tratado (ET-1 + extrato supercrítico de *Piper divaricatum*, n=3). Os encéfalos foram processados para análise histológica com coloração pela violeta de cresila. Após a análise histológica, observou-se que os animais de ambos os grupos exibiram palor tecidual (perda de corpos neuronais) e infiltrado inflamatório na área de lesão. Entretanto, nos animais tratados com extrato supercrítico de *Piper divaricatum*, houve uma diminuição da área de infarto e redução do número de células mononucleares e próximas a ele. Estes resultados sugerem que o extrato de *Piper divaricatum*, na concentração investigada, diminui o infiltrado de células inflamatórias, principalmente células mononucleares, com concomitante efeito neuroprotetor após isquemia cortical experimental em ratos adultos. Estudos futuros, usando marcadores específicos de neurônios, leucócitos e células gliais devem confirmar os resultados aqui descritos.

**Palavras-chave:** Acidente Vascular Encefálico, Fitoterápicos, Neuroinflamação, Micróglia, Neuroproteção.

## ABSTRACT

Stroke is one of the main causes of disability and death in the world, with ischemic stroke being the most prevalent. Nowadays, the only pharmacological treatment available for ischemic stroke is the recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA), a drug that is widely used due to its short therapeutic window and severe side effects. Therefore, studies are necessary for the identification of neuroprotective drugs capable of avoiding secondary injury after acute neural disorders. Piper divaricatum plant is considered in the folk medicine as possessing both anti-inflammatory and anti-oxidant effects, with some scientific evidence available. This plant is also used for treatment of rheumatic diseases. Nevertheless, its potential anti-inflammatory and neuroprotective effects have not yet been investigated using experimental models of brain stroke. In this study, the anti-inflammatory and neuroprotective potential of the supercritical extract of Piper divaricatum (100 mg/kg, i.p) was investigated using an experimental model of cortical ischemia induced by microinjections (80 pmol/ $\mu$ l) of endothelin-1 (ET-1) in adult Wistar rats. Six animals were divided in 2 experimental groups: control group (ET-1 + 5% tween, n = 3) and treated group (ET-1 + supercritical Piper divaricatum extract, n = 3). The brains were processed for histological analysis with cresyl violet staining. After histological analysis, it has been observed tissue pallor, loss of neuronal bodies and inflammatory infiltrate in the ischemic area of both experimental groups. However, in the animals treated with supercritical Piper divaricatum extract, there was a decrease in infarct area and reduction of inflammatory infiltrate. These results suggest that Piper divaricatum extract, at the investigated concentration, decreases the infiltrate of inflammatory cells, mainly mononuclear cells, with concomitant neuroprotective effects after experimental cortical ischemia in adult rats. Future studies, using specific markers of neurons, leukocytes and glial cells, are necessary to confirm the results here described.

**Key words:** Stroke, Phytotherapics, Neuroinflammation, Microglia, Neuroprotection.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
1.2. JUSTIFICATIVA .....	11
1.3. HIPÓTESE E PERGUNTA EXPERIMENTAL .....	11
1.4. OBJETIVOS GERAIS .....	13
1.5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
2.1. EPIDEMIOLOGIA .....	14
2.2. FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO .....	14
2.3. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO PARA O ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO .....	18
2.4. <i>PIPER DIVARICATUM</i> .....	19
<b>3. MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>21</b>
3.1. ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	21
3.2. PROCEDIMENTO PRÉ-CIRÚRGICO .....	21
3.3. INDUÇÃO DE ISQUEMIA FOCAL POR MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA- 1 .....	21
3.4. PERFUSÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO .....	21
3.5. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA .....	22
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>25</b>

<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>29</b>
<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>36</b>

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o Acidente Vascular Encefálico (AVE) é definido como a ocorrência súbita de disfunção neurológica focal, e por vezes global, com duração superior a horas ou que cause morte, resultado de origem vascular (BRASIL, 2013).

O AVE resulta do acúmulo a longo prazo de fatores risco não-modificáveis, incluindo idade avançada, gênero e etnia, e fatores de risco modificáveis, tais quais hipertensão, doença cardíaca/fibrilação atrial, diabetes, dislipidemia, tabagismo, etilismo e sedentarismo. (KIRSHNER, 2009; PACIARONI e BOGOUSSLAVSKY, 2010; SKINNER et al., 2009). No geral, classifica-se o AVE como hemorrágico ou isquêmico dependendo do mecanismo fisiopatológico responsável pelo dano cerebral, sendo o tipo isquêmico o mais frequente, correspondendo a mais de 80% dos casos (SARKAR et al., 2019). O evento isquêmico ocorre quando um vaso cerebral é ocluído, por exemplo por placas de ateromas, o que obstrui o fluxo sanguíneo para uma porção do encéfalo, acarretando rápida e progressiva morte celular. (DESAI et al., 2019; SARKAR et al., 2019). Após colapso metabólico inicial, uma cascata patológica com inúmeros mecanismos, entre os quais excitotoxicidade, acidose metabólica, morte celular programada, estresse oxidativo e neuroinflamação, induzem aumento progressivo da área de lesão primária, com severos déficits funcionais subsequentes (LO et al., 2003; MOSKOWITZ et al., 2010).

Atualmente, a única terapia farmacológica aprovada para o tratamento da isquemia é o ativador do plasminogênio tecidual recombinante (rt-PA, alteplase), um trombolítico que dissolve o coágulo e restaura o fluxo sanguíneo. (ONWUEKWE e EZEALA-ADIKAIIBE, 2012). No entanto, esta terapia tem pouco uso na prática clínica, por causa da sua restrita janela terapêutica. Ela é indicada para o AVE isquêmico e seu uso é restrito a cerca de 4.5 horas (POWERS et al., 2011) após início dos sintomas clínicos, apesar de que novos estudos sugerem que esta janela de aplicação pode ser estendida (KNECHT et al., 2017). O uso tardio do trombolítico alteplase pode induzir a transformação hemorrágica, onde o vaso sanguíneo pode

romper induzindo um AVE hemorrágico, o que agrava o quadro do paciente (KABLAU et al., 2011). Na nossa região, onde ribeirinhos podem chegar ao hospital vários dias após o início dos sintomas, o uso clínico de trombolítico é praticamente impossível.

## **1.2. JUSTIFICATIVA**

Modelos animais de isquemia cerebral focal são essenciais para identificar os eventos responsáveis por morte celular, falência elétrica, inibição da síntese proteica, depleção energética e assim determinar a vida útil da área de penumbra potencialmente viável (COOK et al., 2012; SORBY-ADAMS et al., 2018)..

Do ponto de vista terapêutico, por ser uma área ainda viável de tratamento, a área de penumbra isquêmica é alvo de possíveis intervenções terapêuticas, tais quais os agentes neuroprotetores que interferem nos mecanismos das cascatas isquêmicas, visando resgate desse tecido neuronal (SARKAR et al., 2019). Sabe-se que a lesão inicial (centro isquêmico) pode expandir consideravelmente em mais de 60% do seu volume inicial e invadir a penumbra na fase mais crônica do AVE, o que aumente os déficits funcionais consideravelmente (LO et al., 2003; MOSKOWITZ et al., 2010). Esse fenômeno é conhecido como degeneração neural secundária (DNS).

## **1.3. HIPÓTESE E PERGUNTA EXPERIMENTAL**

Dentre os vários eventos da cascata isquêmica, a inflamação é reconhecida como um evento primordial para a fisiopatologia do AVE. Visto que tal desempenha um caráter benéfico no controle da lesão isquêmica, todavia se não for adequadamente modulada, pode desencadear efeitos deletérios. Compreender a ação dos componentes desta cascata e suas relações entre si é essencial para criação de agentes capazes de modulá-la.

Agentes neuroprotetores, o seja, drogas que impeçam ou minimizem a DNS, são grandemente desejáveis na prática clínica, mas são indisponíveis. Inúmeros estudos propuseram diversas drogas alopáticas, incluindo bloqueadores de cálcio e de receptores de N-Metil-D-Aspartato (NMDA) como o MK801, mas nenhuma delas foi aprovada em humanos devidos aos seus terríveis efeitos colaterais e/ou ineficácia em humanos (MERGENTHALER & MEISEL, 2012; CHAMORRO et al., 2016). A busca por agentes neuroprotetores é incessante e moléculas que protejam o SNC sem efeitos colaterais consideráveis é de grande importância científica e clínica.

Uma possibilidade interessante é que existam neuroprotetores como componentes de plantas da flora Amazônica (GOMES-LEAL, 2016). Estes compostos naturais, alguns que podem ser usados na dieta (por exemplo, o gergelim preto), e outros como óleo de copaíba e cipó puçá, possuem potencial para menos efeitos colaterais. Nosso laboratório no Instituto de Ciências Biológicas da UFPA investiga a possibilidade de que existam agentes anti-inflamatórios e neuroprotetores para doenças agudas do SNC, como AVE e trauma, por vários anos, com algumas evidências científicas já publicadas (SALAZAR et al., 2018; BOTELHO et al., 2015; BOTELHO et al., 2014 ;GUIMARAES-SANTOS et al., 2012).

Considerando a imensa diversidade da flora Amazônica, inúmeras outras plantas podem possuir efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetoras em doenças do SNC. A *Piper divaricatum* é uma planta encontrada na Amazônia, como em regiões do Marajó, em vários outros estados brasileiros, com efeitos larvicidas e anti-fúngicos já descritos (DA SILVA et al., 2014; SOUTO et al., 2012; DA SILVA et al., 2010). Como o estresse oxidativo é um importante mecanismo do AVE e substâncias anti-oxidantes podem induzir neuroproteção, o *Piper divaricatum* pode possuir efeito neuroprotetor, apesar destes efeitos não terem sido investigados.

Neste estudo, investigaremos a hipótese de que o *Piper divaricatum* é anti-inflamatório e neuroprotetor após isquemia focal induzida por microinjeções de endotelina-1 (ET-1) no córtex cerebral de ratos Wistar adultos.

#### 1.4. OBJETIVO GERAL

Investigar se o extrato supercrítico de *Piper divaricatum* possui efeitos anti-inflamatórios e/ou neuroprotetores em um modelo experimental de isquemia cortical em ratos adultos.

#### 1.5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Investigar os padrões lesivos gerais, incluindo palor e área de infarto, após isquemia focal induzida por microinjeções de endotelina-1 no córtex motor de ratos adultos;
- b. Comparar os padrões lesivos mencionados nos encéfalos de animais tratados com tween a 5% ou com extrato supercrítico de *Piper divaricatum*;
- c. Avaliar o padrão inflamatório contendo células mononucleares e polimorfonucleares na região isquêmica de forma comparativa e animais controle e tratados com extrato de *Piper divaricatum*;
- d. Avaliar o padrão inflamatório contendo células mononucleares e polimorfonucleares na região isquêmica de forma comparativa e animais controle e tratados com extrato de *Piper divaricatum*;
- e. Comparar o padrão de perda neuronal entre animais tratados e controle no modelo de lesão proposto.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. EPIDEMIOLOGIA**

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o AVE mata 6,2 milhões de pessoas no mundo a cada ano, sendo a segunda maior causa de morte no mundo (OMS, 2006). A OMS estima que, até 2030, o AVE continue sendo a segunda maior causa de mortes no mundo, sendo responsável por 12,2% dos óbitos previstos para o ano. O prognóstico epidemiológico também sugere que uma em cada seis pessoas terá um AVE na vida (OMS, 2006; BRASIL, 2013).

No Brasil, de acordo com dados do Ministério da Saúde, no ano de 2011, foram registrados 99.159 óbitos por AVE. As doenças cerebrovasculares são a primeira causa de morte, seguidas pelo infarto agudo do miocárdio (BRASIL, 2012). O AVE também é a segunda causa de incapacidade em países de baixo e médio desenvolvimento (FEING et al, 2013). No Brasil, a imensa maioria dos sobreviventes necessita de reabilitação para as sequelas neurológicas consequentes, sendo que aproximadamente 70% não retornam ao seu trabalho e 30% necessita de auxílio para caminhar (BRASIL, 2012).

### **2.2. FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO**

A lesão causada pela isquemia cerebrovascular exhibe tipicamente duas zonas: o centro isquêmico e a penumbra. A zona do centro isquêmico tem redução de 10-25% do fluxo sanguíneo e rápida depleção da reserva energética com possível necrose. (BROUNS e DEYN, 2009; DULA et al, 2019). Devido à falência energética, e em minutos ou horas após a oclusão do vaso sanguíneo, ocorre desequilíbrio iônico intracelular, falência mitocondrial e ativação intracelular de proteases, lipases e ribonucleases levando a rápida desagregação dos elementos celulares estruturais e perda da integridade celular (RAMOS-CABRER et al, 2011; ANRATHER e IADECOLA, 2016; McCABE et al., 2018)

No centro isquêmico, a falência energética induz excitotoxicidade local e despolarização peri-infarto que levam a morte celular, principalmente por necrose.

As células necróticas liberam padrões moleculares associados ao dano (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular pattern*), glutamato, espécies reativas de oxigênio (EROs), e adenosina trifosfato (ATP), que ativam as células microgliais residentes e astrócitos, as quais podem liberar citocinas amplificando a resposta inflamatória (LO et al., 2003; MOSKOWITZ et al., 2010; GOMES-LEAL, 2012, 2019). Esses mediadores causam o recrutamento de células imunes periféricas em uma tentativa de iniciar a remoção de resíduos celulares e recuperação no parênquima cerebral. Este processo induzirá posteriormente morte das células gliais e de neurônios (LO et al., 2003; MOSKOWITZ et al., 2010; GOMES-LEAL, 2012, 2019).

A viabilidade desta área de penumbra é mantida por algumas horas devido ao suprimento sanguíneo das artérias colaterais. No entanto, eventos secundários da amplificam os mecanismos lesivos, expandindo a área de lesão inicial e comprometendo a penumbra isquêmica (LO et al., 2003; MOSKOWITZ et al., 2010). Descreveu-se que a lesão inicial pode aumentar em até 70% devido ao mecanismo de DNS (LO et al., 2003; MOSKOWITZ et al., 2010; DULA et al., 2019). No centro isquêmico, as células morrem mais por necrose, enquanto que na penumbra isquêmica as células morrem mais por necrose e apoptose, além de tipos intermediários de morte celular e autofagia (HOU et al., 2019).

A excitotoxicidade origina-se do acúmulo patológico de aminoácidos excitatórios como o glutamato no meio extracelular e fenda sináptica (BESANCON et al., 2008). O glutamato ativa os receptores de NMDA (N-methyl-D-aspartate) e AMPA (amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) que levam inicialmente à entrada de sódio e, tardiamente, ao influxo exacerbado de cálcio para o meio intracelular, desregulação da homeostase intracelular do cálcio, resultando na ativação excessiva de proteases, lipases e enzimas que contribuem para a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies nitrogenadas, disfunção mitocondrial, ativação da cascata apoptótica e poli (adenosina difosforibose) ativação da polimerase. (MOSKOWITZ et al., 2010; ANRATHER & IADECOLA, 2016).

O aumento de EROs e a alteração funcional das células do endotélio vascular desestabiliza a barreira hematoencefálica (BHE), contribuindo para a infiltração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos T ativados, o que agrava os mecanismos lesivos (ANRATHER e IADECOLA, 2016; RODRIGO et al. 2013). Além do mais, modelos experimentais de isquemia mostram uma resposta inflamatória sistêmica, que atinge o pico de atividade 4 horas após a lesão e precede o pico de neuroinflamação 20 horas depois. Esta resposta é caracterizada por altos níveis de IL-6 e proteína C-reativa, esta última associada a um prognóstico lesivo ruim (REICHE et al, 2019).

A neuroinflamação é um importante componente da lesão secundária após AVE e outras doenças do SNC (GOMES-LEAL, 2012; RANSOHOFF, 2016; GOMES-LEAL, 2019). Ela possui componentes humorais e celulares, ambos com componentes dos sistemas imunes inato e adaptativo (GOMES-LEAL, 2012, 2019). Células da micróglia são os principais componentes da resposta inflamatória do SNC (GOMES-LEAL, 2012, 2019). Elas são derivadas de progenitores presentes no saco de Yolk que invadem o SNC durante o desenvolvimento do sistema nervoso (GINHOUX et al., 2010).

Em situações não patológicas, as células da micróglia fazem uma varredura completa do parênquima neural através de movimento estocásticos dos seus longos ramos em busca de alterações patológicas, deste modo protegendo o sistema nervoso (NIMMERJAHN et al., 2005). Estes movimentos dependem de sinalizadores como o ATP (DAVALOS et al., 2005). Em situações lesivas, como no AVE, as células microgliais são ativadas, com mudanças profundas na sua morfologia e bioquímica (GOMES-LEAL, 2012, 2019). Esse fenômeno é conhecido como microgliose.

As células da micróglia são ativadas rapidamente em resposta a uma isquemia cerebral (THORED et al., 2009). Essa ativação atende um pico entre 3 e 7 dias após a indução isquêmica perdurando por várias semanas (THORED et al., 2009; JIN et al, 2010; MA et al 2017). O papel dessas células imunes é duplo na isquemia (GOMES-LEAL, 2012, 2019). Após oclusão experimental da artéria cerebral média, a inibição da ativação microglial com

minociclina diminui a neuroinflamação e induz neuroproteção (YRJANHEIKKI et al., 1999), apesar de que, no mesmo modelo experimental, a ablação genética da micróglia aumenta a neuroinflamação e induz mais lesão (LALANCETTE-HEBERT et al., 2007).

Essa dualidade da ação micróglia é conhecida como Face de Janus, em alusão ao deus da mitologia grega Janus, que representa dualidade. A face de Janus da função microglial pode ser explicada pela presença de diferentes ligantes, DAMPS ou sinais de perigo, no ambiente patológico que ao ativar diferentes receptores na membrana microglial podem gerar fenótipos benéficos prejudiciais (GOMES-LEAL, 2012, 2019). A ativação de receptores normalmente ativados por patógenos na membrana microglial, como receptores tipo toll e outros receptores, poderia fazer com que as células da micróglia respondessem de forma similar ao combate a uma infecção, mesmo na ausência de uma, matando neurônios como um efeito colateral desta resposta equivocada. Essa é a base da hipótese do “fogo amigo”, recentemente levantada em nosso laboratório (GOMES-LEAL, 2019)

Astrócitos exercem papéis importantes no funcionamento do sistema nervoso central e também na fisiopatologia do AVE (LIMA et al., 2016; PEKONY et al., 2019) . Eles podem proliferar e sofrer diferenciação (astrogliose) após a isquemia cerebral com aumento da expressão de proteína ácida fibrilar glial (GFAP, do inglês glial fibrillary acidic protein). Astrócitos podem produzir mediadores inflamatórios e desencadear a neuroinflamação pela expressão de proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e moléculas co-estimulatórias, que podem ativar respostas anti-inflamatórias (TH-2). Assim como a micróglia, astrócitos também exibem funções de caráter duplo, às vezes benéficas e em outras prejudiciais (PEKONY et al., 2014; PEKONY et al., 2019).

Portanto, a isquemia induz astrocitose e microgliose com liberação de mediadores inflamatórios tais quais citocinas, quimiocinas, EROs e metaloproteinases. Esses mediadores aumentam a expressão de moléculas de adesão no endotélio cerebral, que promove adesão e infiltração de leucócitos derivados do sangue (neutrófilos, macrófagos e linfócitos) para a área de isquemia.

Esse infiltrado leucocitário promove amplificação da resposta inflamatória pela secreção de uma variedade de mediadores pró-inflamatórios tais quais TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , EROs. Entretanto, micróglia ativada, macrófagos e células T reguladoras também secretam alguns fatores neuroprotetores, como IL-10 e TGF- $\beta$ , que podem suprimir a inflamação pós-isquêmica (PEKONY et al., 2014; PEKONY et al., 2019; SARKAR et al., 2019). A ativação periférica de vias inflamatórias após a lesão isquêmica aguda também exerce papel essencial no desfecho neurológico. Mediadores imunológicos e oxidativos gerados no encéfalo se propaga através da circulação sanguínea, causando uma resposta inflamatória sistêmica. (ANRATHER e IADECOLA, 2016; SARKAR et al., 2019).

### **2.3. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO PARA O ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO**

A restauração do fluxo sanguíneo cerebral é a única terapia efetiva para o tratamento da isquemia cerebral. O rt-PA (alteplase) é uma droga trombolítica, que causa rápida recanalização e restaura o oxigênio e suprimentos nutricionais para a área afetada, e por conseguinte induz melhora na função neurológica (ROTH, 2011;McCABE et al, 2018). Entretanto sua utilização é limitada fatores como estreita janela temporal para administração e efeitos colaterais graves (SAVER e LEVINE, 2010).

Geralmente, o alteplase traz bons resultados em 1 entre 3 pacientes tratados até 3 horas do início do quadro clínico e em 1 entre 6 pacientes tratados na janela de tempo de 3-4,5h, todavia não há benefícios se a administração do medicamento no tempo superior a este período. Após 4,5 horas, o risco de graves efeitos colaterais graves como hemorragia parenquimal, supera os benefícios de sua utilização (SAVER e LEVINE, 2010; KABLAU et al., 2011; THIEBAUT et al., 2018).

Por causa desta curta janela terapêutica, o número de pacientes que recebe tratamento é pequeno. Prevenção de incapacidade é visto somente em 6 a cada 1.000 pacientes com AVC. Além da curta janela terapêutica, o atraso no

reconhecimento e transporte dos pacientes, reduz para 5% o número de casos elegíveis para trombólise com rt-PA. O alteplase, embora efetivo, não reduz a mortalidade de forma direta, apesar de atuar eficazmente na funcionalidade dos pacientes pela redução de sequelas (McCABE et al, 2018; MINISTERIO DA SAUDE, 2012). Na nossa região, onde ribeirinhos podem chegar ao hospital vários dias após o início dos sintomas, o uso clínico de trombolítico é praticamente impossível.

#### **2.4. PIPER DIVARICATUM**

A família Piperaceae compreende cerca de 5 gêneros e mais de 2000 espécies de plantas. O gênero Piper é encontrado principalmente em regiões tropicais e subtropicais, e tem sido extensamente investigado como matéria-prima para produtos naturais com potencial antifúngico, antitumoral, antioxidante antiplasmodial e tripanocida. Além disso, espécies do gênero Piper já são utilizadas pela medicina popular para tratar doenças, incluindo febre, icterícia, reumatismo e neuralgia (DA SILVA et al, 2014).

*Piper divaricatum*, conhecida popularmente também como pau-de-angola, jaborandi-manso, “beetle” é um arbusto com até 9 metros de altura encontrada em vários estados brasileiros do norte e nordeste, incluindo a região Marajoara. Na medicina popular, as folhas e raízes são utilizadas para tratar doenças reumatológicas e cólicas (ANDRADE et al., 2009).

Em outras investigações, o óleo essencial de *Piper divaricatum* exibiu efeito antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. *Cladosporium spp* – contaminantes do ar que causam alergias e outras doenças do trato respiratório (DA SILVA et al, 2010). Óleo essencial de *Piper divaricatum* exibiu atividade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas. (BARBOSA et al, 2012). Além disso, também há resultados que mostram em sua composição o eugenol, uma substância que é utilizada para analgesia em tratamentos endodônticos. (DA SILVA et al, 2017).

Em outros trabalhos, algumas espécies do gênero *Piper*, como *Piper glabratum*, (BRANQUINHO et al, 2017) e *Piper vicosanum* (BRAIT et al, 2015) tiveram confirmadas suas propriedades anti-inflamatórias pela inibição da migração leucocitária. Apesar de ser empregada popularmente no tratamento de doenças de caráter inflamatório, tais qual o reumatismo, há uma escassez de estudos que comprovem e descrevam a atividade anti-inflamatória do *Piper divaricatum*.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS**

Foram utilizados 6 ratos da linhagem Wistar, machos e adultos, pesando entre 250-350 g. Os animais ficaram alojados em gaiolas contendo 3 animais, com água e comida na proporção ideal a cada exemplar. Os procedimentos experimentais foram executados conforme o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará, objetivando reduzir ao máximo o sofrimento e a ansiedade nos animais. (PARECER 137-130)

#### **3.2. PROCEDIMENTOS PRÉ-CIRÚRGICOS**

Os animais foram adquiridos com 3 meses de antecedência da data prevista para o início das cirurgias, ambientados em gaiolas-padrão e manipulados sobre balança de precisão para acompanhamento do ganho de massa corpórea ideal ao momento da cirurgia.

#### **3.3. INDUÇÃO DE ISQUEMIA FOCAL POR MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-**

1

Neste estudo, utilizamos o método de indução de isquemia focal por microinjeções da substância vasoconstritora ET-1, usado de rotina em nosso laboratório (FRANCO et al., 2012; SOUZA-RODRIGUES et al., 2008). Antes dos procedimentos cirúrgicos os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (Vetanarcol®, Köning. 72 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (Kensol®, Köning. 9 mg/Kg). Verificada a ausência dos reflexos de retirada de pata e corneano, os animais foram colocados sobre um aparelho estereotáxico (Insight® EFF-336), sob a proteção de uma manta térmica.

As coordenadas adotadas a partir do bregma foram: +1,2 mm, anterior-posterior; +2,3 mm, médio-lateral; e -0,5 mm, dorso-ventral, a partir da superfície cortical. Uma incisão longitudinal foi feita com bisturi a fim de expor a caixa craniana e no ponto especificado pelas coordenadas estereotáxicas, realizou-se craniotomia

com auxílio de broca cirúrgica odontológica de baixa rotação para exposição da superfície cortical.

Com auxílio de uma micropipeta de vidro graduada (Sigma-Aldrich, Hirschmann) foi injetado 80 pMols, diluída em 1  $\mu$ L de corante azul colonil, de modo a permitir a localização da área de injeção. A micropipeta foi mantida fixa por cinco minutos no parênquima neural para evitar possíveis refluxos.

Após os procedimentos cirúrgicos, os ratos ficaram em observação, em intervalos regulares, visando o monitoramento da recuperação e da evolução dos sintomas causados pelo dano isquêmico, mantidos em gaiolas-padrão individuais durante o tempo de sobrevivência de 7 dias.

### **3.4. PERFUSÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO**

Ao término do período de sobrevivência de cada grupo experimental, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (Vetanarcol®, König 72mg/kg) e cloridrato de xilazina (Kensol®, König. 9mg/kg). Abolidos os reflexos de retirada da pata e corneano foram perfundidos na região do ventrículo esquerdo do coração com 300-400 ml de tampão fosfato salina (PBS 0,1M; 0,9%; ph 7,2 – 7,4) heparinizada, seguido de 300-400 ml de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (PB 0,1M; pH 7,2 – 7,4).

Os encéfalos foram retirados e pós-fixados por 24 horas em paraformaldeído 4% tamponado. Em seguida, foram crioprotetidos em soluções com concentrações 30 crescentes de sacarose a 25%, 50%, 100% diluídos em mistura de glicerina com tampão fosfato 0,05 M- pH 7,2 – 7,4.

Após a crioproteção, os encéfalos foram incluídos em TissueTek® (Sakura) para congelamento a -35°C em câmara de criostato (Microm HE 505E) e, posteriormente, seccionados por navalhas INOX fixadas em criostato. As secções de 20 $\mu$ m foram montadas em lâminas histológicas gelatinizadas e conservadas em um freezer a -20°C para uso posterior em protocolos de histoquímica.

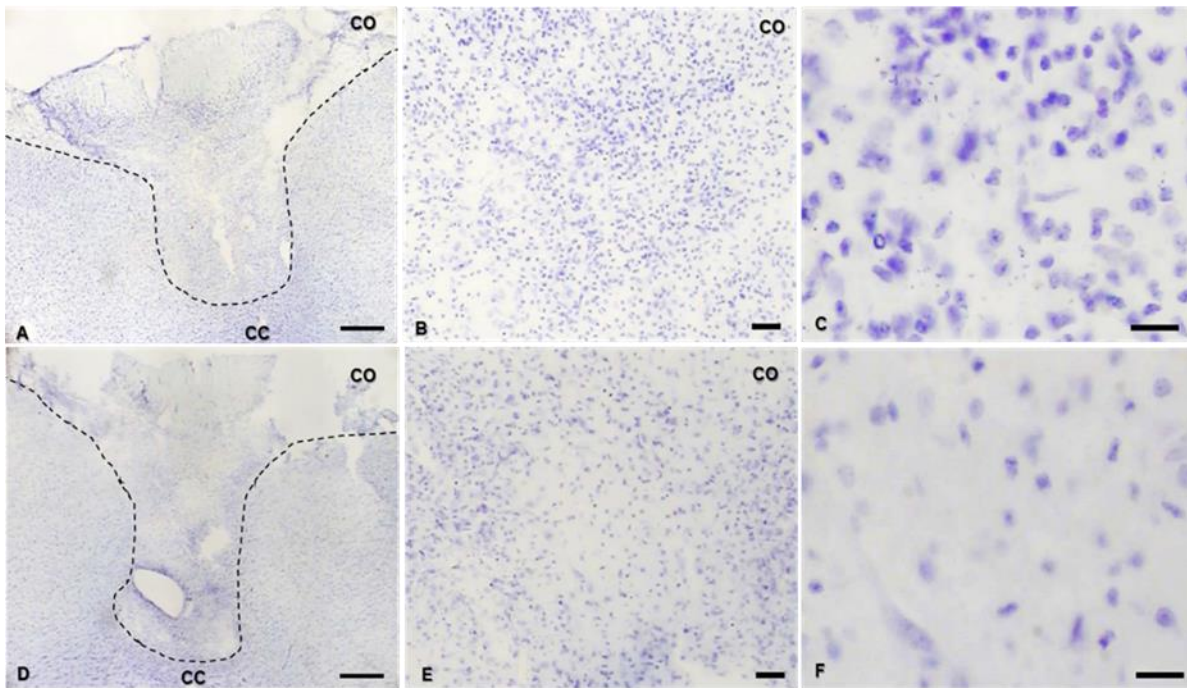
### **3.5. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA**

A análise histopatológica foi realizada pela coloração de Nissl-Violeta de cresila que permite a visualização de corpos celulares e a perda dos mesmos em situações patológicas (DOS SANTOS et al., 2007; LIMA et al., 2008; GUIMARAES et al., 2009).

Para identificar o local exato da lesão isquêmica, observou-se secções coradas em diferentes pontos, anteriores e posteriores à área de injeção de endotelina-1. As secções mais próximas do centro da lesão foram escolhidas para análise histopatológica.

#### 4. RESULTADOS

Neste estudo, investigamos os possíveis efeitos neuroprotetores e anti-inflamatórios do extrato supercrítico da planta *Piper divaricatum*. Nos animais controle, tratados somente com tween a 5%, as microinjeções de ET-1 induziram conspícua lesão isquêmica caracterizada por palor tecidual (ausência de corpos neuronais), infarto cortical e intensa resposta inflamatória (Figura 1A-C). A lesão afetou quase todas as camadas corticais, mas não a substancia branca do corpo caloso (Figura 1). A análise microscópica com objetivas de maior aumento revelou predomínio de infiltrado de células mononucleares (macrófagos/micróglia). Nos animais tratados com 100 mg/kg de extrato supercrítico de *Piper divaricatum*, houve uma diminuição da área de infarto, preservação de corpos celulares e redução do número de células mononucleares no centro isquêmico (Figura 1D-F).



**Figura 1:** Análise histopatológica da área da lesão revelada pela coloração com violeta de cresila. Em A, B e C: animal controle (7d após lesão); em D, E e F: animal tratado (7d após lesão). A linha pontilhada em A e D delimita toda extensão da área de lesão. Córtex cerebral (CO); Corpo caloso (CC). Escalas: 200 $\mu$ m (A e D); 50  $\mu$ m (B e E) e 30  $\mu$ m (C e F).

## 5. DISCUSSÃO

Estudos utilizando modelos experimentais de isquemia vêm fornecendo importantes avanços para a compreensão dos mecanismos envolvidos no AVE (HERMANN et al, 2019; McCABE et al, 2017). Neste estudo, induzimos isquemia focal no córtex motor de ratos adultos por microinjeções de ET-1. Este procedimento foi eficaz para a indução de perda tecidual, infarto cortical e intensa resposta inflamatória. Estes resultados condizem com os estudos prévios de nosso laboratório, onde implementamos o modelo experimental utilizado (DOS SANTOS et al., 2007; SOUZA-RODRIGUES et al., 2008; FRANCO et al., 2012; LIMA et al., 2016).

A coloração de Nissl empregada neste trabalho é amplamente usada como método histológico para estudar a morfologia e alterações patológicas no SNC (DOS SANTOS et al., 2007; SOUZA-RODRIGUES et al., 2008; FRANCO et al., 2012; LIMA et al., 2016). O corante básico de violeta de cresila interage com o DNA (ácido desoxirribonucleico) do núcleo celular e também com RNA (ácido ribonucleico), que é altamente concentrado no retículo endoplasmático rugoso e nos ribossomos das células neuronais. As células danificadas mostram várias características, incluindo picnose (condensação da cromatina), edema ou necrose (KÁDAR et al, 2009).

No geral, há uma diminuição da intensidade da violeta de cresila na marcação de Nissl, o que é detectável em torno de 2 a 3 horas após a isquemia experimental (ZILLE et al, 2012). Neste estudo, observamos que o grupo de animais controle submetidos à isquemia por microinjeções de ET-1 apresentou diminuição de corpos celulares no centro da lesão isquêmica, como relatado anteriormente. Os corpos celulares de Nissl são envolvidos na síntese proteica, incluindo enzimas relacionadas à síntese de neurotransmissores e peptídeos (KADAR et al, 2012). No grupo controle, a coloração de Nissl mostrou notável palor e morte celular. Como esperado, os corpos celulares no encéfalo isquêmico apresentaram estas características morfológicas com redução do tamanho e número de neurônios nas

camadas corticais de modo mais intenso quando comparados ao grupo de tratamento com o extrato de *Piper divaricatum*.

A perda neuronal após isquemia pode ocorrer devido a inúmeros fatores entre os quais os previamente descritos para a fisiopatologia do AVE (LO et al., 2003; MOSKOWITZ et al., 2010; GOMES-LEAL, 2012, 2019). A excitotoxicidade é especialmente importante. A morte excitotóxica é fundamental para a indução de morte neural, tanto que injeções de pequenas quantidades de NMDA causam intensa necrose nos cérebros de animais de experimentação (GUIMARÃES-SANTOS et al., 2012). A ativação excessiva de receptores glutamatérgicos ionotrópicos induz massiva abertura de canais de Ca<sup>++</sup> promovendo ativação de lipases, proteases e formação de radicais livres, contribuindo para intensa morte celular (BESANCON et al., 2008; BROUNS e DEYN, 2009).

Nos animais tratados com extrato supercrítico de *Piper divaricatum*, houve uma diminuição da área de infarto e redução do número de células mononucleares no infiltrado inflamatório. Este resultado é corroborado pelo estudo publicado Hua et al. (2018), no qual relatou-se um efeito neuroprotetor do extrato supercrítico de outras duas plantas do gênero *Piper* - *Piper nigrum* L. and *Piper longum* L - após isquemia focal permanente.

Houve diminuição de células mononucleares (macrófagos/micróglia ativadas) após tratamento com *Piper divaricatum*. Como a ativação microglial exacerbada contribui para lesão secundária (GOMES-LEAL, 2012, 2019), a modulação da ativação microglial pode ser um importante componente das ações neuroprotetoras do *Piper divaricatum*. Corroborando este dado, o trabalho de Yrjanheikki et al. (1999) mostrou que a inibição da ativação microglial com minociclina diminui a neuroinflamação e a área de infarto, tanto no córtex como no estriado de ratos adultos.

O efeito neuroprotetor do *Piper divaricatum* pode ocorrer devido às ações pleiotrópicas, como no caso da minociclina. No entanto, efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios são mecanismos muito prováveis de ação desta planta (DA SILVA et al., 2010). Sabe-se que os mecanismos anti-oxidantes endógenos estão diminuídos

após isquemia, e que o estresse oxidativo é um potente indutor de lesão secundária (LO et al., 2003; MOSKOWITZ et al., 2010; SARKAR et al., 2019).

O extrato de *Piper divaricatum* foi utilizado para o tratamento de animais isquêmicos na tentativa de modular o processo inflamatório no córtex motor. O infiltrado inflamatório foi notado tanto no grupo controle quanto no tratado, todavia no grupo tratado o infiltrado inflamatório foi mais brando. O papel da neuroinflamação é crucial na fisiopatologia de doenças do SNC, porém há dualidade quanto a função da ativação microglial que pode ser prejudicial ou benéfica (BECKER e BUCKWALTER, 2016; GOMES-LEAL, 2019). Isso parece depender dos estímulos presentes no tecido e dos receptores ativados na membrana microglial (GOMES-LEAL, 2019).

A modulação da inflamação ao invés da sua abolição completa é mais indicada no caso de uma terapia que atue em mecanismos inflamatórios no SNC, já que a inflamação também possui efeitos benéficos. Células microgliais, astrócitos e outros componentes da resposta inflamatória no SNC podem promover efeitos benéficos na fase aguda pós-isquemia devido a produção de fatores tróficos e de crescimento, que contribuem para recuperação neuronal e neurogênese após isquemia (BUTOVSKY et al, 2006). A ativação microglial também exibiu perfil benéfico no trabalho de Lalancette-Hébert et al. (2007), onde a ablação genética da proliferação microglial, durante a inflamação, acentuou a lesão isquêmica induzida por oclusão da artéria cerebral média em camundongos. A neuroproteção microglial também foi encontrada em modelo experimental de isquemia por privação de glicose e oxigênio em cultura organotípica (NEUMANN et al., 2006, 2008).

## 6. CONCLUSÃO:

Os dados aqui apresentados sugerem que o extrato supercrítico de *Piper divaricatum* (100 mg/Kg) reduz a área de infarto, preserva corpos celulares e diminui o infiltrado inflamatório após microinjeções de ET-1 no córtex motor de ratos adultos.

O presente estudo é o primeiro a sugerir ação neuroprotetora do *Piper divaricatum* em modelo de isquemia cerebral focal com ET-1, constituindo um estudo piloto para trabalhos posteriores, utilizando outros tempos de sobrevivência e marcações com técnicas de imunohistoquímica para avaliar de forma quantitativa o caráter neuroprotetor do extrato de *Piper divaricatum*.

## REFERÊNCIAS

ANRATHER, J.; IADECOLA, C. Inflammation and stroke: An overview. **Neurotherapeutics**. v. 13, n. 4, 2016

BARBOSA, Q. P. S. et al. Chemical composition, circadian rhythm and antibacterial activity of essential oils of *Piper divericatum*: A new source of safrole. **Quim. Nova**, v. 35, n. 9, p. 1806–1808, 2012.

BECKER, K. J.; BUCKWALTER, M. Stroke, inflammation and the immune response: Dawn of a new era. **Neurotherapeutics**, v. 13, n. 4, p. 659–660, 2016.

BESACON, E. et al. Beyond NMDA and AMPA glutamate receptors: emerging mechanisms for ionic imbalance and cell death in stroke. **Trends in pharmacological sciences**, v. 29, n. 5, p. 268-275, 2008.

BOTELHO, J. R. S. et al. Copaíba (*Copaifera* sp.) leaf extracts obtained by CO<sub>2</sub> supercritical fluid extraction: Isotherms of global yield, kinetics data, antioxidant activity and neuroprotective effects. **The Journal of Supercritical Fluids**. v.98, p. 167-171, 2015.

\_\_\_\_\_, J. R. S. et al. Black sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds extracts by CO<sub>2</sub> supercritical fluid extraction: Isotherms of global yield, kinetics data, total fatty acids, phytosterols and neuroprotective effects. **The Journal of Supercritical Fluids**. V. 93, p.49-55, 2014.

BRAIT, D. R. H., et al. Toxicological analysis and anti-inflammatory effects of essential oil from *Piper vicosanum* leaves. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 3, p. 699-705, 2015.

BRANQUINHO, L. S. et al. Anti-inflammatory and toxicological evaluation of essential oil from *Piper glabratum* leaves. **J. Ethnopharmacol**, v, 198, p. 372–378, fev. 2017.

BRASIL. Portaria 664, de 12 de abril de 2012. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas - Trombólise no acidente vascular cerebral isquêmico agudo. **Ministério da Saúde**: Brasília, DF, 12 abr., 2012. Disponível em: [ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpssp/bibliote/informe\\_eletronico/2012/iels.abr.12/lcls71/U\\_PT-MS-GM-664\\_120412.pdf](ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpssp/bibliote/informe_eletronico/2012/iels.abr.12/lcls71/U_PT-MS-GM-664_120412.pdf). Acesso em 18 abr. 2019.

\_\_\_\_\_. Portaria nº 665, de 12 de abril de 2012: Dispõe sobre os critérios de habilitação dos estabelecimentos hospitalares como Centro de Atendimento de Urgência aos Pacientes com Acidente Vascular Cerebral (AVC), no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), institui o respectivo incentivo financeiro e aprova a

Linha de Cuidados em AVC. **Ministério da Saúde**: Brasília, DF, 12 abr., 2012. Disponível em: <<http://www.saude.mt.gov.br/arquivo/7416/legislacao>>. Acesso em: 18 abr. 2019.

\_\_\_\_\_. Diretriz de reabilitação a pessoa com acidente vascular cerebral. Ministério da Saúde. Brasília, DF, 2013.

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, jul. 2009.

BUTOVSKY, O et al. Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. **Mol. Cell. Neurosci.** v.31, p. 149–160. 2006.

CHAMORRO, A. et al. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. **Lancet Neurol.** v.15, p.869-881, 2016.

COOK, D. J.; TYMIANSKI, M. Nonhuman primate models of stroke for translational neuroprotection research. **Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics.**v. 9, p. 371-379, 2012.

DA SILVA, J. K. et al. Antifungal activity and computational study of constituents from Piper divaricatum essential oil against Fusarium infection in black pepper. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 17926–17942, nov. 2014.

\_\_\_\_\_, J. K. et al. Essential oil composition, antioxidant capacity and antifungal activity of Piper divaricatum. **Nat. Prod. Commun.**, v. 5, n. 3, p. 80-477, mar. 2010.

\_\_\_\_\_, J. K. et al. Essential oils of Amazon Piper species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. **Ind. Crops Prod.**, v. 58, p. 55–60, mar. 2014.

DAVALOS, D., et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nat Neurosci.** v.8, 752-758, 2005

DESAI, S. M. et al. High Variability in Neuronal Loss: Time Is Brain, Requantified. **Stroke**, v. 50, n. 1, p. 34-37, 2019.

DOS SANTOS, C. D.; PICANÇO-DINIZ, C. W.; GOMES-LEAL, W. Differential patterns of inflammatory response, axonal damage and myelin impairment following excitotoxic or ischemic damage to the trigeminal spinal nucleus of adult rats. **Brain Research**, v. 1172, p. 130-144, out. 2007.

ERISLÉIA-MEIRELES, N. et al. Phenylpropanoids produced by *Piper divaricatum*, a resistant species to infection by *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, the pathogenic agent of fusariosis in black pepper. **J. Plant Pathol. Microbiol.**, v. 7, n. 333, p. 2-7, 2016.

FEIGIN, V. L. et al. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 18, n. 383, p. 245-254, jan. 2014.

FERNANDEZ-LOPEZ, D. et al. Reduced infarct size and accumulation of microglia in rats treated with WIN 55,212-2 after neonatal stroke. **Neuroscience**, v. 207, p. 307-315, 2012.

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

GEHRMANN, J. et al. Immunocytochemical study of an early microglial activation in ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 12, p. 257-269, 1992.

\_\_\_\_\_, J. et al. Reactive microglia in cerebral ischaemia: an early mediator of tissue damage? **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 21, n. 4, p. 277-289, ago. 1995.

GINHOUX, F., et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. **Science**. v. 330, p. 841-5. 2010

GOMES-LEAL, W. Microglial physiopathology: how to explain the dual role of microglia after acute neural disorders? **Brain and Behavior**. v. 2, n.3, p.345-356, 2012.

\_\_\_\_\_, W. Why microglia kill neurons after neural disorders? The friendly fire hypothesis. **Neural Regen Res**. v. 14, n. 9, p.1499-1502, 2019.

GUIMARAES, J. S. et al. Mechanisms of secondary degeneration in the central nervous system during acute neural disorders and white matter damage. **Review in Neuroscience**, v. 48, n. 6, p. 304-310, p. 16-31, mar. 2009.

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

HERMANN, D. M. et al. Animal models of ischemic stroke and their impact on drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 14, n. 3, 315-326, fev. 2019.

HOFF, D. R. B. et al. Toxicological analysis and anti-inflammatory effects of essential oil from *Piper vicosanum* leaves. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 73, n. 3, p. 699-705, dez. 2015.

HOU, K., et al. The progress of neuronal autophagy in cerebral ischemia stroke: Mechanisms, roles and research methods. *J Neurol Sci.* v. 400, p.72-82, 2019.

HUA, S. et al. Neuroprotective Effect of dichloromethane extraction from Piper nigrum L. and Piper longum L. on permanent focal cerebral ischemia injury in rats. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases.** p. 1-10, 2018.

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

KABLAU, M., et al. Predictors and early outcome of hemorrhagic transformation after acute ischemic stroke. **Cerebrovascular diseases.** v.32, p.334-341, 2011.

KÁDÁR, A. et al. Improved method for combination of immunocytochemistry and Nissl staining. **J Neurosci Methods**, v. 184, n. 1, p. 115–118, out. 2009.

KIRSHNER, H. S. Differentiating ischemic stroke subtypes: risk factors and secondary prevention. **Journal of the Neurological Science**, v. 279, n.1-2, p.1-8, abr. 2009.

KNECHT, T., et al. Adjunctive Therapy Approaches for Ischemic Stroke: Innovations to Expand Time Window of Treatment. **Int J Mol Sci.** v.18, 2017

LALANCETTE-HEBERT, M., et al. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. **J Neurosci.** v.27, p.2596-2605, 2007.

LIMA, R. R. et al. Diffuse axonal damage, myelin impairment, astrogliosis and inflammatory response following microinjections of nmda into the rat striatum. **Inflammation**, v. 31, n. 1, p. 24-35, fev. 2008.

\_\_\_\_\_ et al. Neurodegeneration and Glial Response after Acute Striatal Stroke: Histological Basis for Neuroprotective Studies. **Oxid Med Cell Longev.** v. 31, p.735-764, 2016.

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.

MA, Y. et al. The biphasic function of microglia in ischemic stroke. **Progress in Neurobiology**, v. 157, p. 247–272, out. 2017.

MCCABE, C. et al. Animal models of ischaemic stroke and characterisation of the ischaemic penumbra, **Neuropharmacology**, p. 1-9, set. 2017.

\_\_\_\_\_. et al. Animal models of ischaemic stroke and characterisation of the ischaemic penumbra. **Neuropharmacology**, v. 15, n. 134, p. 77-169, maio. 2018.

MERGENTHALER, P.; MEISEL, A. Do stroke models model stroke? **Dis Model Mech.** v. 5, p.718-725, 2012.

NEUMANN J, et al. Microglia provide neuroprotection after ischemia. **Faseb Journal.** v. 20, p. 714-716, 2006.

\_\_\_\_\_, J., et al. Microglia cells protect neurons by direct engulfment of invading neutrophil granulocytes: a new mechanism of CNS immune privilege. **J Neurosci** v.28, p. 5965-5975, 2008.

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

NIMMERJAHN, A.; KIRCHOFF, F., HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science.** v.308, p.1314-1318, 2005.

ONWUEKWE, I. O.; EZEALA-ADIKAIIBE, B. Ischemic stroke and neuroprotection. Annals of medical and health sciences research. **Journal Home**, v. 2, n. 2, p. 186-190, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Manual STEPS de Acidentes Vascular Cerebrais da OMS: enfoque passo a passo para a vigilância de acidentes vascular cerebrais.** Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2006.

PACIARONI, M.; BOGOUSLAVSKY, J. Primary and secondary prevention of ischemic stroke. **European neurology**, v. 63, n. 5, p. 267-278, 2010.

PEKKNY, M., WILHELMSSON, U., PEKNA, M., 2014. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. **Neuroscience letters.** v.565, p. 30-38, 2014.

\_\_\_\_\_, M., et al. Astrocyte activation and reactive gliosis-A new target in stroke? **Neurosci Lett.** v.689, p. 45-55, 2019.

PETTY, G. W. et al. Ischemic stroke subtypes: a population-based study of incidence and risk factors. **Stroke**, v. 30, n. 12, p. 2513-2516, dez. 1999.

RAMOS-CABRER, P. et al. Targeting the Ischemic Penumbra. **Stroke.** v.42, p. 7-11, 2011.

RANSOHOFF, R. M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 777-783, 2016.

REICHE, E. M. V. et al. Immune-inflammatory, oxidative stress and biochemical biomarkers predict short-term acute ischemic stroke death. **Metabolic Brain Disease.** 2019

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

ROTH, J. M. Recombinant tissue plasminogen activator for the treatment of acute ischemic stroke. **Proc (Bayl Univ Med Cent )**. v.24, p. 257-259, 2011

SARKAR, S. et al. Cerebral ischemic stroke: cellular fate and therapeutic opportunities. **Front Biosci (Landmark Ed)**. v.24, p. 435-450, 2019.

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

SAVER, J. L.; LEVINE, S. R. Alteplase for ischaemic stroke-much sooner is much better. **Lancet**, v. 375, n. 9727, p. 8-1667, maio. 2010.

SCHULZ, U. G.; ROTHWELL, P. M. Differences in vascular risk factors between etiological subtypes of ischemic stroke: importance of population-based studies. **Stroke**, v. 34, n. 8, p. 2050-2059, ago. 2003.

SKINNER, R. et al. Psychoneuroimmunology of stroke. **Immunology And Allergy Clinics of North America**, v. 29, n. 2, p. 359-379, maio. 2009.

SORBY-ADAMS, A. J.; VINK, R.; TURNER, R. J. Large animal models of stroke and traumatic brain injury as translational tools. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v.315, p.165-190, 2018

SOUTO, R. N. et al. Insecticidal activity of Piper essential oils from the Amazon against the fire ant *Solenopsis saevissima* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). **Neotrop Entomol**. v.41, p.510-517, 2012.

SOUZA-RODRIGUES, R. D. et al. Inflammatory response and white matter damage after microinjections of endothelin-1 into the rat striatum. **Brain Research**, v.1200, p. 78-88, mar. 2008.

THIEBAUT, A. M. et al. The role of plasminogen activators in stroke treatment: fibrinolysis and beyond. **Lancet Neurology**, v. 17, n. 12, p. 1121-1132, 2018.

THIEL, A.; HEISS, W. D. Imaging of microglia activation in stroke. **Stroke**, v. 42, n. 2, 507–512, fev. 2011.

THORED, P., et al. Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. **Glia**. v.57, p.835-849, 2009.

TOBIN, M. K. et al. Neurogenesis and inflammation after ischemic stroke: what is known and where we go from here. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 34, n. 10, p. 1573–1584, 2014.

VAN VELTHOVEN, C. T. et al. Mesenchymal stem cell treatment after neonatal hypoxic-ischemic brain injury improves behavioral outcome and induces neuronal and oligodendrocyte regeneration. **Brain Behav. Immun.**, v. 24, n. 3, p. 387–393, mar. 2010.

YRJANHEIKKI, J. et al. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.96, n.13, p. 496-500, 1999.

ZILLE, M. et al. Visualizing cell death in experimental focal cerebral ischemia: promises, problems, and perspectives. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 32, n. 2, p. 213–231, fev. 2012.

## ANEXO 1

**PARECER 137-13**

**Projeto:** EXTRATOS DE PLANTAS DA AMAZÔNIA E SEUS PRINCÍPIOS ATIVOS COMO AGENTES ANTI-INFLAMATÓRIOS E NEUROPROTETORES EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO E TRAUMAS CRANIOENCEFÁLICO E DA MEDULA ESPINHAL

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

**Área Temática:** Neurociências

**Vigência:** 04/2014 a 04/2016

**Nº no CEPAE-UFPA:** 137-13

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

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

Belém, 05 de março de 2013

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