



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

IJAIR ROGÉRIO COSTA DOS SANTOS

EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E NEUROPROTETORES DO EXTRATO DE
GERGELIM PRETO (*Sesamum indicum* L) EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE
ISQUEMIA ESTRIATAL

BELÉM
2024

IJAIR ROGÉRIO COSTA DOS SANTOS

EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E NEUROPROTETORES DO EXTRATO DE
GERGELIM PRETO (*Sesamum indicum* L) EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE
ISQUEMIA ESTRIATAL

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Neurociências e Biologia Celular do
Instituto de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal do Pará, como
requisito para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Neurociências

Orientador: Prof.º Dr. Wallace Gomes Leal

BELÉM

2024

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

C837e Costa dos Santos, Ijair Rogerio.
Efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores do extrato de gergelim preto (*Sesamum indicum* L) em um modelo experimental de isquemia estriatal / Ijair Rogerio Costa dos Santos. — 2024.
xxix, 130 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Wallace Gomes Leal
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2024.

1. Acidente vascular encefálico. 2. Neuroproteção. 3. Neuroinflamação. 4. Extrato de gergelim. I. Título.

CDD 571.9

IJAIR ROGÉRIO COSTA DOS SANTOS

EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E NEUROPROTETORES DO EXTRATO DE
GERGELIM PRETO (*Sesamum indicum* L) EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE
ISQUEMIA ESTRIATAL

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Neurociências e Biologia Celular do
Instituto de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal do Pará, como
requisito para obtenção do título de Doutor.

APROVADA EM: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wallace Gomes Leal
Orientador / Presidente da Banca
Universidade Federal do Oeste do Pará

1º Examinador
Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior
Universidade Federal do Pará

2º Examinador
Prof. Dr. Enio Mauricio Nery dos Santos
Universidade Federal do Pará

3º Examinador
Prof. Dr^a. Lucidia Fonseca Santiago
Universidade Federal do Pará

Suplente
Prof. Dr. Marcelo Marques Cardoso
Universidade Federal do Pará

Aos meus filhos Arthur e Ana Carolina Godot, por serem uma constante inspiração, e aos meus pais Higino e Maria Santos, pelas muitas lições de vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wallace Gomes Leal, que viabilizou esse projeto de doutorado e que, ao longo desta pesquisa, sempre esteve à disposição para atender meus pedidos de auxílio, gentilmente cedendo seu tempo.

Agradeço ao Prof. Dr. Manoel Filho, que, gentilmente, cedeu o equipamento “Micropipette Puller” usado na preparação de micropipetas à injeção da endotelina-1 na área anatômica do encéfalo de ratos adultos Wistar, escolhida à indução isquêmica focal.

Agradeço a Prof.^a Dra. Réia Silvia Lemos, que tem acompanhado toda minha trajetória no ICB e a principal incentivadora desta qualificação, em nível de doutorado, e, também, por sua amizade e orientação nos momentos de dificuldade vivido neste período.

Agradeço a Prof.^a Dra. Edna Franco, do Instituto Evandro Chagas (IEC), pela dedicação e carinho demonstrados na ajuda necessária para conclusão deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Rafael Lima, por deixar disponível o espaço físico de seu laboratório, pelo exemplo de pesquisador competente e por sua amizade, à realização de atividades experimentais importantes à finalização deste trabalho.

Agradeço ao meu amigo Reginaldo Trindade, pela orientação, não apenas em questões acadêmicas, mas também em questões pessoais, sendo ele um exemplo de caráter a ser seguido.

Agradeço ao Prof. Msc. Rômulo Feio, pela amizade, caráter e excelente profissional, que sempre esteve engajado para ver a realização desse trabalho.

Agradeço a aluna de doutorado Michele Dias, pela sua dedicação, companheirismo e compreensão nos momentos em que precisei dela durante os experimentos laboratoriais.

Agradeço aos funcionários do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas – ICB, mas, em especial ao Sr. Amarildo Gomes de Melo pelas oportunidades de convívio, aprendizado e auxílio constante.

Agradeço aos meus colegas de laboratório Carol Anjos, Carol Ramos, Iury Gonçalves, Amanda Silva e Catarina Brito, sem a parceria de vocês eu não teria conseguido.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	30
1.1. ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO (AVE).....	30
1.2. EVENTOS PREJUDICIAIS NO PARÊNQUIMA CEREBRAL (CASCATA ISQUÊMICA) DURANTE ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO.....	34
1.2.1. Visão Geral da Isquemia Cerebral.....	34
1.2.2. Excitotoxicidade.....	36
1.2.3. Estresse Oxidativo e Nitrosativo.....	37
1.2.4. Ruptura da Barreira Hematoencefálica (BHE).....	38
1.2.5. Apoptose.....	40
1.2.6. Resposta Inflamatória no AVE.....	43
1.3. EPIDEMIOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO.....	51
1.4. PLANTAS MEDICINAIS COMO FONTES DE RECURSOS TERAPEUTICOS.....	57
1.5. JUSTIFICATIVA.....	60
1.6. HIPOTESE EXPERIMENTAL.....	61
1.7. OBJETIVOS.....	62
1.7.1. Objetivos Gerais.....	62
1.7.2. Objetivos Específicos.....	62
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	64
2.1. Animais e Aspectos Éticos.....	64
2.2. Grupos Experimentais.....	64
2.3. Avaliação da Citotoxicidade do Extrato de Gergelim Preto (<i>sesamum indicum</i> L.).....	65
2.4 Perfil de Acidez do Extrato Supercrítico de Gergelim Preto (<i>sesamum indicum</i> L.).....	66
2.5. Isquemia Focal em Roedores.....	67
2.6. Perfusão e Processamento Tecidual.....	68
2.7. Análise Histopatológica e Imuno-histoquímica.....	69
2.7.1. Área da Lesão.....	69
2.7.2. Estudos Imuno-histoquímicos.....	69
2.7.2.1. Neurônios.....	69

2.7.2.2. Células Gliais.....	70
2.7.3. Métodos Histológicos.....	70
2.8. Análise Qualitativa.....	70
2.9. Análise Quantitativa.....	71
2.10. Análise Estatística.....	71
2.11. Matéria-Prima, Fracionamento e Isolamento do Extrato.....	72
2.11.1.Considerações a Respeito da Matéria-Prima: Gergelim preto(<i>Sesamum Indicum</i> L).....	72
2.11.2. Preparação e Caracterização da Matéria Prima.....	73
2.11.3. Obtenção de Extratos por Fracionamento com Fluido Supercritico.....	74
3. RESULTADOS	76
3.1. Histopatologia da Lesão Isquêmica Após Microinjeção de Endotelina-1 no Estriado de Ratos Machos Adultos e Submetidos ao Tratamento Intraperitoneal com Solução Tween 5% e Extrato Supercritico de Gergelim Preto (<i>Sesamum indicum</i> L).....	76
3.2. Reatividade Astrocitária Após Lesão Isquêmica Obtida por Microinjeção de Endotelina-1 no Estriado de Ratos Machos e Submetidos ao Tratamento Intraperitoneal com Solução Tween 5% e Extrato Supercritico de Gergelim Preto (<i>Sesamum indicum</i> L).....	78
3.3. Distribuição de Células Microgliais/ Macrófagos Ativos Após Lesão Isquêmica Obtida por Microinjeção de Endotelina-1 no Estriado de Ratos Machos Submetidos ao Tratamento Intraperitoneal com Solução Tween 5% e Extrato Supercritico de Gergelim Preto (<i>Sesamum indicum</i> L).....	83
3.4. Preservação e Perda neuronal Após Lesão Isquêmica Ocasionalada por Microinjeção de Endotelina-1 no Estriado de Ratos Machos Submetidos ao Tratamento Intraperitoneal com Solução Tween 5% e Extrato Supercritico de Gergelim Preto (<i>Sesamum indicum</i> L).....	89
3.5. Histopatologia do Rim e Fígado de Animais Isquêmicos Tratados com Tween a 5% e com Extrato de Gergelim Preto.....	97
3.6. Índice de Acidez do Extrato de Gergelim Preto (<i>Sesamum indicum</i> L).....	103
3.7. Avaliação Citotóxica do Extrato de Gergelim Preto (<i>Sesamum indicum</i> L) Por Comparação Segundo o Tempo de Exposição.....	103
4. DISCUSSÃO	106

5. CONCLUSÃO.....	117
6. REFERÊNCIAS.....	119
Anexo I- Protocolo de Imunohistoquímica.....	153
Anexo II- Metodos de Coloração: Hematoxilina e Eosina, Tricrômico de Gomori, Reativo de shiff (P. A. S) e Violeta de Cresila.....	155
Anexo III- Parecer/ CEPAE.....	159

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF	Fator indutor de apoptose
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico
anti- ED1	Marcador imuno-histoquímico específico de micróglia
anti-GFAP	Marcador imuno-histoquímico específico de astrócitos
anti-NeuN	Marcador imuno-histoquímico específico de neurônios
Apaf-1	Fator de ativação de protease apoptótica 1
ATP	Adenosina trifosfato
AVE	Acidente vascular encefálico
BAX	Proteína apoptótica
BID	Proteína apoptótica
BCL-2	Proteína apoptótica
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BHE	Barreira hematoencefálica
CC	Corpo caloso
CEs	Células endoteliais
CEPAE	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação
Cito C	Citocromo C
CINC	Citocinas quimioatrativa de neutrófilos
COVID-19	Doença do corona vírus
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Animais de Experimentação
Datp	Deoxiadenosina trifosfato
DA	Doença de Alzheimer
DCNT	Doença crônica não transmissível
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Declaração de óbito
DSE	Sementes de sesamum desengorduradas
DREADED-D`s	Exclusão, invalidez e morte
EAAT2	Transportador de aminoácidos excitatórios
ED-1+	Micróglia/macrófagos imunomarcados
EEP	Elementos do espaço porta/hepático
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

eNOS	Oxido nítrico sintase endotelial
EO	Estresse oxidativo
ERRO	Espécie reativa de oxigênio
ESGP	Extrato supercrítico de gergelim preto
ESPIN	Emergência de saúde pública de importância nacional
ET-1	Endotelina -1
E200MV R	Microscópio binocular- Modelo Eclipse
FADD	Proteína FAS associada ao domínio de morte
FACET	Laboratório de Análises Químicas da Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia
FFA	Ácidos graxos livres
GAP	Junção comunicante
GDNF	Fator neurotrófico derivado de células gliais
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GFAP+	Astrócitos imunomarcados
GRL	Glomérulo renal
HE	Hematoxilina e eosina
HEP	Hepatócitos
HO-	Hidroxila
H2O2	Peróxido de hidrogênio
IL-1	Interleucina-1
IL- 1 β	Interleucina-1 beta
IL-1ra	Receptor antagonista da interleucina-1 beta
IL-2	Interleucina- 2
IL-6	Interleucina- 6
IL-8	Interleucina- 8
IL-10	Interleucina-10
IL-15	Interleucina-15
IFN- γ	Interferon gama
iNOS	Oxido nítrico sintase induzida
i.p.	Intraperitoneal
IRM	Imagens por ressonância magnética
KDa	Quilodalton

LCR	Líquido cefalorraquidiano
LME	Lesão da medula espinhal
LPS	Lipopolissacarídeo
MAC	Moléculas de adesão celular
MAPKs	Proteína-quinases ativadas por mitógenos
MCP-1	Proteína quimioatrativa de monócitos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MIP-1	Proteína inflamatória de macrófagos
μl	Microlitro
MMPs	Metaloproteinase da matriz
MRF-1	Fator de resposta microglial
MS	Ministério da saúde
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NaOH	Hidróxido de sódio
NeuN	Proteína nuclear específica de neurônios
NeuN+	Neurônios imunomarcados
NF-κB	Fator nuclear- kappa Beta
NH ₂	Terminal amino
NMDAR	Receptores N-metil-D- Aspartato
NMDA	N-methyl-D-aspartato
nNOS	Oxido nítrico sintase neuronal
NOO ₂	Peroxinitrito
NO	Oxido nítrico
NOX	Oxidases
NOS	Oxido nítrico sintase
OACM	Oclusão da artéria cerebral média
O ₂ ⁻	Superóxido
OGD	Redução de oxigênio e glicose
OMS	Organização mundial de saúde
PARP	Enzima poli (ADP-ribose) polimerase
P.A.S	Ácido Periódico-Schiff
PBS	Tampão fosfato salina

PCR	Reação em cadeia da polimerase
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
PJ	Proteínas juncionais
PMols	Picomols
PMEN	Permeabilidade na membrana externa mitocondrial
PPAR- γ	Proliferador de peroxissoma-ativado pelo receptor gama
PUFA	Ácidos graxos fração poli-insaturada
P38	Proteína do grupo das quinases
RIC	Ratos isquêmicos controles
RIC7D	Ratos isquêmicos controles 7 dias de sobrevida
RM	Ressonância magnética
RIT7D	Ratos isquêmicos tratados 7 dias de sobrevida
RIT	Ratos isquêmicos tratados
rt-PA	Ativador do plasminogênio tecidual recombinante
SAMU	Serviço de Atendimento Móvel de Urgência
SARS-coV-2	Vírus causador da síndrome respiratória aguda grave
SFA	Ácidos graxos fração saturada
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
Speed SFE 2	Unidade de extração supercrítica
ST	Estriado
SUS	Sistema único de saúde
TC	Tomografia computadorizada
tCD	Linfócitos T
TG	Tricrômico de Gomori
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TIA	Acidente isquêmico transitório
TLR4	Receptor de membrana (Toll-like)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TR	Túbulo renal
T0	Tubo em tempo inicial
T20	Tubo em tempo 20 minutos
T40	Tubo em tempo 40 minutos

UBS	Unidade básica de saúde
VCL	Veia centrolobular
VCAM- 1	Moléculas de adesão vascular- 1
VL	Ventrículo lateral
ΔG	Energia livre de Gibbs

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Imagens do cérebro humano. (A, C, D) Angiografia; (B) Tomografia Computadorizada (TC); (E, F, G) Ressonância Magnética (IRM). Presença de lesão isquêmica e/ou hemorrágica no parênquima cerebral.	31
Figura 02	Acidente Vascular Encefálico (AVE) em humanos (A) e em ratos (B). Área afetada (*) ocasionada por oclusão da Artéria Cerebral Média (OACM).	33
Figura 03	Progressão dos eventos bioquímicos prejudiciais ao parênquima cerebral durante Acidente Vascular Encefálico (AVE) após horas, dias e semanas.	35
Figura 04	Apoptose. Via intrínseca mitocondrial causando expressão e/ou ativação de proteínas; via extrínseca com ligantes que ativam receptores de morte.	43
Figura 05	Etapas à avaliação da citotoxicidade de extrato de gergelim (<i>sesamum indicum</i> L). Preparo da solução, centrifugação, transferência e leitura.	66
Figura 06	Desenho experimental à obtenção da lesão isquêmica, dose injetada do extrato e o intervalo de tempo de cada aplicação.	68
Figura 07	Esquema que identifica a posição das secções nas lâminas à quantificação das células imunomarcadas e imagem (corte coronal) evidenciando o local da lesão isquêmica após injeção de endotelina-1(ET-1).	71
Figura 08	Estágios de crescimento do gergelim preto (<i>Sesamum indicum</i> L).	72
Figura 09	Speed SFE2 da Appleid Separations	74

- Figura 10** Imagens de amostras de tecidos cerebrais corados com violeta de cresila mostrando que o AVE isquêmico foi induzido no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1). **Linha superior:** animal controle (Tween), 1 dia após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 1 dia após AVE. **Setas:** apontam para infiltrado de células polimorfonucleares; **Linha pontilhada:** área isquêmica; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **VL:** Ventrículo lateral; **ST:** Estriado. **Barra de escala:** 50 μm (A, D); 100 μm (B, E.); 400 μm . 77
- Figura 11** Imagens de amostras de tecidos cerebrais corados com violeta de cresila mostrando que o AVE isquêmico foi induzido no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1). **Linha superior:** animal controle (Tween), 7 dias após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 7 dias após AVE. **Setas:** apontam para infiltrado de células polimorfonucleares; **Linha pontilhada:** área isquêmica; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **VL:** Ventrículo lateral; **ST:** Estriado. **Barra de escala:** 50 μm (A, D); 100 μm (B, E.); 400 μm . 77
- Figura 12** Encéfalo de rato isquêmico. **Seta:** indicando edema; **Asterisco (*):** ramo da artéria cerebral média. 78
- Figura 13** Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcção para célula glial (Astrócitos) mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz resposta astrocitária e imunomarcção por anticorpos anti-GFAP. **Linha superior:** animal controle (Tween), 1 dia após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 1 dia após AVE. **Setas:** apontam para astrócitos reativos; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **VL:** Ventrículo lateral; **ST:** Estriado. **Barra de escala:** 50 μm (A, D); 100 μm (B, E.); (C, F) 400 μm . 79

- Figura 14** Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcação 80
para célula glial (Astrócitos) mostrando que o AVE isquêmico no
Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz resposta
astrocitária e imunomarcação por anticorpos anti-GFAP. **Linha
superior:** animal controle (Tween), 1 dia após AVE; **Linha
inferior:** animal tratado (Gergelim), 1 dia após AVE. **Setas:**
apontam para astrócitos reativos; **Asterisco (*):** local de injeção
de ET-1; **VL:** Ventrículo lateral; ST: Estriado. **Barra de escala:**
50 μm (A, D); 100 μm (B, E.); (C, F) 400 μm .
- Figura 15** Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcação 80
para célula glial (Astrócitos) mostrando que o AVE isquêmico no
Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz resposta
astrocitária e imunomarcação por anticorpos anti-GFAP. **Linha
superior:** animal controle (Tween), 1 dia após AVE; **Linha
inferior:** animal tratado (Gergelim), 1 dia após AVE. **Setas:**
apontam para astrócitos reativos; **Asterisco (*):** local de injeção
de ET-1; **VL:** Ventrículo lateral; ST: Estriado. **Barra de escala:**
50 μm (A, D); 100 μm (B, E.); (C, F) 400 μm .
- Figura 16** Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcação 81
para célula glial (Astrócitos) mostrando que o AVE isquêmico no
Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz resposta
astrocitária e imunomarcação por anticorpos anti-GFAP. **Linha
superior:** animal controle (Tween), 7 dias após AVE; **Linha
inferior:** animal tratado (Gergelim), 7 dias após AVE. **Setas:**
apontam para astrócitos reativos; **Asterisco (*):** local de injeção
de ET-1; **VL:** Ventrículo lateral; ST: Estriado. **Barra de escala:**
50 μm (A, D); 100 μm (B, E.) ;(C, F) 400 μm .

- Figura 17** Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcação 81
para célula glial (Astrócitos) mostrando que o AVE isquêmico no
Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz resposta
astrocitária e imunomarcação por anticorpos anti-GFAP. **Linha
superior:** animal controle (Tween), 7 dias após AVE; **Linha
inferior:** animal tratado (Gergelim), 7 dias após AVE. **Setas:**
apontam para astrócitos reativos; **Asterisco (*):** local de injeção
de ET-1; **VL:** Ventrículo lateral; ST: Estriado. **Barra de escala:**
50 μm (A, D); 100 μm (B, E.); (C, F) 400 μm
- Figura 18** Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcação 82
para célula glial (Astrócitos) mostrando que o AVE isquêmico no
Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz resposta
astrocitária e imunomarcação por anticorpos anti-GFAP. **Linha
superior:** animal controle (Tween), 7 dias após AVE; **Linha
inferior:** animal tratado (Gergelim), 7 dias após AVE. **Setas:**
apontam para astrócitos reativos; **Asterisco (*):** local de injeção
de ET-1; **VL:** Ventrículo lateral; ST: Estriado. **Barra de escala:**
50 μm (A, D); 100 μm (B, E.); (C, F) 400 μm .
- Figura 19** Análise quantitativa de células gliais (astrócitos GFAP⁺ / campo) 82
imunorreativos na área isquêmica após injeção de endotelina-1
(ET-1). **Controle:** grupo isquêmico tratado apenas com Tween;
Tratado: grupo isquêmico tratado apenas com extrato de
gergelim. ($p < 0,05$).
- Figura 20** Análise quantitativa de células gliais (astrócitos GFAP⁺ / campo) 83
imunorreativos na área isquêmica após injeção de endotelina-1
(ET-1). **Controle:** grupo isquêmico tratado apenas com Tween;
Tratado: grupo isquêmico tratado apenas com extrato de
gergelim. ($p < 0,05$).

- Figura 21** Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcção 84
para células gliais (micróglias) mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz imunomarcção positiva para essas células (ED-1⁺). **Linha superior:** animal controle (Tween), 1 dia após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 1 dia após AVE. **Setas:** apontam para células (micróglias/macrófagos) ED-1⁺; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado. **Barra de escala:** 50 µm (A, D); 100 µm (B, E.) ;(C, F) 400 µm.
- Figura 22** Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcção 85
para células gliais (micróglias) mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz imunomarcção positiva para essas células (ED-1⁺). **Linha superior:** animal controle (Tween), 1 dia após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 1 dia após AVE. **Setas:** apontam para células (micróglias/macrófagos) ED-1⁺; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado. **Barra de escala:** 50 µm (A, D); 100 µm (B, E.); (C, F) 400 µm.
- Figura 23** Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcção 85
para células gliais (micróglias) mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz imunomarcção positiva para essas células (ED-1⁺). **Linha superior:** animal controle (Tween), 1 dia após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 1 dia após AVE. **Setas:** apontam para células (micróglias/macrófagos) ED-1⁺; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado. **Barra de escala:** 50 µm (A, D); 100 µm (B, E.) ;(C, F) 400 µm.

- Figura 24** Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcação 86
para células gliais (micróglias) mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz imunomarcação positiva para essas células (ED-1⁺). **Linha superior:** animal controle (Tween), 7 dias após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 7 dias após AVE. **Setas:** apontam para células (micróglias/macrófagos) ED-1⁺; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado. **Barra de escala:** 50 µm (A, D); 100 µm (B, E.); (C, F) 400 µm.
- Figura 25** Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcação 86
para células gliais (micróglias) mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz imunomarcação positiva para essas células (ED-1⁺). **Linha superior:** animal controle (Tween), 7 dias após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 7 dias após AVE. **Setas:** apontam para células (micróglias/macrófagos) ED-1⁺; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado. **Barra de escala:** 50 µm (A, D); 100 µm (B, E.); (C, F) 400 µm.
- Figura 26** Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcação 87
para células gliais (micróglias) mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz imunomarcação positiva para essas células (ED-1⁺). **Linha superior:** animal controle (Tween), 7 dias após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 7 dias após AVE. **Setas:** apontam para células (micróglias/macrófagos) ED-1⁺; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado. **Barra de escala:** 50 µm (A, D); 100 µm (B, E.); (C, F) 400 µm.

- Figura 27** Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcação 87
para células gliais (micróglias) mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz imunomarcação positiva para essas células (ED-1⁺). **Linha superior:** animal controle (Tween), 7 dias após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 7 dias após AVE. **Setas:** apontam para células (micróglias/macrófagos) ED-1⁺; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado. **Barra de escala:** 50 µm (A, D); 100 µm (B, E.); (C,F) 400 µm
- Figura 28** Análise quantitativa de células gliais (microglias/macrófagos 88
ED1⁺ / campo) imunorreativas na área isquêmica após injeção de endotelina-1 (ET-1). **Controle:** grupo isquêmico tratado apenas com Tween; **Tratado:** grupo isquêmico tratado apenas com extrato de gergelim. (p<0,05).
- Figura 29** Análise quantitativa de células gliais (microglias/macrófagos 88
ED1⁺ / campo) imunorreativas na área isquêmica após injeção de endotelina-1 (ET-1). **Controle:** grupo isquêmico tratado apenas com Tween; **Tratado:** grupo isquêmico tratado apenas com extrato de gergelim. (p<0,05).
- Figura 30** Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcação 90
para neurônios mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz perda neuronal e imunomarcação positiva com anticorpo anti-NeuN. **Linha superior:** animal controle (Tween), 1 dia após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 1 dia após AVE. **Setas:** apontam para células NeuN⁺; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado; **VL:** Ventrículo lateral. **Barra de escala:** 50 µm (A, D); 100 µm (B, E.); (C, F) 400 µm.

- Figura 31** Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcação 90
para neurônios mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz perda neuronal e imunomarcação positiva com anticorpo anti-NeuN. **(a)** e **(d)** ênfase para preservação de neurônios na periferia; **(c)** e **(f)** ênfase para de preservação de neurônios no centro da lesão; **Linha superior**: animal controle (Tween), 1 dia após AVE; **Linha inferior**: animal tratado (Gergelim), 1 dia após AVE. **Setas**: apontam para células NeuN⁺; **Asterisco (*)**: local de injeção de ET-1; **CC**: Corpo Caloso; **ST**: Estriado; **VL**: Ventrículo lateral. **Barra de escala**: 50 µm (A, D); 100 µm (B, E.); (C,F) 400 µm.
- Figura 31a** Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcação 96
para neurônios mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz perda neuronal e imunomarcação positiva com anticorpo anti-NeuN. **(a)** e **(d)** ênfase para preservação de neurônios na periferia; **(c)** e **(f)** ênfase para de preservação de neurônios no centro da lesão; **Linha superior**: animal controle (Tween), 1 dia após AVE; **Linha inferior**: animal tratado (Gergelim), 1 dia após AVE. **Setas**: apontam para células NeuN⁺; **Asterisco (*)**: local de injeção de ET-1; **CC**: Corpo Caloso; **ST**: Estriado; **VL**: Ventrículo lateral. **Barra de escala**: 50 µm (A, D); 100 µm (B, E.); (C, F) 400 µm.
- Figura 32** Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcação 91
para neurônios mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz perda neuronal e imunomarcação positiva com anticorpo anti-NeuN. **Linha superior**: animal controle (Tween), 1 dia após AVE; **Linha inferior**: animal tratado (Gergelim), 1 dia após AVE. **Setas**: apontam para células NeuN⁺; **Asterisco (*)**: local de injeção de ET-1; **CC**: Corpo Caloso; **ST**: Estriado; **VL**: Ventrículo lateral. **Barra de escala**: 50 µm (A, D); 100 µm (B, E.); (C, F) 400 µm.

- Figura 33** Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcação 91
para neurônios mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz perda neuronal e imunomarcação positiva com anticorpo anti-NeuN. **Linha superior:** animal controle (Tween), 1 dia após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 1 dia após AVE. **Setas:** apontam para células NeuN⁺; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado; **VL:** Ventrículo lateral. **Barra de escala:** 50 µm (A, D); 100 µm (B, E.);(C,F) 400 µm.
- Figura 34** Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcação 92
para neurônios mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz perda neuronal e imunomarcação positiva com anticorpo anti-NeuN. **Linha superior:** animal controle (Tween), 7 dias após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 7 dias após AVE. **Setas:** apontam para células NeuN⁺; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado; **VL:** Ventrículo lateral. **Barra de escala:** 50 µm (A, D); 100 µm (B, E.) ;(C, F) 400 µm.
- Figura 35** Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcação 92
para neurônios mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz perda neuronal e imunomarcação positiva com anticorpo anti-NeuN. **Linha superior:** animal controle (Tween), 7 dias após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 7 dias após AVE. **Setas:** apontam para células NeuN⁺; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado; **VL:** Ventrículo lateral. **Barra de escala:** 50 µm (A, D); 100 µm (B, E.); (C, F)400 µm.

- Figura 36** Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcação 93
para neurônios mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz perda neuronal e imunomarcação positiva com anticorpo anti-NeuN. **Linha superior:** animal controle (Tween), 7 dias após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 7 dias após AVE. **Setas:** apontam para células NeuN⁺; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado; **VL:** Ventrículo lateral. **Barra de escala:** 50 µm (A, D); 100 µm (B, E.); (C, F) 400 µm.
- Figura 36a** Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcação 96
para neurônios mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz perda neuronal e imunomarcação positiva com anticorpo anti-NeuN. **(a)** e **(d)** ênfase para preservação de neurônios na periferia; **(c)** e **(f)** ênfase para de preservação de neurônios no centro da lesão; **Linha superior:** animal controle (Tween), 7 dias após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 7 dias após AVE. **Setas:** apontam para células NeuN⁺; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado; **VL:** Ventrículo lateral. **Barra de escala:** 50 µm (A, D); 100 µm (B, E.); (C,F) 400 µm.
- Figura 37** Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcação 93
para neurônios mostrando strando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz perda neuronal e imunomarcação positiva com anticorpo anti-NeuN. **Linha superior:** animal controle (Tween), 7 dias após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 7 dias após AVE. **Setas:** apontam para células NeuN⁺; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado; **VL:** Ventrículo lateral. **Barra de escala:** 50 µm (A, D); 100 µm (B, E.); (C, F) 400 µm.

- Figura 38** Análise quantitativa de neurônios (NeuN⁺/campo) 94
imunomarcados na área isquêmica após injeção de endotelina-1 (ET-1). **Controle:** grupo isquêmico tratado apenas com Tween 5%; **Tratado:** grupo isquêmico tratado apenas com extrato de gergelim 75mg/2x dia. (p<0,05).
- Figura 39** Análise quantitativa de neurônios (NeuN⁺/campo) 94
imunomarcados na área isquêmica após injeção de endotelina-1 (ET-1). **Controle:** grupo isquêmico tratado apenas com Tween 5%; **Tratado:** grupo isquêmico tratado apenas com extrato de gergelim 75mg/2x dia. (p<0,05).
- Figura 40** Análise quantitativa de neurônios (NeuN⁺/campo) 95
imunomarcados no centro da área isquêmica após injeção de endotelina-1 (ET-1). **Controle:** grupo isquêmico tratado apenas com Tween 5%; **Tratado:** grupo isquêmico tratado apenas com extrato de gergelim 75mg/2x dia. (p<0,05).
- Figura 41** Análise quantitativa de neurônios (NeuN⁺/campo) 95
imunomarcados no centro da área isquêmica após injeção de endotelina-1 (ET-1). **Controle:** grupo isquêmico tratado apenas com Tween 5%; **Tratado:** grupo isquêmico tratado apenas com extrato de gergelim 75mg/2x dia. (p<0,05).
- Figura 42** Imagens de amostras de tecidos de fígados corados com 98
Tricrômico de Gomori (TG) mostrando estruturas internas desse órgão, aparentemente sem alterações após 24 horas de tratamento. **Linha superior:** amostra de fígado de animal controle (Tween); **Linha inferior:** amostra de fígado de animal tratado (Gergelim). **Setas:** apontam para hepatócitos; **VCL:** Veia centrolobular; **HEP:** hepatócitos. **Barra de escala:** 50 µm (A, D); 100 µm (B, E.); (C, F) 400 µm.

- Figura 43** Imagens de amostras de tecidos de fígados corados com Hematoxilina e Eosina (HE) mostrando estruturas internas desse órgão aparentemente sem alterações após 24 horas de tratamento. **Linha superior:** amostra de fígado de animal controle (Tween); **Linha inferior:** amostra de fígado de animal tratado (Gergelim). **Setas:** apontam para hepatócitos; **VCL:** Veia centrolobular; **Hep:** hepatócitos. **Barra de escala:** 50 µm (A, D); 100 µm (B, F.); 400 µm. 98
- Figura 44** Imagens de amostras de tecidos de rins corados com Hematoxilina e Eosina (HE) mostrando estruturas internas desse órgão aparentemente sem alterações após 24 horas de tratamento. **Linha superior:** amostra de rim de animal controle (Tween); **Linha inferior:** amostra de rim de animal tratado (Gergelim). **Setas:** apontam para glomérulos renais; **Gl:** Glomérulo Renal; **Tr:** Túbulo Renal. **Barra de escala:** 50 µm (A, D); 100 µm (B, E.); (C, F) 400 µm. 99
- Figura 45** Imagens de amostras de tecidos de rins corados com Tricrômico de Gomori (TG) mostrando estruturas internas desse órgão aparentemente sem alterações após 24 horas de tratamento. **Linha superior:** amostra de fígado de animal controle (Tween); **Linha inferior:** amostra de fígado de animal tratado (Gergelim). **Setas:** apontam para Glomérulos Renais; **Gl:** Glomérulo Renal; **Tcp:** Túbulos Renais. **Barra de escala:** 50 µm (A, C); 400 µm (B, D). 100
- Figura 46** Imagens de amostras de tecidos de fígado corados com Hematoxilina /Eosina (HE) e Tricrômico de Gomori (TG) mostrando estruturas internas desse órgão aparentemente sem alterações após 7 dias de tratamento. **Linha superior:** amostra de fígado de animal controle (Tween); **Linha inferior:** amostra de fígado de animal tratado (Gergelim). **Setas:** apontam para hepatócitos; **VCL:** Veia centrolobular; **HEP:** hepatócitos. **Barra de escala:** 50 µm (A, D); 400 µm (B, E). 101

- Figura 47** Imagens de amostras de tecidos de rins corados com P.A.S 102
(Reativo de Shiff) mostrando estruturas internas desse órgão aparentemente sem alterações após 7 dias de tratamento.
Linha superior: amostra de rim de animal controle (Tween);
Linha inferior: amostra de rim de animal tratado (Gergelim).
Setas: apontam para Túbulos renais; **Tcp:** túbulos contorcidos proximais; **Glr:** Glomérulo renal. **Barra de escala:** 100 μ m (A, C); 400 μ m (B, D).
- Figura 48** Imagens de amostras de tecidos de rins corados com P.A.S 103
(Reativo de Shiff) mostrando estruturas internas desse órgão aparentemente sem alterações após 24 horas de tratamento.
Linha superior: amostra de rim de animal controle (Tween);
Linha inferior: amostra de rim de animal tratado (Gergelim).
Setas: apontam para Glomérulos renais; **Tr:** Túbulos renais;
Glr: Glomérulo renal. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, E.); (C, F) 400 μ m.
- Figura 49** Avaliação Citotóxica do Extrato de Gergelim Preto (*Sesamum* 105
indicum L). Tabela de valores de concentrações do extrato x tempo e percentual de hemólise. Distribuição em placas e tubo de ensaios de amostras: controle (-) e controle (+).

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Grupos Experimentais, descrição e quantidade de animais por grupo.	64
Tabela 02	Propriedade hemolítica do extrato supercrítico de gergelim (<i>Sesamum indicum</i>).	104

RESUMO

Acidente Vascular Encefálico (AVE) é uma neuropatologia caracterizada como o surgimento súbito global ou focal de déficits da função neurológica de duração superior a 24 horas ou que leve a morte, cuja única causa reside na origem vascular. Estudos sobre a incidência, comprometimento físico e mortalidade enquadram o AVE como a segunda causa de morte no mundo e a principal complicação orgânica que leva às disfunções físico-neurológicas, frequentemente, graves e permanentes. A indução do AVE em animais de experimentação e o entendimento de sua fisiopatologia, bem como a busca de tratamentos que minimizem os danos neurológicos e estimulem a recuperação morfofuncional do indivíduo afetado são temas de grande relevância científica e clínica. Neste estudo, investigamos os possíveis efeitos neuroprotetores e/ou anti-inflamatórios do extrato supercrítico de gergelim preto (*Sesamun indicum L.*) após lesão isquêmica focal por microinjeções de 80 pmol de endotelina-1 no estriado de ratos adultos, usando as coordenadas estereotáticas: 1,2 mm, anterior-posterior; 2,5 mm, médio-lateral; 4,0 mm, dorsoventral. Após a indução do AVE, os grupos controles foram tratados com tween a 5% e os tratados receberam 150 mg/kg de gergelim, ambos, por via intraperitoneal, em duas doses diárias de 75 mg/kg. A neuropatologia foi obtida em secções encefálicas com 50 e 20 µm de espessuras e coradas com violeta de cresila, para identificar a área de lesão, e/ou imunomarcadas por anticorpos específicos à identificação de neurônios (anti-NeuN), astrócitos (anti-GFAP) e micróglia (anti-ED1). Secções de 5 µm de espessura de rim e fígado corados por métodos histológicos e histoquímicos não mostraram alterações morfológicas nas células que compõem esses órgãos essenciais, sugerindo baixa toxicidade do extrato. Todas as secções coradas e/ou imunomarcadas foram visualizadas em microscópio óptico e seus campos mais ilustrativos, em todos os tempos de sobrevida e grupos experimentais, foram capturados digitalmente e editados em computador. A quantificação das células NeuN+(neurônios), micróglia/macrófagos (ED1+) e astrócitos (GFAP+) na área de lesão, três secções por lâmina, todo campo ao redor de lesão por secção, com auxílio de uma gradícula de área 0,0625 mm² na ocular possibilitou o teste t-Student à análise estatística entre os grupos e o uso do programa Microsoft Excel à plotagem dos gráficos. Por fim, uma caracterização da citotoxicidade *in vitro*, bem como a verificação do índice de acidez do extrato revelou baixa acidez e mínima agressividade em células sanguíneas, que ratifica o uso do extrato supercrítico em estudos que visem o tratamento de doenças agudas e crônicas no SNC.

Palavras chaves: Acidente vascular encefálico; neuroproteção; extrato de gergelim; neuroinflamação.

ABSTRACT

Stroke is a neuropathology characterized as the sudden global or focal emergence of deficits in neurological function last more than 24 hours or leading to death the only cause of which lies in vascular origin. Studies on incidence, physical impairment and mortality classify stroke as the second cause of death in the world and the main organic complication that leads to physical-neurological dysfunction, which are often serious and permanent. The induction of stroke in experimental animals and the understanding of its pathophysiology, as well as the search for treatments that minimize neurological damage and stimulate the morphofunctional recovery of the affected individual are topics of great scientific and clinical relevance. In this study, we investigated the possible neuroprotective and/or anti-inflammatory effects of supercritical black sesame extract (*Sesamum indicum* L) after focal ischemic injury by microinjections of 80 pmol of endothelin-1 into the striatum of adult rats, using the stereotaxic coordinates: 1,2 mm, anteroposterior; 2,5, mediolateral; 4,0 mm, dorsoventral. After stroke induction, the control groups were treated with 5% tween and the treated groups received 150mg/kg of sesame, both intraperitoneally, in two daily doses of 75mg/kg. Neuropathology was obtained in brain sections 50 and 20 μm thick and stained with cresyl violet, to identify the area of injury, and/or immunostained with specific antibodies to identify neurons (anti-NeuN), astrocytes (anti-GFAP) and microglia (anti-ED-1). 5 μm thick sections of kidney and liver stained by histological and histochemical methods showed no morphological changes in the cells that make up these essential organs, suggesting low toxicity of the extract. All stained and/or immunostained sections were viewed under an optical microscope and their most illustrative fields, in the survival times and experimental groups, were digitally captured and edited on a computer. Quantification of NeuN+ cells (neurons, microglia/macrophages (ED-1+), astrocytes (GFAP+)) in the lesion area, three sections per slide, the entire field around the lesion per section, with the aid of a grid with an area of 0.0625 mm² in the eyepiece, enabled the Student's t-test for statistical analysis between groups and the use of the Microsoft Excel program to plot the graphs. Finally, a characterization of in vitro cytotoxicity, as well as verification of the acidity index of the extract revealed low acidity and minimal aggressiveness in blood cells, which confirms the use of the supercritical extract in studies aimed at treating acute and chronic diseases in the CNS.

Key words: Stroke; neuroprotection; sesame extract; neuroinflammation.

1. INTRODUÇÃO

1.1. ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO (AVE)

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é caracterizado como uma doença crônica não transmissível (DCNT) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) a define como o surgimento súbito focal ou global de déficits da função neurológica com duração superior a 24 horas ou que leve à morte, cuja única causa reside na origem vascular (MARKUS, 2008; FEIGIN et al., 2016; BERNAL et al., 2020).

O AVE pode ser consequência da interrupção de uma via vascular de grande e/ou pequeno calibre em uma área no encéfalo devido a formação de um trombo; o resultado de uma lesão embolítica com ou sem o prévio conhecimento de histórico cardíaco e/ou arterial do indivíduo; resultar de uma hiperfusão sistêmica na borda da área de lesão à trombose venosa e/ou hemorragia com ruptura da parede vascular intracerebral e subaracnóidea (BROUNS, DE DEYN, 2009; THIEBAUT DE SCHOTTEN et al., 2015; FEIGIN et al., 2016). Quando ocorre hemorragia, o extravasamento seguido do acúmulo de sangue e seus derivados atingem o parênquima neural e o espaço dural ocasionando uma condição patológica considerada grave. Os fatores predisponentes mais frequentes ao AVE, são: hipertensão, diabetes, causas cardíacas, tabagismo, obesidade abdominal, hiperlipidemia, sedentarismo, consumo de álcool, dieta alimentar, estresse psicossocial e, recentemente, a depressão, mas, independentemente do fator predisponente que resulta o AVE, o comprometimento vascular atua como causa primária em 85% a 90% da lesão isquêmica (MARKUS, 2008; AMELIA; CHARLES; MITCHELL, 2017; SANTOS; LUQUINI; FAGUNDES, 2020).

A imediata abordagem dos pacientes com AVE é de fundamental importância para se evitar a rápida evolução e o prognóstico da doença. Os acometidos devem ser prontamente atendidos pela equipe de saúde e encaminhados a um neurologista para atendimento inicial e com o suporte de uma excelente infraestrutura hospitalar (MARKUS, 2008; AMELIA; CHARLES; MITCHELL, 2017). O diagnóstico clínico de AVE deve ser preciso, mas o tipo e a localização exata podem ser menos imediatos. Essa abordagem é melhor alcançada por imagens cerebrais recentes dos pacientes acometidos, obtidas por ressonância magnética (RM), tomografia computadorizada (TC) e por emissão de pósitrons (PET) - componentes importantes tanto na identificação do tipo, área comprometida e no direcionamento à aplicação de

intervenções médicas na prática clínica diária (SANDERS; JORGENSEN; MASHOUR, 2015). Nas neuroimagens, a hemorragia elucida a presença de sangue no parênquima cerebral que se acumula e pressiona áreas adjacentes. Entretanto, a constatação de um fluxo insuficiente de sangue, incapaz de satisfazer as necessidades de oxigênio e demais substâncias, sinaliza para um quadro isquêmico que representa a maioria dos casos de AVE (KRISHNAMURTHI, et al., 2013; MICHELLE; LIEBESKIND, 2016) (**Figura 1**). A maioria das pesquisas experimentais e clínicas têm se concentrado na interrupção do fluxo sanguíneo ao córtex, substância branca (gânglios da base), em vez de todo território cerebral, sendo as regiões mais investigadas àquelas onde há maior grau de hipofusão sanguínea que progridem rapidamente para danos irreversíveis (KRISHNAMURTHI, et al., 2013; MICHELLE; LIEBESKIND, 2016).

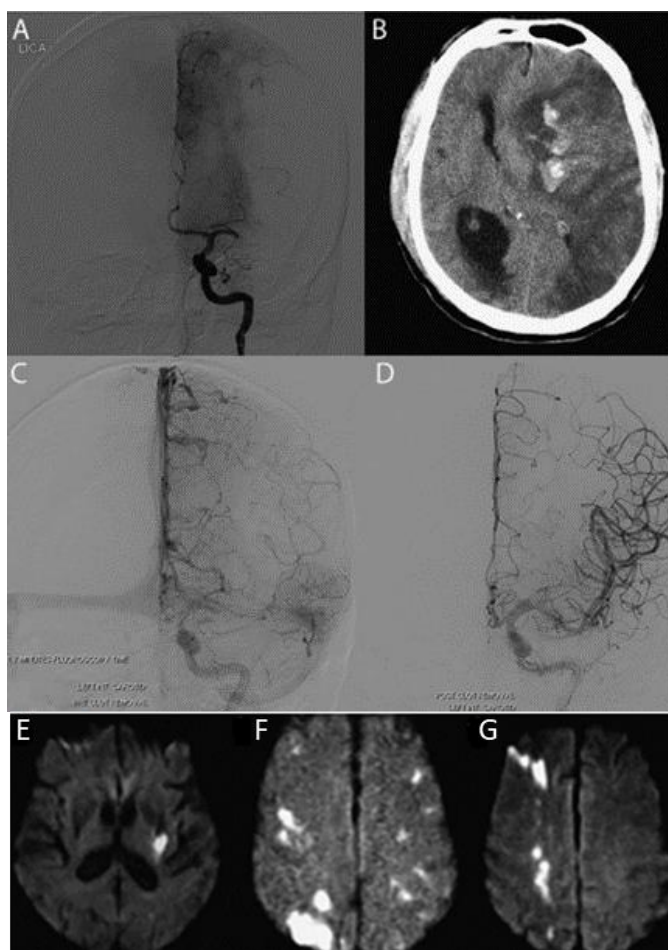


Figura 1: Imagens do cérebro humano. (A, C, D) Angiografia; (B) Tomografia Computadorizada (TC); (E, F, G) Ressonância Magnética (RM). Presença de lesão isquêmica e/ou hemorrágica no parênquima cerebral (MICHELLE; LIEBESKIND, 2016).

Modelos experimentais de isquemia cerebral são amplamente adotados com esse propósito, na busca de consistente avaliação e tratamento dessa doença (FLURI et al., 2015). Devido a uma etiologia heterogênea e com um amplo espectro de manifestações, alguns modelos são necessários para delinear as especificidades evidenciadas nessa neuropatologia (CLEMENS, 2017; FLURI et al., 2015). A ampla lacuna entre o AVE isquêmico obtido em modelos experimentais com os vivenciados em humanos tem um caráter preocupante, uma vez que, com exceção da recanalização do vaso ocluído, nenhuma das centenas de estratégias neuroprotetoras experimentais puderam ser introduzidas na clínica médica até o momento (JICKLING; SHARP, 2015). No entanto, muitos aspectos da fisiopatologia do AVE foram identificados nesses modelos e, posteriormente, deram suporte à identificação de áreas e mecanismos moleculares específicos dessa neuropatologia (MERGENTHALER; DIRNAGL; MEISEL, 2004). O conceito de penumbra, a identificação da propagação de despolarizações corticais, a detecção de neurogênese pós-AVE e a neuroinflamação são exemplos proeminentes de pesquisas experimentais em AVE (MERGENTHALER; DIRNAGL; MEISEL, 2004; CLEMENS, 2017).

A penumbra isquêmica, um componente importante para a progressão do dano cerebral, tornou-se um marco na pesquisa de AVE, pois essa área pode ser recuperada e é alvo de terapia celular (EBINGER et al., 2009). Métodos de ressonância magnética (RM) possibilitam a visualização da penumbra, permitindo uma estimativa na recuperação desse local, onde há uma redução do suprimento de sangue abaixo de 15% a 20% dos níveis basais resultante do surgimento de uma área danificada no parênquima cerebral devido a uma morte celular necrótica (núcleo isquêmico) de rápida evolução (MERGENTHALER; DIRNAGL; MEISEL, 2004). Os erros e acertos, no decorrer da investigação da fisiopatologia do AVE em modelos experimentais, são válidos e de extrema importância, pois legitimam pesquisas planejadas ao entendimento das múltiplas vias moleculares acionadas no ambiente isquêmico. Outrossim, os resultados obtidos devem ser trasladados à realidade do AVE em humanos por comparação com tecidos cerebrais “*post-mortem*” por AVE, legitimando a necessidade de construção de grandes bancos de cérebros “*post-mortem*” por AVE, uma questão que é ignorada em muitos países (JICKLING; SHARP, 2015).

Nas últimas três a quatro décadas, considerando-se os custos mais baixos de aquisição, manutenção, métodos de monitoramento e processamentos de tecidos mais simples - bem como questões éticas -, camundongos e ratos são os espécimes mais usados em modelos de AVE *in vivo* (VANUCCI et al., 2001; HOSSMANN, 2006). No entanto, é sempre necessário ter em mente que os resultados dos modelos de AVE em roedores podem não representar a verdade dos mecanismos moleculares envolvidos nessa neuropatologia (JICKLING; SHARP, 2015; CLEMENS, 2017; DEREK; HIRANMOY, 2020). Geralmente, os modelos enfocam a busca da aproximação da lesão real em humanos e o estudo do infarto de grandes dimensões, sendo o modelo mais utilizado o da Oclusão da Artéria Cerebral Média (OACM) em ratos, relacionado à especificidade sexual por aparentemente influenciar na extensão da lesão (VANUCCI et al., 2001; WISE et al., 2001; DEREK; HIRANMOY, 2020) (**Figura 2**). Nessa abordagem experimental, vários eventos iônicos, moleculares e genéticos são investigados: a perda da função da bomba iônica de membrana, a liberação de neurotransmissores excitatórios, a produção de radicais livres de oxigênio e de outras espécies reativas de oxigênio, a ativação de proteínas sinaptossômicas associadas e/ou a expressão de genes (HOSSMANN, 2006; HAZELL, 2007; TSAI et al., 2011; LU H et al., 2014).

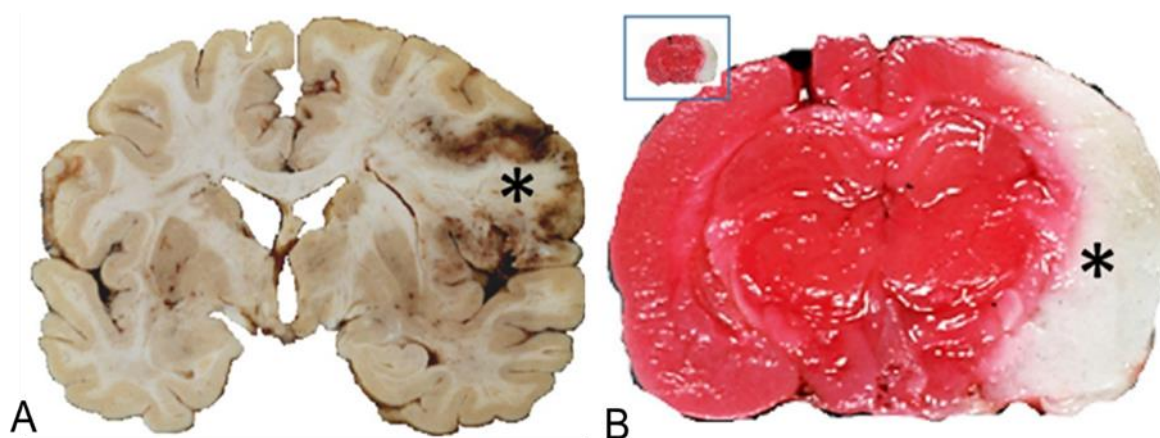


Figura 2: Acidente Vascular Encefálico (AVE) em humanos (A) e em ratos (B). Área afetada (*) ocasionada por oclusão da Artéria Cerebral Média (OACM) (CLEMENS, 2017).

Esses estudos revelam que o AVE ocasiona mudanças no fluxo de íons que atravessam a membrana celular - os gradientes dos íons potássio, sódio e cálcio - que provocam um influxo de água levando ao rápido aumento no volume celular de neurônios e células gliais, caracterizando o edema. Outrossim, mostram que há

acúmulo de neurotransmissores excitatórios em áreas isquêmicas induzindo a transmissão sináptica excitotóxica, bem como ratificam os déficits de ATP e ativação desordenada de enzimas proteases, lipases e nucleases que sinalizam para danos na membrana celular, no material genético e em proteínas estruturais do neurônio (LO; DALKARA; MOSKOWITZ, 2003; MONTANA et al., 2004; ROUNS, DE DEYN, 2009; WILLARD; KOOCHKEPOUR, 2013; MÁZALA; GRANGE; CHIN, 2015).

1.2. EVENTOS PREJUDICIAIS NO PARÊNQUIMA CEREBRAL (CASCATA ISQUÊMICA) DURANTE ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO (AVE)

1.2.1. Visão Geral da Isquemia Cerebral

O cérebro consome grandes quantidades de adenosina trifosfato (ATP) para manter suas diversas funções, mas suas reservas de ATP são extremamente limitadas. Consequentemente, o cérebro é extremamente sensível a interrupções na distribuição cerebrovascular de oxigênio e substratos metabólicos e, alguns minutos, sem essa perfusão, pode haver dano ao parênquima cerebral onde essas interrupções intensas ou prologadas produzem lesões cerebrais que definem o AVE (JUSTIN et al., 2019).

O AVE desencadeia uma cascata complexa e destrutiva no parênquima cerebral (AMANTEA et al., 2018). A interrupção na concentração de oxigênio e o decréscimo do substrato energético compromete a produção de ATP, causando o colapso da energia livre (ΔG Gibbs) à hidrólise de ATP (ΔG ATP) - a força motriz termodinâmica para o transporte de eletrólitos e outros processos celulares críticos. A diminuição do ΔG ATP impede o transporte de cálcio (Ca^{++}) na membrana e, consequentemente, a elevada concentração de Ca^{++} intracelular ativa nucleases que degradam o DNA, enzimas e proteínas estruturais (JUSTIN et al., 2019; IADECOLA; ANRATHER, 2011). O déficit de ΔG ATP prejudica o mecanismo iônico da $Na^{+}K^{+}$ ATPase reduzindo o gradiente de íons sódio (Na^{+}), o que potencializa a captação de glutamato - o acúmulo de glutamato extracelular eleva a ativação dos canais de cálcio Ca^{++} em neurônios no ambiente isquêmico. Embora essencial para recuperar o tecido isquêmico, a restauração do fluxo sanguíneo e do oxigênio resulta na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) que desativam as enzimas metabólicas e as bombas de Ca^{++} , exacerbando a depleção de ATP e a sobrecarga de cálcio (Ca^{++}) (IADECOLA; ANRATHER, 2011). ERO e íons Ca^{++} abrem poros de transição na

membrana mitocondrial interna, alterando a permeabilidade e o gradiente de hidrogênio (H^+), que é importante à fosforilação oxidativa, esgotando ainda mais a ΔG ATP e liberando citocromo C para ativar caspases que medeiam a apoptose neuronal (JUSTIN et al., 2019). Nesse ambiente, neurônios danificados liberam nucleotídeos de purina que fazem a micróglia liberar citocinas inflamatórias, atraindo macrófagos à lesão (IADECOLA; ANRATHER, 2011). Esses mecanismos culminam em danos no parênquima cerebral e levam ao colapso de vias bioquímicas relacionadas com a sobrevivência das células e tecidos, ocasionando uma série de eventos no local: excitotoxicidade, estresse oxidativo e nitrosativo, ruptura da barreira hematoencefálica, resposta inflamatória e apoptose que culminam na lesão e morte celular (BROUNS, DE DEYN, 2009; BYLICKY; MUELLER; DAY, 2018, RICHARD et al., 2019) (**Figura 3**).

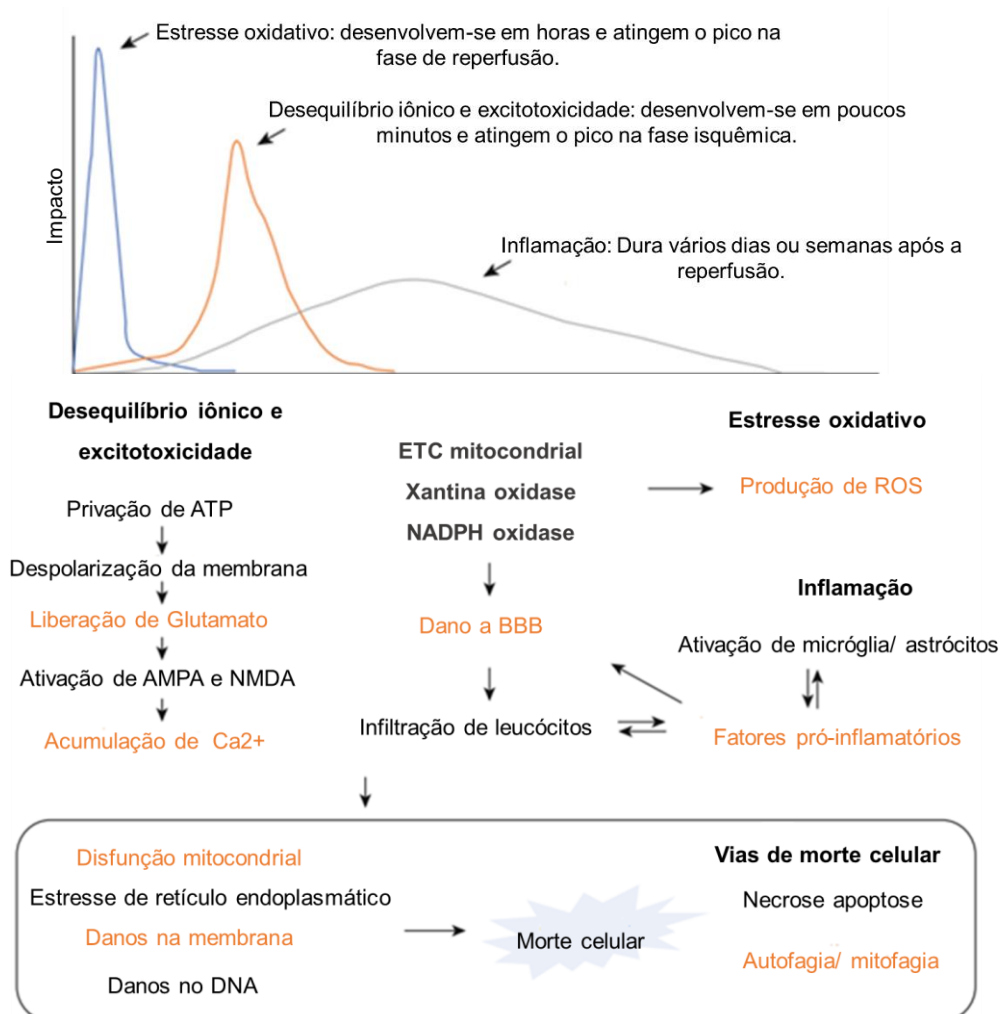


Figura 3: Progressão dos eventos bioquímicos prejudiciais ao parênquima cerebral durante Acidente Vascular Encefálico (AVE) após horas, dias e semanas (adaptada de HUI XU et al., 2021).

1.2.2. Excitotoxicidade

O AVE causa grande depleção de ATP e de outros compostos orgânicos, resultando na liberação de aminoácidos excitatórios que levam à acúmulos de íons e sinalização de cascatas enzimáticas ocasionando danos neuronais (RICHARD et al., 2019).

O aumento nos níveis dos íons potássio (K^+) conduz à liberação do neurotransmissor glutamato, influenciando canais acoplados de sódio (Na^+) e cálcio (Ca^{++}) relacionados aos receptores N-metil-D-Aspartato (NMDAR). Esses mecanismos aumentam os níveis de íons sódio (Na^+) e cloro (Cl^-) juntamente ao influxo de água com a formação do edema citotóxico no local da lesão (WILLARD; KOOCHKEPOUR, 2013; CARLO et al., 2020).

A elevada concentração de glutamato também influencia na ativação de receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico) e metabotrópicos - uma etapa crítica na cascata inflamatória. Esses receptores atuam por meio de canais monoiônicos e aumentam os níveis de cálcio Ca^{++} citosólico, ativando enzimas proteases, lipases, quinases, fosfatases, endonuclease e radicais livres, além de criarem uma sobrecarga de cálcio mitocondrial que compromete a produção de ATP (SEDER; MAYER, 2009; WU; TYMIANSKI, 2018; RICHARD et al., 2019).

O íon magnésio (Mg^{++}) bloqueia os poros dos canais do receptor NMDA. Mas, quando o glutamato é liberado dos locais pré-sinápticos e quando receptores AMPA são ativados, o Mg^{++} é completamente removido dos NMDARs devido a despolarização parcial na membrana pós-sináptica (SATTLER; TYMIANSKI, 2001). Isso causa o influxo de Na^+ e Ca^{++} na célula que desempenha um papel importante na morte celular isquêmica. Essa sobrecarga de cálcio dentro de neurônios ativa uma série de vias de sinalização de morte, como a ativação de calpaínas, produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) que ocasiona um comprometimento mitocondrial (WILLARD; KOOCHKEPOUR, 2013; LIU et al., 2018; CASAS et al., 2019). Esses eventos são críticos e estão relacionados com a excitotoxicidade que progride por um período de tempo consideravelmente curto e dependente do tipo e severidade da lesão (WILLARD; KOOCHKEPOUR, 2013).

1.2.3. Estresse Oxidativo e Nitrosativo

Estresse oxidativo, um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e substâncias antioxidantes, é induzido na isquemia cerebral concomitante a inflamação e reperfusão no local da lesão, desempenhando um papel crítico na fisiopatologia do AVE (SINNING; WESTERMANN; CLEMMENSEN, 2017). A família das NADPH oxidases (NOX) é a principal fonte de ERO na célula, mas, no sistema nervoso central (SNC) existem várias fontes de ERO- as mitocôndrias, xantina oxidase, ciclooxigenases e a óxido nítrico sintase (NOS) (MILLER et al., 2005; CHANGJUN et al., 2019).

A xantina oxidase e a NADPH oxidase são as duas enzimas oxidativas que desempenham um papel crucial na produção do ânion superóxido (O_2^-), um radical livre importante e que atinge níveis elevados juntamente com a hidroxila (OH^-) nas primeiras 24 horas após AVE (HEMELRIJCK et al., 2005). Entre os diversos membros das oxidases, a NOX2, nos leucócitos, é responsável pela geração de radicais superóxidos tóxicos (O_2^-) que são importantes em reações imunológicas para combater patógenos. Em células gliais e endoteliais, mas com níveis mais baixos, essa enzima é fonte de espécies reativas de oxigênio (LASSÈGUE; CLEMPUS, 2003; MILLER et al., 2005; CHANGJUN et al., 2019). As Óxido Nítrico Sintases (NOS): i) neuronal (nNOS); ii) endotelial (eNOS); iii) induzível (iNOS) são responsáveis pela síntese de óxido nítrico (NO), um composto reativo que causa estresse oxidativo, lesão no material genético e inibição da cadeia respiratória mitocondrial ocasionando grande efeito deletério sobre as células no ambiente isquêmico (CHANGJUN et al., 2019).

Óxido nítrico (NO) é produzido pela conversão da L-arginina por ação das sintetases que estão com níveis elevados durante o AVE - eNOS sendo expressa nos primeiros momentos após isquemia; nNOS e iNOS, respectivamente, expressas após algumas horas (HEMELRIJCK et al., 2005). O NO tem papéis benéficos e/ou prejudiciais no ambiente isquêmico, participando da restauração do suprimento de sangue para área isquêmica, o que colabora na redução do dano cerebral, ou ainda, pode reagir com ânions superóxidos formando radicais peroxinitrito (NOO^-) que contribuem para a peroxidação lipídica, toxicidade celular e, eventualmente, morte de neurônios e células gliais (SHIRLEY; ORD; WORK, 2014). Ademais, seus efeitos patológicos no tecido cerebral dependem em grande parte da concentração,

sensibilidade da célula ou se a fase é aguda ou crônica (CHEN; HSU, 2009; CHEN et al., 2017).

Níveis elevados de iNOS são evidenciados em diversos tipos de células. Em microglias e neutrófilos, no ambiente isquêmico, a produção de radicais livres via nNOS e iNOS é concomitante a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e liberação de hidroxila (OH^-), o que torna o meio mais neurotóxico, comprometendo ainda mais a função e a viabilidade celular (MILLER et al., 2005; HERTZ, 2008; GARCIA-BONILLA et al., 2014; CHANGJUN et al., 2019).

1.2.4. Ruptura da Barreira Hematoencefálica (BHE)

Uma diferença estrutural significativa entre as vias vasculares cerebrais e periféricas é a barreira hematoencefálica (BHE), que regula estritamente o movimento das moléculas entre o sangue e o cérebro contribuindo para a homeostase do SNC. Essa regulação inclui: (i) difusão paracelular muito limitada entre células endoteliais (CEs), (ii) baixos níveis de transcitose de CE, (iii) uma matriz de transportadores endoteliais movendo substratos do sangue para o cérebro ou do cérebro para o sangue e (iv) a presença de enzimas cerebrovasculares que metabolizam compostos potencialmente neurotóxicos (KEEP et al., 2008; ABBOTT et al., 2010).

A disfunção da BHE, evidenciada por ruptura na justaposição entre as células e o aumento da permeabilidade, é uma característica patológica proeminente de AVE isquêmico e/ou hemorrágico e está associada com um mal prognóstico clínico (KEEP et al., 2008; PRAKASH; CARMICHAEL, 2015). Durante a progressão do AVE, células veiculadas pelo sangue e substâncias químicas extravasam para o parênquima cerebral através da BHE prejudicada, resultando em aumento da permeabilidade paracelular e transcelular simultâneo ao lesionamento do endotélio vascular (KEANEY; CAMPBELL, 2015). A homeostase de água e íons no cérebro é interrompida, levando ao edema cerebral e a infiltração de leucócitos no ambiente lesionado que exacerba ainda mais as respostas inflamatórias e agravam a lesão cerebral (HUANG et al., 2006).

A infiltração e o acúmulo de células e/ou moléculas imunes periféricas no parênquima cerebral, após o AVE, contribuem para a disfunção da BHE e a progressão da lesão (ABBOTT et al., 2010). Nas primeiras horas, células microgliais

residentes no cérebro são ativadas e sinalizam à liberação de citocinas pró-inflamatórias que aumentam a expressão da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), P-selectina e E-selectina (LI et al., 2013; KEANEY; CAMPBELL, 2015). Essas moléculas ainda permitem a aderência, acúmulo e transmigração de leucócitos através do endotélio e medeiam cascatas inflamatórias, exacerbando ainda mais a lesão no parênquima cerebral (GELDERBLOM et al., 2009; LIESZ et al., 2015).

A disfunção da BHE também é central à gênese da transformação hemorrágica e ao aumento da mortalidade após o tratamento com o trombolítico ativador de plasminogênio tecidual recombinante (tPA) no AVE (JICKLING et al., 2014). A transformação hemorrágica ocorre como resultado da quebra circunstancial da BHE que, já em estágios iniciais, se correlaciona amplamente com a hemorragia intracerebral após trombólise de tPA. Imagens de ressonâncias magnética como marcador de disfunção da BHE em pacientes com AVE recebendo terapia trombolítica, indicaram abertura precoce da BHE como preditor independente da transformação hemorrágica (JIN et al., 2015).

Essa condição pode elevar os níveis de metaloproteínase de matriz cerebral (MMP-9) que associada a fosforilação da proteína P43-conexina da junção comunicante (junção GAP) contribui ao aumento da permeabilidade da BHE e da transformação hemorrágica (CHUAN et al., 2022; YANG et al., 2016). A ruptura na justaposição das células é principal razão subjacente ao aumento da permeabilidade paracelular da BHE após AVE. Outrossim, alterações graduais das proteínas juncionais (PJ) como a modificação, translocação e degradação proteica, dentro de uma janela temporal, são determinados pelo grau de gravidade da lesão isquêmica e sendo esses processos interligados, a translocação pode levar à degradação (GONZÁLEZ-MARISCAL; TAPIA; CHAMORRO, 2008; YANG et al., 2016; CHANGJUN et al., 2019; CHUAN, 2022).

O AVE ativa uma cascata de sinalização nas células endoteliais, levando a alterações de proteínas juncionais - fosforilação, translocação, degradação - ocasionando aumento da permeabilidade da BHE resultando em progressão da lesão neurovascular (CHANGJUN et al., 2019). Nesse ambiente, o óxido nítrico (NO) tem sua concentração alterada ocasionando danos à integridade celular, além de comprometer a permeabilidade vascular local por ativar às MMPs que são enzimas proteolíticas e que desempenham sua função na lâmina basal, degradando moléculas

que constituem a laminina e fibras colágenas (REMPE; HARTZ; BAUER, 2016). A atuação da MMP modifica a adesão entre as células da parede endotelial, favorecendo o extravasamento do plasma devido ao aumento da permeabilidade local, bem como propiciando entrada de leucócitos e, conseqüentemente, de hemácias, cujos efeitos podem ser modulados por condições fisiológicas (YANG et al., 2015; JIN et al., 2015; NAHIRNEY; REESON; BROWN, 2016).

A gravidade da ruptura da BHE, bem como sua consequência, é topograficamente heterogênea (LIEBNER et al., 2018; QIU et al., 2021). O dano difuso ou leve da BHE pode ser reversível com a reperusão oportuna na penumbra isquêmica, no entanto, a lesão vascular grave na área central pode ser potencializada durante esse processo. Embora a quebra da BHE esteja associada a pior prognóstico após AVE, tem havido debate se essa disfunção é causa ou uma consequência da lesão do tecido cerebral (SHI et al., 2016; QIU et al., 2021).

1.2.5. Apoptose

Os mecanismos moleculares de morte celular (apoptose) não são necessariamente idênticos no cérebro (McCULLOUGH et al., 2005). As primeiras observações clínicas e experimentais relacionadas à diferença sexual na resposta ao AVE foram conferidas aos efeitos dos hormônios gonadais (HOFFMAN; MERCHENTHALER; ZUP, 2006). Estudos “*in vivo*” e “*in vitro*” sugerem que as vias de morte celular no AVE diferem no cérebro de machos e fêmeas. Em machos, o mecanismo é mediado, em grande parte, pela ativação da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e subsequente ativação da PARP- Poli (ADP) ribose polimerase; em fêmeas, essa condição é desencadeada pela enzima citocromo C (Cito C) e ativação de caspases (DU et al., 2004; McCULLOUGH et al., 2005; RENOLLEAU et al., 2007; LANG; McCULLOUGH et al., 2008; YUAN et al., 2009).

Fisiologicamente, a morte celular é um mecanismo homeostático altamente regulado e de grande importância e necessário para manter tecidos, tamanho dos órgãos e suas funções (McCULLOUGH et al., 2005; FRICKER et al., 2018). Um tipo de célula que está em sua maior parte isento do fluxo diário de nascimento e morte é a célula neuronal, pois, após o período de desenvolvimento, os neurônios mantêm uma vida longa para preservar os circuitos adequados. No entanto, durante o período de desenvolvimento, a morte celular ocorre tanto em precursores neuronais mitóticos

quanto em populações neuronais diferenciadas pós-mitóticas (KUAN et al., 2000; BUSS et al., 2006; FRICKER et al., 2018).

A apoptose desempenha um papel importante na geração de circuitos funcionais dentro do Sistema Nervoso Central (SNC) por meio de alguns mecanismos, como a eliminação de neurônios que migram para posições ectópicas ou àqueles que inervam alvos inadequados e que competem por quantidades limitantes de fatores tróficos essenciais à sobrevivência e ao direcionamento de uma via neuronal (BUSS et al., 2006; FRICKER et al., 2018). Enquanto a remoção do excesso de neurônios durante o desenvolvimento do SNC é essencial à formação de circuitos funcionais, a morte dessas células é uma das principais causas de doenças agudas e crônicas (FRICKER et al., 2018).

Kerr e colaboradores (1972) descreveram a apoptose, pela primeira vez, levando em consideração as mudanças morfológicas que incluíam a condensação da cromatina, a quebra da membrana nuclear, o encolhimento celular e formação de corpos vesiculares pequenos e próximos à superfície celular denominados corpos apoptóticos. Atualmente, três abordagens importantes emergiram a respeito desse mecanismo molecular de morte de células neurais: i) que existem muitas maneiras pelas quais os neurônios podem morrer; ii) há uma extensa discussão e, as vezes ambiguidade, entre os mecanismos que resultam a morte celular; iii) a morte neuronal não é meramente um evento autônomo da célula, mas, é frequentemente desencadeado através de interações com células gliais e neurônios vizinhos (FRICKER et al., 2018).

A apoptose parece contribuir para a morte neuronal após o AVE com mecanismos desencadeados em duas vias celulares: (i) via intrínseca (ou mitocondrial) e a (ii) via extrínseca (via receptor de morte) (FRICKER et al., 2018; HAASE et al., 2008) (**Figura 4**). A via extrínseca é desencadeada pela ligação do fator de necrose tumoral (TNF) a receptores de morte na superfície da célula. A ligação ao receptor resulta no recrutamento da proteína Fas- associada ao domínio de morte (FADD) - que se ligam as moléculas pró-caspase-8, desencadeando o processamento proteolítico e ativação de caspase-8 (MICHEAU; TSCHOPP, 2003, FRICKER et al., 2018). A caspase-8 ativa caspases efetoras por clivagem proteolítica direta ou indiretamente por clivagem da proteína BH3. Concomitantemente a essa clivagem, a proteína Bid produz tBid que é direcionada à mitocôndria para induzir a ativação de

proteína Bax e a permeabilidade na membrana externa mitocondrial (PMEM) (FRICKER et al., 2018).

Ligantes TNF- α e Fas podem induzir apoptose em neurônios durante a inflamação após AVE (HASSE et al., 2008). Vias dependente de Fas, p38 e óxido nítrico (NO) sinalizam para a expressão de caspases, ratificando o papel dessas enzimas na morte de neurônios no ambiente isquêmico e em outras neuropatologias (HARRISON et al., 2001; FRICKER et al., 2018).

A via intrínseca, centra-se na regulação da PMEM pelas proteínas da família Bcl-2 que compartilham homologia de 1 a 4 domínios Bcl-2 (BH) requeridos para interações homo e heterotípicas que determine a PMEM (WEI et al., 2001; FRICKER et al., 2018). Outras proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak contêm domínios BH1-3 essenciais à execução e/ou sinalização dessa via de apoptótica. As moléculas de Bax existem como monômeros citosólicos nos quais os terminais estão restritos e incorporados na estrutura da proteína, sendo expostos durante estímulo apoptótico e direcionando a Bax à membrana mitocondrial externa ocasionando a projeção do terminal amino (NH₂) e a formação de dímeros e/ou homo oligômeros que resultam na PMEM (FRICKER et al., 2018; CZABOTAR et al., 2013). A Bax forma estruturas em anel de vários tamanhos e formatos que representam poros e que são desprovidos de outras proteínas mitocondriais. Essas estruturas contribuem à liberação de citocromo C e de outras proteínas envolvidas nesse mecanismo de morte celular (BLEICKEN et al., 2014; GILLIES et al., 2015; SALVADOR-GALLEGO et al., 2016).

A citocromo C (cit C), liga-se ao fator de ativação de protease apoptótica 1 (apaf-1) e, junto com a deoxiadenosina trifosfato (dATP), forma uma estrutura heptamérica, o apoptossoma, que recruta a caspase-9 que sofre autoclivagem e ativa a caspase-3 (BRATTON; SALVESSEN, 2010). Caspase-3 e outras caspases executoras clivam uma infinidade de proteínas, mediando a desmontagem sistemática de células em apoptoses. Alguns desses substratos, quando clivados, potencializam sua toxicidade em doenças agudas e crônicas (BULAT; WIDMANN, 2009). Ademais, em consequência da indução de PMEM, outras vias podem ser ativadas no citosol - smac/diablo, fator indutor de apoptose (AIF), endonuclease G. A supressão e/ou inibição dessas vias diminuiu a morte de células neurais em uma série de modelos "*in vitro*" e "*in vivo*" de neuropatologias (ZAMORANO et al., 2012; D'ORSI et al., 2015; D'ORSI et al., 2016).

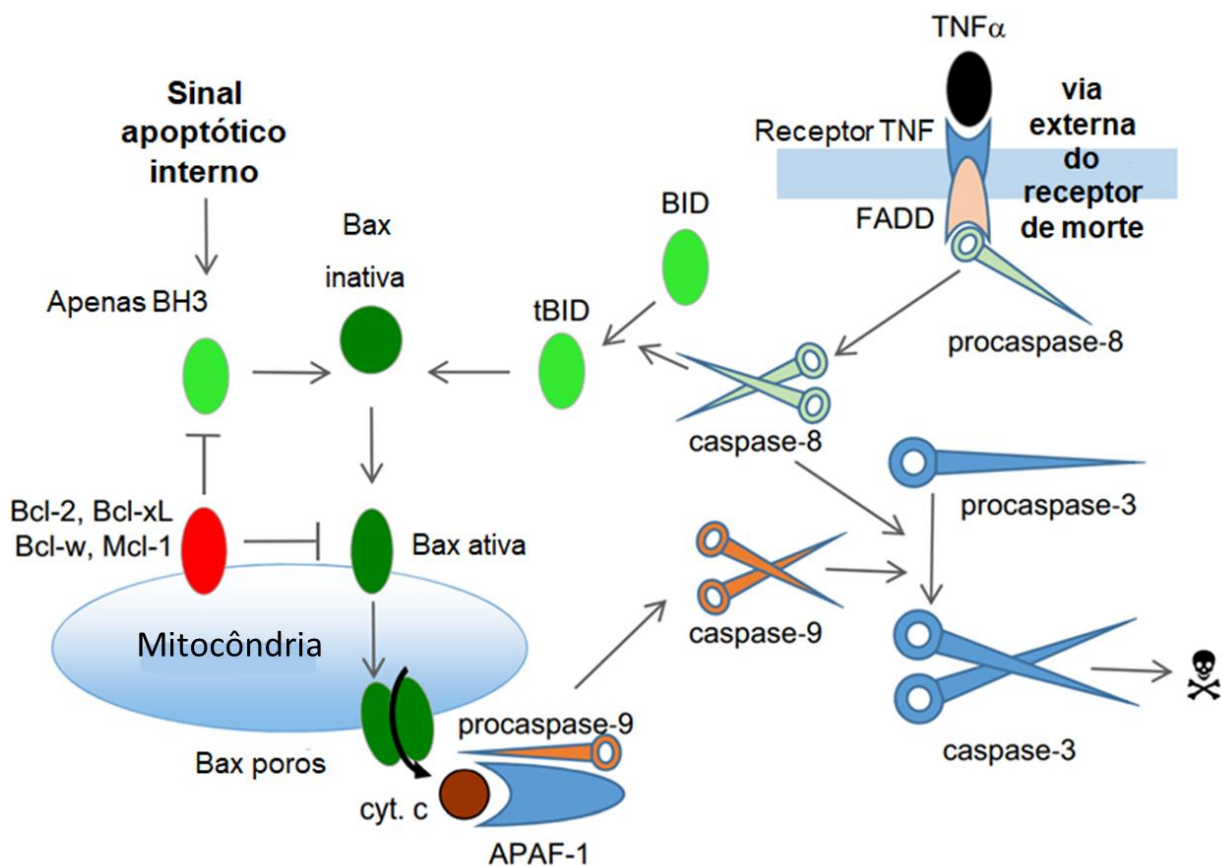


Figura 4: Apoptose. Via intrínseca mitocondrial causando expressão e/ou ativação de proteínas; via extrínseca com ligantes que ativam receptores de morte (adaptado FRICKER et al., 2018).

1.2.6. Resposta Inflamatória no AVE

Elementos neuronais, células gliais e vasculares formam uma "unidade neurovascular" funcional, mas, após AVE, esse estado de equilíbrio é quebrado (IADECOLA; ANRATHER, 2011). Por conseguinte, micróglia e astrócitos são ativados em poucas horas, levando à produção de citocinas, quimiocinas e infiltração de leucócitos. Nos últimos anos, fármacos têm sido testados nas vias danificadas com o objetivo de minimizar perdas teciduais e/ou déficits neurológicos durante a inflamação (WEN et al., 2004; ADIBHATLA; HATCHER, 2008; JIN; YANG; LI, 2010; DUGUE et al., 2017).

Micróglia, células residentes do sistema imune inato no cérebro e que representam 5% a 20% da população glial, são ativadas após AVE passando por alterações morfológicas e fenotípicas. Essas células quando ativadas agem de forma semelhante a macrófagos durante a inflamação sistêmica (CLARK et al., 1993; VAGNEROVA; KOERNER; HURN, 2008) e tem a capacidade de fagocitar – remover

organismos estranhos e restos celulares, além de sinalizar a expressão de citocinas e MMP que podem comprometer a BHE (GURUSWAMY; ELALI, 2017).

A micróglia no estado quiescente apresenta uma configuração bem definida: uma soma celular pequeno e amplas ramificações (CLARK et al., 1993; VAGNEROVA; KOERNER; HURN, 2008). Após AVE, a ativação microglial precede e predomina sobre a infiltração de macrófagos – são ativadas poucos minutos após o início da lesão isquêmica, aumentando sua expressão nos dias seguintes, com o pico em 10 dias após AVE - mas, os mecanismos desse processo ainda não estão muito bem estabelecidos (SCHILLING et al., 2005; WU et al., 2005; KIM et al., 2016). Em modelos experimentais de AVE a ativação dessas células na região lesionada pode ser um parâmetro de determinação da gravidade da lesão, devido a neurotoxicidade mediada pela micróglia ser elevada no parênquima cerebral lesionado e ser associado a produção de espécies reativas de oxigênio, citocinas e MMPs (PERRY, 2007; RANSOHOFF; PERRY, 2009; KIM et al., 2016; GURUSWAMY; ELALI, 2017).

Após AVE, receptores CD14 ativados por iNOS e receptor toll-like (TLR4) são expressos na micróglia sugerindo um possível mecanismo de ativação dessas células (KIM; ZHOU et al., 2013; KAWABORI; YENARI, 2014, DUGUE et al., 2017). Danos no parênquima cerebral induz ativação microglial, pois neurônios submetidos a situações de estresse produzem ATP e ADP que acionam mecanismos que sinalizam em receptores específicos da membrana destas células, ativando-os (PERRY, 2007). Na condição de ativada, a micróglia possui morfologia ameboide com prolongamentos curtos e grossos e função fagocítica podendo sinalizar para expressão de GDNF- Fator Neurotrófico Derivado de células Gliais que desempenha função benéfica à sobrevivência de neurônios e aumenta a expressão de moléculas de membrana da família MHC classes I e II, receptores CD4 e CD8 e receptores do complemento (PERRY; ANDERSSON; GORDON, 1993; DUGUE et al., 2017). McDonough e colaboradores (2017) demonstraram que essas células do SNC induzem a expressão de interferon (interferon α/β) sinalizando para a expressão de quimiocinas que possuem um papel importante na progressão da lesão isquêmica. As células microgliais ativadas desempenham um papel duplo no ambiente isquêmico: i) sinalizam para expressão de citocinas pró-inflamatórias que resultam em danos no tecido cerebral, exacerbando a lesão isquêmica; ii) sinalizam à expressão de fatores

anti-inflamatórios (GOMES-LEAL, et al 2004b; EKDAHL; KOKAIA; LINDIVALL, 2009; PONOMAREV; VEREMEYKO; WEINER, 2013; YUAN et al., 2014).

Após AVE, macrófagos podem ser detectados nas primeiras duas horas; porém, nas horas subsequentes, ambos, macrófagos derivados do sangue e residentes do SNC, encontram-se dispersos por toda lesão e permanecem detectáveis por mais de uma semana (GOMES-LEAL, et al 2004b; ELALI; JEAN, 2016). A ativação microglial é intensa no centro e na área de penumbra isquêmica, sendo a função benéfica ou deletéria dessas células dependente da modulação exercida por ativação de vias bioquímicas e/ou estímulos no ambiente isquêmico (SCHWARTZ et al., 2001; NEUMANN et al., 2006; GOMES-LEAL, 2019). A micróglia ao redor do tecido isquêmico migra em direção a lesão e mantém estreita associação com neurônios, por um mecanismo denominado de “capping”, e após a morte do neurônio, esse mecanismo ajuda no reconhecimento precoce e na rápida remoção fagocítica dos neurônios mortos (NEUMANN et al., 2016). A micróglia pode favorecer a expressão do fator de crescimento TGF- β 1 com função neuroprotetora após AVE (ELALI; JEAN, 2016;).

Jin e colaboradores (2017) demonstraram que a supressão da ativação microglial intensificou a infiltração de leucócitos, aumentou a lesão e promoveu mais déficits neuronais. Outros fatores neurotróficos atuando concomitantemente à ativação microglial promovem neurogênese e plasticidade, ratificando uma modulação fenotípica dessas células durante o AVE (TAYLOR et al., 2017). A diminuição da ativação microglial e de produtos oxidativo, no ambiente isquêmico, vem sendo o foco de muitos estudos direcionados à melhora e recuperação do tecido cerebral lesionado (YUAN et al., 2014;).

Semelhante a micróglia, os astrócitos são células residentes importantes para a manutenção do sistema nervoso central. Eles estão ativamente envolvidos na formação da BHE, no controle da homeostase de íons e água, na liberação de fatores neurotróficos, na eliminação de neurotransmissores liberados durante a atividade sináptica, transporte de metabólitos e produtos residuais (BYLICKY; MUELLER; DAY, 2018). Em condições fisiológicas normais, os astrócitos retiram o excesso de glutamato do espaço extracelular, convertendo-o em glutamina para reutilização neuronal, mas, durante a lesão cerebral, a extensão dos danos aos astrócitos afeta a capacidade de sua captação (BYLICKY; MUELLER; DAY et al., 2018). Não está claro

como o AVE afeta a captação de glutamato, mas, tem sido relatado que a expressão do transportador EAAT2 (transportador de aminoácidos excitatórios) de glutamato é defeituosa durante a isquemia (TAKANO et al., 2009; KETHEE et al., 2011). No ambiente isquêmico, células gliais e citocinas sinalizam para a reatividade dos astrócitos o que resulta na expressão de fatores inflamatórios, como proteína -1 quimioatrativa de monócitos, interleucina 1 β (IL- 1 β), proteína ácida fibrilar glial (GFAP), vimetina e nestina que podem levar à gliose reativa e a formação da cicatriz glial (HERRMANN; EHRENREICH, 2003; PEKONY; NILSSON, 2005; WANG et al., 2018).

Overman e colaboradores (2012), demonstraram que após AVE a reatividade astrocitária é intensa no núcleo da lesão em uma janela temporal de quatro horas a um dia, atingindo seu máximo em quatro dias e persistindo até 28 dias. Tecidos cerebrais “*post mortem*” de pacientes que sofreram AVE revelaram elevada expressão de interleucina-15 (IL-15) em astrócitos, semelhante ao que foi evidenciado em camundongos transgênicos submetidos a oclusão da artéria cerebral media (OACM) por 60 minutos (LI et al., 2017). Outrossim, os astrócitos não reativos fornecem suporte e nutrientes significativos para sobrevivência de neurônios por liberar o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento de fibroblasto-2 e o Nerve Growth Factor (NGF) que desempenham um papel importante na neuroproteção (LIU Z et al., 2014; VOGELGESANG; BECKER; DRESSEL, 2014). Os astrócitos, através de suas ramificações, estabelecem fortes associações com as células endoteliais que estruturam capilares cerebrais e pericitos que formam a barreira hematoencefálica (BHE), mas, durante o AVE, a metaloproteinase de matriz interrompe essa associação degradando a lâmina basal, ocasionando o rompimento da BHE e criando uma via de entrada à invasão de células inflamatórias (DEL ZOPPO, 2010).

Os leucócitos, atuantes no ambiente isquêmico, liberam fatores pró-inflamatórios no local e, em muitos estudos, a presença dessas células tem servido como um marcador de resposta inflamatória após AVE (CEULEMANS et al., 2010). Os neutrófilos são as primeiras células imunes que invadem o tecido lesionado após AVE, seguidos dos monócitos, sofrendo alterações estruturais devido à adesão e migração através da parede endotelial do vaso sanguíneo. No ambiente isquêmico, essas células são atraídas por quimiocinas via gradiente de concentração,

provocando uma lesão secundária e sinalizando à expressão dos fatores pró-inflamatórios, espécies reativas de oxigênio, proteases e metaloproteínase de matriz (CEULEMANS et al.; 2010; RICHARD et al., 2019).

As ativações dessas vias prejudicam a membrana da célula endotelial e a lâmina basal, levando à permeabilidade da BHE e ao edema. Entre 4 a 6 horas de infiltração de neutrófilos, monócitos aderem as paredes dos vasos e se movem em direção as regiões isquêmicas alcançando atividade máxima em 3-7 dias após AVE (JICKLING et al., 2015). Os neutrófilos desempenham um papel fisiopatológico importante na lesão isquêmica aguda. Em um modelo de isquemia por MCAO em ratos, após dozes horas da oclusão, foi evidenciado um pico de neutrófilo na área lesionada e formação de trombo (TU et al., 2010; DÖRING et al., 2015).

Substâncias biologicamente ativas- eicosanóides, leucotrienos, prostaglandinas, fator de ativação plaquetária- são produzidos quando leucócitos são ativados por fosfolipases, ocasionando a vasoconstrição e a agregação plaquetária. Outrossim, leucócitos que chegam ao ambiente isquêmico causam danos neuronais no centro e na periferia da lesão, ativando fatores pró-inflamatórios que contribuem ao dano do tecido cerebral após AVE (KIM et al., 2016).

Além da micróglia e dos macrófagos derivados do sangue, os neutrófilos são um dos leucócitos mais importantes que se infiltram na área isquêmica (GOMES-LEAL; CORKILL; PICANÇO-DINIZ, 2005; RICHARD et al., 2019). Essas células, direcionam-se ao parênquima neural durante desordens neurais agudas na medula espinhal e no encéfalo, com função fagocitária de remoção de corpos estranhos na área lesionada (JICKLING et al., 2015; RICHARD et al., 2019). Weston e colaboradores (2007) relataram que os neutrófilos permanecem por um período superior a 32 dias nas regiões isquêmicas, tendo sua presença mascarada após três dias pela expressão de microglias/macrófagos ativados na região lesionada. A elevada concentração dessas células foi correlacionada ao tamanho da lesão e aos déficits funcionais devido a liberação de citocinas inflamatórias, enzimas proteolíticas e radicais livres prejudiciais ao tecido cerebral lesionado (GOMES-LEAL; CORKILL; PICANÇO-DINIZ, 2005; SOUZA-RODRIGUES et al., 2008). Algumas dessas enzimas proteolíticas degradam componentes da matriz extracelular e da junção neurovascular, aumentando a permeabilidade dos vasos sanguíneos no ambiente isquêmico (WESTON et al., 2007; GELDERBLOM et al., 2009; STOWE et al., 2009;

GÖKHAN et al., 2013). A presença dos neutrófilos na área lesionada pelo AVE e a ativação plaquetária dificultam o fluxo sanguíneo, ocasionando mais hipóxia tecidual e ampliando a extensão da lesão isquêmica (SOUZA-RODRIGUES et al., 2008; JICKLING et al., 2015).

Trabalhos de Richard e colaboradores (2019) e TSAI (2010) relatam que a elevada densidade dessas células no ambiente isquêmico estão intimamente associados a progressão da lesão e a mortalidade dos pacientes acometidos. Gökhan e colaboradores (2013) relataram que esse aumento pode estar relacionado à maior liberação dessas células pela medula óssea e baço e com menos apoptose de neutrófilos no local de lesão. Similarmente, linfócitos T são recrutados em estágios posteriores após AVE, com infiltração dessas células na região em torno da lesão entre três a sete dias (DOS SANTOS et al., 2007; SOUZA-RODRIGUES, 2008; FENG et al., 2017). Os mecanismos de atuação dessas células são investigados com o propósito de revelar o papel de vários subtipos de linfócitos T (tCD4+, tCD8+, Tregs etc.) que se infiltram no parênquima cerebral lesionado (YILMAZ et al., 2006; XIE; YANG SH, 2015). Há um interesse na modulação da atividade dos linfócitos no ambiente isquêmico, devido ao seu papel neuroprotetor. Em um deles, a imunossupressão dessas células por anticorpos específicos (CD-25) agravou a perda tecidual e deixou mais prejudicada a função neurológica em uma janela temporal de sete dias após OACM em camundongos (YILMAZ et al., 2006; LIESZ et al., 2009). As terapias que envolvem essas células, visando melhorias aos déficits motores e cognitivos, após AVE, apresentam seus próprios desafios, como: isolamento, purificação, período de expansão e propriedades bioquímicas. (ABBAS; SEN, 2003).

As citocinas são agentes imunomoduladores e que desempenham um papel importante na ativação, proliferação e diferenciação de células. Elas são geralmente polipeptídeos pequenos com peso molecular entre 8-26kDa e de difícil detecção no cérebro, tendo seus receptores expressos em níveis muito baixos (STOLP, 2013). A expressão e codificação de citocinas ocorrem no núcleo isquêmico, área de penumbra e regiões adjacentes à lesão isquêmica (ELKIND et al., 2002; LODDICK; TURNBULL; ROTHWELL, 1998). Esses compostos atuam na regulação da expressão de moléculas de adesão celular (MAC) durante a progressão do AVE, contribuindo para a ruptura da BHE e ocasionando migração de várias células inflamatórias-macrófagos, células *natural killer*, linfócitos T e leucócitos polimorfonucleares-

favorecendo ainda mais a expressão de citocinas no local (REYES et al., 2018; HE et al., 2019).

Neurônios e células da glia também sinalizam para a expressão de citocinas no tecido cerebral lesionado após AVE. As três principais citocinas pró-inflamatórias são a interleucina 1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) que agravam a resposta inflamatória após AVE (SAIRANEN et al., 2001; RAMIRO et al., 2018). Os níveis séricos do TNF- α aumentam em seis horas após AVE e são mantidos por dez dias. Estudos “*post mortem*” demonstraram que células TNF- α foram detectadas em cérebros de pacientes que tiveram AVE isquêmico grave, permanecendo expressas de três a quinze meses (ZAREMBA; LOSY, 2001; DZIEWULSKA; MOSSAKOWSKI, 2003). Concomitante à sinalização de TNF- α , as IL-1 β e IL-6 atingem níveis elevados em dois e sete dias agravando a lesão cerebral por meio de sua ação nos neurônios, células gliais e vasos sanguíneos (ORMSTAD et al., 2011; LAMBERTSEN; BIBER; FINSEN, 2012).

Alternativamente, o fator de crescimento transformador- β (TGF- β) e interleucina-10 (IL-10) são citocinas anti-inflamatórias que inibem a expressão de citocinas pró-inflamatórias, reduzindo assim a inflamação após AVE (DOLL; BARR; SIMPIKINS, 2014). Na área de penumbra isquêmica e em períodos de recuperação de doenças do SNC esses compostos sugerem função neuroprotetora (VAN, EXEL et al., 2002). Outras citocinas também contribuem ao dano e reparo do cérebro, mas, o equilíbrio entre os efeitos benéficos e prejudiciais das citocinas dependem muito do estado bioquímico e fisiológico do encéfalo (LAMBERTSEN; BIBER; FINSEN, 2012; DOLL; BARR; SIMPKINS, 2014).

Concomitante a atuação de células gliais e polimorfonucleares, as quimiocinas-proteínas de sinalização com peso molecular de 8-10 kDa e com a capacidade de induzir quimiotaxia direcionada a células responsivas, principalmente leucócitos-contribuem à progressão do AVE (RAMAN; SOBOLIK-DELMARE; RICHMOND, 2011; RANSOHOFF, 2015). Existem diversas quimiocinas e todas compartilham um padrão estrutural semelhante - quatro resíduos de cisteína, classificando-as em quatro subfamílias - que desempenha um papel importante na atração de neutrófilos, monócitos/macrófagos após o AVE (MURPHY, 2019). As quimiocinas possuem receptores únicos e sobrepostos que pertencem a superfamília dos receptores acoplados a proteína G. Esses receptores são geralmente expressos em baixas

concentrações, mas, após AVE, TNF- α e IL-1 β aumentam a expressão e liberação de quimiocinas específicas como as Citocinas Quimioatrativa de Neutrófilos (CINC), MCP-1 quimioatrativa de monócitos, Fator de Resposta Microglial 1(MRF-1) e Proteína Inflamatória de Macrófagos 1(MIP-1) reguladas nas três primeiras horas e permanecendo com níveis significativos por mais de seis horas (BACON; HARRISON, 2000; HUGHES; NIBBS, 2018).

Trabalhos de Brait e colaboradores (2011) utilizando ensaios de reação em cadeia da polimerase (PCR) para determinar a expressão de quimiocinas após OACM em camundongos e seguidos de análises dos genes em 4, 24 e 72 horas, mostraram que essas substâncias são reguladas acima do normal, mediando infiltração de leucócitos e desempenhando um papel importante na fisiopatologia do AVE. Além de suas propriedades quimiotáticas, as quimiocinas afetam diretamente a BHE durante o processo isquêmico- em co-culturas de células endoteliais cerebrais e astrócitos, a adição de MCP-1 ocasionou um aumento significativo na permeabilidade da BHE (CHU et al., 2014; HAMMOND et al., 2014). Os níveis de quimiocinas aumentam na penumbra isquêmica a partir de seis horas, com um pico em 48 horas. Valores que se correlacionam com a progressão e tamanho da lesão isquêmica- a expressão dessas substâncias pode ser regulada positivamente no líquido cefalorraquidiano (LCR) e no soro sanguíneo de pacientes acometidos por AVE (BRAIT et al., 2011; GUO et al., 2014).

No contexto da resposta inflamatória após AVE, os mecanismos de sinalização, em diversas vias celulares, expressos durante esse processo comprovam uma incerteza no prognóstico de melhora ou não do indivíduo acometido (RICHARD et al., 2019). Atualmente, novos ensaios moleculares- por exemplo, a deleção de genes (manipulação genética) relacionados à expressão ou não dessas substâncias envolvidas nesse processo inflamatório- têm proporcionado um melhor entendimento da fisiopatologia do AVE, abrindo uma via de investigação que pode funcionar como uma estratégia terapêutica ao Acidente Vascular Encefálico e para outras desordens no SNC (RICHARD et al., 2019; GONZÁLES-NIETO et al, 2020).

1.3. EPIDEMIOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

Estudos epidemiológicos a respeito do AVE nos ajudam a compreender a história natural da doença, a identificar os fatores de risco e os fatores prognósticos que podem levar a marcadores dos sintomas iniciais até o momento da observação clínica para o entendimento dos mecanismos da doença (ROGER et al. 2011). Os dados epidemiológicos e observacionais podem informar os profissionais de saúde e pesquisadores a respeito das novas áreas de pesquisas direcionadas a essa neuropatologia, bem como identificar os indivíduos, grupos ou áreas geográficas que estão em maior risco de AVE e/ou que indiquem resultados preocupantes (ROGER et al. 2011; OVBIAGELE; NGUYEN-HUYNH, 2011).

Uma abordagem crítica dos fatores envolvidos nos casos de maiores complicações e riscos aos indivíduos podem levar a uma melhor compreensão das causas subjacentes. Além disso, a identificação dos indivíduos, grupos e/ou áreas geográficas ajudam os médicos e formuladores de políticas, em saúde pública, no desenvolvimento de programas mais eficazes para reduzir o risco do AVE, além de introduzir mecanismos que reduzam a incapacidade do paciente acometido (ROGER et al. 2011; OVBIAGELE; NGUYEN-HUYNH, 2011). O AVE, uma neuropatologia altamente prevalente e com um custo substancial para a sociedade na forma de “dreaded-D’s” (exclusão, invalidez e morte), enquadra-se como a principal causa de deficiência crônica, a segunda principal causa de demência e a quarta principal causa de morte em vários países (CHEN, 2009; ROGER et al., 2011). As consequências do AVE são bem alarmantes, mas, em alguns centros, as estimativas gerais variam e podem representar dados não necessariamente confiáveis (ROGER et al., 2011). Aproximadamente, 85% dos casos de AVE são isquêmicos e 15% são hemorragias primárias em que 3% destas são subaracnóideas. Neste contexto, os indivíduos de origem asiática, africana e latino-americana tendem a ter uma frequência maior de AVE do que pessoas de origem europeia (ARIESEN et al., 2003; ROGER et al., 2011).

A incidência de AVE aumenta rapidamente com a idade, dobrando o risco a cada década após os 55 anos. Alguns estudos ratificam que entre adultos de 35 a 44 anos a incidência de AVE é de 30 a 120 casos de 100.000/ano e, para a faixa etária de 65 a 74 anos, a incidência é de 670 a 970 casos de 100.000/ano (ROGER et al., 2011). O AVE também acomete crianças, mas, em comparação com os adultos a incidência é substancialmente menor – 1 a 2,5 casos de 100.000/ ano; cerca de 50 a 75 % dos

AVE's resultam de hemorragias, sendo a doença falciforme a principal causa de AVE na infância, com maior incidência entre as idades de dois a cinco anos (OHENE-FREMPONG et al., 1998; CHONG; SACCO, 2005).

Na última década, devido ao melhor controle dos fatores vasculares de risco durante abordagem clínicas dos pacientes, as taxas de incidências do AVE nos países desenvolvidos diminuíram modestamente e/ou estabilizaram. Entretanto, projeta-se que com envelhecimento contínuo da população, especialmente nos países ocidentais, essas taxas deverão aumentar dramaticamente nos próximos quarenta anos (ROGER et al., 2011). Outrossim, os eventos isquêmicos transitórios (TIA's) influenciam à estimativa do AVE por serem considerados como um déficit neurológico de início abrupto e temporário que resulta em isquemia cerebral (JOHNSTON et al., 2003). Determinar a incidência e a prevalência exata dos TIA's pode ser importante, pois os sintomas experimentados são neurologicamente inespecíficos - condição que levou um grupo de especialistas modificarem formalmente a definição, considerando-o como um episódio transitório de disfunção neurológica focal causada no cérebro, medula e retina, sem infarto agudo (EASTON et al., 2009).

A prevenção continua sendo o caminho mais viável para diminuir os casos de AVE na sociedade. Nesse sentido, os estudos clínicos têm colaborado à identificação dos vários fatores e/ou condições que aumentam o risco de uma pessoa ter um AVE (CHONG, SACCO, 2005). São os vistos como modificáveis e não modificáveis e, geralmente, aplicam-se ao AVE primário e/ou recorrente. Os não modificáveis servem como marcadores para verificação do alto risco de AVE, enquanto os modificáveis são aqueles passíveis de intervenção para minimizar o risco dessa neuropatologia (CHONG; SACCO, 2005; OVBIAGELE; NGUYEN-HUYENH, 2011). Um estudo internacional de caso-controle, mostrou que cerca de 90% dos AVE's podem estar relacionados a dez fatores de riscos: hipertensão, diabetes, causas cardíacas, tabagismo, obesidade abdominal, dislipidemia, sedentarismo, consumo de álcool, dieta alimentar, estresse psicossocial e recentemente a depressão (O'DONNELL et al., 2010).

As diferenças de gênero nas doenças cardíacas são bem reconhecidas, mas pouco se sabe sobre as diferenças de gênero no AVE - embora as taxas de mortalidade por AVE condicionadas por idade para homens sejam maiores do que para mulheres (APPELROS; STEGMAYR; TARENT, 2009). Em geral, devido a sua

longevidade, mais homens morrem de AVE a cada ano, mas há estudos que mostram que as mulheres podem ser acometidas por AVE graves e que, em alguns casos, possuem 30% menos probabilidade de receber tratamento intravenoso com tPA, mesmo após ajuste por idade, comorbidades e outras características clínicas (APPELROS; STEGMAYR; TARENT, 2009).

Os casos e a mortalidade por AVE variam muito geograficamente e os países de baixa renda *per capita* são os mais afetados. Nesses centros, a relação entre pobreza e desigualdade no atendimento em saúde é vivenciada, possibilitando os diferentes níveis de cobertura de saúde à população, uma vez que os indicadores socioeconômicos (renda, educação, ocupação, classe etc.) são heterogêneos e se mostram diretamente associados a letalidade de casos de AVE devido a um péssimo atendimento, um atraso na recuperação funcional e motora durante a reabilitação e um aumento do risco recorrente (KAPRAL et al., 2002; LÖFMARK; HAMMARSTRÖM, 2008; JOHNSTON; MENDIS; MATHERS, 2009).

AVE é uma neuropatologia debilitante e, em alguns casos, mortal (RICHARD et al., 2019). No mundo, milhões de pessoas, a cada ano, são afetadas por DCNT e com a possibilidade de recorrência no envelhecimento (BENJAMIN et al., 2017). Pacientes idosos apresentam maior mortalidade e pior qualidade de vida após essa neuropatologia, em comparação com pacientes mais jovens. Nesse âmbito, o gênero também possui correlação na incidência e no resultado (ARBOIX et al., 2000; BENJAMIN et al., 2017). Os valores econômicos destinados aos cuidados dos sobreviventes aumentam com a idade, uma vez que pacientes idosos são mais propensos a terem déficits graves, requerendo maiores cuidados (BUSHNELL et al., 2014). Com exceção de drogas trombolíticas, nenhuma terapia farmacológica foi aprovada para AVE, mas, vários estudos têm revelado inúmeros compostos que se mostraram promissores em estudos pré-clínicos, mas com efeitos protetores que não se traduzem em eficácia clínica aos pacientes (VAN DER WOUPE et al., 2005; SOHRABJI; PARK; MAHNKE, 2017).

Diferentemente do infarto do miocárdio, que quase sempre é devido à doença aterosclerótica e que afeta as artérias coronárias, a identificação do tipo AVE tem sido de grande relevância clínica (SOHRABJI; PARK; MAHNKE, 2017). Basicamente, o AVE é classificado em hemorrágico e/ou isquêmico: i) os hemorrágicos podem ser principalmente intraparenquimatosos ou subaracnóides; ii) os isquêmicos podem ser

divididos, no que tem sido referido como subtipos etiológicos ou categorias que representam as causas do AVE, em: cardioembólico, aterosclerótico e lacunar de outras causas específicas (vasculite, distúrbios genéticos etc.) (TIRSCHWELL et al., 2004; SOHRABJI; PARK; MAHNKE, 2017).

Há evidências de que uma alta proporção de AVE hemorrágico pode ser encontrada em países em desenvolvimento, onde o número de distúrbios hipertensivos é maior (CHONG, SACCO, 2005). Na tentativa de mudar esse quadro, ações em saúde para o reconhecimento e o tratamento do AVE estão sendo aplicadas, em associação com campanhas informativas, visando mudanças no estilo de vida dos indivíduos - atividades físicas e/ou dietas menos calóricas (TIRSCHWELL et al., 2004). Somam-se a essas ações, a identificação dos fatores de risco modificáveis e o aumento na demonstração, pelos implementadores, da eficácia dos esforços na redução do risco de curto e longo prazo que envolvem a dieta, comorbidades, idade, etnia (AMELIA; CHARLES; MITCHELL, 2017). Ainda dentro desta proposta da prevenção do AVE, campanhas sobre os danos resultantes do uso de drogas tem ganhado destaque. De acordo com o Relatório Mundial de 2017 sobre Drogas, emitido pelo Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime, o número de usuários aumentou em 23% em onze anos, atingindo 255 milhões de indivíduos em 2015. Esses dados ratificam o aumento no número de mortes atribuídas ao uso de drogas - 67,5% atribuídos ao uso de anfetaminas, 49,7% a cocaína, 29,6% a opióides e os 23% restantes para outras drogas (BÜTTNER, 2011; CRIME WORLD DRUG REPORT, 2017). As drogas ilícitas podem provocar danos aos vasos cerebrais ou em outros órgãos, afetando vias de coagulação do sangue ou coração que compromete negativamente a circulação cerebral (BÜTTNER, 2011; CRIME WORLD DRUG REPORT, 2017). Nesse contexto, AVE isquêmico agudo (infartos cerebrais) ou hemorrágicos (intracerebrais e subaracnóideas) são devidos aos mecanismos de ação específicos de cada substância psicoativa no SNC onde o aumento de pressão arterial, causado por ações estimulantes da droga, é o desencadeador de rupturas em um vaso sanguíneo cerebral e /ou de aneurismas. Há relatos clínicos da vasoconstrição cerebral induzida por ações estimulantes dessas drogas que reduz o fluxo sanguíneo, promove a agregação plaquetária e acelera aterosclerose (WORLD DRUG REPORT, 2017; INDAVE et al., 2018).

No Brasil, existem poucos dados a respeito da prevalência do AVE (ABRANCZUK; VILLELA, 2019). Uma pesquisa de base domiciliar, com uma amostra representativa nacional, relata que o número absoluto estimado de pessoas com AVE e incapacidade, devido a essa neuropatologia, aproxima-se de 2 milhões de indivíduos e, muitos deles, aproximadamente 568.000 indivíduos, com déficits motores e cognitivos consideráveis (BENSENOR et al., 2015). Dentro desse intervalo de acometidos, a prevalência é de 1,6% em homens e 1,4% em mulheres e o percentual de incapacitados atinge 29,5% em homens e 25,9% em mulheres (BENSENOR et al., 2015; ABRANCZUK; VILLELA, 2019).

A prevalência aumenta com a idade em indivíduos com menor grau de escolaridade, mesmo residindo em área urbana e independentemente da cor da pele autodeclarada (BENSENOR et al., 2015). O mesmo é observado quanto a incapacidade dos acometidos - verifica-se pouca diferença quanto ao sexo, raça, área de moradia e nível de escolaridade -, mas em pessoas mais idosas a prevalência e o grau de incapacidade apresentam altas taxas (BENSENOR et al., 2015). Atualmente, esforços têm sido feitos para legitimar a importância do AVE como uma doença vascular com grande relevância nas estatísticas de casos em diversas regiões do Brasil - essa neuropatologia tem sido registrada no sistema de informação sobre mortalidade, como a quarta causa de morte, excedida apenas por doença cardíaca, pneumonia e causas mal definidas (DATASUS, 2019). Em 2017, um estudo intitulado “Melhoria do Diagnóstico de Causa de Morte no Brasil” coordenado por instituições nacionais e internacionais e em parceria com o Ministério da Saúde do Brasil (MS), sessenta cidades das cinco regiões brasileiras que aderiram ao estudo tiveram o perfil e a reclassificação de óbitos de pessoas, com 30 anos de idade ou mais, cuja causa na declaração de óbito (DO) foi classificada como AVE, identificados e relatados (OMS, 2012; SAMIRA et al., 2019). Os dados abrangeram toda extensão territorial, incluindo zona urbana e rural, sendo verificado que 85% dos óbitos por AVE ocorreram em cidades com mais de 500 mil habitantes e com acesso a serviços de saúde, qualidade da atenção e capacitação dos recursos envolvido no processo (SAMIRA et al., 2019; OMS, 2012). Do total de óbitos investigados, 53% eram do sexo feminino, 69,8% ocorreram na faixa etária de 70 anos, 30,2% na faixa de 30 a 69 anos. Em relação a autodeclaração da cor da pele- brancos e negros (pretos e pardos) tiveram 47,9% e 46,8% dos óbitos por AVE (SAMIRA et al., 2019). A região sudeste

apresentou 46,6% dos óbitos, enquanto sul e centro-oeste apresentaram 6,9% e 3,6% dos casos estudados, sendo 84,9% dos óbitos registrados em hospitais e 8,2% em domicílio (SAMIRA et al., 2019). Em relação a investigação a respeito da *causa mortis*, os Estados do Acre (AC) com 100%, Santa Catarina (SC) com 77,2% e Tocantins (TO) 71,3% foram os que se destacaram nessa medida. Sergipe (SE), Mato grosso (MT), Paraná (PR) e Alagoas (AL) investigaram entre 40% e 70% dos óbitos. Estados como Amazonas (5,5%), Bahia (8,1%), Rio de Janeiro (8,9%), com maiores prevalências de óbitos, tiveram baixo percentual de casos investigados (SAMIRA et al., 2019; FRANÇA et al., 2014).

Por sua vez, em um estudo de Resende e colaboradores (2021) a respeito do número de pacientes internados por AVE em Belém (PA), de janeiro de 2016 a novembro de 2020, dos 6.402 pacientes internados, um total de 1.474 vieram a óbito. Esse número, deveu-se a uma melhora no controle dos principais fatores de risco modificáveis e a preocupação da população com saúde e prevenção (RESENDE; AMORIM; SOUZA, 2021). A infraestrutura de suporte para pacientes com AVE no Brasil tem melhorado e em Belém (PA), região metropolitana, os atendimentos nas unidades básicas de saúde (UBS), bem como a identificação, prevenção e controle de fatores de risco na população tem colaborado à diminuição da mortalidade por AVE (DANTAS et al., 2019, NUGEM et al., 2020; RESENDE; AMORIM; SOUZA, 2021). Essas implementações no tratamento do AVE, justificam-se pelas Portarias nº 664/2012 e nº 665/2012 que aprovaram o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para o AVE no Brasil, bem como critérios para qualificação hospitalar como centro de pronto atendimento ao AVE (SILVA et al., 2018). Nesse contexto, o Plano de Ação Estratégico de Combate as Doenças Crônicas Não-Transmissíveis (DCNT), em vigência desde 2011, tem contribuído ao planejamento e efetividade de políticas públicas, maior acesso da população a saúde primária, bem como a campanhas de conscientização e programas de educação médica ao controle de AVE e seus fatores de risco no Estado do Pará (PA) e em todo Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; PASSOS et al., 2016).

Na capital paraense, o sexo masculino apresentou maior número de casos por AVE e os mais acometidos foram aqueles acima de 60 anos (DAMATA et al., 2016; ALMEIDA; VIANNA, 2018; AZEVEDO; ARAÚJO; SOUZA, 2018). Quanto a etnia dos pacientes acometidos por AVE, a prevalência foi maior em pardos (49,1%), seguidos

dos brancos (0,2%), pretos (0,2%) e amarelos (0,2%). Essas informações podem ter um viés, devido as contradições históricas, geográficas e culturais do Brasil que permitem uma distribuição heterogênea das raças e etnias pelas regiões (SCHIMIDT et al., 2019).

Atualmente, com a eclosão da pandemia do novo coronavírus (SARS-coV-2) - agente etiológico causador de uma Síndrome Respiratória Aguda Grave, conhecida como COVID-19 (Coronavirus Disease-2019), tem havido uma subnotificação nos casos de AVE em todo território brasileiro devido a instauração do Estado de Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN) para conter o avanço da doença que proporcionou o aumento na internação hospitalar, levando ao esgotamento dos leitos de terapia intensiva e a uma subnotificação ou detecção de casos de AVE pelo Sistema Único de saúde (SUS) em diversas regiões do Brasil (CAVALCANTE et al., 2020).

Finalizando, as patologias agudas e crônicas do sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) afetam um considerável contingente de pessoas em diversas regiões do mundo (LOTUFO, 2005). Essas doenças demandam um custo financeiro ao sistema de saúde pública e deixam sequelas irreversíveis nos indivíduos acometidos, viabilizando as investigações dos mecanismos que desencadeiam os fatores responsáveis pelos déficits motores e cognitivos à melhor avaliação clínica e utilização de abordagens terapêuticas adequadas (LO; DALKARA; MOSKOWITZ, 2003; GOMES-LEAL, 2004; CARMICHAEL, 2005).

1.4. PLANTAS MEDICINAIS COMO FONTES DE RECURSOS TERAPEUTICOS

Uma planta medicinal pode ser considerada aquela administrada sob qualquer forma ou por alguma via ao homem e que exerce um tipo de ação farmacológica (SILVA; CARVALHO, 2004). Elas podem ser classificadas tendo como base sua ordem de importância, e várias são empregadas diretamente na terapêutica ou se destinam à manipulação na indústria para obtenção de princípios ativos ou como produto à semissíntese (SILVA; CARVALHO, 2004).

Os fármacos obtidos são amplamente utilizados na clínica médica, (CALIXTO, 2000; CECHINEL-FILHO, 1998). Aproximadamente, 50% dos medicamentos utilizados são de origem sintética e 25% são de origem vegetal, isolados ou produzidos por semissíntese - processos de síntese orgânica e biotecnológica que

tem contribuído ao aumento de medicamentos prescritos em países industrializados (LOZOYA, 2001). Nos últimos 20 anos, os fármacos de origem natural que apareceram no mercado são quase na totalidade oriundos das pesquisas científicas de países asiáticos (CALIXTO, 2000; LOZOYA, 2001).

Os chineses usam o conhecimento popular sobre as ervas medicinais há séculos, resultando em mais de mil espécies de plantas medicinais identificadas, catalogadas e usadas em tratamentos de doenças (WANG, 1984; DING, 1987). Muitas espécies foram analisadas e tiveram seus princípios ativos conhecidos- da *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae) , vulgarmente chamada de papoula, extraiu-se o ópio que contem a morfina muito empregada no combate a dor desde 1903; dessa mesma planta (papoula) foi extraída a codeína (Robiquet) e a papaverina (Merk); outros compostos de plantas medicinais – cardenolídeos (digitoxina e a digoxina) foram utilizados no tratamento de cardiopatias; para câncer, alcaloides extraídos da *Catharanthus roseus* G.Don (Apocynaceae) e taxóides extraídos *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae) são considerados importantes no tratamento dessa patologia (FELLOWS, 1992; CRAGG et al., 1999; YUNE; CECHINEL, 2001; HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

Atualmente, muitos estudos procuram alternativas fitoterápicas ao tratamento de neuropatologias agudas e crônicas, ressalta-se pesquisas com o Ginkgo biloba como fitoterápico e que parece ter efeitos neuroprotetores (AO et al., 2006). Igualmente, Guimarães-Santos e colaboradores (2012) investigaram os efeitos anti-inflamatório e neuroprotetor da copaíba no SNC através de um modelo experimental de AVE em ratos. Com mesmo objetivo, o gergelim (*Sesamum indicum* L) - uma planta cultivada há centenas de anos para obtenção de sementes que são utilizadas na alimentação e condimentos - tem apresentado grande potencial de cura de algumas patologias quando ingerida “*in natura*” e/ou usada topicamente (KIRAN; ASAD, 2008). Por seu turno, estudos de Hu e colaboradores (2004) relatam que as sementes de gergelim possuem propriedades antioxidantes, uma propriedade importante em doenças que acometem o SNC.

Cientes da importância de certas espécies de plantas para fins medicinais e centrados na descoberta e estudos de outras, em países com uma megabiodiversidade - Austrália, Brasil, China, Colômbia, Equador, Índia, Indonésia, Madagascar, Malásia, México, Peru e Zaire - a utilização das plantas, como matriz

medicinal, de forma sustentável tem representado um avanço à conservação e reparo das áreas degradadas. No Brasil, o cerrado é considerado um *hotspot* mundial - conceito criado em 1988 pelo ecólogo inglês Norman Myers para determinar as áreas mais importantes para preservação da biodiversidade (RHODIN, 2005). Os 34 *hotspots* identificados correspondem a apenas 2,3% da superfície terrestre, onde se encontram 50% das plantas conhecidas (RHODIN, 2005).

Em muitos estados do Brasil a matéria-prima vegetal é empregada na elaboração de fitomedicamentos consumidos por 20% da população que encontra nos produtos de origem natural, especialmente as plantas medicinais, a única fonte de recursos terapêuticos (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003). Na medicina popular, muitas espécies são usadas empiricamente sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança, enquanto que no mundo aproximadamente 17% das plantas foram estudados de alguma maneira em relação ao uso como produto medicinal e, na grande maioria, sem nenhum aprofundamento nos aspectos fotoquímicos e farmacológicos (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003; HAMBURGER; MARSTON; HOSTETTMANN, 1991; CRAGG et al., 1999).

Em estudos com substâncias e/ou extratos de plantas, do ponto de vista farmacológico, é imprescindível a avaliação, em cultura de células e/ou em modelos experimentais, da atividade antiulcerogênica, anti-inflamatória e anticancerígena, bem como dos efeitos anticonvulsivante, poder analgésico e, recentemente, das ações neuroprotetora em doenças agudas e crônicas do SNC (GUIMARÃES et al., 2012). Outrossim, uma avaliação toxicológica - citotoxicidade, toxicidade aguda, toxicidade em doses repetidas (toxicidade crônica), irritação dérmica primária e cumulativa, irritação ocular, sensibilidade cutânea e fototoxicidade - é importante para melhor caracterizar a matriz do extrato, possibilitando o delineamento de abordagens que permitem o fechamento do ciclo multidisciplinar na investigação e/ou estudo com plantas medicinais (UNICAMP, 2006).

Nesse sentido, compostos químicos extraídos da matriz de plantas medicinais e com potenciais princípios ativos, constituem-se em produtos importantes e decisivos, considerando-se a riqueza vegetal ainda sem estudo, com possibilidades ao desenvolvimento de novos medicamentos na área científico-tecnológica (YUNES; CECHINEL, 2001; UNICAMP, 2006).

1.5. JUSTIFICATIVA

Evidências clínicas e epidemiológicas reforçam que o risco de AVE e as medidas de tratamentos adotadas após a lesão isquêmica estão relacionados aos aspectos fisiológicos dos pacientes e que as diferenças nos padrões da lesão são atribuídas a efeitos diversos, resultantes dos processos iônicos e bioquímicos posteriores à privação de oxigênio no parênquima cerebral (HURN; BRASS, 2003; VAGNEROVA et al., 2008; BROUNS, DE DEYN, 2009).

Modelos experimentais de AVE, em ratos, proporcionam patologia semelhante à encontrada em humanos e funcionam como mecanismos práticos importantes para avaliar a ação de fármacos sintéticos e/ou extratos de diversas plantas sobre a morte celular, a progressão da lesão, as respostas inflamatórias e os déficits motores resultantes da lesão isquêmica (ALKAYED et al., 1998; VANNUCCI et al., 2001; LEGG; LANGHORNE, 2004; DOBKIN, 2005; GUIMARAES et al., 2012).

As investigações sobre os possíveis efeitos neuroprotetores, neurorregenerativos e anti-inflamatórios dos extratos de plantas da Amazônia brasileira continuam incipientes e as principais doenças neurodegenerativas agudas e crônicas permanecem sem cura (GUIMARÃES et al., 2012). No caso do AVE, que se configura como a segunda causa mundial de morte, somente perdendo para o câncer e doenças do coração, inexistem abordagens terapêuticas (com exceção do trombolítico tPA para AVE isquêmico) que diminuam a lesão neural secundária após o início dos sintomas (TAYLOR et al., 1996; CABRAL et al., 1997). No entanto, poucos pacientes se beneficiam do uso de trombolíticos, devido à sua estreita janela terapêutica ser verificada em até 3 a 4,5 horas após o início dos sintomas, sob o risco de ocorrer à transformação hemorrágica (CARPENTER et al., 2011; RYMNER et al., 2010).

Portanto, diante da ineficácia das várias drogas testadas para as desordens neurais agudas em modelos experimentais com animais e/ou em estudos com humanos (O'COLLINS et al., 2006; SACCHETTI, 2008), há a necessidade da busca de novos e mais eficazes agentes neuroprotetores e/ou anti-inflamatórios para doenças do SNC, o que justifica este estudo. Assim, guarda também conformidade as novas diretrizes do Ministério da Saúde (MS), que considera o AVE um problema de saúde pública.

1.6. HIPÓTESE EXPERIMENTAL

Em concordância com o exposto acima, levantamos a seguinte hipótese para ser investigada: o tratamento com extrato supercrítico de gergelim preto (*Sesamum indicum* L) em ratos adultos machos e isquêmicos por microinjeção de endotelina-1 no estriado tem efeito anti-inflamatório e neuroprotetor.

1.7. OBJETIVOS

1.7.1. Objetivos Gerais

O objetivo geral dessa pesquisa foi investigar, de forma sistemática, utilizando modelo experimental de AVE, os possíveis efeitos anti-inflamatórios, neuroprotetores e/ou regenerativos de uma planta, considerada como neuroprotetora e/ou anti-inflamatória pela medicina popular: gergelim preto (*Sesamum indicum* L), para o qual existem evidências científicas de seus possíveis efeitos em outras patologias.

1.7.2. Objetivos Específicos

- a. Descrever a histopatologia da lesão isquêmica, a perda tecidual e a distribuição e densidade de células polimorfonucleares após o tratamento com o extrato supercrítico de gergelim preto (*Sesamum indicum* L) nos tempos de sobrevida estabelecidos.
- b. Investigar qualitativa e quantitativamente os efeitos do extrato supercrítico de gergelim preto (*Sesamum indicum* L) sobre a reatividade astrocitária em diferentes tempos de sobrevida após AVE experimental induzido por microinjeção de endotelina -1 (ET-1) no estriado de ratos adultos;
- c. Investigar qualitativa e quantitativamente se o extrato supercrítico de gergelim preto (*Sesamum indicum* L) pode influenciar na ativação microglial em diferentes tempos de sobrevida após AVE experimental como especificado;
- d. Investigar qualitativa e quantitativamente se o extrato de gergelim preto (*Sesamum indicum* L) possui efeito sobre a perda neuronal nos diferentes tempos de sobrevida após AVE experimental;
- e. Investigar por microscopia optica se o extrato de gergelim preto (*Sesamum indicum* L) ocasiona alterações morfológicas nas células dos rins e fígado de animais isquêmicos que receberam doses diárias do extrato nos tempos de sobrevida estabelecidos;
- f. Investigar os efeitos citotóxicos, atividade hemolítica, do extrato de gergelim preto (*Sesamum indicum* L), nos componentes sanguíneos.

- g. Investigar o percentual de acidez do extrato de gergelim preto (*Sesamum indicum* L), relacionando-o aos possíveis danos histológicos e/ou aos efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores após AVE.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais e aspectos éticos

Para a realização do estudo foram utilizados ratos adultos Wistar do sexo masculino cedido pelo Biotério Central da Universidade Federal do Pará (UFPA). Os procedimentos experimentais foram realizados em obediência às normas sugeridas pelo Conselho Nacional de Controle de Animais de Experimentação (CONCEA) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE - UFPA). O parecer de aprovação tem o número: BIO 137-13.

2.2. Grupos Experimentais

Neste estudo, investigamos os possíveis efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores do gergelim preto (*Sesamum indicum L*) após isquemia, usando os seguintes grupos experimentais:

Tabela 1: Grupos Experimentais, descrição e quantidade de animais por grupo. **RIT24H:** Rato isquêmico tratado-24 horas; **RIC24H:** Rato isquêmico controle-24 horas; **RIT7D:** Rato isquêmico tratado- 7 Dias; **RIC7D:** Rato isquêmico controle- 7 Dias.

Grupos	Descrição	Número
RIT24H	Animais que receberam todos os procedimentos cirúrgicos, a injeção de endotelina-1 no estriado e o tratamento com extrato de gergelim (150mg/kg) por via intraperitoneal e que foram perfundidos em 24 horas após a última dose.	9
RIC24H	Animais que receberam todos os procedimentos cirúrgicos, a injeção de endotelina-1 no estriado e o tratamento com solução Tween a 5% por via intraperitoneal e que foram perfundidos em 24 horas após a última dose.	6
RIT7D	Animais que receberam todos os procedimentos cirúrgicos, a injeção de endotelina-1 no estriado e o tratamento com extrato de gergelim (150mg/kg) por via intraperitoneal e que foram perfundidos 7 dias após a última dose.	9
RIC7D	Animais que receberam todos os procedimentos cirúrgicos, a injeção de endotelina-1 no estriado e o tratamento com solução Tween a 5% por via intraperitoneal e que foram perfundidos 7 dias após a última dose.	6

2.3. Avaliação da Citotoxicidade do Extrato de Gergelim Preto (*Sesamum indicum* L)

Para avaliar os efeitos da citotoxicidade do extrato supercrítico de gergelim preto (*Sesamum indicum* L) sobre hemácias humanas, a atividade hemolítica foi desenvolvida segundo Sharma; Sharma, 2001 e Khan et al., 2013 com algumas modificações (**Figura 5**). Os percentuais de hemólise foram calculados, utilizando-se a seguinte equação:

$$\% \text{ Hemólise} = [(A_{492} \text{ Óleo} - A_{492} \text{ PBS} / (A_{492} \text{ TRI} - A_{492} \text{ PBS})) \times 100]$$

Onde: A_{492} Óleo= Absorbância do composto óleo em 492 nm

A_{492} PBS= Absorbância do PBS (controle negativo) em 492 nm

A_{492} TRI= Absorbância do Triton (controle positivo) em 492 nm

Cerca de 2 ml de hemácias humanas foram lavadas três vezes por centrifugação (2500 rpm/ 10 minutos) em tampão fosfato salina (PBS) para preparação de uma suspensão de hemácias a 10%. Alíquotas de 2,5 mL da suspensão de hemácias foram preparadas e acrescidas de 500 µL do extrato nas concentrações de 2000, 1000, 500 e 250 mg/L. As soluções foram misturadas e originaram três alíquotas de 1mL cada, denominadas como T0, T20 e T40 que foram levadas imediatamente a banho-maria e incubadas a 37°C. Em seguida, 40 µL de glutaraldeído a 2,5% foram adicionados em tempos diferentes aos três tubos para encerrar a reação: (i) ao tubo T0 imediatamente após a incubação a 37°C; (ii) após 20 minutos ao tubo T20; (iii) e depois de quarenta minutos de incubação ao tubo T40.

Após adição do glutaraldeído nos tempos indicados, os tubos foram centrifugados a 2500 rpm por quinze minutos para permitir que membranas rompidas e as células não rompidas sedimentassem. O sobrenadante foi removido e transferido para uma placa de 96 poços e a hemoglobina liberada no sobrenadante foi medida por espectrofotometria à absorbância de 492 nm utilizando um espectrofotômetro.

Como controle positivo foi utilizado 0,2% de Triton X-100 diluído em PBS (100% de hemólise) e uma solução de PBS (0% de hemólise) como controle negativo. De cada controle foi usado o volume de 500 µL que foram adicionados às alíquotas de 2,5 ml da suspensão de hemácias a 10%.

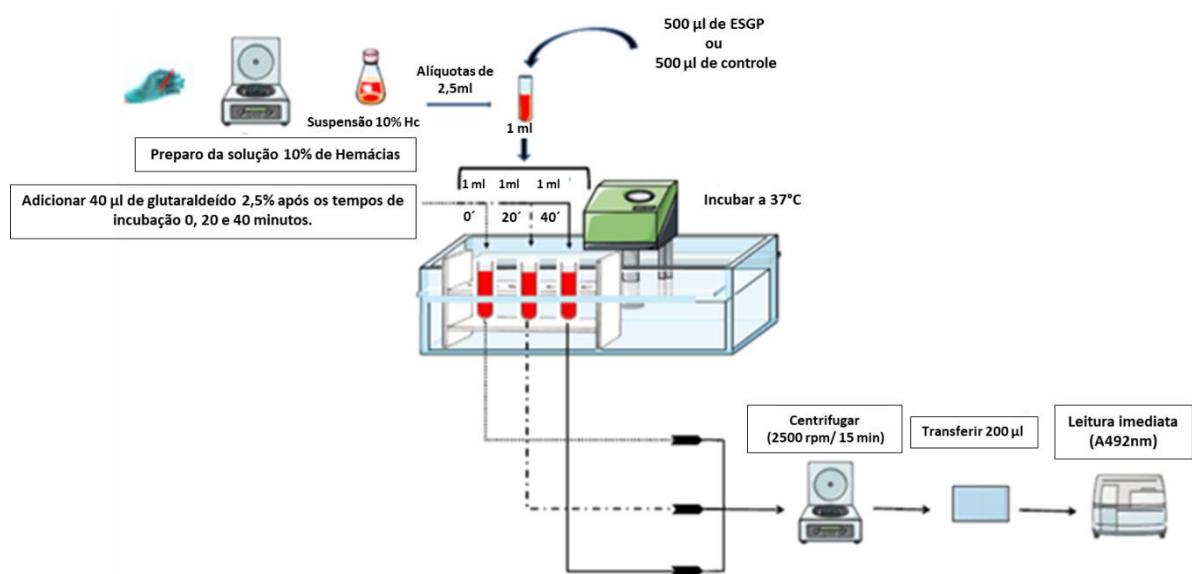


Figura 5: Etapas à avaliação da citotoxicidade de extrato de gergelim (*Sesamum indicum* L). Preparo da solução, centrifugação, transferência e leitura.

2.4. Perfil de Acidez do Extrato Supercrítico de Gergelim Preto (*Sesamum indicum* L)

O índice de acidez do extrato supercrítico de gergelim preto (*Sesamum indicum* L) foi determinado segundo o método oficial Ca 5a-40 da American Oil Chemists' Society (AOCS, 2014), a amostra foi dissolvida em álcool neutralizado a quente e a fenolftaleína foi utilizada como indicador. A amostra foi titulada com Hidróxido de Sódio (NaOH). O resultado dessa análise foi expresso em porcentagem de ácidos graxos livres (%FFA) em ácido palmítico e láurico.

Ácidos graxos como % palmítico

$$\% = \frac{\text{ml de NaOH} \times N \times \text{fc} \times 25,6 \text{ (constante)}}{\text{Massa da amostra (g)}}$$

Massa da amostra (g)

Ácidos graxos como % láurico

$$\% = \frac{\text{ml de NaOH} \times N \times \text{fc} \times 20,0 \text{ (constante)}}{\text{Massa da amostra (g)}}$$

Massa da amostra (g)

Valor de Acidez

Valor de Acidez (mgKOH/g) = [% ácidos graxos livres (palmítico ou láurico) x 1,99]

Onde:

N: Normalidade do Hidróxido de Sódio (0,1);

Fc: Fator de Correção do Hidróxido de Sódio 0,1 N;

Constante: É o peso molecular do ácido graxo

Notas:

01- A massa de amostra varia de acordo com o tipo de produto a ser analisado (quantidade de ácidos graxos livres);

02- Os ácidos graxos livres são frequentemente expressos em termos do valor de acidez, definido como o número de miligramas de KOH necessários para neutralizar 1 g de amostra.

2.5. Isquemia Focal em Roedores

Em estudos prévios se realizou o modelo experimental proposto. Utilizaram-se os efeitos vasoconstritores do peptídeo endotelina-1(ET-1) para induzir a isquemia focal na região do estriado de ratos adultos (LIMA et al.,2008; CARDOSO, 2012; FRANCO et al., 2012). Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal (i.p) de uma mistura de cloridrato de cetamina (Vetanarcol®, König 72 mg/ Kg) e Xilazina (Kensol®, König 9 mg/ Kg). Os reflexos corneano e de retirada das patas foram testados antes dos animais serem posicionados no aparelho estereotático (Insight, Brasil). A estereotaxia e a cirurgia foram iniciadas somente quando estes reflexos foram abolidos pela anestesia. Uma pequena abertura foi realizada no crânio destes animais com coordenadas estereotáticas específicas para injeções de ET-1 no estriado, em relação ao Brégma, coordenadas: 1,2 mm anterior-posterior; 2,5 mm médio-lateral; -4,0 mm dorsoventral a partir da superfície cortical (PAXINOS et al., 1980). O corante azul de colanil foi adicionado ao diluente da endotelina-1 para facilitar a identificação do local de injeção no momento dos cortes em criostato.

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram observados, em intervalos regulares (de duas em duas horas), visando o monitoramento da recuperação e da evolução dos sintomas causados pelo dano isquêmico, mantidos em gaiolas-padrão individuais com água e comida durante o tratamento com o extrato da planta e/ou

Tween a 5% nos tempos de sobrevida: 24 horas e 7 dias após a indução isquêmica (Figura 6).

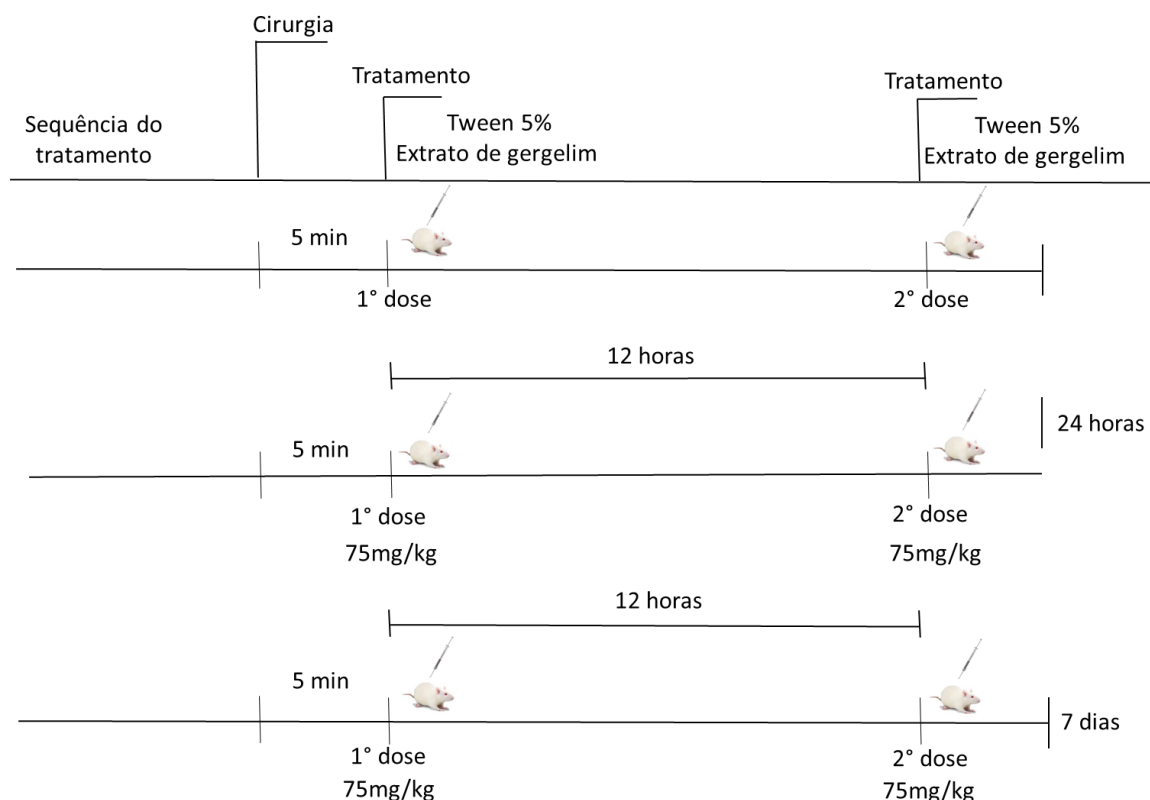


Figura 6: Desenho experimental à obtenção da lesão isquêmica, dose injetada do extrato e o intervalo de tempo de cada aplicação.

2.6. Perfusão e processamento tecidual

Após os diferentes tempos de sobrevida especificados acima, os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (Vetanarcol®, König 72 mg/Kg) e xilazina (Vetanarcol®, König 72 mg/Kg) via intraperitoneal (i.p.). Os testes do reflexo corneano e de retirada da pata foram avaliados para garantir que os animais estavam bem anestesiados, antes de qualquer manipulação cirúrgica. Em seguida, realizou-se uma rapidamente toracotomia e a exposição do saco pericárdico que foi aberto para a visualização do coração. Uma pequena incisão na aurícula direita foi realizada e uma agulha ligada ao sistema de perfusão foi introduzida no ventrículo esquerdo e direcionada até a porção inicial da aorta; os animais foram perfundidos com solução salina 0,9% heparinizada seguida pelo fixador Paraformaldeído a 4%.

Os encéfalos foram dissecados e pós-fixados por 24 horas no mesmo fixador utilizado na perfusão. Após a pós-fixação por um período de 24 horas, os mesmos

foram crioprotetidos utilizando o seguinte protocolo: i) solução crioprotetora a 25% (24 horas); ii) solução crioprotetora a 50% (48 horas); iii) solução crioprotetora a 100% (7 dias). Após a crioproteção, o tecido foi congelado em gel de imersão (TissueTek) para cortes em criostato a -35°C . Por conseguinte, secções coronais com espessura de 20 e 50 μm foram obtidas e colocados em lâminas previamente gelatinizadas e mantidas a temperatura ambiente por um período mínimo de 24 horas. Em seguida guardadas em freezer à -20°C para posterior utilização nos procedimentos de imuno-histoquímica e/ou histológicos.

2.7. Análise Histopatológica e Imuno-histoquímica

2.7.1. Área da Lesão

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

2.7.2. Estudos Imuno-histoquímicos

Para se avaliar os possíveis efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores do extrato de gergelim preto (*Sesamum indicum* L), extração por fluido supercrítico, foi realizada uma série de estudos imuno-histoquímicos para marcação específica a cada tipo celular na área isquêmica.

Foram seguidos os protocolos de imunomarcação padronizados, utilizados com o método DAB-níquel (GOMES-LEAL et al., 2004) estabelecidos em estudos prévios.

2.7.2.1. Neurônios

Os corpos neuronais foram marcados com anticorpo anti-NeuN (1:100, Chemicon), um marcador específico de corpos celulares de neurônios maduros (MULLEN et al., 1992; CARDOSO, 2012; FRANCO et al., 2012).

2.7.2.2. Células Gliais

Para o estudo de astrócitos, utilizou-se anticorpo anti-proteína acídica fibrilar glial (anti-GFAP) (1:1000, Dako) (GOMES-LEAL et al., 2004a); a presença de micróglias / macrófagos ativados no centro ou na periferia da lesão foi identificada pelo anticorpo ED1 (1:500, Serotec) (DIJKSTRA et al., 1985).

2.7.3. Métodos Histológicos

As amostras de tecidos biológicos de rim e fígado de animais isquêmicos - tratados com extrato de gergelim e controles que receberam tratamento com PBS Tween a 5% - foram armazenados em solução fixadora a base de formaldeído 10% tamponado por 24 horas e, em seguida, processados em uma bateria de álcool etílico, em diferentes concentrações (70%, 80%, 90% e 100%) por um período de tempo especificado em cada concentração. Em seguida, passaram em uma bateria de xileno (Xilol-I e Xilol-II), por tempos determinados e, posteriormente, incluídos em parafina e cortados em micrótomo para obtenção de secções com espessura de 5µm que foram coradas pelos métodos de coloração de rotina e/ou histoquímicos - Hematoxilina e Eosina (HE), Tricrômico de Gomori (TG), Ácido Periódico-Schiff (P.A.S reativo de Schiff) obedecendo o Protocolo de Lillie (1965).

2.8. Análise Qualitativa

Todas as secções coradas pelos diferentes métodos histológicos e imuno-histoquímicos foram inspecionadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse 50i). A área de lesão foi delineada nas imagens obtidas de secções coradas com NeuN ou violeta de cresila, utilizando-se o programa Power Point. Essa identificação ocorreu a partir das bordas que delimitavam a área lesionada, em diferentes secções, todas pertencentes a diferentes animais e tempos de sobrevida (n=5/ animal/ tempo de sobrevida). Os campos mais ilustrativos, obtidos de secções em todos os tempos de sobrevida e grupos experimentais, foram capturadas com o programa de computador Motic 5.0 e Câmara Digital acoplada a um microscópio óptico (THORED et al., 2009).

2.9. Análise Quantitativa

A avaliação quantitativa dos resultados histopatológicos: foram obtidos em um microscópio Binocular (Modelo Eclipse- E200MV R) com gradícula de área 0,0625 mm² acoplada a ocular, sendo elas: a) o número de células NeuN+ (neurônios); b) micróglia/macrófagos (ED-1+) ativos; c) astrócitos reativos (GFAP). Os campos investigados foram visualizados na objetiva de 40X e as contagens das células em três secções por lâmina, todo campo ao redor da lesão por secção, em quatro animais para cada grupo experimental (**Figura 7**).

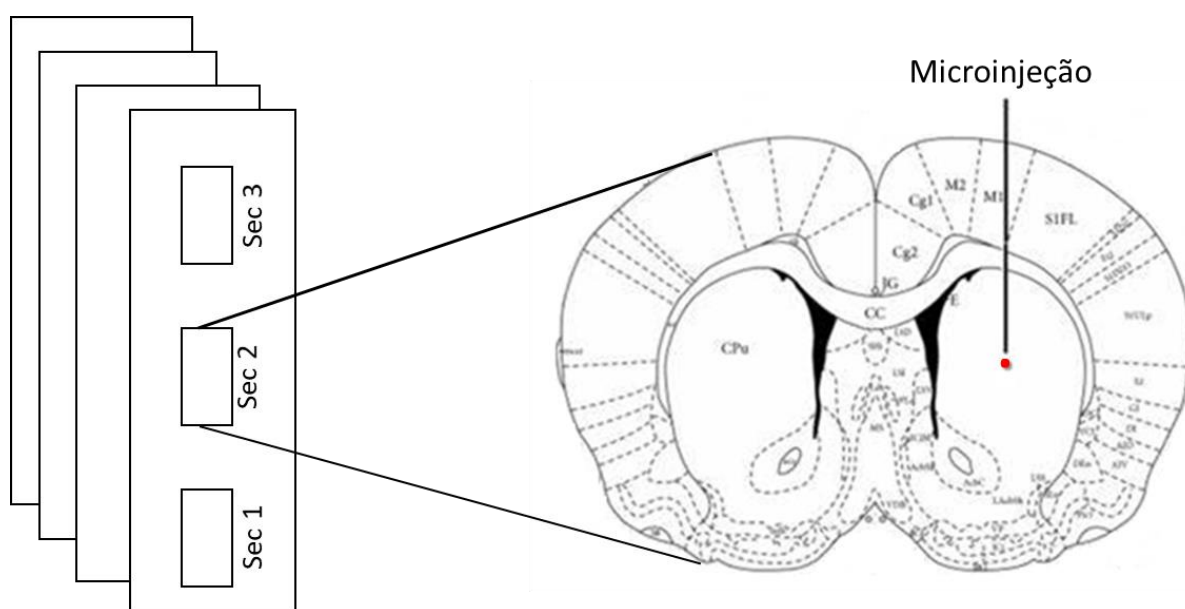


Figura 7: Esquema que identifica a posição das secções nas lâminas à quantificação das células imunomarcadas e imagem (corte coronal) evidenciando o local da lesão isquêmica após injeção de endotelina-1(ET-1).

2.10. Análise Estatística

Foram utilizados os parâmetros de estatística descritiva (média, erro padrão e desvio padrão) para todos os dados quantitativos. As diferenças entre os grupos foram investigadas pelo teste t-Student, com o nível de significância em $p < 0.05$ para significativo e $p < 0.01$ iguais a altamente significativo. Os resultados estatísticos e a plotagem dos gráficos foram obtidos no programa Microsoft Excel.

2.11. Matéria-prima, Fracionamento e Isolamento do Extrato

2.11.1. Considerações a respeito da Matéria-Prima: Gergelim preto (*Sesamum indicum* L).

O gergelim (*Sesamum indicum* L) é uma planta pertencente à família *Pedaliaceae*, ordem *Tubiflorae*, subordem *Solamineae*, tribo *Sesameae* e gênero *Sesamum*. Essa planta possui 13 gêneros e 75 espécies, sendo uma planta anual ou perene de altura variável – aproximadamente de 0,5 a 3 m, possuindo o caule reto com ou sem ramificações. As folhas são pecioladas pubescentes, sendo as flores axilares, gamopétalas e zigóformas, com fruto tipo cápsula e deiscência loculicida (AMABILLE et al., 2001). Trata-se de uma oleaginosa com bastante importância econômica e cultivada em diversas localidades no mundo - em regiões de clima tropical e semi-tropical e com boa adaptação ao semi-árido (**Figura 8**) (KOCA et al., 2007).



Figura 8: Estágios de crescimento do gergelim preto (*Sesamum indicum* L) (WEI et al., 2022).

O gergelim possui um alto percentual de proteínas e carboidratos, além de apresentar sementes ricas em compostos com propriedades oleaginosos. Essas características são bastante exploradas nas indústrias farmacêuticas e de alimentos à obtenção de suplemento alimentar, hidratantes, sabonetes, loções e filtros solares

etc. (BAYDAR et al., 1999; ELLEUCH et al., 2007). Por sua vez, as substâncias antioxidantes presentes nos óleos extraídos desse vegetal possibilitam estudos “*in vitro*” ou “*in vivo*” para diversas patologias: diabetes, hipertensão, câncer, dislipidemia e outras (SANKAR et al., 2004; KOCA et al., 2007).

Nesse contexto, antioxidantes lipossolúveis – tocoferóis e tocotrienóis – conferem ao óleo de gergelim uma elevada estabilidade oxidativa em relação aos outros óleos vegetais (SUJA et al., 2004; SCHWARTZ et al., 2008). O gergelim ocupa o nono lugar entre as oleaginosas mais plantadas no mundo com uma área cultivada aproximadamente de 6 milhões de hectares, apresentando uma produtividade em sementes de 400kg/ha. No Brasil são produzidas aproximadamente 13 mil toneladas em uma área de 22 mil hectares que possibilita uma produtividade média de 519 kg/ha em virtude de temperaturas que variam entre 25 °C a 30 °C nesses locais, com baixas altitudes – valores abaixo de 500m - e considerável volume de precipitação, em torno de 650mm (AMABILLE et al., 2001; ARRIEL et al., 2009; MESQUITA et al., 2013).

Destaca-se que a espécie pode ser inserida em sistemas tradicionais de cultivo (plantio direto) e/ou em sistemas agroecológicos, possibilitando aos pequenos e médios produtores uma alternativa de plantio (PERIN et al., 2010).

2.11.2. Preparação e Caracterização da Matéria Prima

O gergelim preto (*Sesamum indicum* L.) foi adquirido da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) através de uma colaboração com o Dr. Osmar Lameira, coordenador do Laboratório de Biotecnologia da EMPRAPA. Essa planta possui identificação botânica e as exsiccatas estão depositadas no museu da EMBRAPA.

A matéria-prima foi processada no Laboratório de Separações e Processos do Centro Tecnológico em Colaboração com o Prof. Dr. Raul Carvalho Jr, Engenheiro Químico e professor adjunto do Campus da UFPA em Belém. Os procedimentos foram descritos em investigações prévias (CARVALHO, 2004; CARVALHO, 2005).

Inicialmente, a matéria-prima foi lavada, submetida à secagem até peso constante e colocada em sacos plásticos de polipropileno, fechadas e armazenadas em freezer doméstico em temperatura inferior a -5 °C. As sementes foram moídas em um moinho elétrico de facas (TECNAL, modelo TE 631/1, São Paulo, Brasil). Posteriormente, foi realizada a análise granulométrica deste material utilizando um

conjunto de peneiras padronizadas da Série Tyler (W.S. Tyler, USA), com abertura de -18 + 60 *mesh*. O produto da granulometria foi colocado em um agitador magnético (PRODUTEST, modelo 3580, São Paulo, Brasil) até a separação completa das partículas. Após o peneiramento deste material, as frações de 24 a 48 *mesh* foram homogeneizadas para posterior acondicionamento a vácuo em sacos plásticos de polipropileno, os quais foram armazenados em um freezer em temperatura inferior à -5°C.

2.11.3. Obtenção de Extratos por Fracionamento com Fluido Supercrítico

O extrato de gergelim preto foi obtido com o uso da tecnologia de extração com fluido supercrítico (CARVALHO, 2005).

A extração foi realizada em uma unidade de extração supercrítica, Speed SFE 2 da Appleid Separations (930, Hamilton Street, Allentown, PA 18101), do Laboratório de Análises Químicas da Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia (FACET) da Universidade Federal do Pará (UFPA), *campus* Belém, conforme apresentado na (Figura 9).



Figura 9: Speed SFE2 da Appleid Separations

Os experimentos foram realizados em duplicatas com planejamento aleatorizado na unidade de extração supercrítica. O leito de extração foi formado com cerca de 10% do volume da célula de extração empacotada com matéria-prima utilizando partículas de tamanho de 24, 32 e 48 *mesh* divididas em partes iguais e o restante foi preenchido com esferas de vidro. Foram realizadas extrações exaustivas

até que todo material solúvel na condição de processo (temperatura, pressão e vazão de solvente) seja removido da matriz sólida.

3. RESULTADOS

3.1. Histopatologia da Lesão Isquêmica após Microinjeção de Endotelina-1 no Estriado de Ratos Machos Adultos e Submetidos ao Tratamento Intraperitoneal com Solução Tween 5% e Extrato Supercrítico de Gergelim Preto (*Sesamum indicum* L).

Para avaliar a histopatologia da lesão após o AVE, foram utilizadas técnicas histoquímicas e imuno-histoquímicas em secções de encéfalos dos ratos isquêmicos, por injeção de 80 pMol de endotelina-1 (ET-1) no estriado, usando a coloração de violeta de cresila e imunomarcagem específica para células gliais e neurônios.

A coloração de violeta de cresila foi efetiva para demonstrar que as células polimorfonucleares infiltram a área periférica e central à lesão, no período de 24 horas e 7 dias após a isquemia, acumulando-se nas proximidades de neurônios isquêmicos. (**Figuras 10 e 11**). Nesse período, foi verificado edema, resposta inflamatória e diminuição de corpos celulares, bem como áreas de lesão bastantes distintas. Um ramo da artéria cerebral média próximo ao local de injeção da ET-1 e do edema foi melhor observado pela coloração com nuclear *fast-green* (**Figura 12**).

A densidade de células infiltradas na área de lesão nos animais isquêmicos e tratados por 24 horas com extrato supercrítico de gergelim preto foi menor em relação aos animais isquêmicos que não receberam o tratamento nesse período (animais-controle). Após 7 dias de isquemia, um aparente aumento no número de células infiltradas no local da lesão foi verificado - um número bem superior ao observado nas 24 horas. Semelhante à janela temporal de 24 horas, verificou-se, após 7 dias, uma diferença na densidade de células polimorfonucleares entre os grupos, com o grupo tratado apresentando menor número de células polimorfonucleares em relação ao grupo controle.

Essas observações sugerem que as células polimorfonucleares que infiltraram à área isquêmica do encéfalo, no período de 24 horas e após 7 dias, podem estar sofrendo influência do extrato usado no tratamento (**Figuras 10 e 11**).

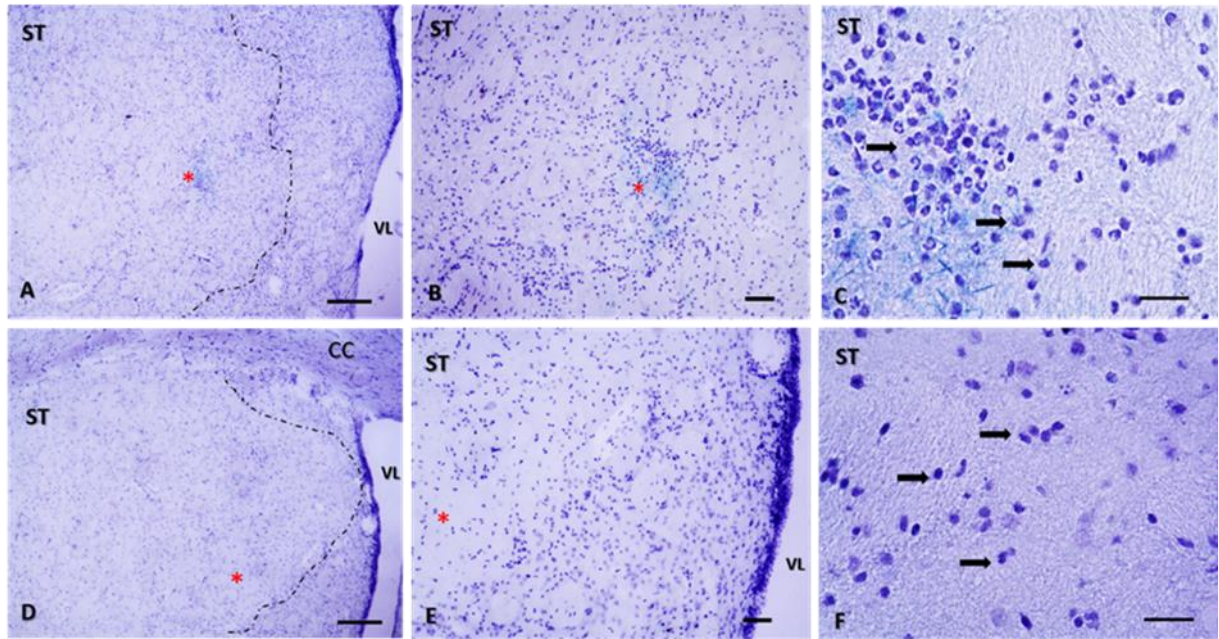


Figura 10: Imagens de amostras de tecidos cerebrais corados com violeta de cresila mostrando que o AVE isquêmico foi induzido no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1). **Linha superior:** animal controle (Tween), 1 dia após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 1 dia após AVE. **Setas:** apontam para infiltrado de células polimorfonucleares; **Linha pontilhada:** área isquêmica; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **VL:** Ventrículo lateral; **ST:** Estriado. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, E); 400 μ m.

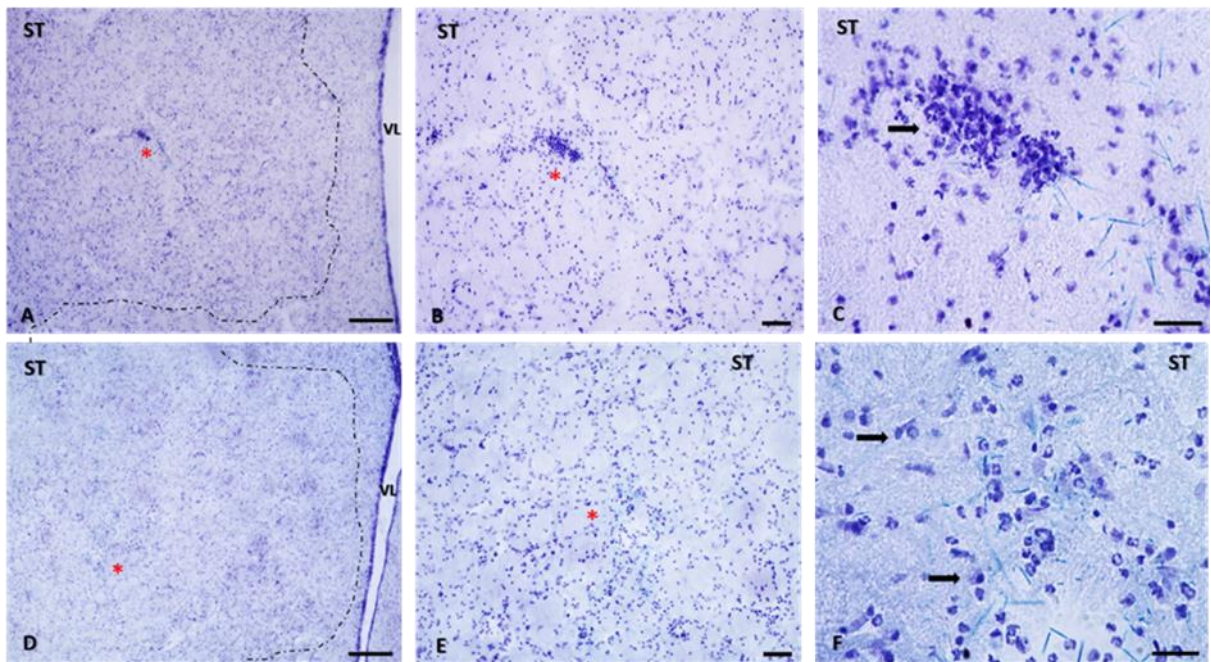


Figura 11: Imagens de amostras de tecidos cerebrais corados com violeta de cresila mostrando que o AVE isquêmico foi induzido no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1). **Linha superior:** animal controle (Tween), 7 dias após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 7 dias após AVE. **Setas:** apontam para infiltrado de células polimorfonucleares; **Linha pontilhada:** área isquêmica; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **VL:** Ventrículo lateral; **ST:** Estriado. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, E); 400 μ m (C,F).

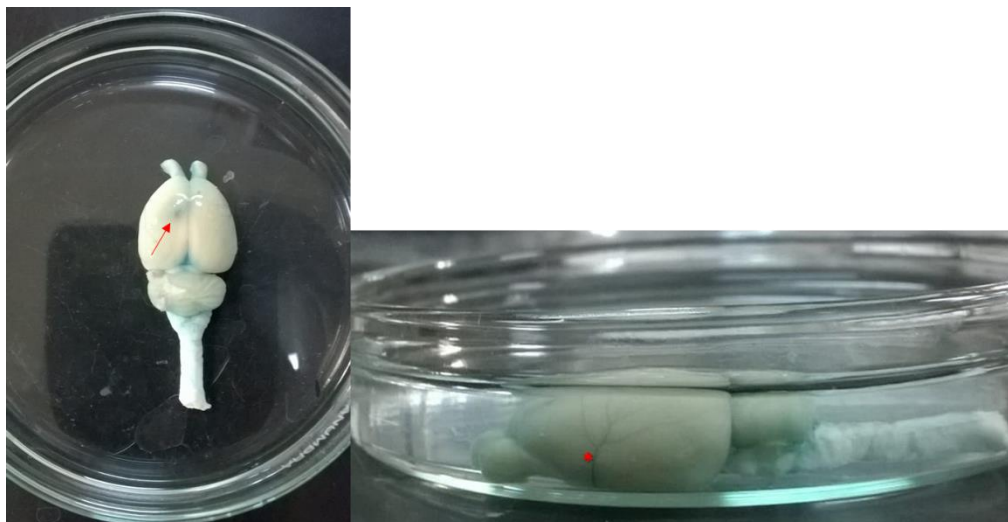


Figura 12: Encéfalo de rato isquêmico. **Seta:** indicando edema; **Asterisco (*):** ramo da artéria cerebral média.

3.2. Reatividade Astrocitária Após Lesão Isquêmica Obtida por Microinjeção de Endotelina-1 no Estriado de Ratos Machos e Submetidos ao Tratamento Intraperitoneal com Solução Tween 5% e Extrato Supercrítico de Gergelim Preto (*Sesamum indicum* L).

O AVE, induzido por endotelina-1(ET-1) no estriado, ocasionou astrogliose independentemente do tempo de sobrevivência de 24 horas e/ou 7 dias após a isquemia.

Nesse local, os astrócitos foram evidenciados por imunomarcagem com o anticorpo anti-GFAP específico para essas células (figuras 13 a 20). Em 24 horas, a distribuição dos astrócitos foi verificada no centro e periferia da lesão, tanto no grupo que recebeu o tratamento com solução de Tween a 5% como naqueles que receberam o tratamento com extrato supercrítico de gergelim (dose de 150mg/kg) subdividida em duas doses de 75mg/kg (**Figura 13**). Nessa janela temporal, observou-se maior número de astrócitos íntegros, próximos ao centro de lesão, no grupo tratado com o extrato supercrítico de gergelim preto (ESGP) (**Figura 13**). As quantificações dos astrócitos nesse período, dentro das áreas próximas e distantes ao centro de lesão, não revelaram diferença significativa no número de astrócitos reativos quando comparamos os dois grupos- Tween a 5% e àqueles que receberam o ESGP (**Figura 19**).

Por sua vez, a distribuição de células GFAP+ positivas na área isquêmica após 7 dias mostrou semelhança àquela visualizada em 24 horas - com astrócitos reativos

no centro e periferia da lesão. Entretanto, na área central à lesão, nos animais que receberam o tratamento com extrato supercrítico de gergelim preto, alguns astrócitos apresentavam uma morfologia semelhante às de astrócitos íntegros - morfologia ramificada e corpo celular pequeno (**Figuras 16 e 17**). Em sequência, as quantificações das células GFAP+, na área isquêmica, revelaram uma diferença significativa na densidade de astrócitos entre o grupo tratado com o ESGP comparativamente ao que recebeu a solução Tween a 5% (**Figura 20**).

Os resultados da quantificação, nos tempos de 24 horas e 7 dias, sugerem que no ESPG pode haver substâncias ativas que modulam a atuação dessas células no ambiente isquêmico.

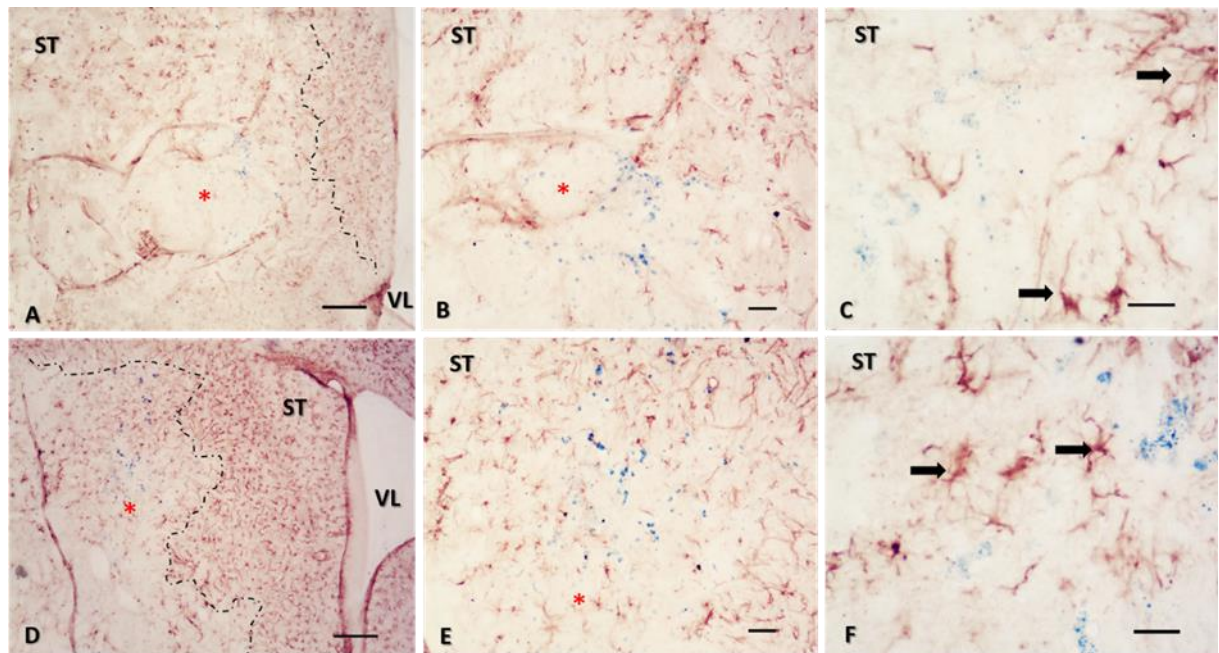


Figura 13: Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcacão para célula glial (Astrócitos) mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz resposta astrocitária e imunomarcacão por anticorpos anti-GFAP. **Linha superior:** animal controle (Tween), 1 dia após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 1 dia após AVE. **Setas:** apontam para astrócitos reativos; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **VL:** Ventrículo lateral; **ST:** Estriado. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, E.); (C, F) 400 μ m.

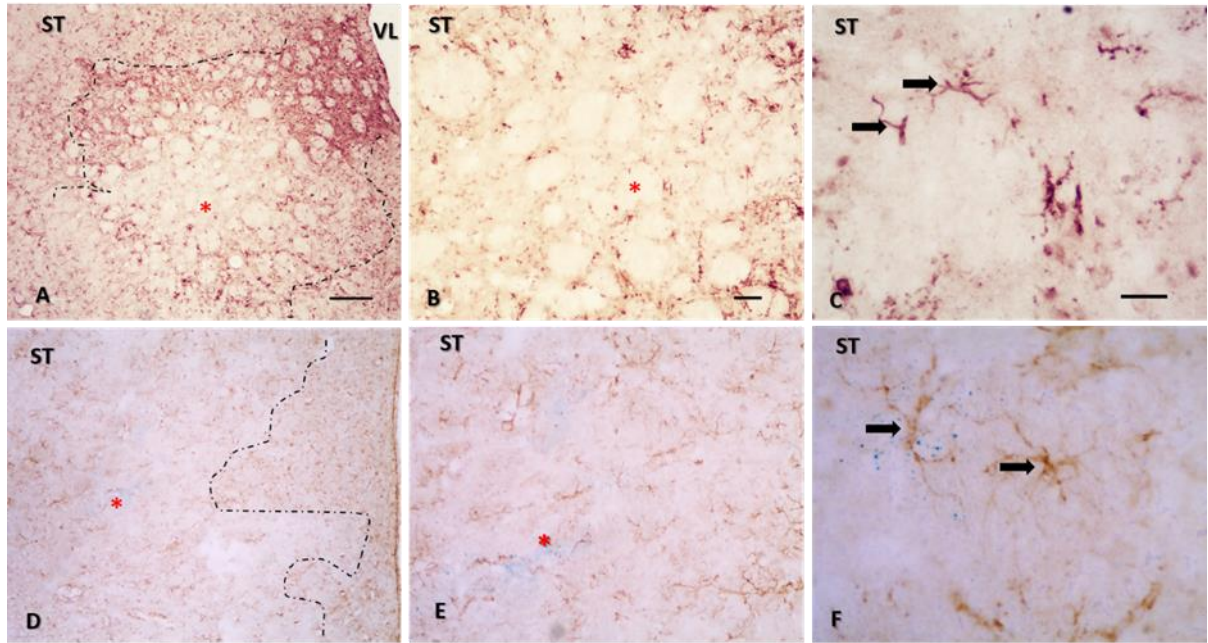


Figura14: Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcção para célula glial (Astrócitos) mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz resposta astrocitária e imunomarcção por anticorpos anti-GFAP. **Linha superior:** animal controle (Tween), 1 dia após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 1 dia após AVE. **Setas:** apontam para astrócitos reativos; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **VL:** Ventrículo lateral; **ST:** Estriado. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, E.); (C, F) 400 μ m.

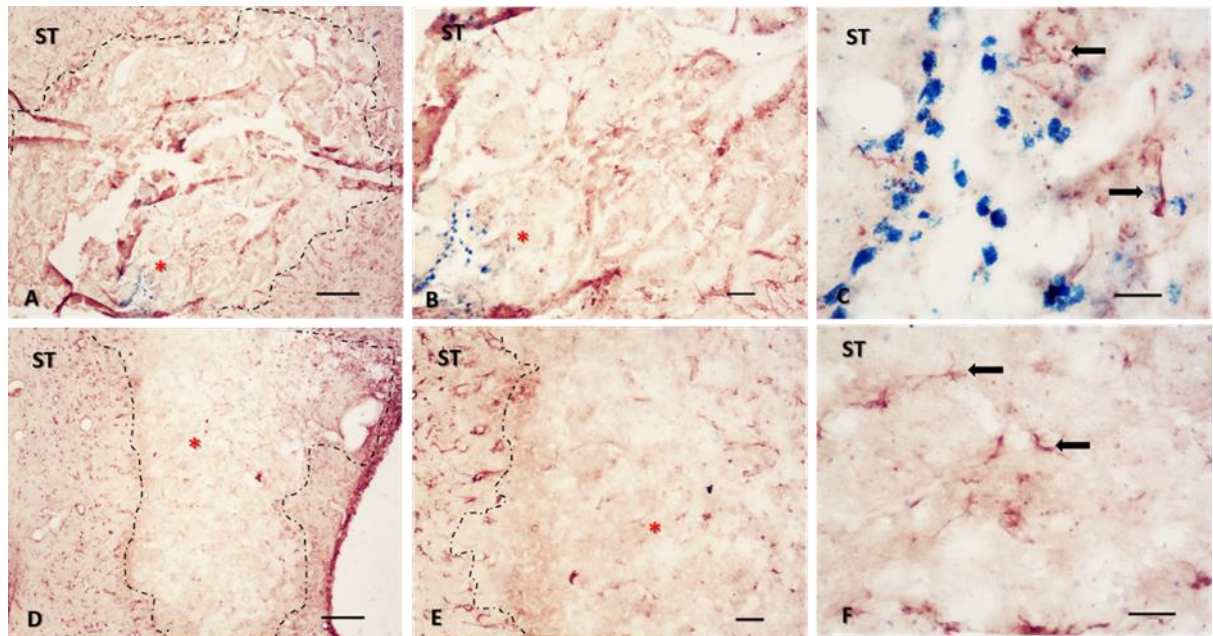


Figura 15: Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcção para célula glial (Astrócitos) mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz resposta astrocitária e imunomarcção por anticorpos anti-GFAP. **Linha superior:** animal controle (Tween), 1 dia após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 1 dia após AVE. **Setas:** apontam para astrócitos reativos; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **VL:** Ventrículo lateral; **ST:** Estriado. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, E.); (C, F) 400 μ m.

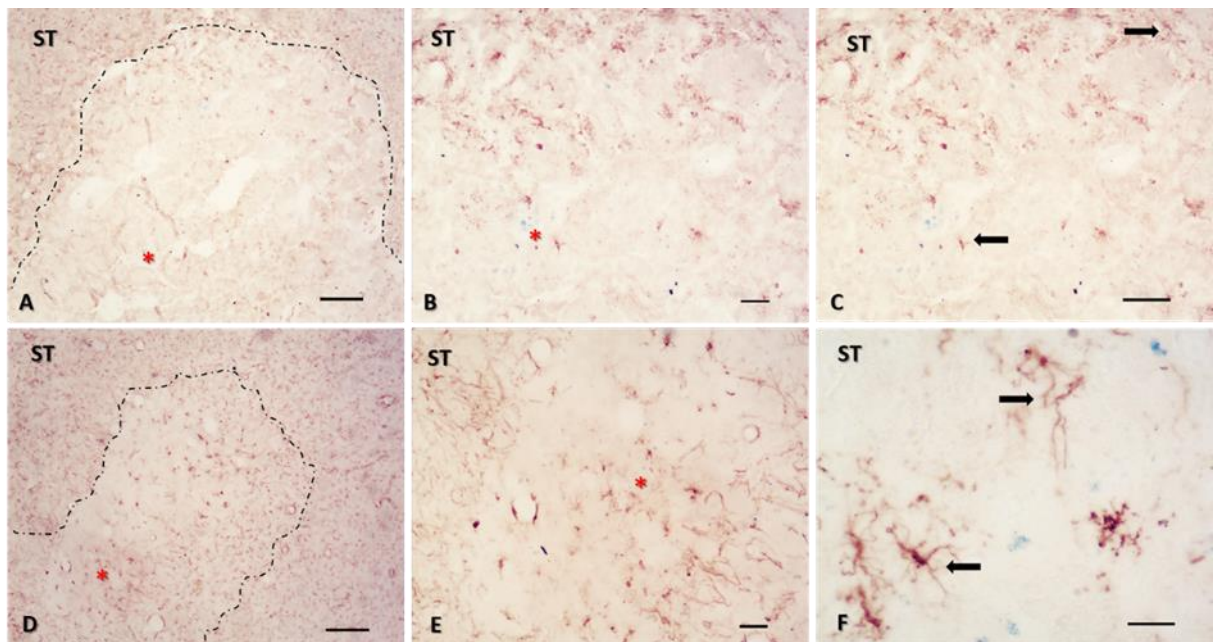


Figura 16: Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcção para célula glial (Astrócitos) mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz resposta astrocitária e imunomarcção por anticorpos anti-GFAP. **Linha superior:** animal controle (Tween), 7 dias após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 7 dias após AVE. **Setas:** apontam para astrócitos reativos; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **VL:** Ventrículo lateral; **ST:** Estriado. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, E.); (C, F) 400 μ m.

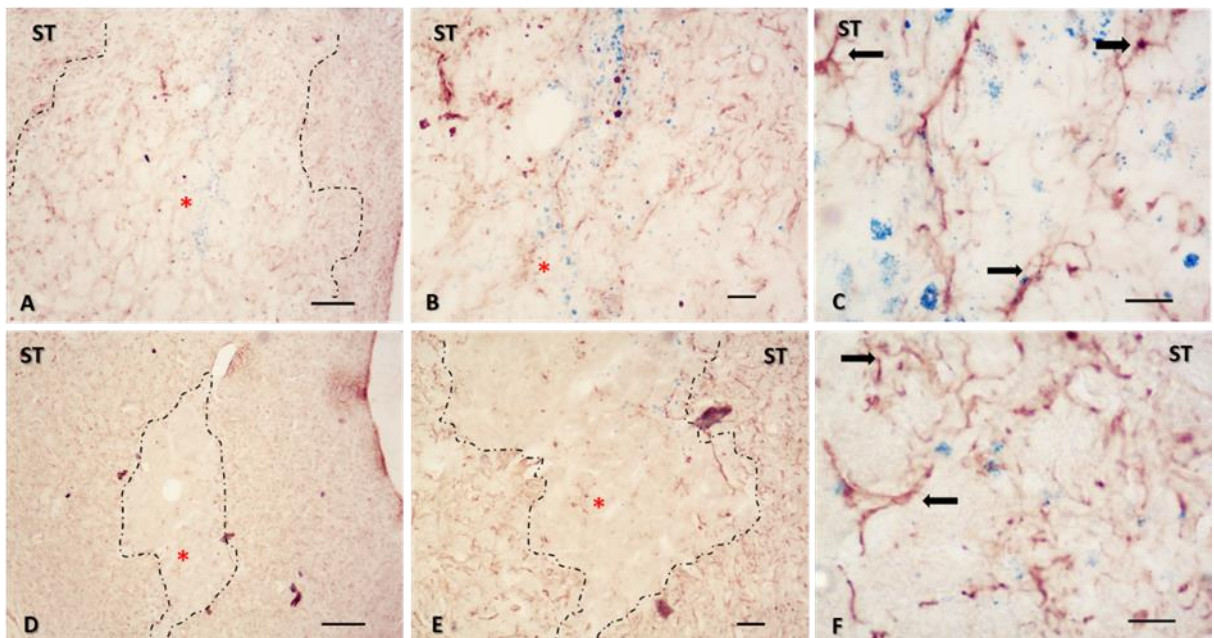


Figura 17: Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcção para célula glial (Astrócitos) mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz resposta astrocitária e imunomarcção por anticorpos anti-GFAP. **Linha superior:** animal controle (Tween), 7 dias após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 7 dias após AVE. **Setas:** apontam para astrócitos reativos; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **VL:** Ventrículo lateral; **ST:** Estriado. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, E.); (C, F) 400 μ m.

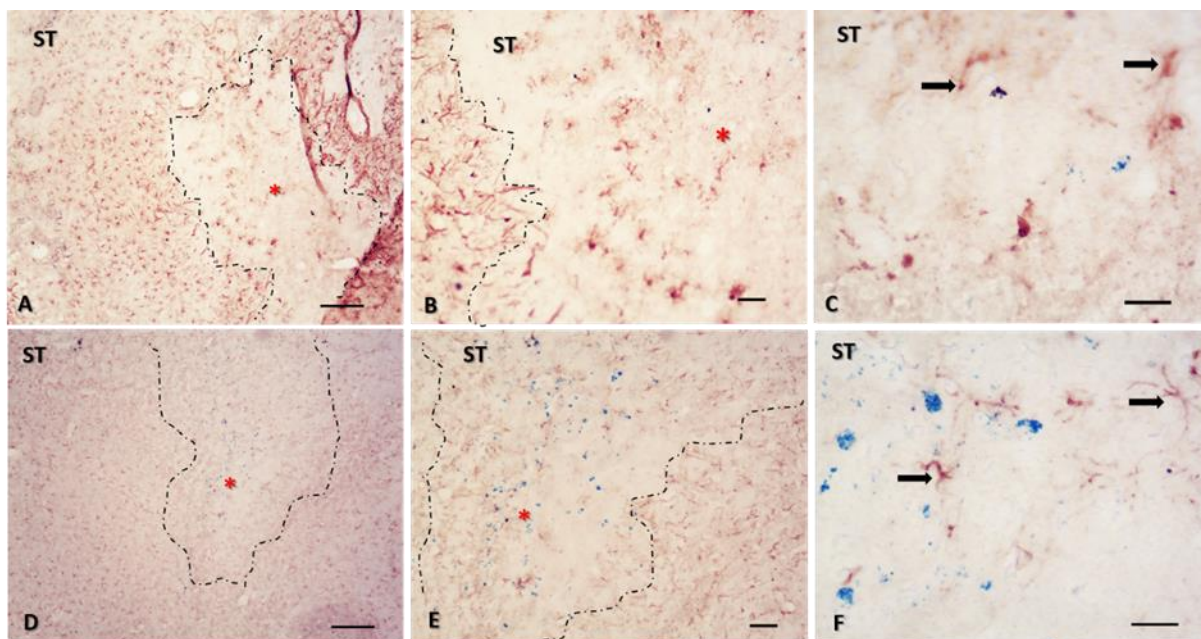


Figura 18: Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcção para célula glial (Astrócitos) mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz resposta astrocitária e imunomarcção por anticorpos anti-GFAP. **Linha superior:** animal controle (Tween), 7 dias após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 7 dias após AVE. **Setas:** apontam para astrócitos reativos; **Asterisco (*)**: local de injeção de ET-1; **VL:** Ventrículo lateral; **ST:** Estriado. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, E.); (C, F) 400 μ m.

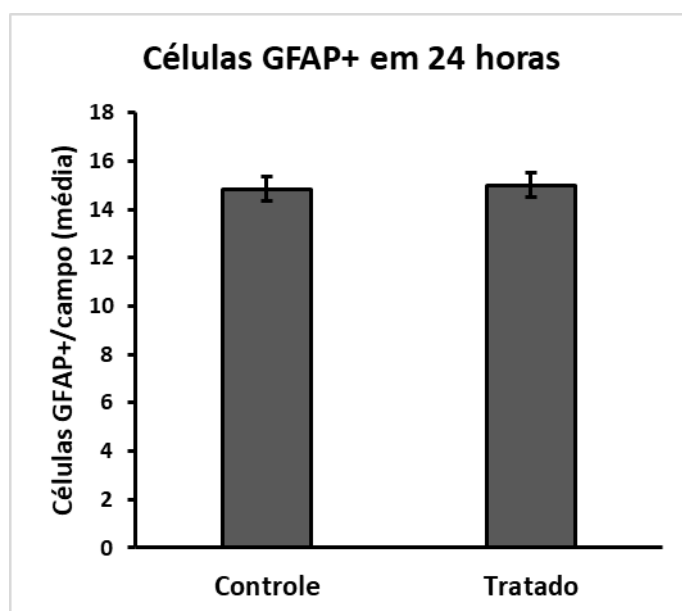


Figura 19: Análise quantitativa de células glias (astrócitos GFAP+ / campo) imunorreativos na área isquêmica após injeção de endotelina-1 (ET-1). **Controle:** grupo isquêmico tratado apenas com Tween; **Tratado:** grupo isquêmico tratado apenas com extrato de gergelim.

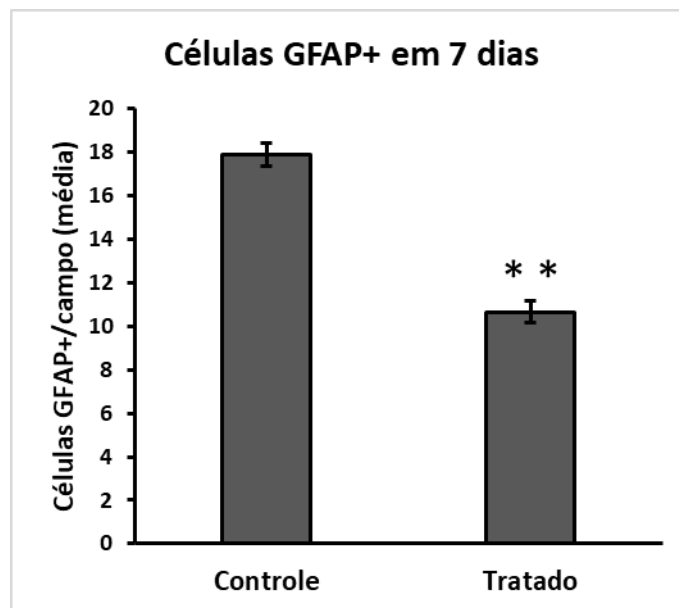


Figura 20: Análise quantitativa de células gliais (astrócitos GFAP⁺ / campo) imunorreativos na área isquêmica após injeção de endotelina-1 (ET-1). **Controle:** grupo isquêmico tratado apenas com Tween; **Tratado:** grupo isquêmico tratado apenas com extrato de gergelim; ($p < 0,01$).

3.3. Distribuição de Células Microgliais/ Macrófagos Ativos Após Lesão Isquêmica Obtida por Microinjeção de Endotelina-1 no Estriado de Ratos Machos Submetidos ao Tratamento Intraperitoneal com Solução Tween 5% e Extrato Supercrítico de Gergelim Preto (*Sesamum indicum* L).

Para verificar a ativação das células microgliais/macrófagos no tecido cerebral isquêmico, após injeção de endotelina-1, foi executada a marcação por imuno-histoquímica com anticorpos Anti-ED1 (CD68). Após 24 horas e/ou 7 dias da progressão isquêmica, as células ED1⁺ (microglias/macrófagos) foram detectadas na área de lesão, mas, com ativação mais intensa no centro da área lesionada (**Figuras 21 a 29**).

Em 24 horas, o acúmulo de células ED1⁺ foi maior próximo ao centro da lesão em animais tratados com solução Tween a 5% em relação àqueles que receberam o tratamento com o extrato supercrítico de gergelim preto (ESGP) (150mg/kg). A quantificação de células ED1⁺, nessa janela temporal de 24 horas, revelou diferença significativa entre os grupos avaliados (**Figura 28**).

Em 7 dias de isquemia, a distribuição dessas células foi semelhante ao observado ao tempo de 24 horas, mas, a densidade de células ED1⁺ no centro de lesão foi bem menor no grupo que recebeu o tratamento com extrato supercrítico de

gergelim preto (ESGP) (150mg/kg) quando comparado ao grupo que foi tratado com a solução Tween a 5%. (**Figuras 24 e 25; Figura 29**)

A quantificação das células ED1+, em ambos os tempos de sobrevivência, sugere que o tratamento com extrato supercrítico de gergelim preto (ESGP) influenciou na modulação da atividade dessas células (micróglia/macrófagos) no ambiente isquêmico.

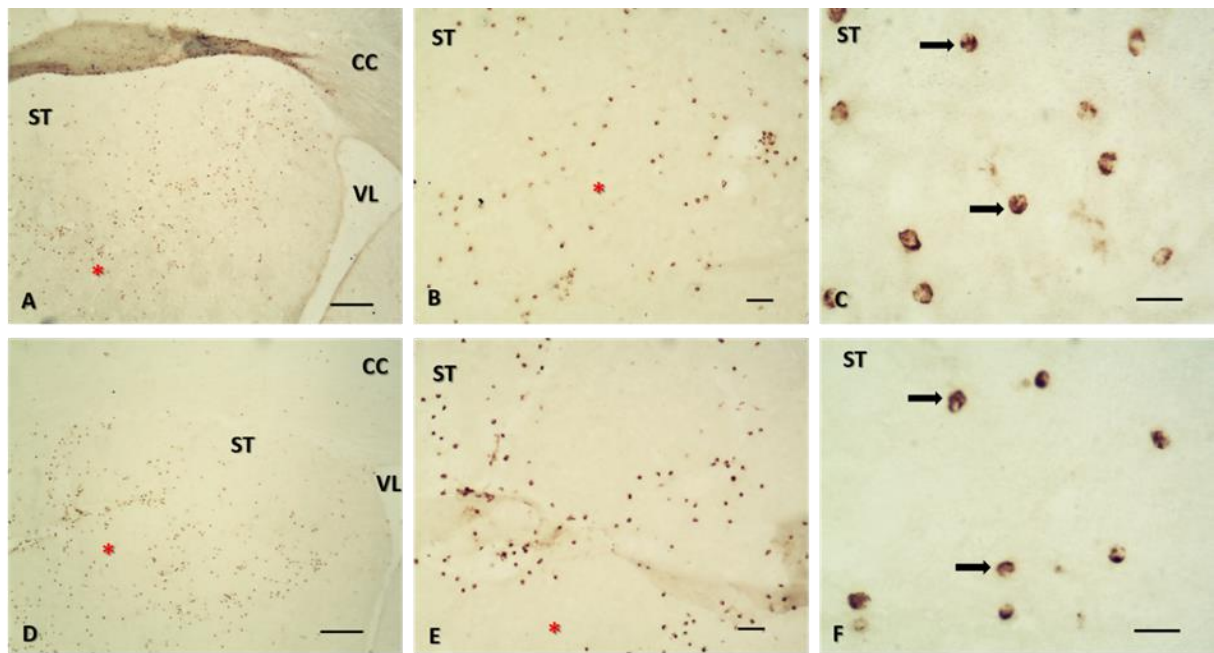


Figura 21: Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcção para células gliais (micróglia) mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz imunomarcção positiva para essas células (ED-1+). **Linha superior:** animal controle (Tween), 1 dia após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 1 dia após AVE. **Setas:** apontam para células (micróglia/macrófagos) ED-1+; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado. **Barra de escala:** 50 μm (A, D); 100 μm (B, E.) ;(C, F) 400 μm.

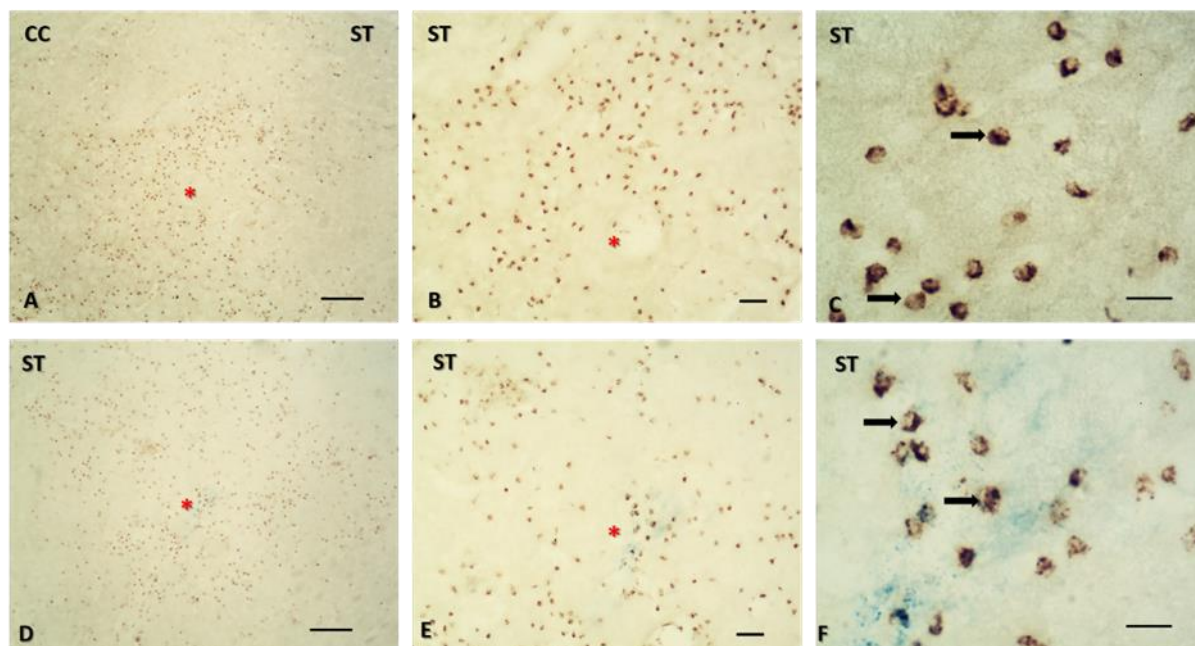


Figura 22: Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcacão para células gliais (micróglias) mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injecco de endotelina-1(ET-1) induz imunomarcacão positiva para essas células (ED-1⁺). **Linha superior:** animal controle (Tween), 1 dia após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 1 dia após AVE. **Setas:** apontam para células (micróglias/macrófagos) ED-1⁺; **Asterisco (*)**: local de injecco de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, E.); (C, F) 400 μ m.

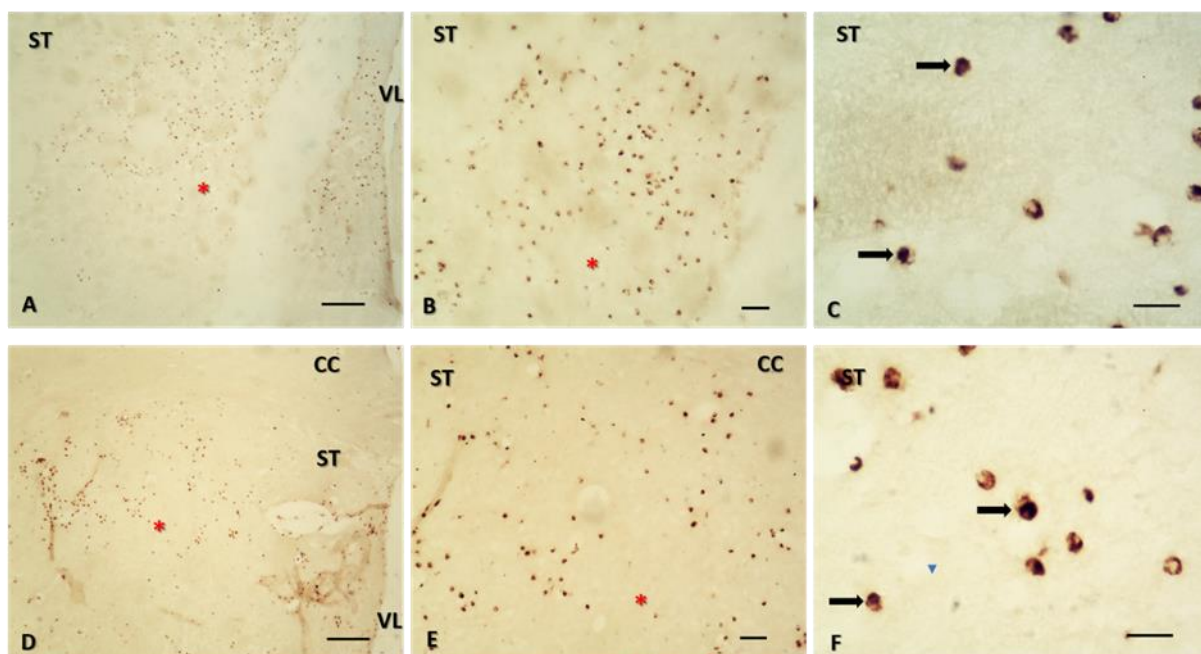


Figura 23: Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcacão para células gliais (micróglias) mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injecco de endotelina-1(ET-1) induz imunomarcacão positiva para essas células (ED-1⁺). **Linha superior:** animal controle (Tween), 1 dia após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 1 dia após AVE. **Setas:** apontam para células (micróglias/macrófagos) ED-1⁺; **Asterisco (*)**: local de injecco de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, E.); (C, F) 400 μ m.

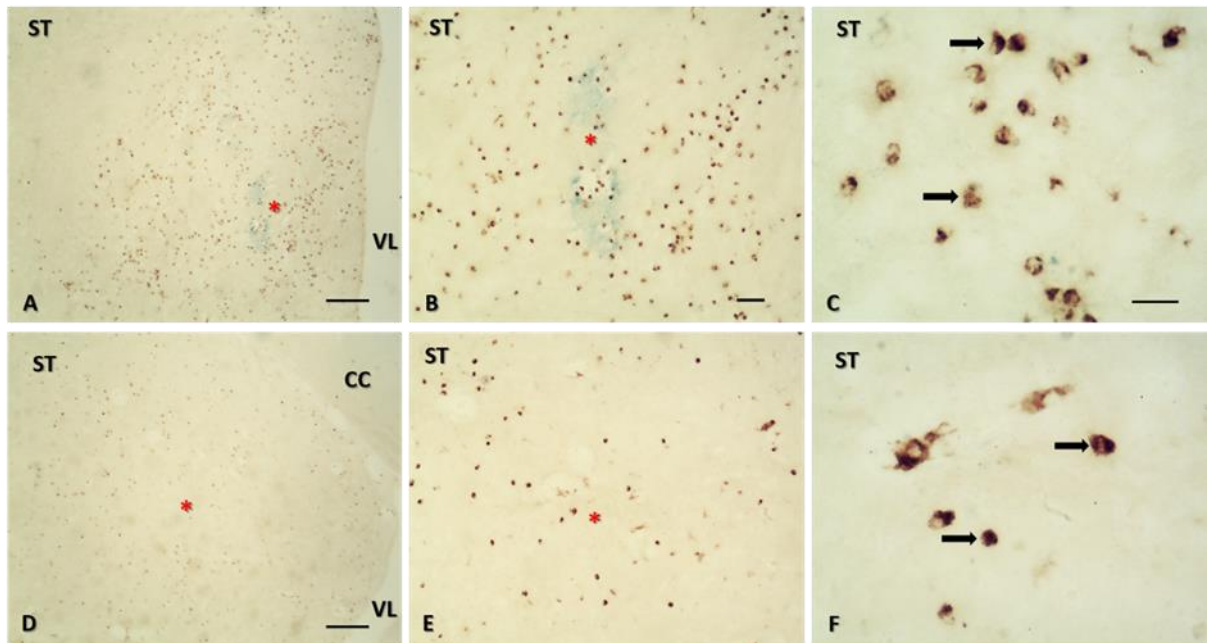


Figura 24: Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcção para células gliais (micróglias) mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz imunomarcção positiva para essas células (ED-1⁺). **Linha superior:** animal controle (Tween), 7 dias após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 7 dias após AVE. **Setas:** apontam para células (micróglias/macrófagos) ED-1⁺; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, E.); (C, F) 400 μ m.

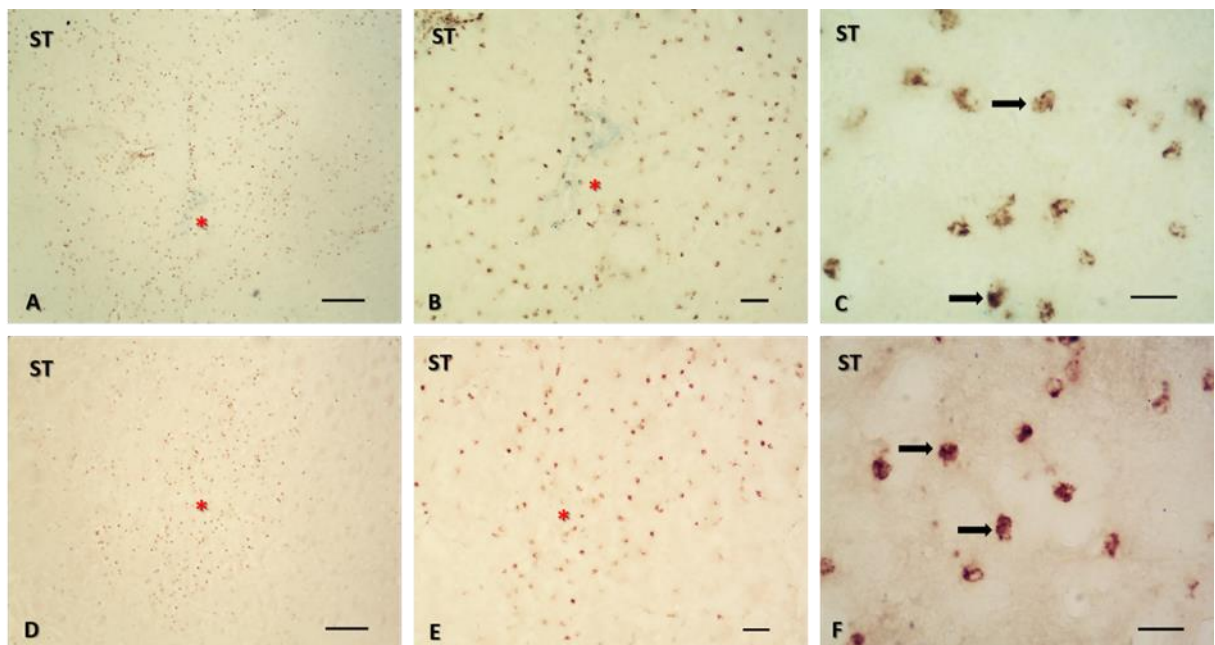


Figura 25: Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcção para células gliais (micróglias) mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz imunomarcção positiva para essas células (ED-1⁺). **Linha superior:** animal controle (Tween), 7 dias após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 7 dias após AVE. **Setas:** apontam para células (micróglias/macrófagos) ED-1⁺; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, E.); (C, F) 400 μ m.

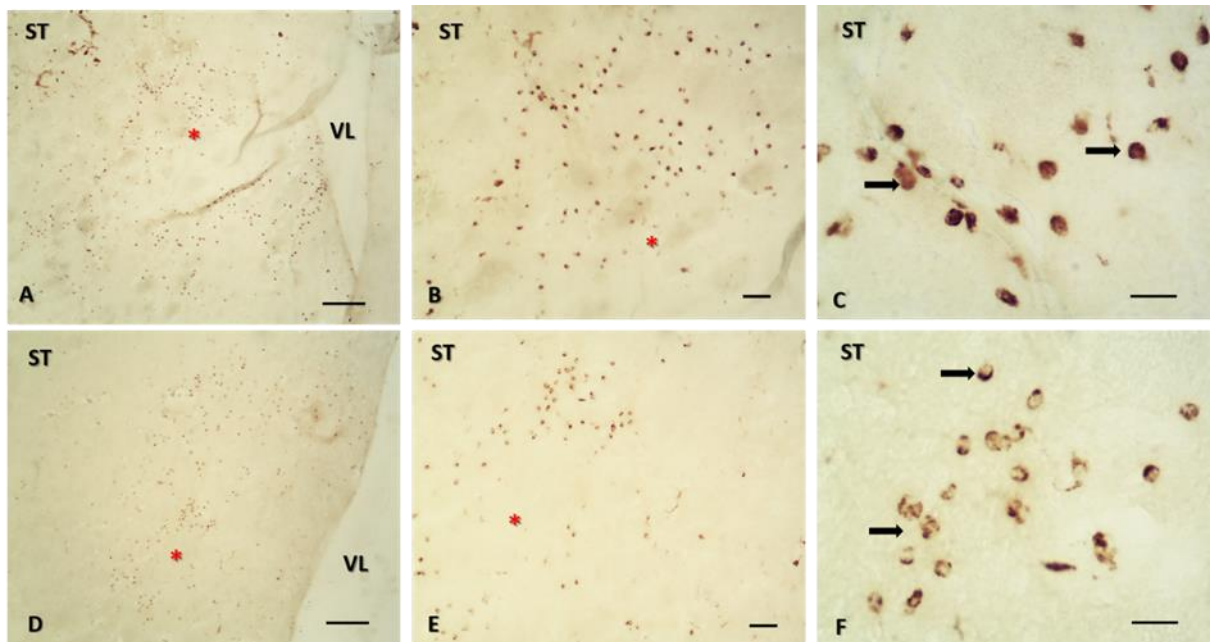


Figura 26: Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcacão para células gliais (micróglias) mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeccção de endotelina-1(ET-1) induz imunomarcacão positiva para essas células (ED-1⁺). **Linha superior:** animal controle (Tween), 7 dias após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 7 dias após AVE. **Setas:** apontam para células (micróglias/macrófagos) ED-1⁺; **Asterisco (*)**: local de injeccção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, E.); (C, F) 400 μ m.

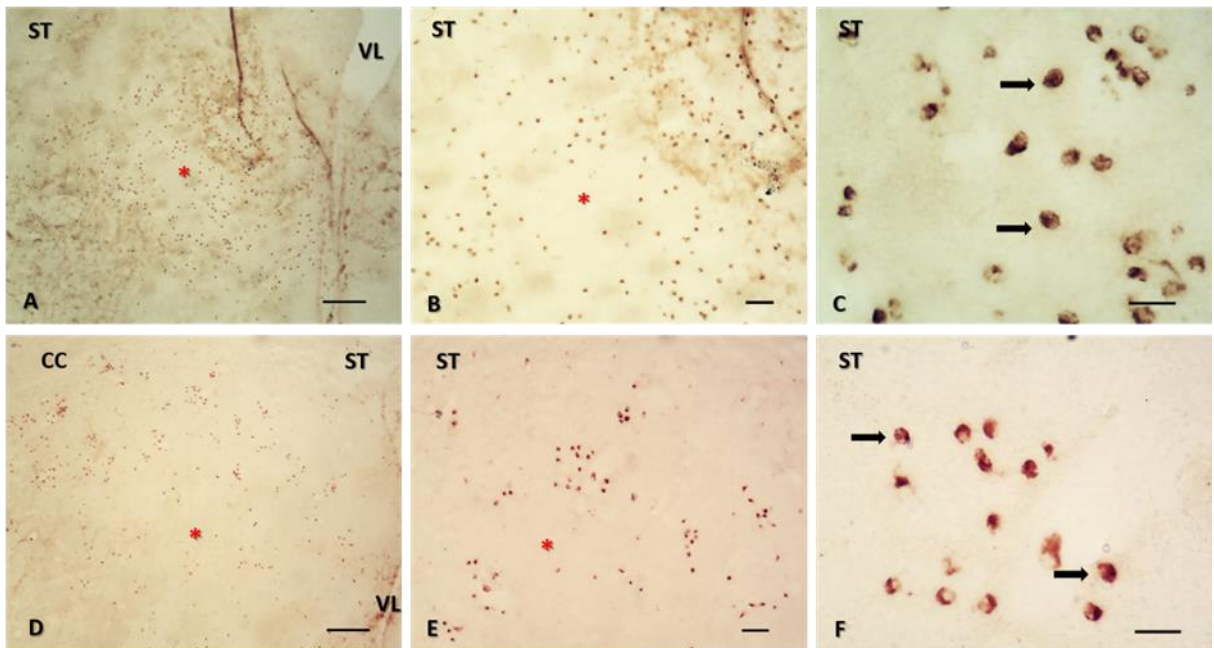


Figura 27: Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcacão para células gliais (micróglias) mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeccção de endotelina-1(ET-1) induz imunomarcacão positiva para essas células (ED-1⁺). **Linha superior:** animal controle (Tween), 7 dias após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 7 dias após AVE. **Setas:** apontam para células (micróglias/macrófagos) ED-1⁺; **Asterisco (*)**: local de injeccção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, E.); (C,F) 400 μ m.

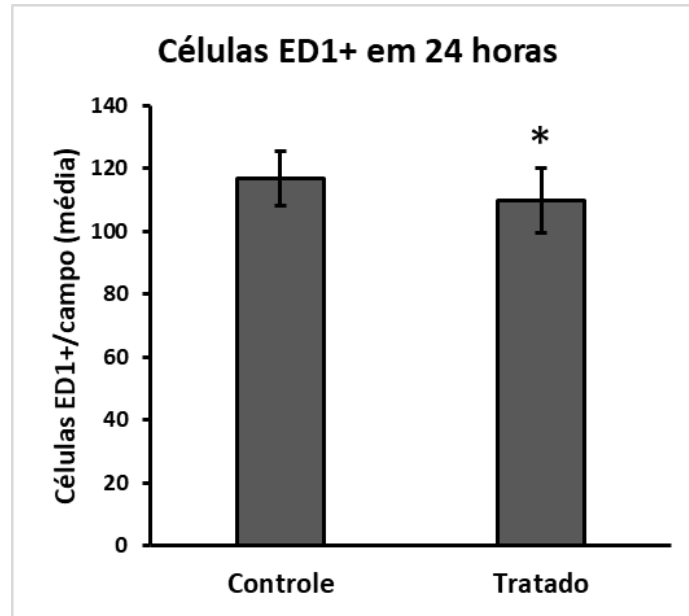


Figura 28: Análise quantitativa de células gliais (microglias/macrófagos ED1+ / campo) imunorreativas na área isquêmica após injeção de endotelina-1 (ET-1). **Controle:** grupo isquêmico tratado apenas com Tween; **Tratado:** grupo isquêmico tratado apenas com extrato de gergelim; ($p < 0,05$).

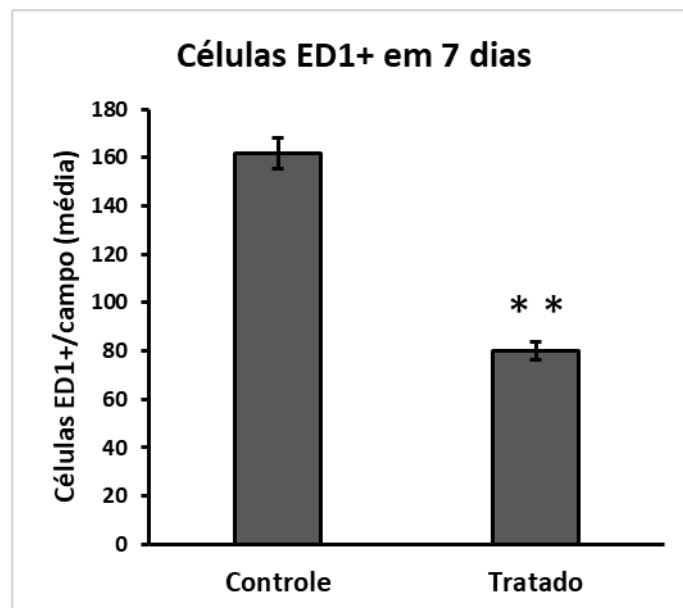


Figura 29: Análise quantitativa de células gliais (microglias/macrófagos ED1+ / campo) imunorreativas na área isquêmica após injeção de endotelina-1 (ET-1). **Controle:** grupo isquêmico tratado apenas com Tween; **Tratado:** grupo isquêmico tratado apenas com extrato de gergelim; ($p < 0,01$).

3.4. Preservação e Perda neuronal após Lesão Isquêmica Ocasionalada por Microinjeção de Endotelina-1 no Estriado de Ratos Machos Submetidos ao Tratamento Intraperitoneal com Solução Tween 5% e Extrato Supercrítico de Gergelim Preto (*Sesamum indicum* L).

Para avaliar a preservação ou a perda neuronal no tecido cerebral isquêmico, após injeção de endotelina-1, foi realizada a imunomarcagem com anticorpo anti-NeuN. Após 24 horas e 7 dias do evento isquêmico as células NeuN+ foram identificadas na periferia e em áreas próximas ao centro na lesão (**Figuras 30 a 41**).

Próximo aos neurônios preservados (células neuN+) foram identificadas áreas onde não houve marcação dessas células, sugerindo grande perda neuronal após isquemia (**Figuras 31 e 35**). Em 24 horas, a preservação de neurônios foi mais evidenciada em animais que receberam o tratamento com o extrato supercrítico de gergelim preto (ESGP) (150mg/kg) em relação àqueles que receberam a solução de Tween 5% (**Figuras 30 a 33**). Ainda nessa janela temporal, identificamos corpos neuronais próximos ao centro de lesão em seções de animais que foram tratados com o ESGP - uma condição que não foi observada no grupo tratado com solução de Tween a 5%. (**Figuras 31 e 33**). A quantificação dos neurônios, aparentemente viáveis na periferia e centro de lesão, revelou uma diferença significativa no número de células neuN+ positivas nos animais isquêmicos tratados quando comparados àqueles que receberam a solução Tween (**Figura 38**).

Em 7 dias após isquemia, a preservação de neurônios (células neuN+ positivas), na periferia e no centro de lesão, foi aparentemente menor no grupo que recebeu tratamento com solução Tween a 5% em relação ao grupo que recebeu tratamento com extrato supercrítico de gergelim preto (ESGP) (150mg/kg) (**Figuras 34 e 36**). Essa preservação neuronal foi ratificada pela quantificação dessas células, revelando uma diferença significativa entre os grupos investigados - controle (RIC7D) e tratado (RIT7D) (**Figura 39**).

A perda e a preservação de neurônios foram evidentes, mas, na janela temporal de 7 dias, no centro da lesão, a preservação de neurônios foi maior que na janela temporal de 24 horas nos animais que receberam tratamento com extrato supercrítico de gergelim preto (ESGP). (**Figura 31 a e 36 a; Figuras 40 e 41**).

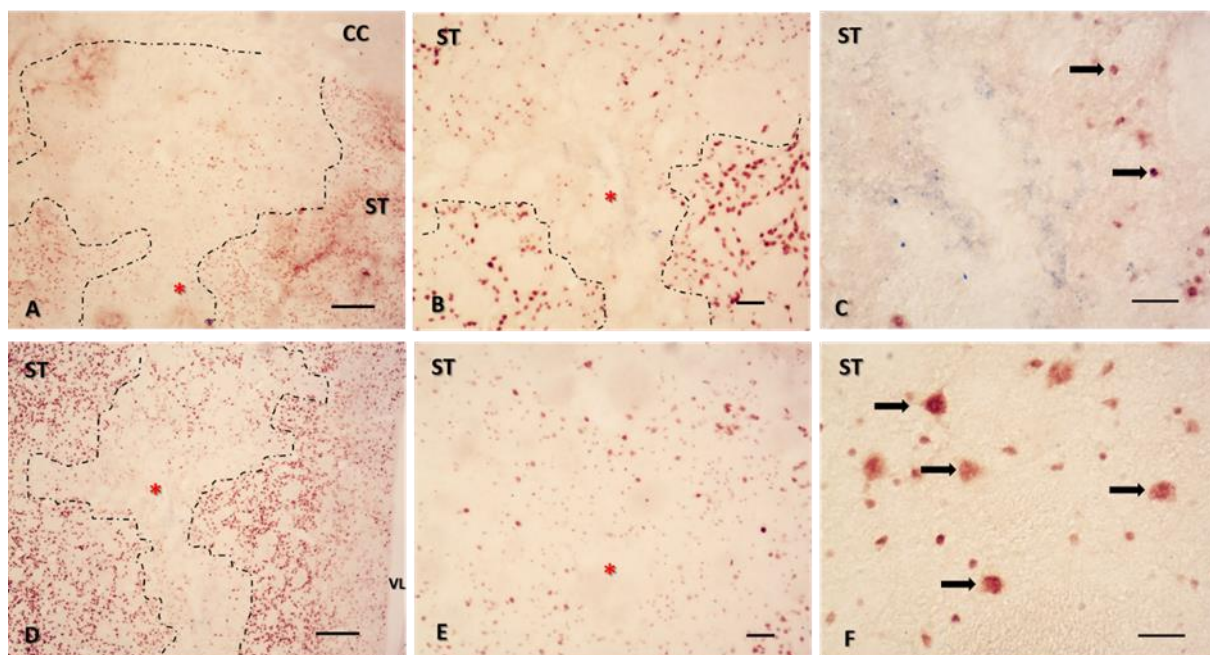


Figura 30: Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcção para neurônios mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz perda neuronal e imunomarcção positiva com anticorpo anti-NeuN. **Linha superior:** animal controle (Tween), 1 dia após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 1 dia após AVE. **Setas:** apontam para células NeuN⁺; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado; **VL:** Ventrículo lateral. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, E.); (C, F) 400 μ m.

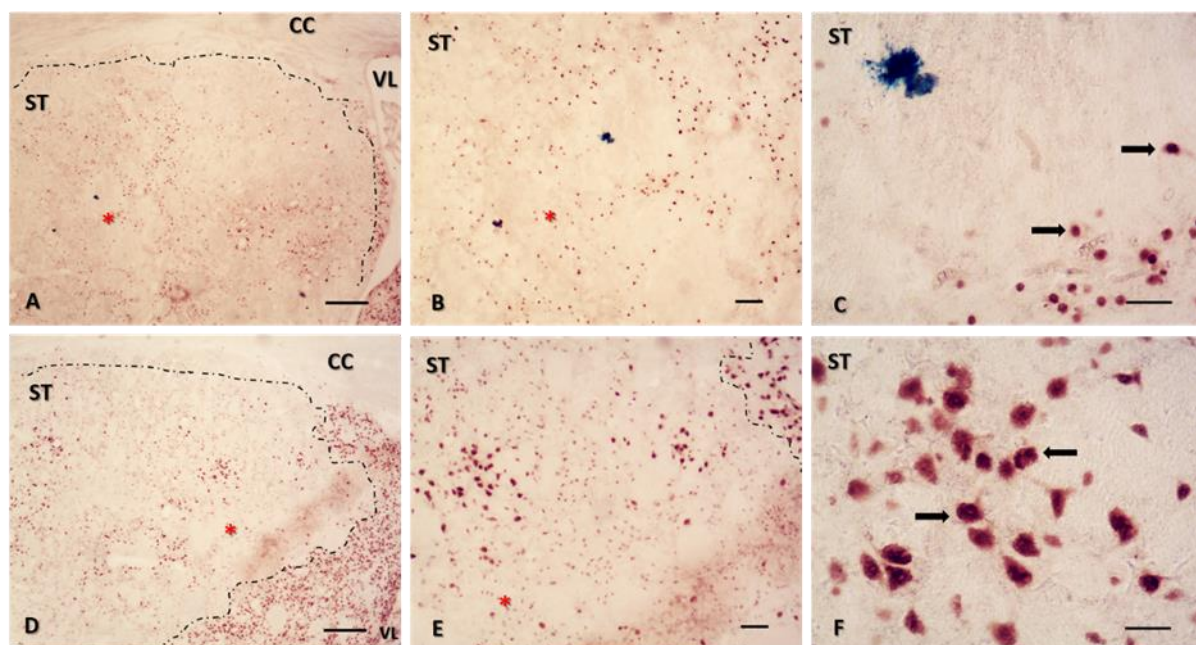


Figura 31: Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcção para neurônios mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz perda neuronal e imunomarcção positiva com anticorpo anti-NeuN. **(a) e (d)** ênfase para preservação de neurônios na periferia; **(c) e (f)** ênfase para de preservação de neurônios no centro da lesão; **Linha superior:** animal controle (Tween), 1 dia após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 1 dia após AVE. **Setas:** apontam para células NeuN⁺; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado; **VL:** Ventrículo lateral. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, E.); (C, F) 400 μ m.

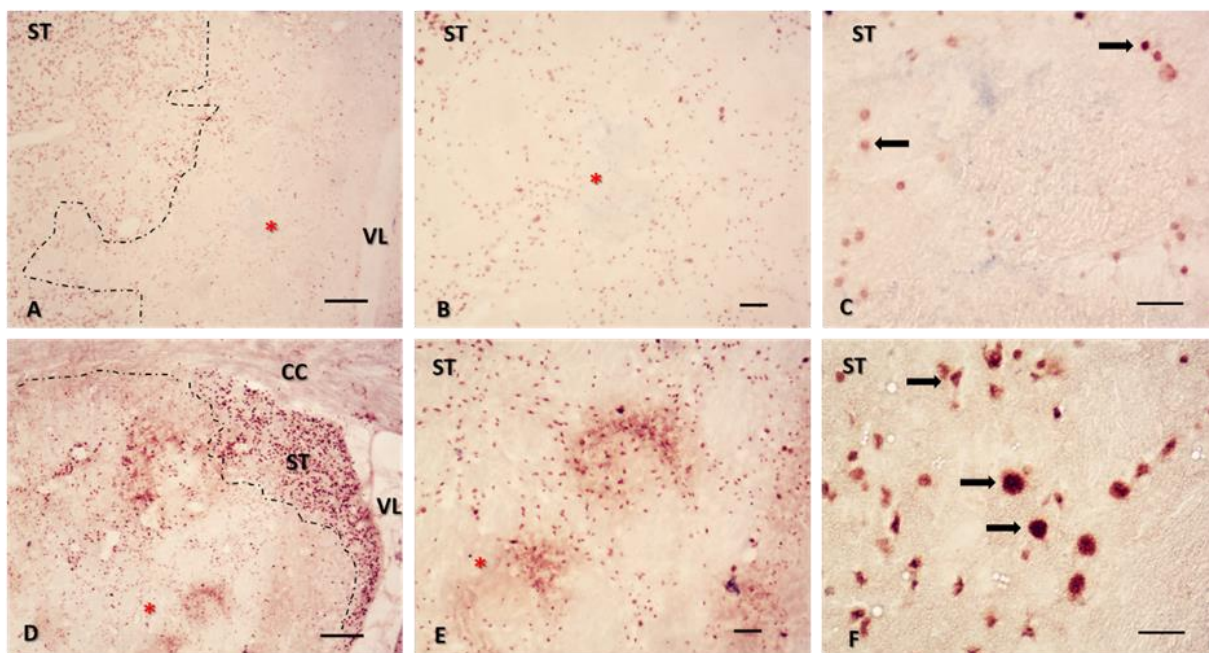


Figura 32: Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcção para neurônios mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz perda neuronal e imunomarcção positiva com anticorpo anti-NeuN. **Linha superior:** animal controle (Tween), 1 dia após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 1 dia após AVE. **Setas:** apontam para células NeuN⁺; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado; **VL:** Ventrículo lateral. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, E.); (C, F) 400 μ m.

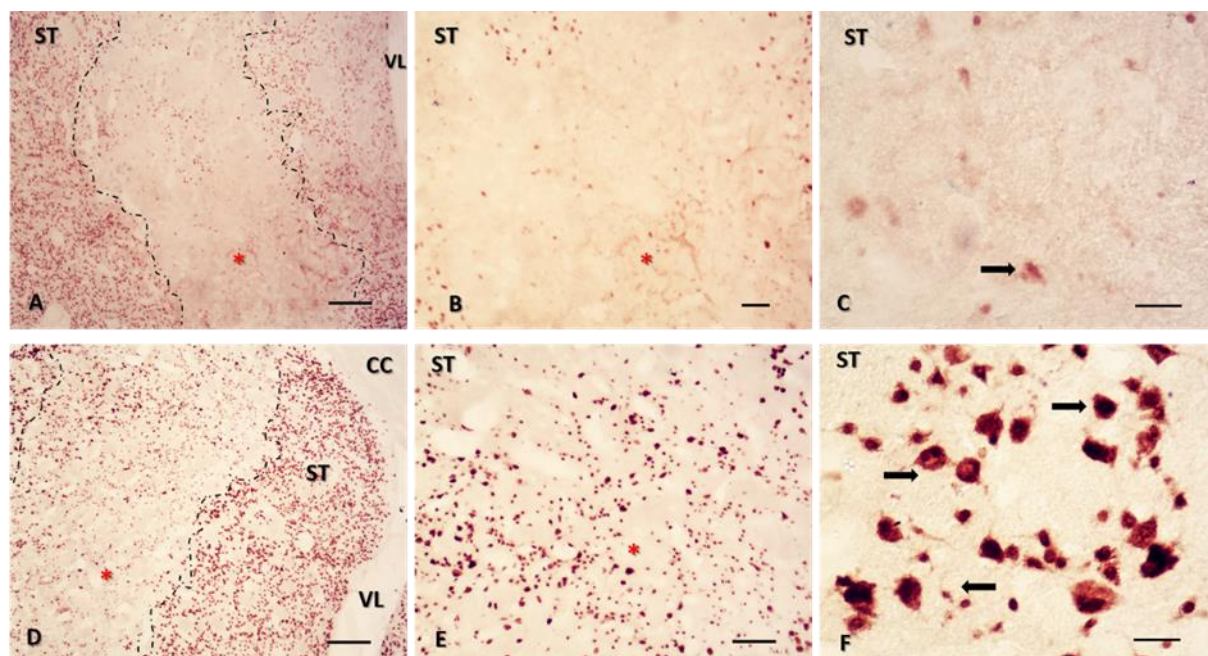


Figura 33: Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcção para neurônios mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz perda neuronal e imunomarcção positiva com anticorpo anti-NeuN. **Linha superior:** animal controle (Tween), 1 dia após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 1 dia após AVE. **Setas:** apontam para células NeuN⁺; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado; **VL:** Ventrículo lateral. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, E.);(C,F) 400 μ m.

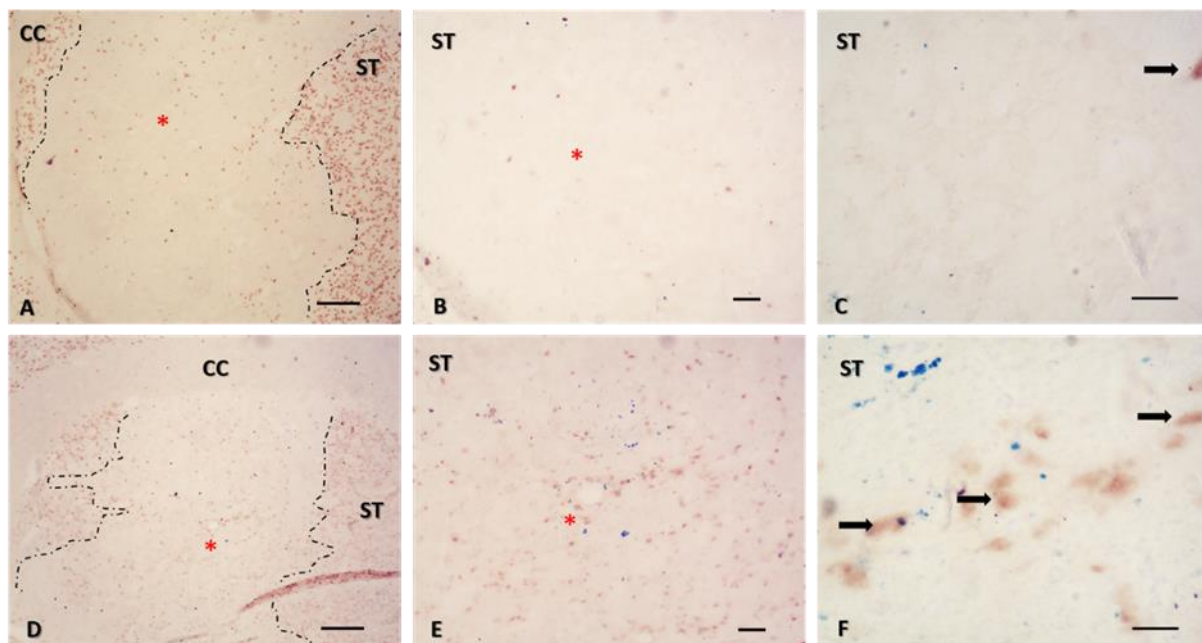


Figura 34: Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcção para neurônios mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz perda neuronal e imunomarcção positiva com anticorpo anti-NeuN. **Linha superior:** animal controle (Tween), 7 dias após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 7 dias após AVE. **Setas:** apontam para células NeuN⁺; **Asterisco (*)**: local de injeção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado; **VL:** Ventrículo lateral. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, E.); (C, F) 400 μ m.

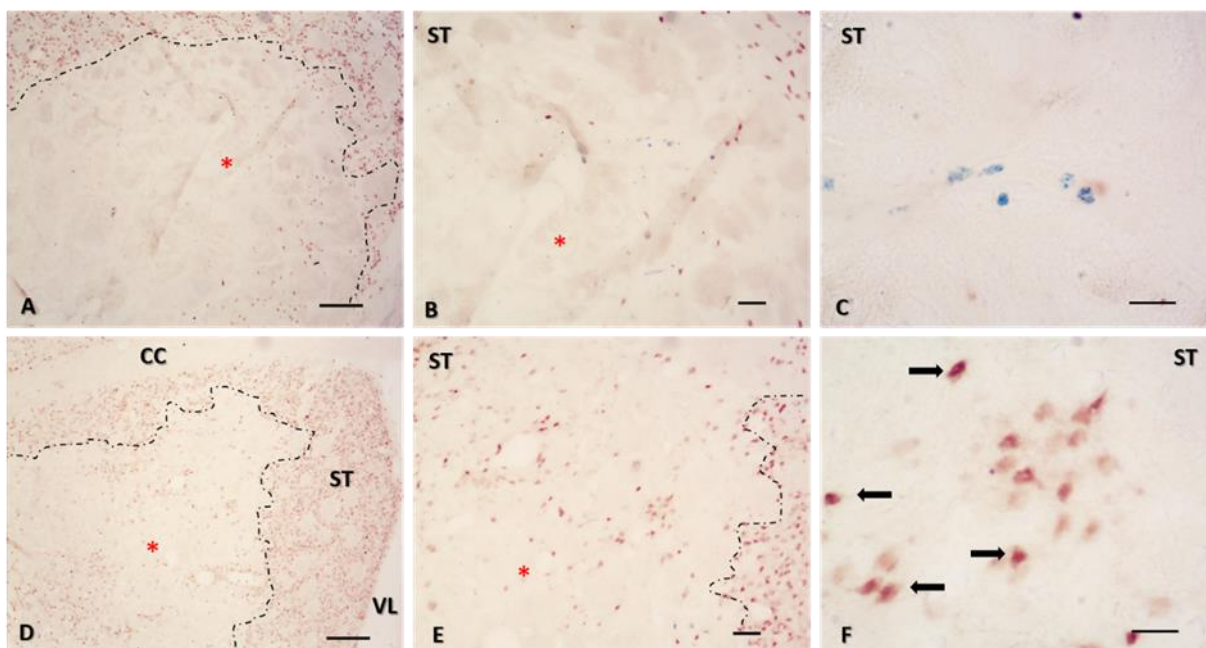


Figura 35: Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcção para neurônios mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz perda neuronal e imunomarcção positiva com anticorpo anti-NeuN. **Linha superior:** animal controle (Tween), 7 dias após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 7 dias após AVE. **Setas:** apontam para células NeuN⁺; **Asterisco (*)**: local de injeção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado; **VL:** Ventrículo lateral. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, E.); (C, F) 400 μ m.

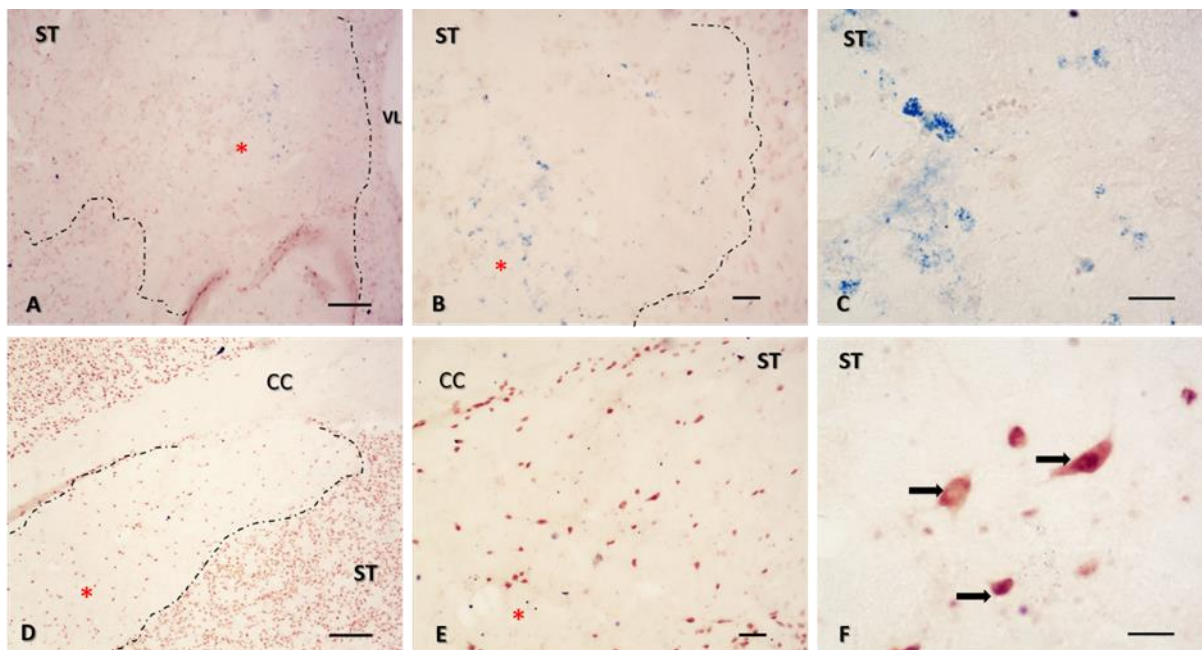


Figura 36: Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcção para neurônios mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz perda neuronal e imunomarcção positiva com anticorpo anti-NeuN. **Linha superior:** animal controle (Tween), 7 dias após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 7 dias após AVE. **Setas:** apontam para células NeuN⁺; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado; **VL:** Ventrículo lateral. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, E.); (C, F) 400 μ m.

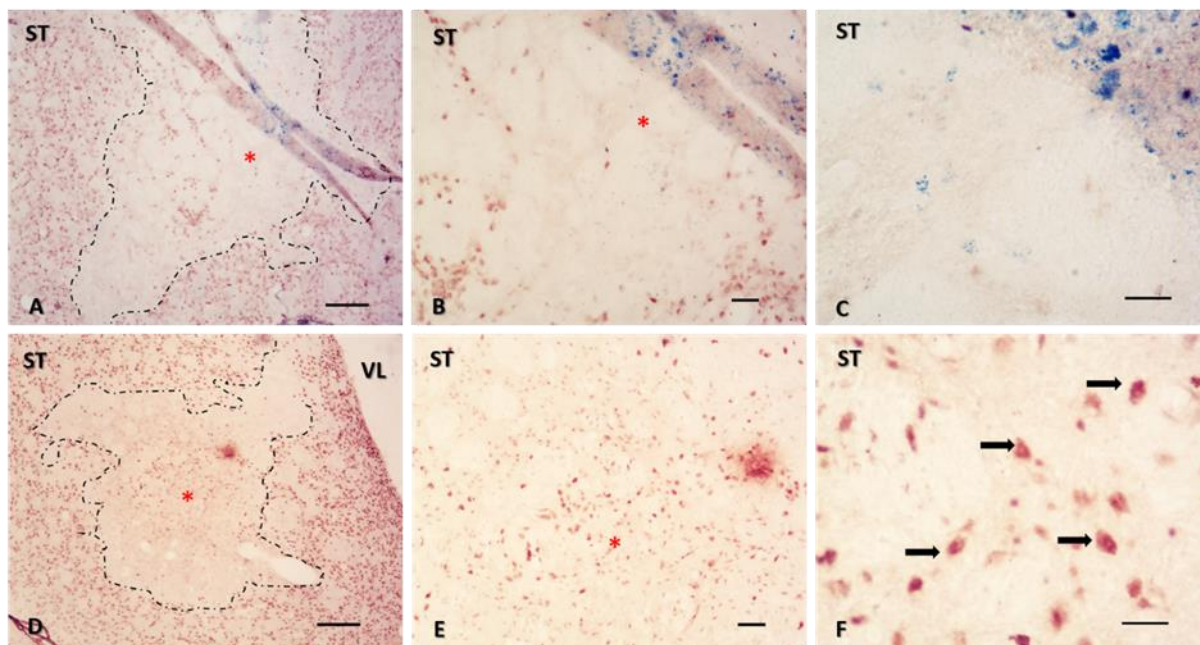


Figura 37: Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcção para neurônios mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz perda neuronal e imunomarcção positiva com anticorpo anti-NeuN. **Linha superior:** animal controle (Tween), 7 dias após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 7 dias após AVE. **Setas:** apontam para células NeuN⁺; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado; **VL:** Ventrículo lateral. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, E.); (C, F) 400 μ m.

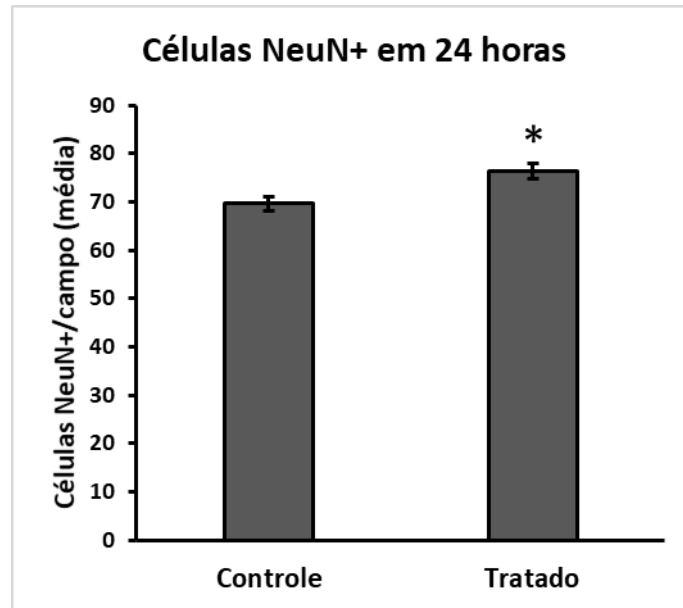


Figura 38: Análise quantitativa de neurônios (NeuN⁺/campo) imunomarcados na área isquêmica após injeção de endotelina-1 (ET-1). **Controle:** grupo isquêmico tratado apenas com Tween 5%; **Tratado:** grupo isquêmico tratado apenas com extrato de gergelim 75mg/2x dia; (p<0,05).

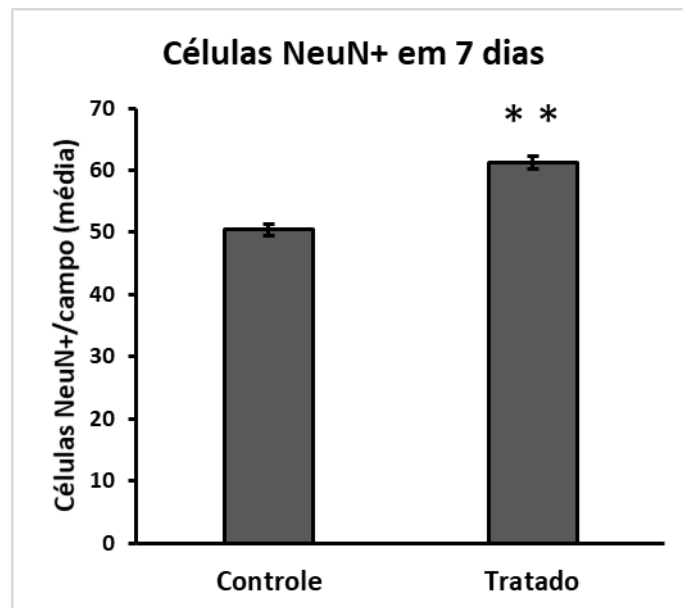


Figura 39: Análise quantitativa de neurônios (NeuN⁺/campo) imunomarcados na área isquêmica após injeção de endotelina-1 (ET-1). **Controle:** grupo isquêmico tratado apenas com Tween 5%; **Tratado:** grupo isquêmico tratado apenas com extrato de gergelim 75mg/2x dia; (p<0,01).

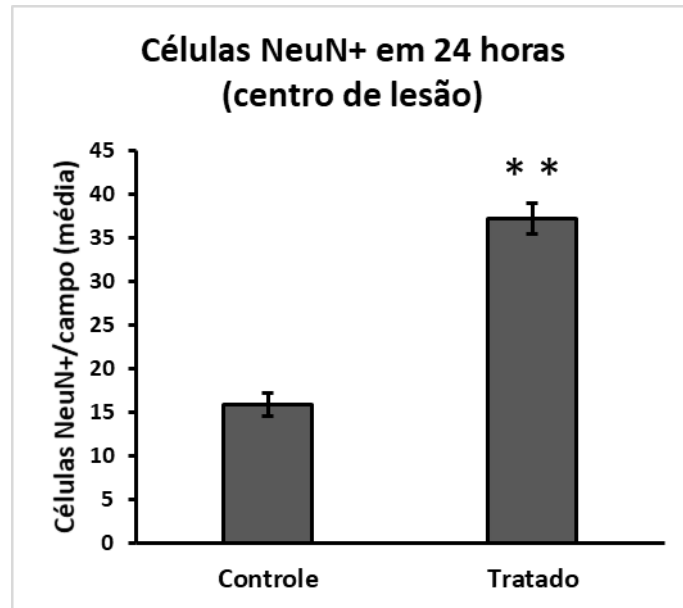


Figura 40: Análise quantitativa de neurônios (NeuN+/campo) imunomarcados no centro da área isquêmica após injeção de endotelina-1 (ET-1). **Controle:** grupo isquêmico tratado apenas com Tween 5%; **Tratado:** grupo isquêmico tratado apenas com extrato de gergelim 75mg/2x dia; ($p < 0,01$).

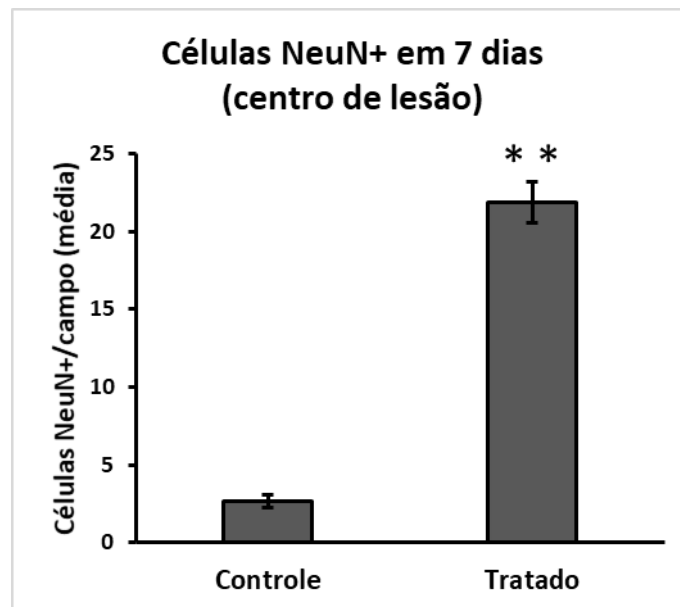


Figura 41: Análise quantitativa de neurônios (NeuN+/campo) imunomarcados no centro da área isquêmica após injeção de endotelina-1 (ET-1). **Controle:** grupo isquêmico tratado apenas com Tween 5%; **Tratado:** grupo isquêmico tratado apenas com extrato de gergelim 75mg/2x dia; ($p < 0,01$).

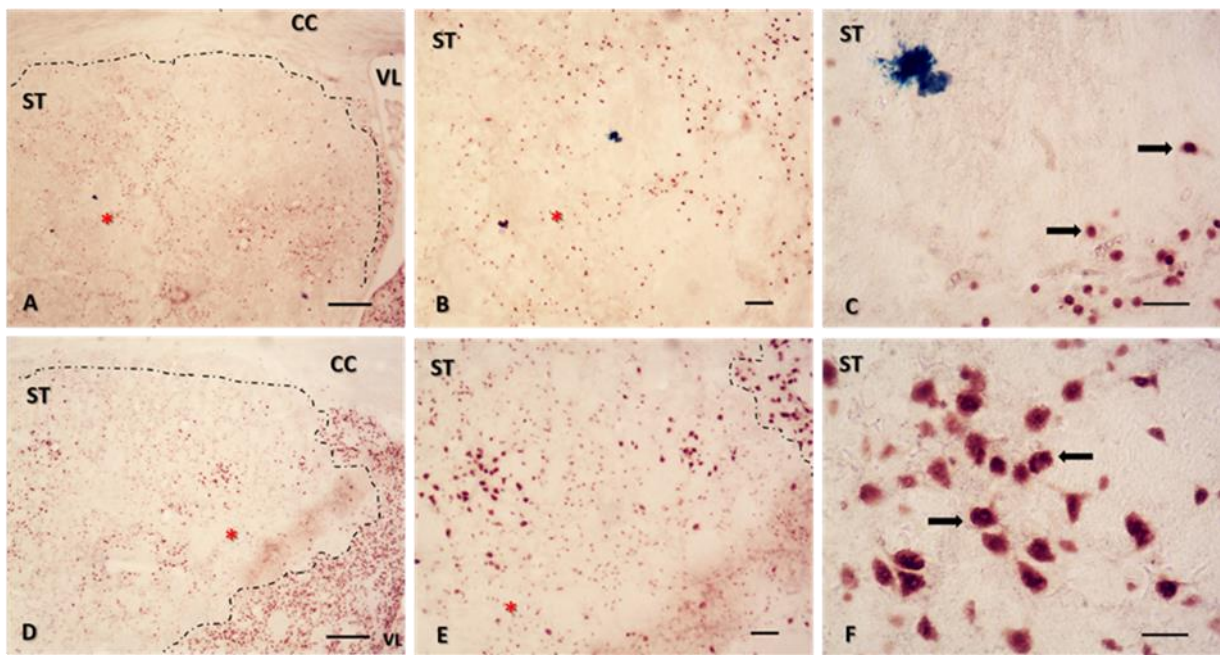


Figura 31a: Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcção para neurônios mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz perda neuronal e imunomarcção positiva com anticorpo anti-NeuN. (a) e (d) ênfase para preservação de neurônios na periferia; (c) e (f) ênfase para preservação de neurônios no centro da lesão; **Linha superior:** animal controle (Tween), 1 dia após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 1 dia após AVE. **Setas:** apontam para células NeuN⁺; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado; **VL:** Ventrículo lateral. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, E.); (C, F) 400 μ m.

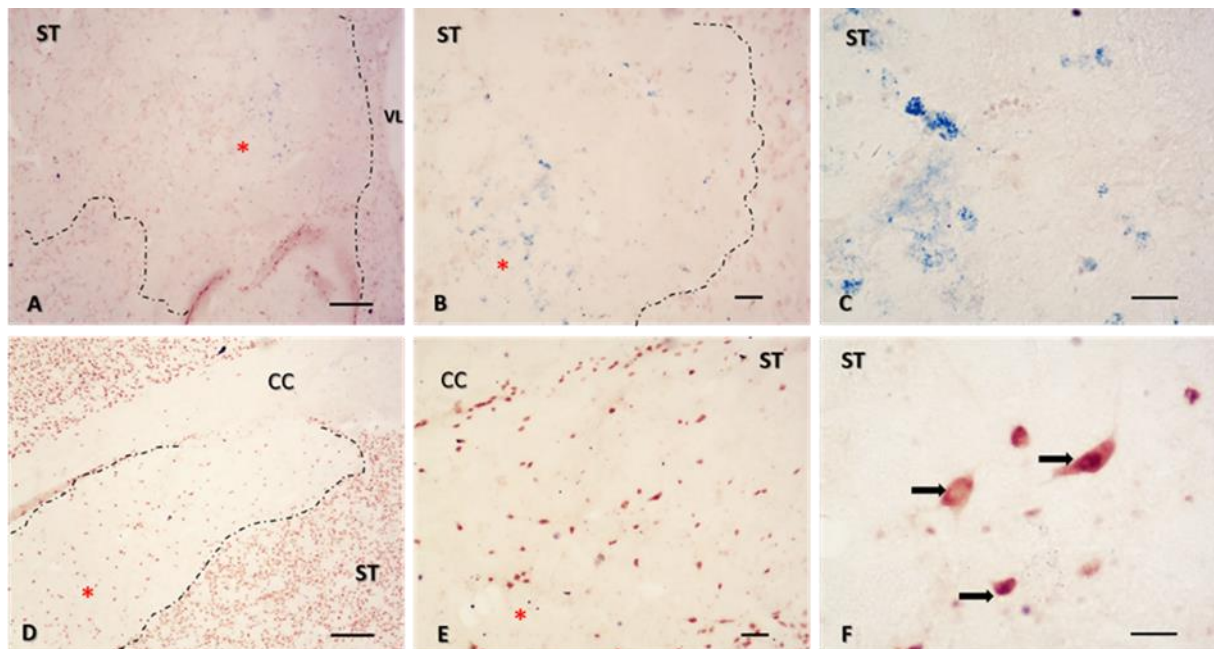


Figura 36 a: Imagens de amostras de tecidos cerebrais com imunomarcção para neurônios mostrando que o AVE isquêmico no Estriado (ST) após injeção de endotelina-1(ET-1) induz perda neuronal e imunomarcção positiva com anticorpo anti-NeuN. (a) e (d) ênfase para preservação de neurônios na periferia; (c) e (f) ênfase para preservação de neurônios no centro da lesão; **Linha superior:** animal controle (Tween), 7 dias após AVE; **Linha inferior:** animal tratado (Gergelim), 7 dias após AVE. **Setas:** apontam para células NeuN⁺; **Asterisco (*):** local de injeção de ET-1; **CC:** Corpo Caloso; **ST:** Estriado; **VL:** Ventrículo lateral. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, E.); (C, F) 400 μ m.

3.5. Histopatologia do Rim e Fígado de Animais Isquêmicos tratados com Tween a 5% e com Extrato de Gergelim Preto.

Secções histológicas de rim e fígado com espessuras de 5-6 μm foram coradas por métodos de coloração de rotina e/ou histoquímicos para a identificação de possíveis alterações estruturas em células que constituem o tecido desses órgãos.

Áreas danificadas, em algumas secções, foram identificadas como artefatos de técnicas, comuns em métodos histológicos. Em secções de fígado de animais controle e tratados corados por Hematoxilina- Eosina (HE) ou Tricrômico de Gomori (TG) os Hepatócitos e elementos do espaço porta (EEP) não mostraram alterações morfológicas (**Figuras 42, 43 e 46**). Em secções de rim corados pelos mesmos métodos, também não foram evidenciadas alterações morfologias em estruturas importantes ao funcionamento desse órgão - túbulos contorcidos proximais e distais, glomérulos renais e capsulas de Bowman (**Figuras 44 e 45**).

O método de Reativo de Shiff (P.A.S) mostrou integridade da membrana basal nas estruturas dos túbulos contorcidos e glomérulos renais (córtex renal) em animais tratados e controles em todos os tempos de sobrevida (**Figuras 47 e 48**). A ausência de lesões hepáticas e renais sugere que ESGP não apresenta substâncias prejudiciais para esses órgãos.

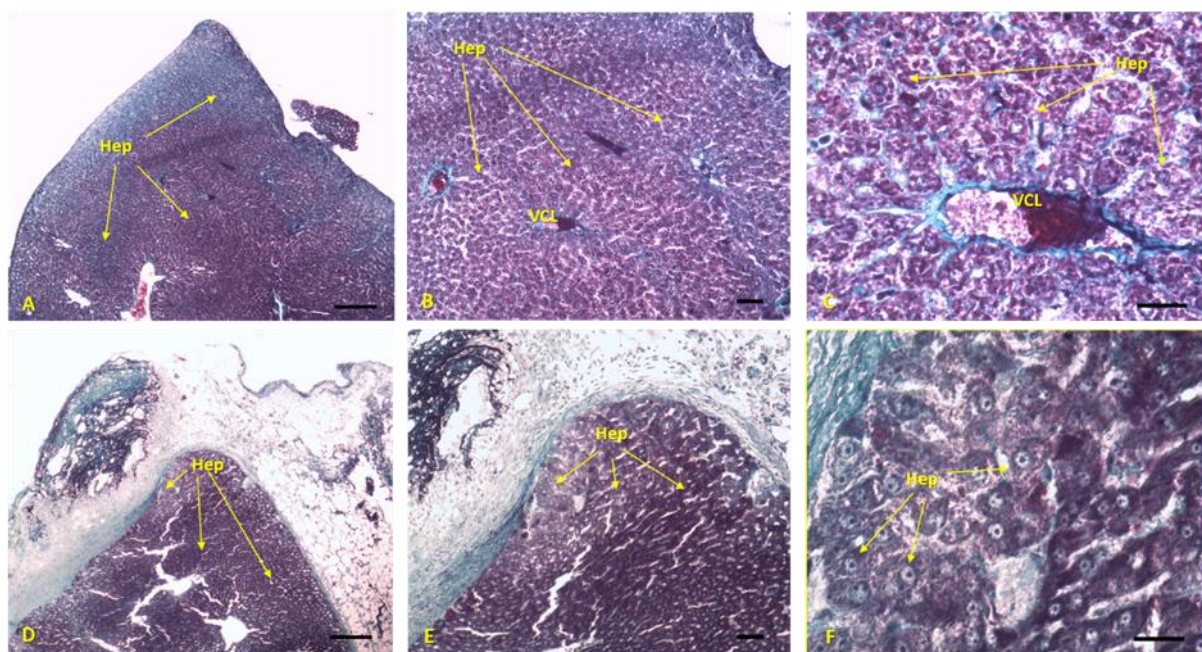


Figura 42: Imagens de amostras de tecidos de fígados corados com Tricrômico de Gomori (TG) mostrando estruturas internas desse órgão, aparentemente sem alterações após 24 horas de tratamento. **Linha superior:** amostra de fígado de animal controle (Tween); **Linha inferior:** amostra de fígado de animal tratado (Gergelim). **Setas:** apontam para hepatócitos; **VCL:** Veia centrolobular; **HEP:** hepatócitos. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, E.); (C, F) 400 μ m.

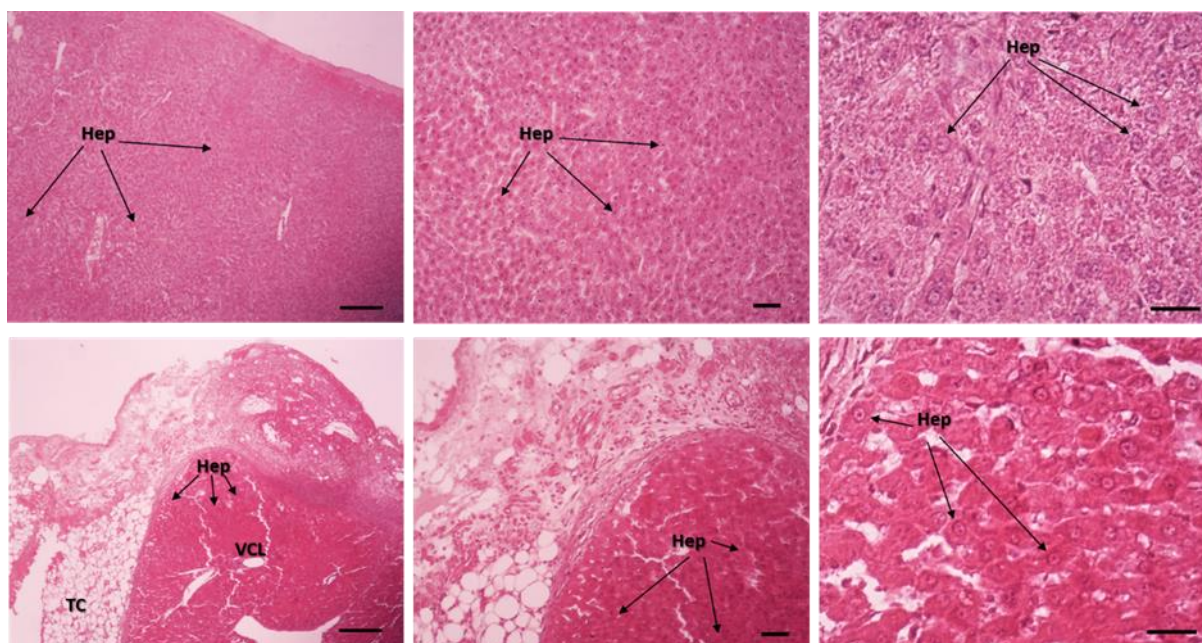


Figura 43: Imagens de amostras de tecidos de fígados corados com Hematoxilina e Eosina (HE) mostrando estruturas internas desse órgão aparentemente sem alterações após 24 horas de tratamento. **Linha superior:** amostra de fígado de animal controle (Tween); **Linha inferior:** amostra de fígado de animal tratado (Gergelim). **Setas:** apontam para hepatócitos; **VCL:** Veia centrolobular; **Hep:** hepatócitos. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, F.); 400 μ m.

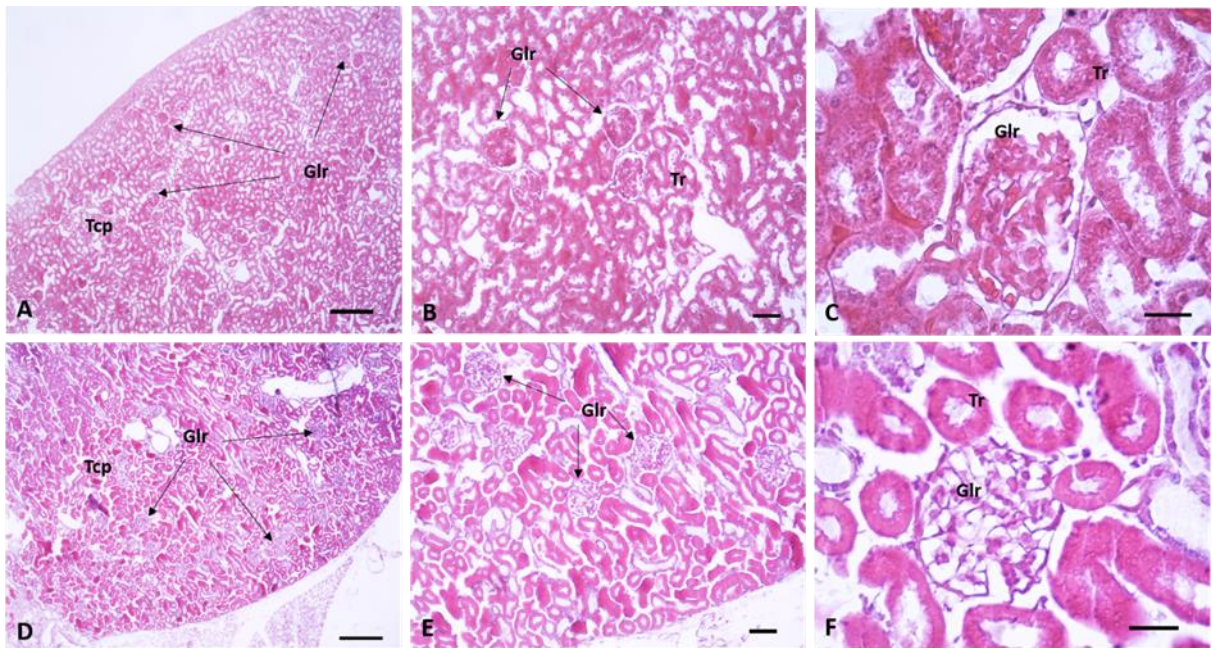


Figura 44: Imagens de amostras de tecidos de rins corados com Hematoxilina e Eosina (HE) mostrando estruturas internas desse órgão aparentemente sem alterações após 24 horas de tratamento. **Linha superior:** amostra de rim de animal controle (Tween); **Linha inferior:** amostra de rim de animal tratado (Gergelim). **Setas:** apontam para glomérulos renais; **Glr:** Glomérulo Renal; **Tr:** Túbulo Renal. **Barra de escala:** 50 μm (A, D); 100 μm (B, E.); (C, F) 400 μm .

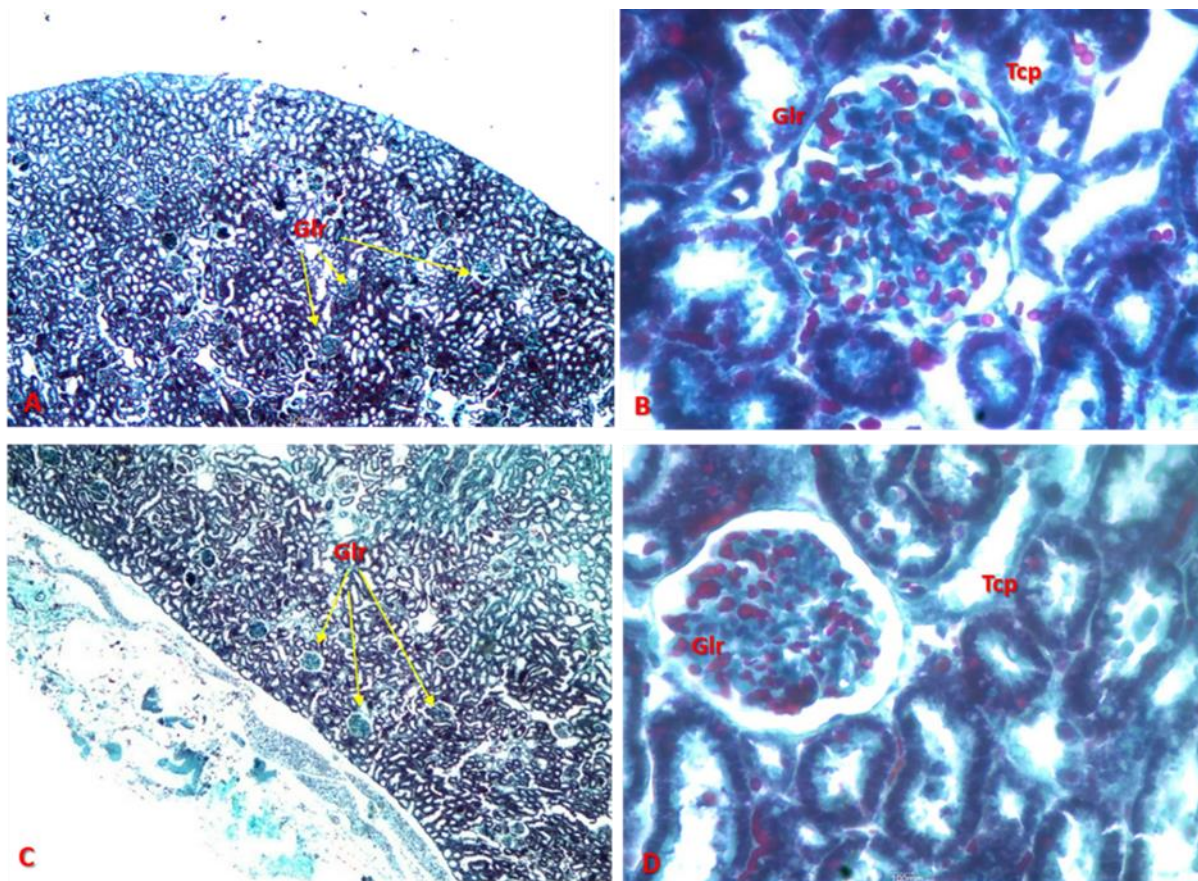


Figura 45: Imagens de amostras de tecidos de rins corados com Tricrômico de Gomori (TG) mostrando estruturas internas desse órgão aparentemente sem alterações após 24 horas de tratamento. **Linha superior:** amostra de fígado de animal controle (Tween); **Linha inferior:** amostra de fígado de animal tratado (Gergelim). **Setas:** apontam para Glomérulos Renais; **Glr:** Glomérulo Renal; **Tcp:** Túbulos Renais. **Barra de escala:** 50 μ m (A, C); 400 μ m (B, D).

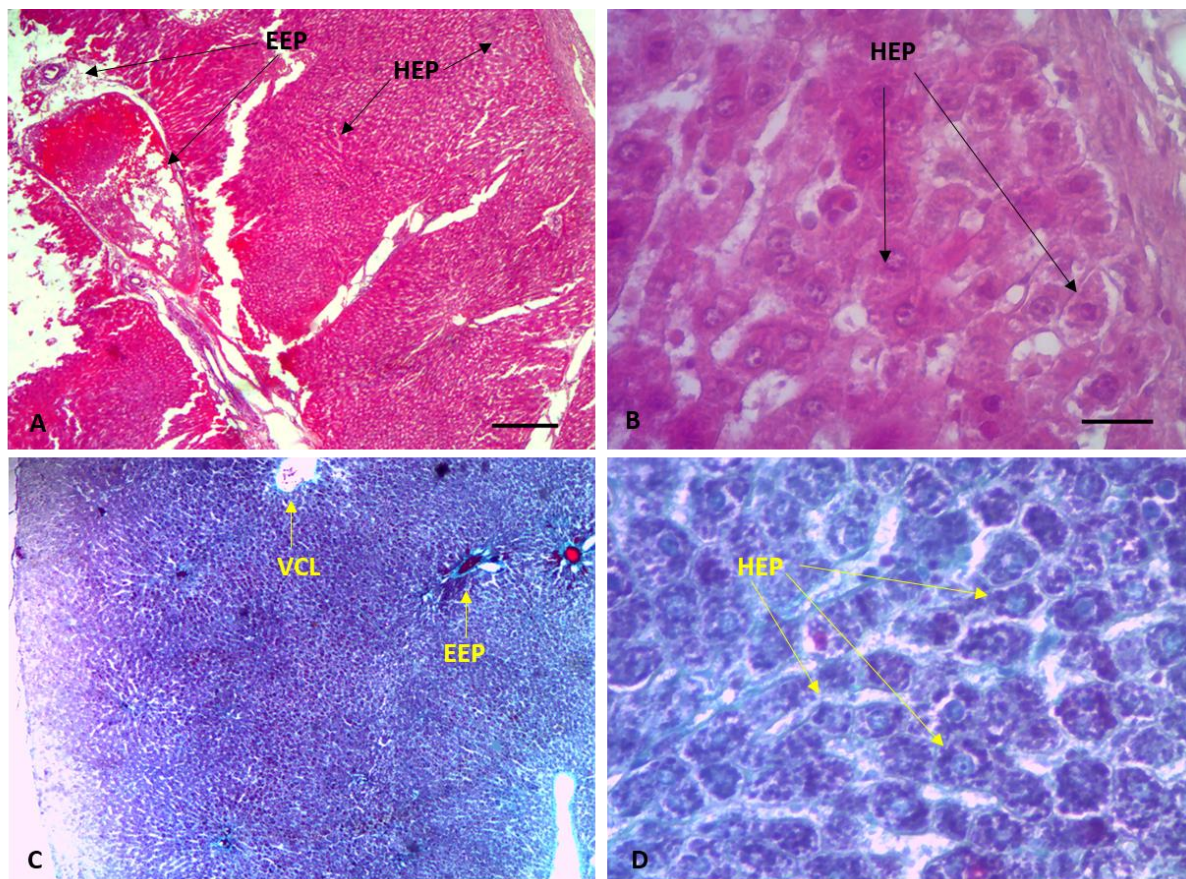


Figura 46: Imagens de amostras de tecidos de fígado corados com Hematoxilina /Eosina (HE) e Tricrômico de Gomori (TG) mostrando estruturas internas desse órgão aparentemente sem alterações após 7 dias de tratamento. **Linha superior:** amostra de fígado de animal controle (Tween); **Linha inferior:** amostra de fígado de animal tratado (Gergelim). **Setas:** apontam para hepatócitos; **VCL:** Veia centrolobular; **HEP:** hepatócitos; **EEP:** elementos do espaço porta. **Barra de escala:** 50 μm (A, D); 400 μm (B, E).

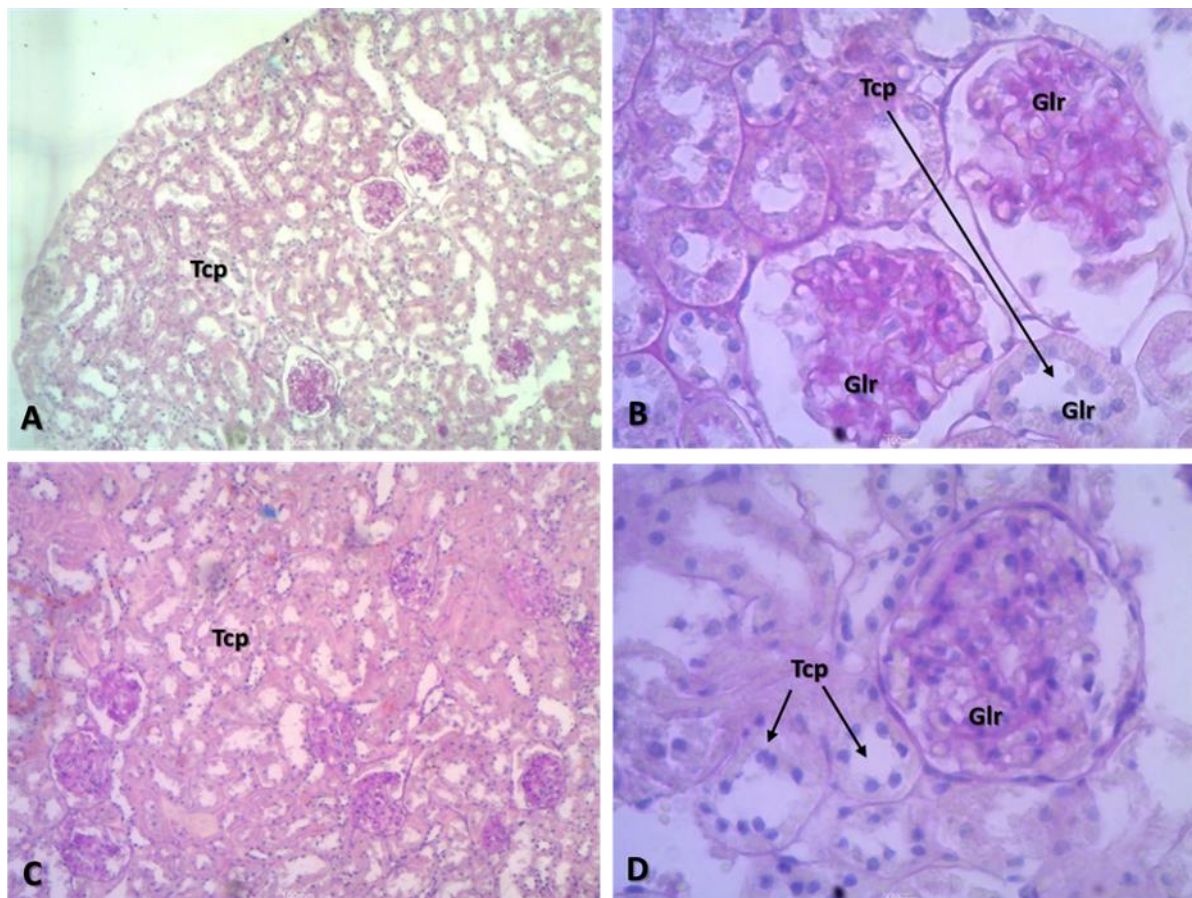


Figura 47: Imagens de amostras de tecidos de rins corados com P.A.S (Reativo de Schiff) mostrando estruturas internas desse órgão aparentemente sem alterações após 7 dias de tratamento. **Linha superior:** amostra de rim de animal controle (Tween); **Linha inferior:** amostra de rim de animal tratado (Gergelim). **Setas:** apontam para Túbulos renais; **Tcp:** túbulos contorcidos proximais; **Glr:** Glomérulo renal. **Barra de escala:** 100 μ m (A, C); 400 μ m (B, D).

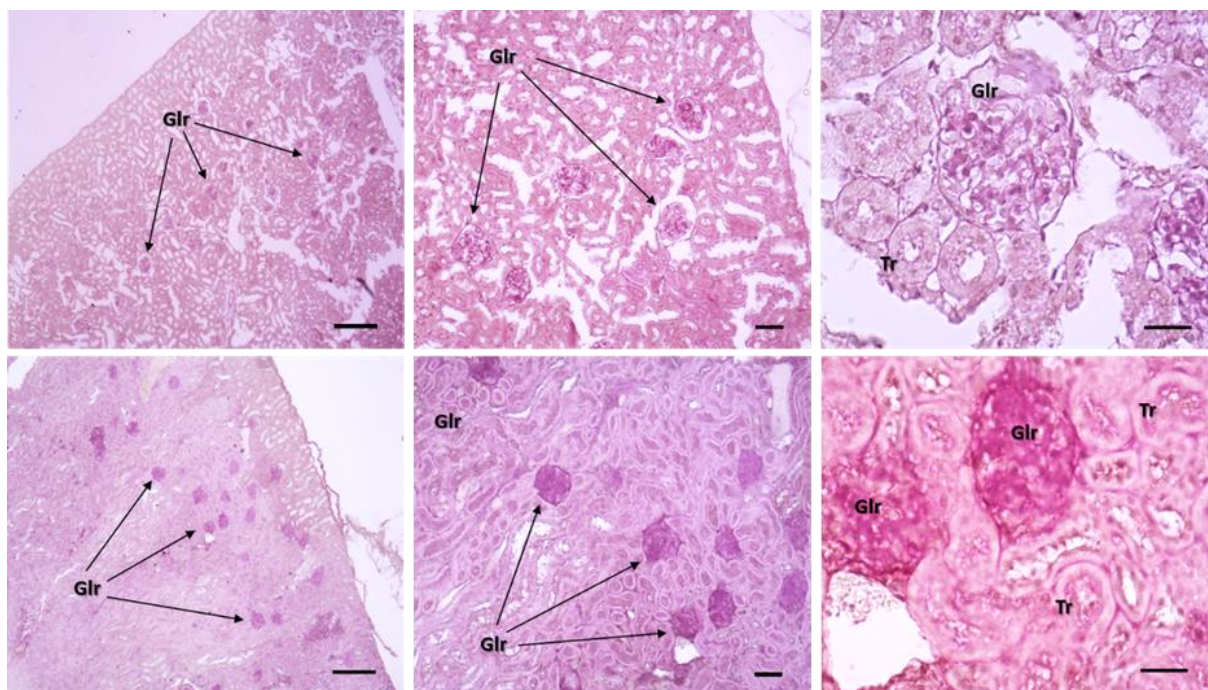


Figura 48: Imagens de amostras de tecidos de rins corados com P.A.S (Reativo de Schiff) mostrando estruturas internas desse órgão aparentemente sem alterações após 24 horas de tratamento. **Linha superior:** amostra de rim de animal controle (Tween); **Linha inferior:** amostra de rim de animal tratado (Gergelim). **Setas:** apontam para Glomérulos renais; **Tr:** Túbulos renais; **Glr:** Glomérulo renal. **Barra de escala:** 50 μ m (A, D); 100 μ m (B, E.); (C, F) 400 μ m.

3.6. Índice de Acidez do Extrato de Gergelim Preto (*Sesamum indicum* L).

O extrato supercrítico de gergelim preto (*Sesamum indicum* L) foi submetido ao método oficial Ca 5a-40 da American Oil Chemists' Society (AOCS, 2014) para verificação do índice de acidez. O resultado revelou a presença de ácidos graxos saturados (SFAs) - palmíticos (C16: 0), [35,81 %] e láurico (C12: 0), [27,98%].

A maior concentração identificada na amostra foi de ácido palmítico (C16: 0) [35,81 %]. Os resultados mostram, em porcentagem de ácidos graxos livres (% FFA), baixa acidez do extrato testado.

3.7. Avaliação Citotóxica do Extrato de Gergelim Preto (*Sesamum indicum* L) por Comparação Segundo o Tempo de Exposição.

A caracterização da citotoxicidade *in vitro* é um procedimento importante à avaliação biológica de compostos e/ou produtos na análise inicial da biocompatibilidade e posterior utilização sem danos à saúde. Através da exposição de uma cultura celular a determinado biomaterial de interesse é possível caracterizar reações adversas de citotoxicidade resultantes da composição do biomaterial testado.

O extrato supercrítico de gergelim (*Sesamum indicum* L.) foi testado em ensaio de citotoxicidade por contato direto com amostras sanguíneas, segundo Masson e Lombello (2016). Em apenas uma concentração do extrato foi verificada hemólise parcial (7.28%). A hemólise completa foi demonstrada por 0.2% (v/v) de Triton X-100 como controle positivo e não foi evidenciada hemólise por PBS (concentração) como controle negativo (**Figura 49; Tabela 2**).

Resultado que sugere uma condição de mínima agressividade e/ou alteração na função sanguínea ocasionada pelo ESGP utilizado em nosso estudo.

Tabela 2: Propriedade hemolítica do extrato supercrítico de gergelim (*Sesamum indicum*)

Amostra	Percentual de hemólise de hemácias			
	Concentrações de compostos (mg/L)			
	250	500	1000	2000
Gergelim (<i>Sesamum indicum</i> L)	0	3.53	3.64	7.28

Determinação de Citotoxicidade				
Atividade hemolítica				
Data de Realização	Número	A ₄₉₂ Ext.	A ₄₉₂ PBS (Controle -)	A ₄₉₂ Triton (Controle +)
04/jun	1	0.329	0.263	1.17
Média		0.329	%Hemólise	7.28
Desv. Médio		0.000		0.00
Observações				
Amostra de extrato supercrítico de gergelim, dados de abs utilizado em azul				

Concentrações (mg/L)				Tempo (min)
250	500	1000	2000	
0.258	0.194	0.288	0.201	0
0.256	0.22	0.288	0.329	20
0.206	0.295	0.296	0.193	40
%Hemólise	-2.54	3.53	3.64	7.28

Cito - (Ext Gergelim)

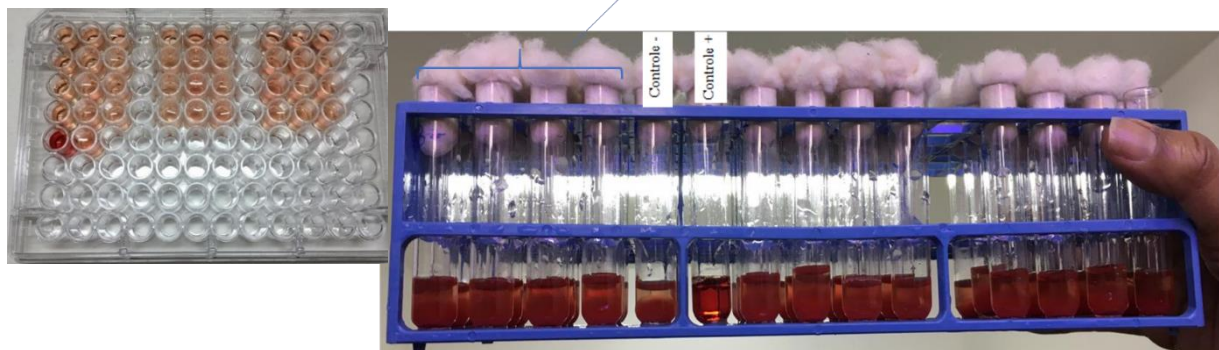


Figura 49: Avaliação Citotóxica do Extrato de Gergelim Preto (*Sesamum indicum* L). Tabela de valores de concentrações do extrato x tempo e percentual de hemólise. Distribuição em placas e tubo de ensaios de amostras: controle (-) e controle (+).

4. DISCUSSÃO

Em média, a cada 40 segundos, alguém sofre um AVE, o que demonstra drasticamente a frequência dessa doença devastadora (MOZAFFARIAN et al.; 2016). AVE é causado na grande maioria dos casos por oclusão de uma artéria cerebral (OACM), ocasionando a obstrução do fornecimento sanguíneo em determinada região encefálica e, em alguns momentos, o rompimento do vaso sanguíneo causa hemorragia grave na área de lesão, sendo a extensão da área atingida dependente da duração do evento (VAGNEROVA; KOERNER; HURN, 2008; MOZAFFARIAN et al.; 2016).

À obtenção do AVE isquêmico focal, adotou-se um modelo experimental por injeção de endotelina-1 (ET-1), no encéfalo de ratos adultos, que tem proporcionado um amplo espectro de manifestações que mimetizam um AVE em humanos. Nessa abordagem, muitos aspectos da fisiopatologia foram identificados por métodos histoquímicos e imuno-histoquímicos como relado por Liddelow e colaboradores (2017) e por Clemens (2017). Igualmente, outras características da lesão isquêmica como a área de penumbra, o núcleo isquêmico e o infiltrado de células foram ratificados utilizando microscopia óptica, tendo como um ponto de orientação o local de injeção do peptídeo ET-1 diluído juntamente com o pigmento azul de colanil, conforme demonstrado em trabalhos de Guimarães e colaboradores (2012).

A isquemia foi executada em ratos machos jovens e consanguíneos, saudáveis e alojados em condições livres de patógeno segundo os trabalhos de Dirnagl (2016). Essa condição não impediu a redução na variabilidade da lesão isquêmica e, tampouco, invalidou a investigação a respeito da fisiopatologia do AVE associado ao tratamento com extrato supercrítico de gergelim preto (ESGP) em ratos de linhagem consanguínea. Outrossim, as diferentes lesões isquêmicas observadas ratificam a discrepância entre a realidade do AVE em humanos e aqueles obtidos em modelos experimentais com roedores, uma vez que, em humanos, os eventos isquêmicos preferencialmente ocorrem em pacientes idosos e, em ambos os sexos, frequentemente com comorbidades que requerem múltiplos medicamentos com diversas interações no organismo como comentado em trabalhos de Roger e colaboradores (2011).

Yanagisawa (1998) verificou um mínimo refluxo do fármaco ET-1 no período de estabelecimento da lesão isquêmica. Neste estudo, a propriedade vasoconstritora da

ET-1, injetada estereotaxicamente ao parênquima cerebral dos animais que compunham os grupos experimentais garantiu o aparecimento de uma área de lesão no estriado. O quadro isquêmico instalado ocasionou alterações comportamentais nos animais: i) dificuldades de marcha- déficits motores ; ii) desorientações e dificuldades em relacionar pontos em campo aberto (déficits cognitivos) semelhante ao verificado nos trabalhos de Yew e colaboradores (2019) relativa a uma abordagem comportamental que não foi intensamente explorada, em nesso estudo, em virtude da dificuldade que obtivemos na estruturação e montagem de um espaço adequado à investigação desses déficits após AVE. Entretanto, mostrou-se útil em ratificar a concentração usada do peptídeo ET-1 à formação dos grupos investigados, e também compatível para mimetizar certos aspectos evidenciados no AVE em humanos.

Essas observações corroboraram à simulação de AVE e à execução de estudos de longos prazos. Neste estudo uma verificação histopatológica nos tempos de 24 horas e 7 dias após lesão isquêmica foi estabelecida, e foram investigados: (i) os efeitos do tratamento por via intraperitoneal com extrato supercrítico de gergelim preto (*Sesamum indicum* L) (ESGP) sobre o padrão da lesão isquêmica, a infiltração de células polimorfonucleares, a distribuição e ativação de células gliais (micróglia e astrócitos) e a perda neuronal na região lesionada; (ii) os danos da dose (mg/kg) injetada do extrato sobre os rins e fígado; (iii) a ação citotóxica do ESGP em hemácias sanguíneas e sua composição acídica para uso biológico.

Nesse sentido, em todos os grupos experimentais foram observadas diferenças no formato e tamanho da lesão isquêmica após injeção de 80pMol de endotelina-1, uma verificação compatível aos resultados encontrados nos trabalhos de Cotrina e colaboradores (2017) que investigaram a progressão da lesão isquêmica em roedores, mas em diferentes tempos de sobrevivência. Essa diferença pareceu ser consequência do método de injeção adotado, realizado com auxílio de micropipetas de vidro acopladas em sondas de polietileno conectadas a seringas de 5ml e/ou resultante da distribuição desse fármaco no tecido cerebral. Vários trabalhos que utilizaram a endotelina-1 para obtenção e estudo da fisiopatologia da lesão isquêmica mostraram distintos formatos de lesão na área de injeção, mesmo quando uma seringa de Hamilton e aparelho regulador de tempo de injeção e concentração do peptídeo foram utilizados (CLEMENS, 2017).

As diferenças no formato e tamanho da lesão impossibilitaram uma melhor avaliação a respeito dos efeitos do extrato supercrítico de gergelim preto sobre a redução e/ou recuperação tecidual na área lesionada. Todavia, uma abordagem em relação a infiltração e distribuição das células inflamatórias no ambiente isquêmico pôde ser bem elucidada. Trabalhos de Dos Santos e colaboradores (2007) e Vagnerova e colaboradores (2008) demonstraram infiltrados efetivos de células inflamatórias na área de lesão; um evento que foi observado, neste estudo, no centro e periferia, em ambos os grupos experimentais. A abordagem qualitativa feita por microscopia óptica, em ambos os grupos experimentais, como verificado em trabalhos de Choi e colaboradores (2018), revelou uma densidade de células polimorfonucleares com distribuições distintas - um menor número dessas células foi verificado nos animais tratados nos tempos de 24 horas e 7 dias após isquemia.

Trabalhos de Shahidi e colaboradores (2006) comprovam a presença de compostos antioxidantes no gergelim preto capazes de doar hidrogênio e neutralizar o excesso de radicais livres presentes na área isquemia e que são essenciais à ativação de vias relacionadas às respostas inflamatórias e/ou à morte de neurônios no parênquima cerebral lesionado. Nesse sentido, o resultado qualitativo verificado após o tratamento com o ESGP se justifica pela presença de compostos e/ou componentes químicos com grupos funcionais que influenciem nas vias relacionadas às respostas inflamatórias durante o AVE.

Essas respostas celulares ocasionadas no processo de inflamação progridem em regiões próximas e/ou distantes da lesão (SHENBIN et al., 2020). Nesta investigação, no centro (núcleo isquêmico) e periferia da lesão (penumbra isquêmica), correspondentes a áreas de intensa atividade celular, foram efetuadas marcações por imuno-histoquímica específicas para células microgliais - células residentes no SNC e que desempenham funções importantes após AVE (NEUMANN et al., 2016; SHENBIN et al., 2020). As marcações revelaram intensa densidade de células microgliais no centro e periferia da lesão, com essas células apresentando morfologia diferente daquelas adquiridas no estado quiescente. A utilização do anticorpo CD68 foi determinante para identificar micróglia na área lesionada, ratificando a resposta imune após AVE de acordo com os trabalhos de Schwartz e colaboradores (2001).

Diversos trabalhos que investigam a resposta inflamatória após AVE relacionam os resultados da quantificação das células inflamatórias no ambiente

isquêmico à ativação de vias moleculares nesse local. Essas abordagens quantitativas servem para avaliar prováveis efeitos benéficos e/ou prejudiciais ocasionados por fármacos sintéticos (alopáticos) e/ou extrato de plantas com potencial farmacológico, já descrito na literatura científica e que possam servir como possíveis terapêuticas para diversas neuropatologias agudas e crônicas (Xu et al., 2021). Nesse sentido, foram realizadas as contagens dessas células ativas (micróglias/macrófagos) na área lesionada, em ambos os grupos investigados - os tratados com Tween 5% e os que receberam 150mg/kg de extrato supercrítico de gergelim preto. As contagens, os resultados estatísticos e as plotagens dos gráficos revelaram um menor número de células ED1+ (CD68+) nas secções imunomarcadas com anti-ED1 e oriundas dos animais tratados com extrato supercrítico de gergelim preto, o que pode ser atribuído a presença de compostos químicos no ESGP e com grupamentos funcionais de propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias como relatado em Jamarkattel-Pandit (2010). Em trabalhos de Shen e colaboradores (2004) com redução de oxigênio e glicose (OGD), uma condição “*in vitro*” com células neurais e que mimetiza a isquemia no tecido cerebral, a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), a liberação do glutamato e citocinas inflamatórias foi evidenciada. Song e colaboradores (2006) relataram que eliminadores de radicais e compostos antioxidantes podem proteger células neurais contra danos induzidos pela isquemia. Moazzami, Andersson, Kammal-Eldin (2006) e Jeong e colaboradores (2004) relataram que glicosídeos de lignana, glicosídeos de sesaminol e outros compostos fenólicos – ácido p-hidroxibenzoico, ácido p-cumárico, ácido vanílico foram identificados e relatados como antioxidantes, anti-inflamatórios, com efeitos protetores em relação à morte celular induzida por ERO. Outros compostos, como o sesaminol e glicosídeo de sesaminol, isolados de sementes de *sesamum* desengorduradas (DSE), também foram relatados como tendo antioxidantes, efeitos anti-inflamatórios e protetores em modelos de doença de Alzheimer (DA) (KIM et al., 2003; LEE et al., 2005; LEE et al., 2006), resultados que possuem certa correlação quanto a possível ação de um efeito anti-inflamatório do ESGP em mecanismos que exacerbam a lesão isquêmica.

Em estudos de Shenbin e colaboradores (2020) foram bem investigados os papéis prejudiciais do fenótipo microglial M1 no ambiente isquêmico - um fenótipo que sinaliza para ativação de vias pró-inflamatórias e que contribuem à exacerbação da lesão durante a progressão de evento isquêmico. Nesta investigação, a diminuição na

densidade de células ED1+ sugere que compostos no ESGP podem estar influenciando em vias que modulam essas células. Hu e colaboradores (2012) tem apresentado o fenótipo microglial M2 como benéfico durante o evento isquêmico. A ativação dessas células imunes residentes do SNC é acompanhada de mudanças fenotípicas das mesmas no ambiente isquêmico (JIANG et al., 2020) - podendo ser classificadas como um tipo pró-inflamatório ou anti-inflamatório, a saber: fenótipo M1 ou M2, um processo denominado de polarização, com características temporais que mudam dinamicamente durante evento patológico do AVE (HU et al., 2012; RANSOHOFF, 2016). É geralmente aceito que na fase aguda do AVE, a proliferação e ativação da micróglia causam uma forte reação inflamatória que é prejudicial para o SNC, mas mesmo na fase aguda e/ou crônica essas células podem produzir uma variedade de citocinas que contribuem à sobrevivência e reparo neuronal (LALANCETTE-HEBERT et al., 2007). As micróglia têm interações extensas com outras células do SNC ratificando sua importância e complexidade na patogênese do AVE, mas independente de qual mecanismo pode estar sendo modulado pelo tratamento com ESGP, após isquemia focal por ET-1, parece evidente, que compostos fenólicos e fitatos identificados em trabalhos de KIM e colaboradores (2016), CHEN e colaboradores (2017) e com efeito amplamente redutor, pode estar presente no ESGP - o que contribuiria para a inativação de agentes oxidantes produzidos durante a progressão isquêmica.

Nas primeiras horas após AVE, um outro tipo de célula glial, os astrócitos, tem sua atividade, no ambiente isquêmico, bastante modificada (BYLICKY; MUELLER; DAY, 2018). Alterações nessas células podem ser observadas como um marcador de resposta celular ao AVE, sendo a passagem do seu estado não ativado ao ativado associado a uma forte expressão da proteína acídica fibrilar glial (GFAP) (PEKNY; NILSSON, 2005). Vários autores relatam que no tecido cerebral lesionado a GFAP funciona como marcador de um processo inflamatório. Neste estudo, a marcação por imuno-histoquímica com anti-GFAP mostrou elevada reatividade de astrócitos na área lesionada, achados que estão de acordo com trabalhos Herrmann e colaboradores (2003) que relataram intensa reatividade dessas células após AVE em ratos. Nos grupos experimentais investigados a reatividade astrocitária foi evidenciada ao redor (região de penumbra isquêmica) e centro de lesão (núcleo isquêmico), uma distribuição que está de acordo com Overman e colaboradores (2012), embora no

centro de lesão, em animais tratados com ESGP, a astrogliose foi menor. Evidenciou-se a preservação dessas células em algumas áreas, sugerindo que o ESGP pode influenciar na atividade de astrócitos, o que pode ser benéfico à sobrevivência e reparo neuronal. Recentemente, trabalhos de Liddelow e colaboradores (2017) mostraram que essas células podem ser moduladas em dois tipos, os astrócitos A1 e A2; no ambiente isquêmico, ambos, têm suas atividades - benéficas e/ou prejudiciais - modeladas por células microgliais. Astrócitos A1 adquirem papel semelhante ao fenótipo microglial M1, com ação prejudicial no ambiente isquêmico, o que pode resultar em mais perda de neurônios. Astrócitos A1 regulam positivamente muitos genes clássicos da cascata de complemento, mostrando-se como destrutivos para as sinapses, ratificando que astrócitos A1 podem ser prejudiciais (LIDDELOW et al., 2017). Entretanto, astrócitos A2 regulam positivamente fatores neurotróficos, condicionando-os como protetores. Essa modulação tem fornecido evidência de que astrócitos reativos induzidos por AVE promovem a recuperação e reparo do SNC (LIDDELOW et al., 2017; SHENBIN et al., 2020).

A quantificação dessas células na área de lesão e a análise dos gráficos estatísticos obtidos, mostraram uma diferença significativa entre as células GFAP+ nos grupos que receberam doses 150 mg/kg de ESGP em relação àqueles onde o tratamento foi realizado com a solução Tween a 5%. Em relação ao ESGP, os resultados sugerem que pode haver compostos com propriedades redutoras e que influenciam em vias moleculares envolvidas na modulação de astrócitos. A presença de um componente no ESGP que possa modular a atividade dessas células e/ou que seja sequestrante de ERO, torna-se relevante e, por conseguinte, apresenta-se como um importante componente para isolamento e uso em futuras investigações em terapia celular, visando o tratamento de doenças do SNC, uma vez que há poucos estudos e testes envolvendo a utilização desse tipo de extrato.

Neste estudo, evidenciou-se bastante astrócitos em alguns grupos de animais lesionados e tratados com gergelim, porém não é possível relatar qual tipo A1 ou A2 tem predominância no local. Contudo, como essas células são influenciadas pela atividade microglial, em resposta a isquemia, o resultado obtido possibilita, em estudos subsequentes, novas investigações com ênfase na ação desse extrato em vias moleculares envolvidas na modulação de astrócitos após AVE e na lesão da medula espinhal (LME), uma neuropatologia que acomete muitos indivíduos

(SHENBIN et al., 2020), bem como em outras doenças do SNC que ocasionam ativação e modulação fenotípica de outras células. Nesse sentido, a atividade de astrócitos no centro de lesão, evidenciada no estudo, em animais tratados com extrato, pode sugerir um prognóstico benéfico, uma vez que a atividade microglial foi menor no grupo em questão. Entretanto, não se pode descartar uma ação prejudicial dessas células, em virtude da não realização de ensaios moleculares que suprimem a atividade microglial e identifique a expressão de proteínas relacionadas a atividade de astrócitos A2.

Concomitante a ação de células gliais (astrócitos e micróglia) se evidencia, nos resultados obtidos, uma perda de neurônios na área de lesão. A morte de neurônios, após isquemia focal, foi bastante investigada em trabalhos de Du et al. (2004), McCullough et al. (2005), Renolleau et al. (2007) que sugeriram o envolvimento de vias bioquímicas na sinalização e ativação dos mecanismos de morte celular durante o AVE. Em nosso estudo, uma perda neuronal foi bem evidente nos períodos pós-isquemia investigados sugerindo ativação de vias de morte neuronal segundo McCullough e colaboradores 2005. Outrossim, Mohd M Khan e colaboradores (2010) relatam que o estresse oxidativo (EO) causado por um desequilíbrio entre a produção de oxigênio reativo e a capacidade do sistema biológico de inativar os intermediários reativos ou reparar os danos resultantes durante o AVE colaboram à perda neuronal. Condição que se correlaciona aos nossos achados, uma vez que na abordagem quantitativa foi revelado uma diferença significativa na preservação de neurônios em secções imunomarcadas e oriundas dos animais que receberam o tratamento ESGP.

Em estudos de Kiso (2004), alterações no estado normal do meio *redox* pode ocasionar efeitos tóxicos pela produção de peróxidos e radicais livres (RL), que causam danos oxidativos em uma variedade de alvos moleculares e celulares levando à necrose e/ou apoptose. Os benefícios de vários antioxidantes e eliminadores de radicais livres no ambiente isquêmico tem sido demonstrado em uma série de estudos, muitos deles incluindo proteínas, DNA, lipídios, mitocôndrias e estruturas de membrana (YOUSUF et al., 2009). Nesse contexto, a menor perda neuronal evidenciada nos animais isquêmicos que receberam o tratamento com ESGP pode estar relacionada a compostos antioxidantes existentes na matriz do extrato, condição bem estabelecida em estudos de Xu e colaboradores em outros extratos (2021).

Broughton, Reutens, Souben (2009) relatam que as vias de sinalização apoptótica e anti-apoptótica são ativadas após AVE e que mudanças no equilíbrio entre fatores proteicos, pró e anti-apoptótica à expressão de proteínas que promovam a morte celular funcionam como um mecanismo subjacente a esse processo. Em modelos experimentais são investigadas as vias de sinalização que desencadeiam a cascata de morte celular, muitas delas envolvem a ativação de p53 e caspase-3. Em trabalhos de Ji e colaboradores (2007) a inibição da expressão da p53 e caspase-3 reduziram a lesão isquêmica. Conforme os trabalhos de Lang, McCullough (2008) e McCullough e colaboradores (2005), as vias de morte neuronal são dependentes da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), da enzima poli (ADP) ribose polimerase (PARP), da citocromo C e da ativação de caspases. Independente da via desencadeadora da perda neuronal, a constatação, neste estudo, de neurônios íntegros próximos ao centro de lesão, onde a viabilidade dessas células é improvável, ratifica uma neuroproteção que pode estar correlacionada aos efeitos do tratamento com ESGP nas vias de morte celular e na modulação de células gliais. Essa investigação molecular não foi executada nesse estudo, mas, os resultados qualitativos e quantitativos alcançados com anti-NeuN, anti-ED1 e anti-GFAP são relevantes em estudos subsequentes, pois a avaliação dos déficits motores e cognitivos tanto em modelos experimentais de AVE como na clínica médica, em humanos, estão relacionados a perda de neurônios e a modulação de células gliais no local de lesão.

Fármacos sintéticos (alopáticos) e/ou compostos fitoquímicos têm proporcionado grandes benefícios à clínica médica, eliminando e/ou reduzindo, em alguns casos, os sintomas prejudiciais ao indivíduo acometido por doenças do SNC e periférico. Entretanto, o longo período de utilização de fármacos pode ocasionar danos em órgão vitais alterando a homeostase do organismo (HUANG et al., 2019). Neste estudo, a análise histopatológica de rim e fígado de animais isquêmicos tratados com solução Tween 5% e com o ESGP foi executada em secções histológicas de 5 µm de espessura de acordo com o protocolo de Lillie e colaboradores (1965). Os métodos de coloração de rotina e histoquímicos utilizados foram eficientes à visualização das estruturas e células nos órgãos investigados, conferindo um diagnóstico seguro conforme demonstrado em Finn (1987). Áreas danificadas foram excluídas do diagnóstico e receberam a identificação de artefato de técnica, segundo Kiernan

(1990). No fígado, os hepatócitos, a veia centro lobular e os elementos do espaço porta foram bem visualizados, não sendo evidenciado nenhuma alteração significativa, um padrão histopatológico semelhante aos resultados encontrados nos trabalhos de Finn (1987). Nos rins, os glomérulos renais, os túbulos contorcidos proximais e distais, a cápsula de Bowman e outras áreas não apresentaram danos significativos em sua morfologia, sugerindo que o ESGP, em tempos agudos após AVE experimental, além de indicar uma modulação nas respostas das células inflamatórias no ambiente isquêmico, não ocasionaram danos nesses órgãos essenciais. Poucas diferenças nos diagnósticos histopatológicos foram notadas nesses órgãos, em animais controles e tratados. O método de reativo de Shiff (P.A.S) (LILLIE, 1965) foi eficiente à visualização da membrana basal nos glomérulos renais, ratificando a ausência de lesão nessa estrutura.

Em estudos realizados por Yoshikawa e colaboradores (2008), 300µg de Rb1 (Ginsenoside) - composto presente no Ginsen - administrado por via intravenosa, uma vez por dia e 7 dias antes da embolização, ocasionou uma reação positiva após várias medições fisiológicas, sugerindo recuperação em tempos precoce e tardios de primatas não-humanos com AVE experimental. Similarmente, em um modelo de hemorragia subaracnóidea em ratos, Li e colaboradores (2011) demonstraram que a administração de 20mg de RB1 por via intravenosa (i.v) diminui o edema e mostrou histologicamente a redução do lúmen da artéria basilar sugerindo melhora do estado hemorrágico. Neste trabalho, a administração intraperitoneal (i.p) de 150mg/kg de ESGP em ratos isquêmicos não foi prejudicial aos rins e fígado, demonstrando uma recuperação positiva em tempos precoce e tardios, semelhante aos trabalhos de Yoshikawa e colaboradores (2008) em primatas não-humanos.

O uso de ESGP pretendeu alcançar a melhoria das complicações resultantes do estado isquêmico, bem como investigar possíveis danos em órgãos essenciais. Nesse sentido, ensaios de biocompatibilidade realizados para avaliar a citotoxicidade celular foram conduzidos, segundo trabalhos de Masson, Lombello (2016) e Cruz e colaboradores (1998). A resposta ao ensaio evidenciou aspectos de hemólise parcial e completa, revelando não haver presença e severidade de efeitos citotóxicos. O baixo índice de hemólise observado - hemólise parcial (7.28%) após testagem com ESGP- ratifica o uso do ESGP, em outras concentrações, em modelos experimentais de doenças agudas e crônicas do SNC.

Segundo estudos realizados no Instituto Adolfo Lutz (2008) o índice de acidez revela o estado de conservação do óleo, ao ponto de torná-lo impróprio ao uso. A liberação de próton hidrogênio (H⁺) é prejudicial a homeostase do meio intracelular, o que pode limitar o uso de substâncias de caráter ácido em estudos biológicos. Nesta abordagem, antes da utilização do ESGP no tratamento de AVE experimental, a submissão do extrato ao método oficial Ca 5a-40 da American Oil Chemists' Society (AOCS, 2014), para verificação do índice de acidez, revelou a presença de ácidos graxos saturados (SFAs) - palmíticos (C16: 0) e láurico (C12: 0)- próximos ao resultado obtido por Corso (2008) na extração de óleo de sementes de gergelim, empregando os solventes dióxido de carbono e n-propano pressurizado, bem como aos de Botelho e colaboradores (2014) com o método de extração por dióxido de carbono em estado supercrítico- SFAs, palmíticos (C16: 0) e esteárico (C18: 0) e poli-insaturados (PUFAs) ácido linoleico (C18: 2) e linolênico (C18: 3). Em porcentagem de ácidos graxos livres (% FFA), uma baixa acidez do extrato pode ser referida. Uma característica que possibilita o uso em outros ensaios *"in situ"* e *"in vivo"*.

Em relação ao exposto acima, a fisiopatologia do AVE é um processo complexo e os novos estudos propõem a investigação, no ambiente lesionado, dos vários mecanismos bioquímicos que estão além de simples dano tecidual. Consequentemente, a reação inflamatória que ocorre após a lesão neuronal desempenha um papel importante, sendo excepcionalmente elaborada, com respostas pró-inflamatórias multifásicas, que estimula a produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO) provocando estresse oxidativo e ativação de células endoteliais.

No contexto isquêmico, esses compostos danificam diretamente a estrutura vascular e iniciam o processo de inflamação correlacionada a resposta imune imediata (SUN et al., 2018). Similarmente, células gliais (astrócitos, microgliais) e leucócitos liberam vários agentes com ação pró-inflamatória - quimiocinas, citocinas e outras enzimas - que prejudicam o parênquima cerebral. As atividades dessas células são bem demonstradas em modelos animais, o que foi evidenciado em nosso estudo - células gliais atuando nas áreas lesionadas e que podem ter uma função dual - útil e prejudicial (HU et al., 2012; GOMES-LEAL, 2019; JIANG et al., 2020; SHENBIN et al., 2020).

A ação de substâncias redutoras no ESGP que inativam vias envolvidas na neuroinflamação podem ser as responsáveis por influenciar essas respostas celulares. Entretanto, vários fatores genéticos modulam o processo de inflamação, benéficamente ou não, aspecto que não foi objeto de investigação neste estudo e que pode ser abordado em pesquisa complementar. Muitos genes são capazes de influenciar a natureza da isquemia cerebral e a extensão da área afetada, modificando o prognóstico do AVE, logo, ensaios genéticos associados aos efeitos do ESGP após AVE parecem ser importantes.

Até o presente, a neuroinflamação vem sendo o foco dos estudos em AVE, por ser um alvo promissor no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e, quando bem definidas, tornam-se um passo importante na busca de mecanismo que possam minimizar os déficits ao SNC do indivíduo acometido - principal objetivo desse trabalho.

5. CONCLUSÃO

A injeção de 80pMOL de endotelina-1 no estriado de ratos adultos Wistar induziram lesões isquêmicas distintas em virtude do modo de injeção adotado e da própria distribuição da ET-1 no local de injeção. Entretanto, isso não impossibilitou uma avaliação qualitativa da lesão nos grupos experimentais adotados. O método de injeção por *scalp* venoso e micropipeta de vidro durante cirurgia estereotáxica produziu menor invasibilidade no processo cirúrgico e ausência de refluxo do fármaco injetado, ainda proporcionou melhor rendimento na formação dos grupos experimentais delineados - tratados e controles.

O modo de tratamento por via intraperitoneal possibilitou mais confiabilidade dos volumes injetados - solução Tween 5% ou extrato supercrítico - não sendo verificado presença de necrose tecidual no local de injeção, bem como comportamentos que caracterizam estado de dor no animal manipulado.

O método de coloração por violeta de cresila delineou bem a área de lesão e foi eficiente em mostrar o infiltrado de células polimorfonucleares no local, além de possibilitar a verificação de uma diferença no número de células polimorfonucleares entre os grupos tratados e controles, investigados nos tempos de 24 horas e 7 dias, após a lesão isquêmica, sugerindo possíveis efeitos do ESGP no comportamento dessas células.

Os marcadores imuno-histoquímicos utilizados possibilitaram a quantificação de células gliais e de neurônios, no centro (núcleo isquêmico) e periferia da lesão (penumbra isquêmica), revelando que: i) O número de microglias/ macrófagos ED1+ e astrócitos reativos foram menores em animais que receberam o tratamento com o ESGP; ii) neurônios preservados, no centro e periferia da lesão, foram mais evidenciados no grupo que recebeu ESGP. Essas observações, sugerem uma modulação na atividade dessas células por compostos presentes na matriz do extrato.

Associados aos resultados no SNC, o tratamento com ESGP não foi prejudicial aos rins e fígado, locais onde avaliações por técnicas histológicas de rotina e/ou histoquímicas não mostraram danos significativos nesses órgãos, demonstrando efeitos atóxicos do ESGP. Por sua vez, a ação citotóxica do ESGP pode ser considerada moderada, pois em células sanguíneas o extrato ocasionou baixo nível de hemólise, um bom prognóstico ao uso ESGP em modelos de doenças agudas e

crônica do SNC “*in vivo*”, ratificado pela presença de ácidos graxos insaturados e poli-insaturados - substâncias orgânicas de baixa acidez e com poder antioxidante

Os resultados obtidos sugerem que o estudo com ESGP, como agente anti-inflamatório e neuroprotetor nas doenças agudas e crônicas do SNC, devem prosseguir com o objetivo de isolar uma substância e/ou composto, clinicamente viável, contra uma variedade de condições em que o dano celular no parênquima cerebral seja consequência do estresse oxidativo ocasionado por AVE e outras neuropatologias que sinalizam para respostas inflamatórias. Portanto, uma maior compreensão do mecanismo subjacente à neuroproteção pelo ESGP poderá fornecer um caminho para novas abordagens terapêuticas, com extratos supercríticos em modelos de AVE em animais de experimentação, como meta de se produzir resultados que contribuam às aplicações clínicas no tratamento dessas neuropatologias em humanos e que permanecem ainda sem cura, acometendo milhões de pessoas no mundo.

6. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; SEN, R. The activation of lymphocytes is in their carma. **Immunity**. v. 18, n. 6, p. 721-722, jun. 2003.
- ABBOTT, N. J. et al. Structure and function of the blood-brain barrier. **Neurobiol Dis.** v. 37, n. 1, p. 13-25, 2010.
- ADIBHATLA, R. M.; HATCHER, J. F. Altered lipid metabolism in brain injury and disorders. **Sub-Cellular Biochemistry**. v. 49, p. 241-268, 2008.
- ADRIAN, G. G.; PHILIPP, J. K.; FRIEDHELM, C. H.; CATHRIN, B. Brain networks and their relevance for stroke rehabilitation. **Clin neurophysiol.** v. 137, n. 7, p. 1098-1124, 2019.
- ABRAMCZUK, B.; VILLELA, E. A luta contra o AVC no Brasil. **Com Ciência**, n. 109, 2019.
- ALKAYED, N. J. et al. Gender-linked brain injury in experimental stroke. **Stroke: a Journal of Cerebral Circulation**. v. 29, n. 1, p. 159-165, jan. 1998.
- ALMEIDA, L. G.; VIANNA, J. B. M. Perfil epidemiológico dos pacientes internados por acidente vascular cerebral em um hospital de ensino. **Revista Ciências em Saúde**. v. 8, n. 1, p. 12-17, 2018.
- AMABILLE, R. F. et al. CNPA G3: Nova opção de gergelim para a região do Distrito Federal. **EMBRAPA Cerrados, Planaltina**. 3p. (comunicado técnico, 43), 2001.
- GRECO, R.; MICIELI, G.; BAGETTA, G. Paradigm shift to neuroimmunomodulation for translational neuroprotection in stroke. **Front Neurosci.** v.12, 2018.
- AMELIA K. B.; CHARLES, E.; MITCHELL, S. V. E. Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention. **Circ Res.** v. 120, n. 3, p. 472–495, 2017.

AMIRI-NIKPOUR, M. R.; NAZARBAGHI, S.; HAMD-HOLASOU, M.; REZAEI, Y. An open-label evaluator-blinded clinical study of minocycline neuroprotection in ischemic stroke: gender-dependent effect. **Acta Neurol Scand**. v. 131, n. 1, p. 45-50, 2015.

AO, Q. et al. Protective effects of extract of Ginkgo biloba (EGb 761) on nerve cells after spinal cord injury in rats. **Spinal Cord**. v. 44, n. 11, p. 662-667, 2006.

APPELROS, P.; STEGMAYR, B.; TERÉNT, A. Sex differences in stroke epidemiology: a systematic review. **Stroke**. v. 40, n. 4, p. 1082-1090, 2009.

ARBOIX, A. et al. Acute stroke in very old people: clinical features and predictors of in-hospital mortality. **J Am Geriatr Soc**. v. 48, n.1, p. 36-41, 2000.

ARIESEN, M. J.; CLAUS, S. P.; RINKEL, G. J.; ALGRA, A. Risk factors for intracerebral hemorrhage in the general population: a systematic review. **Stroke**. v. 34, n. 8, p. 2060-2065, 2003.

ARRIEL, N. H. C.; FIRMINO, P. T.; BELTRÃO, N. E. M. Gergelim: o produtor pergunta, a Embrapa responde. **Brasília DF, Embrapa Informação Tecnológica**. p. 209, 2009.

ASSAF, Y.; JOHANSEN, B. H.; THIEBAUT, S.; M. The role of diffusion MRI in neuroscience NMR. **Biomed**. v. 32, n. 4, p. 37-62, 2019.

Atual concepção de fármaco segundo os paradigmas Ocidental e Oriental: In: R. A. AZEVEDO, G. V. O.; ARAÚJO, A. H. V.; SOUZA, T. A. Aspectos epidemiológicos do acidente vascular encefálico na Paraíba em 2016. **Fisioterapia Brasil**. v.19, n. 5, p. 236- 241, 2018.

BACON, K. B.; HARRISON, J. K. Chemokines and their receptors in neurobiology: perspectives in physiology and homeostasis. **J Neuroimmunol**. v. 104, n. 1, p. 92-97, 2000.

BAYDAR, H.; TURGUT, I.; TURGUT, K. Variation of certain characters and line selection for yield, oil, oleic na linoleic acids in the turkish sesame (*sesamum indicum* L.) populations. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**. v. 23, p. 431-441, 1999.

BENJAMIN, E. J. et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. **Circulation**. v. 135, n. 10, p. 146-603, 2017.

BENSENOR, I. M. et al. Prevalência de acidente vascular cerebral e de incapacidade associada no Brasil: Pesquisa Nacional de Saúde-2013. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**. v. 73, n. 9, p. 746-750, 2015.

BERNAL, H. M. et al. Incidence of hospitalization and mortality due to stroke in young adults, residents of developed regions in Brazil, 2008-2018. **PLoS ONE**. v. 15, n. 11, p. 242- 248, 2020.

BLEICKEN, S. et al. Structural model of active Bax at the membrane. **Mol Cell**. v. 56, n. 4, p. 496-505, 2014.

BONAKDARPOUR, B.; BEESON, P. M.; DEMARCO, A. T.; RAPCSAK, S. Z. Variability in blood oxygen level dependent (BOLD) signal in patients with stroke-induced and primary progressive aphasia. **Neuroimage Clin**. v. 8, p. 87-94, 2015.

BOTS, S. H.; PETERS, S. A. E.; WOODWARD, M. B. M. J. Sex differences in coronary heart disease and stroke mortality: a global assessment of the effect of ageing between 1980 and 2010. **Glob Health**. v. 2, n. 2, 2017.

BRAIT, V. H. et al. Chemokine-related gene expression in the brain following ischemic stroke: no role for CXCR2 in outcome. **Brain Res**. v. 1372, p.169-179, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Informações de saúde (Tabnet): estatísticas vitais: mortalidade geral [Internet]. Brasília, DF; 2008 [atualizado em 25 jan. 2016; citado em 27 ago. 2019]. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>.

BRATTON, S. B.; SALVESEN, G. S. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. **J Cell Sci.** v. 123, p. 3209-14, 2010.

BROUGHTON, B. R.; REUTENS, D. C.; SOBEY, C. G. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. **Stroke.** v. 40, p. 331–339, 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, Jul. 2009.

BULAT, N.; WIDMANN, C. Caspase substrates and neurodegenerative diseases. **Brain Res Bull.** v. 80, n. 4-5, p. 251-267, 2009.

BUSHNELL, C. D. et al. Sex differences in quality of life after ischemic stroke. **Neurology.** v. 82, n. 11, p. 922-931, 2014.

BUSS, R. R. et al. Neuromuscular development in the absence of programmed cell death: phenotypic alteration of motoneurons and muscle. **J Neurosci.** v. 26, n. 52, p. 13413-27, 2006.

BÜTTNER, A. Review: The neuropathology of drug abuse. **Neuropathol Appl Neurobiol.** v. 37, n. 2, p. 118-134, 2011.

BYLICKY, M. A.; MUELLER, G. P.; DAY, R. M. Mechanisms of Endogenous Neuroprotective Effects of Astrocytes in Brain Injury. **Oxid Med Cell Longev.** 2018.

CABRAL, N. L. et al. Epidemiology of cerebrovascular disease in Joinville, Brazil. An institutional study. **Arq Neuropsiquiatr.** v. 55, p. 357-363, 1997.

CALIXTO J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal and Biological Research**. v. 33, p.179-189, 2000.

CARDOSO, M. M. et al. Minocycline treatment and bone marrow mononuclear cell transplantation after endothelin-1 induced striatal ischemia (In Press). **Inflammation**. 2012.

CARLO, D. M. et al. Neuroinflammatory Mechanisms in Ischemic Stroke: Focus on Cardioembolic Stroke, Background, and Therapeutic Approaches. **Int. J. Mol. Sci**. 2020.

CARMICHAEL, S. T. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. **NeuroRx: the Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**. v. 2, n. 3, p. 396-409, Jul. 2005.

CARPENTER, C. R. et al. Thrombolytic therapy for acute ischemic stroke beyond three hours. **J Emerg Med**. v. 40, p. 82-92, 2011.

CARVALHO J. R. R. N. Obtenção de extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) por extração supercrítica: determinação do rendimento global, de parâmetros cinéticos e de equilíbrio e outras variáveis do processo. **Departamento de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas**, 2004.

CARVALHO, J.; MOURA, L.; ROSA, P.; MEIRELES, M. Supercritical fluid extraction from rosemary: Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 35, p. 197-204, 2005.

CASAS, A. I. et al. Calcium-dependent blood-brain barrier breakdown by NOX5 limits postreperfusion benefit in stroke. **J Clin Invest**. v. 129, n. 4, p. 1772-1778, 2019.

CAVALCANTE, J. R. et al. COVID-19 no Brasil: evolução da epidemia até a semana epidemiológica 20 de 2020. v. 29, n. 4, 2020.

CECHINEL-FILHO, V. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**. v. 21, n. 1, 1998.

CEULEMANS, A. G. et al. The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia. **J Neuroinflammation**. v. 7, 2010.

CHANGJUN, Y.; KIMBERLY, E. H.; SYLVAIN, D.; SYLVAIN, D. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. **Am J Physiol Cell Physiol**. v. 316, n. 2, p. 135-153, 2019.

CHEN C, HSU C. **Stroke: an overview**. In: Lisak R., Truong, D. D., Carroll, W. M., Bhidayasiri R (eds) International neurology: a clinical approach. West Sussex, United Kingdom: Wiley-Blackwell, 2009:1.

CHEN, H. S.; QI, S. H.; SHEN, J. G. "One-compoundmulti-target: combination prospect of natural compounds with thrombolytic therapy in acute ischemic stroke. **Current Neuropharmacology**. v. 15, n. 1, p. 134-156, 2017.

CHEN, Z. Q. et al. The role of nitric oxide in stroke. **Med Gas Res**. v. 7, n. 3, p. 194-203, 2017.

CHONG, J.; SACCO, R. Risk factors for stroke, assessing risk, and the mass and high-risk approaches for stroke prevention. In: Gorelick PB, editor. Continuum: Stroke Prevention. Hagerstown, Maryland: Lippincott Williams and Wilkins. pp. 18–34, 2005.

CHU, H. X. et al. Role of CCR2 in inflammatory conditions of the central nervous system. **J Cereb Blood Flow Metab**. v. 34, n. 9, p. 1425-1429, 2014.

CHUAN et al. Signaling pathways involved in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic interventions. **Signal transduction and targeted therapy**. v.7, n. 1, 2022.

CLARK, R. K.; LEE, E. V.; FISH, C. J.; WHITE, R. F.; PRICE, W. J.; JONAK, Z. L.; FEUERSTEIN, G. Z.; BARONE, F. C. Development of tissue damage, inflammation and resolution following stroke: an immunohistochemical and quantitative planimetric study. **Brain Research Bulletin**. v. 31, n. 5, p. 565-572, 1993.

CLEMENS, J. S. Ischemic stroke: experimental models and reality. **Acta Neuropathol**. v. 133, p. 245–261, 2017.

CRAGG, G. M.; SCHEPARTZ, S. A.; SUFFNEZ, M.; GREVER, M. R. The taxol supply crisis: New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. **J. Nat Prod**. v. 56, p. 1657-1668, 1993.

CRUZ, A. S. et al. Comparação de métodos para testar a citotoxicidade “in vitro” de materiais biocompatíveis. **Rev. Saúde Pública**. v.32, n.2, p.153-159, 1998.

CZABOTAR, P. E. et al. Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis. **Cell**. v. 152, n. 3, p. 519-531, 2013.

DAMATA, S. R. R. et al. Perfil epidemiológico dos idosos acometidos por acidente vascular cerebral. **Revista Interdisciplinar**. v. 9, n. 1, p. 107-117, 2016.

DANTAS, L. F. et al. Public hospitalizations for stroke in Brazil from 2009 to 2016. **PLoS ONE**. v. 14, n. 3, 2019.

DEL ZOPPO, G. J. The neurovascular unit in the setting of stroke. **J Intern Med**. v. 267, n. 2, p. 156-171, 2010.

DEREK, B.; HIRANMOY, D. Current Advances in Ischemic Stroke Research and Therapies. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**. v. 1866, n. 4, p. 165-260, 2020.

DIJKSTRA, C. D.; DOPP, E. A.; JOLING, P.; KRAAL, G. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. **Advances in experimental medicine and biology**. v. 186, p. 409-419, 1985.

DIRNAGL, U. Thomas Willis Lecture: Is Translational Stroke Research Broken, and if So, How Can We Fix It ?. **Stroke**. v. 47, n. 8, p. 2148-2153, 2016.

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

DOBKIN, B. H. Clinical practice. Rehabilitation after stroke. **The New England Journal of Medicine**. v. 352, n. 16, p. 1677-1684, abr. 2005.

DOLL, D. N.; BARR, T. L.; SIMPKINS, J. W. Cytokines: their role in stroke and potential use as biomarkers and therapeutic targets. **Aging Dis**. v. 5, n. 5, p. 294-306, 2014.

DÖRING, Y.; DRECHSLER, M.; SOEHNLEIN, O.; WEBER, C. Neutrophils in atherosclerosis: from mice to man. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 35, n. 2, p. 288-295, 2015.

D'ORSI, B, et al. Bax regulates neuronal Ca²⁺ homeostasis. **J Neurosci**. v. 35, n. 4, p. 1706-1722, 2015.

D'ORSI, B, et al. Bok Is Not Pro-Apoptotic But Suppresses Poly ADP-Ribose Polymerase-Dependent Cell Death Pathways and Protects against Excitotoxic and Seizure-Induced Neuronal Injury. **J Neurosci**. v. 36, n 16, p. 4564-4578, 2016.

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.

DU, L. et al. Innate gender-based proclivity in response to cytotoxicity and programmed cell death pathway. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 279, n. 37, p. 38563-38570, set. 2004.

DUGUE, R.; NATH, M.; DUGUE, A.; BARONE, F. C. Roles of pro-and anti-inflammatory cytokines in traumatic brain injury and acute ischemic stroke. **Mechanisms of Neuroinflammation: IntechOpen**. 2017.

DZIEWULSKA, D.; MOSSAKOWSKI, M. J. Cellular expression of tumor necrosis factor α and its receptors in human ischemic stroke. **Clin Neuropathol**. v. 22, n. 1, p. 35-40, 2003.

EASTON, J. D. et al. Definition and evaluation of transient ischemic attack: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular Nursing; and the Interdisciplinary Council on Peripheral Vascular Disease. The American Academy of Neurology affirms the value of this statement as an educational tool for neurologists. **Stroke**. v. 40, n. 6, p. 2276-2293, 2009.

EBINGER, M. et al. Imaging the penumbra—strategies to detect tissue at risk after ischemic stroke. **J Clin Neurosci**. v. 16, p.178-187, 2009.

EKDAHL, C. T.; KOKAIA, Z.; LINDVALL, O. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. **Neuroscience**. v. 158, n. 3, p. 1021-1029, fev. 2009.

ELALI, A.; JEAN, L. N. The Role of Monocytes in Ischemic Stroke Pathobiology: New Avenues to Explore. **Front Aging Neurosci**. v. 8, 2016.

ELKIND, M. S. et al. Tumor necrosis factor receptor levels are associated with carotid atherosclerosis. **Stroke; a Journal of Cerebral Circulation**. v. 33, n. 1, p. 31-37, jan. 2002.

ELLEUCH, M. et al. Quality characteristics of sesame seeds and by-products. **Food Chemistry**. v.2, p. 641-650, 2007.

FEIGIN, V. L. et al. Global Burden of Diseases, Injuries and Risk Factors Study 2013 and Stroke Experts Writing Group. **Lancet Neurol**. v.15, n. 9, p. 913-924, 2016.

FELLOWS, L. E. Pharmaceuticals from traditional medical plants and other: Future prospects: In: J. D. Coombers, ed. New drugs from natural sources. London, IBCv technical Services, 1992.

FENG, Y. et al. Infiltration and persistence of lymphocytes during late-stage cerebral ischemia in middle cerebral artery occlusion and photothrombotic stroke models. **J Neuroinflammation**. v.14, n. 1, 2017.

FINN, G. Atlas de histologia. São Paulo: editora médica panamericana,1997.

FLURI, F.; SCHUHMANN, M. K; KLEINSCHNITZ, C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. **Drug Des Devel Ther**. v. 9, p. 3445–3454, 2015.

FRANÇA, E. B. et al. Causas mal definidas de óbito no Brasil: método de redistribuição baseado na investigação do óbito. **Rev Saúde Pública**. v. 48, n. 4, p. 671-681, 2014.

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, p. 122-132, 2012.

FRICKER, M. et al. Neuronal Cell Death. **Physiol Rev**. v. 98, n. 2, p. 813-880, 2018.

GARCIA-BONILLA, L. et al. Inducible nitric oxide synthase in neutrophils and endothelium contributes to ischemic brain injury in mice. **J Immunol.** v. 193, n. 5, p. 2531-2537, 2014.

GELDERBLOM, M. et al. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. **Stroke.** v. 40, n. 5, p. 1849-1857, 2009.

GILLIES, L. A. et al. Visual and functional demonstration of growing Bax-induced pores in mitochondrial outer membranes. **Mol Biol Cell.** v. 26, n. 2, p. 339-349, 2015.

Global and regional burden of first-ever ischaemic and haemorrhagic stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010.

GÖKHAN, S. et al. Neutrophil lymphocyte ratios in stroke subtypes and transient ischemic attack. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.** v. 17, n. 5, p. 653-657, 2013.

GOMES-LEAL, W. et al. Astrocytosis, microglia activation, oligodendrocyte degeneration, and pyknosis following acute spinal cord injury. **Experimental Neurology.** v. 190, n. 2, p. 456-467, Dec. 2004b.

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

GONZÁLEZ-MARISCAL, L.; TAPIA, R.; CHAMORRO, D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. **Biochim Biophys Acta.** v. 1778, n. 3, p. 729-756, 2008.

GOMES-LEAL, W. Why microglia kill neurons after neural disorders? The friendly fire hypothesis. **Neural Regeneration Research.** v. 14, n. 9, p. 1499-1502, September 2019.

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**. 2012.

GUO, Y. Q. et al. Expression of CCL2 and CCR2 in the hippocampus and the interventional roles of propofol in rat cerebral ischemia/reperfusion. **Exp Ther Med**. v. 8, n. 2, p. 657-661, 2014.

GURUSWAMY, R.; ELALI, A. Complex Roles of Microglial Cells in Ischemic Stroke Pathobiology: New Insights and Future Directions. **Int J Mol Sci**. v. 18, n. 3, 2017.

HAASE, G.; PETTMANN, B.; RAOUL, C.; HENDERSON, C. E. Signaling by death receptors in the nervous system. **Curr Opin Neurobiol**. v.18, n. 3, p. 284-289, 2008.

HAMBURGER, M.; MARSTON, A.; HOSTETMANN, K. Search for new drugs of plant origin. **Advances in Drug Research**. v. 20, p.167-169, 1991.

HAMMOND M, D. et al. CCR2+ Ly6C (hi) inflammatory monocyte recruitment exacerbates acute disability following intracerebral hemorrhage. **J Neurosci**. v. 34, n. 11, p. 3901-3909, 2014.

HARRISON, D. C. et al. Caspase mRNA expression in a rat model of focal cerebral ischemia. **Brain Res Mol Brain Res**. v. 89, n. 1-2, p. 133-146, 2001.

HAZELL, A. S. Excitotoxic mechanisms in stroke: an update of concepts and treatment strategies. **Neurochemistry International**. v. 50, n. 7-8, p. 941-953, jun. 2007.

HE, H. Y.; REN, L.; GUO, T.; DENG, Y, H. Neuronal autophagy aggravates microglial inflammatory injury by downregulating CX3CL1/fractalkine after ischemic stroke. **Neural Regen Res**. v.14, n. 2, p. 280-288, 2019.

HEMELRIJCK, V. A. et al. Postischaemic mild hypothermia inhibits apoptosis in the penumbral region by reducing neuronal nitric oxide synthase activity and thereby preventing endothelin-1-induced hydroxyl radical formation. **Eur J Neurosci.** v. 22, n. 6, p. 1327–1337, 2005.

HERRMANN, M.; EHRENREICH, H. Brain derived proteins as markers of acute stroke: their relation to pathophysiology, outcome prediction and neuroprotective drug monitoring. **Restorative Neurology and Neuroscience** v. 21, n. 3-4, p. 177-190, 2003.

HERTZ, L. Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective. **Neuropharmacology** v. 55, n. 3, p. 289-309, set. 2008.

HOFFMAN, G. E.; MERCHENTHALER, I.; ZUP, S. L. Neuroprotection by ovarian hormones in animal models of neurological disease, **Endocrine**, v. 29, n. 2, p. 217-231, abr. 2006.

HOSSMANN, K. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. **Cellular and Molecular Neurobiology** v. 26, n. 7-8, p. 1057-1083, Nov. 2006.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. A importância das plantas medicinais: Princípios ativos de plantas superiores. Série de textos da Escola de Verão em Química- IV, São Carlos, SP, EdUFSCar, 2003, 152 p.

HU, Q.; XU, J.; CHEN, S.; YANG, F. Antioxidant activity of extracts of black sesame seed (*Sesamum indicum* L.) by supercritical carbon dioxide extraction. **J Agric Food Chem.** v. 52, n. 4, p. 943-947, 2004.

HU, X. et al. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. **Stroke** v. 43, n. 3063–3070, 2012.

HUANG et al. Neuroprotective Effects of Ginseng Phytochemicals: Recent Perspectives. **Molecules** v. 24, n. 16, p. 29-39, 2019.

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

HUGHES, C. E.; NIBBS, R. J. B. A guide to chemokines and their receptors. **FEBS J** v. 285, n. 16, p. 2944-2971, 2018.

HURN, P. D.; BRASS, L. M. Estrogen and stroke: a balanced analysis. **Stroke; a Journal of Cerebral Circulation.** v. 34, n. 2, p. 338-341, fev. 2003.

HUI XU. et al. Neuroprotective Phytochemicals in Experimental Ischemic Stroke: Mechanisms and Potential Clinical Applications. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity.** v. 2021, p. 1-45, 2021.

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

INDAVE, B. I. et al. Risk of stroke in prescription and other amphetamine-type stimulants use: A systematic review. **Drug Alcohol Rev.** v. 37, n. 1, p. 56-69, 2018.

JAMARKATTEL-PANDIT, N. et al. Neuroprotective Effect of Defatted Sesame Seeds Extract against in vitro and in vivo Ischemic Neuronal Damage. **Planta Med.** v. 76, p. 20-26, 2010.

JEONG, S. M. et al. Effect of seed roasting conditions on the antioxidant activity of defatted sesame meal extracts. **J Food Sci.** v. 69, p. 377–381, 2004.

JI, X. Mild hypothermia diminishes oxidative DNA damage and pro-death signaling events after cerebral ischemia: a mechanism for neuroprotection. **Front. Biosci.** v. 12, p. 1737–1747, 2007.

JICKLING, G. C. et al. Hemorrhagic transformation after ischemic stroke in animals and humans. **J Cereb Blood Flow Metab.** v. 34, n. 2, p. 185-199, 2014.

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

JICKLING, G. C.; SHARP, F. R. Improving the translation of animal ischemic stroke studies to humans. **Metab Brain Dis.** v. 30, p. 461–467, 2015.

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.

JIN, W. N. et al. Depletion of microglia exacerbates postischemic inflammation and brain injury. **J Cereb Blood Flow Metab.** v. 37, n. 6, p. 2224-2236, 2017.

JIN, X.; LIU, J.; LIU, W. Early ischemic blood brain barrier damage: a potential indicator for hemorrhagic transformation following tissue plasminogen activator (tPA) thrombolysis ?. **Curr Neurovasc Res.** v. 11, n.3, p. 254-262, 2014.

JIN, X.; SUN, Y.; XU, J.; LIU, W. Caveolin-1 mediates tissue plasminogen activator-induced MMP-9 up-regulation in cultured brain microvascular endothelial cells. **J Neurochem.** v. 132, p. 724–730, 2015.

JIANG, C., WU, W.; DENG, Y.; GE, j. Modulators of microglia activation and polarization in ischemic stroke. **Mol Med Rep.** v. 21, n. 5, p. 2006- 2018, 2020.

JOHNSTON, S. C. et al. Prevalence and knowledge of transient ischemic attack among US adults. **Neurology.** v. 60, n. 9, p. 1429-1434, 2003.

JOHNSTON, S. C.; MENDIS, S.; MATHERS, C. D. Global variation in stroke burden and mortality: estimates from monitoring, surveillance, and modelling. **Lancet Neurol.** v. 8, n. 4, p. 345-354, 2009.

JUSTIN, D. S. et al. Ischemic and Hypoxic Conditioning: Potential for Protection of Vital Organs. **Exp Physiol.** v. 104, n. 3, p. 278–294, 2019.

KAPRAL, M. K.; WANG, H.; MAMDANI, M.; TU, J. V. Effect of socioeconomic status on treatment and mortality after stroke. **Stroke**. v. 33, n. 1, p. 268-273, 2002.

KARNATH, H. O.; SPERBER, C.; RORDEN, C. Mapping human brain lesions and their functional consequences. **Neuroimage**. v.165, p.180-189, 2018.

KEANEY, J.; CAMPBELL, M. The dynamic blood-brain barrier. **FEBS J**. v. 282, n. 21, p. 4067-4079, 2015.

KEEP, R. F. et al. Blood-brain barrier function in intracerebral hemorrhage. **Acta Neurochir**. v. 105, p. 73-77, 2008.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**. v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.

KETHEE; P, et al. Changes in glutamate transporter expression in mouse forebrain areas following focal ischemia. **Brain Res**. v. 1418, p. 93-103, 2011.

KHAN, et al. Phenyl aldehyde and propanoids exert multiple sites of action towards cell membrane and cell wall targeting ergosterol in *Candida albicans*. **AMB Express**. v. 3, n. 54, 2013.

KIERNAN, J. A. Histological and Histochemical Methods. Second Edition, 1990.

KIM, D. Y. W. J. et al. Phytochemicals in ischemic stroke. **Neuromolecular Medicine**. v. 18, n. 3, p. 283-305, 2016.

KIM, J. Y. et al. Inflammation after Ischemic Stroke: The Role of Leukocytes and Glial Cells. **Exp Neurobiol**. v. 25, n. 5, p. 241-251, 2016.

KIM, J. Y.; KAWABORI, M.; YENARI, M. A. Innate inflammatory responses in stroke: mechanisms and potential therapeutic targets. **Curr Med Chem**. v. 21, n. 18, p. 2076-2097, 2014.

KIM, S. R. et al. The protective effects of sesaminol glycosides against cognitive deficits and oxidative stress induced by β -amyloid protein in mice. **Physiol Funct Dis Risk Reduct.** v. 3, 2003.

KIRAN, K.; ASAD, M. Wound healing activity of *Sesamum indicum* L seed and oil in rats. **Indian J Exp Biol.** v. 46, n. 11, p. 777-782, 2008.

KISO, Y. Antioxidative roles of sesamin, a functional lignan in sesame seed, and its effect on lipid- and alcohol-metabolism in the liver: a DNAmicroarray study. **Biofactors.** v. 21, p. 191–196, 2004.

KOCA, H.; BOR, M.; OZDEMIR, F.; TURKAN, I. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. **Environmental and Experimental Botany.** v. 60, p. 344-351, 2007.

KRISHNAMURTHI, R. V. et al. Global Burden of Diseases, Injuries, Risk Factors Study 2010 (GBD 2010). GBD Stroke Experts Group. **Lancet Glob Health.** v. 1, n. 5, 2013.

KUAN, C. Y.; ROTH, K. A.; FLAVELL, R. A.; RAKIC, P. Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. **Trends Neurosci.** v. 23, n. 7, p. 291-297, 2000.

LAI, T. W.; ZHANG, S.; WANG, Y. T. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. **Prog Neurobiol.** v. 115, p. 57-88, 2014.

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.

LALLUKKA, T. et al. Trends in Diagnosis-Specific Work Disability Before and After Stroke: A Longitudinal Population-Based Study in Sweden. **J Am Heart Assoc.** v. 7, n. 1, 2018.

LAMBERTSEN, K. L.; BIBER, K.; FINSEN, B. Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. **J Cereb Blood Flow Metab.** v. 32, n. 9, p. 1677-1698, 2012.

LANG, J. T.; MCCULLOUGH, L. D. Pathways to ischemic neuronal cell death: are sex differences relevant ?. **Journal of Translational Medicine.** v. 6, p. 33-33, 2008.

LASSÈGUE, B.; CLEMPUS, R. E. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 285, n. 2, p. 277- 297, 2003.

LEE, S. Y. Effect of sesaminol glucosides on β -amyloid-induced PC12 cell death through antioxidant mechanisms. **Neurosci Res.** v. 52, p. 330-341, 2005.

LEE, S. Y. Inhibitory effect of sesaminol glucosides on lipopolysaccharide-induced NF-kB activation and target gene expression in cultured rat astrocytes. **Neurosci Res.** v. 56, p. 204-212, 2006.

LEGG, L.; LANGHORNE, P. Rehabilitation therapy services for stroke patients living at home: systematic review of randomised trials. **Lancet.** v. 363, n. 9406, p. 352-356, jan. 2004.

LEWÉN, A.; MATZ, P.; CHAN, P. H. Free radical pathways in CNS injury. **J. Neurotrauma.** v. 17, p. 871–890, 2000.

LI, H. et al. Histological, cellular and behavioral assessments of stroke outcomes after photothrombosis-induced ischemia in adult mice. **BMC Neurosci.** v. 15, 2014.

LI, J.; MCCULLOUGH, L. D. Sex differences in minocycline-induced neuroprotection after experimental stroke. **J Cereb Blood Flow Metab.** v. 29, n. 4, p. 670-674, 2009.

LI, M. et al. Astrocyte-derived interleukin-15 exacerbates ischemic brain injury via propagation of cellular immunity. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 114, n. 3, 2017.

LI, P. et al. Adoptive regulatory T-cell therapy protects against cerebral ischemia. **Ann Neurol.** v. 74, n. 3, p. 458-457, 2013.

Li, Y. et al. Treatment with ginsenoside rb1, a component of panax ginseng, provides neuroprotection in rats subjected to subarachnoid hemorrhage-induced brain injury. **Acta Neurochir.** 2011.

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

LIEBNER, S. et al. Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. **Acta Neuropathol.** v. 135, n. 311-336, 2018.

LIESZ, A. et al. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. **Nat Med.** v. 15, n. 2, p. 192-199, 2009.

LIESZ, A.; HU, X.; KLEINSCHNITZ, C.; OFFNER, H. Functional role of regulatory lymphocytes in stroke: facts and controversies. **Stroke.** v. 46, n. 5, p. 1422-1430, 2015.

Lillie, R.D. Histopathologic Technic and Pratical Histochemistry. Third Edition, 1965.

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

LIU F. et al. Mitochondria in Ischemic Stroke: New Insight and Implications. **Aging Dis.** v. 9, n. 5, p. 924-937, 2018.

LIU, P. et al. NO modulates P-selectin and ICAM-1 mRNA expression and hemodynamic alterations in hepatic I/R. **Am J Physiol.** v. 275, n. 6, 1998.

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, May. 2003.

LODDICK, S. A.; TURNBULL, A. V.; ROTHWELL, N. J. Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**. v. 18, n. 2, p. 176-179, fev. 1998.

LÖFMARK, U.; HAMMARSTRÖM, A. Education-related differences in case fatality among elderly with stroke. **Neuroepidemiology**. v. 31, n. 1, p. 21-27, 2008.

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

LOZOYA, X. Investigación y Ciencia, 254, (1997), Apud: R. A. Yunes, V. Cechinel Filho, Breve análise histórica da Química de Plantas Medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas Ocidental e Oriental: In: R. A. Yunes, J. B. Calixto, Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó-SC, Argus, 2001, p. 523.

LU H. et al. Induction and imaging of photothrombotic stroke in conscious and freely moving rats. **J Biomed Opt**. v. 19, 2014.

LUO, C. X. et al. Interaction of nNOS with PSD-95 negatively controls regenerative repair after stroke. **J Neurosci**. v. 34, n. 40, p. 13535-48, 2014.

Silva, M. C.; Carvalho, J. C. T. Plantas Medicinais: In: J. C. T. Carvalho, **Fitoterápicos. Antiinflamatórios**. Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, SP, Tecmedd, 2004, 480 p.

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

MASSON, A. O.; NASCIMENTO, M. H. M.; LOMBELLO, C. B. Análise comparativa de diferentes métodos de citotoxicidade in vitro. In: XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, Uberlândia, MG, 2014. Anais...p.2484-2488. Ref.723. Disponível em: http://www.canal6.com.br/cbeb/2014/artigos/cbeb2014_submission_723.pdf. Acesso em:13 de julho de 2016.

MÁZALA, D. A.; GRANGE, R. W.; CHIN, E. R. The role of proteases in excitation-contraction coupling failure in muscular dystrophy. **Am J Physiol Cell Physiol**. v. 308, n. 1, p. 33-40, 2015.

MCCULLOUGH, L. D. et al. Ischemic nitric oxide and poly (adp-ribose) polymerase-1 in cerebral ischemia: male toxicity, female protection. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 25, n. 4, p. 502-512, abr. 2005.

MCDONOUGH, A. et al. Ischemia/Reperfusion Induces Interferon-Stimulated Gene Expression in Microglia. **J Neurosci**. v. 37, n. 34, p. 8292-8308, 2017.

Medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas MERGENTHALER, P.; DIRNAGL, U.; MEISEL, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. **Metab Brain Dis**. v. 19, p. 151–167, 2004.

MESQUITA, J.B.R; AZEVEDO, B.M; CAMPELO, A. R; FERNANDES, C.N.V; VIANA T.V.A. Crescimento e produtividade da cultura do gergelim (*Sesamum indicum* L.) sob diferentes níveis de irrigação. **Irriga, Botucatu**, v. 18, n. 2, p. 364-365, 2013.

MICHEAU, O.; TSCHOPP, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. **Cell**. v.114, n. 2, p. 181-190, 2003.

MICHELLE, P. L.; LIEBESKIND, M. P. H. D. Imaging of Ischemic Stroke. American Academy of Neurology. **Continuum**. v. 22, n. 5, p. 1399–1423, 2016.

MILLER, N. R. et al. Estrogen can act via estrogen receptor alpha and beta to protect hippocampal neurons against global ischemia-induced cell death. **Endocrinology**. v. 146, n. 7, p. 3070-3079, Jul. 2005.

Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise de Situação de Saúde. Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022. Brasília (DF); 2011. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

MOAZZAMI, A. A.; ANDERSSON, R. E.; KAMAL-ELDIN, A. HPLC analysis of sesaminol glucosides in sesame seeds. **J Agric Food Chem**. v. 54, p. 633–638, 2006.

MOHD. M. K. et al. Sesamin attenuates behavioral, biochemical and histological alterations induced by reversible middle cerebral artery occlusion in the rats. **Chemico-Biological Interactions**. v. 183, p. 255–263, 2010.

MONTANA, V. et al. Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes. **The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience**. v. 24, n. 11, p. 2633-2642, Mar. 2004.

MONTARI, M. A. Química Nova. v. 18; n. 1, p. 56-64, 1995.

MOZAFFARIAN, D. et al. **Heart Disease and Stroke Statistics-2016**. American Heart Association Statistics Committee., Stroke Statistics Subcommittee. **Circulation**. v. 133, n. 4, p. 447-454, 2016.

MULLEN, R. J.; BUCK, C. R.; SMITH, A. M. Neun, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. **Development (Cambridge, England)**. v. 116, n. 1, p. 201-211, set. 1992.

MURPHY, P. M. Chemokines and chemokine receptors. **Clinical Immunology: Elsevier**. p. 157–170, 2019.

NAHIRNEY, P. C.; REESON, P.; BROWN, C. E. Ultrastructural analysis of blood-brain barrier breakdown in the peri-infarct zone in young adult and aged mice. **J Cereb Blood Flow Metab**. v. 36, n 2, p. 413-425, 2016.

NEUMANN, J. et al. Microglia provide neuroprotection after ischemia. **FASEB J**. v. 20, n. 6, p. 714-716, 2006.

NUGEM, R. et al. Stroke Care in Brazil and France: National Policies and Healthcare Indicators Comparison. **Journal of Multidisciplinary Healthcare**. 2020.

OCIDENTAL E ORIENTAL: In: R. A. Yunes, J. B. Calixto, Plantas Medicinais sob a ótica da O'COLLINS, V. E. et al. 1,026 experimental treatments in acute stroke. **Ann Neurol**. v. 59, p. 467-477, 2006.

O'DONNELL, M. J. et al. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. interstroke investigators. **Lancet**. v. 376, n. 9735, p. 112-123, 2010.

OHENE-FREMPONG, K. et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. **Blood**. v. 91, n. 1, p. 288- 294, 1998.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde: CID-10. 8ª ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo; 2012.

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. **J Neurol.** v. 258, n. 4, p. 677-685, 2011.

OVBIAGELE; MAI N. NGUYEN-HUYNH. Stroke Epidemiology: Advancing Our Understanding of Disease Mechanism and Therapy. **Neurotherapeutics.** v.8, n. 3, p. 319-329, 2011.

OVERMAN, J. J. et al. A role for ephrin-A5 in axonal sprouting, recovery, and activity-dependent plasticity after stroke. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.109, n. 33, 2012.

PASSOS, V. M. A. et al. Consistent declining trends in stroke mortality in Brazil: mission accomplished ?. **Arq. Neuropsiquiatr.** v. 74, n. 5, p. 376-381, 2016.

PEKNY, M.; NILSSON, M. Astrocyte activation and reactive gliosis. **Glia.** v. 50, n. 4, p. 427-434, jun. 2005.

PERIN, A.; CRUVINEL, J. D.; SILVA, W. J. Desempenho do gergelim em função da adubação NPK e do nível de fertilidade do solo. **Acta Scientiarum Agronomy, Maringá.** v. 32, n.1, p. 93-98, 2010.

PERRY, V. H. Stress primes microglia to the presence of systemic inflammation: implications for environmental influences on the brain. **Brain, Behavior, and Immunity.** v. 21, n. 1, p. 45-46, jan. 2007.

PERRY, V.; ANDERSSON, P.; GORDON, S. Macrophages and inflammation in the central nervous system. **Trends in Neurosciences.** v. 16, n. 7, p. 268-273, Jul. 1993.

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

POONAM, S.; JAYASHRI, D. S. In vitro hemolysis of human erythrocytes — by plant extracts with antiplasmodial activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v.74, p. 239-243, 2001.

PRAKASH R, CARMICHAEL ST. Blood-brain barrier breakdown and neovascularization processes after stroke and traumatic brain injury. **Curr Opin Neurol**. v. 28, n. 6, p. 556-564, 2015.

RAMAN, D.; SOBOLIK-DELMARE, T.; RICHMOND, A. Chemokines in health and disease. **Exp Cell Res**. v. 317, n. 5, p. 575-589, 2011.

RAMIRO, L.; SIMATS, A.; GARCÍA-BERROCOSO, T.; MONTANER, J. Inflammatory molecules might become both biomarkers and therapeutic targets for stroke management. **Ther Adv Neurol Disord**. v. 11, 2018.

RANSOHOFF, R. M. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? **Nat Neurosci**. v. 19, n. 987–991, 2016.

RANSOHOFF, R. M.; PERRY, V. H. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 119-145, 2009.

RANSOHOFF, R. M.; TRETTEL, F. Chemokines and chemokine receptors in brain homeostasis. **Front Cell Neurosci**. v. 9, 2015.

REMPE, R. G.; HARTZ, A. M. S.; BAUER, B. Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: Versatile breakers and makers. **J Cereb Blood Flow Metab**. v. 36, n. 9, p. 1481-507, 2016.

RENOLLEAU, S. et al. Specific caspase inhibitor q-vd-oph prevents neonatal stroke in p7 rat: a role for gender, **Journal of Neurochemistry**, v. 100, n. 4, p. 1062-1071, fev. 2007.

RESENDE, R. W. S.; AMORIM, F. C.; SOUSA, E. J. S. Epidemiological Profile of Patients Admitted for Stroke in Belém-PA between 2016 to 2020. **Revista Amazônia Science & Health**. v. 9, n. 1, 2021.

REYES, R.; CARDEÑES, B.; MACHADO-PINEDA, Y.; CABAÑAS, C. Tetraspanin CD9: A Key Regulator of Cell Adhesion in the Immune System. **Front Immunol**. v.9, 2018.

RHODIN, A. A. Conservation International do Brasil. Prioridades de conservação <http://conservation.org.br/como/index.php?id=8>, acesso em 12/05/2005.

RICHARD, L. J. et al. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke. **J Neuroinflammation**. v.16, n.142,2019.

ROGER, V. L. et al. Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. **Circulation**. v. 123, n. 4, 2011.

ROOME, R. B. et al. A reproducible Endothelin-1 model of forelimb motor cortex stroke in the mouse. **J Neurosci Methods**. v. 233, p. 34-44, 2014.

RYMNER, M. M.; AKHTAR, N.; MARTIN, C.; SUMMERS, D. Management of acute ischemic stroke: time is brain. **Mo Med**. v. 107, p. 333-337, 2010.

SACCHETTI, M. L. Is it time to definitely abandon neuroprotection in acute ischemic stroke ?. **Stroke**. v. 39, p. 1659-1660, 2008.

SAIRANEN, T. et. al. Evolution of cerebral tumor necrosis factor-alpha production during human ischemic stroke. **Stroke**. v. 32, n. 8, p. 1750-1758, 2001.

SALVADOR-GALLEGO, R. et al. Bax assembly into rings and arcs in apoptotic mitochondria is linked to membrane pores. **EMBO J.** v. 35, n. 4, p. 389-401, 2016.

SAMIRA, N. M. Profile of deaths from unspecified stroke after investigation of garbage codes in 60 cities in Brazil, 2017. **Rev Bras Epidemiol.** 2019.

SANDERS, R. D.; JORGENSEN, M. E.; MASHOUR, G. A. Perioperative stroke: a question of timing? **Br J Anaesth.** v. 115, p. 11–13, 2015.

SANKAR, D.; SAMBANDAM, G.; RAO, M. R.; PUGALENDI, K. V. Impact of sesame oil on nifedipine in modulating oxidative stress and electrolytes in hypertensive patients. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.** v. 13, n. 107, 2004.

SANTOS, K. R.; LUQUINI, V. C.; FAGUNDES, T. R. Epidemiologia dos óbitos relacionados a Acidente Vascular Cerebral ocorridos no Estado do Paraná: uma comparação entre os anos de 2008 e 2018. **Research, Society and Development.** v. 9, n. 11, 2020.

SATTLER, R.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. **Mol Neurobiol.** v.24, n. 1-3, p.107-129, 2001.

SCHILLING, M. et al. Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: An investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. **Exp. Neurol.** v. 196, p. 290–297, 2005.

SCHMIDT, M. H. et al. Acidente vascular cerebral e diferentes limitações: uma análise interdisciplinar. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR.** v. 23, n. 2, p. 139-144, 2019.

SCHWARTZ, H.; OLLILAINEN, V.; PIIRONEV, V.; LAMPI, A. M. Tocoherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. **Journal of Food composition and Analysis**. v. 21, p.152-161, 2008.

SEDER, D. B.; MAYER, S. A. Critical care management of subarachnoid hemorrhage and ischemic stroke. **Clinics in Chest Medicine**. v. 30, n. 1, p. 103-122, p. 103-122, Mar. 2009.

SHAHIDI, F.; LIYANA-PATHIRANA, C. M.; WALL, D. S. Antioxidant activity of white and black sesame seeds and their hull fractions. **Food Chemistry**, v.99, p.478-483, 2006.

SHEN, C. C. Protective effect of nicotinamide on neuronal cells under oxygen and glucose deprivation and hypoxia/reoxygenation. **J Biomed Sci**. v. 11, p. 472–481, 2004.

SHENBIN, X. et al. Glial Cells: Role of the Immune Response in Ischemic Stroke. **Front. Immunol**. 2020.

SHI, Y. et al. Rapid endothelial cytoskeletal reorganization enables early blood-brain barrier disruption and long-term ischaemic reperfusion brain injury. **Nat Commun**. v.7, p.105-123, 2016.

SHIRLEY, R.; ORD, E. N.; WORK, L. M. Oxidative stress and the use of antioxidants in stroke. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**. v. 3, n. 3, p. 472–501, 2014.

SILVA, G. S. et al. Gender differences in outcomes after ischemic stroke: role of ischemic lesion volume and intracranial large-artery occlusion. **Cerebrovasc Dis**. v. 30, n. 5, p. 470-475, 2010.

SILVA, G. S.; ROCHA, E. C. A.; PONTES-NETO, O. M.; MARTINS, S. O. Stroke Care Services in Brazil. **Journal of Stroke Medicine**. v. 1, n. 1, p. 51-54, 2018.

SILVA, M. C; CARVALHO, J. C. T. Plantas Medicinais: In: J. C. T. Carvalho, **Fitoterápicos Antiinflamatórios**. Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, SP, Tecmedd, 480 p., 2004.

SINNING, C.; WESTERMANN, D.; CLEMMENSEN, P. Oxidative stress in ischemia and reperfusion: current concepts, novel ideas and future perspectives. **Biomark Med.** v.11, n. 11, p. 11031-1040, 2017.

SINNING, C.; WESTERMANN, D.; CLEMMENSEN, P. Oxidative stress in ischemia and reperfusion: current concepts, novel ideas and future perspectives. **Biomark Med.** v. 11, n. 11, p. 11031–11040, 2017.

SOHRABJI, F.; PARK, M, J.; MAHNKE, A. H. Sex differences in stroke therapies. **J Neurosci Res.** v. 95, n. 1-2, p. 681-691, 2017.

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.

STOLP, H. B. Neuropoietic cytokines in normal brain development and neurodevelopmental disorders. **Mol Cell Neurosci.** v. 53, p. 63-68, 2013.

STOWE, A. M. et al. Neutrophil elastase and neurovascular injury following focal stroke and reperfusion, **Neurobiology of Disease**, v. 35, n. 1, p. 82-90, Jul. 2009.

SUJA, K. P. et al. Antioxidant efficacy of sesame cake extract in vegetable oil protection. **Food Chemistry.** v. 84, p. 393-400, 2004.

SUN, M. S. et al. Free radical damage in ischemia-reperfusion injury: an obstacle in acute ischemic stroke after revascularization therapy. **Oxidative medicine and cellular longevity.** v. 17, 2018.

TAKANO, T; OBERHEIM, N; COTRINA, M. L; NEDERGAARD, M. Astrocytes and ischemic injury. **Stroke**. 2009.

TAYLOR, R. A. et al. TGF- β 1 modulates microglial phenotype and promotes recovery after intracerebral hemorrhage. **J Clin Invest**. v.127, n. 1, p. 280-292, 2017.

TAYLOR, T. N. et al. Lifetime cost of stroke in the united states. **Stroke; a Journal of Cerebral Circulation**. v. 27, n. 9, p. 1459-1466, set. 1996.

TAYLOR, T. N. et al. Lifetime cost of stroke in the United States. **Stroke**. v. 27, p. 1459-1466, 1996.

THIEBAUT, S. M. et al. Revisiting Disconnection Syndromes. **Cereb Cortex**. v. 25, n. 12, p. 4812-27, 2015.

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.

TIRSCHWELL, D. L. et al., Association of cholesterol with stroke risk varies in stroke subtypes and patient subgroups. **Neurology**. v. 63, n. 10, p. 1868-1875, 2004.

TRUELSEN, T. et al. Causes of death data in the Global Burden of Disease estimates for ischemic and hemorrhagic stroke. **Neuroepidemiology**. v. 45, n. 3, p. 152-160, 2015.

TSAI, L. K. et al. Mesenchymal stem cells primed with valproate and lithium robustly migrate to infarcted regions and facilitate recovery in a stroke model. v. 42, n. 10, p. 2932-2939, 2011.

TSAI, N. W. et al. Leucocyte apoptosis in patients with acute ischaemic stroke. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. v. 37, n. 9, p.884-888, 2010.

TU, X. K. et al. Spatio-temporal distribution of inflammatory reaction and expression of TLR2/4 signaling pathway in rat brain following permanent focal cerebral ischemia. **Neurochem Res.** v. 35, n. 8, p. 1147-1155, 2010.

UNICAMP. Disponível no endereço (<http://www.cpqba.unicamp.br>), acesso em 07/07/2006.

United Nations Office on Drugs and Crime World Drug Report 2017. [(accessed on 26 February 2019)]; Available online: https://www.unodc.org/wdr2017/field/WDR_2017.

VAGNEROVA, K.; KOERNER, I. P.; HURN, P. D. Gender and the injured brain. **Anesthesia and Analgesia.** v. 107, n. 1, p. 201-214, Jul. 2008.

VAN DER Worp, H. B.; DE HAAN, P.; MORREMA, E.; KALKMAN, C. J. Methodological quality of animal studies on neuroprotection in focal cerebral ischaemia. **J Neurol.** v. 252, n. 9, p. 1108-1114, 2005.

VAN EXEL, E. et al Inflammation and stroke: the leiden 85-plus study. **Stroke; a Journal of Cerebral Circulation.** v. 33, n. 4, p. 1135-1138, abr. 2002.

VANNUCCI, S. J. et al. Experimental stroke in the female diabetic, db/db, mouse, **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 21, n. 1, p. 52-60, jan. 2001.

VOGELGESANG, A.; BECKER, K. J.; DRESSEL, A. Immunological consequences of ischemic stroke. **Acta Neurol Scand.** v. 129, n. 1, p. 1-12, 2014.

WANG, H. et al. Portrait of glial scar in neurological diseases. **Int J Immunopathol Pharmacol.** v. 31, 2018.

WEI, M. C. et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. **Science**. v. 292, n. 5517, p. 727-730, 2001.

WEN, Y. et al. Estrogen attenuates nuclear factor-kappa b activation induced by transient cerebral ischemia. **Brain Research**. v. 1008, n. 2, p. 147-154, May. 2004.

WESTON, R. M.; JONES, N. M.; JARROTT, B.; CALLAWAY, J. K. Inflammatory cell infiltration after endothelin-1-induced cerebral ischemia: histochemical and myeloperoxidase correlation with temporal changes in brain injury. **J Cereb Blood Flow Metab**. v. 27, n. 1, p. 100-114, 2007.

WILLARD, S. S.; KOOCHKEPOUR, S. Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways. **Int J Biol Sci**. v. 9, n. 9, p. 948-59, 2013.

WISE, P. M. et al. Estradiol is a protective factor in the adult and aging brain: understanding of mechanisms derived from in vivo and in vitro studies. **Brain Research. Brain Research Reviews**. v. 37, n. 1-3, p. 313-319, Nov. 2001.

WON, S. J.; KIM, J. E.; CITTOLIN-SANTOS, G. F.; SWANSON, R. A. Assessment at the single-cell level identifies neuronal glutathione depletion as both a cause and effect of ischemia-reperfusion oxidative stress. **J Neurosci**. v. 35, n. 18, p. 7143-7152, 2015.

WU, Q. J.; TYMIANSKI, M. Targeting NMDA receptors in stroke: new hope in neuroprotection. **Molecular brain**. v.11, n. 1, 2018.

XIE, L., YANG, S. H. Interaction of astrocytes and T cells in physiological and pathological conditions. **Brain Res**. p. 63-73, 2015.

XING, H. et al. Neuroprotective Effects of Ginseng. **Molecules**. 2019.

YANAGISAWA, M. et al. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels. **J Hypertens.** v. 6, n. 4, ,1988.

YANG, X.; CHU, H.; TANG, Y.; DONG, Q. The role of connexin43 in hemorrhagic transformation after thrombolysis in vivo and in vitro. **Neuroscience.** v. 329, p. 54-65, 2016.

YILMAZ, G.; ARUMUGAM, T. V.; STOKES, K. Y.; GRANGER, D. N. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. **Circulation.** v. 113, n. 17, p. 2105-2112, 2006.

YOSHIKAWA, T. et al. Ginsenoside Rb1 reduces neurodegeneration in the peri-infarct area of a thromboembolic stroke model in non-human primates. **J Pharmacol Sci.** v.107, n. 1, p. 32-40, 2008.

YOUSUF, S. et al. Resveratrol exerts its neuroprotective effect by modulating mitochondrial dysfunctions and associated cell death during cerebral ischemia. **Brain Res.** v. 1250, p. 242–253, 2009.

YUAN, M. et al. Sex differences in the response to activation of the poly (adp-ribose) polymerase pathway after experimental stroke. **Experimental Neurology.** v. 217, n. 1, p. 210-218, May. 2009.

YUAN, Y. et al. Anti-inflammatory effects of Edaravone and Scutellarin in activated microglia in experimentally induced ischemia injury in rats and in BV-2 microglia. **BMC Neurosci.** v.15, 2014.

YUNES, R. A.; CECHINEL, F. V. Breve análise histórica da Química de Plantas Medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas Ocidental e Oriental: In: R. A. Yunes, J. B. Calixto, Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó-SC, Argus, 523 p., 2001.

ZAMORANO, S. et al. A BAX/BAK and cyclophilin D-independent intrinsic apoptosis pathway. **PLoS One**. v. 7, n. 6, p. 377- 382, 2012.

ZAREMBA, J.; LOSY, J. Early TNF-alpha levels correlate with ischaemic stroke severity. **Acta Neurol Scand**. v. 104, n. 5, p. 288-295, 2001.

ZHOU, M.; WANG, C. M.; YANG, W. L.; WANG, P. Microglial CD14 activated by iNOS contributes to neuroinflammation in cerebral ischemia. **Brain Res**. v. 1506, p. 105-114, 2013.

ANEXO I- Protocolo de Imunohistoquímica

Foram seguidos os protocolos de imunomarcacão padronizados, utilizados com o método DAB-níquel (GOMES-LEAL et al., 2004) estabelecidos em estudos prévios.

Células gliais (astrócitos, micróglias) reativas no centro e periferia de lesão, bem como a perda neuronal no ambiente lesionado foram identificados por anticorpos específicos à cada tipo celular.

A etapa à identificação obedeceu ao seguinte protocolo:

As lâminas com secções encefálicas foram retiradas do freez -20 °C e, em seguida, colocadas na estufa (Brasdonto, BrClave) a 40 °C por 20 minutos para depois serem delimitadas com Pap-PEN (Invitrogen), de modo a concentrar por mais tempo as gotas de soluções que por cima delas foram despejadas. Por conseguinte, as mesmas foram lavadas em PBS por 5 minutos para remoção do excesso de tissue-tek e imersas em tampão borato (0,2M; pH 9,0; Nuclear) à temperatura constante de 65°C, por 25 minutos. Após esta fase, as lâminas foram secas por 20 minutos à temperatura ambiente e lavada em PBS por 5 minutos para que fossem submetidas ao tratamento com solução de metanol + peróxido de hidrogênio – 100 ml de metanol absoluto (QEEL) para cada 1ml de H₂O₂ (Merck) sob agitação constante. Passada essa fase, as lâminas foram lavadas por 3 vezes (5 minutos cada) em solução PBS/Tween (Sigma-Aldrich®) e incubadas por 1h em soro normal de cabra a 10% para GFAP; soro normal de cavalo a 10% para ED1 e NeuN, sempre em câmara úmida. Passada este período de tempo, o anticorpo primário GFAP, ED1 e NeuN foram incubados durante 24 horas. Após a incubação em anticorpo primário, as secções foram lavadas por três vezes (5 minutos cada) na solução de PBS/Tween® e incubadas por 2h no anticorpo secundário biotinilado cabra anti-coelho (1:1000, GFAP) e anti-camundongo feito em cavalo (1:500, ED1; 1:200, NeuN). Após esse período, três lavagens foram realizadas (5 minutos cada) em PBS/Tween® para que as secções fossem incubadas no complexo Avidina-Biotina Peroxidase (Vector®, kit ABC Vectastain®) por 2h. Finalizando, as secções foram lavadas 4 vezes (4 tempos de 5 minutos cada) antes da revelação utilizando diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich). Após lavagem as secções foram incubadas em uma solução contendo 250ml de PB 0,1M (pH 7,2–7,4), juntamente com 125mg de DAB e 130µl de H₂O₂ e, posteriormente, monitoradas em microscópio óptico até que a intensidade da reação

seja adequada. Após o término da revelação as secções foram lavadas em PB 0,1M (pH 7,2–7,4) e desidratadas em gradientes de álcool /xileno para a montagem com lamínulas e Entellan (Merck).

Anexo II- Metodos de Coloração: Hematoxilina e Eosina, Tricrômico de Gomori, Reativo de shiff (P. A. S) e Violeta de Cresila

1. Hematoxilina- eosina

A) Corantes e Soluções

- 1) Hematoxilina de Harris
- 2) Eosina
- 3) Álcool 95% acidificado com ácido clorídrico a 1%

B) Fixador: Formol a 10% tamponado.

C) Método de Coloração:

- 1) Desparifinar;
- 2) Lavar em água de torneira por 5 minutos;
- 3) Corar pela hematoxilina de Harris por 5 a 15 minutos;
- 4) Lavar em água de torneira por 5 minutos e limpar as lâminas;
- 5) Diferenciar em álcool- ácido até que os núcleos fiquem bem diferenciados;
- 6) Lavar em água de torneira por 10 minutos;
- 7) Corar pela Eosina por 3- 5 minutos;
- 8) Lavar em água destilada;
- 9) Desidratar;
- 10) Montar.

D) Resultados:

- Azul: núcleo
- Rosa: Citoplasma

2. Tricrômico de Gomori

A) Corantes e Soluções:

- 1) Hematoxilina férrica de Weigert
- 2) Tricrômico-Gomori
- 3) Ácido acético a 0,5%

B) Fixador: Formol a 10% tamponado.

C) Método de Coloração:

- 1) Desparafinar;
- 2) Corar pela Hematoxilina férrica de Weigert por 10 minutos;
- 3) Corar pelo tricromico de Gomori por 15 a 20 minutos;
- 4) Diferenciar em solução de ácido acético a 0,5% por 2 minutos;
- 5) Lavar em água destilada por 5 minutos;
- 6) Desidratar em álcool 95%, absoluto e clarear em xilol;
- 7) Montar.

D) Resultados:

- Vermelho: Fibras musculares
- Verde claro: Fibras colágenas
- Preto: Núcleo

3. Reativo de Schiff (P.A.S.) - ácido periódico- Schiff

A) Corantes e Soluções:

- 1) Ácido periódico 1%
- 2) Reativo de Schiff
- 3) Hematoxilina de Harris

B) Fixador: Formol a 10% tamponado.

C) Método de Coloração:

- 1) Desparafinar;
- 2) Lavar em água destilada por 5 minutos;
- 3) Tratar pelo ácido periódico de 5 a 10 minutos (não reaproveitar)
- 4) Lavar em 2 a 3 frascos de água destilada
- 5) Tratar pelo Reativo de Schiff (filtrar antes de usar) de 15 a 20 minutos;
- 6) Lavar em água de torneira por 10 minutos;
- 7) Corar pela Hematoxilina de Harris por 1 a 5 minutos;
- 8) Lavar bem em água destilada;
- 9) Desidratar;
- 10) Montar.

D) Resultados:

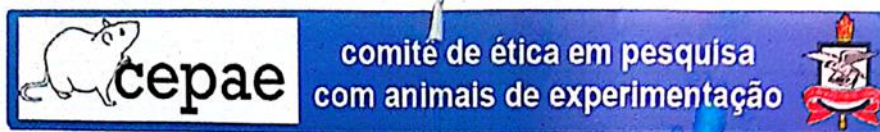
-Vermelha: Membrana basal

4. Violeta de cresila (secções de 50 µm)

A) Metodo de coloração

- 1) Solução de H₂O_d/ ácido acético- 12 minutos
- 2) Solução de violeta de cresila- 30 minutos
- 3) Álcoos 70%, 80% e 90%- 1 minuto em cada
- 4) Álcool absoluto I- 1 minuto
- 5) Alcool absoluto II- 1 minuto
- 6) Xilou I e Xilou II- 1 minuto em cada
- 7) Montagem em entelan e lamínula

Anexo III- Parecer/ CEPAE



PARECER BIO137-13

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: 09/2013 a 06/2017

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 (200 ratos Wistar) 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, 10 de julho de 2013

Wallace Gomes Leal
Prof. Dr. Wallace Gomes Leal
Coordenador do Lab. de Neuroproteção
e Neuroregeneração Experimental
ICB-UFPA

RECEBIDO EM!
18-07-2013
Reginaldo