



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR
COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
CENTRO REGIONAL DE CIÊNCIAS NUCLEARES DO NORDESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS E
NUCLEARES

ELAINE VASCONCELOS DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DO EFEITO NEUROPROTETOR DO ÁCIDO
ROSMARÍNICO EM LESÕES DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL:
correlações anátomo-funcionais**

Recife

2020

ELAINE VASCONCELOS DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DO EFEITO NEUROPROTETOR DO ÁCIDO
ROSMARÍNICO EM LESÕES DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL:
correlações anátomo-funcionais**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Tecnologias Energéticas e Nucleares para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Aplicações de
radioisótopos na indústria e medicina.

Orientadora: Profa. Dra. Mércia Liane de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Malamut

Recife

2020

Catálogo na fonte
Bibliotecário Gabriel Luz, CRB-4 / 2222

S237a Santos, Elaine Vasconcelos dos.
Avaliação pré-clínica do efeito neuroprotetor do ácido rosmarínico em lesões de isquemia e reperfusão cerebral: correlações anátomo-funcionais / Elaine Vasconcelos dos Santos – Recife, 2020.
75 f.: figs., tabs., abrev. e siglas.

Orientadora: Profa. Dra. Mércia Liane de Oliveira.
Coorientador: Prof. Dr. Carlos Malamut.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2020.
Inclui referências e anexos.

1. Tecnologias Energéticas e Nucleares. 2. Ácido rosmarínico. 3. Acidente vascular cerebral. 4. Tomografia por emissão de positrons. 5. FDG-18F. I. Oliveira, Mércia Liane de (Orientadora). II. Malamut, Carlos (Coorientador). III. Título.

UFPE

621.4837 CDD (22. ed.)

BCTG / 2020-287

ELAINE VASCONCELOS DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DO EFEITO NEUROPROTETOR DO ÁCIDO
ROSMARÍNICO EM LESÕES DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL:
CORRELAÇÕES ANÁTOMO-FUNCIONAIS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Tecnologias Energéticas e Nucleares para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em: 28 / 02 /2020

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mércia Liane de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Carlos Malamut
Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear

Profa. Dra. Fabiana Farias de Lima Guimarães
Centro Regional de Ciências nucleares do Nordeste

Profa. Dra. Simone Cristina Soares Brandão
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Edvane Borges da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Elvis Joacir de França
Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu marido, meus familiares e amigos pelo apoio e paciência.

À Brígida, meu co-piloto. Obrigada por tudo, Bribri!

Às minhas companheiras de jornada do CDTN, Jousie, Natane e Isabella, pela ajuda, companhia e incentivo.

Ao Bruno, Guilherme, Léo e Zaca pelas vezes que nos ajudaram a carregar as blindagens.

Às amigas do CRCN, Naty e Raquel que mesmo de longe atendiam aos meus gritos de socorro.

À minha filhinha Helena que me atrapalhou bastante rrsrsrs.

Aos meus orientadores, Mércia e Malamut, por todos os ensinamentos.

À todos os professores que contribuíram com suas sugestões e correções.

À Nilvânia e Kalydja, secretárias do PROTEN.

Agradeço à FACEPE pelo recurso financeiro disponibilizado.

Ao Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco, ao Programa de Pós-graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, ao Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste e ao Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear.

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho.

RESUMO

O acidente vascular cerebral (AVC) é uma doença grave, com altas taxas de mortalidade e morbidade. O uso de trombolíticos e a trombectomia endovascular têm auxiliado no prognóstico de pacientes. Entretanto, ainda não existe terapia preventiva ou curativa eficiente o bastante para estacionar efetivamente os efeitos progressivos da doença. Por esta razão, vários grupos de pesquisa tem se dedicado ao estudo de potenciais agentes terapêuticos e neuroprotetores. Os polifenóis vêm se destacando principalmente pela atividade antioxidante e anti-inflamatória, características estas que estão diretamente associadas à patogênese do AVC. Neste contexto, um composto polifenol bastante estudado tem sido o ácido rosmarínico (AR), cuja atuação como neuroprotetor foi observada em modelos de diferentes doenças neurológicas. O objetivo deste estudo foi avaliar o possível efeito neuroprotetor preventivo do ácido rosmarínico em modelo murino de AVC isquêmico por meio da utilização da tomografia por emissão de pósitrons (PET) associada ao radiofármaco FDG-18F, pela determinação de área cerebral infartada e por teste comportamental para determinação de déficit neurológico. Foram utilizados 6 grupos experimentais: camundongos saudáveis, sham tratados com salina, sham tratados com AR, isquêmicos tratados com salina e isquêmicos tratados com AR. O tratamento com AR iniciou-se 7 dias antes da indução da isquemia cerebral global. Foram administradas doses de 20mg/kg/dia, intragastricamente. Imagens por microPET foram adquiridas e associadas ao estudo comportamental para avaliação de déficit neurológico. Após a eutanásia dos animais, os cérebros foram coletados e corados com 2, 3, 5 – cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) para determinação de área necrótica em cada grupo. Foi realizada avaliação semi-quantitativa da captação cerebral de FDG-18F para verificar o efeito do ácido rosmarínico em diferentes regiões do cérebro e o mapeamento paramétrico estatístico das imagens por meio do software SPM. Resultados obtidos por meio da coloração de TTC demonstraram que apenas o grupo de animais que sofreram a isquemia apresentaram regiões de infarto evidentes e que o pré-condicionamento com AR promoveu neuroproteção do insulto isquêmico ($p < 0,01$). A análise semi-quantitativa PET FDG-18F revelou decréscimo significativo de captação no grupo isquêmico veículo quando comparado ao grupo sadio, em 6 das 14 regiões analisadas, que foram, estriado ($p=0,0118$, hemisfério esquerdo; $p=0,0046$ hemisfério direito), córtex ($p=0,0068$), hipocampo esquerdo ($p=0,0078$), tálamo ($p=0,0451$), colículo superior ($p=0,0254$) e colículo inferior ($p=0,0086$). De forma interessante, 3 dessas regiões (estriado, colículo superior e inferior) pareceram não ter sido afetadas nos animais isquêmicos tratados com AR, que tiveram captação semelhante ao grupo sadio. Esse resultado sugere efeito neuroprotetor do

AR nessas regiões, corroborando os resultados do TTC. Além disso, resultados obtidos com uso da ferramenta SAMIT no ambiente do MATLAB demonstraram que a técnica PET FDG-18F foi eficiente em diagnosticar o dano neurológico provocado pelo modelo BCCAO, uma vez que os grupos isquêmicos mostraram captação reduzida em relação ao sadio ($P_{\text{FWE}} < 0,05$; $P < 0,0001$). Com base nestes resultados, podemos sugerir que o pré-condicionamento com AR foi capaz de reduzir a área de infarto cerebral, tendo portanto, efeito neuroprotetor em modelo de AVC global.

Palavras-chave: Ácido rosmarínico. Acidente vascular cerebral. Tomografia por emissão de positrons. FDG-18F.

ABSTRACT

Stroke is a serious disease, with high rates of mortality and morbidity. The use of thrombolytics and endovascular thrombectomy have helped in the prognosis of patients. However, there is still no preventive or curative therapy efficient enough to effectively stop the progressive effects of the disease. For this reason, several research groups have been dedicated to the study of potential therapeutic and neuroprotective agents. Polyphenols have stood out mainly for their antioxidant and anti-inflammatory activity, characteristics that are directly associated with the pathogenesis of stroke. A polyphenol compound that has been extensively studied has been rosmarinic acid (RA), whose performance as a neuroprotective agent has been observed in models of different neurological diseases. Thus, the objective of this study was to evaluate the possible preventive neuroprotective effect of rosmarinic acid in a murine model of ischemic stroke through the use of positron emission tomography (PET) associated with the radiopharmaceutical FDG-18F, by determining the infarcted brain area and by behavioral testing to determine neurological deficit. The methodology consisted of the use of 6 experimental groups of animals, being: healthy mice, sham treated with saline, sham treated with RA, ischemic treated with saline and ischemic treated with RA. RA treatment started 7 days before the induction of global cerebral ischemia. Doses of 20mg/kg/day were administered intragastrically. MicroPET images were acquired and associated with a behavioral study to assess neurological deficit. After euthanizing animals, the brains were collected and stained with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) to determine the necrotic area in each group. For the analysis of the MicroPET images obtained, a semi-quantitative evaluation of the brain uptake of FDG-18F was performed to verify the effect of rosmarinic acid in different regions of the brain and the statistical parametric mapping of the images using the SPM software. Results obtained through TTC staining demonstrated that only the group of animals that suffered the ischemia had evident infarction regions and, interestingly, the preconditioning with RA promoted neuroprotection of the ischemic insult ($p < 0.01$). The semi-quantitative PET FDG-18F analysis revealed a significant decrease in uptake in the vehicle ischemic group when compared to the healthy group, in 6 of the 14 regions analyzed, which were striatum ($p = 0.0118$, left hemisphere; $p = 0.0046$ right hemisphere), cortex ($p = 0.0068$), left hippocampus ($p = 0.0078$), thalamus ($p = 0.0451$), upper colliculus ($p = 0.0254$) and lower colliculus ($p = 0.0086$). Interestingly, 3 of these regions (striatum, upper and lower colliculus) appeared to have not been affected in ischemic animals treated with RA, which had similar uptake to the healthy group. This result suggests a neuroprotective effect of RA in these regions, corroborating the

results of TTC. In addition, results obtained using the SAMIT tool in the MATLAB environment demonstrated that the PET FDG-18F technique was efficient in diagnosing the neurological damage caused by the BCCAO model, since the ischemic groups showed reduced uptake in relation to the healthy one (PFWE<0.05; P<0.0001). Based on these results, we can suggest that pre-conditioning with RA was able to reduce the area of cerebral infarction, thus having a neuroprotective effect in a global stroke model.

Keywords: Rosmarinic acid. Stroke. Positron emission tomography. FDG-18F.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama esquemático ilustrando os principais fatores envolvidos na fisiopatologia do AVC isquêmico.....	20
Figura 2 - Mecanismos de dano inflamatório no AVC	22
Figura 3 - Mecanismos de dano neuronal por excitotoxicidade.....	23
Figura 4 - Estrutura química do ácido rosmarínico	25
Figura 5 - Representação do modelo de oclusão bilateral de artéria carótida comum.	28
Figura 6 - Representação esquemática do processo de aquisição do radiofármaco e imagens PET.....	30
Figura 7 - Estrutura molecular do FDG-18F	31
Figura 8 - Síntese do FDG-18F por substituição nucleofílica.	32
Figura 9 - Esquema do planejamento experimental	37
Figura 10 - Animal anestesiado e imobilizado para a cirurgia (A). Animal com as carótidas clipadas (B)	39
Figura 11 - Esquema do sistema <i>balance beam</i>	42
Figura 12 - Sistema <i>balance beam</i> em uso.....	42
Figura 13 - Processo de preparação da coloração por TTC.....	44
Figura 14 - Imagem sendo analisada no software <i>Image J</i>	45
Figura 15 - Percentual de área necrótica após isquemia e reperfusão.	47
Figura 16 - Captação de FDG-18F normalizada pela captação do cérebro inteiro.	53
Figura 17 - Mapeamento cerebral de imagens PET FDG-18F.....	55
Figura 18 - Captação de FDG-18F normalizada pela captação do cérebro inteiro.	56
Figura 19 - Mapa de contrastes das diferenças estatísticas relevantes entre os grupos isquêmicos x sadios.....	59
Figura 20 - Imagens de animais com sequelas de isquemia cerebral	61
Figura 21 - Comparação entre as médias de escore neurológico	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Escore de severidade de déficit neurológico	43
Tabela 2 - Captação regional de FDG-18F (SUV) normalizada pelo cérebro inteiro	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	Ácido rosmarínico
AVC	Acidente vascular cerebral
BHE	Barreira hemato-encefálica
CAT	Catalase
CDTN	Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
CH ₃ CN	Acetonitrila
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
COX-2	Ciclooxigenase-2
eNOS	Sintase de óxido nítrico endotelial
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDG-18F	Fludesoxiglicose Flúor-18
FEW	<i>Family-wise error</i>
Fe^{2+}	Ferro oxidado
Fe^{3+}	Ferro reduzido
FWHM	<i>Full width at half maximum</i>
GPx	Glutathione peroxidase
HO_2^{\bullet}	Radical peroxila
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
IL-1 β	Interleucina 1- β
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
I/R	Isquemia e reperfusão
keV	Quiloelétron-volt
Ki	Taxa de captação de glicose
K ₂ CO ₃	Carbonato de potássio
microPET	Tomografia por emissão de pósitrons dedicada a pequenos animais
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MBq	Megabequerel
MLEM	<i>Maximum Likelihood Expectation Maximization</i>
MRGlu	Captação absoluta de glicose

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NADPH oxidase	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase reduzida
NF- $\kappa\beta$	Fator nuclear kappa beta
NMDA	N-metil D-Aspartato
nNOS	Sintase de óxido nítrico neuronal
NOS	Óxido nítrico sintase
Nrf-2	Fator nuclear eritróide
NSS	<i>Neurological severity score</i> / Escore de severidade de déficit neurológico
ON	Óxido nítrico
O_2^-	Ânion superóxido
$O_2^{\bullet-}$	Radical superóxido
$ONOO^-$	Peroxinitrito
O_2	Dioxigênio
OH^\bullet	Radical hidroxila
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
PGE2	Prostaglandina E-2
PI	Pressão intracraniana
pMCAO	Oclusão de artéria cerebral média permanente
ROIs	Regiões de interesse
SAMIT	<i>Small Animal Molecular Imaging Toolbox</i>
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
SPECT	Tomografia computadorizada por emissão de fóton único
SPM	<i>Statistical parametric mapping</i> / Mapeamento paramétrico estatístico
SUS	Sistema Único de Saúde
SUV	<i>Standardized uptake value</i> / Valor de captação padronizado
tBCCAO	Oclusão de artéria carótida comum bilateral transiente
TIV	Trombólise intravenosa
tMCAO	Oclusão de artéria cerebral média transiente
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
tPAs	Ativadores de plasminogênio tecidual
TTC	2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio
2VO	Oclusão de dois vasos

2-DG-6-P

2-deoxi-D-glicose-6-fosfato

3D

Tridimensional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	Acidente vascular cerebral isquêmico	19
2.1.1	Inflamação	21
2.1.2	Excitotoxicidade.....	22
2.1.3	Estresse oxidativo.....	24
2.2	Ácido rosmarínico	25
2.3	Modelo animal de isquemia cerebral.....	27
2.4	Tomografia por emissão de pósitrons de pequenos animais	28
2.4.1	FDG-18F	31
2.4.2	Análise semi-quantitativa de captação do FDG-18F.....	32
2.4.3	Análise baseada em voxels – Mapeamento paramétrico estatístico.....	33
2.5	Teste comportamental para determinação de déficit neurológico.....	34
2.6	Determinação de área cerebral infartada	34
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1	Animais.....	36
3.2	Preparação e administração do ácido rosmarínico	36
3.3	Modelo animal de isquemia cerebral.....	37
3.4	Protocolo de aquisição de imagens microPET FDG-18F.....	39
3.5	Processamento e análise das imagens microPET FDG-18F	40
3.5.1	Análise baseada em ROIs.....	40
3.5.2	Mapeamento paramétrico estatístico	40
3.6	Teste Comportamental.....	41
3.6.1	Reprodução do aparato para teste comportamental <i>balance beam</i>	41
3.6.2	Teste comportamental <i>Balance beam</i>	42
3.7	Coloração com 2, 3, 5 – cloreto de trifeniltetrazólio.....	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1	Avaliação da área de infarto cerebral após isquemia e reperfusão.	46
4.2	Avaliação semi-quantitativa do efeito regional do ácido rosmarínico sobre a captação cerebral de FDG-18F	49
4.3	Avaliação do efeito do ácido rosmarínico sobre a captação cerebral de FDG-18F por análise baseada em voxels.....	58

4.4	Avaliação do efeito do ácido rosmarínico sobre o índice de severidade de déficit neurológico	60
5	CONCLUSÃO	64
6	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	65
	REFERÊNCIAS	66
	ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS DO CENTRO DE DESENVOLVIMENTO DA TECNOLOGIA NUCLEAR.....	72
	ANEXO B – CÁLCULO DO NÚMERO AMOSTRAL.....	73
	ANEXO C – TABELA DE DISTRIBUIÇÃO NORMAL PADRÃO (Z)	75

1 INTRODUÇÃO

A isquemia é caracterizada pela redução do suprimento sanguíneo em regiões onde o fluxo arterial foi interrompido, impedindo o fornecimento de oxigênio e substratos metabólicos, como a glicose.

A isquemia e o posterior restabelecimento do fluxo sanguíneo desencadeiam uma série de eventos no organismo que resultam na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs) e grande quantidade de radicais livres como óxido nítrico (ON), ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxinitrito ($ONOO^-$), capazes de causar danos aos tecidos biológicos e provocar efeitos deletérios, como inflamação e morte celular, culminando em falência do órgão. Esses danos são descritos como lesões de isquemia e reperfusão (I/R).

Em condições saudáveis, o organismo possui mecanismos de combate aos efeitos nocivos das EROs e ERNs. No entanto, em situações em que as lesões são demasiado extensas, os mecanismos de defesa do organismo tornam-se insuficientes e a integridade dos tecidos biológicos pode ser comprometida.

No cérebro, a falta de oxigenação pode provocar danos, incluindo disfunção sensorial motora, desordens de orientação espacial, perda de memória e deficiências de aprendizagem, em alguns casos, irreversíveis (FONDEVILA; BUSUTTIL; KUPIEC-WEGLINSKI, 2003; LIU; SUN; LI, 2016; MIGUEL; MENEZES; ARAÚJO, 2012).

Estratégias para tratamento do acidente vascular cerebral (AVC) vêm sendo ostensivamente estudadas nas últimas décadas. No entanto, apesar dos efeitos positivos da revascularização via ativadores de plasminogênio tecidual ou trombectomia endovascular na fase aguda, ainda não existe terapia curativa ou preventiva bem estabelecida que possa estacionar os efeitos progressivos da isquemia e reperfusão.

Em estudos de novas abordagens terapêuticas, compostos naturais conhecidos como polifenóis, vêm se destacando como promissores agentes de neuroproteção, principalmente por promoverem efeito antioxidante e anti-inflamatório, já que esses fatores estão comprovadamente ligados à fisiopatologia do AVC (BARON, 2018; SINGH; KRISHAN; SHRI, 2018).

O ácido rosmarínico é um desses compostos. Ele pode ser encontrado em abundância na natureza e seus efeitos benéficos em termos de neuroproteção, ação antioxidante e anti-inflamatória já foram comprovados, através de ensaios histológicos e bioquímicos, em modelos

in vitro, e em modelos de animais (FONTELES et al., 2016; RAMALHO et al., 2014; ZHANG et al., 2017).

O uso de modelos animais é de grande importância, especialmente no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento, já que estas precisam ser comprovadamente efetivas e seguras para que sejam administradas em humanos.

Apesar de sua evidente atividade biológica, ainda não há consenso sobre o modo de atuação do ácido rosmarínico e sobre a melhor forma de entrega ao sistema nervoso central, sendo necessários mais estudos.

O objetivo desse trabalho foi avaliar se o ácido rosmarínico, administrado oralmente, seria capaz de pré-condicionar o cérebro, minimizando os efeitos danosos da injúria de isquemia e reperfusão cerebral, por meio da avaliação de alterações anatomo-funcionais em modelo global de isquemia e reperfusão cerebral em camundogos tratados e não tratados. A intenção do estudo foi acrescer subsídio básico para desenvolvimento de uma nova abordagem terapêutica na prática clínica, dentro do escopo da medicina preventiva.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O AVC é um grave problema de saúde pública com altas taxas de mortalidade e invalidez e custos altíssimos aos serviços de saúde em todo o mundo. A doença ocorre quando o suprimento de oxigênio e glicose é interrompido por rompimento ou obstrução de vasos sanguíneos comprometendo a homeostase celular e assim provocando efeitos deletérios como excitotoxicidade, estresse oxidativo, inflamação e morte celular. São classificados como hemorrágicos ou isquêmicos, sendo este último o mais comum, representando 85 a 90% dos casos. A prevalência do AVC isquêmico está relacionada a problemas como aterotrombose, proveniente de ruptura de placa aterosclerótica, condições associadas ao estresse oxidativo, como hipertensão, diabetes e dislipidemia e também a fatores relacionados ao estilo de vida, como o tabagismo e sedentarismo (ALLEN; BAYRAKTUTAN, 2009; KHOSHNAMEH et al., 2017; MIGUEL; MENEZES; ARAÚJO, 2012; RODRIGO et al., 2013).

Atualmente, as duas principais abordagens terapêuticas utilizadas na prática clínica para tratamento do AVC são a administração intravenosa de ativadores de plasminogênio tecidual (tPA) e a trombectomia endovascular. Os tPAs também conhecidos como trombolíticos são enzimas que catalisam a ativação da plasmina, auxiliando no processo de fibrinólise (quebra dos polímeros de fibrina formados durante a coagulação sanguínea). É considerada a estratégia mais efetiva e usual da prática clínica, ainda que sua taxa de recanalização seja de apenas cerca de 30%. A trombólise aumenta o risco de hemorragia subsequente e só pode ser utilizada em uma janela de tempo específica de no máximo 4,5 h após o início dos sintomas (MAJID, 2014; SUN et al., 2017).

A trombectomia endovascular ou cateterismo cerebral consiste em inserir um cateter através de uma artéria da perna até atingir a região de obstrução no cérebro. É indicada para uma população restrita de pacientes que apresentam obstrução em vaso calibroso e com boa circulação colateral. Os melhores resultados são obtidos quando a intervenção é feita em até 6 h ou, no máximo, em até 24 h após o início dos sintomas. Em 2015, a eficiência do método foi comprovada a partir de 6 ensaios clínicos randomizados, em que a taxa de recanalização precoce após a trombectomia foi de mais de 80%, superando em muito a trombólise intravenosa (TIV). Ainda assim, mais da metade dos pacientes tratados não alcançou independência funcional devido principalmente ao núcleo isquêmico já estar em tamanho avançado no momento da intervenção (6 h após o início dos sintomas). A trombectomia é invasiva e, no Brasil, apesar de aprovada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), ainda não é adequadamente reembolsada pelo SUS (Sistema Único de Saúde) (Talamone Rose.

Novidades no tratamento do Acidente Vascular Cerebral. *Jornal da USP*. 2017. Disponível em: <<http://jornal.usp.br/atualidades/novidades-no-tratamento-do-acidente-vascular-cerebral/>>. Acesso em 06/07/2019).

Ambas as estratégias citadas acima podem promover a reperfusão dos vasos afetados e reverter o quadro do paciente na fase aguda. No entanto, ainda não há tratamento que seja comprovadamente eficiente em interromper a cadeia de eventos danosos que perdura muito tempo após o momento da reperfusão (BARON, 2018).

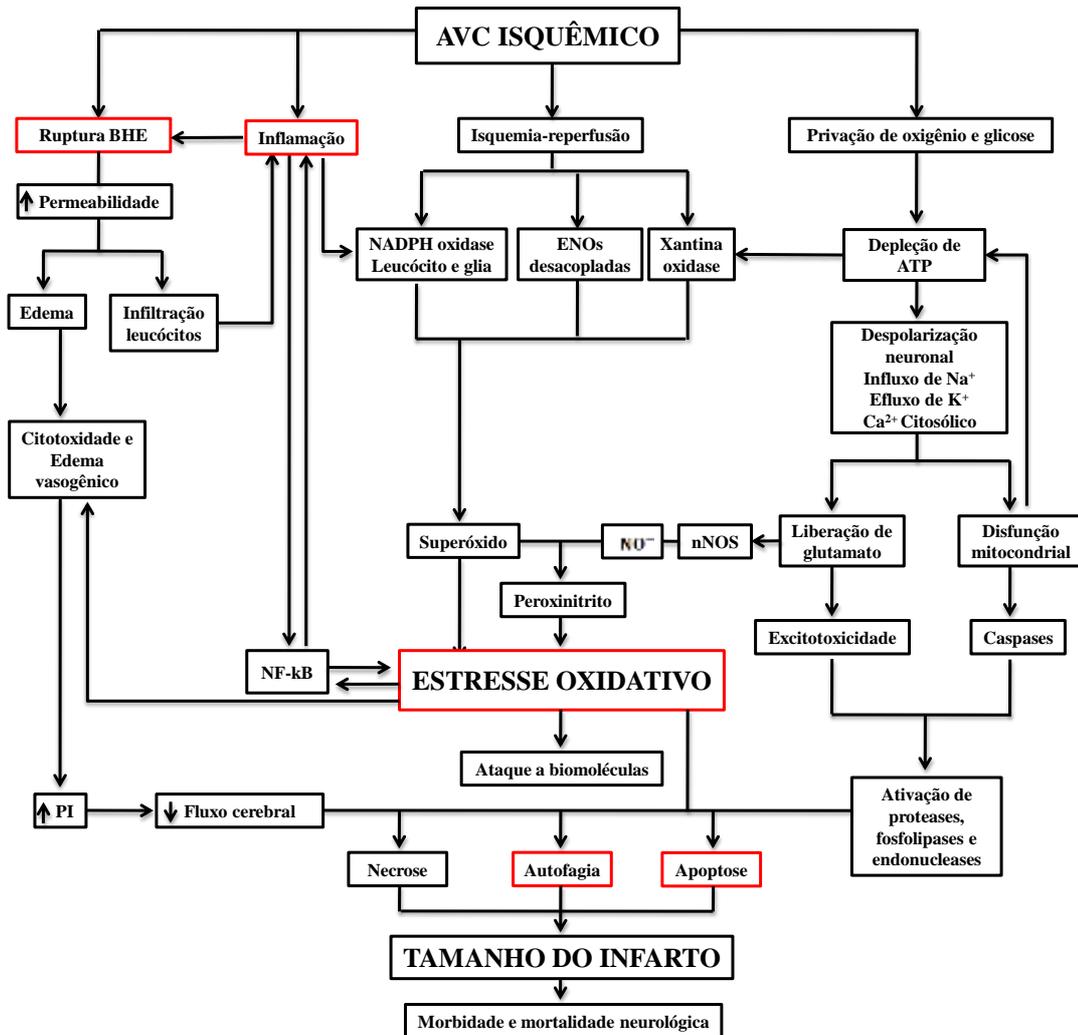
2.1 Acidente vascular cerebral isquêmico

O AVC é caracterizado histologicamente por um núcleo isquêmico que corresponde à área de infarto, cercada por uma região referida como área de penumbra ou peri-infarto. No núcleo isquêmico, a morte celular por necrose e excitotoxicidade ocorre dentro de minutos devido à redução extrema do fluxo sanguíneo. Já na região de penumbra, a morte celular ocorre por apoptose e inflamação mediadas pelo estresse oxidativo e tende a ser mais lenta devido ao suporte da circulação colateral. Na isquemia, uma cascata de eventos metabólicos resulta na formação de EROs e ERNs, que participam do processo de injúria à região de penumbra. Tal região tem sido objeto de pesquisas na tentativa de estacionar a progressão do núcleo isquêmico, fornecendo subsídio para a sobrevivência das células na região peri-infartada. Entre algumas abordagens não farmacológicas em estudo, estão a administração de oxigenação normobárica (oxigenação à pressão ambiente), hipotermia e estimulação sensorial. Entre as farmacológicas pode-se citar a utilização do NA-1/Tat-NR2B9c que é um agente inibidor das interações entre a proteína PSD95 com os receptores de glutamato. O efeito benéfico se dá pela interferência em uma via pró-morte celular (BARON, 2018).

Tymianski registrou em sua revisão sobre a combinação de neuroproteção com tratamento endovascular que estudos de neuroproteção realizados isoladamente representam um grande desafio, muitas vezes demandando um grande número de indivíduos avaliados, o que se aplica tanto a estudos clínicos quanto pré-clínicos. A heterogeneidade dos acidentes vasculares cerebrais, a velocidade de progressão, a incerteza sobre a fração recuperável do cérebro, as janelas de tempo de intervenção e as baixas taxas de recanalização espontânea estão entre os obstáculos a serem superados para obtenção de resultados satisfatórios. Segundo ele, a utilização de imagens da região de penumbra poderia ser utilizada como critério de base para a escolha de pacientes com prognóstico semelhante como forma de maximizar o efeito do tratamento e torná-lo evidente (TYMIANSKI, 2017).

Na Figura 1 estão sintetizados os principais eventos desencadeados pelo AVC isquêmico, incluindo o estresse oxidativo, com destaque em vermelho para os principais alvos de intervenção terapêutica (RODRIGO et al., 2013).

Figura 1 – Diagrama esquemático ilustrando os principais fatores envolvidos na fisiopatologia do AVC isquêmico.



Fonte: adaptado de RODRIGO et al (2013).

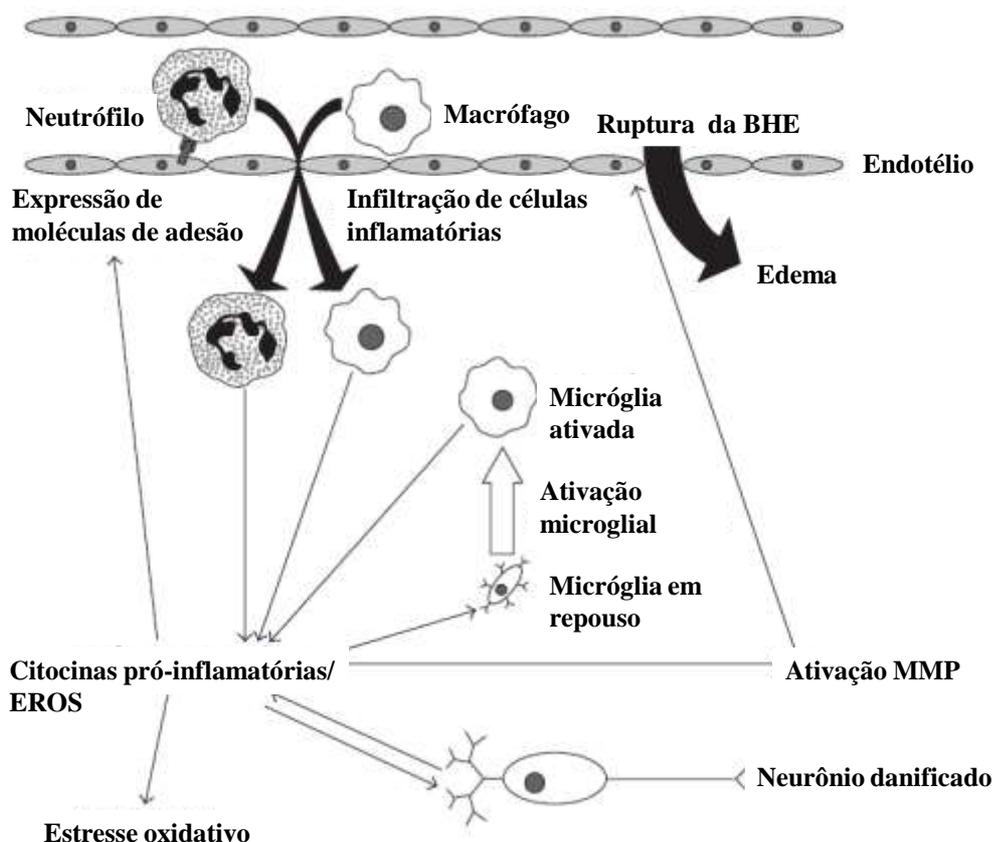
A ruptura da BHE causa edema e infiltração de leucócitos, que aumentam a inflamação. Proteínas, lipídios e DNA são atacados pelas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROS e ERNs). A privação de oxigênio e glicose leva à depleção de adenosina trifosfato (ATP), resultando na liberação de glutamato e disfunção mitocondrial. O estresse oxidativo ativa as vias de apoptose, necrose e autofagia, que determinam o tamanho final do infarto. BHE – barreira hematoencefálica; PI – pressão intracraniana; eNOS – sintase de óxido nítrico endotelial; nNOS – sintase de óxido nítrico neuronal; NADPH oxidase - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase reduzida.

2.1.1 Inflamação

O processo inflamatório é iniciado após a reperfusão, com a liberação de citocinas e quimiocinas que recrutam células inflamatórias para a região do dano. Tais células secretam substâncias que podem acumular em níveis tóxicos, promovendo estresse oxidativo e ativação de metaloproteinases de matriz (MMPs), que degradam a matriz extracelular, favorecendo o rompimento da barreira hematoencefálica e formação de edema (MAJID, 2014).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória que atua na fase inicial do processo de dano pós reperfusão. Estudos demonstram que a tentativa de bloquear ou reduzir a produção da molécula no organismo possa caracterizar uma estratégia de tratamento direta para as complicações do AVC. Yoon et al., descreveram a atuação de um análogo da talidomida (3,6' ditiotalidomida) na supressão da neuroinflamação por meio da inibição da síntese de TNF- α em modelo de AVC isquêmico em camundongos (YOON et al., 2013). Anticorpos monoclonais ligados a receptores TNF também foram usados por Sumbria et al., como forma de inibir a ação de TNF- α , atravessando a BHE e reduzindo significativamente o volume de infarto em camundongos submetidos a oclusão de artéria cerebral média transiente (tMCAO) (MAJID, 2014). O fator nuclear kappa beta (NF- $\kappa\beta$) é um complexo proteico envolvido na resposta celular ao estresse, que participa de processos inflamatórios ativados pelo TNF- α . Luan et al., demonstraram que o tratamento com ácido rosmarínico reduziu edema e dano tecidual em ratos diabéticos submetidos a tMCAO pela inibição da ativação do NF- $\kappa\beta$ pelo TNF- α (LUAN et al., 2013). Na Figura 2, podem ser observados mecanismos de dano inflamatório no AVC.

Figura 2 – Mecanismos de dano inflamatório no AVC



Fonte: adaptado de MAJID (2014).

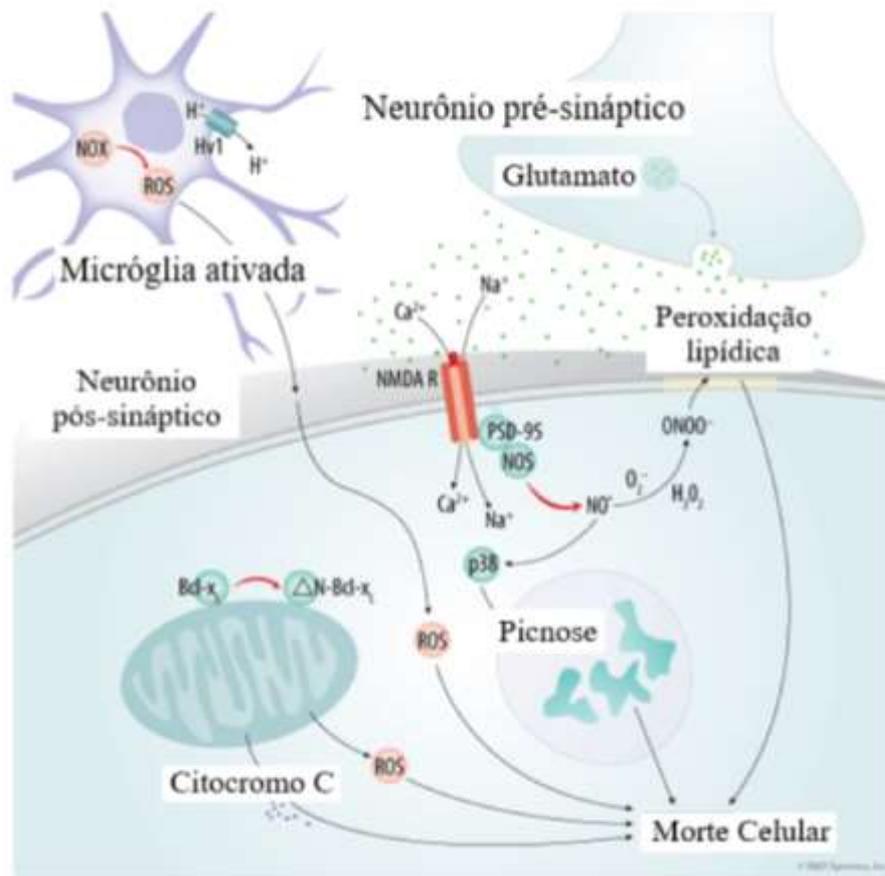
Citocinas pró-inflamatórias e EROs liberadas por neurônios danificados levam à ativação da micróglia e à expressão de moléculas de adesão celular nas células endoteliais e células inflamatórias migratórias. A infiltração de células inflamatórias e micróglia ativada secretam citocinas e espécies de oxigênio adicionais, resultando em mais dano ao tecido, estresse oxidativo, ativação de metaloproteinases de matriz, ruptura da BHE e edema. BHE – barreira hematoencefálica; MMP – metaloproteinases de matriz.

2.1.2 Excitotoxicidade

O glutamato é um aminoácido presente em grande quantidade no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos que atua como neurotransmissor excitatório. A privação de oxigênio e glicose provocada pelo insulto isquêmico resulta na liberação de níveis tóxicos de glutamato no espaço extracelular. Tal desequilíbrio, acompanhado da ativação de receptores de glutamato leva ao influxo de cálcio e despolarização neuronal, o que acarreta morte celular via apoptose, necrose e autofagia. O desequilíbrio do perfil de concentração espaço temporal do glutamato é referido como excitotoxicidade e também está associado à ocorrência de doenças neurodegenerativas (BRASILEIRA; GOMES VALLI, 2014; GREWER; RAUEN, 2005; MAJID, 2014; VAARMANN et al., 2013). Na Figura 3, podem ser observadas vias de dano

neuronal por excitotoxicidade. O glutamato se acumula em níveis tóxicos na fenda sináptica, os receptores NMDA (N-metil D-Aspartato) são superativados, permitindo influxo desregulado de cálcio e sódio, estimulando a produção de EROs e ERNs e induzindo morte neuronal por ativação de proteases que danificam a estrutura celular, com peroxidação lipídica, liberação de fatores citotóxicos pela micróglia, interrupção da função mitocondrial e indução de picnose (condensação da cromatina que afeta a integridade da carioteca).

Figura 3 – Mecanismos de dano neuronal por excitotoxicidade.



Fonte: <https://www.rndsystems.com/resources/articles/neuronal-death-glutamate-excitotoxicity-protein-mediators-strategies-inhibition>. Acesso em 04/07/2019.

O glutamato se acumula a níveis tóxicos na fenda sináptica. Os receptores N-metil D-Aspartato (NMDA) são superativados permitindo influxo desregulado de cálcio e sódio estimulando a produção de EROs e ERNs e induzindo morte neuronal por ativação de proteases que danificam a estrutura celular, peroxidação lipídica, liberação de fatores citotóxicos pela micróglia, interrupção da função mitocondrial e indução de picnose (condensação da cromatina que afeta a integridade da carioteca).

2.1.3 Estresse oxidativo

As EROs e ERNs são formadas enzimaticamente ou não em células de mamíferos. O SNC é uma região especialmente sensível aos seus efeitos negativos, devido à baixa atividade de enzimas neuronais antioxidantes, altas concentrações de lipídios peroxidáveis, alto consumo de oxigênio e altos níveis de ferro. Entre as espécies reativas mais relevantes, está o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), gerado como subproduto da cadeia respiratória ou como produto de enzimas como a xantina oxidase (XO) ou a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH). O superóxido é moderadamente reativo e tem meia-vida de 2 - 4 μ s em pH fisiológico ($\sim 7,4$). Ele se forma a partir da redução do O_2 por um elétron e uma vez protonado forma o radical peroxila (HO_2^{\bullet}) que é mais reativo, porém presente em pequenas quantidades em pH fisiológico. Sua dismutação a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é extremamente rápida e pode ocorrer de forma espontânea ou catalisada pela enzima superóxido dismutase. O $O_2^{\bullet-}$ pode doar elétrons ao Fe^{3+} formando Fe^{2+} que reduz o H_2O_2 e forma OH^{\bullet} e OH^- . O radical hidroxila (OH^{\bullet}) é considerado o de mais alto poder oxidativo, responsável por reações rápidas e inespecíficas de diferentes substratos e capaz de interagir com todos os tipos de moléculas biológicas (BARBOSA et al., 2014; RODRIGO et al., 2013).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) também participa de reações formadoras de OH^{\bullet} e atua como mensageiro em condição de estresse. Seu tamanho reduzido permite que ele atravesse membranas celulares, difundindo sua ação danosa em diferentes compartimentos, podendo também inativar enzimas por oxidação de seus grupos tiol (BARBOSA et al., 2014; RODRIGO et al., 2013).

O óxido nítrico (ON) é gerado por óxido nítrico sintase endotelial, neuronal ou induzível, sendo esta última a mais importante em processos patológicos. Quando associado a níveis elevados do íon superóxido, o radical NO pode formar peroxinitrito ($ONOO^-$) pró-oxidante e/ou reduzir o efeito antioxidante da superóxido dismutase (BARBOSA et al., 2014; RODRIGO et al., 2013).

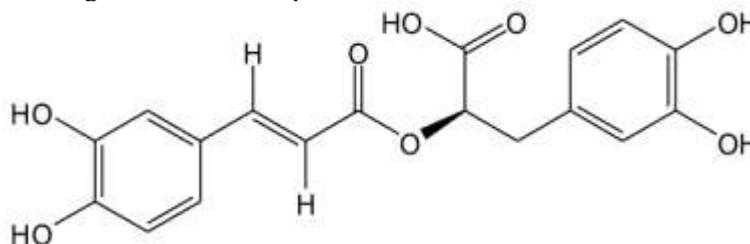
Em condições normais, o organismo possui mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo. A atuação de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalases, além de antioxidantes não enzimáticos como o ácido ascórbico (vitamina C), β -caroteno, ácido úrico, α -tocoferol (vitamina E), fazem esse papel, pois são capazes de doar ou receber elétrons, inativando os radicais livres. Em condições patológicas, recursos terapêuticos adicionais são necessários (RODRIGO et al., 2013).

2.2 Ácido rosmarínico

Antioxidantes naturais têm efeitos benéficos na função endotelial e neuroprotetora. Os polifenóis, principalmente, têm sido alvo de investigação desde o surgimento do chamado “Paradoxo Francês”, termo atribuído à pesquisa que revelou o resveratrol contido no vinho tinto como responsável pela baixa incidência de doença cardíaca na população francesa, apesar da dieta rica em gorduras (MIGUEL; MENEZES; ARAÚJO, 2012; SINGH; KRISHAN; SHRI, 2018). Liu et al., demonstraram o efeito anti-apoptótico do pré-tratamento com resveratrol, no cérebro de camundongos C57BL/6 submetidos a BCCAO (Oclusão de Artéria Carótida Comum Bilateral Transiente) pelo aumento da expressão de enzima anti-apoptótica Bcl-2 e redução da expressão das pró-apoptóticas Bax, Caspase-3 e Caspase-3 clivada na região CA-1 do hipocampo, região especialmente sensível a insulto isquêmico e associada à formação de novas memórias e depressão (LIU; SUN; LI, 2016; ZHANG et al., 2017).

O ácido rosmarínico (AR) é um polifenol derivado do ácido caféico e do ácido 3, 4 - dihidroxifenilático, comumente encontrado em diversas espécies das famílias *Lamiaceae* e *Boraginaceae*, como a melissa (*Melissa officinalis*), o alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e a sálvia (*Salvia officinalis*). Foi isolado pela primeira vez na Itália em 1958 por Scarpati e Oriente, tendo recebido esse nome devido à planta *Rosmarinus officinalis*, popularmente conhecida como alecrim, da qual fora extraído na ocasião. A estrutura química do ácido rosmarínico pode ser observada na Figura 4 (PETERSEN; SIMMONDS, 2003).

Figura 4 – Estrutura química do ácido rosmarínico



Fonte: https://www.researchgate.net/figure/Molecular-structure-of-rosmarinic-acid_fig1_236099182.

O AR tem se mostrado extremamente eclético com relação aos benefícios relatados em estudos científicos. Seus efeitos têm sido observados em vários estudos *in vivo* e *in vitro*, entre os quais pode-se ressaltar atividade biológica antioxidante e anti-inflamatória (FONTELES et al., 2016; RAMALHO et al., 2014; ZHANG et al., 2017), neuroprotetora (ALKAM et al., 2007; FARR et al., 2016; KHAMSE et al., 2015; LEE et al., 2016a) e anti-depressiva (FACHEL et al., 2019; FERLEMI et al., 2015).

Osakabe et al., demonstraram ação anti-inflamatória do AR após aplicação tópica em modelo de papiloma de pele em camundongo, assim como Cao et al., observaram efeito semelhante após administração oral em modelo de carcinoma hepatocelular. Nestes estudos, o efeito anti-inflamatório e anti-carcinogênico se deu pela regulação de citocinas pro-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$), interleucina 1- β (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6). Também foi relatada inibição de adesão celular e angiogênese que foi associada à atividade antioxidante (CAO; PRESCOTT, 2002; FACHEL et al., 2019; OSAKABE et al., 2004). Rahbardar et al., avaliaram o efeito do AR em modelo murino de dor neuropática e observaram, nos animais tratados, atividade anti-inflamatória e antioxidante associada à redução dos fatores inflamatórios como óxido nítrico sintase induzível (iNOS), ciclooxigenase-2 (COX-2), IL-1 β , prostaglandina E-2 (PGE2) e metaloproteinase de matriz 2 (MMP2) (GHASEMZADEH RAHBARDAR et al., 2017).

Fonteles et al., avaliaram o efeito neuroprotetor do AR no cérebro de camundongos C57BL/6 submetidos a modelo de isquemia focal permanente (pMCAO) e concluíram que o extrato reduziu a área de infarto cerebral e reduziu o déficit de memória, suprimindo a resposta inflamatória e ativação microglial. O efeito foi atribuído à provável indução de sinaptogênese e neurogênese (FONTELES et al., 2016).

Zhang et al., mostraram em seu estudo que o AR melhorou o comportamento ansioso e protegeu a atividade locomotora e cognitiva de ratos submetidos a modelo global de isquemia e reperfusão (oclusão de 4 vasos), protegendo significativamente os neurônios da região CA-1 do hipocampo por meio da via de sinalização Akt/JNK3/caspase-3. A regulação desta via tem efeito neuroprotetor uma vez que, aumentada a fosforilação de Akt1 e reduzida a de JNK-3, há também a redução da expressão de caspase-3 clivada (ZHANG et al., 2017). Também foi observada proteção da memória, atribuída à redução de neurotoxicidade provocada pelo peroxinitrito em modelo murino de doença de Alzheimer (ALKAM et al., 2007).

A atividade antioxidante exercida por determinados compostos geralmente se dá pela doação de elétrons a moléculas instáveis, promovendo a sua neutralização. No caso do AR, há indícios recentes que mostram que essa pode ser uma visão simplificada de seu modo de atuação. Acredita-se que a presença de dois grupos catecol em sua estrutura pode indicar que prótons de um desses grupos possam ser removidos e formar pontes de hidrogênio entre as moléculas, estabilizando os radicais. Embora esses fenômenos não estejam de todo esclarecidos tem sido possível confirmar o efeito antioxidante do AR pelo aumento da expressão de enzimas antioxidantes (catalase (CAT), glutationala peroxidase (GPx) e redutase, superóxido dismutase (SOD), óxido nítrico sintase) e redução dos níveis de EROs e ERNs, de marcadores de

lipoperoxidação e de dano ao DNA. Também foi observada atuação do AR na regulação positiva da expressão do fator nuclear eritróide (Nrf-2), fator que regula a expressão de enzimas antioxidantes como CAT, GPx e SOD (FACHEL et al., 2019).

2.3 Modelo animal de isquemia cerebral

Conforme citado anteriormente, ainda não existe cura ou tratamento efetivo para a injúria isquêmica e ainda há muito a ser compreendido em relação à sua fisiopatologia. O uso de modelos animais de AVC, associados ao estudo de novas terapias é a principal fonte de informação disponível atualmente para suprir essa carência (LEÓN-MORENO et al., 2020).

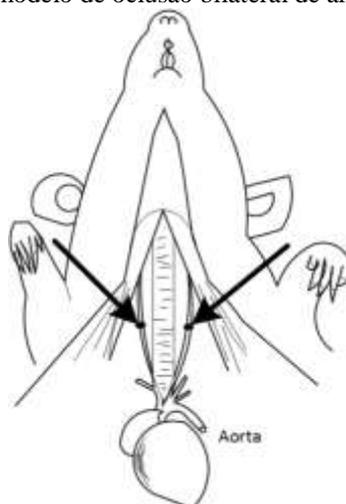
A oclusão bilateral de artéria carótida comum (BCCAO, do inglês *bilateral common carotid artery occlusion*) ou oclusão de dois vasos (2VO), é um modelo de isquemia global transiente que tem sido descrito na literatura como eficiente em reproduzir as alterações neuronais da isquemia e reperfusão observadas em quadros de AVC isquêmico humano. Consiste na obstrução temporária do fluxo sanguíneo cerebral através da clipagem bilateral das artérias carótidas com posterior reperfusão.

A hipoperfusão cerebral provocada pelo modelo, a partir de 15 minutos, em camundongos C57BL/6, promove alterações em áreas do cérebro como córtex, estriado, hipocampo e tálamo, causando prejuízo de funções motoras e cognitivas. O modelo de isquemia global difere dos modelos focais, pois afeta o cérebro como um todo. É reprodutível e apresenta resultados morfológicos constantes, tornando o modelo adequado a essa finalidade (TERASHIMA et al., 1998; WAHUL et al., 2018; WU et al., 2001; ZHAO et al., 2013).

O BCCAO ainda é o modelo mais comum de indução de isquemia cerebral global transiente, também conhecida como isquemia do cérebro anterior. Foi desenvolvido originalmente em ratos e gerbils mas sua adaptação para uso em camundongos foi de grande interesse, devido ao crescente desenvolvimento de camundongos geneticamente modificados, que permitem avaliar os efeitos isolados de proteínas específicas na lesão isquêmica (LEÓN-MORENO et al., 2020).

No entanto, essa adaptação ainda apresenta uma série de desafios, pois além do tamanho reduzido do animal, as espécies de camundongos apresentam alta variabilidade em sua anatomia vascular, tanto entre espécies quanto entre indivíduos da mesma linhagem, o que pode impactar diretamente a obtenção de resultados homogêneos (LEÓN-MORENO et al., 2020; ONKEN; BERGER; KRISTIAN, 2012). Uma representação do modelo BCCAO pode ser observada na Figura 5.

Figura 5 – Representação do modelo de oclusão bilateral de artéria carótida comum.



Fonte: <<https://bio-protocol.org/e2704>>. Acesso em 15/05/2019.

Wahul et al., estudaram o efeito da BCCAO no córtex, estriado e hipocampo de camundongos CD-1 e identificaram por meio de ensaios moleculares de marcadores de hipóxia, inflamação e apoptose, que a região do hipocampo apresentou sinais de dano tardio em relação às demais regiões citadas levando à conclusão de que a isquemia cerebral global afeta diferencialmente, em termos de tempo, regiões do cérebro consideradas críticas (WAHUL et al., 2018).

Zhao et al., observaram por meio do teste do labirinto aquático de Morris¹ (MWM – *do inglês, Morris Water Maze Task*) que o comprometimento da memória e aprendizado em camundongos C57BL/6 submetidos a BCCAO foi pronunciado a partir do terceiro dia após a reperusão em comparação aos grupos sham e controle. (BROMLEY-BRITS; DENG; SONG, 2011; ZHAO et al., 2013).

2.4 Tomografia por emissão de pósitrons de pequenos animais

Vários ramos de pesquisa utilizam roedores para reproduzir alterações na estrutura e função cerebral promovidas por doenças humanas como Alzheimer, Parkinson e AVC, e assim adquirir informações sobre a patogênese dessas doenças associadas à avaliação do efeito de novas abordagens terapêuticas (LANCELOT; ZIMMER, 2010).

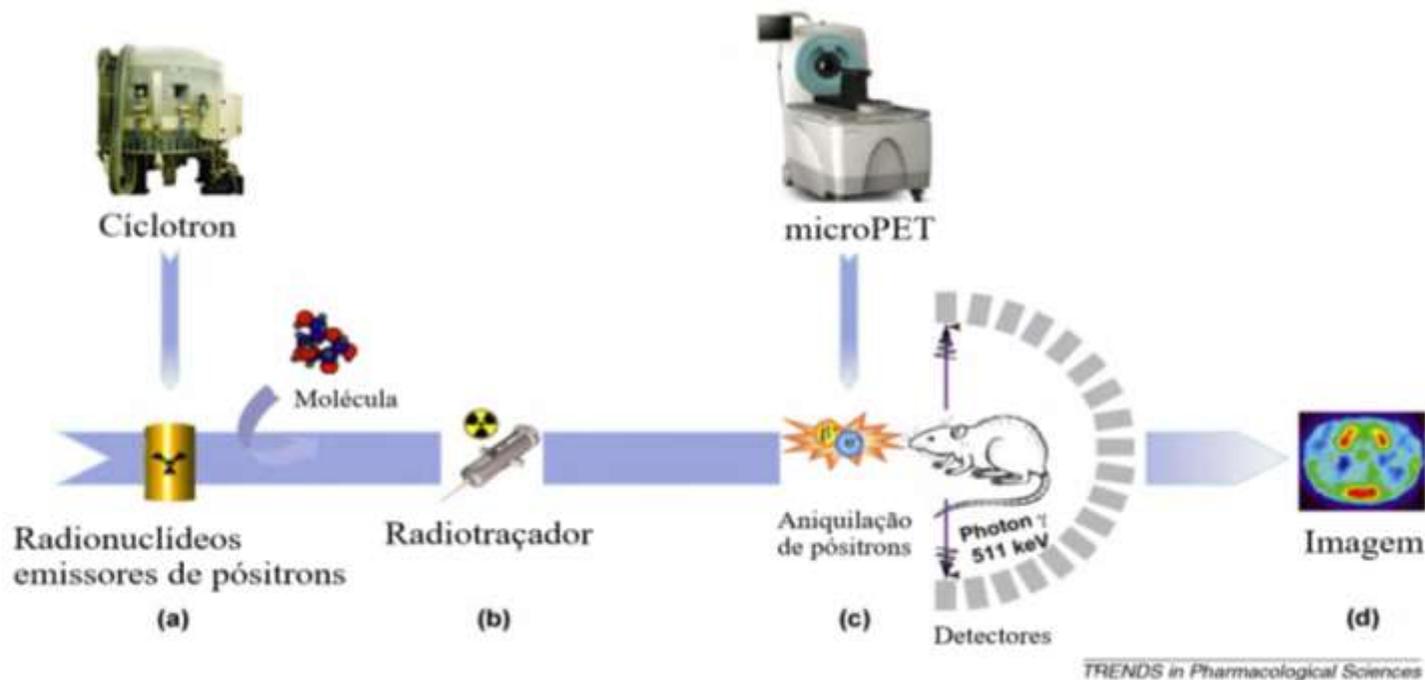
¹ O labirinto aquático de Morris é um teste comportamental amplamente utilizado para avaliar aprendizagem e memória hipocampo – dependente.

Uma das principais dificuldades enfrentadas nesse tipo de estudo é a necessidade de realização de análises histológicas e bioquímicas, o que demanda a utilização de grande número de animais e impossibilita a realização de estudos longitudinais do mesmo animal.

A tomografia por emissão de pósitrons dedicada a pequenos animais ou microPET é uma tecnologia utilizada em pesquisa pré-clínica que semelhante ao PET tradicional utiliza traçadores radioativos com afinidade por órgãos ou processos biológicos específicos que ao serem detectados e mapeados podem fornecer informações metabólicas e funcionais de processos naturais ou patológicos, de forma não invasiva (LANCELOT; ZIMMER, 2010).

O princípio físico básico do equipamento é a detecção de fótons de coincidência emitidos por radionuclídeos com deficiência de nêutrons. Em seu processo de decaimento, estes núcleos emitem pósitrons com baixo alcance que irão interagir com elétrons do meio e sofrer aniquilação, emitindo dois fótons de 511 keV em direções opostas. O local de origem do pósitron e o volume a partir do qual ele foi emitido podem ser mensurados a partir das linhas de resposta formadas ao longo de detectores cintiladores opostos, dispostos em anéis em torno do objeto de estudo (LONSDALE; BEYER, 2010; SATTLER et al., 2010). Uma representação esquemática do processo de aquisição do radiofármaco e aquisição de imagens PET pode ser observada na Figura 6.

Figura 6 – Representação esquemática do processo de aquisição do radiofármaco e imagens PET



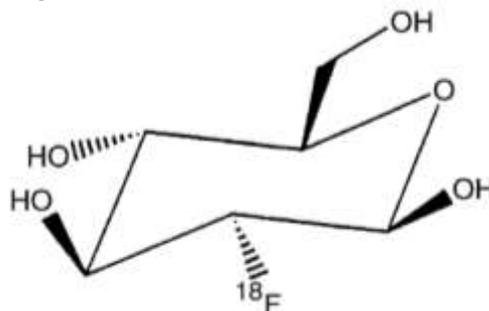
Representação esquemática do processo de produção do radiotraçador e aquisição de imagens PET. (a) Cíclotron, acelerador de partículas produz o radionuclídeo emissor de pósitrons. (b) O radionuclídeo é incorporado à molécula de escolha através de etapas de radiosíntese. (c) O escaneamento no microPET é realizado após injeção do radiotraçador. O mesmo se acumula no tecido em estudo e decai emitindo pósitrons que caminham poucos milímetros até colidirem com um elétron do meio e se aniquilarem emitindo simultaneamente dois fótons de 511 keV em direções opostas. Estes fótons são detectados simultaneamente pela câmara PET, dentro de uma janela de tempo pré-definida, por detectores opostos que correspondem a cristais cintiladores dispostos em múltiplos anéis dentro do cabeçote do equipamento. (d) Uma imagem 3D é reconstruída após a coleta de um número estatisticamente significativo de eventos radioativos por algoritmos matemáticos.

2.4.1 FDG-18F

O fludesoxiglicose (18F), ou FDG-18F, é o radiofármaco mais utilizado mundialmente em exames PET, em avaliações de patologias do miocárdio, cérebro e também na detecção precoce de diversos tipos de câncer. Segundo Yu (2006), “trata-se de um análogo da glicose do qual o grupo hidroxila do carbono 2 é substituído por um átomo de flúor radioativo”.

O FDG-18F é um marcador de processos de alta captação de glicose que, quando absorvido pelas células por difusão facilitada, é fosforilado pela hexoquinase para 2-deoxi-D-glicose-6-fosfato (2-DG-6-P), mas não pode ser metabolizado devido à ausência do grupo hidroxila do carbono 2, que é essencial para a próxima etapa da via metabólica, ficando temporariamente retido dentro da célula (BEUTHIEN-BAUMANN et al., 2000; FAWDRY, 2007; YU, 2006). Sua estrutura molecular é mostrada na Figura 7.

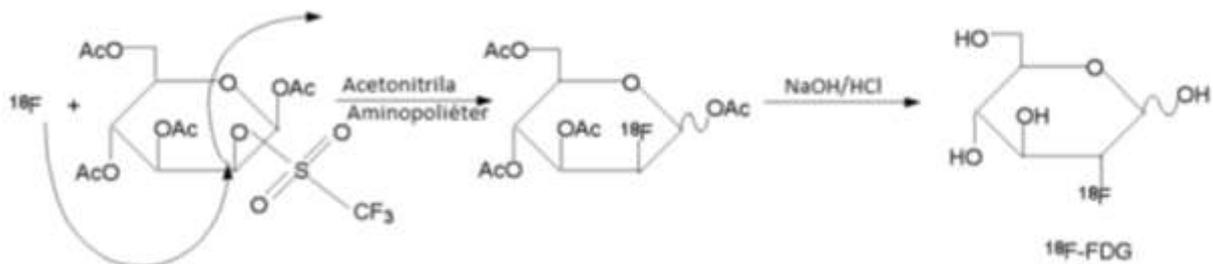
Figura 7– Estrutura molecular do FDG-18F



Fonte: DANTAS (2013).

No processo de síntese, o Flúor-18 é extraído da mistura aquosa proveniente do ciclotron e eluído com uma solução aquosa de acetonitrila (CH_3CN), contendo carbonato de potássio (K_2CO_3) e uma quantidade equimolar de aminopoliéter. Como pode ser observado na Figura 8, o íon fluoreto ^{18}F reage com o precursor triflato de manose (1,3,4,6-O-Acetil-2-O-trifluorometanosulfonil-beta-Dmanopiranoose), molécula similar ao FDG-18F exceto pela presença de grupo triflato no carbono 2 e presença de grupos acetil nos carbonos 1, 3, 4 e 6, e promove uma quebra da ligação carbono-oxigênio, substituindo o triflato presente no carbono 2 e criando uma ligação carbono-flúor. Este processo leva a uma inversão estereoquímica do carbono 2, dando à molécula uma configuração de glicose. Finalmente os grupos acetil são removidos por hidrólise, dando origem ao composto FDG-18F (CRCN, 2013).

Figura 8– Síntese do FDG-18F por substituição nucleofílica.



Fonte: YU (2006).

2.4.2 Análise semi-quantitativa de captação do FDG-18F

A tomografia por emissão de pósitrons surgiu como ferramenta de análise visual e evoluiu com o advento de métodos de quantificação e semi-quantificação que permitiram mensurar e comparar processos biológicos com base em potenciais de ligação e taxas de transferência. Dentre esses métodos, está o SUV (*do inglês Standardized Uptake Value*) que é um parâmetro de semi-quantificação muito conhecido e utilizado que representa a concentração relativa do traçador no volume de interesse. Costuma ser associado à avaliação qualitativa tornando-a menos subjetiva e funciona como uma aproximação da taxa de captação de glicose (K_i) ou captação absoluta de glicose (MRGlu) (PRANDO et al., 2018). O SUV é calculado pela Equação 1:

$$SUV = \frac{C_{PET}(t)}{\left(\frac{\text{Atividade injetada}}{\text{Peso do paciente}} \right)} \quad (1)$$

Em que $C_{PET}(t)$ representa a concentração de FDG-18F na região de interesse em um momento específico.

A distribuição do traçador nos tecidos biológicos também pode ser estimada em função do tempo por meio da aquisição de imagens dinâmicas durante a injeção do radiofármaco. Dessa forma é possível avaliar o tempo de entrada e saída do radiofármaco nas regiões de interesse. A determinação da concentração do traçador no sangue arterial (função de entrada arterial) pode ser necessária uma vez que interfere diretamente na taxa de transporte nos tecidos.

Uma variedade de métodos tem sido descritos na literatura para esta finalidade como dispositivos de coleta automática, função de entrada derivada da imagem e função de entrada arterial padronizada. A amostragem de sangue arterial manual embora ainda seja considerada

o padrão ouro em estudos de pequenos animais, representa um grande desafio, principalmente quando se trata de camundongos, devido ao seu volume de sangue reduzido (PRANDO et al., 2018).

2.4.3 Análise baseada em voxels – Mapeamento paramétrico estatístico

Segundo Friston et al., desenvolvedores do Software SPM (do inglês *statistical parametric mapping*), o mapeamento paramétrico estatístico se refere à “construção de processos estatísticos espacialmente estendidos para testar hipóteses sobre efeitos regionais específicos”. “É uma ferramenta computacional desenvolvida para análise de neuroimagens funcionais que permite estimar a distribuição de probabilidade das intensidades dos voxels para gerar mapas estatísticos paramétricos que possam determinar diferenças relevantes ou testar hipóteses sobre efeitos regionais específicos das amostras de interesse” (FERNANDES; SATO; BUSATTO, 2011). Atualmente é um método bem estabelecido de análise baseada em voxels que proporciona uma abordagem sistemática e automática de análise de dados PET, SPECT (do inglês *Single Photon Emission Computed Tomography*) e de ressonância magnética (FRISTON et al., 1995).

As análises convencionais baseadas em ROIs (regiões de interesse) apresentam limitações dentre as quais podemos destacar três pontos bastante relevantes: 1- o delineamento manual dos ROIs é subjetivo e, portanto pode apresentar baixa precisão e reprodutibilidade; 2- tais análises geralmente partem de uma informação *a priori* das regiões de interesse, o que pode levar a observações tendenciosas ou à não observação de algum efeito que possa ocorrer fora destas regiões; 3- É preciso considerar que a análise de alterações metabólicas regionais dentro de um sistema que está sendo afetado globalmente pode ser complicada, e para isso, o SPM foi desenvolvido, permitindo uma análise global do cérebro onde cada condição no estudo estará associada a um conjunto de voxels particular que não esteja condicionado a uma geometria pré-definida (BARON, 1999; FRISTON, 2007; FRISTON et al., 1995; GARCIA et al., 2015; PRANDO et al., 2018).

Para criação dos mapas paramétricos é necessário que as imagens passem por um pré-processamento seguindo as etapas de normalização, segmentação e suavização. A normalização é feita para corrigir erros de aquisição, como alterações no posicionamento e permitir o alinhamento (registro) de imagens de indivíduos diferentes utilizando um modelo de referência anatômica. A segmentação é a diferenciação de componentes como matéria branca, cinzenta e líquido, separando os voxels de acordo com sua intensidade em classes específicas para cada

região. A suavização visa reduzir as variações anatômicas entre os indivíduos através da aplicação de um filtro gaussiano. Neste processo, as bordas entre os voxels são suavizadas através da substituição dos valores individuais pela média ponderada dos valores dos voxels adjacentes. As diferenças estatísticas apresentadas nos mapas paramétricos podem ser avaliadas a partir do teste t de *Student* (FERNANDES; SATO; BUSATTO, 2011).

2.5 Teste comportamental para determinação de déficit neurológico

Assim como em humanos, lesões cerebrais podem provocar alterações nas habilidades motoras de camundongos, que podem ser mensuradas por testes comportamentais. Tais testes também são comumente utilizados para avaliar o efeito de tratamento após o estabelecimento de um dano neurológico (LUONG et al., 2011).

O *balance beam* é um teste utilizado para avaliar coordenação motora fina e equilíbrio. Trata-se de uma ferramenta simples, de fácil reprodução e baixo custo, capaz de identificar alterações discretas que poderiam não ser identificadas em testes convencionais como o Rotarod. Foi desenvolvido originalmente para avaliar comprometimento motor em ratos idosos e tem se mostrado útil também na avaliação de animais jovens, geneticamente modificados e lesionados, inclusive em modelos de AVC (BROOKS; DUNNETT, 2009; DOEPPNER et al., 2014; LUONG et al., 2011; STANLEY et al., 2005).

A atribuição de um escore de severidade de déficit neurológico (NSS, do inglês *Neurological Severity Score*) costuma ser associada ao teste. Consiste em estabelecer uma escala de pontuação a ser utilizada como critério de diferenciação comportamental baseada no teste realizado (SINGH; KRISHAN; SHRI, 2018).

2.6 Determinação de área cerebral infartada

O método de coloração utilizando 2, 3, 5 – cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) é uma técnica simples e barata que permite identificar macroscopicamente diferenças entre tecido cerebral viável e infartado. Ao reagir com o tecido cerebral, o TTC que originalmente é incolor é reduzido a vermelho formazan² pela ação de desidrogenases, produzindo um contraste entre tecido viável, vermelho e tecido infartado branco ou rosado. Como a enzima desidrogenase está

² Produto cromogênico artificial resultante da redução de sais tetrazólio por desidrogenases ou redutases.

presente em grande quantidade nas mitocôndrias, considera-se a correlação entre a intensidade da cor e a quantidade e atividade mitocondrial no tecido (BENEDEK et al., 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos relatados neste estudo foram aprovados pela Comissão de ética de uso de animais do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN) sob o protocolo nº 003/17, conforme o Anexo A. O cálculo amostral realizado está descrito no Anexo B. A metodologia do estudo foi estabelecida de acordo com descrições encontradas na literatura científica.

3.1 Animais

Foram utilizados no estudo 109 camundongos C57BL/6, machos, com idades de 7-11 semanas e peso médio de 21,3 g, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais e mantidos no laboratório de Bioensaios do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN/CNEN) em ambiente controlado (temperatura e umidade) com acesso irrestrito a comida e água em ciclos de claro/escuro de 12/12 h.

Foi respeitado o período de uma semana para ambientação dos animais antes de iniciar os experimentos.

3.2 Preparação e administração do ácido rosmarínico

O ácido rosmarínico, fórmula química $C_{18}H_{16}O_6$, foi adquirido na Sigma-Aldrich®, em pó, com pureza química $\geq 98\%$ (HPLC), proveniente da espécie *Rosmarinus officinalis L.*, conhecida popularmente como alecrim (Rosmarinic acid. Sigma Aldrich. 2019. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com>. Acesso em: 18/03/2020).

Para administração aos animais, o produto foi pesado em balança analítica e diluído em solução salina na concentração de 4 mg/mL, de forma a possibilitar o ajuste das doses de 20 mg/kg/dia, na faixa de microlitros, para não saturar o estômago dos animais.

Os animais foram pesados antes de iniciar o tratamento e a cada semana, para cálculo da média de peso e administração da solução de AR em microlitros.

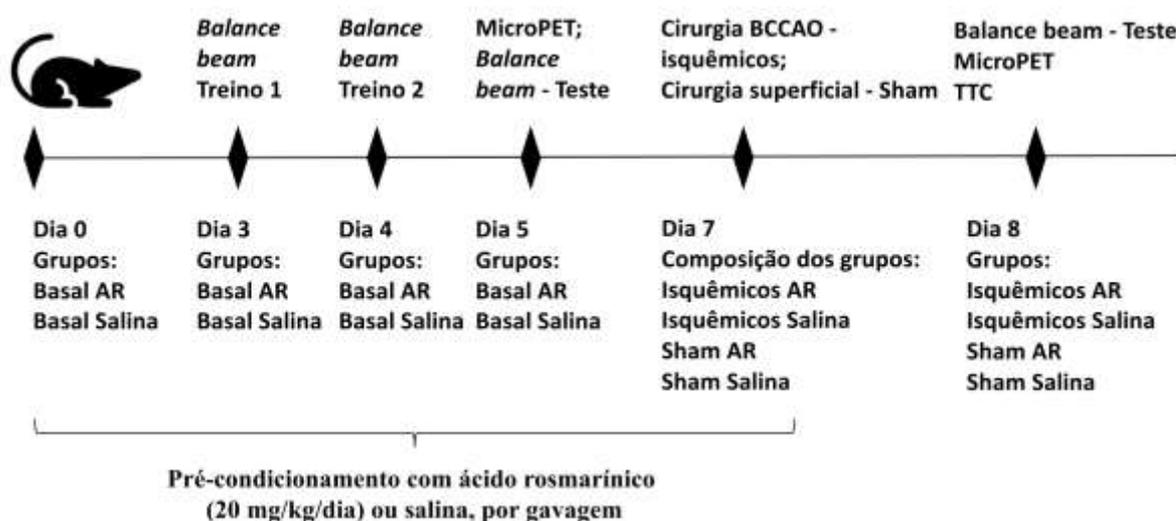
O tratamento foi feito por via oral, em procedimento referido como gavagem, administração intragástrica ou enteral. Para tal, foi utilizada agulha específica com ponta arredondada, introduzida pela boca do animal e delicadamente empurrada pelo esôfago até o estômago, tomando-se os cuidados necessários para não causar danos ao trato digestório ou acessar inadvertidamente a traquéia (Procedimentos recomendados para administração de

substâncias aos animais. www.usp.br. 2020. Disponível em: <www.usp.br> bioterio > Artigos > Gavage>. Acesso em 18/03/2020).

A administração do tratamento foi realizada preferencialmente pela mesma pessoa e na mesma média de horário com os quais os animais estavam habituados, de forma a evitar estresse adicional aos mesmos.

Foram estabelecidos seis grupos experimentais, sendo eles: (1) basal ou sadio tratado com salina; (2) sham³ tratado com salina (veículo); (3) isquêmico tratado com salina; (4) basal tratado com AR; (5) sham tratado com AR e (6) isquêmico tratado com AR. Os animais foram pré-condicionados com ácido rosmarínico ou salina por 7 dias, sendo a cirurgia para indução da isquemia realizada no sétimo dia. Um esquema do planejamento experimental pode ser observado na Figura 9.

Figura 9 – Esquema do planejamento experimental



Fonte: A autora (2019).

3.3 Modelo animal de isquemia cerebral

A reprodução do modelo BCCAO foi realizada conforme publicação de Speetzen et al., 2013, publicada com protocolo detalhado e vídeo na revista científica JOVE (do inglês *Journal of Visualized Experiments*) (SPEETZEN; ENDRES; KUNZ, 2013).

³ O termo sham é utilizado para designar os animais que foram submetidos a cirurgia simulada, em que não houve indução de isquemia.

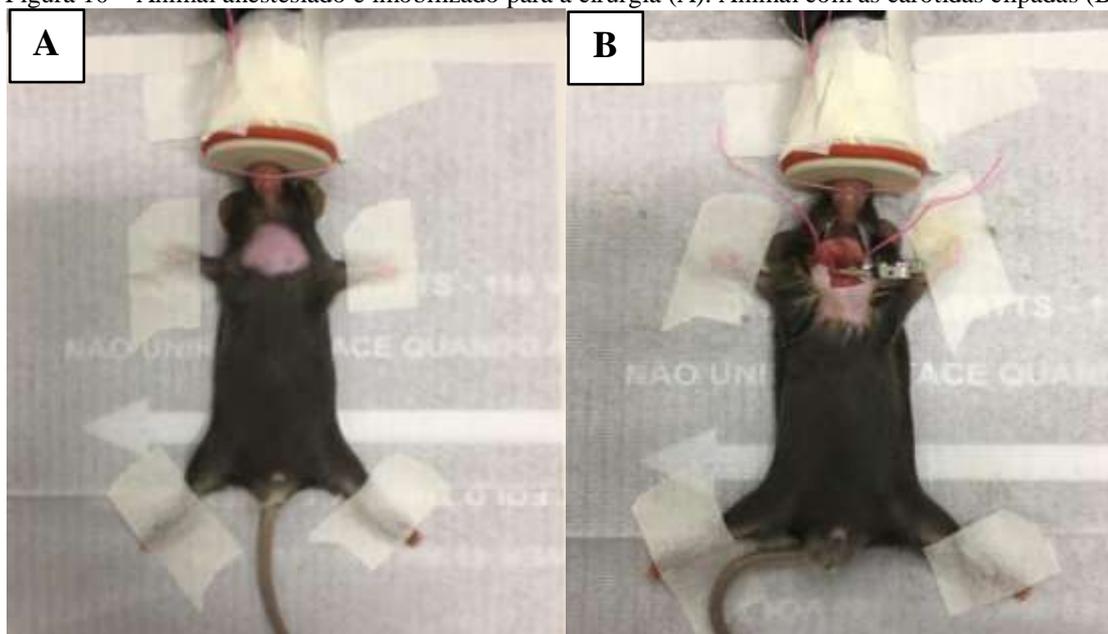
Os animais foram anestesiados com isoflurano por via inalatória. Foi utilizada uma proporção de 5% do anestésico em O₂, para indução da anestesia, reduzindo posteriormente para 2,0 a 1,5% para manutenção, observando sempre o ritmo respiratório do animal, durante o procedimento, para avaliação da necessidade de ajuste.

Após a anestesia, os animais foram imobilizados com os membros esticados e presos à almofada de aquecimento. O tubo de dispensação de anestésico inalatório foi fixado à mesa e o nariz do animal posicionado dentro dele. Uma linha foi passada por trás dos dentes incisivos e presa ao respirador, como forma de evitar que o nariz do animal saísse do tubo durante o procedimento. Após a imobilização, os animais foram depilados na região do pescoço ventral e foi utilizado iodo para assepsia do local. Foi feita uma incisão vertical de aproximadamente 1 cm na região ventral do pescoço expondo a região da traquéia. Para melhor visualização, as glândulas salivares foram delicadamente levantadas, facilitando o acesso às artérias carótidas comuns. Uma vez identificadas as artérias, foi realizada dissecação das mesmas com uma pinça, evitando o manuseio do nervo vago e, em seguida, a oclusão foi feita por 25 minutos utilizando cliques de aneurisma não traumáticos (TOSCANO et al., 2016).

Durante toda a cirurgia, os animais foram mantidos sobre almofada de aquecimento a fim de manter a temperatura estável. Após a retirada dos cliques foi observada a reperusão das artérias por inspeção visual e as glândulas salivares foram reposicionadas. Por fim a incisão foi suturada com fio de nylon 6-0 e foi feita aplicação de lidocaína, anestésico local, para redução da dor na região da incisão. Ao final da cirurgia, os animais foram mantidos em ambiente aquecido por cerca de 1 h, antes de retornarem às gaiolas individuais (TOSCANO et al., 2016).

Na Figura 10 são mostradas, em (A) a imagem do animal anestesiado e imobilizado para a cirurgia e em (B) com as carótidas clipadas.

Figura 10 – Animal anestesiado e imobilizado para a cirurgia (A). Animal com as carótidas clipadas (B)



Fonte: A autora (2018).

3.4 Protocolo de aquisição de imagens microPET FDG-18F

O metabolismo da glicose no cérebro foi avaliado por microPET associado ao radiofármaco FDG-18F. Os animais foram mantidos em jejum por pelo menos 6 horas antes da realização do experimento. Foram adquiridas duas imagens dos animais, sendo a primeira antes da cirurgia, para composição do grupo basal ou sadio, e a segunda, um dia após a BCCAO.

Os animais foram injetados intraperitonealmente com atividades de FDG-18F entre 18,7 – 23,9 MBq. Após a injeção, foram mantidos por 60 minutos, durante o período de captação, em ambiente levemente aquecido e na penumbra, com o objetivo de evitar captação excessiva nas glândulas de Harder⁴ e gordura marrom (JAISWAL et al., 2017). Na sequência, os animais foram anestesiados novamente com isoflurano e posicionados no microPET em posição prona. Foram adquiridas imagens estáticas de 30 minutos com 1 posição de cama na região da cabeça. A reconstrução de imagens foi feita pelo método MLEM (*do inglês Maximum Likelihood Expectation Maximization*) em 3D com 40 iterações. O software *PMOD* foi utilizado para visualização e tratamento das imagens.

⁴ Glândulas situadas na região retroorbital, muito desenvolvidas em roedores, que atuam na regulação da quantidade de luz incidente na retina de camundongos. Devido à sua localização e alta atividade, as glândulas harderianas captam avidamente o FDG-18F, reduzindo a biodisponibilidade para o cérebro e podendo interferir na quantificação da atividade neuronal na região frontal do cérebro.

3.5 Processamento e análise das imagens microPET FDG-18F

O conjunto de imagens dos grupos experimentais, obtido nas aquisições PET FDG-18F, antes e após a indução de isquemia, foi analisado por método semi-quantitativo baseado em VOIs e por mapeamento paramétrico estatístico, baseado em voxels.

3.5.1 Análise baseada em ROIs.

O mapeamento das regiões do cérebro foi feito com o auxílio do software PMOD, utilizando o atlas de Ma-Benveniste-Mirrione. O cérebro foi dividido em 14 regiões e os valores de atividade por região foram disponibilizados pelo PMOD em KBq/cm^3 . Para obtenção dos valores em $\text{SUV}_{\text{médio}}$, foi feita inserção de informações de peso do animal, atividade injetada, hora da injeção e atividade residual na seringa. Após a inserção destes parâmetros foi possível obter a tabela de valores em $\text{SUV}_{\text{médio}}$ por região e o desvio padrão associado. A montagem dos gráficos e análise estatística dos resultados foi feita com o auxílio do software *Graphpad Prism 6*.

3.5.2 Mapeamento paramétrico estatístico

Para realização do mapeamento paramétrico estatístico, as imagens passaram por um pré-processamento dentro do ambiente do MATLAB, utilizando o software SPM12 e a ferramenta SAMIT (do inglês *Small Animal Molecular Imaging Toolbox*).

Primeiramente, as imagens foram reorientadas a partir do bregma e registradas espacialmente com ajuste rígido, de maneira a corrigir variações decorrentes do posicionamento do animal. Para registro, foi utilizado um modelo de cérebro de camundongos de mesmo nome de seus desenvolvedores, Ma-Benveniste-Mirrione, que representa um atlas de deformação mínima de 10 camundongos C57BL/6, machos, com idades de 12-14 semanas e peso de 25-30g (Mouse Brain Atlas Ma-Benveniste-Mirrione. 2005. Disponível em: <<http://doc.pmod.com/pbas/mousebrainatlasma-benveniste-mirrione4996.html>> Acesso em 23/04/2020). Em seguida, foi selecionado um *template* traçador-específico de FDG-18F e as imagens foram normalizadas a partir da atividade injetada e do peso dos animais. Foi aplicada uma máscara ao cérebro inteiro para evitar a influência da captação externa durante o processo de suavização. As imagens foram suavizadas com FWHM (do inglês *full width at half maximum*) selecionada em 0,12 mm. Foi aplicada uma máscara implícita a fim de evitar a

suavização fora da região definida e uma máscara explícita para o cérebro inteiro (Ma-Benveniste-Mirrione). A análise estatística foi feita por teste t de *Student* de duas amostras. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados em que o valor de P corrigido para FWE (do inglês *family-wise error*) foi inferior a 0,05, ou P não corrigido inferior a 0,0001.

3.6 Teste Comportamental

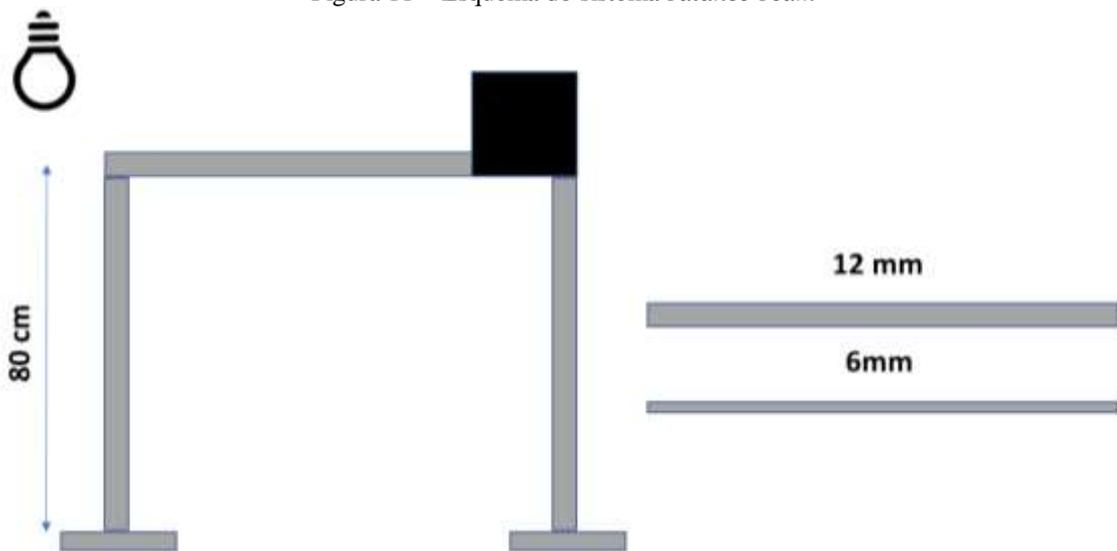
Para realização do teste comportamental foram realizadas as etapas de reprodução do aparato, teste dos animais e atribuição de escore neurológico, conforme descrito nos itens a seguir.

3.6.1 Reprodução do aparato para teste comportamental *balance beam*

O aparato para realização do teste *balance beam* foi reproduzido conforme modelo de LUONG et al., publicado com protocolo detalhado e vídeo no periódico científico JOVE (LUONG et al., 2011).

O sistema consistiu em um suporte de 80 cm de altura, em que foram colocadas vigas de madeira de espessura graduada para observar a capacidade do animal de caminhar sobre elas. Foram utilizadas duas vigas com 12 mm e 6 mm de espessura. O sistema foi construído em madeira com aplicação de fórmica escura no compartimento fechado para torná-lo mais atrativo aos animais, que têm preferência por locais menos iluminados. Em uma das extremidades, foi colocada uma lâmpada incandescente como estímulo aversivo e na caixa de madeira foi colocado material de aninhamento da gaiola do próprio animal a fim de incentivar a travessia (LUONG et al., 2011). Um esquema do aparato pode ser visto na Figura 11 e o modelo construído na Figura 12.

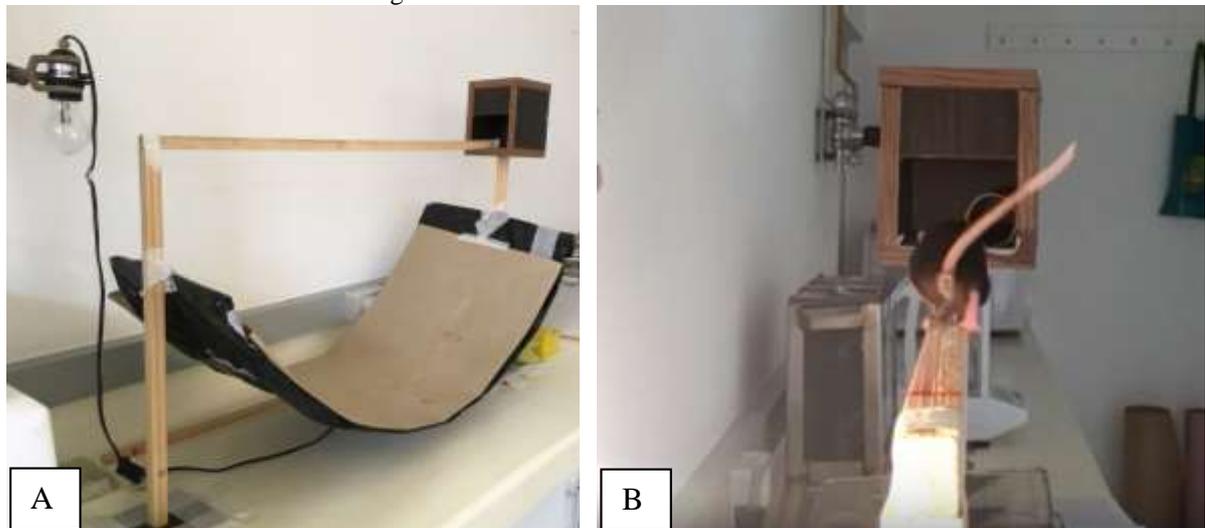
Figura 11 – Esquema do sistema *balance beam*



Fonte: A autora (2018).

Representação esquemática do aparato utilizado para teste comportamental *balance beam*. As linhas de 12 e 6 mm representam as vigas de madeira que foram alternadas para avaliar o desempenho dos animais na caminhada.

Figura 12 – Sistema *balance beam* em uso



Fonte: A autora (2018).

A, sistema *balance beam* construído; B, imagem de animal durante a realização do teste comportamental.

3.6.2 Teste comportamental *Balance beam*

O teste comportamental *balance beam* foi realizado antes e após a indução de lesão isquêmica. Consistiu em encorajar os animais a atravessar a viga até a caixa escura,

acompanhando a desenvoltura com que os mesmos percorreram o trajeto. O objetivo foi comparar o desempenho dos animais antes e após a cirurgia e tratamento. Nos dois dias que antecederam ao teste, os animais foram treinados para ambientação ao aparato.

No dia do experimento, os animais foram trazidos ao local do teste 10 minutos antes. Primeiramente foi posicionada no aparato a viga de 12 mm e cada animal foi submetido a duas travessias. Em seguida, foi feito um intervalo de 15 min para descanso e a viga foi trocada pela de 6 mm. Os animais foram então submetidos a duas novas travessias. Uma câmera foi posicionada estrategicamente para filmar as travessias e facilitar a análise posterior (Adaptado de LUONG et al., 2011).

Os animais foram analisados em relação a alterações como ptose palpebral⁵, marcha atáxica⁶ e desequilíbrio. Uma escala de escore foi atribuída como forma de dimensionar o dano neurológico causado pela isquemia. Nesta escala, 0 (zero) foi atribuído a movimento espontâneo normal, ou seja, sem déficit neurológico e escore máximo (5), atribuído à incapacidade de travessia. A ocorrência de deslizos de pata, animal arrastando a barriga e ou agarrando-se à viga, parando durante o trajeto, enrolando a cauda na viga (tentativa de equilíbrio), também foram considerados na composição da pontuação (SINGH; KRISHAN; SHRI, 2018; TOSCANO et al., 2016). A classificação detalhada do escore pode ser vista na Tabela 1.

Tabela 1 – Escore de severidade de déficit neurológico

Escore	Grau de severidade	Desempenho no teste
0	Nenhum	Agilidade, postura ereta, travessia pé ante pé.
1 - 1,5	Leve	Eventuais deslizos de pata, parando durante o trajeto.
2 - 2,5	Moderado	Ptose ou marcha atáxica, desequilíbrio, desorientação.
3 - 3,5	Grave	Ptose e marcha atáxica, arrastando a barriga e/ou agarrando-se à viga.
4 - 5	Crítico	Andando persistentemente em círculos e ptose, e/ou marcha atáxica; impossibilidade de atravessar a viga.

Fonte: adaptado de Toscano et al. (2016).

⁵ Queda da pálpebra superior, que passa a recobrir uma parte maior da córnea. É causada por alterações no músculo que eleva a pálpebra ou por problemas neurológicos.

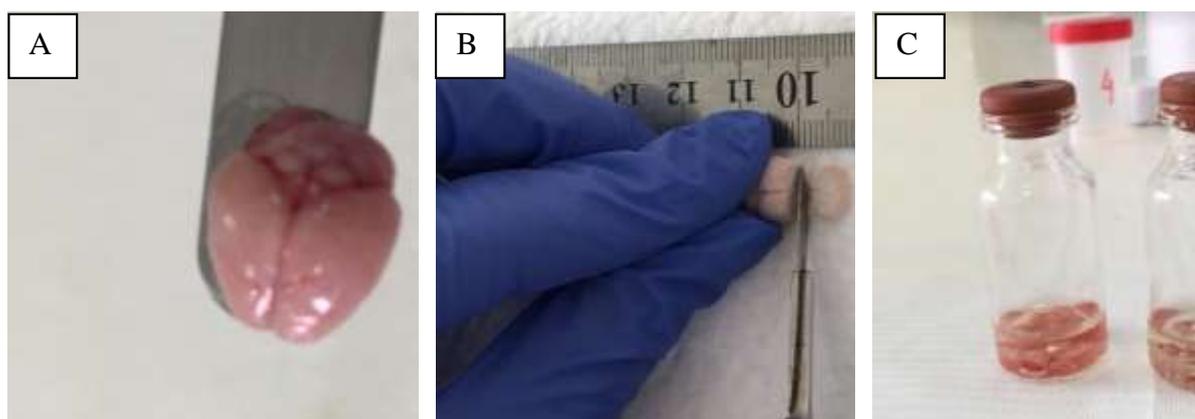
⁶ Falta de coordenação de movimentos musculares voluntários e de equilíbrio. É normalmente associada a uma degeneração ou bloqueio de áreas específicas do cérebro e cerebelo.

3.7 Coloração com 2, 3, 5 – cloreto de trifeniltetrazólio

O 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), fórmula química $C_{19}H_{15}ClN_4$, foi adquirido em pó na Sigma Aldrich® e diluído em PBS (do inglês *phosphate buffered saline*, tampão fosfato-salina) na proporção de 2%, antes da utilização.

No último dia de experimento, após a realização das imagens e teste comportamental, os camundongos foram anestesiados com isoflurano e eutanasiados por deslocamento cervical. Em seguida, o cérebro foi removido e congelado em nitrogênio líquido para facilitar o corte manual em fatias coronais de aproximadamente 2 mm de espessura. As fatias foram colocadas em frascos de vidro contendo a solução de TTC, e mantidas em banho maria durante 30 min, a 37°C (SILVA et al., 2015). O processo de preparação do tecido cerebral para coloração por TTC, pode ser observado na Figura 13.

Figura 13 – Processo de preparação da coloração por TTC.

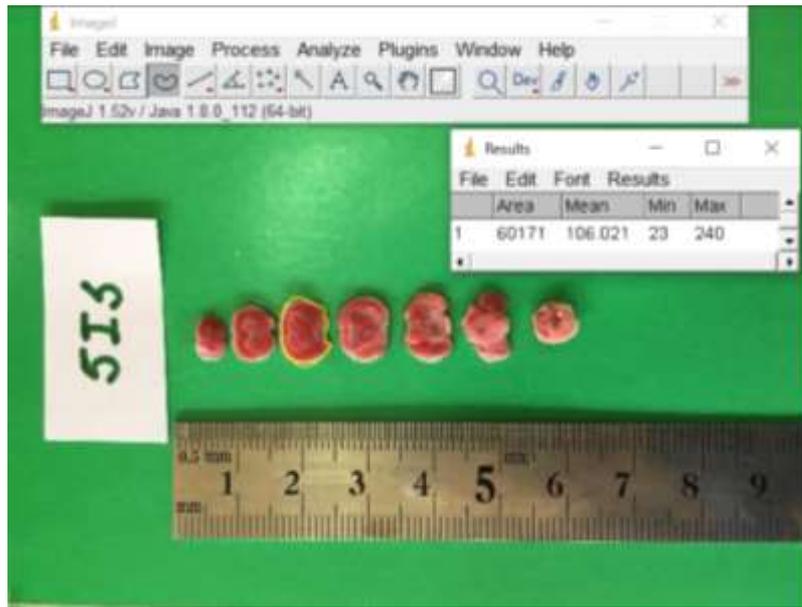


Fonte: A autora (2018).

Em A, cérebro de camundongo extraído após a eutanásia. Em B, cérebro congelado em nitrogênio líquido sendo fatiado manualmente. Em C, fatias do cérebro adicionadas à solução de TTC para serem levadas ao banho maria.

Após a reação, as fatias foram fixadas em formalina, retiradas cuidadosamente dos frascos, colocadas sobre papel plastificado, classificadas por animal, secadas manualmente com papel absorvente e fotografadas ao lado de uma régua.

O software *Image J* foi utilizado para calcular a área total do cérebro e as áreas necróticas, a partir da seleção manual dessas áreas nas fotografias. A imagem da régua foi utilizada para determinar a escala de tamanho do objeto em análise, dentro do ambiente do software. Os resultados foram obtidos como percentual de área necrótica e analisados por teste *t de Student* com o auxílio do software *GraphPad Prism 5*. Uma imagem da interface do *Image J* pode ser vista na Figura 14.

Figura 14 – Imagem sendo analisada no software *Image J*.

Fonte: A autora (2020).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tópicos seguintes descrevem os resultados obtidos, por etapas, de acordo com os experimentos realizados.

4.1 Avaliação da área de infarto cerebral após isquemia e reperfusão.

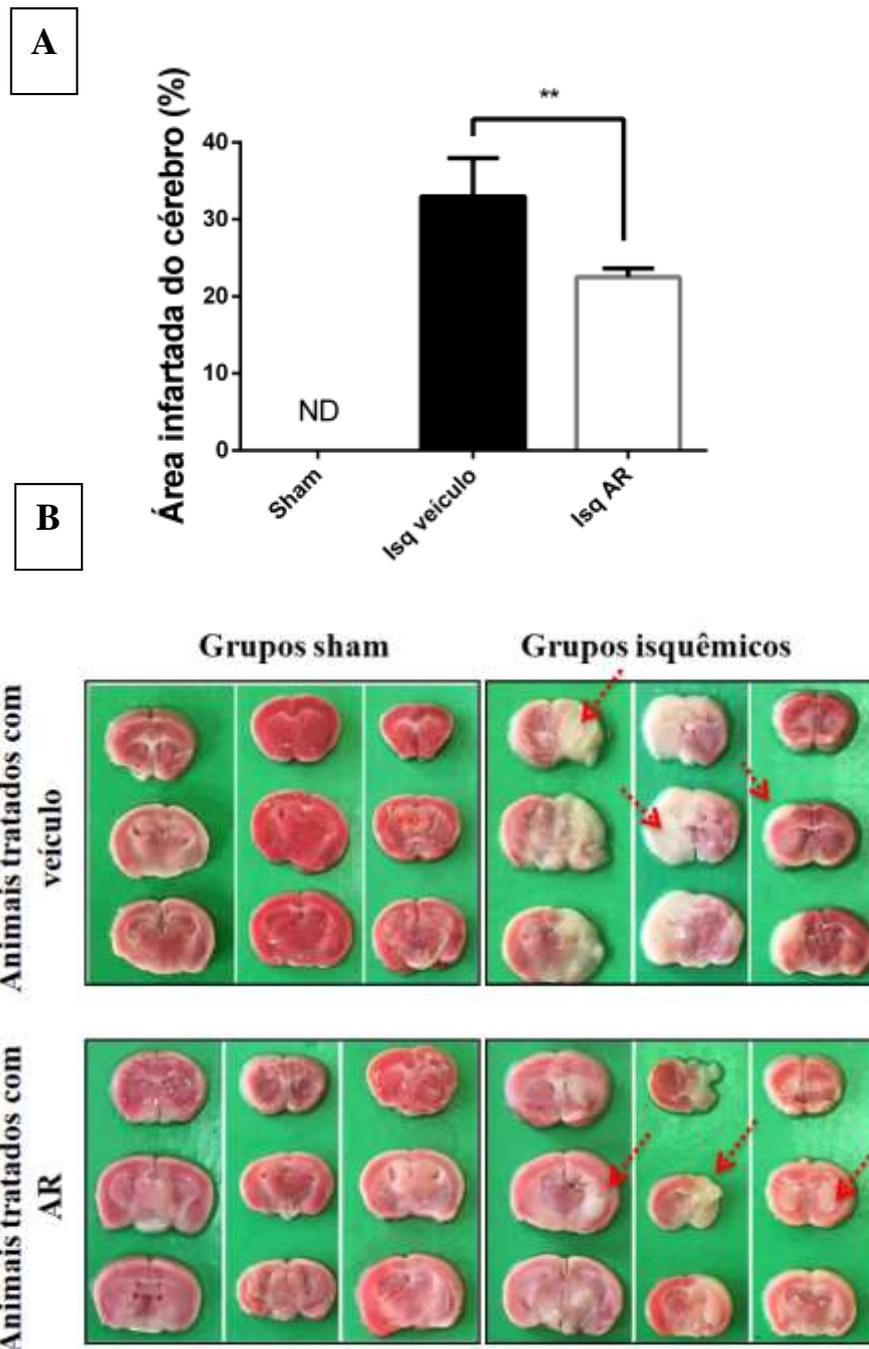
O método de coloração de fatias do cérebro com 2, 3, 5 - cloreto de trifeniltetrazólio foi usado para identificar a porcentagem cerebral comprometida por necrose. O composto conferiu coloração avermelhada a regiões de tecido vivo, com atividade mitocondrial e evidenciou as áreas do cérebro que foram acometidas pela isquemia que se mantiveram esbranquiçadas ou levemente rosadas.

Foi observado que os cérebros dos animais sham apresentaram coloração avermelhada homogênea, diferentemente dos animais isquêmicos veículo e AR, que apresentaram áreas esbranquiçadas visíveis. Tais achados revelam que o procedimento cirúrgico foi realizado de forma eficiente, uma vez que houve presença de regiões de infarto evidentes nos grupos isquêmicos, não encontradas nos grupos controle.

Uma outra observação importante, é que os animais tratados com ácido rosmarínico apresentaram região de infarto cerebral significativamente menor do que o grupo controle, tratado com veículo ($p = 0,0056$). Esse resultado mostrou que o pré-condicionamento com AR, promoveu neuroproteção do insulto isquêmico.

Os resultados podem ser observados na Figura 15A e são corroborados pelas imagens ilustrativas apresentadas na Figura 15B.

Figura 15 – Percentual de área necrótica após isquemia e reperfusão.



Fonte: A Autora (2020)

A-Valores em percentual de área necrótica obtidos comparando as áreas não coradas à área total do cérebro por meio do software *Image J*. B-Imagens de fatias coronais de cérebro de camundongos coradas com TTC. As setas em vermelho exemplificam regiões esbranquiçadas em que o TTC não reagiu, evidenciando falta de atividade mitocondrial como indicativo de necrose isquêmica. É possível observar que tais regiões não aparecem nos grupos sham mas que são evidentes nos grupos isquêmicos e ainda mais pronunciadas no grupo isquêmico tratado apenas com veículo. A análise estatística foi feita por teste *t* de *Student* com o auxílio do software *Graphpad Prism 6*. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 18$ sham; 9 isquêmicos veículo; 5 isquêmicos AR). ND = Não detectado. ** *p* value 0,0056.

A análise de área de infarto mostrou que o AR apresentou efeito neuroprotetor consistente com os trabalhos de Fonteles et al., Cui et al. e Luan et al (CUI et al., 2018; FONTELES et al., 2016; LUAN et al., 2013), que relataram volume de infarto reduzido em camundongos isquêmicos, após tratamento com AR. No primeiro estudo, foi demonstrado que o AR promoveu efeito neuroprotetor contra déficits de memória induzidos por modelo focal de isquemia permanente (pMCAO) em camundongos, após tratamento com doses intraperitoneais de 1 e 20 mg/kg/dia de AR, durante 5 dias. Análises de volume de infarto, escore de déficit neurológico e atividade de mieloperoxidase (MPO) foram realizadas 24 h depois da cirurgia. A coloração por TTC evidenciou que as áreas de infarto foram localizadas predominantemente nas regiões do córtex ipsilateral, e em menor grau no estriado e hipocampo e que a perda neuronal foi significativamente menor nos grupos tratados em relação ao controle. Foi observado também que o AR suprimiu a resposta inflamatória e a ativação astrogliar e que o efeito contra déficit de memória provavelmente se deu pela indução de sinaptogênese e neurogênese (FONTELES et al., 2016).

Cui et al., também observaram efeito do AR reduzindo o volume de infarto e apoptose em camundongos submetidos a modelo focal de isquemia e reperfusão (tMCAO). Foram administradas, intraperitonealmente, doses de 10, 20 ou 40 mg/kg de AR, imediatamente após a reperfusão. Em concordância com nosso estudo, foi observada redução significativa do volume de infarto, avaliado por TTC, 24 h após a reperfusão, para doses de 20 e 40 mg/kg. Ao mesmo tempo, foi observada redução estatisticamente significativa do escore de déficit neurológico (CUI et al., 2018).

Em estudos envolvendo ratos diabéticos submetidos a injúria de isquemia e reperfusão cerebral, Luan et al., relataram redução significativa do volume de infarto, edema no cérebro e déficit neurológico, em animais tratados com AR, quando comparados ao controle. Neste trabalho foram avaliados parâmetros de dose-resposta, janela de tempo de terapia e estudo de longo prazo. Foi observado que o tratamento com AR em doses de 25, 50, 100 e 200 mg/kg, administrados por via intravenosa, 30 minutos após a reperfusão, reduziram o volume de infarto de forma dose dependente, sem afetar o índice glicêmico. Os resultados de janela de tempo de terapia indicaram que a dose de 50 mg/kg reduziu o déficit neurológico, volume de infarto e edema, mesmo quando administrada com atraso de 1h, 3h e 5h, apresentando, porém, efeito benéfico mais evidente quando administrada precocemente. O estudo de longo prazo, mostrou que o AR administrado em uma única dose intravenosa de 50 mg/kg, 14 dias após a reperfusão, ainda atuou reduzindo o escore de déficit neurológico e volume de infarto. O efeito neuroprotetor observado foi atribuído ao aumento da taxa de sobrevivência de neurônios dos

animais tratados, 24 h e 14 dias após a I/R, aferidas por marcação imunológica NeuN (LUAN et al., 2013).

Mustaq et. al. relataram também, que o tratamento com AR, em doses de 10 mg/kg/dia, por via intragástrica, durante 21 dias, reduziu em 28% o nível de peroxidação lipídica no hipocampo, 38% no córtex e 47% no estriado em cérebros de ratos com diabetes induzida por streptozotocin (MUSTAQ et al., 2014).

Em modelo de isquemia e reperfusão cerebral global, semelhante ao utilizado neste estudo, foi demonstrado que o tratamento intraperitoneal com AR, em doses de 20 mg/Kg/dia, melhorou o comportamento ansioso e protegeu a atividade locomotora e cognitiva de ratos, protegendo significativamente os neurônios da região CA-1 do hipocampo através da via de sinalização Akt/JNK3/caspase-3. O índice de apoptose neuronal nos animais isquêmicos foi avaliado por coloração por cresil violeta, 5 dias após a reperfusão, e o grupo tratado com AR apresentou sobrevivência neuronal significativamente superior ao grupo controle (ZHANG et al., 2017).

Li e colaboradores registraram a atuação do AR como neuroprotetor em modelo de injúria hipóxico-isquêmica perinatal, em ratos que foram tratados com AR por via intragástrica na dosagem de 20 mg/kg/dia, durante 5 dias, e apresentaram melhora nos sintomas de deficiência motora, ansiedade e déficit de aprendizado e memória. Também foi observado aumento da proliferação de células progenitoras de oligodendrócitos na zona sub-ventricular e sutil reversão da regulação negativa da proteína básica da mielina e da perda da bainha de mielina no corpo caloso (LI et al., 2019). O efeito anti-isquêmico também foi observado em estudo de isquemia por privação de oxigênio e glicose de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), após pré-tratamento com RABE (derivado do AR; 1,10 $\mu\text{mol/L}$) (WU et al., 2017).

Os achados dos estudos citados acima, corroboram nossos resultados de avaliação de necrose por TTC e poderiam ser correlacionados mais profundamente após realização de avaliação imuno-histoquímica (LUAN et al., 2013).

4.2 Avaliação semi-quantitativa do efeito regional do ácido rosmarínico sobre a captação cerebral de FDG-18F

Foram analisadas 14 regiões do cérebro, sendo algumas delas divididas por hemisférios: estriado direito e esquerdo, córtex, hipocampo direito e esquerdo, tálamo, cerebelo, prosencéfalo, hipotálamo, amígdala direita e esquerda, tronco cerebral, substância cinzenta, colículo superior, bulbo olfatório, mesencéfalo direito e esquerdo, colículo inferior direito e

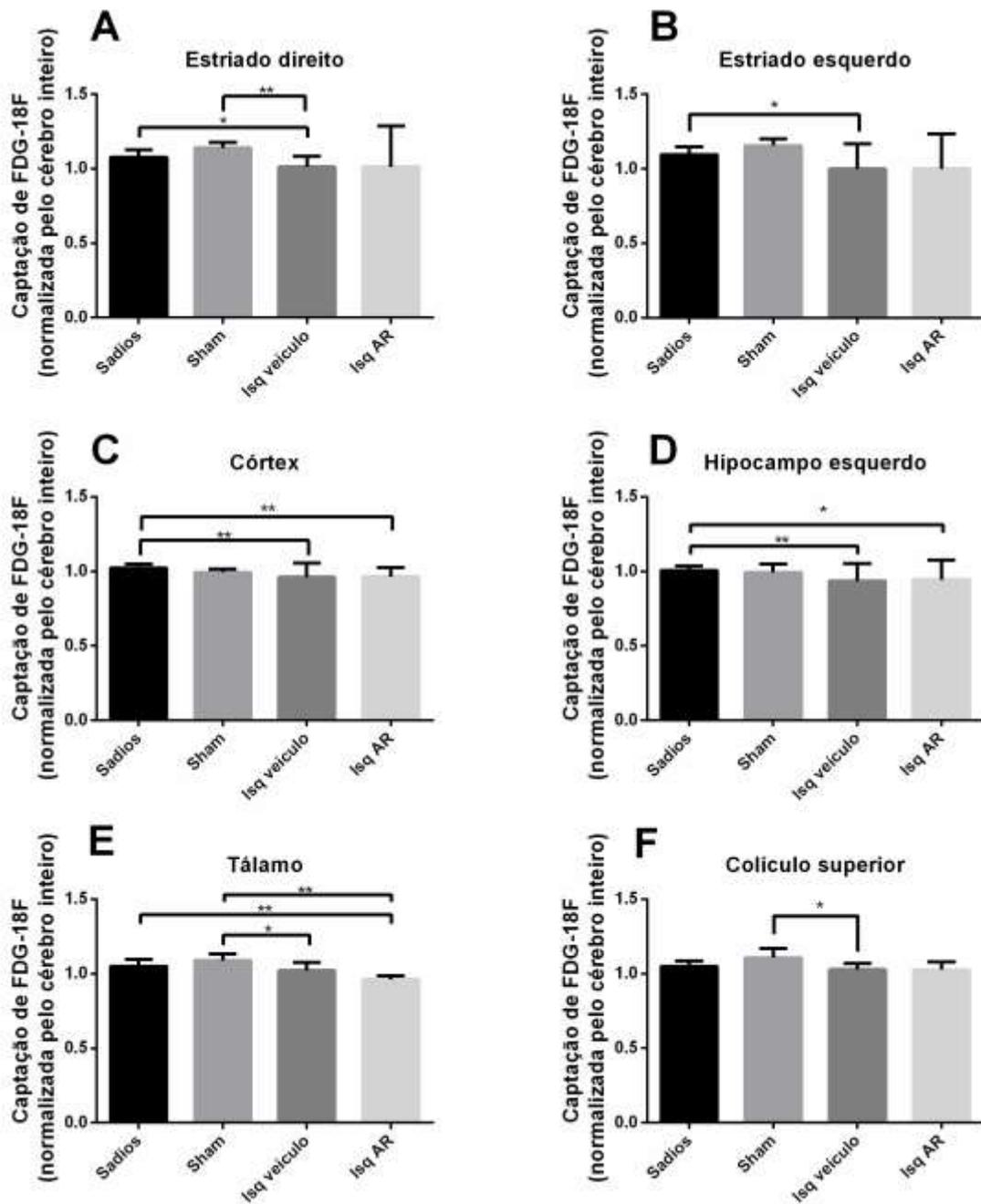
esquerdo. A captação média de FDG-18F nestas regiões, foi calculada para cada grupo experimental e corrigida para atividade injetada e peso dos animais. Os valores em SUV foram normalizados pela captação no cérebro inteiro. Os dados são mostrados na Tabela 2, abaixo.

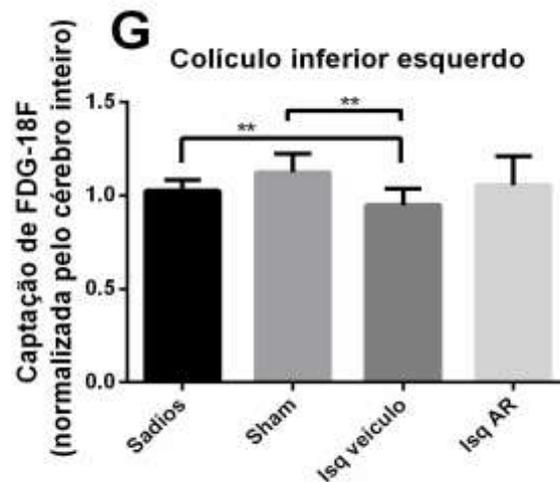
Tabela 2 – Captação regional de FDG-18F (SUV) normalizada pelo cérebro inteiro

Regiões cerebrais	Captação FDG-18F (SUV)	Captação FDG-18F (SUV)	Captação FDG-18F (SUV)	Captação FDG-18F (SUV)
	Sadios	Sham	Isquêmicos veículo	Isquêmicos AR
Estriado direito	1,075±0,010	1,140±0,017	1,012±0,026	1,011±0,1381
Estriado esquerdo	1,096±0,010	1,155±0,021	0,9993±0,063	0,9993±0,118
Córtex	1,022±0,005	0,9926±0,010	0,9602±0,036	0,9647±0,030
Hipocampo direito	0,9576±0,007	0,9533±0,022	0,9666±0,018	0,9300±0,066
Hipocampo esquerdo	1,007±0,005	0,9933±0,025	0,9343±0,045	0,9443±0,065
Tálamo	1,050±0,009	1,089±0,019	1,022±0,020	0,9623±0,012
Cerebelo	0,9914±0,007	1,033±0,020	1,004±0,039	1,032±0,057
Prosencéfalo	0,8693±0,009	0,9041±0,027	0,9142±0,019	0,9777±0,037
Hipotálamo	0,7895±0,015	0,7462±0,040	0,9298±0,038	0,8854±0,027
Amígdala direita	0,7424±0,015	0,6880±0,019	0,8337±0,031	0,8487±0,072
Amígdala esquerda	0,7991±0,013	0,7544±0,031	0,8246±0,029	0,8773±0,069
Tronco cerebral	0,9803±0,011	0,9538±0,033	1,107±0,043	1,084±0,030
Substância cinzenta central	1,044±0,011	1,087±0,021	1,057±0,043	1,096±0,050
Colículo superior	1,048±0,007	1,107±0,028	1,028±0,015	1,027±0,026
Bulbo olfatório	1,010±0,022	1,019±0,019	1,091±0,051	1,090±0,071
Mesencéfalo direito	1,039±0,009	1,033±0,015	1,082±0,034	1,064±0,045
Mesencéfalo esquerdo	1,068±0,007	1,090±0,010	1,079±0,021	1,072±0,018
Colículo inferior direito	1,045±0,013	1,172±0,039	1,051±0,056	1,078±0,074
Colículo inferior esquerdo	1,026±0,011	1,124±0,044	0,9493±0,033	1,055±0,077

A análise semi-quantitativa das imagens PET FDG-18F mostrou captação reduzida nas regiões do estriado ($p = 0,0118$), colículo superior ($p = 0,0254$), colículo inferior ($p = 0,0086$), córtex ($p = 0,0068$), hipocampo ($p = 0,0078$) e tálamo ($p = 0,0451$) dos animais isquêmicos tratados com veículo quando comparados aos grupos sadios e/ ou sham. No entanto, diferentemente das demais regiões citadas, as regiões do estriado, colículo superior e inferior parecem não ter sido afetadas nos animais tratados com AR, uma vez que estes tiveram metabolismo semelhante aos animais sadios nestas áreas. Estes resultados sugerem que o pré-tratamento com AR teve um efeito neuroprotetor no cérebro desses animais. Tais resultados podem ser vistos na Figura 16. Imagens representativas da captação cerebral regional de FDG-18F, de acordo com o grupo experimental, são apresentadas na Figura 17.

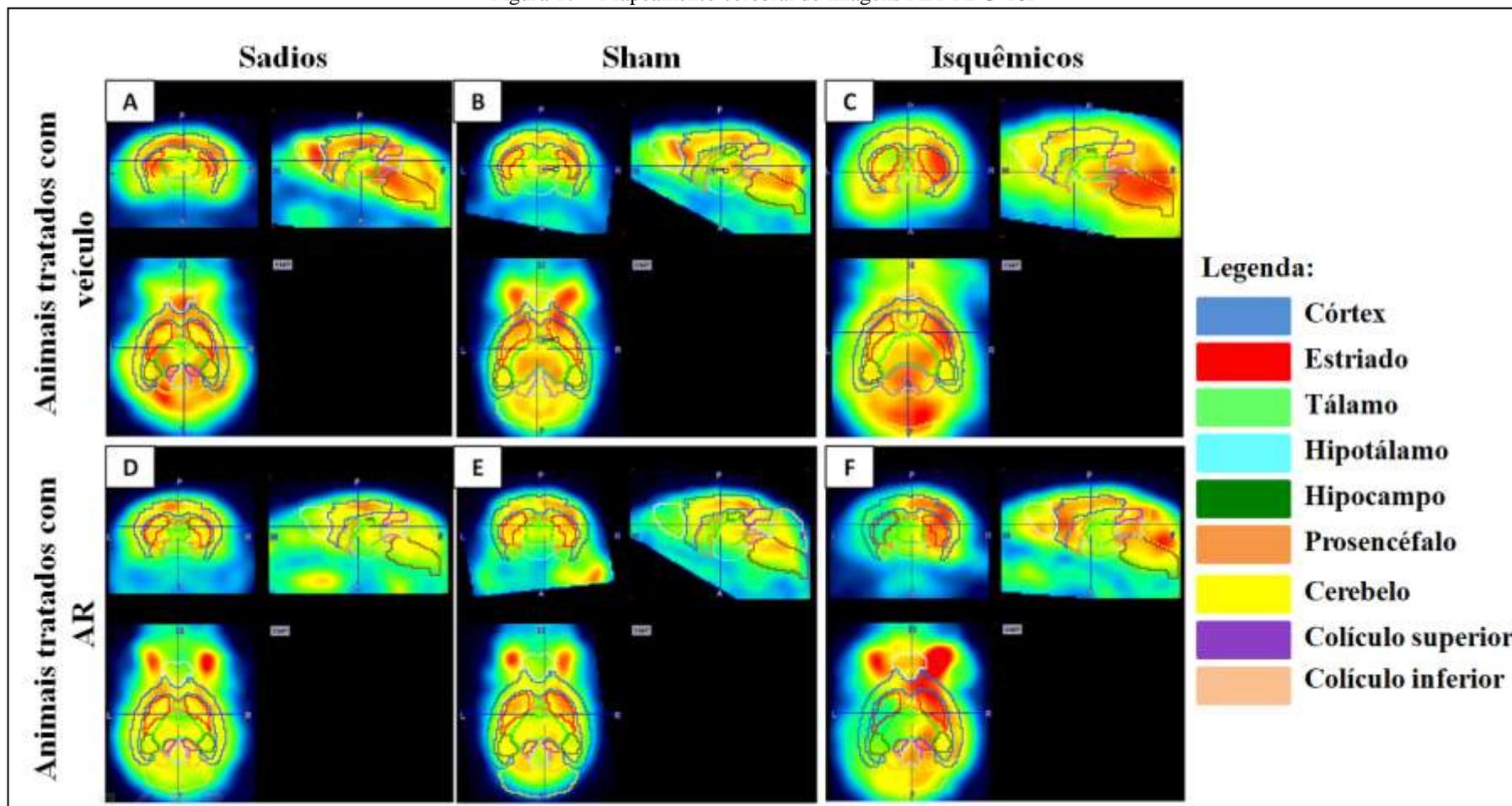
Figura 16 – Captação de FDG-18F normalizada pela captação do cérebro inteiro.





Análise comparativa da captação de FDG-18F nas regiões do estriado (A e B), córtex (C), hipocampo (D), tálamo (E), colículo superior e inferior (F e G). Nessas regiões, foi observada uma redução na captação de FDG-18F no cérebro de animais isquêmicos tratados com solução salina em comparação com animais saudáveis e / ou sham. Nas regiões do estriado, colículo superior e inferior, a captação do grupo isquêmico tratado com AR foi semelhante aos grupos sadio e / ou sham. Nas demais regiões, não houve indicativo de recuperação metabólica nos animais tratados com AR. A análise estatística foi realizada por teste t de Student com o auxílio do software Graphpad Prism 6. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 24, 5, 7$ e 4 , para sádios, sham, isquêmicos veículo e isquêmicos AR, respectivamente). ** $p < 0,006$, * $p < 0,04$.

Figura 17 – Mapeamento cerebral de imagens PET FDG-18F

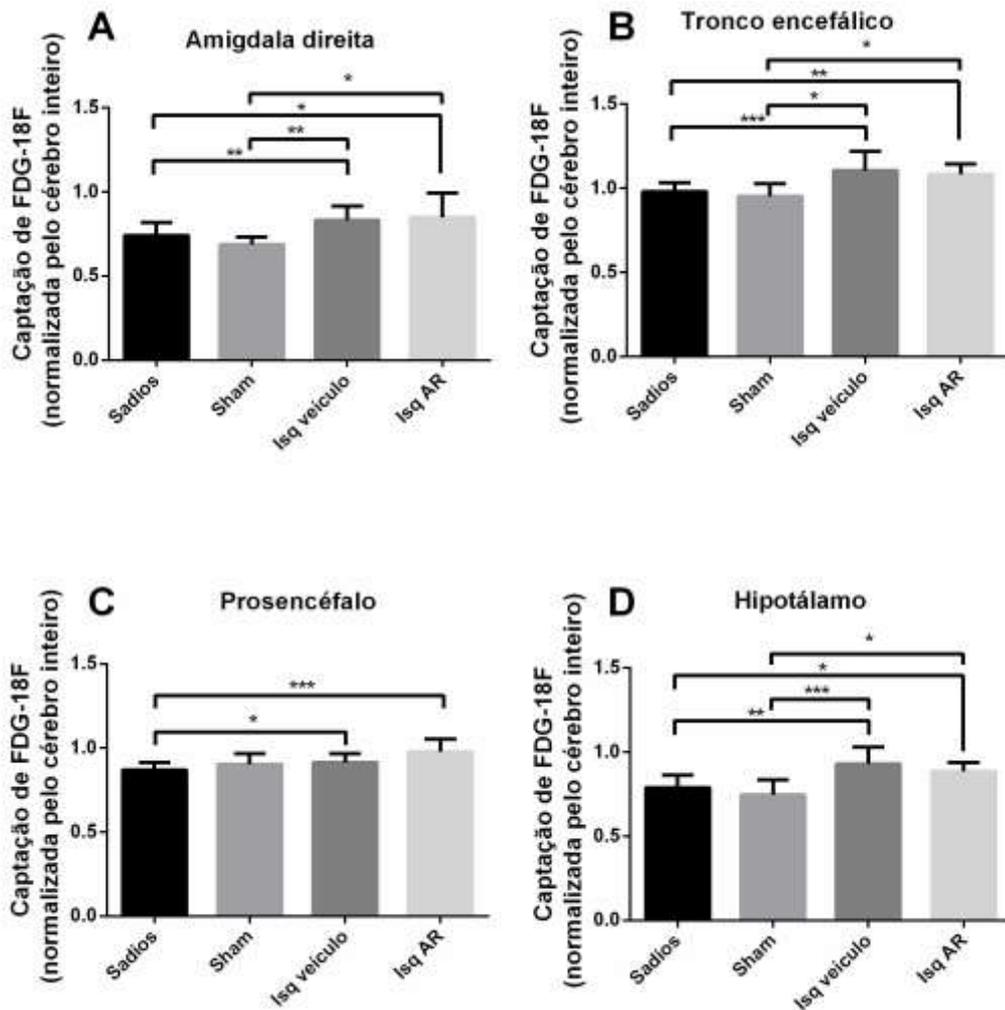


Fonte: A autora (2020).

Imagens representativas da captação cerebral de FDG-18F em cérebro de camundongo, mapeadas com o auxílio do Software PMOD. Na figura estão destacadas em diferentes cores, as regiões do cérebro mais visíveis. Em A-animal sadio tratado com veículo, B- animal sham tratado com veículo, C-animal isquêmico tratado com veículo, D-animal sadio tratado com AR, E- animal sham tratado com AR, F-animal isquêmico tratado com AR. Nas Figuras C e F podem ser observadas áreas de captação reduzida de FDG-18F, correspondentes às regiões do córtex, estriado hipocampo, tálamo, colículo superior e inferior.

Ainda de acordo com a análise semi-quantitativa de captação de FDG-18F, foi observado que das 14 regiões analisadas, 4 tiveram aumento de captação em relação ao grupo sadio e/ ou sham. Foram elas: amígdala ($p = 0,0098$), tronco encefálico ($p = 0,0003$), prosencéfalo ($p = 0,0331$) e hipotálamo ($p = 0,0003$). Os resultados podem ser vistos na Figura 18.

Figura 18 – Captação de FDG-18F normalizada pela captação do cérebro inteiro.



Análise comparativa da captação de FDG-18F nas regiões da amígdala direita (A), tronco encefálico (B), prosencéfalo (C) e hipotálamo (D). Nessas regiões, os dois grupos isquêmicos tiveram captação aumentada em comparação ao grupo sadio e / ou sham. A análise estatística foi realizada por teste t de *Student* com o auxílio do software *Graphpad Prism 6*. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 24, 5, 7$ e 4 , para sadio, sham, isquêmicos veiculo e isquêmicos AR). *** $p < 0,0004$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

A análise semi-quantitativa por PET FDG-18F, realizada 1 dia após a reperfusão, mostrou diferenças regionais no metabolismo glicolítico de animais isquêmicos tratados e não

tratados com AR. De acordo achados histológicos descritos em estudos científicos, as regiões mais afetadas pelo modelo BCCAO em camundongos C57BL/6 são córtex, estriado, hipocampo e tálamo (LÉON-MORENO et al., 2020; SVOBODA et al., 2019). Em concordância com esses estudos, nossos resultados mostraram captação reduzida nestas 4 regiões, além do colículo superior e inferior, nos animais isquêmicos tratados com veículo. Tais regiões de hipometabolismo puderam ser identificadas visualmente na coloração por TTC e confirmadas por análise semi-quantitativa baseada em VOIs.

Esses resultados reforçam o potencial diagnóstico da técnica PET FDG-18F na detecção e delineamento de lesões de isquemia e reperfusão, na fase aguda, em modelo global de AVC. Resultados semelhantes foram previamente descritos por Liang et al. e Zhang et al. Nesses estudos a técnica foi utilizada para acessar função cerebral e foi capaz de identificar, respectivamente, conectividade metabólica anormal e alterações significativas no metabolismo glicolítico, em modelos de AVC focal (LIANG et al., 2018; ZHANG et al., 2018).

Além da eficácia diagnóstica, a PET FDG-18F tem sido útil na avaliação de estratégias terapêuticas para o AVC isquêmico. Os resultados em termos de recuperação metabólica apresentados na Figura 16A, B, F e G, para as regiões do estriado, colículo superior e inferior dos animais isquêmicos tratados com AR, parecem seguir a mesma linha de estudos prévios realizados com esta finalidade. A técnica mostrou recuperação metabólica em animais submetidos a modelo de AVC focal após tratamento com eletroacupuntura (WU et al., 2017). Da mesma forma, mostrou aumento de captação em região infartada no hemisfério lesionado de ratos isquêmicos, após transplante de células tronco (WANG et al., 2013; ZHANG et al., 2015).

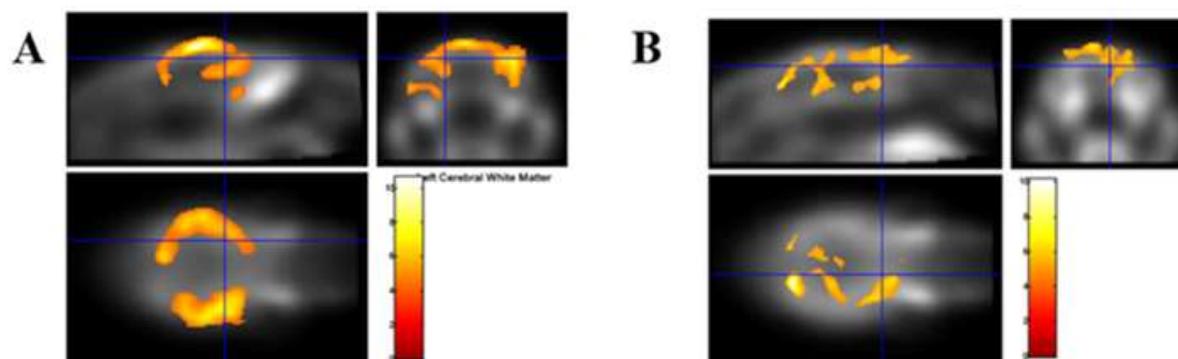
Quanto às regiões que apresentaram hipercaptação nos grupos isquêmicos (amígdala, tronco encefálico, septo basal do prosencéfalo e hipotálamo) é possível que esse aumento seja consequência de algum mecanismo compensatório. Resultados semelhantes foram relatados em estudo PET FDG-18F com ratos submetidos a modelo de AVC focal. Nesse estudo, foi observado um aumento no metabolismo glicolítico em regiões contralaterais do cérebro de animais isquêmicos, após indução de terapia de contenção de membro (recurso para estimular o uso do membro mais afetado pela isquemia). Acredita-se que esse efeito possa ser consequência de neurogênese ou aumento da expressão do GLUT-3 nessas áreas, como forma de sobrepor a deficiência funcional das regiões lesionadas (LI et al., 2017). Mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

4.3 Avaliação do efeito do ácido rosmarínico sobre a captação cerebral de FDG-18F por análise baseada em voxels

Com o objetivo de comparar os resultados obtidos pela análise baseada em VOIs, foi realizada análise baseada em voxels, através de mapeamento paramétrico estatístico, com o auxílio do software SPM.

Nesta análise também foi observada redução significativa na captação de FDG-18F no cérebro dos animais isquêmicos em comparação aos sadios. As áreas que apresentaram redução estatisticamente significativa de captação de FDG-18F estão apresentadas na Figura 19, fundidas em um *template* de imagem de FDG-18F de cérebro de camundongo.

Figura 19 – Mapa de contrastes das diferenças estatísticas relevantes entre os grupos isquêmicos x sádios.



Grupos	Nível Cluster		Coordenadas do voxel de pico (mm)				
	Nº	Tamanho do cluster (voxels)	P _{FWE}	P	x	y	z
Sádios x Isquêmicos veículo	1	13293	0,006	0,000	- 2,6	- 2,0	- 0,1
Sádios x Isquêmicos AR	1	7278	0,126	0,000	1,2	- 5,8	- 1,3

Comparação entre os grupos isquêmico veículo e sádios (A) e isquêmico AR e sádios (B). As informações qualitativas fornecidas pela imagem, associadas aos resultados mostrados na tabela, revelam, em A - que o grupo isquêmico tratado com solução salina apresentou captação reduzida de FDG-18F quando comparado ao grupo sadio (PFWE = 0,006). Em B, da mesma forma, os animais isquêmicos tratados com AR apresentaram captação reduzida em relação ao grupo saudável, mas com menor intensidade (P não corrigido <0,0001). Não foram observadas diferenças significativas quando comparados os grupos isquêmicos veículo e isquêmicos AR. P_{FWE} - valor p corrigido (*family wise error*); P - valor p não corrigido <0,0001.

As informações quantitativas apresentadas na Figura 19, acima, descrevem o número de clusters ($n^{\circ}=1$), que são os agrupamentos de voxels representando as regiões destacadas; o tamanho representado pelo número de voxels em cada cluster; P_{FWE} é o nível de confiança máximo para cada cluster corrigido para múltiplas comparações utilizando correção baseada na teoria do campo randômico (FWE, do inglês *family-wise error*); P é o valor p não corrigido; T o valor t máximo em cada cluster e x , y e z as coordenadas do voxel de pico em cada cluster. Os resultados corroboram os achados da análise de área necrótica e análise semi-quantitativa PET FDG-18F descritas previamente. No entanto, não foi possível evidenciar o efeito do pré-condicionamento com o AR, provavelmente devido ao número amostral reduzido neste estudo.

Apesar de ter a vantagem de ser orientado a dados e não a regiões de interesse previamente definidas, o mapeamento paramétrico estatístico pode trazer problemas de múltiplas comparações que aumentam a probabilidade de ocorrência de erros do tipo I (falso positivos) e que quando corrigidos resultam em perda de sensibilidade e consequentemente aumento da probabilidade de erros do tipo II (falso negativos) (WELCH et al., 2013). Foram considerados estatisticamente significativos apenas os resultados em que o p corrigido para FWE foi inferior a 0,05 e aqueles em que o p não corrigido foi inferior a 0,0001.

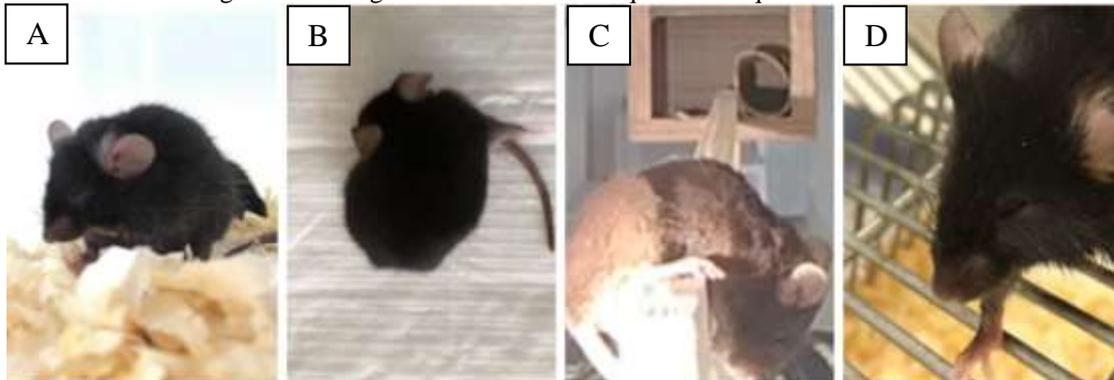
4.4 Avaliação do efeito do ácido rosmarínico sobre o índice de severidade de déficit neurológico

Com o objetivo de correlacionar o perfil das lesões cerebrais com a presença de déficit neurológico nos animais e um possível efeito do tratamento com AR, foi realizado teste comportamental com sistema *balance beam* e determinação de escore de severidade de déficit neurológico, antes da indução de isquemia e 1 dia após a reperusão.

Foi observado que os animais que passaram pela cirurgia BCCAO apresentaram redução da mobilidade, ptose palpebral, marcha atáxica, movimentação em círculos, postura encurvada, isolamento do grupo, vocalização e morte. Tais sintomas possuem correlação com o modelo de isquemia global e com os resultados observados na coloração por TTC (WAHUL et al., 2018)

Na Figura 20 são apresentadas imagens de animais em que foi induzida injúria isquêmica, na tentativa de demonstrar um pouco do que foi registrado em vídeo. Um comparativo entre os índices de déficit neurológico de cada grupo pode ser observado na Figura 21.

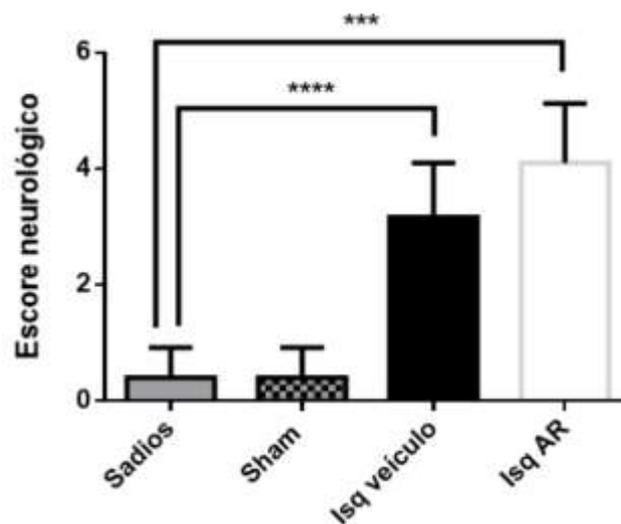
Figura 20 – Imagens de animais com sequelas de isquemia cerebral



Fonte: A autora (2019).

Em A, imagem de animal com postura encurvada e apresentando ptose palpebral; B, imagem de animal caminhando persistentemente em círculos; C, imagem de animal com déficit crítico, impossibilitado de realizar a travessia; D, imagem aproximada de animal apresentando ptose palpebral.

Figura 21 – Comparação entre as médias de escore neurológico



Fonte: A autora (2019).

Médias de valores de escore neurológico atribuídos com base no desempenho dos animais no teste *balance beam*. Análise estatística realizada por teste Mann-Whitney utilizando o software *Graphpad Prism 6*. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n = 10, 5, 7 e 4, para sadios, sham, isquêmico veículo e isquêmico AR, respectivamente). ****p < 0,0001; ***p = 0,0008.

Não foi observado em nosso estudo, efeito do AR no índice de déficit neurológico dos animais isquêmicos. Levando em consideração que estes animais apresentaram área de necrose diminuída após tratamento com AR, é possível que o número reduzido de amostras no grupo isquêmico tratado, tenha interferido negativamente neste resultado. A realização de um tratamento e avaliação mais prolongada do escore clínico poderiam ser uma alternativa interessante para observar melhor esses efeitos.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o pré-condicionamento com ácido rosmarínico, na dosagem intragástrica de 20mg/kg/dia, durante 7 dias, reduziu a área de infarto isquêmico em modelo global de AVC em camundongos C57BL/6, em concordância com estudos anteriores (ZHANG et al., 2017). Tais achados foram observados a partir da análise do percentual de área necrótica por TTC e corroborados por análise semi-quantitativa de metabolismo cerebral por PET FDG-18F. Em ambas as metodologias utilizadas para avaliar a captação de FDG-18F no cérebro (VOIs e SPM), foi possível observar redução metabólica coerente com o modelo proposto no cérebro dos animais isquêmicos, mas apenas na primeira foi possível observar tendência de recuperação no grupo isquêmico tratado com AR nas regiões do estriado, colículo superior e inferior.

Alguns estudos sobre a atuação do ácido rosmarínico em diferentes modelos de doença, como doença de Alzheimer e Parkinson, epilepsia do lobo temporal e dor neuropática, foram incluídos como fonte de discussão nesse estudo, por apresentarem em sua fisiopatologia processos também presentes no AVC em que já se observou efeito benéfico do AR. São eles, estresse oxidativo, sobrecarga intracelular de Ca^{2+} , inibição da translocação do fator-kB (FALLARINI et al., 2009). Além de efeito anti-inflamatório associado à regulação de citocinas pro-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$), interleucina 1- β (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6) (OSAKABE et al., 2004).

Rahbardar et al., descreveram o AR, como alternativa potencial ao tratamento de distúrbios neurológicos associados à inflamação, após comprovação de seu efeito como modulador da neuroinflamação em modelo de dor neuropática em ratos tratados com 40 mg/kg/dia, por via intraperitoneal, durante 14 dias. Foi observado, através de ensaios bioquímicos de Western blot, realizados 7 e 14 dias após a lesão, que os animais tratados com AR, apresentaram redução significativa de marcadores de inflamação, como: óxido nítrico, COX-2, IL-1 β e PGE-2 (GHASEMZADEH RAHBARDAR et al., 2017).

Em estudo para avaliação da capacidade de neuroreparação à toxicidade da 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), substância utilizada na indução de modelo murino de doença de Parkinson, o tratamento com AR em doses de 20 mg/kg/dia, durante 21 dias, por via intragástrica, suprimiu as alterações provocadas pelo agente agressor, restaurando o conteúdo de dopamina e de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase e regulando a expressão dos genes Bcl-2 e Bax aumentados pela 6-OHDA (WANG et al., 2012).

Doses de 16 a 32 mg/kg/dia de AR, administradas durante 30 dias por via intragástrica, preveniram o prejuízo cognitivo induzido por consumo crônico de etanol em testes de esQUIVA passiva para avaliar aprendizado e memória de ratos Wistar. O AR atuou inibindo o aumento

de peroxidação lipídica e nitrito, diminuindo também os níveis de SOD, CAT, GSH (glutathiona reduzida) e FRAP (potencial antioxidante redutor férrico). O efeito foi atribuído às propriedades antioxidantes do composto (HASANEIN; SEIFI; HAJINEZHAD, 2016).

Em modelo de epilepsia de lobo temporal provocado por injeção intrahipocampal de ácido caínico, o pré-tratamento com AR, na dosagem de 10 mg/kg/dia, por via intragástrica, reduziu o teor de malondialdeído (produto de peroxidação lipídica) e nitrito, aumentou a atividade da catalase e atuou inibindo a redução de neurônios nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo (KHAMSE et al., 2015).

A partir dos trabalhos citados acima, é possível concluir que ainda não existe um consenso em relação à dose, tempo de tratamento e via de administração ideal para o ácido rosmarínico. No entanto, os efeitos observados em relação à redução de dano neuronal na injúria de isquemia e reperfusão cerebral, a partir das propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do composto, parecem ser consistentes.

Embora os resultados aqui descritos não tenham divergido dos trabalhos de referência, é possível que um maior número de animais ou ainda uma dose superior de AR, pudessem ter proporcionado um efeito mais evidente.

É provável que o potencial de atividade biológica do ácido rosmarínico, embora já comprovado em termos de redução de danos neurológicos e modulação de expressão de citocinas pró-inflamatórias e de marcadores de oxidação, não esteja sendo totalmente aproveitado devido à sua baixa disponibilidade em termos de farmacodinâmica. Fazendo-se necessário o desenvolvimento de estratégias e vias de administração alternativas que possam garantir a entrega de doses maiores, de forma segura, ao SNC (FACHEL et al., 2019; FARR et al., 2016; KUO; RAJESH, 2017; LEE et al., 2016b).

5 CONCLUSÃO

Concluiu-se que o pré-tratamento com AR, na dosagem de 20 mg/kg/dia (i.g), teve efeito neuroprotetor, reduzindo a área de infarto cerebral de animais submetidos a modelo global de isquemia e reperfusão. A técnica PET FDG-18F provou ser útil na detecção e diferenciação de lesão de isquemia e reperfusão cerebral e sensível o suficiente para detectar a recuperação metabólica em animais tratados com AR em regiões específicas do cérebro. É possível que um estudo de maior duração e número de animais pudesse apresentar resultados mais expressivos em relação ao efeito do AR nas demais regiões do cérebro isquêmico.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Realização de experimentos adicionais por um período de tempo mais longo visando analisar os efeitos da reperfusão em sua fase tardia, bem como a eficiência do tratamento com AR nessa fase. Sugere-se análises durante 15 dias, eventualmente mais, dependendo dos resultados.
- Utilização de fluxometria por laser Doppler para o estabelecimento de valores padronizados de redução e restabelecimento do fluxo sanguíneo cerebral, durante a cirurgia, conforme estudo realizado por Speetzen e colaboradores (SPEETZEN; ENDRES; KUNZ, 2013).
- Realização de estudos histológicos e bioquímicos adicionais associados às análises quantitativas de imagens PET.

REFERÊNCIAS

- ALKAM, T. et al. A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by A β 25-35. **Behavioural Brain Research**, v. 180, n. 2, p. 139–145, jun. 2007.
- ALLEN, C. L.; BAYRAKTUTAN, U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. **International Journal of Stroke**, v. 4, n. 6, p. 461–470, 2009.
- BACKES, H. et al. Glucose consumption of inflammatory cells masks metabolic deficits in the brain. **NeuroImage**, v. 128, p. 54–62, 2016.
- BAI, J.; GAO, Y.; GAO, Y. H. Effect of Pei Yuan Tong Nao capsules on neuronal function and metabolism in cerebral ischemic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 238, n. March, p. 111837, 2019.
- BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453–460, 2014.
- BARON, J. C. Mapping the ischaemic penumbra with PET: Implications for acute stroke treatment. **Cerebrovascular Diseases**, v. 9, n. 4, p. 193–201, jul. 1999.
- BARON, J. C. **Protecting the ischaemic penumbra as an adjunct to thrombectomy for acute stroke**. **Nature Reviews Neurology**. Nature Publishing Group, jun. 2018.
- BENEDEK, A. et al. Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phases of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. **Brain Research**, v. 1116, n. 1, p. 159–165, 2006.
- BEUTHIEN-BAUMANN, B. et al. Preparation of fluorine-18 labelled sugars and derivatives and their application as tracer for positron-emission-tomography. **Carbohydrate Research**, v. 327, n. 1–2, p. 107–118, 2000.
- GOMES VALLI, L. **Mecanismo de ação do glutamato no sistema nervoso central e a relação com doenças neurodegenerativas**. **Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria**. v.18, n.1, 2014
- BROMLEY-BRITS, K.; DENG, Y.; SONG, W. Morris Water Maze Test for Learning and Memory Deficits in Alzheimer's Disease Model Mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 53, jul. 2011.
- BROOKS, S. P.; DUNNETT, S. B. Tests to assess motor phenotype in mice : a user's guide. **Nature Publishing Group**, v. 10, n. 7, p. 519–529, 2009.
- CAO, Y.; PRESCOTT, S. M. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v. 190, n. 3, p. 279–286, 2002.
- CHARAN, J.; KANTHARIA, N. How to calculate sample size in animal studies? **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, out. 2013.

COCHRAN, W G; PAUL CHAMBERS, S. The Planning of Observational Studies of Human Populations. **Journal of the Royal Statistical Society**. v. 128, n.2, 1965

CUI, H. Y. et al. Rosmarinic acid elicits neuroprotection in ischemic stroke via Nrf2 and heme oxygenase 1 signaling. **Neural Regeneration Research**, v. 13, n. 12, p. 2119–2128, dez. 2018.

CUI, Y. et al. NeuroImage A voxel-based analysis of brain activity in high-order trigeminal pathway in the rat induced by cortical spreading depression. **NeuroImage**, v. 108, p. 17–22, 2015.

DOEPPNER, T. R. et al. Effects of neural progenitor cells on post-stroke neurological impairment — a detailed and comprehensive analysis of behavioral tests. **Frontiers in cellular neurosciences**. v. 8, n. October, p. 1–15, 2014.

FACHEL, F. N. S. et al. An overview of the neuroprotective potential of rosmarinic acid and its association with nanotechnology-based delivery systems: A novel approach to treating neurodegenerative disorders. **Neurochemistry International**. jan. 2019.

FALLARINI, S. et al. Clovamide and rosmarinic acid induce neuroprotective effects in in vitro models of neuronal death. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 6, p. 1072–1084, 2009.

FARR, S. A. et al. Effect of botanical extracts containing carnosic acid or rosmarinic acid on learning and memory in SAMP8 mice. **Physiology and Behavior**, v. 165, p. 328–338, 2016.

FAWDRY, R. M. Radiolysis of 2-[18F]fluoro-2-deoxy-d-glucose (FDG) and the role of reductant stabilisers. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 65, n. 11, p. 1193–1201, 2007.

FERLEMI, A. V. et al. Rosemary tea consumption results to anxiolytic- and anti-depressant-like behavior of adult male mice and inhibits all cerebral area and liver cholinesterase activity; Phytochemical investigation and in silico studies. **Chemico-Biological Interactions**, v. 237, p. 47–57, jul. 2015.

FERNANDES, M.; SATO, J.; BUSATTO, G. Mapeamento Estatístico Paramétrico das Alterações Estruturais Cerebrais devido à Doença de Alzheimer e ao Transtorno Cognitivo Leve. **Fei.Edu.Br**, p. 22–27, 2011.

FONDEVILA, C.; BUSUTTIL, R. W.; KUPIEC-WEGLINSKI, J. W. Hepatic ischemia/reperfusion injury - A fresh look. **Experimental and Molecular Pathology**. Academic Press Inc., 2003.

FONTELES, A. A. et al. Rosmarinic acid prevents against memory deficits in ischemic mice. **Behavioural Brain Research**, v. 297, p. 91–103, jan. 2016.

FRISTON, K. et al. Statistical Parametric Maps in Functional Imaging: A General Linear Approach. **Human Brain Mapping**. v. 2, p. 189–210, 1995

FRISTON, K. A Short History of SPM. In: **Statistical Parametric Mapping: The Analysis of Functional Brain Images**. Elsevier Ltda. 2007

FUEGER, B. J. et al. Impact of animal handling on the results of ¹⁸F-FDG PET studies in mice. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 47, n. 6, p. 999–1006, 2006.

GARCIA, D. V. et al. A standardized method for the construction of tracer specific PET and SPECT rat brain templates: Validation and implementation of a toolbox. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, mar. 2015.

GHASEMZADEH RAHBARDAR, M. et al. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. and rosmarinic acid in a rat model of neuropathic pain. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 86, p. 441–449, 2017.

GREWER, C.; RAUEN, T. Electrogenic glutamate transporters in the CNS: Molecular mechanism, pre-steady-state kinetics, and their impact on synaptic signaling. **Journal of Membrane Biology**, jan. 2005.

HASANEIN, P.; SEIFI, R.; HAJINEZHAD, M. R. induced learning and memory deficits in rats Rosmarinic acid protects against chronic ethanol-induced learning and memory deficits in rats. **Nutritional Neuroscience**. 2016.

KHAMSE, S. et al. Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect in the kainate rat model of temporal lobe epilepsy: Underlying mechanisms. **Pharmaceutical Biology**, 2015.

KHOSHNAM, S. E. et al. Vanillic acid attenuates effects of transient bilateral common carotid occlusion and reperfusion in rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 96, p. 667–674, dez. 2017.

KUO, Y. C.; RAJESH, R. Targeted delivery of rosmarinic acid across the blood–brain barrier for neuronal rescue using polyacrylamide-chitosan-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles with surface cross-reacting material 197 and apolipoprotein E. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 528, n. 1–2, p. 228–241, ago. 2017.

LANCELOT, S.; ZIMMER, L. Small-animal positron emission tomography as a tool for neuropharmacology. **Trends in Pharmacological Sciences**, set. 2010.

LEE, A. Y. et al. The neuro-protective effect of the methanolic extract of *Perilla frutescens* var. japonica and rosmarinic acid against H₂O₂-induced oxidative stress in C6 glial cells. **Biomolecules and Therapeutics**, 2016a.

LEE, A. Y. et al. *Perilla frutescens* var. japonica and rosmarinic acid improve amyloid- β 25-35 induced impairment of cognition and memory function. **Nutrition Research and Practice**, v. 10, n. 3, 2016b.

LEÓN-MORENO, L. C. et al. Challenges and Improvements of Developing an Ischemia Mouse Model Through Bilateral Common Carotid Artery Occlusion. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 29, n. 5, 2020.

LI, M. et al. Rosmarinic acid ameliorates hypoxia / ischemia induced cognitive deficits and promotes remyelination. 2019.

LIANG, S. et al. Abnormal Metabolic Connectivity in Rats at the Acute Stage of Ischemic

Stroke. **Neurosci Bull.** 2018.

LIU, S.; SUN, J.; LI, Y. The Neuroprotective Effects of Resveratrol Preconditioning in Transient Global Cerebral Ischemia-Reperfusion in Mice. **Turkish neurosurgery**, v. 26, n. 4, p. 550–555, 2016.

LONSDALE, M. N.; BEYER, T. Dual-modality PET/CT instrumentation-Today and tomorrow. **European Journal of Radiology**, v. 73, n. 3, p. 452–460, 2010.

LUAN, H. et al. Rosmarinic acid protects against experimental diabetes with cerebral ischemia: Relation to inflammation response. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10, fev. 2013.

LUONG, T. N. et al. Assessment of Motor Balance and Coordination in Mice using the Balance Beam. **Journal of Visualized Experiments**, n. 49, p. 5–7, 2011.

MAJID, A. Neuroprotection in Stroke: Past, Present, and Future. **ISRN Neurology**, v. 2014, p. 1–17, jan. 2014.

MIGUEL, M. P.; MENEZES, L. B. DE; ARAÚJO, E. G. Fisiopatologia do estresse oxidativo após isquemia e reperfusão cerebral e potencial neuroproteção do pequi (caryocar brasiliense). **Enciclopédia biosfera**, v.8, n. 15, p. 1960, 2012.

MIOT, H. A. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. **J Vasc Bras**, v. 10, n. 4, 2011.

NUNES, S. et al. Therapeutic and Nutraceutical Potential of Rosmarinic Acid - Cytoprotective Properties and Pharmacokinetic Profile. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. July, 2015.

ONKEN, M.; BERGER, S.; KRISTIAN, T. NIH Public Access. **J Neurosci Methods**, v. 204, n. 2, p. 254–261, 2012.

OSAKABE, N. et al. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: Anticarcinogenic effect of Perilla frutescens extract in the murine two-stage skin model. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 4, p. 549–557, abr. 2004.

PETERSEN, M.; SIMMONDS, M. S. J. Molecules of Interest: Rosmarinic acid. **Phytochemistry**, v. 62, p. 121-125, 2003

PRANDO, S. et al. Methods for quantification of cerebral glycolytic metabolism using 2-deoxy-2-[18 F]fluoroglucose in small animals. **Research on Biomedical Engineering**, v. 34, n. 3, p. 254–272, set. 2018.

RAMALHO, L. N. Z. et al. Rosmarinic acid attenuates hepatic ischemia and reperfusion injury in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 74, p. 270–278, 2014.

RODRIGO, R. et al. Oxidative Stress and Pathophysiology of Ischemic Stroke: Novel Therapeutic Opportunities. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 12, n. 5, p. 698–714, 2013.

SATTLER, B. et al. PET/CT (and CT) instrumentation, image reconstruction and data transfer for radiotherapy planning. **Radiotherapy and Oncology**, 2010.

SILVA, B. et al. The 5-lipoxygenase (5-LOX) Inhibitor Zileuton Reduces Inflammation and Infarct Size with Improvement in Neurological Outcome Following Cerebral Ischemia. **Current Neurovascular Research**, v. 12, n. 4, p. 398–403, 2015.

SINGH, V.; KRISHAN, P.; SHRI, R. Improvement of memory and neurological deficit with *Ocimum basilicum* L. extract after ischemia reperfusion induced cerebral injury in mice. **Metabolic Brain Disease**, v. 33, n. 4, p. 1111–1120, 2018.

SPEETZEN, L. J.; ENDRES, M.; KUNZ, A. Bilateral Common Carotid Artery Occlusion as an Adequate Preconditioning Stimulus to Induce Early Ischemic Tolerance to Focal Cerebral Ischemia. **Journal of Visualized Experiments**, n. 75, maio 2013.

STANLEY, J. L. et al. The mouse beam walking assay offers improved sensitivity over the mouse rotarod in determining motor coordination deficits induced by benzodiazepines. **Journal of Psychopharmacology**. v. 19, n. 3, p. 221-227, 2005.

SUN, M. et al. Free radical damage in ischemia reperfusion injury: An obstacle in acute ischemic stroke after revascularization therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2018

TERASHIMA, T. et al. Consistent injury in the striatum of C57BL/6 mice after transient bilateral common carotid artery occlusion. **Neurosurgery**, v. 43, n. 4, p. 900–907, 1998.

TOSCANO, E. C. DE B. et al. Platelet-activating factor receptor (PAFR) plays a crucial role in experimental global cerebral ischemia and reperfusion. **Brain Research Bulletin**, v. 124, p. 55–61, 2016.

TYMIANSKI, M. Combining Neuroprotection with Endovascular Treatment of Acute Stroke: Is There Hope? **Stroke**, 2017

VAARMANN, A. et al. Dopamine protects neurons against glutamate-induced excitotoxicity. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 1, jan. 2013.

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

WELCH, A. et al. Mapping Changes in Mouse Brain Metabolism with PET / CT. **J Nucl Med**, v. 54, n. 11, p. 1946–1954, 2013.

WU, C. et al. A forebrain ischemic preconditioning model established in C57Black/Crj6 mice. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 107, n. 1–2, p. 101–106, maio 2001.

WU, L. et al. Dual anti-ischemic effects of rosmarinic acid n-butyl ester via alleviation of DAPK-p53-mediated neuronal damage and microglial inflammation. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 38, n. 4, p. 459–468, abr. 2017.

YOON, J. S. et al. 3,6' - Dithiothalidomide improves experimental stroke outcome cy

suppressing neuroinflammation. **J Neurosci Res**, v. 91(5), n. 1, p. 671–680, 2013.

YU, S. Review of 18F-FDG synthesis and quality control. **Biomedical Imaging and Intervention Journal**, v. 2, n. 4, 2006.

ZHANG, M. et al. Rosmarinic acid protects rat hippocampal neurons from cerebral ischemia/reperfusion injury via the Akt/JNK3/caspase-3 signaling pathway. **Brain Research**, v. 1657, p. 9–15, 2017.

ZHANG, T. et al. Modular architecture of metabolic brain network and its effects on the spread of perturbation impact. **J. Neuroimage**, 2018

ZHAO, X. et al. The effects of bilateral common carotid artery occlusion on expression of peripherin and choline acetyltransferase activity in C57BL/6 mice. **Brain Research**, v. 1491, p. 167–175, 2013.

**ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DE USO
DE ANIMAIS DO CENTRO DE DESENVOLVIMENTO DA TECNOLOGIA
NUCLEAR**



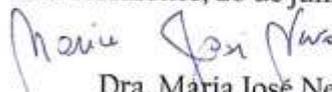
Comissão de Ética de Uso de Animais
Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
CEUA/CDTN

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada *Avaliação do potencial neuroprotetor do ácido rosmarínico no tratamento de lesões de isquemia e reperfusão cerebral por micropet*, registrada com o protocolo nº 003/17, que tem como responsável, *Carlos Malamut*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS DO CDTN, em reunião de 26/06/2017.

Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa
Vigência da autorização: 27/06/2022
Espécie/linhagem/raça: Mus musculus/raça C57Bl/6
Nº de animais: 192
Peso/Idade: 25-30g/9 a 11 semanas
Sexo: (x) macho () fêmea
Origem: Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas –
CEBIO/UFMG

Belo Horizonte, 26 de junho de 2017.


Dra. Maria José Neves
Sub-Coordenadora do CEUA/CDTN

ANEXO B – CÁLCULO DO NÚMERO AMOSTRAL

A estimativa do número ideal de animais a serem utilizados no estudo foi calculada por amostragem aleatória simples, com base no modelo de Cochran (COCHRAN, W G; PAUL CHAMBERS, 1965), conforme a Equação 1, abaixo:

$$n = 1 + \left[2C \cdot \left(\frac{s}{d} \right)^2 \right] \quad (1)$$

Em que o valor de C varia de acordo com o valor de força ou poder escolhido para o teste e com o nível de significância empregado, podendo ser calculado pela Equação 2. s e d representando, respectivamente, o desvio padrão aceitável e a diferença esperada entre os grupos, valores estes obtidos a partir de estudos semelhantes na literatura científica (CHARAN; KANTHARIA, 2013; MIOT, 2011).

$$C = (z\alpha + z\beta)^2 \quad (2)$$

O poder do teste ($1-\beta$) representa a chance de encontrar uma diferença existente, e o nível de significância (α), a chance de considerar dois grupos diferentes quando eles não são. Os valores de z foram obtidos a partir da tabela de distribuição normal padrão, demonstrada no Anexo A. Considerando um intervalo de confiança de 0,95, foi localizado na tabela o valor de 0,475 e somados os valores da linha (1,9) e coluna (0,06) correspondentes, totalizando **1,96**. Neste estudo, optou-se por considerar um poder de teste de 80%, para o qual o valor de $z\beta$ estabelecido em literatura é de 0,84 (CHARAN; KANTHARIA, 2013; MIOT, 2011). O cálculo pode ser observado na Equação 3.

$$C = (1,96 + 1,282)^2 = 10,51 \quad (3)$$

Logo, considerando um desvio máximo s de 0,45 (45%) e uma diferença esperada entre os grupos d de 0,8, temos:

$$n = 1 + \left[2 \cdot 10,51 \cdot \left(\frac{0,45}{0,8} \right)^2 \right] = 7,65 \quad (4)$$

Sendo $n = 7,65$ ou 8, este deveria ser o número mínimo de animais a ser utilizado em cada grupo do estudo, totalizando 48 animais divididos aleatoriamente em 6 grupos. Considerando ainda o grau de invasividade do procedimento em questão, e com base em experiências prévias do grupo de pesquisa com outros modelos animais, foi considerado um percentual de perda de 50%, a ser acrescido no número final, calculado pela Equação 5 (CHARAN; KANTHARIA, 2013; MIOT, 2011).

$$n_{\text{corrigido}} = \frac{n}{\left[1 - \left[\frac{\text{percentualdeperda}}{100}\right]\right]} = \frac{48}{\left[1 - \left[\frac{50}{100}\right]\right]} = 96 \text{animais} \quad (5)$$

ANEXO C – TABELA DE DISTRIBUIÇÃO NORMAL PADRÃO (Z)

Standard Normal Probabilities										
para calcular α :										
z	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09
0	0	0.004	0.008	0.012	0.016	0.0199	0.0239	0.0279	0.0319	0.0359
0.1	0.0398	0.0438	0.0478	0.0517	0.0557	0.0596	0.0636	0.0675	0.0714	0.0753
0.2	0.0793	0.0832	0.0871	0.091	0.0948	0.0987	0.1026	0.1064	0.1103	0.1141
0.3	0.1179	0.1217	0.1255	0.1293	0.1331	0.1368	0.1406	0.1443	0.148	0.1517
0.4	0.1554	0.1591	0.1628	0.1664	0.17	0.1736	0.1772	0.1808	0.1844	0.1879
0.5	0.1915	0.195	0.1985	0.2019	0.2054	0.2088	0.2123	0.2157	0.219	0.2224
0.6	0.2257	0.2291	0.2324	0.2357	0.2389	0.2422	0.2454	0.2486	0.2517	0.2549
0.7	0.258	0.2611	0.2642	0.2673	0.2704	0.2734	0.2764	0.2794	0.2823	0.2852
0.8	0.2881	0.291	0.2939	0.2967	0.2995	0.3023	0.3051	0.3078	0.3106	0.3133
0.9	0.3159	0.3186	0.3212	0.3238	0.3264	0.3289	0.3315	0.334	0.3365	0.3389
1	0.3413	0.3438	0.3461	0.3485	0.3508	0.3531	0.3554	0.3577	0.3599	0.3621
1.1	0.3643	0.3665	0.3686	0.3708	0.3729	0.3749	0.377	0.379	0.381	0.383
1.2	0.3849	0.3869	0.3888	0.3907	0.3925	0.3944	0.3962	0.398	0.3997	0.4015
1.3	0.4032	0.4049	0.4066	0.4082	0.4099	0.4115	0.4131	0.4147	0.4162	0.4177
1.4	0.4192	0.4207	0.4222	0.4236	0.4251	0.4265	0.4279	0.4292	0.4306	0.4319
1.5	0.4332	0.4345	0.4357	0.437	0.4382	0.4394	0.4406	0.4418	0.4429	0.4441
1.6	0.4452	0.4463	0.4474	0.4484	0.4495	0.4505	0.4515	0.4525	0.4535	0.4545
1.7	0.4554	0.4564	0.4573	0.4582	0.4591	0.4599	0.4608	0.4616	0.4625	0.4633
1.8	0.4641	0.4649	0.4656	0.4664	0.4671	0.4678	0.4686	0.4693	0.4699	0.4706
1.9	0.4713	0.4719	0.4726	0.4732	0.4738	0.4744	0.475	0.4756	0.4761	0.4767
2	0.4772	0.4778	0.4783	0.4788	0.4793	0.4798	0.4803	0.4808	0.4812	0.4817
2.1	0.4821	0.4826	0.483	0.4834	0.4838	0.4842	0.4846	0.485	0.4854	0.4857
2.2	0.4861	0.4864	0.4868	0.4871	0.4875	0.4878	0.4881	0.4884	0.4887	0.489
2.3	0.4893	0.4896	0.4898	0.4901	0.4904	0.4906	0.4909	0.4911	0.4913	0.4916
2.4	0.4918	0.492	0.4922	0.4925	0.4927	0.4929	0.4931	0.4932	0.4934	0.4936
2.5	0.4938	0.494	0.4941	0.4943	0.4945	0.4946	0.4948	0.4949	0.4951	0.4952
2.6	0.4953	0.4955	0.4956	0.4957	0.4959	0.496	0.4961	0.4962	0.4963	0.4964
2.7	0.4965	0.4966	0.4967	0.4968	0.4969	0.497	0.4971	0.4972	0.4973	0.4974
2.8	0.4974	0.4975	0.4976	0.4977	0.4977	0.4978	0.4979	0.4979	0.498	0.4981
2.9	0.4981	0.4982	0.4982	0.4983	0.4984	0.4984	0.4985	0.4985	0.4986	0.4986
3	0.4987	0.4987	0.4987	0.4988	0.4988	0.4989	0.4989	0.4989	0.499	0.499

The values in the table are the areas between zero and the z-score. That is, $P(0 < Z < z\text{-score})$