



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA ANIMAL COMPARADA



**INVESTIGAÇÃO DE POSSÍVEIS EFEITOS NEUROPROTETORES
DA BOLDINA EM RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS À HEMORRAGIA
INTRACEREBRAL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Kamila Ferreira Loureiro

Rio Grande, RS, Brasil

2013

**INVESTIGAÇÃO DE POSSÍVEIS EFEITOS NEUROPROTETORES
DA BOLDINA EM RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS À HEMORRAGIA
INTRACEREBRAL**

POR

Kamila Ferreira Loureiro

Dissertação apresentada ao programa de Pós – Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada da Universidade Federal de Rio Grande (FURG) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fisiologia Animal Comparada.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Horn

DEDICO:

**Aos meus pais, minha mana e a todos os
meus amigos que muito me apoiaram
durante esse dois anos...**

“Tudo tem seu tempo, até certas manifestações mais vigorosas e originais entram em voga ou saem de moda. Mas a sabedoria tem uma vantagem: é eterna.”

Baltasar Gracián

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Rio Grande e ao programa de Pós-Graduação, pela oportunidade de realizar este curso;

A CAPES, pela bolsa de mestrado e as Professoras Carine Corcini e Carla Amorin pela bolsa do projeto Reuni.

Agradeço a Deus, minha força sempre presente em todas as horas e por ter colocado em meu caminho pessoas maravilhosas que tive a oportunidade de conviver por esses 2 anos.

A minha família: pai, mãe e mana, pelo carinho, amor e compreensão nas minhas ausências. Agradeço especialmente ao meu pai por sempre ter me incentivado a seguir o caminho da pesquisa, pelas palavras que me confortavam na minha angústia e por sempre estarem presentes. Esta conquista é para vocês!

A prof^a. Dr^a. Ana Paula Horn, minha orientadora, com quem tive a oportunidade de conviver durante esses dois anos, que me passou seus conhecimentos e experiências, que além de mestre, foi amiga, e em sua amizade, me compreendeu nos meus momentos mais angustiantes e de incertezas, me aconselhou e me incentivou a seguir o caminho que escolhi. Obrigada pelos bons momentos que passamos juntas!!! Ana, expresso a ti o meu sincero agradecimento, o meu carinho e meu respeito. A você, meu simples, mas eterno obrigada!

Aos meus bolsistas e amigos Marcos, Magno, Suellen, Débora e Matheus pela ajuda incondicional, companheirismo e dedicação na realização dos experimentos. Muito obrigada por tudo, vocês foram fundamentais na execução deste trabalho. As minhas colegas de mestrado, Aline e Maria Fernanda, pela amizade e carinho!

Jamais poderia deixar de registrar o meu agradecimento e carinho para minha grande amiga, colega de faculdade, iniciação científica e de pós-

graduação, além de companheira de viagens no percurso Pelotas- Rio Grande, a Gisele. Quero dizer que você foi muito importante nesta minha caminhada, nunca mediu esforços para estar sempre presente, tanto nas horas boas e ruins. Gisele, talvez um muito obrigado fosse pouco para retribuir toda tua ajuda!! Desejo muito sucesso na tua caminhada!!!!

A todos os colegas, professores e funcionários do PPG-FAC FURG, obrigada pela amizade de cada um, pelos conhecimentos ensinados;

A todo pessoal do Laboratório de Neurociências (LabNeuro) pelos bons momentos de convivência, pelas ideias trocadas e colaboração neste trabalho. Meu agradecimento especial ao Gustavo e a Lidiane que nunca mediram esforços e sempre estiveram dispostos a ajudar na realização deste trabalho. Vocês são 10!! Meu simples, mas obrigada de coração;

Ao Juliano, meu amor, meu amigo, pela paciência, compreensão nas minhas ausências e por sempre ter uma palavra de apoio;

Aos laboratoristas, Carol, Gianne e “Black”, pela amizade e dedicação sempre que precisei.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Jardim, pela amizade e colaboração neste trabalho;

A Prof^a. Dr^a. Daniela Barros pela amizade, colaboração e por todos os conselhos. Dani, obrigada por tudo!

Enfim, agradeço a todos que, de uma maneira ou de outra, a mim dedicaram seu tempo e esforço, pelas críticas que me ajudaram e ainda ajudarão a crescer. A todos vocês que fizeram parte da minha vida, meu **MUITO OBRIGADA!!**

RESUMO

LOUREIRO, Kamila Ferreira. **Investigação de possíveis efeitos neuroprotetores da boldina em ratos *wistar* submetidos à hemorragia intracerebral**. 2013. 80p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

A hemorragia intracerebral (HI) que resulta da ruptura espontânea de um vaso intracerebral, é um subtipo de acidente vascular cerebral com alta taxa de morbidade e mortalidade, correspondendo a 15% das mortes por isquemia cerebral no mundo. A boldina ((S)-2,9-dihidroxi-1, 10-dimetoxi-aporphina) é um alcaloide obtido do *Peumus boldus* Molina, conhecido por suas propriedades citoprotetoras e antioxidantes. Funções motoras e parâmetros morfológicos foram avaliados em ratos *Wistar* machos submetidos à HI induzida por injeção de colagenase tipo VII. A boldina foi administrada em dose única através da injeção intraperitoneal 4 horas após a HI. No teste do campo aberto, os animais tratados com as maiores doses de boldina (50 e 75 mg/kg) demonstraram resultados semelhantes aos observados no grupo controle. Não foram observadas melhoras na atividade locomotora dos animais no teste do *footfault* (teste de motricidade em grade) realizado 24 horas após a HI. Já quando avaliados 96 h após a HI os animais dos grupos tratados com as maiores doses de boldina (50 e 75 mg/kg) apresentaram uma melhora significativa na motricidade. No teste do *Beam walking* (teste de equilíbrio e locomoção na barra), realizado 48 e 96 horas após a HI, demonstrou que o grupo colagenase (Col), tanto em 48 quanto em 96 horas obteve escores baixos, indicando um déficit locomotor acentuado comparado com os grupos tratados com boldina. Dados morfológicos foram avaliados através da análise histológica de fatias cerebrais coradas com hematoxilina-eosina e nenhuma alteração no tamanho do hematoma e no número de células inflamatórias foi observada entre os animais submetidos à HI ou os que receberam boldina. Esses dados sugerem que a administração de boldina pode reverter o dano motor neste modelo experimental, embora poucas alterações morfológicas tenham sido observadas após 96 horas. Mais estudos são necessários para investigar o mecanismo de ação deste composto.

Palavras chave: Boldina, Hemorragia Intracerebral, atividade locomotora, hematoma.

ABSTRACT

LOUREIRO, Kamila Ferreira. **Investigação de possíveis efeitos neuroprotetores da boldina em ratos *wistar* submetidos à hemorragia intracerebral.** 2013. 80p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

Intracerebral hemorrhage (ICH), which results from the spontaneous rupture of an intracranial vessel, is a subtype of stroke with high morbidity and mortality accounting for about 15% of all deaths from stroke. Boldine ((S)-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxi-aporphine), an alkaloid obtained from *Peumus boldus* Molina, is known by its antioxidant and cytoprotective properties. Motor function and morphological parameters were accessed from male Wistar rats submitted to collagenase VII-induced ICH followed by a single intraperitoneal injection of boldine four hours after the lesion. In the open field test the animals treated with the higher doses of boldine (50 mg/kg and 75 mg/kg) showed results similar to those observed in the control group. In the footfault test recovery was not observed 24 hours after ICH. However, after 96 hours, recovery was increased in the animals treated with the higher doses of boldine. In the beam walking test, performed 48 and 96 hours after ICH, animals submitted to ICH slipped at least three times crossing the beam, being boldine able to partially reverse these slips. Morphological data were accessed by fresh and histological analysis of brain slices and no changes in hematoma size and number of inflammatory cells were observed among animals submitted to collagenase-induced ICH. These data suggest that boldine administration recovers motor function in this experimental model, although no significant morphological changes were observed after 96 hours. More studies are necessary to investigate the mechanisms of action of this drug.

Keywords: Boldine, Intracerebral Hemorrhage, locomotor activity, hematoma.

LISTA DE ABREVIATURAS

AQP- Aquaporina;

AVC - Acidente Vascular Cerebral;

BHE - Barreira Hematoencefálica;

GB- Gânglio basal;

GFAP- Proteína Ácida Fibrilar Glial;

HI- Hemorragia Intracerebral;

MMP- Metaloproteinases;

NO- Óxido Nítrico;

PMN- Polimorfonucleado;

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio;

SNC - Sistema Nervoso Central;

TNF- α - Fator de Necrose tumoral alfa.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA A- Cascata de eventos disparada pela hemorragia intracerebral.....	7
FIGURA B- Estrutura do alcaloide boldina.....	10

CAPITULO 1

FIGURA 1- Footfault test 24 and 96 hours after ICH.....	43
FIGURA 2- Open field test 48 hours after ICH.....	44
FIGURA 3- Contextual fear conditioning test 96 hours after ICH.....	45
FIGURA 4- Hematoma size	46
FIGURA 5- Inflammatory infiltrate in the brain tissue.....	47
FIGURA 6- Cellular edema in the brain tissue.....	48
FIGURA 7: Reactive astrogliosis.....	49

1. LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1- ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS.....	60
ANEXO 2- ANÁLISE DO PADRÃO DE PESO CORPORAL.....	62
ANEXO 3- GUIA PARA OS AUTORES – Brain Research.....	64

SUMÁRIO

PARTE I

RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE ANEXOS.....	vii
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
2.1. DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS.....	1
2.2. O ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL (AVC).....	1
2.2.1. AVC HEMORRÁGICO.....	3
2.3. BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA	5
2.4. ALCALOIDE BOLDINA	8
3. OBJETIVOS.....	13

PARTE II

1. INTRODUCTION.....	17
2. RESULTS.....	19
2.1. Influence of boldine administration in behavioral tests.....	19
2.2. Boldine treatment do not interfere in lesion size area	20
2.3. Boldine treatment do not reduce inflammatory infiltrate induced by ICH.	20
2.4. Boldine treatment do not reduce cellular edema induced by ICH	21
3. DISCUSSION	22
4. EXPERIMENTAL PROCEDURE	28

4.1. Animal model	28
4.2. Induction of ICH	29
4.3. Boldine treatment	29
4.4. Behavioral tests.....	30
4.4.1. Open Field.....	30
4.4.2. Footfalut test	30
4.4.3. Beam walking	30
4.4.4. Contextual fear conditioning	31
4.5. Morphological analysis.....	31
4.6. Western blotting	32
4.7. Statistical analysis	32
PARTE III	
1. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
2. PERSPECTIVAS	53
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
PARTE IV	
1. ANEXOS.....	61
1.1. ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS	61
1.2. ANÁLISE DO PADRÃO DE PESO CORPORAL DOS ANIMAIS NO PRÉ E PÓS CIRÚRGICO.....	65
1.3. GUIA PARA AUTORES- Brain Research	66

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

As doenças neurodegenerativas afetam funções relacionadas com a qualidade de vida do ser humano como a memória, a cognição, a fala, a personalidade e alguns movimentos especializados, sendo uma das principais causas de morbidade na vida adulta (Price, 1999; Forman *et al.*, 2004). Com o aumento da expectativa de vida, essas doenças estão se tornando cada vez mais comuns, transformando-se num problema de saúde pública. Dentre elas, podemos destacar a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, a esclerose múltipla e os distúrbios cerebrovasculares. Para cada uma dessas doenças, na maioria das vezes, não existe um tratamento efetivo, sendo utilizados apenas alguns tratamentos sintomáticos (Price, 1999).

Felizmente, nos últimos anos, grandes avanços têm sido realizados para compreender a fisiopatologia destas doenças e para criar modelos *in vitro* e *in vivo* com o objetivo de encontrar novos alvos terapêuticos e desenvolver tratamentos que possam ser testados em modelos experimentais e, posteriormente, em pacientes (Price, 1999). Uma das principais estratégias pesquisadas é a neuroproteção, visando reduzir a vulnerabilidade do tecido cerebral aos danos.

2.2. O ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL (AVC)

O AVC é uma definição clínica utilizada para descrever sintomas e crises neurológicas decorrentes da falta de aporte sanguíneo ao cérebro (Doyle *et al.*, 2008), acarretando queda na disponibilidade de oxigênio e glicose e causando lesões teciduais,

O metabolismo energético normal no cérebro tem algumas características especiais, que incluem uma taxa metabólica alta, estoques de carboidratos limitados e uma alta dependência do metabolismo aeróbico de glicose. Por esse motivo, ele é mais vulnerável a uma diminuição nas concentrações de oxigênio e glicose do que os outros tecidos. Além disso, mudanças mínimas na disponibilidade de glicose e oxigênio podem causar danos irreversíveis a este órgão, já que ele possui capacidade limitada de reparar determinados danos (Lipton, 1999).

O AVC pode ser dividido em dois tipos: AVC isquêmico e AVC hemorrágico. AVCs isquêmicos são mais prevalentes do que os hemorrágicos, chegando a aproximadamente 80% de todos os casos, sendo o alvo da maioria das pesquisas para um tratamento clínico (Doyle *et al.*, 2008). Todos os mecanismos que resultam de uma restrição do fluxo de sangue para o cérebro, como a trombose, embolia ou hipoperfusão sanguínea, podem causar um AVC isquêmico. Essas condições levam a uma diminuição do aporte sanguíneo no tecido cerebral e as células não conseguem suportar a homeostasia celular. Isso desencadeia vários processos, como excitotoxicidade, desequilíbrio iônico, estresse oxidativo, inflamação e apoptose, que levam à morte da célula (Doyle *et al.*, 2008). Já o AVC hemorrágico ocorre quando há uma ruptura de um vaso sanguíneo com extravasamento de sangue para o parênquima cerebral, mais

comumente nos gânglios da base, particularmente no estriado (Xi *et al.*, 2006; MacLellan *et al.*, 2009).

A isquemia cerebral e a hemorragia intracerebral (HI) estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade entre adultos e idosos. Dados do Ministério da Saúde mostram que em 2005 as doenças cerebrovasculares foram a maior causa de morte no Brasil, com um número de óbitos ultrapassando os 90.000, correspondendo a 10% da mortalidade no país (Ministério da Saúde, 2008). Essas doenças afetam um amplo espectro da população, podendo levar, na maioria das vezes, a uma limitação física e uma incapacidade mental permanente. Muitos pacientes que foram acometidos por um dos tipos dessa lesão cerebral sobrevivem e sofrem das sequelas dos danos por muitos anos, tanto em nível psicológico e emocional, quanto motor e intelectual, de maneira que esse grupo de pessoas requer cuidados especiais e tratamentos médicos (Horst & Postigo, 1997).

2.2.1. AVC HEMORRÁGICO

Segundo Katsuki (2010), a HI é um tipo de lesão aguda caracterizada por um extravasamento de sangue dentro do parênquima cerebral, com a formação de um hematoma, geração de edema e dano cerebral. É uma desordem neurológica devastadora com alta taxa de morbidade e mortalidade, correspondendo a 15-20% das mortes por AVC no mundo (Xi *et al.*, 2006, Sacco *et al.*, 2009) e apresentando um prognóstico preocupante, visto que, até o momento, apenas tratamentos sintomáticos estão presentes (Katsuki, 2010). Estima-se que sua incidência na população mundial seja de 10-30 a cada 100.000

habitantes. Os fatores de risco que podem estar intimamente relacionados com essa patologia são hipertensão, hipercolesterolemia e diabetes (Price, 1999). Nos últimos 10 anos observou-se um aumento de 18% em sua incidência, causado principalmente pelo aumento da expectativa de vida da população, pela falta de controle da hipertensão arterial e pelo uso de anticoagulantes, trombolíticos e agentes antiplaquetários (Qureshi *et al.*, 2009).

As principais consequências patológicas da hemorragia intracerebral são:

- A formação de um hematoma, que se expande por horas ou até dias;
- A formação de edema na região afetada, que se inicia imediatamente após a ruptura do vaso e aumenta até dias após a lesão;
- A morte massiva de neurônios e células gliais na região afetada;
- A ativação glial na região do perihematoma, responsável por intensa resposta inflamatória local (Figura 1) (Guahua *et al.*, 2006, Katsuki, 2010).

De acordo com Hood e Dincher (1995), os sinais neurológicos variam conforme a localização do AVC no cérebro. Em geral, os pacientes terão paralisia, confusão, desorientação e perda de memória. Um paciente com um AVC num lado do cérebro terá paralisia no lado oposto do corpo (hemiplegia), porque as vias nervosas motoras atravessam o cérebro de um lado para outro, no tronco cerebral. Além disso, pacientes com um AVC que envolva o hemisfério cerebral esquerdo, podem apresentar dificuldades na fala ou na compreensão da palavra falada (afasia) e pacientes com danos ao hemisfério direito do cérebro tendem a apresentar problemas de percepção. Outros problemas associados ao AVC incluem dificuldades para engolir (disfagia), incontinência urinária e fecal e perda da visão na direção do lado paralisado (hemianopsia) (Hood e Dincher, 1995).

Além do sangramento no parênquima cerebral, existem outros fatores complicadores, tais como o aumento da pressão intracraniana pela formação de edema cerebral na região que houve a ruptura do vaso. Esse edema é caracterizado por um aumento do volume do cérebro, que ocorre devido ao acúmulo excessivo de água no parênquima cerebral, aumentando assim a pressão intracraniana (Venero *et al.*, 2001). Existem dois tipos de edemas, de acordo com seus mecanismos de formação:

Edema Citotóxico (celular) – inchaço dos elementos celulares (ex: mitocôndria) do parênquima cerebral, como pode ser observado em condições de hipóxia.

Edema Vasogênico – aumento da permeabilidade vascular e consequente acúmulo de fluido edematoso no espaço extracelular (Papadopoulos e Verkman, 2007).

2.3. BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

A barreira hematoencefálica (BHE) é formada por capilares contínuos, possuindo células endoteliais fortemente ligadas, e por astrócitos, que emitem prolongamentos que circundam a lâmina basal. Os astrócitos são o ponto de ligação celular com os neurônios (Abbott *et al.*, 2006). A BHE tem importante papel na regulação da homeostasia do sistema nervoso central (SNC), incluindo a regulação da troca de nutrientes, água, íons e metabólitos entre o sangue e o SNC e prevenindo a entrada de constituintes potencialmente tóxicos para o SNC (Neuwelt *et al.*, 2008). Grande parte desta função é desempenhada pela aquaporina 4 (AQP4) (Papadopoulos e Verkman, 2007), expressa

predominantemente em membranas celulares astrogliais e que permite a passagem seletiva de substâncias (Papadopoulos *et al.*, 2004).

Deste modo, alterações na BHE que ocorrem após o AVC hemorrágico podem afetar profundamente a progressão da lesão, incluindo a perda de neurônios e das especificações das funções desempenhadas pelo SNC (Neuwelt *et al.*, 2008). As células endoteliais e os astrócitos que compõem esta barreira sofrem danos significativos e células inflamatórias podem atravessar a BHE e alcançar o parênquima cerebral (Dugan & Choi, 1994). Do mesmo modo, nessa situação de desestruturação da BHE, fármacos que antes poderiam ser excluídos agora podem atingir o parênquima cerebral.

Durante lesões agudas e crônicas no SNC ocorre uma reação glial específica, conhecida como astrogliose reativa, representada por uma alteração na morfologia e função dos astrócitos (Pekny e Nilsson, 2005). A astrogliose reativa é um dos principais componentes de resposta celular a lesões do cérebro e tem sido sugerida como uma tentativa de restaurar a homeostasia celular através do isolamento da região danificada (Zhang *et al.*, 2010) do restante do tecido do SNC, em uma tentativa de reconstruir a BHE e facilitar a regeneração axonal ao redor da área lesionada (Pekny *et al.*, 2007).

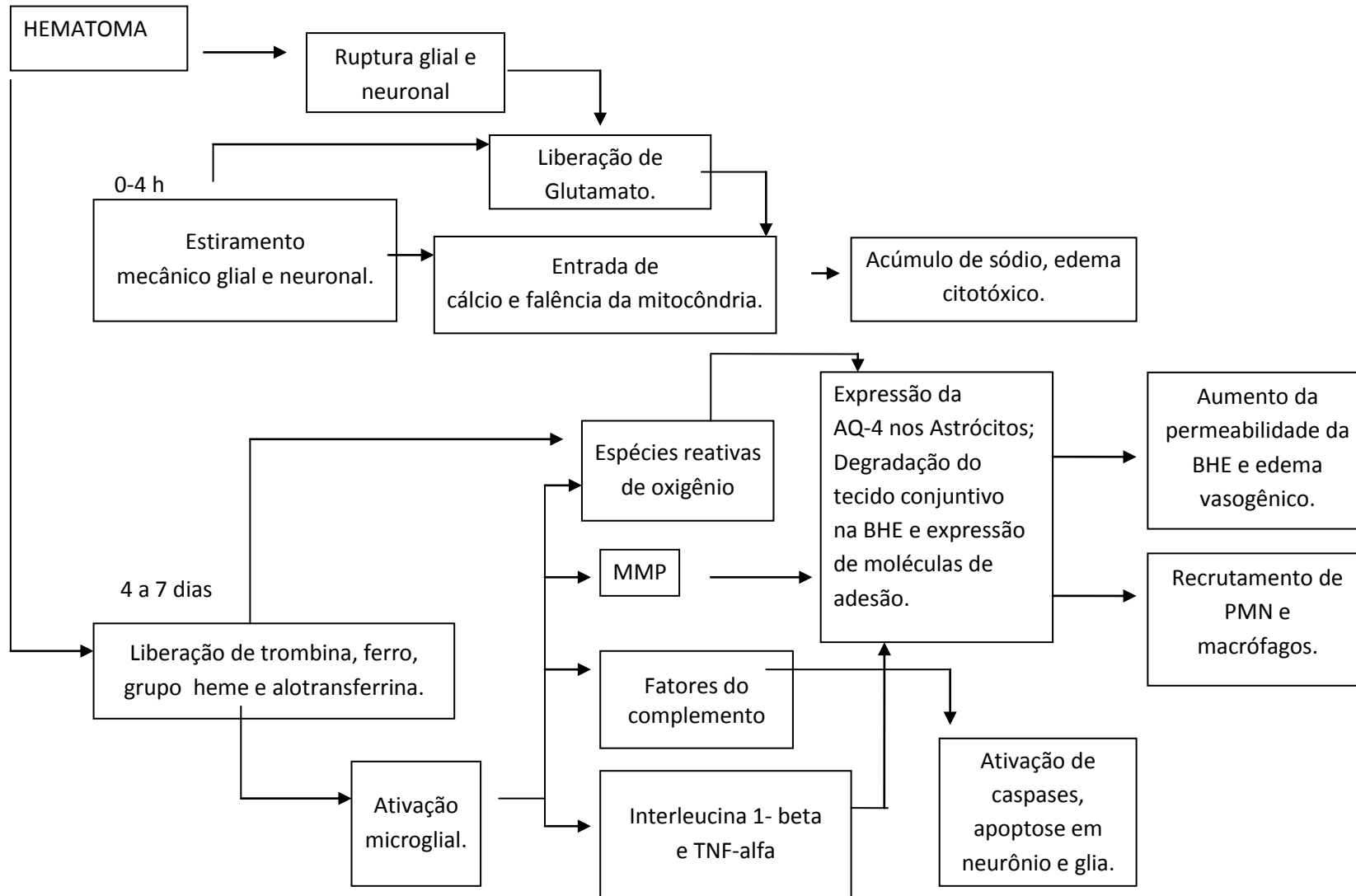


FIGURA A: Cascata de eventos disparada pela hemorragia intracerebral. Adaptado e modificado de Qureshi *et al*, 2009, (MMP: metaloproteinases; TNF-alfa: fator de necrose tumoral alfa; AQ-4: Aquaporina 4; BHE: barreira hematoencefálica).

Infelizmente, apesar da constante busca e de ensaios pré-clínicos promissores (Qureshi *et al.*, 2009), até o momento somente tratamentos sintomáticos estão disponíveis para o AVC hemorrágico, fazendo com que a busca de novas alternativas terapêuticas faça-se necessária. Nesse contexto, a busca de compostos com propriedades neuroprotetoras é uma ferramenta promissora e urgente (Katsuki, 2010).

Segundo Ginsberg (2008), a definição para neuroproteção seria qualquer estratégia ou combinação de estratégias que antagonize, interrompe ou retarde a sequência de dano molecular e bioquímico que, se não for controlado, poderá resultar em lesão irreversível (Ginsberg, 2008).

2.4. ALCALOIDE BOLDINA

Historicamente, as plantas medicinais representam uma das principais e mais disseminadas fontes de medicação pela população em geral e, apesar do aumento do uso de medicamentos sintéticos nos últimos anos, sua utilização ainda tem sido o tratamento de escolha para muitas populações no mundo inteiro (Halberstein, 2005). Assim, diversos alcaloides foram, e ainda são, empregados na terapêutica como importantes ferramentas para investigar efeitos farmacológicos e fisiológicos e para o estudo de mecanismos bioquímicos. Isso possibilitou um avanço na descoberta e no estudo de receptores de canais iônicos, permitindo também elucidar a importância desses alcaloides na química orgânica, na síntese orgânica e no desenvolvimento de fármacos (Cordell *et al.*, 2001).

Segundo Cassels e colaboradores (1995), o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e as reações malélicas dos radicais livres em uma ampla série de processos patológicos levaram a um interesse em procurar moléculas com propriedades antioxidantes que pudessem ser potencialmente úteis como agentes terapêuticos. Assim, com a possibilidade de impedir ou retardar os efeitos deletérios associados à produção excessiva de ROS, essas moléculas passaram a ser importantes na pesquisa (O'Brien *et al.*, 2006).

Dentre os muitos tipos sintéticos e estruturas químicas naturais em estudo, os alcaloides do tipo benzilisoquinolonas despertaram interesse como um novo grupo de compostos com atividade antioxidante. No contexto desse grupo destacaram-se principalmente as propriedades antioxidantes da boldina ((S)-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxi-aporfina) (Cassels *et al.*, 1995).

A boldina é o principal alcaloide presente nas folhas e casca de *Peumus boldus* Molina, uma árvore da família *Monimiaceae*.

A espécie *Peumus boldus* é uma planta originária da região central e sul do Chile (Lanhers *et al.*, 1991), entre latitudes de 33 e 39° (Urzúa & Acuña, 1983), sendo por isso conhecida popularmente como Boldo-do-Chile.

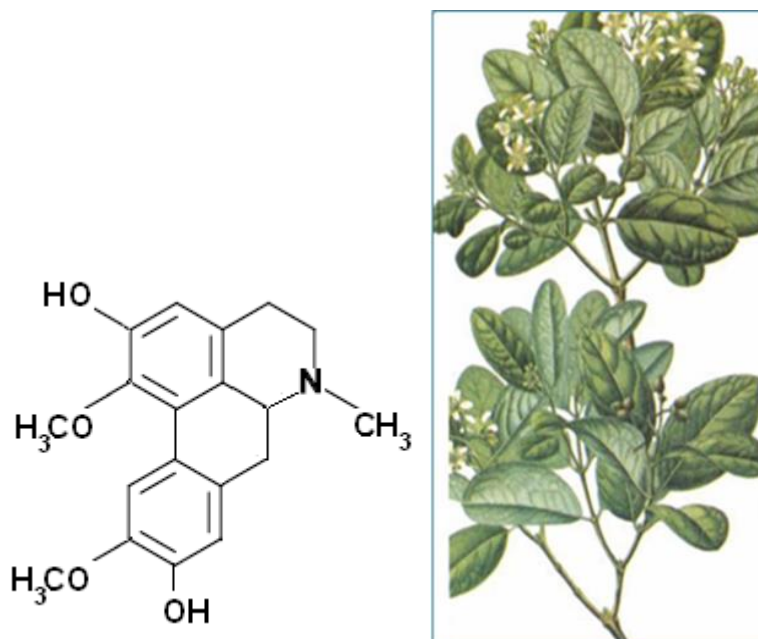


Figura B: Imagem representativa da estrutura química do alcaloide boldina((S)-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxi-aporfina) e das folhas de *Peumus boldus* Molina.

A concentração de boldina nas folhas de Boldo é estimada em 0,14% (Quezada *et al.*, 2004) e pode chegar a mais de 6% nas cascas, dado esse baseado no seu peso seco (Urzúa & Acuña, 1983). Embora presente em menor quantidade, a boldina também ocorre em várias outras espécies das famílias *Monimiaceae*, *Magnoliaceae* e *Lauraceae* (O'Brien *et al.*, 2006).

Preparações utilizando folhas e cascas de Boldo, tais como infusões e chás têm sido empregadas tradicionalmente por uma grande parte da população para uma infinidade de usos, dentre os quais podemos citar: colagogo-colerético, diurético, digestivo, hepatoprotetor, analgésico, laxante, cardiotônico, hepatotônico, estimulante, e ainda como sedativo e hipnótico (Speisky & Cassels, 1994). Entretanto, grande parte desses efeitos não possui estudos científicos que

comprovem sua eficácia.

A boldina, um alcaloide aporfínico e fenólico, isolado principalmente das cascas e folhas, têm sido estudada quanto a sua capacidade em sequestrar radicais livres em modelos experimentais. Há relatos na literatura que seu potente efeito antioxidante está relacionado com sua estrutura química, que possuiu dois grupamentos fenólicos altamente reativos (Cassels *et al.*, 1995; O'Brien *et al.*, 2005). A boldina comporta-se como um potente antioxidante em sistemas biológicos submetidos a dano peroxidativo por espécies reativas, prevenindo a peroxidação de homogeneizados de cérebro (Youn *et al.*, 2002). Além disso, a boldina protege enzimas suscetíveis à inativação por peroxidação (Speisky & Cassels, 1994). Em pesquisas com o objetivo de elucidar o mecanismo de ação da boldina foi demonstrado que ela atua como uma importante sequestradora de radicais hidroxila, além de possivelmente diminuir a produção de óxido nítrico pela mitocôndria (Youn *et al.*, 2002). Konrath e colaboradores (2008) demonstraram, em fatias de tecido hipocampal, que a boldina também pode ter efeito pró-oxidante dependendo da concentração utilizada (Konrath *et al.*, 2008).

Outros efeitos farmacológicos da boldina já descritos na literatura estão relacionados às suas atividades antiinflamatória e antipirética, através da inibição da síntese de prostaglandinas (Backhouse *et al.*, 1994); atividade antiarterogênica, por inibição da oxidação de LDL (Santanam *et al.*, 2004) e atuação como relaxante muscular e imunomoduladora (O'Brien *et al.*, 2005). Trabalhos recentes demonstraram que a boldina possui efeito antiproliferativo em linhagens de gliomas *in vitro* (Gerhardt *et al.*, 2009) e *in vivo* (Gerhardt *et al.*, 2012) e que é neuroprotetora em um modelo de privação de oxigênio e glicose em culturas organotípicas de hipocampo de ratos (Comiran, 2009).

A longa tradição do uso popular de preparações de Boldo do Chile contendo boldina sugere que ela possui uma baixa toxicidade. Doses relativamente altas desse alcaloide são necessárias para induzir efeitos adversos, toxicidade ou mortalidade em diversas espécies de mamíferos. Estudos demonstraram que 500 e 1000 mg/kg de boldina, via oral, foram necessários para matar camundongos e porcos da Índia, respectivamente. A maioria dos animais morreu por insuficiência respiratória (Speisky & Cassels, 1994).

Considerando-se a ineficácia dos fármacos estudados até o momento para a diminuição dos danos causados pelo AVC hemorrágico e as propriedades descritas para a boldina, o presente trabalho visou avaliar, através de um modelo experimental de AVC hemorrágico e de parâmetros comportamentais e morfológicos, um possível papel benéfico da boldina nessa patologia.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

- Investigar o possível efeito neuroprotetor do alcaloide boldina no modelo de hemorragia intracerebral em ratos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Investigar se a boldina:

- altera parâmetros locomotores e de coordenação motora nos animais submetidos à hemorragia intracerebral;
- interfere na memória dos animais submetidos aos diferentes tratamentos;
- é capaz de diminuir o tamanho do hematoma gerado pela hemorragia intracerebral;
- altera o tamanho do infiltrado inflamatório e o edema intracelular causados pela hemorragia intracerebral.

Manuscrito

Manuscrito a ser submetido ao periódico Brain Research.

Fator de impacto: 2.728

CAPÍTULO 1

Boldine decreases the locomotory side effects induced by intracerebral hemorrhage in rats

Kamila Ferreira Loureiro¹, Marcos Freitas Cordeiro², Magno da Silva Marques², Suellen de Azevedo Ribeiro², Débora Camacho Luz², Aline Ribeiro Galho¹, Maria Fernanda Dorrego Antunes¹, Lidiane Dal Bosco¹, Daniela Martí Barros^{1,3} and Ana Paula Horn^{1,2}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada, ²Laboratório de Histologia, ³Laboratório de Neurociências, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, 96210-900, Brazil.

Corresponding author:

Ana Paula Horn - Laboratório de Histologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – Av Itália, Km 8 - Rio Grande, RS, 96210-900, Brazil. Phone number: +55 53 3293 5185. Fax number: +55 53 3293-6848.

e-mail: anapaulahorn@pq.cnpq.br

Abstract

Intracerebral hemorrhage (ICH), which results from the spontaneous rupture of an intracranial vessel, is a subtype of stroke with high morbidity and mortality, accounting for about 15% of all deaths. Boldine ((S)-2,9-dihydroxy-1, 10-dimethoxy-*aporphine*), an alkaloid obtained from *Peumus boldus* Molina, is known by its antioxidant and cytoprotective properties. Motor function and morphological parameters were assessed from male *Wistar* rats submitted to collagenase VII-induced ICH followed by a single intraperitoneal injection of boldine four hours after the lesion. In the open field test the animals treated with the higher doses of boldine (50 mg/kg and 75 mg/kg) showed results similar to those observed in the control group. In the footfault test assessed 96 hours after ICH recovery was increased in the animals treated with the higher doses of boldine. In the beam walking test, performed 48 and 96 hours after ICH, animals submitted to ICH slipped at least three times crossing the beam, being boldine able to partially reverse these slips. Morphological data were assessed by fresh and histological analysis of brain slices and no changes in hematoma size and number of inflammatory cells were observed among animals submitted to ICH. Also, boldine was not able to reverse the ICH-induced reactive astrogliosis, as evidenced by GFAP increase. These data suggest that boldine administration recovers motor function in this experimental model, although no significant morphological changes were observed after 96 hours.

Keywords: Boldine, intracerebral hemorrhage, locomotory activity, hematoma.

1. INTRODUCTION

Intracerebral hemorrhage (ICH) is an acute lesion characterized by a blood leakage inside the brain parenchyma with the generation of hematoma, edema and tissue damage (Katsuki, 2010). It is an important public health issue which leads to high mortality and incapacity rates in adults (Qureshi et al., 2009), corresponding to 15-20% of deaths by stroke in the world (Xi et al., 2006). ICH has a poor prognosis, for which virtually no effective drug therapies are available at present (Katsuki, 2010).

The main pathologic consequences of the ICH are the formation of hematoma and edema which begins immediately after the vessel disruption, growing bigger by days after the original lesion. Moreover, the death of neurons and glial cells in the affected region is observed, as well as glial activation in the perihematoma zone, responsible for intense local inflammatory response (Xi et al., 2006; Katsuki, 2010).

In the last 10 years an increase of 18% in the incidence of the ICH was observed, mainly due to the increased life expectation of the population, lack of control of the blood pressure and rise in the administration of anticoagulant, thrombolytic and antiplatelet agents (Qureshi et al., 2009).

Unfortunately, despite the unremitting investigation and promising pre-clinic assays (Qureshi et al., 2009), until now only symptomatic treatments are available for ICH, being the search for new therapeutic alternatives necessary. In the context, the search for new compounds with neuroprotective properties represent a promising and urgent task (Jiménez and Speisky, 2000; Katsuki, 2010).

Once oxidative stress is involved in the pathogenesis of ICH, there is an

interest in the search of molecules with antioxidant properties which could be potentially useful as therapeutic agents (Cassels et al., 1995), with the ability to prevent or delay the deleterious effects associated with the excessive production of reactive oxygen species (ROS) (O'Brien et al., 2006). According to Jiménez and Speisky (2000), the rise in the free radicals formation may be related with the appearance and progression of several pathologies as cancer, neurodegenerative and vascular diseases.

Among the many sorts of natural and synthetic chemical structures under investigation, the benzyloisoquinoline-type alkaloids aroused interest as a new group of compounds with antioxidant activity. In the context of this group, the antioxidant properties of boldine stood out (Cassels et al., 1995). Boldine, (S)-2,9-dihydroxy-1,10-dimethoxy-aporphine, is the main alkaloid present in the leaves and in the bark of *Peumus boldus* Molina, a tree of the Monimiaceae family, also known as boldo-do-Chile.

Recent studies demonstrated that boldine has an antiproliferative effect in glioma cells *in vitro* (Gerhardt et al., 2009) and *in vivo* (Gerhardt et al., 2012) and is neuroprotective in an oxygen and glucose deprivation model in organotypic cultures of rat hippocampus (Comiran, 2009). Boldine acts as a powerful antioxidant in biological systems submitted to ROS induced peroxidative damage, preventing the peroxidation of homogenized brain (Youn et al., 2002).

Thereby, the present study aimed the evaluation of behavioral and morphological changes resulting from the administration of boldine in an experimental model of ICH.

2. RESULTS

2.1. Influence of boldine administration in behavioral tests

2.1.1. *Footfault* test

In the *footfault* test performed 24 hours after ICH (Figure 1 A), the percentage of motor mistakes observed in each body side showed differences in all groups that received collagenase injections (Col groups). The majority of motor failures were always observed in the lesion contralateral side. Boldine was not able to reverse this alteration in none of the tested doses. On the other hand, when animals were tested 96 hours after ICH (Figure 1 B), the ones treated with the doses of 50 and 75 mg/Kg of boldine showed a significant improvement in their coordination compared to the Col group.

2.1.2. Open field test

The locomotory activity, evaluated by the open field test 48 hours after ICH, significantly reduced in the animals of the Col groups (Figure 2). Similarly to the *footfault* test results, in the groups where the highest boldine doses (50 and 75 mg/Kg) were administrated, an improvement in the number of crossings was observed if compared to those obtained by the group Col, being their results close to the control (Ctl). These results indicate that boldine, in the highest doses can reverse the motor deficits caused by ICH.

2.1.3. Beam Walking test

The beam walking (BW) test was performed to evaluate the locomotory activity and balance of the animals 48 and 96 hours after ICH. The results were converted to score values (adapted from Berthat et al., 2010) and are shown in Table 1.

Analyzing the score values obtained in 48 and 96 hours, we observe that in the Ctl group most of the animals crossed the beam with no failures, being the score 3 the most common. However, when we focus on the Col group, almost all animals slipped at least three times with the limbs contralateral to the infarct, obtaining, thus, score 1. The results showed that boldine, when administered in the highest doses, was able to increase the score number, once most of the boldine-treated animals presented score 2 or 3, suggesting locomotory activity and balance improvement.

2.1.4. Fear conditioning test

The fear conditioning test was performed 72 hours after ICH and its purpose was to evaluate the long term memory of the animals. We observed that in both Ctl and Col group there were no significant differences. All the animals exhibited the same “*freezing*” behavior, indicating that the administration of collagenase or different boldine doses was not able to change the aversive memory in these animals (Figure 3).

2.2. Boldine treatment do not interfere in lesion size area

The morphological analysis of the brains and the measurement of the infarct area in the fresh brain slices attest that the treatment with boldine in any of the doses did not reduce hematoma size (Figure 4 B and 4 C), suggesting that is not because of bleeding reduction that boldine is exerting its protective effect.

2.3. Boldine treatment do not reduce inflammatory infiltrate induced by ICH

The representative images presented in Figure 5 show the presence of inflammatory cells (mainly neutrophils and lymphocytes) in the brain parenchyma of the groups Col, Col+B25, Col+B50 and Col+B75. The Ctl group is not

represented, once there was no infarct, no brain blood barrier disruption and no inflammatory infiltrate found in striatum. These images are representative of at least 4 different animals and counting of leucocytes showed no difference among Col groups, suggesting that boldine do not exert its protective effect by reducing inflammation.

2.4. Boldine treatment do not reduce cellular edema induced by ICH

Cellular edema was found in the brains of Col group and in the groups Col+B25, Col+B50 and Col+B75. Figure 6 shows representative pictures of the striatum of at least 4 animals of each Col group. Again, the Ctl group is not represented, once there was no infarct and, therefore, no cellular edema was observed. This result suggests that is not by reducing cellular edema that boldine exerts the beneficial effect showed in the behavioral tests.

2.5. Boldine treatment do not reduce astrogliosis induced by ICH

Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) immunocontent in Ctl and Col groups was measured to investigate a possible role of boldine in reducing astrogliosis after ICH. Results presented in figure 7 show an increase in GFAP in all Col groups. Not even the highest dose of boldine was able to reduce astrocytic response, suggesting that the boldine effect seen on behavioral tests is not due to reduction in astrogliosis.

3. DISCUSSION

With the increase of the elderly population a consequent growth in the incidence and progression of neurovascular and neurodegenerative diseases is observable. These diseases are important public health problems, once they affect functions related to the human quality of life (Price, 1999; Forman et al., 2004). Researchers are joining efforts in order to understand the physiopathology of these diseases and to find new compounds with therapeutic potential to develop new treatments which can be tested in experimental models and, hopefully, in human patients (Price, 1999).

In this work we used an experimental model which represents the physiological conditions of the ICH and evaluated if a single intraperitoneal injection of three different doses of boldine (25, 50 and 75 mg/Kg) could be beneficial to the animals. Locomotory activity and morphological parameters of the brain tissue were investigated. Boldine, above other characteristics, is considered a powerful antioxidant (O' Brien et al., 2006). This property seems to be related with neuroprotection, once reactive oxygen species are involved with the physiopathology of the ICH (Katsuki, 2010).

3.1. Locomotors deficits in the ICH model

In order to evaluate locomotory activity, we performed behavioral tests 24, 48 and 96 hours after ICH induction. Our results indicate beneficial effects of boldine administration at the doses of 50 and 75 mg/Kg. In the beam walking test, we used an adapted score scale by Berthat (2010) and, analyzing our results, we verified that the animals submitted to the collagenase injection suffered a significant reduction in their scores when compared to the animals of the control

group. From table 1 we conclude that boldine appears to partially revert the locomotory deficits induced by ICH. Berthat and collaborators (2010) evaluated behavioral and morphological parameters in a collagenase-induced ICH model, and they obtained similar results in the beam walking test, where the animals submitted to ICH showed locomotory deficit if compared to the ones belonging to the Sham group (Berthat et al., 2010).

In the footfault test performed 24 hours after ICH we observed that the animals from all groups submitted to ICH showed deficits in their motor coordination. The majority of the motor mistakes were done with the lesion contralateral side. In a previous study, Zhang and collaborators (2009) reported that the animals submitted to traumatic brain injury (TBI) also showed locomotory deficits, making more mistakes with the lesion contralateral side when compared to the control groups (Zhang et al., 2009). When we evaluated our results with the same test 96 hours after ICH, however, the animals treated with boldine at the doses of 50 and 75 mg/Kg showed a significant improvement in their motricity. Similarly to the 96 hours footfault results, the animals submitted to the open field task 48 hours after ICH also showed improvement in their locomotion after 50 and 75 mg/Kg boldine treatment. These data indicate that boldine at these doses is able to reverse ICH-induced motor damage.

Hartman (2009) reported that changes related to the exploratory behavior and locomotory capacity of the animals may be attributed to the loss of dopaminergic neurons located in the substantia nigra. This area has an interconnection with the striatum (Hartman et al., 2009). This might indicate that in our study, where the hematoma was developed mainly in the striatum, the accentuated locomotory deficits observed could be attributed to the dopaminergic

neurons lost in the area. As shown in figure 6, the cellular edema and the degeneration in the lesion side were evident, suggesting an intense cell death and explaining the locomotory deficits found in our work.

According to Gross and Canteras (2012), fear is an emotion which has many physiological and behavioral implications in the animals and it is believed that the amygdalae represent a fundamental role in the processing of this emotion (Gross & Canteras et al., 2012). Lalumiere and collaborators (2005) reported about the interaction between the nucleus accumbens and the basolateral amygdale (BLA) in the memory consolidation and, furthermore, suggest that there are evidences of the involvement of the BLA in the modulation and consolidation of the memory in the training of many tasks, as inhibitory avoidance task and contextual fear conditioning task (Lalumiere et al., 2005). Our results showed that there were no significant differences among the experimental groups in the contextual fear conditioning. These results suggest that the hematoma expansion did not reach cerebral areas responsible for the memory processing which can generate a conditioned response.

Recent neuropsychological findings indicated an important role of the striatum in memory and learning processes. De facto, lesions in this area are implied in cognitive incapability in humans (Hartman *et al.*, 2009). Hartman (2009) reports that only 50% of the patients stricken by ICH survive, and they tend to develop neurological deficits and brain atrophy. Merely 20% of the patients become independent in six months (Hartman et al., 2009). Su and collaborators (2007) did a cohort study in order to evaluate the severity of the cognitive dysfunction in patients who suffered from ICH, six months after its incidence, compared to healthy subjects. Neuropsychological tasks, as tests of attention,

memory, language and visuospatial function were done with all patients to evaluate their cognitive functions. The author reports that the patients with ICH obtained the worst performances (Su et al., 2007). According to Benke and collaborators (2003), lesions in the basal ganglia have a high prevalence and are associated to behavioral inabilities (Benke et al., 2003). Once we did not investigate other memory tests, we cannot affirm that ICH and boldine do not interfere in other memory and cognitive functions in rats.

According to White and McDonald (2002), the striatum can be divided in dorsal striatum (caudate and putamen) and ventral striatum (nucleus accumbens and olfactory tubercle). Each of these parts have anatomical and neurochemical distinctions (White & McDonald, 2002). Voorn and collaborators (2004) verified that the dorsal striatum, where we induced ICH, has got no involvement in memory consolidation and maintenance. The ventral striatum (nucleus accumbens) however, play an important role in memory (Lalumiere et al., 2005). This could also explain the results obtained in the contextual fear conditioning test, once the collagenase injection and the consequent vessel disruption occurred in the caudate-putamen complex (dorsal striatum). Moreover, Gross and Canteras (2012) mentioned that in the contextual fear conditioning test the striatal area is blocked, corroborating with our results.

3.2. Morphological evaluation of the infarct area

The morphological parameters analyzed in our results evince the presence of a prominent hematoma, intense inflammatory response, intracellular edema and cellular degeneration in the brains of the animals submitted to ICH.

Wang and Doré (2007) mentioned that the inflammatory reaction which occurs after a brain injury is a common response of the brain parenchyma as an attempt to repair the damage. Erythrocytes, leucocytes immediately penetrate the injured tissue. Also, glial activation occurs, and tissue degradation and repair starts (Wang & Doré, 2007). According to Neuwelt (2008), the blood-brain barrier (BBB) play a role in many neuroinflammatory processes and neurodegenerative diseases, and the physiology of the structure may be altered by the inflammation. Furthermore, disturbances in the permeability and structure of the BBB, as deregulation of the transporters and greater involvement of the immune system cells through the membrane can be considered neuroinflammatory interactions with the BBB (Neweltet et al., 2008). In this case, the BBB destructuring favors the entrance of inflammatory cells, making the damage in the infarct area even larger. The inflammatory response in the brain injury might include different cell types, which may be neutrophils, lymphocytes and monocytes (Doyle et al., 2008). Wang (2010) reported that pre-clinical and clinical studies allowed us to comprehend the inflammation impact in the ICH. Anti-inflammatory therapies have been tested, but until now no treatment was approved to clinical use (Wang, 2010). Boldine in none of the tested doses was able to reduce inflammatory infiltrate in the injury site.

There are many reports in the literature postulating that besides the anti-inflammatory activity (Backhouse et al., 1994) boldine is able to act as a hydroxyl radical scavenger and to possibly attenuate the nitric oxide production by the mitochondria (Youn et al., 2002), acting as an antioxidant. Because of the capability to prevent or modify the deleterious effects associated with the overproduction of ROS, this alkaloid could attenuate oxidative stress, glial activation and inflammatory response. According to Lau and collaborators (2013),

antioxidants are therapeutically benefic in the treatment of diseases associated to oxidative stress (Lau et al., 2013). In his work, authors evaluated the protective and antioxidant effect of the boldine in hyperglycemia induced by oxidative stress and the vasoprotective mechanism associated to the diabetic endothelial dysfunction. Lau and collaborators found that the pre-treatment with boldine in rat endothelial aortic cells exposed for 48 hours to high glucose concentrations (30 mM) reduced ROS and nitrotyrosine overproduction and retained the nitric oxide production (Lau et al., 2013).

Acute and chronic lesions in the central nervous system induce glial-specific reactions to occur, known as reactive astrogliosis, represented by a change in morphology and function of astrocytes (Pekny and Nilsson, 2005). The reactive astrogliosis is a major component of cellular response to injury of the brain and has been suggested as an attempt to restore cellular homeostasis through the insulation of the damaged region (Zhang et al., 2010) in an attempt to reconstruct the BBB and facilitate axonal regeneration around the damaged area (Pekny et al., 2007). Our results showed that the immunoccontent of GFAP is increased in all groups where the hematoma was present and boldine did not reverse this increase, suggesting that it is not because of a decrease of reactive astrogliosis that 50 and 75 mg/Kg of boldine improved locomotory behavior.

We also evaluated a possible toxicity of boldine treatment. Kidneys and livers were removed from animals to evaluate the conservation of the organ and the integrity of cellular components. The necropsy of the animals did not accuse any macroscopic alterations in both organs (liver and kidney), and the histopathological analysis of slices stained with hematoxylin and eosin did not evince any signs of cellular alteration (data not shown). Indeed, studies reported

that relatively high boldine doses are needed for the induction of malefic, toxic or lethal effects in mammals. There are reports that doses of 500 and 1000 mg/Kg are necessary to kill mice and guinea pigs, respectively. The majority of the animals died due to respiratory insufficiency (Speisky and Cassels, 1994). Gerhardt (2012) also evaluated the potential toxicity of boldine orally given to rats during 14 days. No deaths were observed after this period and the necropsy did not accuse any alteration in the organs (brain, heart, stomach, lung, liver and kidney). The microscopic analysis of histological slices stained with hematoxylin and eosin did not evince any toxicity (Gerhardt et al., 2012).

In conclusion, the results shown here suggest that boldine is able to reverse the motor damage observed in the animals submitted to ICH, albeit no significant morphological changes were observed. This indicates that more studies are necessary in order to investigate the mechanism of action of this promising alkaloid.

4. EXPERIMENTAL PROCEDURE

4.1. Animal model

Male Wistar heterogenic rats weighting 220-250 g were used for the experiments. The animals were maintained in standard conditions of temperature ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), relative humidity (60-80%) and with a regular 12h light/ 12h dark cycle. Up to five animals were kept per cage with water and food *ad libitum*. This experimental protocol (P016/2011) was approved by the ethics Committee in Animal Use (Comitê de Ética em Uso Animal - CEUA) of the Federal University of Rio Grande (FURG) and is in accordance with the EC Directive 86/609/EEC for animal experiments.

4.2. Induction of ICH

The animals were anesthetized with an intraperitoneal (IP) injection of kethamin (90mg/Kg) and xylasin (60 mg/kg) and placed in the stereotaxic apparatus. The induction of the ICH was performed according to Rosenberg and collaborators with some modifications (1990). Briefly, the hemorrhage was induced by stereotaxic injection of collagenase VII (Sigma C0773-7.5 KU), using a Hamilton syringe. The injection occurred in the left striatum (3 mm middle lateral and 5 mm ventral from bregma) (Paxinos and Watson, 2007). 0.23 U of collagenase VII diluted in 2 μ L of phosphate buffered saline (PBS) was administrated to each animal (Kim et al., 2007; Lekic et al., 2010). This procedure was adopted in all experimental groups, except the control (Ctl), where only 2 μ L of PBS was injected. Ten minutes after the injection, the Hamilton syringe was slowly removed from the brain to avoid reflux. After infusion, the needle was removed and wound was sutured.

Xi and collaborators (2006) reported that the ganglionic region (putamen, thalamus and caudate) is most likely to occur ICH in humans (Xi et al., 2006). Because of the high occurrence, we chose this area in our experiments.

4.3. Boldine treatment

Four hours after ICH, boldine (Sigma Aldrich – St. Louis, MO) dissolved in PBS was administrated through a single intraperitoneal 500 μ L injection. Three doses were tested: 25 mg/Kg (Col+B25), 50 mg/Kg (Col+B50) and 75 mg/Kg (Col+B75) (Jiménez and Speisky, 2000).

4.4. Behavioral tests

4.4.1. Open Field

The open field test was used to evaluate the locomotory activity of the rats. The test was performed 48 hours after ICH. The apparatus consists of a wooden box (60 x 40 x 50 cm) with 12 equal squares drawn on the floor. The total number of crossings (passage of the animal with the four limbs from one square to another) within five minutes was counted (Vianna et al., 2001).

4.4.2. Footfall test

Twenty four and 96 hours after ICH, the animals were submitted to the footfall test, which was performed to evaluate the motor precision of the animals. This test consists of placing the rat above a metallic grid with openings measuring 3 square cm. The number of times that the animal fails to place a paw on the grid, letting it go through its openings, was counted. The percentages of motricity errors considering each side of the body were compared (Nishibe et al., 2010).

4.4.3. Beam walking

The BW apparatus consists of a wooden cylindrical bar with 70 cm of length and 4 cm of diameter suspended 1 m above a soft surface. The animals were trained 24 hours before ICH to enter the dark box parting from the enlightened spot, having to cross the entire length of the bar to complete the task. This test was used to evaluate the locomotory activity of the animals 48 and 96 hours after lesion. The time taken by the animal to cross the bar was measured (with a maximum time of 2 minutes) and the number of times the animal slipped with a limb contralateral to the lesion was counted, resulting in a score (Jover, 2006;

Berthat et al., 2010). The following score values were used: 0: the animal fell off the beam or did not cross it within the given time; 1: the animal slipped three or more times with the contralateral side to the lesion; 2: the animal slipped two times with the contralateral side to the lesion; 3: none to one single slip while crossing the beam.

4.4.4. Contextual fear conditioning

Possible memory deficits were evaluated by the contextual fear conditioning test, performed 72 hours after ICH. On the training section, the animals were placed inside a box (25 x 25 x 25 cm) with the floor composed by parallel stainless steel bars. Passed three minutes, the animals suffered three electrical shocks (0,7 mA) with 10 seconds interval between them. After the shocks, the animals were kept for 2 more minutes inside the box. Twenty four hours after this training, the animals were again placed in the box, but there were no electrical shocks. The total time of *freezing* of each rat was assessed during 5 minutes (Vianna et al., 2001).

4.5. Morphological analysis

Rats were euthanized with an overdose of thiopental sodium (75 mg/kg) 96 hours after ICH. The brain was removed, sliced into 2 mm thick coronal sections in the region of interest using a brain matrix and coronal fresh sections were photographed. These slices were fixed in 10% formol for 8 hours and preserved in 70% alcohol until sample processing. The brains were cut on microtome (6 μ m) and stained with hematoxylin and eosin (HE). The morphological parameters analyzed in histological sections were absence/presence of inflammatory infiltrate, intracellular edema and cellular degeneration.

Hematoma size was quantified from images captured from the fresh brain tissue using the software ImageJ. All the measurements were made by the same investigator to avoid deviations in the values found.

4.6. Western blotting

To investigate GFAP immunocontent samples of the ipsilateral striatum were separated and homogenized in lysis buffer (4% SDS, 2.1 mM EDTA, 50 mM Tris). Aliquots were taken for protein determination and β -mercaptoethanol was added to a final concentration of 5%. Samples containing 75 μ g of protein were resolved by 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). After electrophoresis, minigels were blotted onto a nitrocellulose membrane. The membranes were blocked overnight with 5% powdered milk in tween-Tris-buffered saline (M-T-TBS). Primary antibody (Anti-GFAP, 1:2000, Sigma) was incubated overnight at 4°C in M-T-TBS. After washing, the membranes were incubated for 2 h with secondary antibody (anti-mouse IgG peroxidase-conjugated, 1:1000, Cell Signaling). The 3,3',5,5' - tetramethylbenzidine (TMB-Sigma) was used to develop the reaction. The membranes were scanned and the percentage of band intensity was analyzed using ImageJ. For each experiment, control was considered 100%.

4.7. Statistical analysis

The results were tested for normality and analyzed by ANOVA with post-test of Newman-Keuls. All results are specified as Mean \pm SEM. In all cases it a significance level of at least 5% was used ($p < 0.05$) (Zar, 1984).

Acknowledgments

This study was supported by the Brazilian National Research Council (CNPq), Grant number 479501/2011-4 to APH. Kamila Ferreira Loureiro was a fellow from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Daniela Martí Barros is a researcher from the Brazilian National Research Council (CNPq). The authors thank Carolina Perry for technical assistance.

References

Asencio, M., Delaquerrière, B., Cassels, B.K., Speisky, H., Comoy, E., Protais, P., 1999. Biochemical and Behavioral Effects of Boldine and Glaucine on Dopamine Systems. *Pharmacol. Biochem. and Behav.* 62, 7–13.

Backhouse, N., Delporte, C., Givernau, M., Cassels, B.K., Valenzuela, A., Speisky, H., 1994. Anti-inflammatory and antipyretic effects of boldine. *Agents Action.* 42, 114-117.

Benke, T., Delazer, M., Bartha, L., Auer, A., 2003. Basal ganglia lesions and the theory of fronto-subcortical loops: neuropsychological findings in two patients with left caudate lesions. *Neurocase.* 9, 70-85.

Beray-Berthat, V., Delifer, C., Besson, V.C., Girgis, H., Coqueran, B., Plotkine, M., Marchand-Leroux, C., Margail, I., 2010. Long term histological and behavioural characterisation of a collagenase induced model of intracerebral haemorrhage in rats. *J. Neurosci. Methods.* 191, 180 - 190.

Cassels, B.K., Asencio, M., Conget, P., Speisky, H., Videla, L.A., Lissi, E.A., 1995. Structure-antioxidative activity relationships in benzyloquinoline alkaloids. *Pharmacol. Res.* 31(2), 103-107.

Comiran, R. A. 2009. Investigação do efeito neuroprotetor do alcalóide boldina sobre a morte celular induzida pela privação de oxigênio e glicose em culturas organotípicas de hipocampo de rato. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências

Biológicas: Bioquímica)- Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Doyle, K.P., Simon, R.P., Stenzel-Poore, M.P., 2008. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacol.* 55, 310-318.

Forman, M.S., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2004. Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat. med.* 10, 1055-1063.

Gerhardt, D., Horn, A.P., Gaelzer, M.M., Frozza, R.L., Delgado-Cañedo, A., Pelegrini, A.L., Henriques, A.T., Lenz, G., Salbego, C., 2009. Boldine: a potential new antiproliferative drug against glioma cell lines". *Invest. New. Drugs.* 27, 517-525.

Gerhardt, D. 2012. Avaliação do efeito do alcaloide boldina sobre modelos experimentais de malignidades do sistema nervoso central e bexiga. 165 f. Tese (Doutorado Ciências Biológicas: Bioquímica)- Departamento de bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Gross, C. T., Canteras, N.S., 2012. The many paths to fear. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 651-658.

Hartman, R., Lekic, T., Rojas, H., Tang, J., Zhang, J.H., 2009. Assessing functional outcomes following intracerebral hemorrhage in rats. *Brain Res.* 148-157.

Jiménez, I; Speisky, H., 2000. Biological disposition of Boldina: *in vitro* and *in vivo* studies. *Phytother. Res.* 14, 254-260.

Jover, R., Rodrigo, R., Felipo, V., Insausti, R., Sáez-Valero, J., García-Ayllón, M.S., Suárez, I., Candela, A., Compañ, A., Esteban, A., Cauli, O., Ausó, E., Rodríguez, E., Gutiérrez, A., Girona, E., Erceg, S., Berbel, P., Pérez-Mateo, M., 2006. Brain Edema and Inflammatory Activation in Bile Duct Ligated Rats with Diet-Induced Hyperammonemia: A Model of Hepatic Encephalopathy in Cirrhosis. *Hepatology.* 43, 1257-1266.

Katsuki, H., 2010. Exploring Neuroprotective Drug Therapies for Intracerebral Hemorrhage. *J. Pharmacol. Sci.* 114, 366-378.

Kim, J.M., Lee, S.T., Chu, K., Jung, K.H., Song, E.C., Kim, S.J., Sinn, D.I., Kim, J.H., Park, D.K., Kang, K.M., Hyung Hong, N., Park, H.K., Won, C.H., Kim, K.H., Kim, M., Kun Lee, S., Roh, J.K., 2007. Systemic transplantation of human adipose stem cells attenuated cerebral inflammation and degeneration in a hemorrhagic stroke model. *Brain Res.* 43 – 50.

LaLumiere, R.T., Nawar, E.M., McGaugh, J.L., 2005. Modulation of memory consolidation by the basolateral amygdala or nucleus accumbens shell requires

concurrent dopamine receptor activation in both brain regions. *Learn. Mem.* 12(3), 296-301.

Lau, Y.S., Tian, X.Y., Huang, Y., Murugan, D., Achike, F.I., Mustafa, M.R., 2013. Boldine protects endothelial function in hyperglycemia induced oxidative stress through an antioxidant mechanism. *Biochem. Pharmacol.* 85, 367-375.

Lekic, T., Rolland, W., Hartman, R., Kamper, J., Suzuki, H., Tang, J., Zhang, J.H., 2011. Characterization of the brain injury, neurobehavioral profiles, and histopathology in a rat model of cerebellar hemorrhage. *Exp. Neurol.* 227, 96–103.

Nishibe, M., Barbay, S., Guggenmos, D., Nudo, R.J., 2010. Reorganization of Motor Cortex after Controlled Cortical Impact in Rats and Implications for Functional Recovery. *J. Neurotrauma.* 27, 2221-2232.

O'Brien, P., Carrasco-Pozo, C., Speisky, H., 2006. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. *Chem. Biol. Interact.* 159, 1-17.

Paxinus, G., Watson, C., 2007. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Elsevier Academic Press. Sixth ed., Amsterdam.

Pekny, M.; Nilsson, M., 2005. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia.* 50, 427-434.

Pekny, M., Wilhelmsson, U., Bogestål, Y.R., Pekna, M., 2007. The role of astrocytes and complement system in neural plasticity. *Int. Rev. Neurobiol.* 82, 95-111.

Price, D.L., 1999. New order from neurological disorders. *Nature.* 399, p.A3-A5.

Qureshi, A.I., Mendelow, A.D., Hanley, D.F., 2009. Intracerebral haemorrhage. *Lancet.* 373, 1632-1644.

Rosenberg, G.A., Mun-Bryce, S., Wesley, M., Kornfeld, M., 1990. Collagenase-Induced Intracerebral Hemorrhage in Rats. *Stroke.* 21, 801-807.

Speisky, H., Cassels, B.K., 1994. Boldo and Boldine: an emerging case of natural drug development. *Pharmacol. Res.* 29, 1-12.

Sriram, K., O'Callaghan, J. P., 2007. Divergent roles of Tumor Necrosis Factor- α in the brain. *J. of Neuroimmune Pharmacol.* 2, 140-153.

Su, C.Y., Chen, H.M., Kwan, A.L., Lin, Y.H., Guo, N.W., 2007. Neuropsychological impairment after hemorrhagic stroke in basal ganglia. *Arch. Clin. Neuropsychol.* 22, 465–474.

Vianna, M.R., Izquierdo, L.A., Barros, D.M., de Souza, M.M., Rodrigues, C., Sant'Anna, M.K., Medina, J.H., Izquierdo, I. 2001. Pharmacological differences

between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learning. *Bras. J. Med. Biol. Res.* 34, 233-240.

Voorn, P., Vanderschuren, L.J., Groenewegen, H.J., Robbins, T.W., Pennartz, C.M., 2004. Putting a spin on the dorsal–ventral divide of the striatum. *Trends Neurosci.* 27(8), 468-74.

Wang, J., 2010. Preclinical and clinical research on inflammation after intracerebral hemorrhage. *Prog. Neurobiol.* 92(4), 463–477.

Wang, J., Doré, S., 2007. Inflammation after intracerebral hemorrhage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 894–908.

White, N.M., McDonald, R.J., 2002. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 77, 125–184.

Xi, G., Keep, R.F., Hoff, J.T., 2006. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage. *Lancet. Neurol.* 5, 53-63.

Youn, Y.C., Kwon, O.S., Han, E.S., Song, J.H., Shin, Y.K., Lee, C.S., 2002. Protective effect of boldine on dopamine-induced membrane permeability transition in brain mitochondria and viability loss in PC12 cells. *Biochem. Pharmacol.* 63, 495-505.

Zhang, Y., Xiong, Y., Mahmood, A., Meng, Y., Qu, C., Schallert, T., Chopp M., 2009. Therapeutic effects of erythropoietin on histological and functional outcomes following traumatic brain injury in rats are independent of hematocrit. *Brain Res.* 19, 153-164.

Zhang, D., Hu, X., Qian, L., O'Callaghan, J.P., Hong, J.S., 2010. Astrogliosis in CNS pathologies: is there a role for microglia?. *Mol. Neurobiol.* 41, 232–241.

Legends to the figures

Figure 1: Footfault test 24 and 96 hours after ICH. In 24 hours (**A**), the percentage of motor errors with the contralateral (c) and ipsilateral (i) sides to the lesion were both close to 50% in the Ctl group. In all Col groups, however, the foot slips were mainly made by the lesion contralateral side (n=12-15, **=p<0.01, ***=p<0.001). In 96 hours after ICH (**B**) this pattern was maintained only in the groups Col and Col + B25 (n=8-10, *=p<0.05).

Figure 2: Open field test 48 hours after ICH. Boldine was efficient in reversing the locomotory deficit induced by the ICH. The “***” indicates significant difference in comparison with the Ctl group, while the “#” symbolizes significant difference to the Col group (n=17-20, * and # for p<0.05).

Figure 3: Contextual fear conditioning test 96 hours after ICH. No significant differences were observed among the animals submitted to ICH or the animals that received boldine in any of the tested doses (n=21-24, p>0.05).

Figure 4: Hematoma size 96 hours after ICH. The illustration in (A) shows the area of collagenase-induced ICH, in the left striatum. The images in (B) are representative from coronal slices 2 mm thick showing the hematoma size of a sample of each group (a: Ctl; b: Col; c: Col+B25; d: Col+B50; e: Col+B75) 96 hours after ICH. As shown in (C) no significant differences were observed between the hematoma size in the Col and boldine-treated groups (Col+B25, Col+B50 and Col+B75), indicating that boldine was not able to reduce the infarct size (n=4-8, p<0.05).

Figure 5: Inflammatory infiltrate in the brain tissue 96 hours after ICH.

Illustrative images of brain slices stained with HE show the presence of inflammatory infiltrate in the parenchyma of brains belonging to the groups Col, Col+B25, Col+B50 and Col+B75 (picture 5a, 5b, 5c and 5d, respectively). Magnification of 1000x (n=4-6).

Figure 6: Cellular edema and degeneration in the brain tissue 96 hours after

ICH. Illustrative images of brain slices stained with HE showing the presence of cellular edema in brain tissue of animals belonging to the groups Col, Col+B25, Col+B50 and Col+B75 (picture 5a, 5b, 5c and 5d, respectively). Magnification of 1000x (n=4-6).

Figure 7: Boldine do not interfere in ICH-induced reactive astrogliosis.

GFAP immunocontent in the brain tissue of animals belonging to the groups Ctl, Col, Col+B25, Col+B50 and Col+B75 was measured by Western blotting. The “*” indicates significant difference in comparison with the Ctl group (n=8-11, **= $p<0.01$, ***= $p<0.001$)

Figures

Figure 1

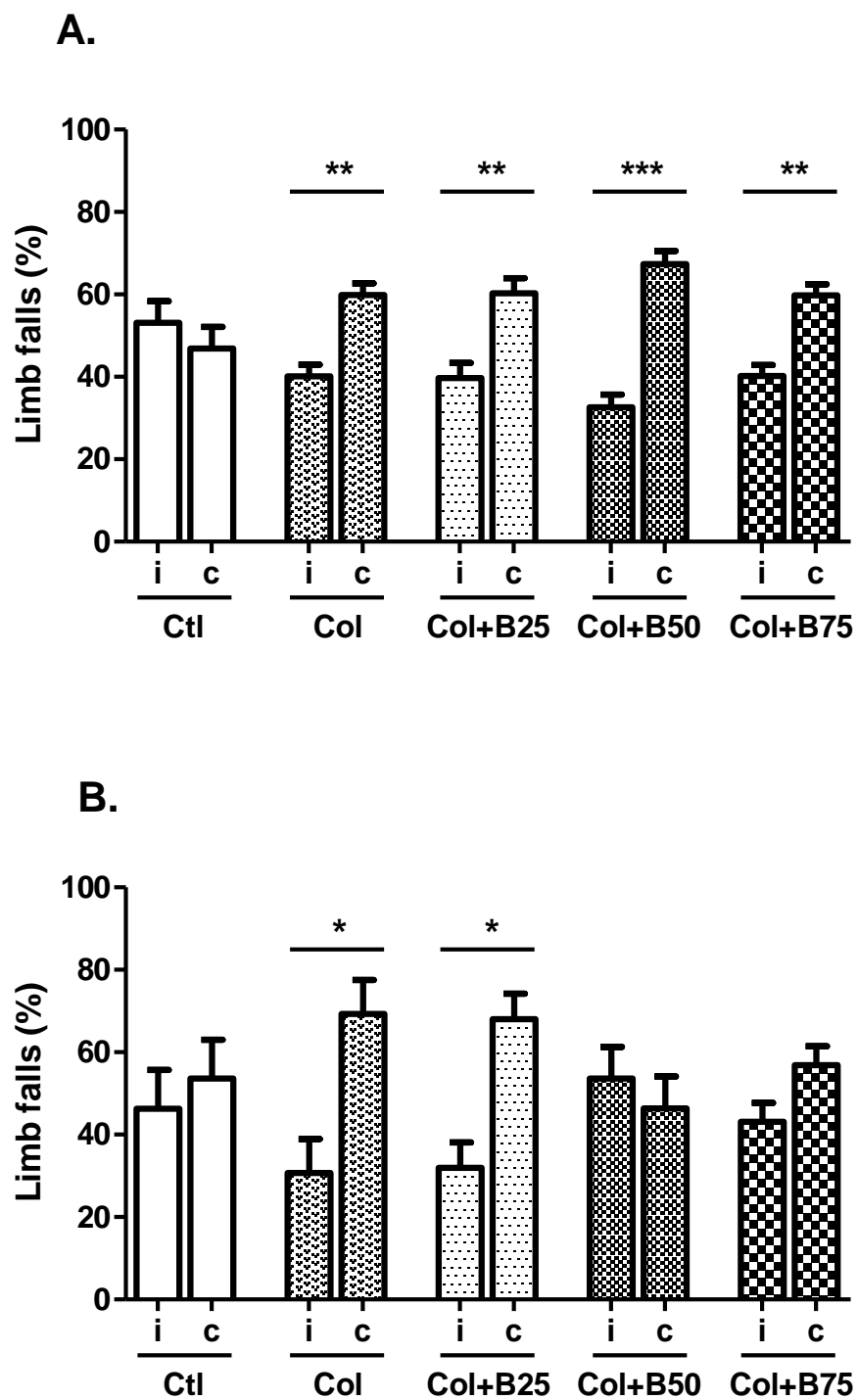


Figure 2

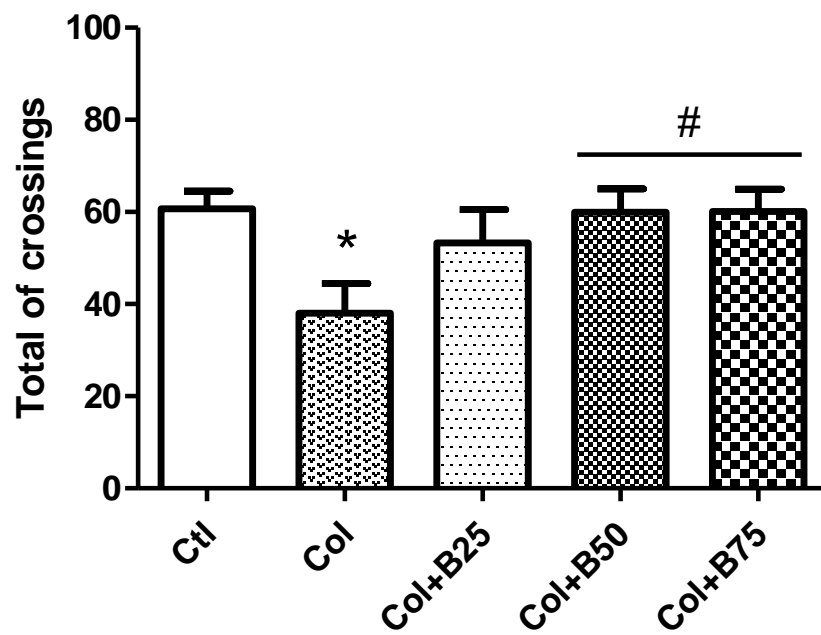


Figure 3

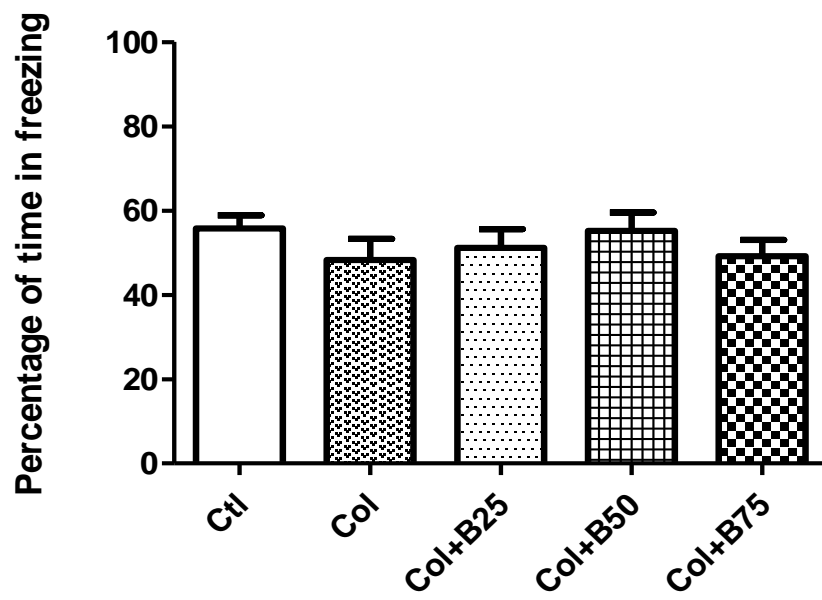
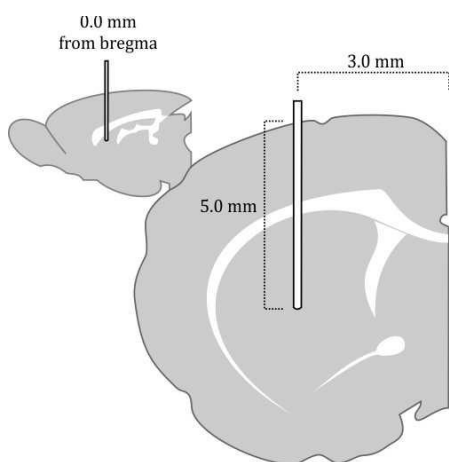
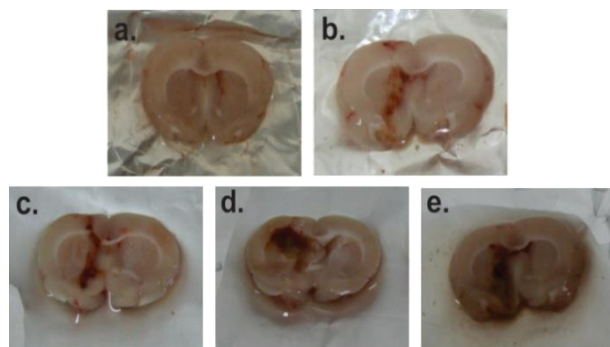


Figure 4

A.



B.



C.

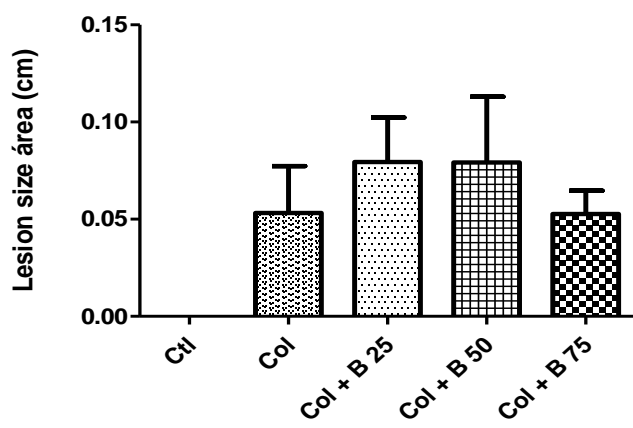


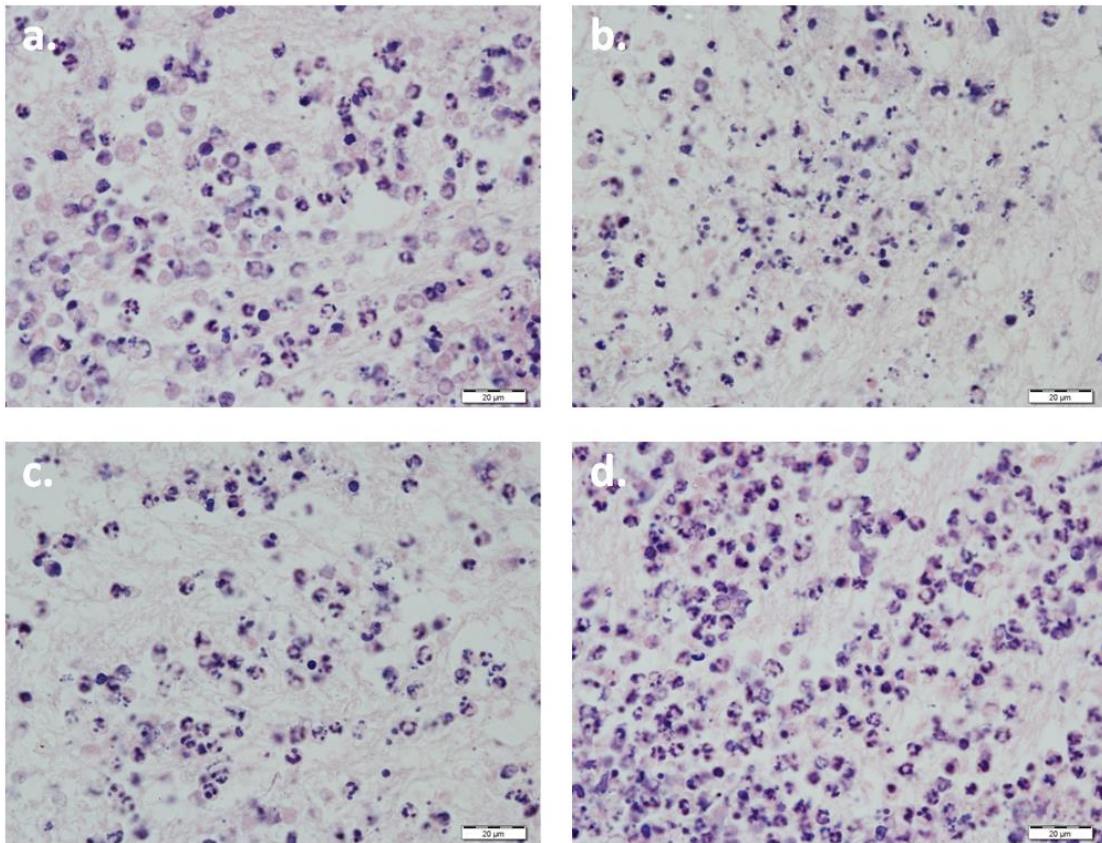
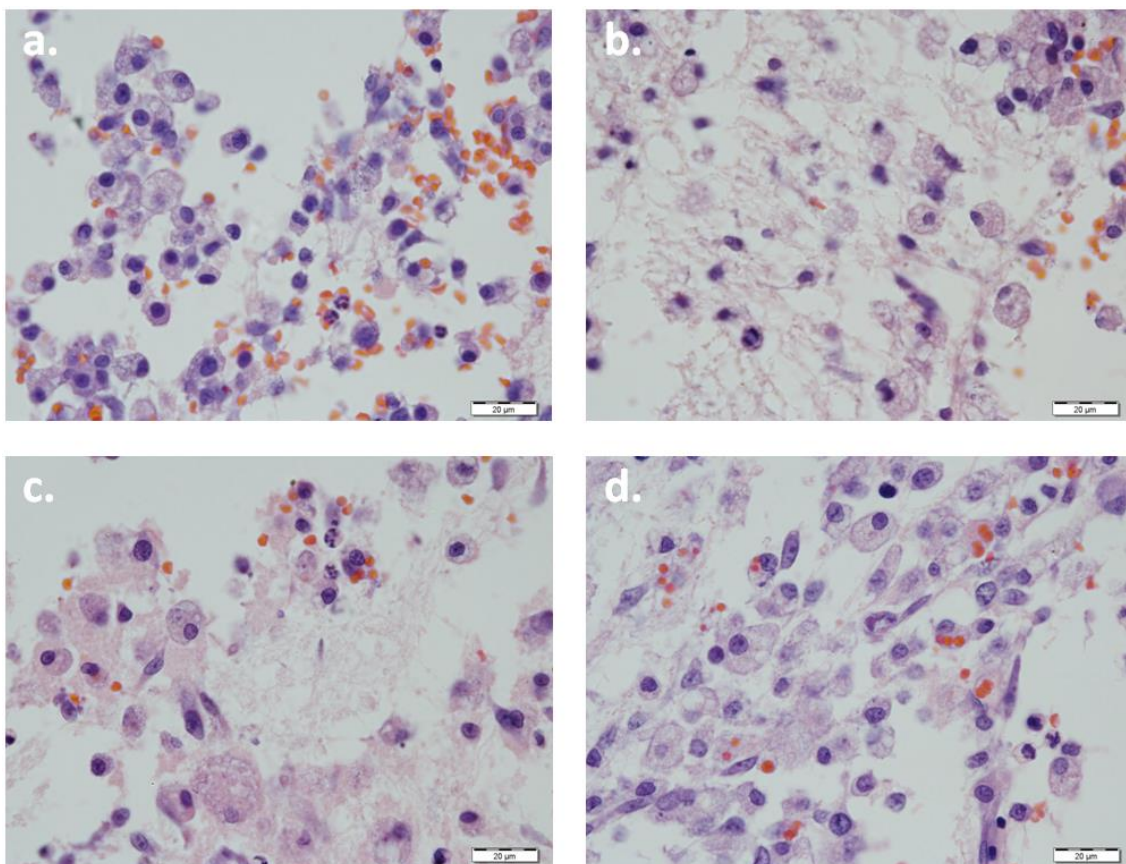
Figure 5

Figure 6:

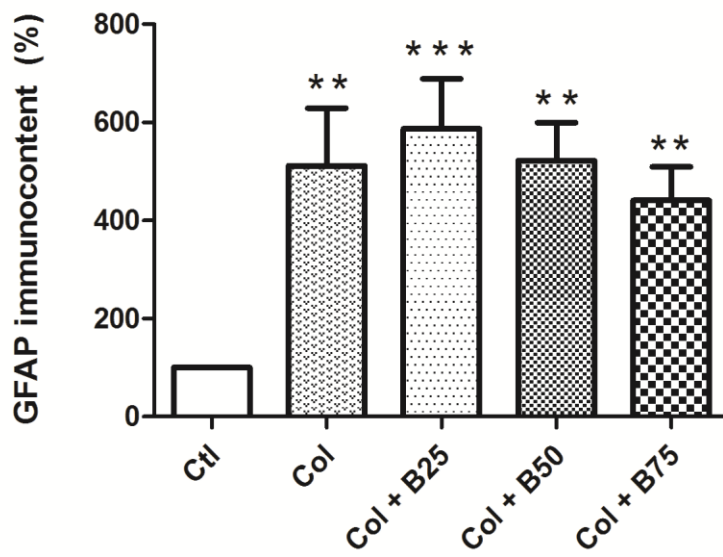


Figure 7:

Tables

Table 1: Beam walking test performed 48 and 96 hours after ICH. The number in parenthesis represents the number of animals per group.

	48 hours				96 hours			
score	0	1	2	3	0	1	2	3
Ctl	0 (8)	1 (8)	0 (8)	7 (8)	0 (8)	0 (8)	0 (8)	8 (8)
Col	0 (4)	4 (4)	0 (4)	0 (4)	0 (4)	3 (4)	0 (4)	1 (4)
Col + B25	2 (5)	1 (5)	0 (5)	2 (5)	3 (5)	0 (5)	1 (5)	1 (5)
Col + B50	1 (6)	0 (6)	2 (6)	3 (6)	0 (6)	1 (6)	0 (6)	5 (6)
Col + B75	2 (8)	2 (8)	2 (8)	2 (8)	2 (8)	1 (8)	1 (8)	4 (8)

1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em nosso laboratório, padronizamos e caracterizamos o modelo de HI e alguns testes comportamentais motores, como o *Footfault* e o *Beam Walking*. Analisando os resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que a boldina, quando administrada nas doses de 50 e 75 mg/kg, reverteu danos motores induzidos pela HI. Assim, com base nesses achados, sugerimos que a boldina possa ter efeitos benéficos na HI, merecendo mais estudos que elucidem seu mecanismo de ação e sendo um fármaco promissor a ser utilizado nessa patologia.

2. PERSPECTIVAS

- Avaliar o efeito da administração crônica da boldina no modelo de HI;
- Avaliar a ativação astrocitária e microglial após o tratamento com boldina através da imunoquantificação das proteínas GFAP e CD11b;
- Quantificar a produção de espécies ativas de oxigênio (EAO) induzidas pela HI e verificar se a administração de boldina interfere nesses níveis;
- Avaliar possíveis alterações em enzimas antioxidantes como: glutathione redutase (GR), glutathione-S-transferase (GST), glutathione cisteína ligase (GCL) e glutathione peroxidase (GPx) induzidas pela HI e investigar se a boldina é capaz de alterar a atividade de alguma dessas enzimas.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, N. J. *et al.*, “Astrocyte–endothelial interactions at the blood– brain barrier”. **Nature Rev Neurosc.** Vol. 7, 41- 53, 2006.
- ASENCIO, M. *et al.*, “Biochemical and Behavioral Effects of Boldine and Glaucine on Dopamine Systems”. **Pharmacol Biochem Behav.** Vol. 62 (1), 7– 13, 1999.
- BACKHOUSE, N. *et al.*, “Anti-inflammatory and antipyretic effects of boldine”. **Agents Actions.** Vol. 42, 114-117, 1994.
- BENKE, T. *et al.*, “Basal ganglia lesions and the theory of fronto-subcortical loops: neuropsychological findings in two patients with left caudate lesions”. **Neurocase.** Vol. 9, 70-85, 2003.
- BERTHAT, V.B. *et al.*, “Long term histological and behavioural characterisation of a collagenase induced model of intracerebral haemorrhage in rats”. **J Neurosci Methods.** Vol. 191, 180 - 190, 2010.
- CASSELS, B.K. *et al.*, “Structure-antioxidative activity relationships in benzylisoquinoline alkaloids”. **Pharmacol Res.** Vol. 31, Nº. 2, 103, 1995.
- COMIRAN, R. A. “Investigação do efeito neuroprotetor do alcalóide boldina sobre a morte celular induzida pela privação de oxigênio e glicose em culturas organotípicas de hipocampo de rato”. 2009. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: bioquímica)- Departamento de bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2009.
- CORDELL, G.A. *et al.*, “The potential of alkaloids in drug discovery”. **Phytother Res.** Vol. 15, 183-205, 2001.

- DOYLE, K.P. *et al.*, "Mechanisms of ischemic brain damage". **Neuropharmacology**. Vol. 55, 310-318, 2008.
- DUGAN, L. L.; CHOI, D. W. "Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes". **Ann Neurol**. Vol. 35, 17-21, 1994.
- FORMAN, M.S. *et al.*, "Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs". **Nat Med**. Vol.10, 1055-1063, 2004.
- GERHARDT, D. *et al.*, "Boldine: a potential new antiproliferative drug against glioma cell lines". **Invest New Drugs**. Vol. 27, 517-525, 2009.
- GERHARDT, D. "Avaliação do efeito do alcaloide boldina sobre modelos experimentais de malignidades do sistema nervoso central e bexiga". 2012. 165 f. Tese (Doutorado Ciências Biológicas: Bioquímica)- Departamento de bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2012.
- GINSBERG, M.D. "Neuroprotection for ischemic stroke: Past, present and future". **Neuropharmacolog**. Vol. 55, 363-389, 2008.
- GROSS, C. T. CANTERAS, N.S. "The many paths to fear". **Nat Rev Neurosci**. Vol. 13, 651-658, 2012.
- GUAHUA, X. *et al.*, "Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage". **Lancet Neurol**. Vol. 5, 53-63, 2006.
- HALBERSTEIN, R.A. "Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns". **Ann Epidemiol**. Vol. 15, 686-699, 2005.
- HARTMAN, R. *et al.*, "Assessing functional outcomes following intracerebral hemorrhage in rats". **Brain Res**. 148-157, 2009.

- HOOD, H.G. E DINCHER, J.R. (Ed.). Fundamentos e prática da Enfermagem. Atendimento completo ao paciente. Porto Alegre: Artes Médicas, 1995.
- HORST, G.T.; POSTIGO, A. "Prevalence and mechanisms of cell death". In: Horst, G.T.; Korf, J. (Ed). **Clin pharmacol of cerebral isch.** New Jersey: Humana, 305 p, 1997.
- JIMÉNEZ, I; SPEISKY, H. "Biological disposition of Boldina: *in vitro* and *in vivo* studies". **Phytother Res.** Vol. 14, 254-260, 2000.
- JOVER, R. *et al.*, "Brain Edema and Inflammatory Activation in Bile Duct Ligated Rats with Diet-Induced Hyperammonemia: A Model of Hepatic Encephalopathy in Cirrhosis". **Hepatology.** Vol. 43, 1257-1266, 2006.
- KATSUKI, H., "Exploring Neuroprotective Drug Therapies for Intracerebral Hemorrhage". **J Pharmacol Sci.** Vol. 114, 366-378, 2010.
- KIM, J.M. *et al.*, "Systemic transplantation of human adipose stem cells attenuated cerebral inflammation and degeneration in a hemorrhagic stroke model". **Brain res.** 43 – 50, 2007.
- KONRATH, E.L. *et al.*, "Antioxidant and pro-oxidant properties of boldine on hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation *in vitro*". **Neurotoxicology.** Vol. 29, 1136-1140, 2008.
- LaLUMIERE, R.T. *et al.*, "Modulation of memory consolidation by the basolateral amygdala or nucleus accumbens shell requires concurrent dopamine receptor activation in both brain regions". **Learn Mem.** Vol. 12(3), 296-301, 2005.
- LANHERS, M.C. *et al.*, "Hepatoprotective and antiinflammatory effects of a traditional medicinal plant of Chile *Peumus boldus*". **Planta Med.** Vol. 57, 110–115, 1991.

- LAU, Y.S. et al., “Boldine protects endothelial function in hyperglycemia induced oxidative stress through an antioxidant mechanism”. **Biochem Pharmacol.** Vol. 85, 367-375, 2013.
- LEKIC, T. *et al.*, “Characterization of the brain injury, neurobehavioral profiles, and histopathology in a rat model of cerebellar hemorrhage”. **Exp Neurol.** Vol. 227, 96–103, 2011.
- LIPTON, P. “Ischemic cell death in brain neurons”. **Physiol Rev.** Vol. 79, 1431-1568, 1999.
- MacLELLAN, C.L. *et al.*, “Assessing cognitive function after intracerebral hemorrhage in rats”. **Behav Brain Res.** Vol. 198, 321–328, 2009.
- Ministério da Saúde Brasil (2008). Saúde Brasil, 2007. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/coletiva_saude_061008.pdf
- NEUWELT, E. *et al.*, “Strategies to advance translational research into brain barriers”. **Lancet Neurol.** Vol. 7, 84–96, 2008.
- NISHIBE, M. *et al.*, “Reorganization of Motor Cortex after Controlled Cortical Impact in Rats and Implications for Functional Recovery”. **J Neurotrauma.** Vol. 27, 2221-2232, 2010.
- O'BRIEN, P. *et al.*, “Boldine and its antioxidant or health-promoting properties”. **Chem Biol Interact.** Vol. 159, 1-17, 2006.
- PAPADOPOULOS, M.C; VERKAMN, A.S. “aquaporin-4 and brain edema”. **Pediatr Nephrol.** Vol. 22, 778–784, 2007.
- PAPADOPOULOS, M. C *et al.*, “Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema”. **FASEB J.** 1-18, 2004.

- PAXINUS, G., WATSON, C. "The rat brain in stereotaxic coordinates". Amsterdam: **Elsevier Academic Press**, (2007).
- PEKNY, M.; NILSSON, M. "Astrocyte activation and reactive gliosis". **Glia**. vol. 50, 427-434, 2005.
- PEKNY, M. *et al.*, "The role of astrocytes and complement system in neural plasticity". **Int Rev Neurobiol**. Vol. 82, 95-111, 2007.
- PRICE, D.L. "New order from neurological disorders". **Nature**. Vol. 399, p.A3-A5, 1999.
- QUEZADA, M. *et al.*, "Antioxidant activity of crude extract, alkaloid fraction, and flavonoid fraction from boldo (*Peumus boldus* Molina) leaves". **J Food Sci**. Vol. 69, 371-376, 2004.
- QURESHI, A.I. *et al.*, "Intracerebral haemorrhage". **Lancet**. Vol. 373, 1632-1644, 2009.
- ROSENBERG, G.A. *et al.*, "Collagenase-Induced Intracerebral Hemorrhage in Rats". **Stroke**. Vol. 21, 801-807, 1990.
- SACCO, S. *et al.*, "Incidence and 10-Year Survival of Intracerebral Hemorrhage in a Population-Based Registry". **Stroke**. Vol. 40, 394-399, 2009.
- SANTANAM, N. *et al.*, "A novel alkaloid antioxidant, boldine and synthetic antioxidant, reduced form of RU486, inhibit the oxidation of LDL *in vitro* and atherosclerosis *in vivo* in LDL_R^{-/-} mice". **Atherosclerosis**. Vol. 173, 203-210, 2004.
- SRIRAM, K.; O'CALLAGHAN, J. P. "Divergent roles of Tumor Necrosis Factor- α in the brain". **J Neuroimmune Pharmacol**. Vol. 2, 140-153, 2007.

- SPEISKY, H. CASSELS, B.K. "Boldo and Boldine: an emerging case of natural drug development". **Pharmacol Res.** Vol. 29, 1-12, 1994.
- SU, C.Y. *et al.*, "Neuropsychological impairment after hemorrhagic stroke in basal ganglia". **Arch Clin Neuropsychol.** Vol. 22, 465–474, 2007.
- URZÚA, A. ACUÑA, P. "Alkaloids from de bark of *Peumus boldus*". **Fitoterapia.** Vol. 4, 175-177, 1983.
- VENERO, J.L. "Aquaporins in the central nervous system". **Prog Neurobiol.** Vol. 63, 321- 336; 2001.
- VIANNA, MRM. *et al.*, "Pharmacological differences between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learnin". **Bras J Med Biol Res.** Vol. 34, 233-240, 2001.
- VOORN, P. *et al.*, "Putting a spin on the dorsal–ventral divide of the striatum". **Trends Neurosci.** Vol. 27(8), 468-74, 2004.
- Xi, G. *et al.*, "Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage". **Lancet Neurol.** Vol. 5, 53–63, 2006.
- YOUN, Y.C. *et al.*, "Protective effect of boldine on dopamine-induced membrane permeability transition in brain mitochondria and viability loss in PC12 cells". **Biochem Pharmacol.** Vol. 63: 495-505, 2002.
- WANG, J.; DORÉ, S. "Inflammation after intracerebral hemorrhage". **J Cereb Blood Flow Metab.** Vol. 27, 894–908, 2007.
- WANG, J. "Preclinical and clinical research on inflammation after intracerebral hemorrhage". **Prog Neurobiol.** Vol. 92(4), 463–477, 2010.
- WHITE, N.M. and McDONALD, R.J. "Multiple parallel memory systems in the brain of the rat". **Neurobiol Learn Mem.** Vol. 77, 125–184, 2002.

- ZHANG, Y. *et al.*, "Therapeutic effects of erythropoietin on histological and functional outcomes following traumatic brain injury in rats are independent of hematocrit". **Brain Res.** Vol. 19, 153-164, 2009.
- ZAR JH, *Biostatistical analysis* (2^a ed.). **Prentice Hall**, New Jersey, 1984.

1. ANEXOS

1.1. ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

a. POSSÍVEIS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS NO FÍGADO.

Foram retirados rim e fígado dos animais controle e submetidos à HI para avaliar possíveis alterações histopatológicas devido à administração de boldina nas diferentes doses, 25, 50 e 75 mg/kg. Os órgãos foram cortados em micrótomo (6 µm) e corados com Hematoxilina-eosina (HE) e, após, analisados microscopicamente. A intensidade das características histopatológicas, para ambos os órgãos, foi expressa em graduações (0 a 3):

0: Ausência de alterações;

1: Intensidade leve (menos de 25% do campo analisado);

2: Intensidade moderada (25 a 50 % do campo analisado);

3: Intensidade severa (mais de 50% do campo analisado).

Parâmetros avaliados: Boa conservação do órgão, identificação de lóbulos hepáticos e espaço porta íntegros, presença ou não de necrose e presença ou não de esteatose.

Tabela 1: Avaliação da presença ou ausência de necrose e esteatose nos diferentes grupos experimentais. Os Grupos: Ctl, Col + B 50 e Col + B 75 mg/kg foram representados por um n total de 9 animais, enquanto os grupos Col e HB 25 mg/kg foram representados por um n total de 8 animais.

GRUPOS	NECROSE	ESTEATOSE
Ctl	0/9	0/9
Col	0/8	0/8
Col + B 25	0/8	0/8
Col + B 50	0/9	0/9
Col + B 75	0/9	0/9

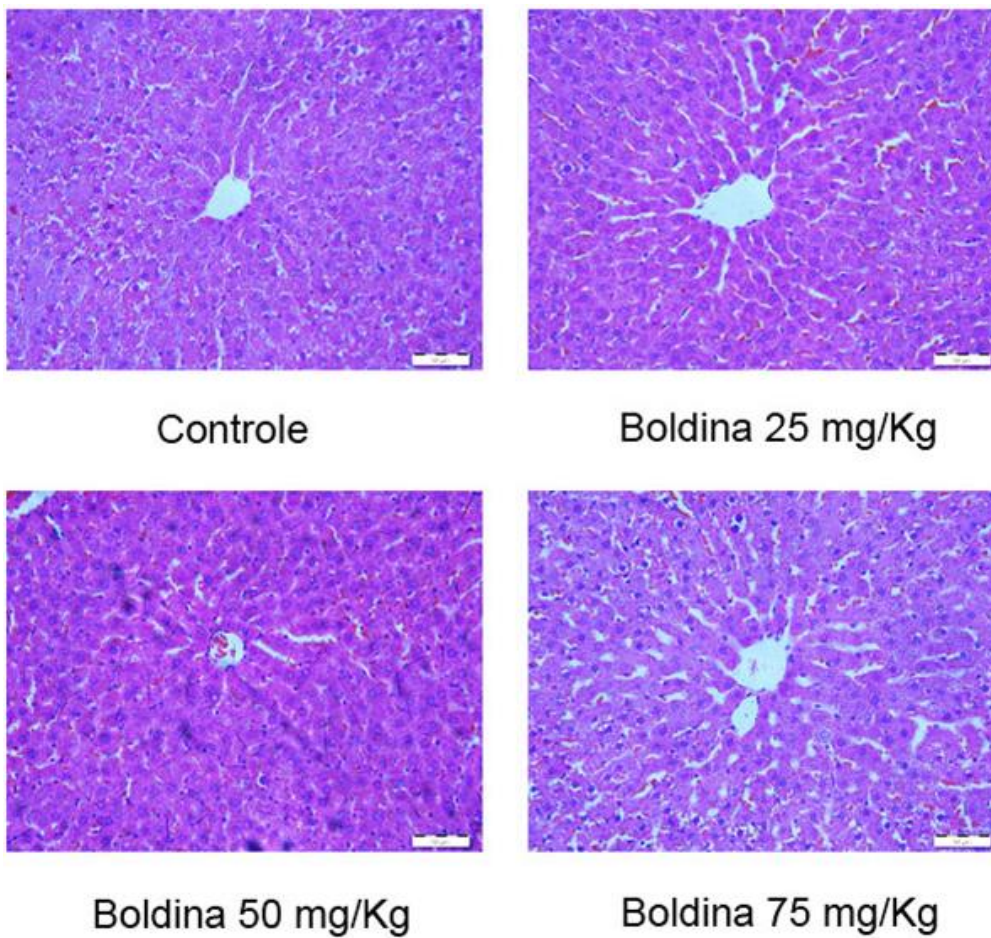


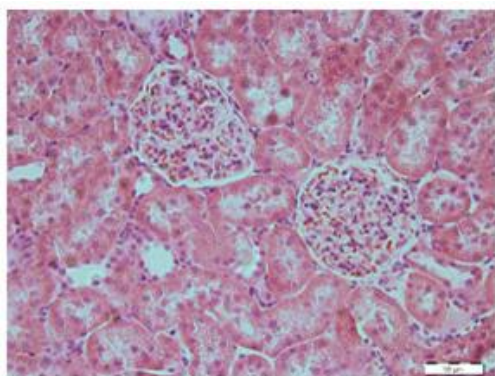
Figura 1: Cortes histológicas do fígado nos diferentes grupos corados com H.E analisados microscopicamente. Não foi observada nenhuma alteração histopatológica nos grupos acima demonstrados. Aumento: 400X.

b. POSSÍVEIS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS NO RIM.

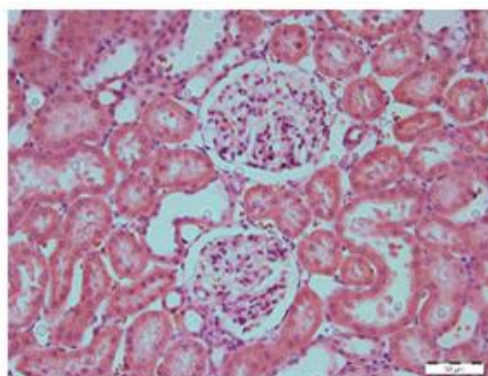
TABELA 2: Avaliação de possíveis alterações histopatológicas no córtex e medula renal nos grupos controle e submetidos a HI. Os Grupos: Ctl, Col + B 25, Col + B 50 e Col + B 75 mg/kg foram representados por um n total de 7 animais, enquanto o grupos Col foi representado por um n total de 8 animais.

Parâmetros avaliados: Boa conservação do órgão, corpúsculos renais e túbulos contorcidos (distais e proximais) íntegros, glomérulo formado por capilares, podócitos, células endoteliais e mesangiais sem alterações histológicas, Cápsula de Bowman íntegra e túbulos com células cúbicas ou poliédricas apresentando citoplasma eosinófilo e núcleos arredondados. Na região medular do órgão foi analisada a alça de Henle e os túbulos coletores, com citoplasma bem delimitado e núcleo esférico.

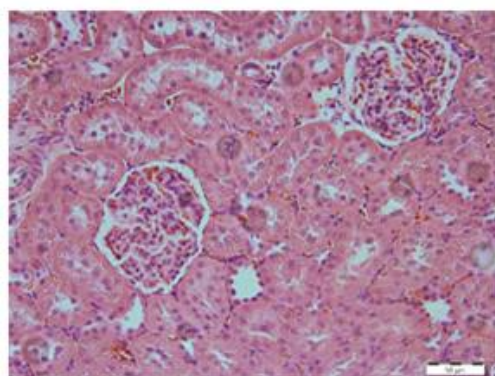
TRATAMENTOS	CÓRTEX			MEDULA	
	Cápsula de Bowman	Glomérulo	Túbulo contorcido (proximal e distal)	Alça de Henle	Túbulos coletores
Ctl	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
Col	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
Col + B 25	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
Col + B 50	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
Col + B 75	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7



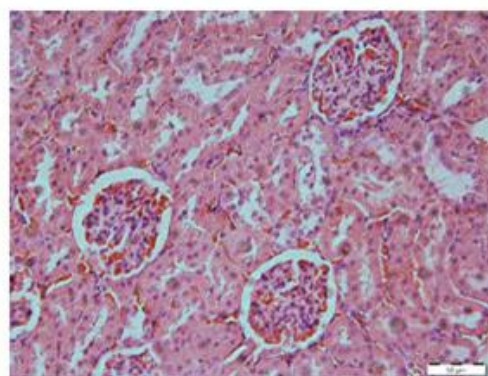
Controle



Boldina 25 mg/Kg



Boldina 50 mg/Kg



Boldina 75 mg/Kg

Figura 2: Cortes histológicos do rim nos diferentes grupos corados com H.E analisados microscopicamente. Não foi observada nenhuma alteração histopatológica nos grupos acima demonstrados. Aumento: 400X.

1.2. ANÁLISE DO PADRÃO DE PESO CORPORAL DOS ANIMAIS NO PRÉ E PÓS CIRÚRGICO.

Os animais do grupo controle e do grupo submetido à HI foram pesados antes da cirurgia e antes da eutanásia. Essa análise teve como objetivo avaliar possíveis alterações no peso desses animais após a indução da HI devido a dificuldade de locomoção ocasionada pela HI, que pudesse impedir desse animal se locomover em busca de comida e água. O gráfico abaixo representa esses dados do padrão de peso desses animais no pré e pós-cirúrgico.

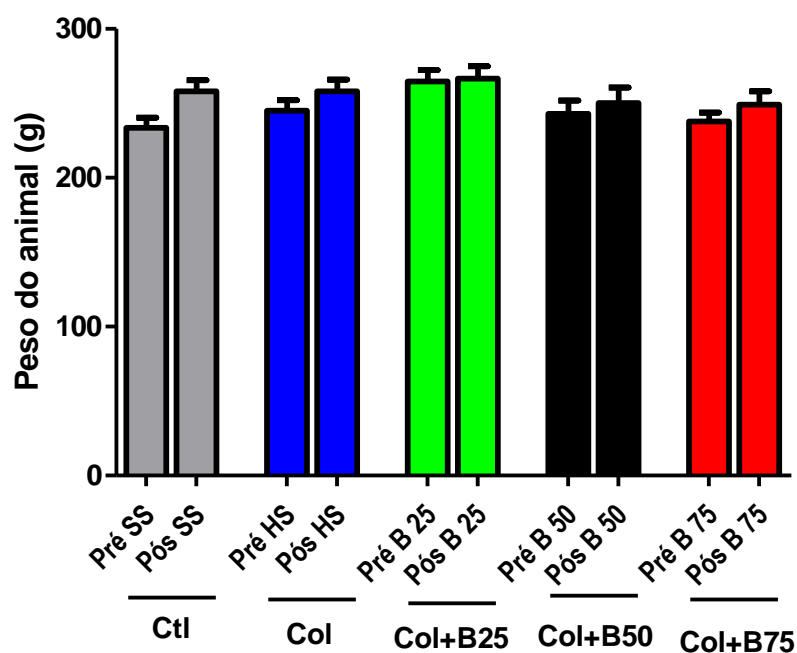


Figura 1: Peso corporal dos animais no pré e pós cirúrgico. Não foram observadas diferenças significativas no peso pré e pós cirúrgico entre os grupos avaliados. Esses resultados demonstram que não houve alteração no peso desses animais e que, na maioria das vezes, eles mantiveram ou aumentaram seu peso corporal ($p= 0,0535$, valor de $F= 1,916$, $n= 17-20$).

1.3. GUIA PARA AUTORES- Brain Research