

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM CHÁ VERDE (*CAMELLIA SINENSIS*) NO
DANO OXIDATIVO E DÉFICIT DE MEMÓRIA INDUZIDO PELO ACIDENTE
VASCULAR CEREBRAL (AVC) ISQUÊMICO E PELO AVC HEMORRÁGICO EM
RATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Caroline Dalla Colletta Altermann

Uruguaiana, RS, Brasil

2016

CAROLINE DALLA COLLETTA ALTERMANN

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM CHÁ VERDE (*CAMELLIA SINENSIS*) NO
DANO OXIDATIVO E DÉFICIT DE MEMÓRIA INDUZIDO PELO ACIDENTE
VASCULAR CEREBRAL (AVC) ISQUÊMICO E PELO AVC HEMORRÁGICO EM
RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Pâmela Billig Mello Carpes

Co-orientadora: Dr^ª. Mauren Assis de Souza

Uruguaiana, RS, Brasil

2016

Universidade Federal do Pampa
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado:

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM CHÁ VERDE (*CAMELLIA SINENSIS*) NO
DANO OXIDATIVO E DÉFICIT DE MEMÓRIA INDUZIDO PELO ACIDENTE
VASCULAR CEREBRAL (AVC) ISQUÊMICO E PELO AVC HEMORRÁGICO EM
RATOS**

Elaborada por
Caroline Dalla Colletta Altermann

como requisito parcial para a obtenção do título de
Mestra em Bioquímica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^ª Dr^ª Pâmela Billig Mello Carpes (Presidente, orientadora)

Prof. Dr. Rafael Roehrs (UNIPAMPA)

Prof. Dr. Iván Izquierdo (PUCRS)

Uruguaiana, RS, Brasil

2016

DEDICATÓRIA

A minha mãe, Marisa Altermann, que com bravura e amor tem se dedicado incansavelmente para que nós, seus filhos possamos estudar e tenhamos condições de realizar nossos sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus.

À professora Pâmela Mello-Carpes pela orientação desde a graduação, por todo o aprendizado e oportunidades nesse período. Pela paciência e confiança que deposita nos seus alunos.

À Mauren Souza pela co-orientação, disponibilidade e ajuda nas técnicas e rotina do laboratório.

Aos colegas de laboratório pela troca de conhecimentos e aprendizado, pelo auxílio em cada etapa dos experimentos que compõem esta dissertação e, todos outros trabalhos que já desenvolvemos no GPFis.

À minha família pelo incentivo e apoio em tudo o que escolho fazer, pelo carinho e por acreditarem em mim nos momentos difíceis que passamos juntos, pela paciência com que compreenderam minhas ausências em época de experimentos.

A todos que de alguma maneira colaboraram para minha formação e aprendizado.

À UNIPAMPA e ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica por oportunizar a realização deste trabalho e à CAPES pela bolsa concedida durante o período.

“É preciso dar um sentido humano as nossas construções...”

Érico Veríssimo

“Mantenha seu cérebro ativo, faça-o trabalhar e ele nunca irá se degenerar. Possuímos grande plasticidade neural - mesmo quando os neurônios morrem os que restam se reorganizam para manter as mesmas funções, mas para isso é conveniente estimulá-los!”

Dra. Rita Levi Montalcini

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Universidade Federal do Pampa, RS, Brasil

EFEITOS DO TRATAMENTO COM CHÁ VERDE (*CAMELLIA SINENSIS*) NO DANO OXIDATIVO E DÉFICIT DE MEMÓRIA INDUZIDO PELO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL (AVC) ISQUÊMICO E PELO AVC HEMORRÁGICO EM RATOS

Autora: Caroline Dalla Colletta altermann

Orientadora: Pâmela Billig Mello Carpes

Co-orientadora: Mauren Assis de Souza

Data e Local da Defesa: Uruguaiana, 15 de março de 2016.

O Acidente Vascular Cerebral (AVC) é classificado em dois tipos: Isquêmico e Hemorrágico. Dentre as sequelas decorrentes do AVC destacam-se as alterações funcionais, prejuízo cognitivo e perda de memória. Além disso, sabe-se que em uma situação como o AVC ocorre o desbalanço do estado redox e, como resultado final, o dano neuronal. Atualmente buscam-se intervenções para promover a neuroproteção através de compostos naturais que possam interferir nos mecanismos bioquímicos visando à redução dos danos. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da suplementação com chá verde (*Camellia Sinensis*) sobre o dano oxidativo e déficit de memória de reconhecimento de objetos (RO) induzidos por dois modelos experimentais de AVC, isquêmico (isquemia-reperfusão transitória; IR) e hemorrágico (hemorragia intracerebral, HIC), em ratos. Para isso 80 ratos machos da raça Wistar foram submetidos à cirurgia de indução da IR ou HIC ou Sham, e divididos em oito grupos: Sham IR, Sham IR e chá verde, AVC Isquêmico, AVC Isquêmico e chá verde, Sham HIC, Sham HIC e chá verde, AVC Hemorrágico, AVC Hemorrágico e chá verde. A suplementação com chá foi realizada por 10 dias antes da cirurgia e mantida por 7 dias após, na dose diária de 400 mg/kg. Após a indução do AVC/Sham os animais foram submetidos a tarefas de memória de reconhecimento para avaliar memória curta e longa duração. Além disso, análises em hipocampo para mensuração de parâmetros relacionados ao estresse oxidativo através da determinação dos níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs),

detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); e para a avaliação da capacidade antioxidante através do método de determinação de transferência de elétrons – FRAP, foram realizadas. Os resultados do RO foram analisados através do Teste t de uma amostra (média teórica 50%), e os resultados bioquímicos através do teste t de Student ou ANOVA de uma via com *post hoc* de Dunn. Ambos os tipos de AVC causaram déficit de memória de curta e longa duração no teste de RO, de forma que os animais não reconheceram o novo objeto após o AVC. Por outro lado, os animais que receberam chá verde previamente ao AVC, assim como os animais dos grupos Sham, gastaram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração explorando o novo objeto. Os dois subtipos de AVC induziram um aumento nos níveis de EROs, o AVC hemorrágico causou lipoperoxidação hipocampal e o AVC isquêmico diminuiu a capacidade antioxidante total, o que relacionamos os consequentes déficits mnemônicos observados. A suplementação com chá verde, por sua vez, demonstrou efeito neuroprotetor e preveniu o dano celular causado pelos modelos de AVC; o chá foi eficiente em evitar o aumento de EROs nos dois modelos, e peroxidação lipídica no grupo AVC Hemorrágico, além manter a capacidade antioxidante total em ambos. Estes resultados comprovam que o AVC provoca déficit de memória de reconhecimento de curta e longa duração e dano oxidativo hipocampal, e que a suplementação de chá verde pode proteger contra tais danos.

Palavras-Chave: memória, estresse oxidativo, chá verde, neuroproteção, Acidente Vascular Cerebral

ABSTRACT

Master Thesis
Graduate Program in Biochemistry
Federal University of Pampa

EFFECTS OF GREEN TEA (*CAMELLIA SINENSIS*) TREATMENT ON OXIDATIVE DAMAGE AND MEMORY DEFICIT INDUCED BY ISCHEMIC AND HEMORRHAGIC STROKE IN RATS

Author: Caroline Dalla Colletta Altermann

Advisor: Pâmela Billig Mello Carpes

Co-advisor: Mauren Assis de Souza

Place and Date of Defense: Uruguaiana, March 15th, 2016.

The stroke is classified in two types: Ischemic and Hemorrhagic. Among the consequences resulting from the stroke there are the functional changes, cognitive deficit and memory impairment. Furthermore, it is known that in a situation such as stroke is followed by disbalance of the redox state and, as a final result, neuronal damage. Currently, interventions to promote neuroprotection through natural compounds that may interfere in biochemical mechanisms aiming the reduction of damage are sought. The aim of this study was to investigate the effect of supplementation with green tea (*Camellia sinensis*) on oxidative damage and object recognition memory (OR) deficit induced by two experimental models of stroke: ischemic (ischemia-reperfusion, IR) and hemorrhagic (intracerebral hemorrhage, ICH), in rats. To this, 80 Wistar male rats divided into 8 groups according the stroke type induced were used (n=10/group): Sham IR, Sham IR and green tea, IR, IR and green tea, Sham ICH, Sham ICH and green tea, ICH, ICH and green tea. Supplementation with green tea was initiated 10 days before the stroke surgery and continued for 7 days after in a dose of 400 mg/kg per day. After all, the rats were subjected to object recognition task (OR) to assess short (STM) and long term memory (LTM). Additionally, hippocampus were used to measure parameters related to oxidative stress by determining the reactive species of oxygen levels (ROS), detection of reactive substances to thiobarbituric acid (TBARS) and the evaluation of the antioxidant capacity by the method of electron transfer determination - FRAP. OR results

were analyses using one-sample t-test (theoretical mean 50%) and biochemical parameters using Student's t-test or one-way ANOVA followed by Dunn's post hoc. Both types of stroke caused STM and LTM in OR test, so, the animals did not recognize the new object after stroke. On the other hand, animals that received green tea previous to stroke, and the animals of the sham group, spent significantly more than 50% of the total exploration time exploring the new object. The two types of stroke induced an increase in the levels of ROS, hemorrhagic stroke caused hippocampal lipid peroxidation and ischemic stroke caused the decrease of the total antioxidant capacity, which is related to the consequent mnemonic deficits observed. Supplementation with green tea showed neuroprotective effect and prevent cell damage caused by stroke models; the green tea was effective in preventing the increase of ROS in both models, and lipid peroxidation in hemorrhagic stroke group, besides keeping the total antioxidant capacity in both. These results show that stroke causes short and long term memory deficits and hippocampal oxidative damage, and that the green tea supplementation can protect against such damage.

Keywords: memory, oxidative stress, green tea, neuroprotection, stroke

LISTA DE FIGURAS

Parte I

	Páginas
Figura 1. Tipos de memória de acordo com o tempo de duração	22
Figura 2. Esquema da estrutura e conexões do hipocampo. CA: abreviatura de Corno de Amon	23
Figura 3. Classificação da memória segundo sua natureza e os diferentes testes comportamentais para avaliar aprendizado e memória	24
Figura 4. Mecanismos fisiopatológicos envolvidos no Acidente Vascular Cerebral Isquêmico	26
Figura 5. Sequência de eventos iniciados pela Hemorragia Intracerebral	27
Figura 6. Mecanismos de defesas antioxidantes contra dano oxidativo induzido por radicais livres	30
Figura 7. Composição química das catequinas presentes no chá verde	31

Parte II

Figura 1. Experimental design. The numbers represent the days of experiments. NDS: Neurologic Disability Scale; OF: Open Field; Habit: Habituation; OR: Object Recognition; STM: Short-Term Memory; LTM: Long Term Memory	36
Figura 2. Short and long-term object recognition memory results. Ischemic and hemorrhagic stroke caused deficits in short-term memory (STM) and long-term memory (LTM) in object recognition (OR) task. Green tea supplementation avoids these deficits. A. Animals from groups 1-4 were trained on OR task and tested 3 h later (STM). B. Animals from groups 1-4 were trained on OR task and tested 24 h later (LTM). C. Animals from groups 5-8 were trained on OR task and tested 3h later (STM). D. Animals from groups 5-8 were trained on OR task and tested 24 h later (LTM). Both ischemic and the hemorrhagic stroke group presented STM and LTM deficits; the groups treated with green tea previously to the stroke induction were able to perform the test correctly. * $P < 0.05$ in one-sample Student's t-test with theoretical mean = 50%; n = 7-10 per group	41
Figura 3. Effects of ischemic and hemorrhagic stroke and green tea	42

supplementation on hippocampal pro-oxidant markers and total antioxidant capacity. A. Levels of Reactive Oxygen Species (ROS). B. Levels of lipid peroxidation measured by TBARS. C. Total antioxidant capacity measured by Ferric Reducing/Antioxidant Power (FRAP). *P < 0.05, ANOVA following by Dunn's post hoc or Student t-test for specific comparisons

LISTA DE TABELAS**Parte II**

	Páginas
Tabela 1. Control behavioral tests results. Ischemic and hemorrhagic stroke did not alter locomotor and exploratory activities on Open Field (One-way ANOVA; data expressed as mean \pm SEM; n=8-10 per group) and did not cause neurological dysfunction evaluated by NDS (score 0 mean no neurological deficit). Experimental groups: 1: Sham Ischemic Stroke; 2: Green Tea + Sham Ischemic Stroke; 3: Ischemic Stroke; 4: Green tea + Ischemic Stroke; 5: Sham Hemorrhagic Stroke; 6: Green Tea + Sham Hemorrhagic Stroke; 7: Hemorrhagic Stroke; 8: Green Tea + Hemorrhagic Stroke	39

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANOVA – Análise de variância
- ATP – Adenosina Trifosfato
- AVC - Acidente Vascular Cerebral
- CA1: sub-região hipocampal, Corno de Amon 1
- CA2 – sub-região hipocampal, Corno de Amon 2
- CA3 – sub-região hipocampal, Corno de Amon 3
- Ca⁺⁺ - Cálcio
- CREB - do inglês *cAMP response element-binding protein*
- BDNF - do inglês *Brain Derived Neurothrophic Factor*
- DCFH-DA - 2'7'diclorofluoresceína diacetato
- DEF - Derivativo fluorescente oxidado
- DNA- do inglês Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)
- EC – epicatequina
- EGC - epigalocatequina
- ECG - epicatequina-3-galato
- EGCG - Epigalocatequina 3-galato
- ERN - Espécies reativas de nitrogênio
- EROs - espécies reativas de oxigênio
- H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
- HIC – Hemorragia Intracerebral
- HO. – Radical hidroxil
- K⁺ - Potássio
- LTM – do inglês *Long-Term Memory* (Memória de Longa Duração)
- LTP - do inglês *Long-Term Potentiation* (Potencialização de Longa Duração)
- MT – Memória de trabalho
- Na⁺ - Sódio
- RO - Teste de reconhecimento de objetos
- O₂⁻ – Ânion superóxido
- ROS – Reactive oxygen species do inglês (espécies reativas de oxigênio)
- SNC – Sistema Nervoso Central
- STM - do inglês *Short-Term Memory* (Memória de Curta Duração)
- TBARS - Ácido Tio-barbitúrico

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3. REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1 Memória	21
3.1.1 Memória de reconhecimento de objetos (RO).....	23
3.2 Acidente Vascular Cerebral.....	25
3.2.1 Acidente Vascular Cerebral Isquêmico	25
3.2.2 Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico.....	26
3.2.3 Modelos animais de AVC.....	28
3.3 Estresse Oxidativo.....	28
3.4 Chá verde.....	31
4. MANUSCRITO	33
Abstract	33
1. Introduction	34
2. Methods.....	35
3. Results	39
4. Discussion.....	42
References	44
5. CONCLUSÕES	48
6. PERSPECTIVAS.....	49
7. REFERÊNCIAS.....	50
8. ANEXOS.....	63
8.1. Parecer de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA da UNNIPAMPA	63

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação foi organizada em três partes principais. Na parte I encontram-se a INTRODUÇÃO, os OBJETIVOS e o REFERENCIAL TEÓRICO. Os MÉTODOS utilizados, bem como os RESULTADOS e DISCUSSÃO e as respectivas REFERÊNCIAS estão apresentadas sob a forma de manuscrito e compõem a parte II deste trabalho. As sessões CONCLUSÃO, PERSPECTIVAS e REFERÊNCIAS encontram-se na parte III, sendo que as referências bibliográficas desta parte referem-se apenas às utilizadas na introdução e referencial teórico desta dissertação, uma vez que as referências do artigo científico estão inseridas na parte II.

PARTE I

1. INTRODUÇÃO

O Acidente Vascular Cerebral (AVC), equivalente ao termo genérico do inglês *Stroke*, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) é definido como uma perturbação focal ou global da função cerebral de origem vascular (WHO, 2001). O AVC é uma das principais causas de morte no Brasil e no mundo, de forma que dados estatísticos têm evidenciado o aumento da incidência de doenças de cerebrovasculares nos últimos anos (KRISHNAMURTHI *ET AL.*, 2013; PORCELLO MARRONE *ET AL.*, 2013). Dentre todos os casos de AVC, a maior incidência é de isquemia cerebral (80-85%) (ASSOCIATION, 2012); o AVC Hemorrágico, por outro lado possui alta taxa de morbidade e mortalidade, superando o isquêmico neste quesito (FEIGIN *ET AL.*, 2009; WANG, J., 2010).

Os fatores de risco que pré-dispõem ao AVC podem ser divididos em dois grupos: tratáveis e não tratáveis. As causas tratáveis estão relacionadas à arteriosclerose, hipertensão arterial sistêmica, *Diabetes Mellitus*, cardiopatias, insuficiência cardíaca congestiva, dislipidemias, obesidade, tabagismo, alcoolismo, sedentarismo e uso de anticoncepcionais orais; dentre os fatores não tratáveis estão a idade, uma vez que com o envelhecimento a ocorrência de AVC aumenta, o sexo e a raça negra (FELDMANN *ET AL.*, 2005; BEMBENEK *ET AL.*, 2015; CHEN *ET AL.*, 2015).

O AVC é uma síndrome vascular neurológica classificada de acordo com sua etiologia. Pode ser classificado como isquêmico, que engloba os subtipos permanente e transitório; ou hemorrágico, cujos subtipos são o intracerebral, o intraventricular e o subaracnóideo. Esta diferenciação é importante, pois a fisiopatologia e os eventos celulares após a injúria, apesar de semelhantes, possuem algumas particularidades em cada subtipo, e assim o prognóstico e a terapêutica diferem.

O AVC isquêmico é caracterizado por um insulto causado pela interrupção do fluxo sanguíneo vascular cerebral. Quando ocorre em uma região específica do cérebro é dito como isquêmico focal; caso a alteração vascular atinja diferentes áreas é denominado isquêmico global. Já o evento vascular hemorrágico é decorrente da ruptura de um vaso sanguíneo no parênquima cerebral que acarreta o extravasamento de sangue para o interior do cérebro - Hemorragia intracerebral (HIC), para o sistema ventricular - Hemorragia intraventricular, e/ou para o espaço subaracnóideo (KUMAR *ET AL.*, 2016).

O sistema nervoso central (SNC) apresenta metabolismo dependente de oxigênio e glicose, sem reservas significantes de ambos, e por isso é tão susceptível a qualquer alteração

do fluxo sanguíneo em comparação com outros órgãos (ZEMKE *ET AL.*, 2004; MERGENTHALER *ET AL.*, 2013). Além disso, o cérebro é particularmente vulnerável a estas injúrias vasculares devido ao estresse oxidativo gerado nestas situações, pois possui menor capacidade antioxidante e uma capacidade limitada de reparo a insultos relacionados com a oferta de oxigênio e glicose (RABIEI E RAFIEIAN-KOPAEI, 2014).

Estudos clínicos e experimentais demonstram que ambos os tipos de AVC causam incapacidades permanentes que decorrem com déficits motores e sensoriais observados no hemicorpo oposto ao local da lesão, com característica hemiplegia ou hemiparesia, distúrbio da deglutição (disfasia), além de declínio das funções cognitivas (ALTMAN *ET AL.*, 2007; LIU *ET AL.*, 2013), sendo o prejuízo da memória umas das complicações frequentes e que contribuem para a redução da independência e qualidade de vida (XIONG *ET AL.*, 2015; KALARIA *ET AL.*, 2016). A memória é definida como a capacidade de aquisição, formação, conservação e evocação de informações. Conforme descreve Izquierdo (2002) não podemos fazer algo que não aprendemos como fazer, assim o acervo de memórias adquiridas faz de cada indivíduo único e contribui para sua personalidade.

Considerando o AVC como um grande problema de saúde pública, para o qual não existe um tratamento eficaz, novas pesquisas clínicas e experimentais demonstram que a prevenção de fatores predisponentes, como a hipertensão e o tratamento com novos compostos, pode ser uma alternativa interessante para reduzir o número de casos e minimizar as sequelas advindas de um AVC (WANG, JIAN, 2010; KEEP *ET AL.*, 2012). A neuroproteção é vista como uma alternativa de prevenção para os distúrbios vasculares e tem o objetivo de minimizar ou interromper a sequência de eventos moleculares advindos da alteração vascular. Nesta busca por terapias efetivas para prevenção ou redução dos danos neurológicos decorrentes do AVC os estudos com compostos bioativos com capacidade antioxidante provenientes de produtos naturais, como flavonoides e resveratrol, têm se mostrado uma alternativa viável (OKUYAMA *ET AL.*, 2014; GIRBOVAN E PLAMONDON, 2015; LOPEZ *ET AL.*, 2015)

Dentre os compostos promissores que têm sido estudados encontra-se o chá verde. Estudos demonstram que a administração de chá verde produzido a partir das folhas da planta *Camellia sinensis* pode exercer um papel antioxidante que colabora para a preservação das funções do SNC; essa capacidade de neuroproteção está relacionada com redução de radicais livres, aumento da capacidade antioxidante e diminuição da morte neuronal (FRASER *ET AL.*, 2007; LI *ET AL.*, 2009; YAN *ET AL.*, 2010; SCHIMIDT *ET AL.*, 2014). Neste contexto, esta dissertação procura responder ao seguinte problema de pesquisa: A suplementação com chá

verde é capaz de evitar ou amenizar o déficit de memória e o dano oxidativo hipocampal induzidos por dois modelos de AVE experimental, isquemia-reperfusão transitória (AVC isquêmico) e hemorragia intracerebral (AVC hemorrágico) em um modelo animal?

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos da suplementação com chá verde sobre o dano oxidativo e déficit de memória induzidos por dois modelos animais de AVC experimental: isquemia-reperfusão transitória (AVC isquêmico) e hemorragia intracerebral (AVC hemorrágico).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a memória de reconhecimento de objetos de curta e longa duração em ratos Wistar machos submetidos a modelos de AVC isquêmico e hemorrágico;
- Avaliar os efeitos neuroprotetores de uma suplementação de chá verde sobre os déficits de memória de reconhecimento associados ao AVC isquêmico e ao AVC hemorrágico em modelos animais;
- Avaliar o estresse oxidativo e capacidade antioxidante em hipocampo de ratos Wistar machos submetidos a modelos de AVC isquêmico e hemorrágico;
- Avaliar o estresse oxidativo e capacidade antioxidante em hipocampo de ratos Wistar machos submetidos a modelos de AVC isquêmico e hemorrágico e previamente suplementados com chá verde.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Memória

Memória é definida como a capacidade de aquisição, formação, conservação e evocação de informações. A aquisição pode ser descrita como o processo de aprendizado, a consolidação como o processo que engloba as alterações moleculares cerebrais necessárias para que a memória seja armazenada; e a evocação é a forma de provar que a memória foi realmente formada e arquivada, é a recordação da informação aprendida e consolidada (IZQUIERDO, 2002).

As memórias podem ser classificadas de acordo com o seu conteúdo, função e/ou tempo de duração. De acordo com a classificação pelo conteúdo as memórias podem ser classificadas como declarativas ou procedurais. São definidas como declarativas (ou explícitas) as memórias referentes a eventos ou conhecimentos. Dentre as memórias declarativas, aquelas que se referem a fatos e eventos são chamadas de episódicas, já as que se referem a conhecimentos gerais são denominadas semânticas. Portanto, as memórias declarativas são aquelas que podem ser verbalizadas (SQUIRE, 1992). De acordo com seu conteúdo, as memórias também podem ser classificadas como não declarativas, procedurais ou implícitas. Este tipo de memória é manifestada por comportamentos motores e está relacionada com as habilidades motoras ou sensoriais, logo memórias implícitas são mais facilmente demonstradas do que verbalizadas (SQUIRE E ZOLA, 1996).

De acordo com a classificação temporal, tem-se a memória de trabalho (MT), ou imediata, que tem duração de segundos ou minutos e é importante para que uma informação possa ser processada, se diferenciando das demais por não formar arquivos (DASH ET AL., 2007). Sua função principal é analisar informações e compará-las com as já existentes, sendo regulada pelo córtex pré-frontal (DASH ET AL., 2007). Além da memória de trabalho, considerando o tempo de duração existem outros dois tipos de memória: a memória de curta duração (STM, do inglês *Short-Term Memory*) e memória de longa duração (LTM do inglês *Long-Term Memory*). A STM dura de minutos a aproximadamente seis horas após a aquisição; já LTM precisa de aproximadamente em 6h para sua consolidação e pode durar dias, meses ou anos (IZQUIERDO ET AL., 1999a). Estudos confirmam que ambas dependem do processamento prévio pela memória de trabalho, sendo fenômenos distintos e paralelos (IZQUIERDO ET AL., 1998) (Fig.1).

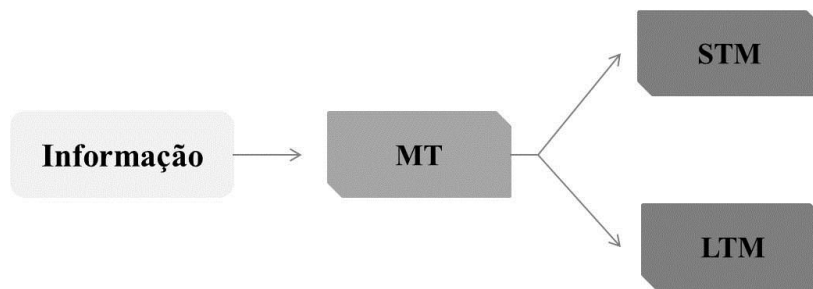


Figura. 1. Tipos de memória de acordo com o tempo de duração. MT: Memória de trabalho. STM: Memória de curta duração, do inglês *Short-Term Memory*. LTM: Memória de longa duração, do inglês *Long-Term Memory* (Adaptado de Izquierdo, 2002).

STM e LTM utilizam-se das mesmas estruturas cerebrais, como hipocampo e áreas do córtex, para consolidar informações e seu conteúdo cognitivo é basicamente o mesmo, porém envolvem mecanismos de consolidação distintos e simultâneos. A STM não requer síntese de proteína, enquanto a LTM necessita de modificações sequenciais desde síntese de proteínas, glicoproteínas e RNAm, cAMP, ativação da PKA, fosforilação do CREB, etc. (IZQUIERDO *ET AL.*, 1998; MEDINA *ET AL.*, 1999; IZQUIERDO *ET AL.*, 2000).

A consolidação de novas memórias envolve a interação entre os sistemas neuronais, sendo o hipocampo fundamental para formação de memórias declarativas de curta e de longa duração (IZQUIERDO, I. E MEDINA, J. H., 1997; HUIJGEN E SAMSON, 2015). O hipocampo é uma estrutura subcortical do lobo temporal que compõe o sistema límbico, sendo dividida em áreas denominadas giro denteado e Corno de Amon (CA), que, por sua vez, é subdividido em CA1, CA2 e CA3 (Fig.2). O hipocampo, especialmente a região CA1, apresenta alta sensibilidade a alterações do fluxo sanguíneo e estresse oxidativo (FARKAS *ET AL.*, 2007; ERFANI *ET AL.*, 2015), assim, considerando sua importância para os processos mnemônicos, diante destas alterações é provável observar déficits de memória.

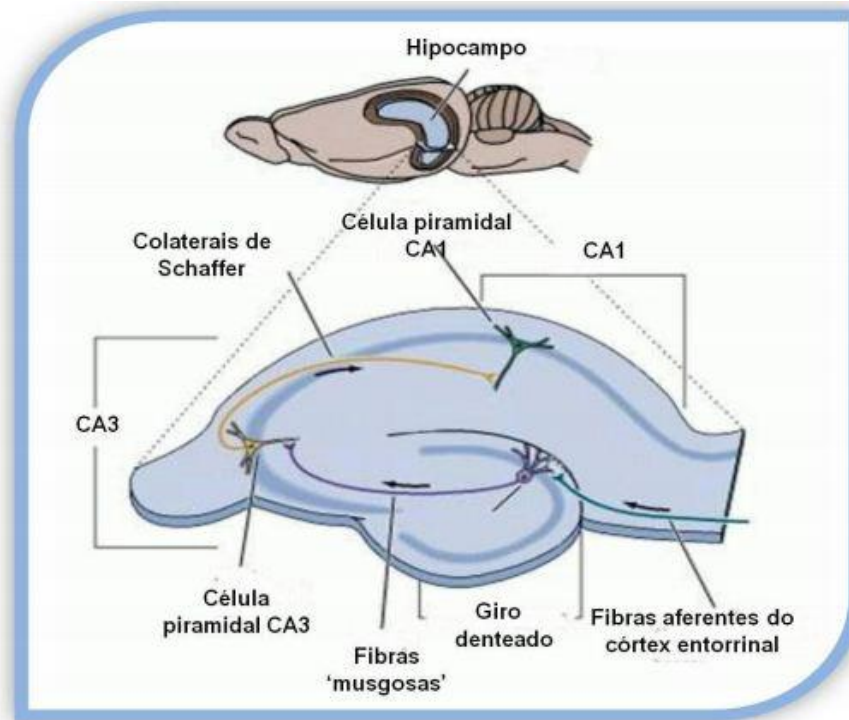


Figura 2. Esquema da estrutura e conexões do hipocampo. CA: abreviatura de Corno de Amon (FONTE: Castro, 2013).

3.1.1 Memória de reconhecimento de objetos (RO)

O estudo dos mecanismos bioquímicos envolvidos nos processos de memória requer o uso de técnicas que muitas vezes não são possíveis de ser realizadas em seres humanos vivos. Neste sentido, a pesquisa animal é uma aliada, sendo os roedores, ratos e camundongos, amplamente utilizados para permitir maior entendimento destes processos.

Uma série de testes comportamentais para avaliar a aquisição, a consolidação e a evocação da memória, além de outros processos como a extinção e a reconsolidação, já foi validada. Tais testes geralmente envolvem a exposição do animal a um aprendizado e posterior avaliação da retenção deste através da reexposição do animal ao contexto de aprendizado, assim se comprova se a memória foi formada e armazenada (QUILLFELDT, 2006).

Em ratos a memória pode ser avaliada através de diferentes testes comportamentais (Fig.3), um deles é o teste de RO (ENNACEUR E DELACOUR, 1988a). O teste de RO se utiliza da tendência natural dos ratos à exploração do ambiente para avaliar a memória declarativa. Em uma sessão de aprendizagem (treino) expõe-se o animal a dois objetos novos diante dos quais o animal não apresente preferência inata, desta forma, dada sua tendência natural, o

animal procurará explorar os objetos, e, sendo os dois novos, espera-se que ele dispense um tempo semelhante explorando cada um deles. Na sessão de teste mantém-se um objeto familiar e o outro é substituído por um objetivo novo; se espera que o animal evoque a memória prévia, de forma que explore mais o objeto novo.

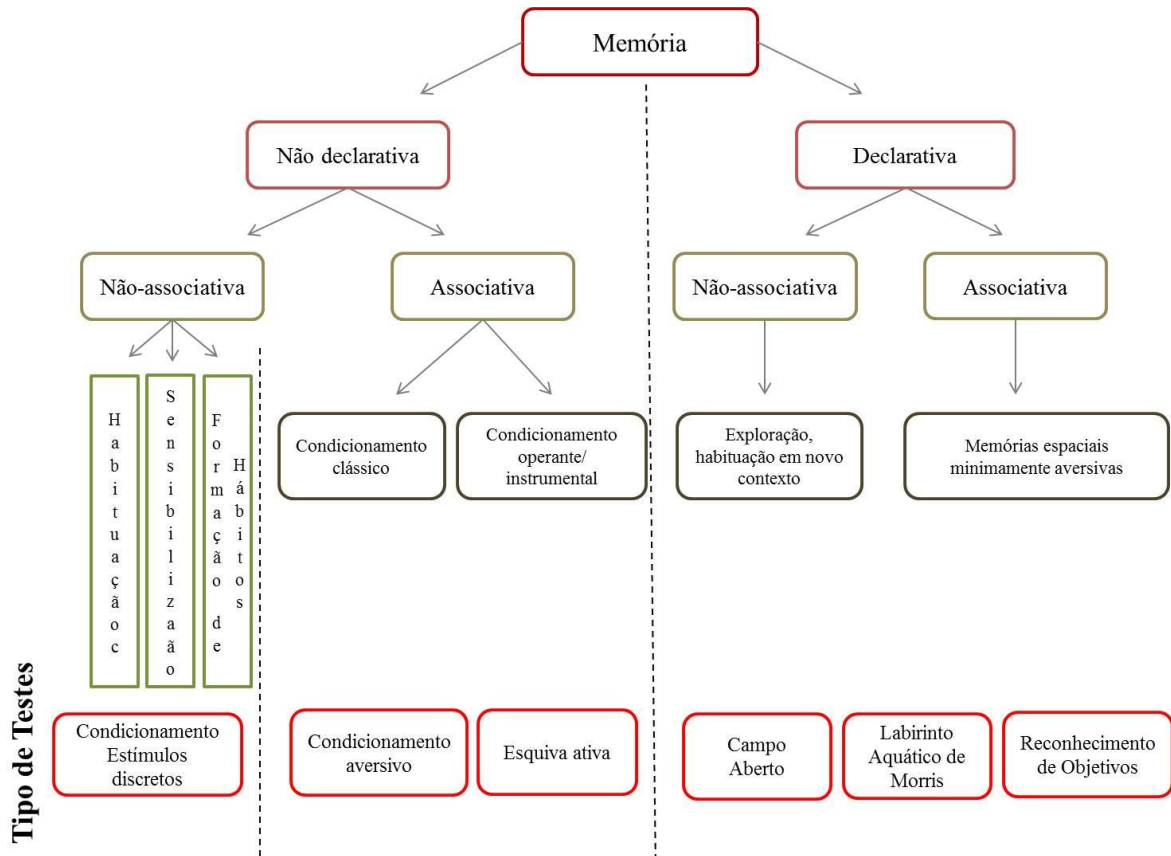


Figura 3. Classificação da memória segundo sua natureza e os diferentes testes comportamentais para avaliar aprendizado e memória (Adaptado de Quillfeldt, J.A., 2006).

O teste de RO é uma ferramenta útil para estudar as memórias declarativas porque tem por princípio o comportamento exploratório inato dos animais e envolve um tipo de memória correspondente à memória declarativa em humanos. O processamento desta memória se dá por eventos bioquímicos no hipocampo, assim como provavelmente em outras estruturas; outra vantagem é de não necessitar de sessões extensas de treino e não expor o animal a estímulos aversivos (CLARKE *ET AL.*, 2008; MELLO-CARPES E IZQUIERDO, 2013). A memória declarativa é um dos tipos fundamentais de memória e em situações como em casos de AVC ou doenças neurodegenerativas, há indícios de declínio desta memória (DE BUTTE-SMITH *ET*

AL., 2009; SALMON *ET AL.*, 2015). Estudo prévio do nosso grupo de pesquisa demonstrou que após isquemia-reperfusão há declínio na memória de reconhecimento de longo prazo (SCHIMIDT *ET AL.*, 2014).

3.2 Acidente Vascular Cerebral

3.2.1 Acidente Vascular Cerebral Isquêmico

O AVC do tipo isquêmico causa uma disfunção fisiológica devido à vulnerabilidade do cérebro à redução do fluxo sanguíneo. Considerando que o cérebro possui alta taxa metabólica, limitado estoque energético e dependência de glicose como substrato energético, a diminuição ou ausência de fluxo de sangue por cinco minutos é o suficiente para desencadear alterações e culminar na morte neuronal (LEE *ET AL.*, 2000).

A isquemia-reperfusão se caracteriza pela interrupção temporária do fluxo sanguíneo seguida pela reperfusão (ALLEN E BAYRAKTUTAN, 2009; CHI *ET AL.*, 2016). Neste processo uma área denominada centro isquêmico sofre uma redução do fluxo sanguíneo que pode chegar a 80% comparado ao normal; a região que circunda o infarto é chamada de zona de penumbra, onde o suprimento sanguíneo é parcialmente mantido através dos vasos colaterais (ISHII *ET AL.*, 2013). Após alguns minutos de isquemia iniciam-se os eventos bioquímicos da cascata isquêmica, que culminam na desintegração da membrana celular, falência energética pela diminuição da concentração de adenosina trifosfato (ATP), neurotoxicidade, inflamação, estresse oxidativo, necrose e apoptose (CHAN, 2001; SAAD *ET AL.*, 2015; ZHANG, J. *ET AL.*, 2015). Este processo ocorre inicialmente devido à ausência de reservas energéticas que gera a falência da bomba de sódio-potássio (Na^+/K^+), com isso ocorre a abertura de canais voltagem-dependentes que induz a saída de potássio (K^+) dos neurônios e influxo de cálcio (Ca^{++}), sódio (Na^+), cloretos e água. Na sequência, e devido a esse desequilíbrio iônico, há uma alteração no sistema de liberação e captação de neurotransmissores na fenda sináptica, especialmente glutamato. Esta liberação de glutamato no espaço extracelular é neurotóxica, leva ao influxo de cálcio, favorece a morte neuronal por apoptose e aumenta a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (GIRBOVAN E PLAMONDON, 2015; YANG, Z.-B. *ET AL.*, 2015; ZHANG, J. *ET AL.*, 2015). Estes, por sua vez, promovem a peroxidação lipídica, dano ao DNA e comprometimento da função ou morte neuronal (DOYLE *ET AL.*, 2008; BROUNS E DE DEYN, 2009; YAIDIKAR E THAKUR, 2015) (Fig. 4).

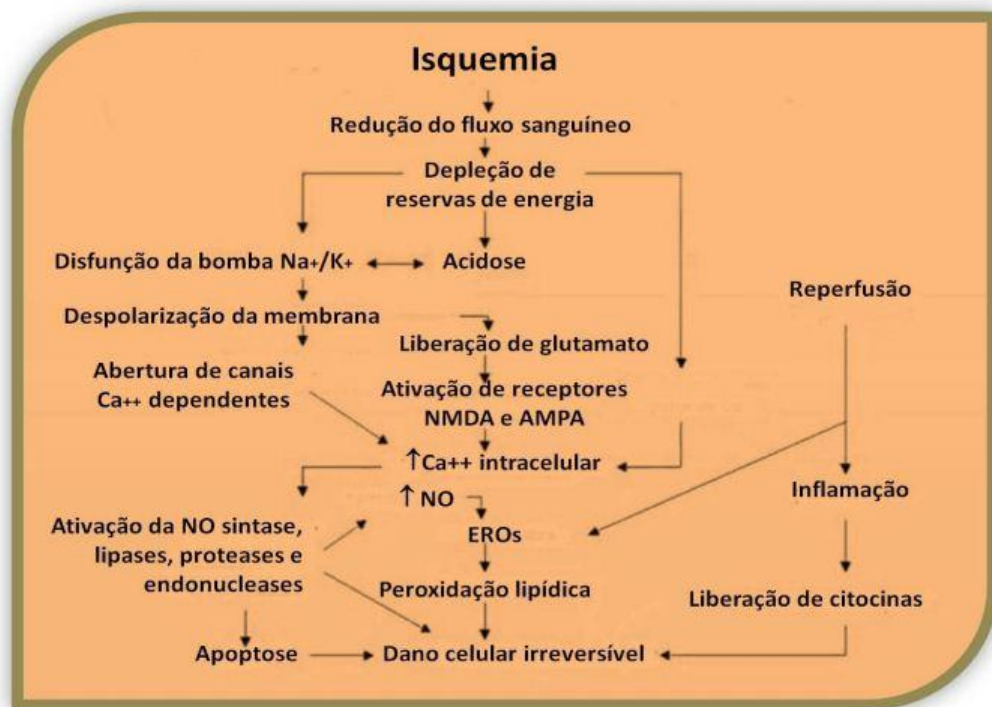


Figura 4. Mecanismos fisiopatológicos envolvidos no Acidente Vascular Cerebral Isquêmico (FONTE: Castro, 2013).

Durante o processo de reperfusão cerebral, com o retorno abrupto do fluxo de sangue e reoxigenação, aumenta a formação de EROs, eleva-se a liberação de mediadores pró-inflamatórios e ativam-se vias de sinalização de morte celular (GRANGER E KVIETYS, 2015). Outro evento importante decorrente da lesão isquêmica é a disfunção da barreira hematoencefálica, alteração esta que ocorre pela ativação de metaloproteinases que degradam a membrana basal e a matriz extracelular, com isso o encéfalo fica exposto a agentes tóxicos e infecciosos (BROUNS E DE DEYN, 2009; KONG *ET AL.*, 2015). Diante destas alterações o paciente apresentará sintomatologia relacionada à perda ou déficit da função exercida pela região cerebral atingida (PICELLI *ET AL.*, 2014; SPERBER E KARNATH, 2016).

3.2.2 Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico

A hemorragia intracerebral (HIC) não traumática ocorre devido à pressão intraluminal aumentada que causa lesão nas paredes de pequenos vasos do cérebro e acarreta na ruptura espontânea de artérias ou arteríolas no parênquima cerebral, com a formação de hematoma e ativação de diversas vias patológicas e morte celular (ZHOU *ET AL.*, 2014).

O evento hemorrágico intracerebral pode ser descrito como um processo dinâmico e complexo; a figura 5 apresenta este processo de forma esquemática. Resumidamente, após o início do extravasamento sanguíneo ocorre a formação de edema, aumento da pressão intracraniana, acúmulo de células inflamatórias, apoptose e necrose. Esta fase inicial, também chamada de lesão primária é caracterizada pela deformação mecânica devido ao hematoma, que produz uma lesão mecânica nos neurônios e glia com a consequente compressão das regiões adjacentes (KEEP *ET AL.*, 2012; EGASHIRA *ET AL.*, 2015).

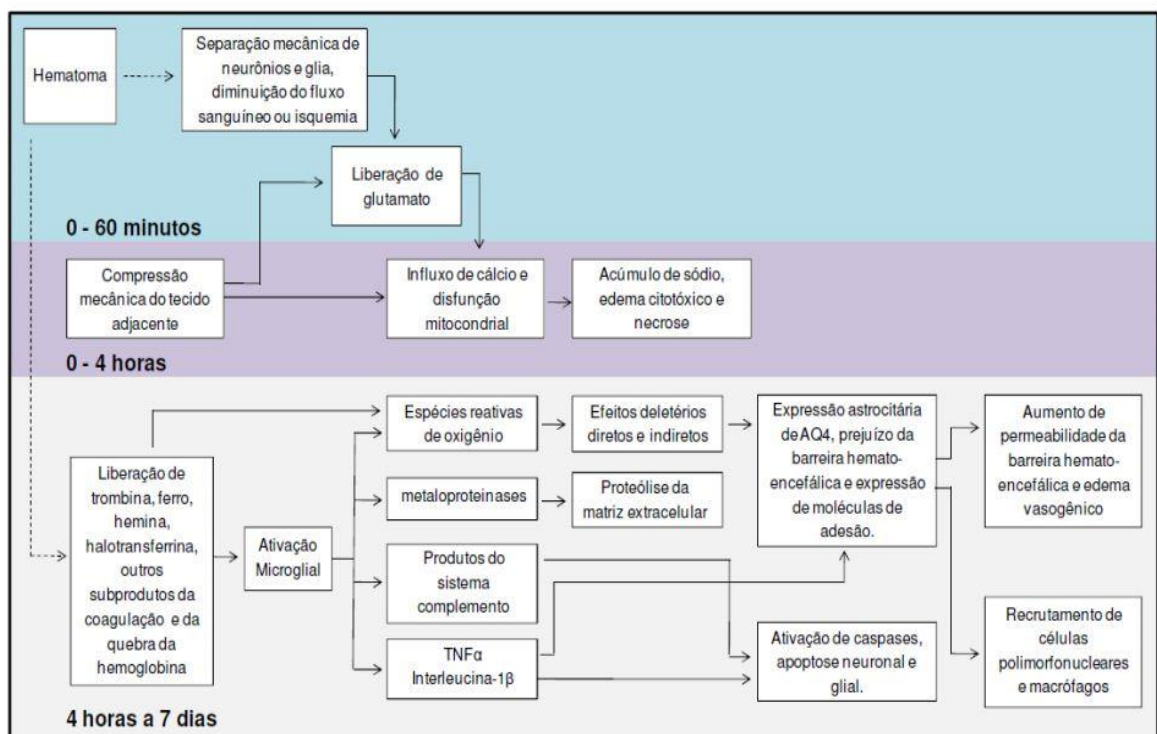


Figura 5. Sequência de eventos iniciados pela HIC (FONTE: Mestriner, 2010).

Secundariamente inicia-se uma cascata ativada pelos produtos de coagulação e degradação da hemoglobina, especialmente a trombina; além de resposta inflamatória e estresse oxidativo. O estresse oxidativo é gerado a partir da degradação do grupo heme da hemoglobina, isto aumenta os níveis de íon ferro (Fe^{2+}) e acarreta no aumento dos radicais livres através das reações Fenton, causando peroxidação lipídica (AURIAT *ET AL.*, 2012; EGASHIRA *ET AL.*, 2015).

Este conjunto de eventos, associado ao hematoma, edema e morte neuronal, contribui para o déficit neurológico (GARCIA *ET AL.*, 2013; XIONG *ET AL.*, 2015). O dano primário é revertido através de procedimento cirúrgico, entretanto, para o dano secundário não há um tratamento efetivo capaz de evitar as alterações e a morte neuronal (KEEP *ET AL.*, 2012; STEIN

ET AL., 2015). Apesar dos já conhecidos mecanismos fisiopatológicos citados, ainda não existem estratégias com sucesso em atenuar ou evitar os prejuízos relacionados à HIC.

3.2.3 Modelos animais de AVC

Conforme previamente mencionado, os modelos animais, assim como as estratégias de pesquisa *in vitro* e outras ferramentas, são úteis para pesquisa científica, considerando as limitações éticas relacionadas aos estudos envolvendo seres humanos. Para o estudo da fisiopatologia do AVC existem diferentes modelos experimentais que mimetizam diferentes tipos de lesões cerebrais e contribuem para o conhecimento dos mecanismos envolvidos e da efetividade de novas alternativas terapêuticas.

Na investigação do AVC do tipo isquêmico existem modelos em roedores que provocam a isquemia seguida da reperfusão nas regiões da carótida e artéria cerebral média (YAN *ET AL.*, 2015) cujas alterações são dependentes da duração da isquemia. Estudos recentes demonstram que a oclusão das artérias carótidas comuns por dez minutos já é o suficiente para desencadear alterações metabólicas seguida de morte neuronal no hipocampo (BOJARSKI *ET AL.*, 2008; LI *ET AL.*, 2011; KUTSUNA *ET AL.*, 2014).

No caso do AVC hemorrágico, dois modelos animais são frequentemente utilizados para induzir a HIC, a injeção de sangue autólogo e a injeção de colagenase (MACLELLAN *ET AL.*, 2012). No modelo autólogo uma determinada quantidade de sangue do próprio animal é administrada em uma região do encéfalo (Kirkman *et al.*, 2011). Esse método mimetiza um evento agudo único de curta duração, entretanto, o que se sabe é que em humanos o sangramento perdura por horas (KIRKMAN *ET AL.*, 2011). A colagenase é uma metaloproteinase derivada da bactéria *clostridium histolicum*, não tóxica aos neurônios. Ao ser injetada ela promove a ruptura da lâmina basal dos vasos sanguíneos através da ação de enzimas proteolíticas que catalisam a hidrólise do colágeno presente na membrana basal da barreira hemato-encefálica, causando, desta forma, o extravasamento de sangue no parênquima de forma aguda (MACLELLAN *ET AL.*, 2008).

3.3 Estresse Oxidativo

Um aspecto comum ao AVC isquêmico e ao hemorrágico é o consequente estresse oxidativo observado após ambos os eventos, podendo acarretar danos ao DNA e morte neuronal, uma vez que, devido à injúria causada o organismo não consegue manter o equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes (CHOI-KWON *ET AL.*, 2004; NAKAMURA *ET AL.*, 2005; PARK *ET AL.*, 2009; MANZANERO *ET AL.*, 2013).

Radicais livres são definidos como moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados (WOJTUNIK-KULESZA *ET AL.*, 2016). Esses elétrons encontram-se centrados nos átomos de oxigênio e nitrogênio, levando à formação das espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e espécies reativas de oxigênio (EROs) a partir do aumento na produção de ânion superóxido (O^{2-}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil ($\cdot HO$), dentre outros (VALKO *ET AL.*, 2007).

Os radicais livres são produtos do metabolismo celular, porém, quando a sua produção ultrapassa a capacidade do sistema antioxidante ocorre o estresse oxidativo, que tem sido relacionado a várias condições patológicas, tais como câncer, doenças cardiovasculares, *Diabetes Mellitus* e doenças neurodegenerativas, além de estar relacionado ao processo de envelhecimento (LIMÓN-PACHECO E GONSEBATT, 2009; SCHIEBER E CHANDEL, 2014; WOJTUNIK-KULESZA *ET AL.*, 2016)

A produção exacerbada de EROs pode gerar reações oxidativas em lipídios insaturados presentes nas membranas, assim a lipoperoxidação altera a permeabilidade e seletividade da membrana, além de causar danos às proteínas, enzimas e receptores presentes na bicamada lipídica, e ao DNA, desequilibrando a homeostase celular (BARTSCH E NAIR, 2004; YE *ET AL.*, 2015).

Fisiologicamente, o organismo apresenta mecanismos de defesa antioxidantes. Estes podem ser descritos em três níveis distintos (figura 6): I) Prevenção da formação de EROs através de biomoléculas denominadas quelantes, que agem como ligantes a metais (Fe e Cu), evitando a reação de Fenton e mantendo a formação de EROs em um nível equilibrado; II) Eliminação dos radicais livres, também chamada de interceptação, que ocorre através da combinação de uma molécula um potencial “*scavengers*” com um radical livre, permitindo a formação de um radical menos lesivo; este processo é realizado pelos mecanismos enzimáticos (que incluem a enzima glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase), e não enzimáticos (como a glutathione); e, III) Reparo das células danificadas, quando os mecanismos antioxidantes anteriores não conseguem evitar os danos oxidativos, mecanismos de tentativa de reparo são possíveis (LUNEC *ET AL.*, 2002; MARRONI *ET AL.*, 2012; AQUILANO *ET AL.*, 2014).

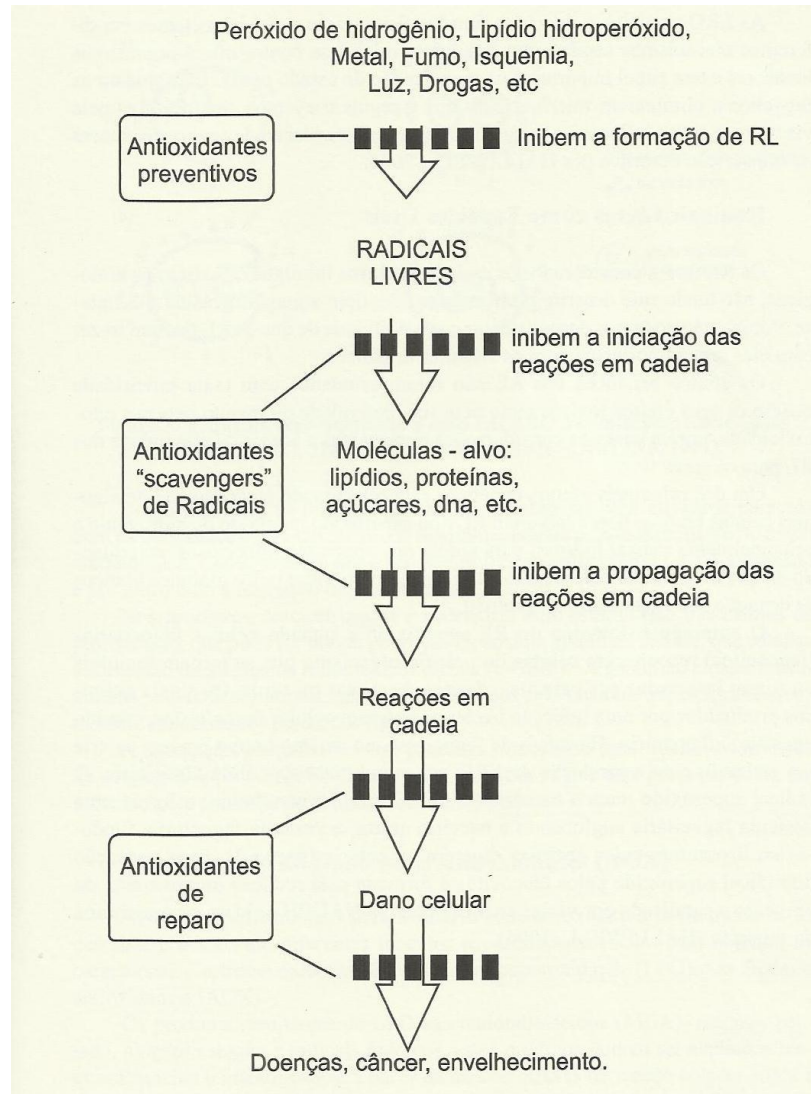


Figura 6. Mecanismos de defesa antioxidantes contra dano oxidativo induzido por radicais livres (FONTE: Marroni, 2012).

O encéfalo é particularmente suscetível aos efeitos deletérios do aumento das EROs, devido à sua elevada atividade metabólica e redução das defesas antioxidantes (ALLEN E BAYRAKTUTAN, 2009). Estudos prévios indicam que este quadro de estresse oxidativo está presente após o AVC, tanto na isquemia-reperfusão quanto na hemorragia intracerebral, e pode causar dano ao DNA e morte neuronal (CHOI-KWON *ET AL.*, 2004; NAKAMURA *ET AL.*, 2005; PARK *ET AL.*, 2009; MANZANERO *ET AL.*, 2013). Assim, a busca por estratégias terapêuticas que possam prevenir e/ou neutralizar o estresse oxidativo, melhorando potencial antioxidante parece ser interessante na busca por alternativas de neuroproteção no AVC.

3.4 Chá verde

Atualmente têm-se demonstrado que os alimentos contribuem diretamente para a saúde. Além do seu valor nutricional, é preciso considerar que muitos alimentos apresentam compostos bioativos, que, quando ingeridos de forma regular, beneficiam as funções fisiológicas do organismo, além de prevenir e tratar doenças (PANG *ET AL.*, 2012; AL-SHERAJI *ET AL.*, 2013); estes são denominados como alimentos funcionais (AL-SHERAJI *ET AL.*, 2013).

O chá produzido a partir das folhas da planta *Camellia sinensis* é uma das bebidas mais consumidas no mundo, e pode ser considerado um alimento funcional (WU E WEI, 2002). Dependendo do processamento utilizado, suas folhas dão origem a quatro principais tipos de chá: verde, preto, vermelho e *oolong*. Dentre estes, o chá verde é produzido a partir das folhas após uma rápida inativação da enzima polifenol oxidase, pelo emprego de vaporização e secagem, o que mantém preservado seu teor de polifenóis e o torna mais rico em catequinas que os demais (SANG *ET AL.*, 2011).

A composição química do chá verde inclui diversas classes de compostos fenólicos. Os flavanóides presentes no chá verde são os monômeros de catequinas, e, dentre as principais encontradas no chá estão a epicatequina (EC), a epigalocatequina (EGC), a epicatequina-3-galato (ECG), e a epigalocatequina-3-galato (ECGC) (figura 7). A ECGC é o composto mais abundante, correspondendo a 50-60% das catequinas que compõem o chá verde, de forma que se acredita que ela seja a maior responsável pela atividade biológica do chá verde (SUTHERLAND *ET AL.*, 2006; SINGH *ET AL.*, 2011).

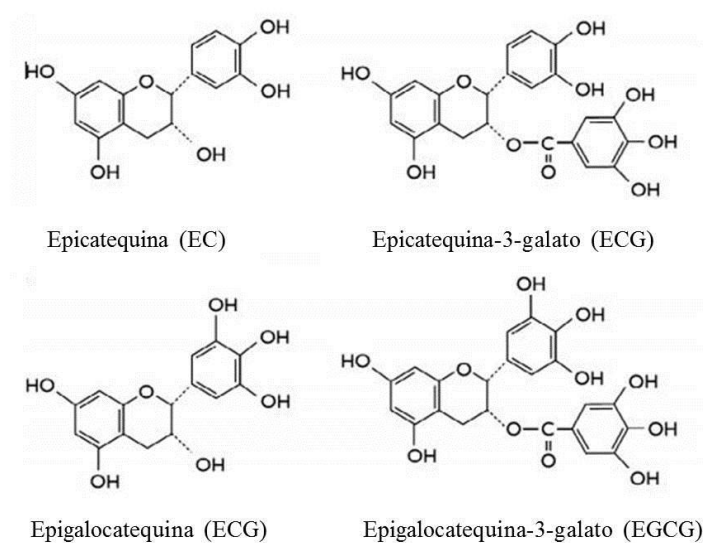


Figura 7. Composição química das catequinas presentes no chá verde (FONTE: Senanayake, 2013).

A atividade antioxidante atribuída ao chá está relacionada ao seu potencial de eliminação de radicais livres e inibição do estresse oxidativo, uma vez que ele atenua oxidação ao substrato através da doação de elétron ao radical livre, capacidade de quelar íons de metais de transição como o ferro (Fe^{2+}) e inibir a peroxidação lipídica. Além destas propriedades, apresenta ação de induzir um aumento da regulação de antioxidantes endógenos, tais como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione. (KONDO *ET AL.*, 1999; WEINREB *ET AL.*, 2004; WU *ET AL.*, 2012b; NAMAL SENANAYAKE, 2013; HSU *ET AL.*, 2014). Estudos recentes afirmam que as catequinas e seus metabólitos ativos têm propriedades funcionais de ação antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-hipertensivas, antidiabéticas, hipocolesterolêmico e antimutagênicas (BOGDANSKI *ET AL.*, 2012; LEE *ET AL.*, 2013b; TANG *ET AL.*, 2013; HSU *ET AL.*, 2014).

Diante do exposto, o chá verde é considerado um alimento funcional devido aos seus compostos bioativos e demonstra ser uma boa estratégia para a manutenção da saúde, considerando que seus compostos podem retardar ou reduzir a progressão de doenças cujo mecanismo patológico se relaciona ao estresse oxidativo.

PARTE II

4. MANUSCRITO

Nesta sessão são apresentados a metodologia, os resultados e discussão do presente trabalho na forma de artigo científico, o qual será submetido à Revista *Neurobiology of Learning and Memory*, atendendo, portanto, às normas da revista.

SHORT-TERM GREEN TEA SUPPLEMENTATION PREVENTS RECOGNITION MEMORY DEFICITS AND AMELIOTE HIPPOCAMPAL OXIDATIVE STRESS INDUCED BY DIFFERENT STROKE MODELS IN RATS

Caroline Dalla Colletta Altermann^a, Mauren Assis Souza^a, Helen L. Schmidt^b, Aryele Pinto Izaguirry^c, Alexandre Martins^a, Alexandre Garcia^a, Francielli W. Santos^c, Pâmela B. Mello-Carpes^{a*}

^a *Physiology Research Group, Federal University of Pampa, Uruguaiana, RS, Brazil*

^b *Applied Neuromechanics Groups, Laboratory of Neuromechanic, Federal University of Pampa, Uruguaiana, RS, Brazil*

^c *Laboratório de Biotecnologia da Reprodução (Biotech), Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, Brazil*

*Corresponding author at: Stress, Memory & Behavior Lab, Federal University of Pampa, Po Box 118, 97500-970 Uruguaiana, RS, Brazil.

E-mail address: pamelacarpes@unipampa.edu.br (P.B. Mello-Carpes).

HIGHLIGHTS

Different types of stroke cause short- and long-term recognition memory deficits.

Green tea administration previously to the stroke ameliorates the memory deficits.

Different types of stroke increase hippocampal oxidative stress.

Green tea prevents oxidative stress and damage induced by hemorrhagic stroke.

Green tea prevents decrease of antioxidant capacity induced by ischemic stroke.

Abstract

This study investigate the effect of green tea (GT) on declarative memory short and long term and oxidative damage induced by transient ischemia-reperfusion (IR) and intracerebral hemorrhage (ICH) in rats. Wistar male rats divided into 8 groups of 10 according the stroke type induced were used: Sham IR, Sham IR+GT, IR, IR+GT, Sham

ICH, Sham ICH+GT, ICH, ICH+GT. Supplementation with GT was initiated 10 days before stroke surgery and continuous for 7 days after (GT dose 400 mg/kg). Short (STM) and long term memory (LTM) we evaluated with object recognition task (OR) and hippocampus were used to measure parameters related to oxidative stress (ROS, lipid peroxidation and total antioxidant capacity). IR and ICH rats showed STM and LTM deficits; GT intervention prevents STM and LTM deficits in both stroke models. IR and ICH induces increase of ROS concentration and, in the case of ICH, of lipid peroxidation in the hippocampus; GT supplementation avoids it on ICH. IR induces decrease of total antioxidant capacity; GT avoids it. These results reveal that GT supplementation presented a neuroprotective role, attenuates redox imbalance and might be a beneficial impact on cognitive functioning after stroke.

Keywords: Memory, Antioxidants, Stroke, Ischemia-Reperfusion, Intracerebral Hemorrhage

1. Introduction

According to American Heart Association, Cerebrovascular accident is classified into two types –Ischemic and Hemorrhagic stroke. Both types are the leading cause of long-term disability and significant decrease in health and quality of life (HINSON *ET AL.*, 2010). Ischemia-reperfusion (IR) accounts for 87 percent of all stroke cases (ASSOCIATION, 2012) and results from temporary or permanent reduction of cerebral blood flow (RODRIGUEZ *ET AL.*, 2014; CHOUDHURY E DING, 2016). Intracerebral hemorrhage (ICH) has lower incidence, but its consequences are more severe, causing a high mortality and morbidity (HWANG *ET AL.*, 2013).

Stroke is a complex neurological syndrome defined as a sudden disturbance in the blood supply to the brain caused by IR or ICH, leads functional and structural damage in brain (JAYARAM *ET AL.*, 2012; CHEON, 2015). Both types of stroke have different patophysiology, but share some common mechanisms of secondary damage, such as increase of oxidative stress and reduction of antioxidants abilities, acute inflammatory response, excitotoxicity and apoptosis (RITZ *ET AL.*, 2008; CAI *ET AL.*, 2015; HADADHA *ET AL.*, 2015; ZHANG, T. *ET AL.*, 2015).

Previous studies have been show that both IR and ICH cause memory deficits in rats and humans (PENDLEBURY E ROTHWELL, 2009; XIONG *ET AL.*, 2015). Hippocampus has been postulated to be involved in cognitive functions such as learning and memory (IZQUIERDO, IVAN E MEDINA, JORGE H., 1997) and this brain region is very sensitive to oxidative stress caused by several kinds of brain injury (MERGENTHALER *ET AL.*, 2013). In this sense, therapies that have a potential antioxidant effect and contributes to ameliorate brain function, including learning and memory performance, could be a good approach to treat damages caused by IR and ICH.

Green tea (GT) derived from *Camellia sinensis* has a high flavonoid content, especially the catechin (–)–Epigallocatechin-3-gallate (EGCG). Many studies have reported EGCG benefits to health, considering its antioxidant (ASSUNÇÃO *ET AL.*, 2010; HSU *ET AL.*, 2014), anti-inflammatory (LEE *ET AL.*, 2013a), anticancer (SINGH *ET AL.*, 2011), anti-diabets (TANG *ET AL.*,

2013) and anti-hypertensive activity (BOGDANSKI *ET AL.*, 2012). Considering that EGCG is the catechin found in highest concentration in green tea, and that green tea can be easily found to buy by general population, some authors have been studying the neuroprotection effects of green tea mixture administration instead of the isolated catechins. In this sense, many studies have reported that the administration of green tea has a neuroprotective role in models of ischemic stroke, which is attributed to its antioxidant and free radical scavenging actions (HONG *ET AL.*, 2000) (WU *ET AL.*, 2012a). Recently, our group demonstrated that a long-term (8 weeks) administration of green tea can avoid different memory deficits induced by IR in rats (SCHIMIDT *ET AL.*, 2014).

Considering these previous results, the present study has been designed to verify if: (i) the neuroprotective effect of green tea in stroke could be observed in a shorter period of tea administration; (ii) the neuroprotective effect of green tea could promote amelioration of short and long-term recognition memory deficits induced by stroke; (iii) the neuroprotective effect of green tea could promote amelioration of hippocampal oxidative stress induced by stroke; and, (iv) the neuroprotective effect of green tea previously observed on ischemic stroke models could be observed on a hemorrhagic stroke model.

2. Methods

2.1. Animals and experimental design

Eighty male Wistar rats (250-300g, age of 3 months) obtained from the Reproduction Center of the Central Vivarium of Federal University of Santa Maria (RS/Brazil) were used. All animals were housed four per cage at a temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$ with a regular 12h light-dark cycle and free access to water and food, according to the guidelines established by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Local Institution (Protocol approval #034/2014).

The rats were divided into eight experimental groups according to the stroke type induced and the treatment (n=10/group):

- (1) Sham Ischemic Stroke: Rats submitted to surgery without carotid arteries occlusion;
- (2) Green Tea + Sham Ischemic Stroke: Rats treated with green tea and submitted to surgery without carotid arteries occlusion;
- (3) Ischemic Stroke: Rats submitted to surgery with temporary carotid arteries occlusion (ischemia-reperfusion);
- (4) Green tea + Ischemic Stroke: Rats treated with green tea and submitted to surgery with temporary carotid arteries occlusion (ischemia-reperfusion);
- (5) Sham Hemorrhagic Stroke: Rats submitted to stereotaxic surgery without infusion of collagenase on hippocampus;

- (6) Green Tea + Sham Hemorrhagic Stroke: Rats treated with green tea and submitted to stereotaxic surgery without infusion of collagenase on hippocampus;
- (7) Hemorrhagic Stroke: Rats submitted to stereotaxic surgery with infusion of collagenase on hippocampus (to induce intracerebral hemorrhage);
- (8) Green Tea + Hemorrhagic Stroke: Rats treated with green tea and submitted to stereotaxic surgery with infusion of collagenase on hippocampus (to induce intracerebral hemorrhage).

2.2. Green tea supplementation

Green tea was purchased from Madrugada Alimentos Ltda, Venâncio Aires, RS, Brazil. Green tea was prepared daily before each experiment using distilled water (95-100°C) and was administrated at ambient temperature. The green tea or distilled water were administered orally (gavage) once a day during 10 days before stroke surgery; the administration continued for 6 days after the surgery, while the behavioral tests were performed (figure 1). The dose for all groups that received green tea was established on 400 mg/Kg/mL of green tea per day; a dose that is considered equivalent to 400 ml/day of green tea for human (XU *ET AL.*, 2010).

After prepared, the mixture was analyzed by high-performance liquid chromatography, which ensured the presence of epicatechin (EGC) (1.298 mg/mL), epicatechin gallate (ECG) (1.803 mg/mL) and epigallocatechin gallate (EGCG) (3.688 mg/mL).

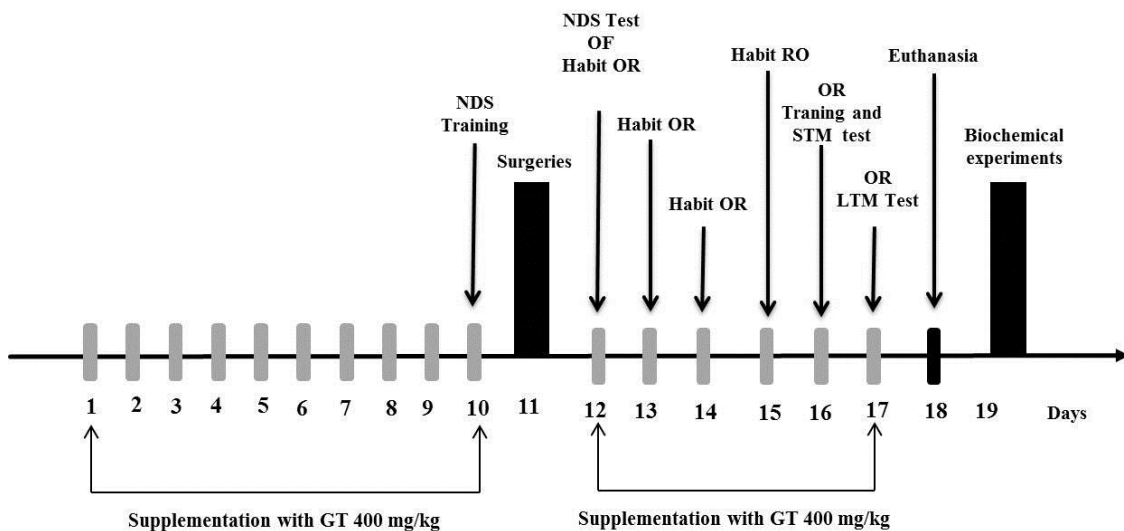


Figure 1. Experimental design. The numbers represent the days of experiments. NDS: Neurologic Disability Scale; OF: Open Field; Habit: Habituation; OR: Object Recognition; STM: Short-Term Memory; LTM: Long-Term Memory.

2.3 Surgeries

2.3.1. Ischemic Stroke Induction (Transient Cerebral Ischemia-Reperfusion)

Rats from groups 1-4 were anesthetized with ketamine and xylazine, 75 mg/kg and 10 mg/kg i.p., respectively, and common carotid arteries were exposed bilaterally and carefully

separated. In sequence, the temporary occlusion of the carotid arteries was performed in the rats of groups 3 and 4 using a vascular clip that was removed after 30 min of occlusion (COLLINO *ET AL.*, 2006), and then the neck skin incision was closed and sutured. Sham-operated animals from groups 1 and 2 were treated in a similar manner, except that the common carotid arteries were not occluded. During the surgery, body temperature was maintained at $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ by a heating pad until the rats were recovered from anesthesia.

2.3.2. Hemorrhagic Stroke Induction (Intracerebral Hemorrhage)

Rats from groups 5-8 were anesthetized with ketamine and xylazine (i.p., 75 mg/kg and 10 mg/kg, respectively) and placed in a stereotaxic frame. A needle (Hamilton instrument syringe, 5 μl ; Hamilton Company USA, Reno, NV, USA) was implanted into the hippocampal region following PAXINOS E WATSON (1986) coordinates: 2.2 mm anterior and 2.2 mm lateral to the Bregma, with a depth of 4.2 mm. Distilled water (1 μl) containing 0.2 U collagenase (Type 4; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was infused over 10 min using pump infusion in bilateral hippocampus of rats from groups 7 and 8. The needle was left in place for 5min and then slowly removed (HWANG *ET AL.*, 2013). The hole was sealed with a metal screw to ensure the intracranial pressure maintenance. Clips were used to close the wound and lidocaine was used to avoid pain. Sham-operated animals from groups 5 and 6 were treated in a similar manner, except for the collagenase infusion. Body temperature was maintained at 37°C during anesthesia with a heating pad.

2.4. Control Behavioral Tests

To ensure that the surgeries did not produce behavioral alterations that could influence the memory tests results some control behavioral tests were performed.

2.4.1. Neurological Deficit Scale (NDS)

The NDS consists of a sequence of easy tests that permit check the presence of possible neurological and/or motor disorders in rodents. Briefly, the rats were evaluated on: spontaneous circling, hind limb retraction, bilateral forepaw grasp, forelimb flexion, and beam walking. The NDS scale ranged between 0 (no neurological deficit; normal function) to 14 (great impairment; maximum neurological deficiency). We trained the rats on NDS one day before the surgery and tested on the first day after surgery (WARKENTIN *ET AL.*, 2010).

2.4.2. Open Field (OF)

The animals were submitted to an open field to evaluate spontaneous locomotor and exploratory activities. The apparatus consisted in an open arena painted white and divided into 12 equal rectangles by black lines; the animal was gently placed in the open field arena for freely exploration for 5 min. During this time the number of crossed lines (crossings) and the number rearings on its hind legs (rearings) were recorded (BONINI *ET AL.*, 2006).

2.5 Memory tests

2.5.1. Object recognition memory tests

Rats have a tendency to interact more with a novel object than with a familiar object, thus this tendency has been used to evaluate their learning and memory (ENNACEUR E DELACOUR, 1988b). To perform this test, all animals were habituated to the experimental arena in the absence of any specific behavioral stimulus for 20 min/day during 4 days. The objects to be recognized were made of metal or glass and were fixed to arena's floor with adhesive ribbon. On the fifth day after habituation (training session) animals were placed in the arena containing two different objects (A and B), and left to explore them freely for 5 min. Short-term memory (STM) was assessed three hours after training, as previously described by (DE LIMA *ET AL.*, 2005), when the animals were exposed for 5 min to arena containing two objects: a familiar (A) and a new object (C).

The test was repeated 24 h later to evaluate long-term memory (LTM). In LTM test, one of the objects was removed and a new object (D) replaced it. Positions of objects (familiar or novel) were randomly permuted for each experimental animal, with the arena being always cleaned with alcohol 70% between trials to avoid clues. Exploration was defined as sniffing or touching the object with the nose and/or forepaws. Sitting on or turning around the object was not considered as an exploratory behavior. Time spent to explore each object was recorded by an observer blind to treatment and expressed as a percentage of total exploration time computed in seconds (MELLO *ET AL.*, 2009).

2.6. Biochemical tests

2.6.1. Tissue preparation

For brain tissue preparation the animals were sacrificed 24h after the end of the behavioral experiments. The brain was removed and bilateral hippocampus were quickly dissected out and homogenized in 50 mM Tris HCl, pH 7.4. Afterwards, samples were centrifuged at 2400 g for 20 min, and supernatants (S1) were used for assays. The hippocampus was chosen considering that this structure has been postulated to be involved in cognitive functions such as learning and memory and is involved on consolidation of object recognition memory (MELLO-CARPES E IZQUIERDO, 2013; MELLO-CARPES *ET AL.*, 2016).

2.6.2. Reactive Oxygen Species (ROS)

Hippocampal ROS content was assessed by a spectrofluorimetric method using 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) as a probe (LOETCHUTINAT *ET AL.*, 2005). The samples (S1) were incubated in darkness with 5 μ L DCFH-DA (1 mM). The oxidation of DCFH-DA to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) is measured for the detection of intracellular ROS. The formation of the oxidized fluorescent derivative (DCF), measured by DCF fluorescence intensity, was recorded at 520 nm (480 nm excitation), 30 min after the addition of DCFH-DA to the medium. Results were expressed as % of control of AU (arbitrary units).

2.6.3. Detection of Thiobarbituric Acid Reactive Substance (TBARS) level

Hippocampal lipoperoxidation was evaluated by the TBARS test (OHKAWA *ET AL.*, 1979). One aliquot of S1 was incubated with a 0.8% thiobarbituric acid solution, acetic acid buffer

3.2. Green tea avoids object recognition short- and long-term memory deficits induced by Ischemic and Hemorrhagic Stroke

Rats were submitted in the object recognition memory test to assess short- (STM) and long-term (LTM) object recognition memory. During the training phase the animals explored equally the two stimuli objects (A and B), about 50% of total exploration time each one (figure 1- training).

In the test for STM, 3h after training, sham groups (ischemic stroke and hemorrhagic stroke sham groups, 1 and 5, respectively) explored the novel object longer than 50% of the total exploration time ($P = 0.0002$ and $P = 0.0005$ respectively, one sample t-test), which indicates a preserved memory (Fig. 2A and 2C – Test/Sham). The ischemic and the hemorrhagic stroke groups (groups 3 and 7) spent a similar amount of time (about 50% of total exploration time) exploring the two objects (Fig. 2A - Test/Ischemic Stroke and 2C - Test/Hemorrhagic Stroke), which suggests a STM deficit ($P = 0.10$ and $P = 0.62$, respectively). Green tea administration previously to the stroke induction was able prevent STM deficit, since the rats supplemented with green tea and submitted to ischemic or hemorrhagic stroke induction explored more than 50% of total exploration time the new object ($P = 0.0005$, Fig. 2A – Test/GT + Ischemic Stroke; $P = 0.002$, Fig. 2C – Test/GT + Hemorrhagic Stroke).

Similar results were observed for long-term memory (LTM) test in OR task, realized 24h after training. LTM was impaired in the stroke induced animals and the administration of green tea previously to the stroke avoids the LTM deficits. Ischemic and hemorrhage stroke caused memory deficits, since the rats spent about 50% of the total exploration time exploring the familiar and the new objects ($P = 0.41$, Fig. 2B – Test/Ischemic Stroke; $P = 0.36$, Fig. 2D – Test/Hemorrhagic Stroke). Administration of green tea previously to the stroke avoided the LTM deficit, both groups Green Tea + Ischemic Stroke and Green Tea + Hemorrhagic Stroke spent more than 50% of the total exploration time exploring the new object ($P = 0.03$, Fig. 2B – Test/GT+Ischemic Stroke; $P = 0.0006$, Fig. 2D – Test/GT+Hemorrhagic Stroke).

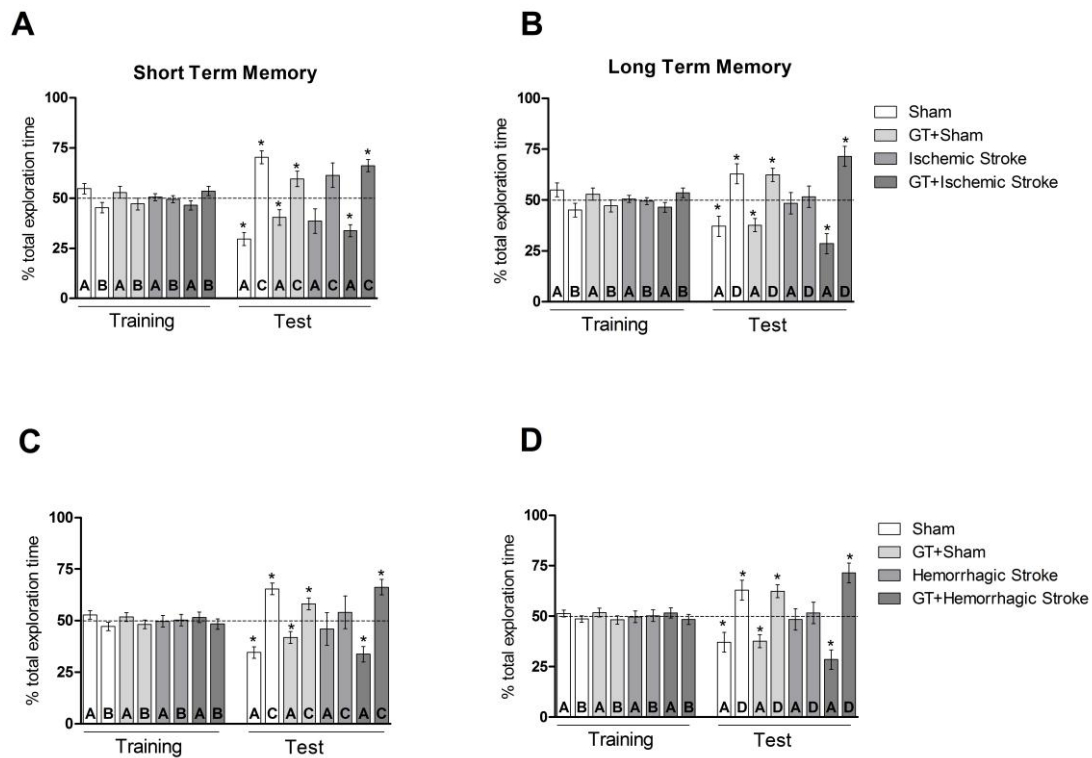


Figure 2. Short and long-term object recognition memory results. Ischemic and hemorrhagic stroke caused deficits in short-term memory (STM) and long-term memory (LTM) in object recognition (OR) task. Green tea supplementation avoids these deficits. A. Animals from groups 1-4 were trained on OR task and tested 3 h later (STM). B. Animals from groups 1-4 were trained on OR task and tested 24 h later (LTM). C. Animals from groups 5-8 were trained on OR task and tested 3h later (STM). D. Animals from groups 5-8 were trained on OR task and tested 24 h later (LTM). Both ischemic and the hemorrhagic stroke group presented STM and LTM deficits; the groups treated with green tea previously to the stroke induction were able to perform the test correctly. * $P < 0.05$ in one-sample Student's t-test with theoretical mean = 50%; $n = 7-10$ per group.

3.3. Green tea avoids partially the hippocampal oxidative stress induced by ischemic and hemorrhagic stroke.

After memory tests the rats were sacrificed and the hippocampus isolated to measure the levels of ROS and TBARS and the total antioxidant capacity. ROS levels in the hippocampus of ischemic and hemorrhage stroke rats were higher than in Sham-operated rats ($P = 0.04$ for Ischemic Stroke; $P = 0.006$ for Hemorrhagic Stroke; Fig. 3A). Green tea prevents the increase on ROS levels only on the Hemorrhagic Stroke group ($P = 0.02$, Fig. 3A, Hemorrhagic Stroke vs. GT + Hemorrhagic Stroke).

We did not observe lipid peroxidation increase (TBARS) in ischemic stroke rats ($P = 0.25$, Fig. 3B). However, we detected an increase on TBARS after hemorrhagic stroke ($P = 0.0006$; Fig. 3B), what is prevented by GT administration ($P = 0.0009$; Fig. 3B).

Furthermore, ischemic stroke caused a reduction in hippocampal FRAP, what represents the total antioxidant capacity, when compared to sham group ($P = 0.006$; fig. 3C). Green tea administration previously to the stroke was avoids this decrease ($P = 0.03$; Fig. 3C, Ischemic

vs. GT + Ischemic Stroke group). The hemorrhagic stroke did not cause alterations on hippocampal FRAP ($P > 0.5$; Fig. 3C).

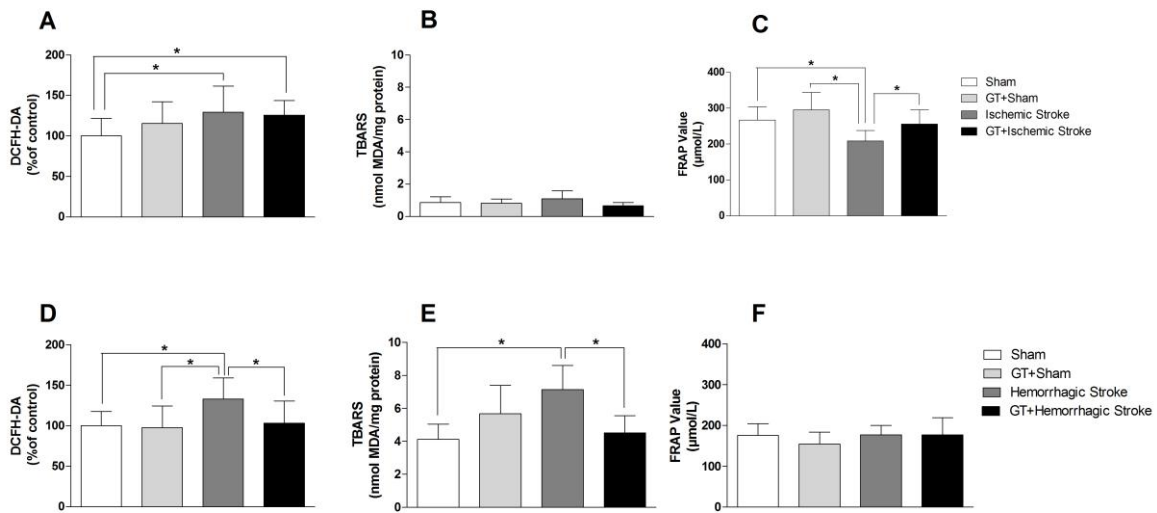


Figure 3. Effects of ischemic and hemorrhagic stroke and green tea supplementation on hippocampal pro-oxidant markers and total antioxidant capacity. A. Levels of Reactive Oxygen Species (ROS). B. Levels of lipid peroxidation measured by TBARS. C. Total antioxidant capacity measured by Ferric Reducing/Antioxidant Power (FRAP). * $P < 0.05$, ANOVA following by Dunn's post hoc or Student t-test for specific comparisons.

4. Discussion

The major finding of this study was that a short-term GT oral administration (10 days) previously to stroke induction prevents short and long-term recognition memory deficits and attenuates the oxidative damage in rats submitted to Ischemia-Reperfusion or Intracerebral Hemorrhage.

Different stroke models has been reported to produce deficits in different types of learning and memory, such in spatial learning and memory (Morris water maze test) (GORDAN *ET AL.*, 2012; YANG, Y. *ET AL.*, 2015) and in aversive short-term memory (step-down avoidance test) (HWANG *ET AL.*, 2013). Previously, our group also demonstrated that a ischemic event promotes long-term recognition and aversive memory deficits (SCHIMIDT *ET AL.*, 2014). Our results add evidences that ischemic stroke also causes short-term object recognition memory deficit and that hemorrhagic stroke could promote STM and LTM deficits. STM and LTM memory formation require different biochemical processes in the rat hippocampus (IZQUIERDO *ET AL.*, 1999b). For example, AMPA receptors are necessary for both STM and LTM, while increased protein synthesis and gene expression are present only in LTM consolidation (IZQUIERDO *ET AL.*, 1998). Although STM and LTM systems are separate and differ in some process, both are depend on the integrity of hippocampus (IZQUIERDO *ET AL.*, 1998), and studies have found a direct correlation between stroke induced memory deficit and hippocampal CA1 neuronal damage (DONG *ET AL.*, 2013; NAYAK E KERR, 2015). Since stroke promotes damage such as increase of oxidative stress and reduction of antioxidants abilities,

acute inflammatory response and excitotoxicity on the affect tissue, if this occur on hippocampus, make sense think that memory disruption will be a consequence of this.

As previously reported by us and others, green tea administration has neuroprotective effects on cognitive dysfunction and neurologic deficits (LEE *ET AL.*, 2013a; CHANG *ET AL.*, 2014; GU *ET AL.*, 2014; SCHIMIDT *ET AL.*, 2014). This neuroprotective effect is generally attributed mainly to its antioxidant capacity, but also could be related to its anti-inflammatory action, PKC activation, acetylcholinesterase inhibition action and action on other pathways (IDE E YAMADA, 2015). Furthermore, epidemiological research shows that daily consumption of green tea entails benefits function cognitive (PARK *ET AL.*, 2011; IDE *ET AL.*, 2014). Our data shows that green tea consumption, for a short period, could avoid short and long-term recognition memory deficits in rats submitted to two different types of stroke, agreeing with the idea that the compounds the green tea improved cognitive function changes. Previous researches demonstrated similar results using the compounds isolated from green tea, especially Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), the predominant constituent of green tea (PARK *ET AL.*, 2010; LEE *ET AL.*, 2013a; GU *ET AL.*, 2014). Although the effects of the individual compounds demonstrate efficacy and have therapeutic potential we choose use the tea mixture in order to mimic the consumer as a daily habit.

The mechanisms involved in the green tea neuroprotection in different brain injury are not completely clean. It is known that the ischemic and hemorrhagic stroke cause an increase on free radicals production and promote oxidative stress (WU *ET AL.*, 2012a; CHANG *ET AL.*, 2014), what was observed by us too, since both types of stroke used here induced increase on ROS levels. Additionally, hemorrhagic stroke promotes increase on lipid peroxidation; this oxidative damage was not detected on ischemic stroke group. In the antioxidant capacity we only observed decrease after ischemic stroke. These results reveals that both types of stroke alter the oxidative balance, but not exactly with the same intensity or in the same way. The ICH promotes oxidative stress and damage without prejudice the non-enzymatic antioxidant capacity (specific antioxidant systems were not investigated here). On the other hand, in the IR we observed increased ROS levels, no alterations on TBARS and decrease on antioxidant capacity. The GT was able to act avoiding the increase of oxidative stress and damage on hemorrhagic stroke model and the reduction of antioxidant capacity on ischemic stroke model. So, probably on the ICH the GT act directly on free radicals removal and cell repair, while the redox potential of GT on ischemic stroke involves its action on the transfer of electrons mechanism (Fenton reaction).

Considering the importance of hippocampus to learning and memory, make sense think that these alterations on oxidative status detected after different stroke models are related to STM and LTM deficits observed in these animals. In the same line, green tea administration previously to stroke avoided short and long term memory and, although in different ways, influence the oxidative balance in both types of stroke. We believe that other biomarkers, as inflammatory ones, for example, need be more investigated, but we are certainly that at least part of the green tea neuroprotection are related to its effects on oxidative balance maintenance.

Therefore, our results indicate that (i) the neuroprotective effect of green tea in stroke can be observed with a shorter period of tea administration (previously this effect was observed on ischemic stroke, but after a 8-weeks of GT administration) (SCHIMIDT *ET AL.*, 2014); (ii) the neuroprotective effect of green tea can prevent short and long-term recognition memory deficits induced by different types of stroke; (iii) the neuroprotective effect of green tea can promote ameliorate of hippocampal oxidative stress induced by different types of stroke.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Association, A. H. (2012). About Stroke.
- Assunção, M., Santos-Marques, M. J., Carvalho, F., & Andrade, J. P. (2010). Green tea averts age-dependent decline of hippocampal signaling systems related to antioxidant defenses and survival. *Free Radical Biology and Medicine*, *48*, 831-838.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*, *239*, 70-76.
- Bogdanski, P., Suliburska, J., Szulinska, M., Stepien, M., Pupek-Musialik, D., & Jablecka, A. (2012). Green tea extract reduces blood pressure, inflammatory biomarkers, and oxidative stress and improves parameters associated with insulin resistance in obese, hypertensive patients. *Nutrition Research*, *32*, 421-427.
- Bonini, J. S., Bevilaqua, L. R., Zinn, C. G., Kerr, D. S., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2006). Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval. *Horm Behav*, *50*, 308-313.
- Cai, J., Cao, S., Chen, J., Yan, F., Chen, G., & Dai, Y. (2015). Progesterone alleviates acute brain injury via reducing apoptosis and oxidative stress in a rat experimental subarachnoid hemorrhage model. *Neuroscience Letters*, *600*, 238-243.
- Chang, C.-F., Cho, S., & Wang, J. (2014). (-)-Epicatechin protects hemorrhagic brain via synergistic Nrf2 pathways. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, *1*, 258-271.
- Cheon, S. H. (2015). The effect of a skilled reaching task on hippocampal plasticity after intracerebral hemorrhage in adult rats. *J Phys Ther Sci*, *27*, 131-133.
- Choudhury, G. R., & Ding, S. (2016). Reactive astrocytes and therapeutic potential in focal ischemic stroke. *Neurobiol Dis*, *85*, 234-244.
- Collino, M., Aragno, M., Mastrocola, R., Gallicchio, M., Rosa, A. C., Dianzani, C., Danni, O., Thiemermann, C., & Fantozzi, R. (2006). Modulation of the oxidative stress and inflammatory response by PPAR-gamma agonists in the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion. *Eur J Pharmacol*, *530*, 70-80.
- de Lima, M. N., Laranja, D. C., Bromberg, E., Roesler, R., & Schroder, N. (2005). Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behav Brain Res*, *156*, 139-143.
- Dong, Y., Li, Y., Feng, D., Wang, J., Wen, H., Liu, D., Zhao, D., Liu, H., Gao, G., Yin, Z., & Qin, H. (2013). Protective effect of HIF-1 α against hippocampal apoptosis and cognitive dysfunction in an experimental rat model of subarachnoid hemorrhage. *Brain Res*, *1517*, 114-121.
- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*, *31*, 47-59.
- Gordan, M. L., Jungwirth, B., Ohl, F., Kellermann, K., Kochs, E. F., & Blobner, M. (2012). Evaluation of neurobehavioral deficits following different severities of cerebral ischemia in rats: A comparison between the modified hole board test and the Morris water maze test. *Behav Brain Res*, *235*, 7-20.
- Gu, H.-F., Nie, Y.-X., Tong, Q.-Z., Tang, Y.-L., Zeng, Y., Jing, K.-Q., Zheng, X.-L., & Liao, D.-F. (2014). Epigallocatechin-3-Gallate Attenuates Impairment of Learning and Memory in

- Chronic Unpredictable Mild Stress-Treated Rats by Restoring Hippocampal Autophagic Flux. *PLoS ONE*, 9, e112683.
- Hadadha, M., Vakili, A., & Bandegi, A. R. (2015). Effect of the Inhibition of Hydrogen Sulfide Synthesis on Ischemic Injury and Oxidative Stress Biomarkers in a Transient Model of Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 24, 2676-2684.
- Hinson, H. E., Hanley, D. F., & Ziai, W. C. (2010). Management of intraventricular hemorrhage. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 10, 73-82.
- Hong, J. T., Ryu, S. R., Kim, H. J., Lee, J. K., Lee, S. H., Kim, D. B., Yun, Y. P., Ryu, J. H., Lee, B. M., & Kim, P. Y. (2000). Neuroprotective effect of green tea extract in experimental ischemia-reperfusion brain injury. *Brain Research Bulletin*, 53, 743-749.
- Hsu, Y.-W., Tsai, C.-F., Ting, H.-C., Chen, W.-K., & Yen, C.-C. (2014). Green tea supplementation in mice mitigates senescence-induced changes in brain antioxidant abilities. *Journal of Functional Foods*, 7, 471-478.
- Hwang, L., Choi, I. Y., Kim, S. E., Ko, I. G., Shin, M. S., Kim, C. J., Kim, S. H., Jin, J. J., Chung, J. Y., & Yi, J. W. (2013). Dexmedetomidine ameliorates intracerebral hemorrhage-induced memory impairment by inhibiting apoptosis and enhancing brain-derived neurotrophic factor expression in the rat hippocampus. *Int J Mol Med*, 31, 1047-1056.
- Ide, K., & Yamada, H. (2015). Clinical benefits of green tea consumption for cognitive dysfunction. *PharmaNutrition*, 3, 136-145.
- Ide, K., Yamada, H., Takuma, N., Park, M., Wakamiya, N., Nakase, J., Ukawa, Y., & Sagesaka, Y. M. (2014). Green Tea Consumption Affects Cognitive Dysfunction in the Elderly: A Pilot Study. *Nutrients*, 6, 4032-4042.
- Izquierdo, I., Barros, D. M., Mello e Souza, T., de Souza, M. M., Izquierdo, L. A., & Medina, J. H. (1998). Mechanisms for memory types differ. *Nature*, 393, 635-636.
- Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1997). Memory Formation: The Sequence of Biochemical Events in the Hippocampus and Its Connection to Activity in Other Brain Structures. *Neurobiology of Learning and Memory*, 68, 285-316.
- Izquierdo, I., Medina, J. H., Vianna, M. R. M., Izquierdo, L. A., & Barros, D. M. (1999). Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res*, 103, 1-11.
- Jayaram, G., Stagg, C. J., Esser, P., Kischka, U., Stinear, J., & Johansen-Berg, H. (2012). Relationships between functional and structural corticospinal tract integrity and walking post stroke. *Clinical Neurophysiology*, 123, 2422-2428.
- Lee, Y.-J., Choi, D.-Y., Yun, Y.-P., Han, S. B., Oh, K.-W., & Hong, J. T. (2013). Epigallocatechin-3-gallate prevents systemic inflammation-induced memory deficiency and amyloidogenesis via its anti-neuroinflammatory properties. *J Nutr Biochem*, 24, 298-310.
- Loetchutinat, C., Kothan, S., Dechsupa, S., Meesungnoen, J., Jay-Gerin, J.-P., & Mankhetkorn, S. (2005). Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. *Radiation Physics and Chemistry*, 72, 323-331.
- Mello-Carpes, P. B., da Silva de Vargas, L., Gayer, M. C., Roehrs, R., & Izquierdo, I. (2016). Hippocampal noradrenergic activation is necessary for object recognition memory consolidation and can promote BDNF increase and memory persistence. *Neurobiology of Learning and Memory*, 127, 84-92.
- Mello-Carpes, P. B., & Izquierdo, I. (2013). The Nucleus of the Solitary Tract → Nucleus Paragigantocellularis → Locus Coeruleus → CA1 region of dorsal hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 100, 56-63.
- Mello, P. B., Benetti, F., Cammarota, M., & Izquierdo, I. (2009). Physical exercise can reverse the deficit in fear memory induced by maternal deprivation. *Neurobiol Learn Mem*, 92, 364-369.
- Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G. A., & Meisel, A. (2013). Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends in neurosciences*, 36, 587-597.
- Nayak, P. K., & Kerr, D. S. (2015). Functional preservation of hippocampal CA1 by low-dose GYKI-52466 preconditioning in a rat model of hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Res*, 1613, 100-109.

- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, *95*, 351-358.
- Park, J.-W., Hong, J.-S., Lee, K.-S., Kim, H.-Y., Lee, J.-J., & Lee, S.-R. (2010). Green tea polyphenol (–)-epigallocatechin gallate reduces matrix metalloproteinase-9 activity following transient focal cerebral ischemia. *J Nutr Biochem*, *21*, 1038-1044.
- Park, S. K., Jung, I. C., Lee, W. K., Lee, Y. S., Park, H. K., Go, H. J., Kim, K., Lim, N. K., Hong, J. T., Ly, S. Y., & Rho, S. S. (2011). A combination of green tea extract and l-theanine improves memory and attention in subjects with mild cognitive impairment: a double-blind placebo-controlled study. *J Med Food*, *14*, 334-343.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (2 ed.). New York: Academic Press.
- Pendlebury, S. T., & Rothwell, P. M. (2009). Prevalence, incidence, and factors associated with pre-stroke and post-stroke dementia: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Neurology*, *8*, 1006-1018.
- Ritz, M.-F., Curin, Y., Mendelowitsch, A., & Andriantsitohaina, R. (2008). Acute treatment with red wine polyphenols protects from ischemia-induced excitotoxicity, energy failure and oxidative stress in rats. *Brain Res*, *1239*, 226-234.
- Rodriguez, P., Jiang, Z., Huang, S., Shen, Q., & Duong, T. Q. (2014). Methylene blue treatment delays progression of perfusion-diffusion mismatch to infarct in permanent ischemic stroke. *Brain Res*, *1588*, 144-149.
- Schmidt, H. L., Vieira, A., Altermann, C., Martins, A., Sosa, P., Santos, F. W., Mello-Carpes, P. B., Izquierdo, I., & Carpes, F. P. (2014). Memory deficits and oxidative stress in cerebral ischemia–reperfusion: Neuroprotective role of physical exercise and green tea supplementation. *Neurobiology of Learning and Memory*, *114*, 242-250.
- Singh, B. N., Shankar, S., & Srivastava, R. K. (2011). Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochemical Pharmacology*, *82*, 1807-1821.
- Tang, W., Li, S., Liu, Y., Huang, M.-T., & Ho, C.-T. (2013). Anti-diabetic activity of chemically profiled green tea and black tea extracts in a type 2 diabetes mice model via different mechanisms. *Journal of Functional Foods*, *5*, 1784-1793.
- Warkentin, L. M., Auriat, A. M., Wowk, S., & Colbourne, F. (2010). Failure of deferoxamine, an iron chelator, to improve outcome after collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Brain Res*, *1309*, 95-103.
- Wightman, E. L., Haskell, C. F., Forster, J. S., Veasey, R. C., & Kennedy, D. O. (2012). Epigallocatechin gallate, cerebral blood flow parameters, cognitive performance and mood in healthy humans: a double-blind, placebo-controlled, crossover investigation. *Hum Psychopharmacol*, *27*, 177-186.
- Wu, K. J., Hsieh, M. T., Wu, C. R., Wood, W. G., & Chen, Y. F. (2012). Green Tea Extract Ameliorates Learning and Memory Deficits in Ischemic Rats via Its Active Component Polyphenol Epigallocatechin-3-gallate by Modulation of Oxidative Stress and Neuroinflammation. *Evid Based Complement Alternat Med*, *163106*, 2.
- Xiong, L., Reijmer, Y. D., Charidimou, A., Cordonnier, C., & Viswanathan, A. (2015). Intracerebral hemorrhage and cognitive impairment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*.
- Xu, Y., Zhang, J. J., Xiong, L., Zhang, L., Sun, D., & Liu, H. (2010). Green tea polyphenols inhibit cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion via modulating oxidative stress. *J Nutr Biochem*, *21*, 741-748.
- Yang, Y., Zhang, M., Kang, X., Jiang, C., Zhang, H., Wang, P., & Li, J. (2015). Thrombin-induced microglial activation impairs hippocampal neurogenesis and spatial memory ability in mice. *Behavioral and Brain Functions : BBF*, *11*, 30.
- Zhang, T., Su, J., Guo, B., Wang, K., Li, X., & Liang, G. (2015). Apigenin protects blood–brain barrier and ameliorates early brain injury by inhibiting TLR4-mediated inflammatory pathway in subarachnoid hemorrhage rats. *International Immunopharmacology*, *28*, 79-87.

PARTE III

5. CONCLUSÕES

A presente dissertação teve por objetivo estudar a efetividade do chá verde como estratégia de neuroproteção em dois modelos de AVC experimental, isquêmico e hemorrágico. Nossos dados demonstram que o insulto isquêmico ou hemorrágico causa déficit na formação e consolidação da memória declarativa de curta e longa duração. Concomitante a este achado comportamental verificamos o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio no hipocampo dos ratos submetidos a ambos modelos de AVC, além do aumento dos níveis de TBARS nos animais submetidos ao AVC Hemorrágico, e a redução da capacidade antioxidante total. Estes resultados corroboram com a literatura, que descreve que o processo fisiopatológico do AVC inclui o aumento do estresse oxidativo, promove peroxidação lipídica e a redução das defesas antioxidantes, além de causar déficits cognitivos.

Ainda, neste estudo a suplementação com chá verde demonstrou ser uma estratégia efetiva para neuroproteção no AVC do subtipo isquêmico e hemorrágico e preservou a capacidade de formação de memórias. Acreditamos que apesar da isquemia-reperfusão e hemorragia intracerebral apresentarem diferentes vias fisiopatológicas, os mecanismos de proteção provenientes dos compostos bioativos do chá verde agem em vias comuns de lesão que envolvem o equilíbrio oxidativo, tais como a prevenção da formação de radicais livres (agindo como quelante de metais), a eliminação de radicais livres (ação “*scavengers*”) e a capacidade de reparo celular, já que o chá verde administrado por um período relativamente pequeno foi capaz de evitar o aumento das EROs, a liperoxidação e a diminuição da capacidade antioxidante total no hipocampo dos ratos submetidos ao AVC, independente do tipo.

O estudo que compõe esta dissertação é uma pequena fração do conhecimento já elucidado sobre o potencial do chá verde como estratégia de neuroproteção em modelos de AVC. Novos estudos devem ser realizados utilizando terapias não farmacológicas, combinadas ou não aos tratamentos já utilizados, para contribuir com o entendimento e diminuição dos déficits decorrentes do AVC. Estudos envolvendo avaliações histológicas, imunohistoquímica e técnicas de *immunoblot* também são válidos e podem contribuir com o entendimento dos mecanismos de ação do chá verde. Esperamos que este trabalho possa contribuir e ser utilizado como ferramenta para nortear futuros estudos.

6. PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados obtidos, nosso grupo de pesquisa têm as seguintes perspectivas de estudo:

- Avaliar a perda neuronal através da análise histológica de secções do hipocampo dorsal após AVC (isquêmico ou hemorrágico), bem como a viabilidade celular hipocampal, e verificar se os compostos bioativos do chá verde tem potencial de evitar danos às células neuronais;
- Quantificar os níveis proteicos de BDNF (do inglês *Brain Derived Neurothrophic Factor*), CREB (do inglês *cAMP response element-binding protein*) e pCREB, importantes proteínas envolvidas na plasticidade neural relacionada à aprendizagem e memória, em animais submetidos aos diferentes modelos de AVC e verificar se há uma associação positiva entre a administração de chá verde e manutenção e/ou aumento da expressão destes;
- Considerando a importância da Potencialização de Longa Duração (LTP, do inglês *Long-Term Potentiation*) na formação da LTM, almejamos verificar se a administração do chá verde contribui para a melhora e/ou manutenção da LTP no hipocampo, alteradas em modelos de AVC;
- Avaliar a atividade de enzimas antioxidantes específicas (SOD, GPx, GSH), bem como verificar oxidação de proteínas e o dano ao DNA em hipocampo de ratos submetidos aos diferentes modelos de AVC, tratados e não tratados com chá verde.

7. REFERÊNCIAS

- AL-SHERAJI, S. H.; ISMAIL, A.; MANAP, M. Y.; MUSTAFA, S.; YUSOF, R. M.; HASSAN, F. A. Prebiotics as functional foods: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1542-1553, 2013. ISSN 1756-4646.
- ALLEN, C. L.; BAYRAKTUTAN, U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. **Int J Stroke**, v. 4, n. 6, p. 461-70, Dec 2009. ISSN 1747-4949 (Electronic) 1747-4930 (Linking).
- ALTMAN, K. W.; SCHAEFER, S. D.; YU, G.-P.; HERTEGARD, S.; LUNDY, D. S.; BLUMIN, J. H.; MARONIAN, N. C.; HEMAN-ACKAH, Y. D.; ABITBOL, J.; CASIANO, R. R. The voice and laryngeal dysfunction in stroke: A report from the Neurolaryngology Subcommittee of the American Academy of Otolaryngology–Head and Neck Surgery. **Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 136, n. 6, p. 873-881, 2007. ISSN 0194-5998.
- AQUILANO, K.; BALDELLI, S.; CIRIOLO, M. R. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. **Front Pharmacol**, v. 5, p. 196, 2014. ISSN 1663-9812 (Electronic) 1663-9812 (Linking).
- ASSOCIATION, A. H. About Stroke. 2012.
- ASSUNÇÃO, M.; SANTOS-MARQUES, M. J.; CARVALHO, F.; ANDRADE, J. P. Green tea averts age-dependent decline of hippocampal signaling systems related to antioxidant defenses and survival. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 6, p. 831-838, 2010. ISSN 0891-5849.
- AURIAT, A. M.; SILASI, G.; WEI, Z.; PAQUETTE, R.; PATERSON, P.; NICHOL, H.; COLBOURNE, F. Ferric iron chelation lowers brain iron levels after intracerebral hemorrhage in rats but does not improve outcome. **Experimental Neurology**, v. 234, n. 1, p. 136-143, 2012. ISSN 0014-4886.
- BARTSCH, H.; NAIR, J. Oxidative stress and lipid peroxidation-derived DNA-lesions in inflammation driven carcinogenesis. **Cancer Detection and Prevention**, v. 28, n. 6, p. 385-391, 2004. ISSN 0361-090X.
- BEMBENEK, J. P.; KARLINSKI, M.; MENDEL, T. A.; NIEWADA, M.; SARZYNSKA-DLUGOSZ, I.; KOBAYASHI, A.; BARANOWSKA, A.; CZLONKOWSKA, A. Temporal trends in vascular risk factors and etiology of urban Polish stroke patients from 1995 to 2013. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 357, n. 1–2, p. 126-130, 2015. ISSN 0022-510X.
- BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Anal Biochem**, v. 239, n. 1, p. 70-6, Jul 15 1996. ISSN 0003-2697 (Print) 0003-2697 (Linking).
- BOGDANSKI, P.; SULIBURSKA, J.; SZULINSKA, M.; STEPIEN, M.; PUPEK-MUSIALIK, D.; JABLECKA, A. Green tea extract reduces blood pressure, inflammatory biomarkers, and oxidative stress and improves parameters associated with insulin resistance in

obese, hypertensive patients. **Nutrition Research**, v. 32, n. 6, p. 421-427, 2012. ISSN 0271-5317.

BOJARSKI, C.; MELONI, B. P.; MOORE, S. R.; MAJDA, B. T.; KNUCKEY, N. W. Na⁺/Ca²⁺ exchanger subtype (NCX1, NCX2, NCX3) protein expression in the rat hippocampus following 3 min and 8 min durations of global cerebral ischemia. **Brain Research**, v. 1189, p. 198-202, 2008. ISSN 0006-8993.

BONINI, J. S.; BEVILAQUA, L. R.; ZINN, C. G.; KERR, D. S.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval. **Horm Behav**, v. 50, n. 2, p. 308-13, 2006. ISSN 0018-506X (Print) 0018-506X (Linking).

BROUNS, R.; DE DEYN, P. P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 111, n. 6, p. 483-495, 2009. ISSN 0303-8467.

CAI, J.; CAO, S.; CHEN, J.; YAN, F.; CHEN, G.; DAI, Y. Progesterone alleviates acute brain injury via reducing apoptosis and oxidative stress in a rat experimental subarachnoid hemorrhage model. **Neuroscience Letters**, v. 600, p. 238-243, 2015. ISSN 0304-3940.

CHAN, P. H. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 21, n. 1, p. 2-14, Jan 2001. ISSN 0271-678X (Print) 0271-678X (Linking).

CHANG, C.-F.; CHO, S.; WANG, J. (-)-Epicatechin protects hemorrhagic brain via synergistic Nrf2 pathways. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 1, n. 4, p. 258-271, 2014. ISSN 2328-9503.

CHEN, H.; HONG, H.; XING, S.; LIU, G.; ZHANG, A.; TAN, S.; ZHANG, J.; ZENG, J. Intracranial versus Extracranial Symptomatic Carotid Atherosclerosis in Chinese Patients: Risk Factors, Stroke Mechanisms, and Long-Term Prognosis. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 24, n. 11, p. 2632-2639, 2015. ISSN 1052-3057.

CHEON, S. H. The effect of a skilled reaching task on hippocampal plasticity after intracerebral hemorrhage in adult rats. **J Phys Ther Sci**, v. 27, n. 1, p. 131-3, Jan 2015. ISSN 0915-5287 (Print) 0915-5287 (Linking).

CHI, O. Z.; BARSOUM, S.; VEGA-COTTO, N. M.; JACINTO, E.; LIU, X.; MELLENDER, S. J.; WEISS, H. R. Effects of rapamycin on cerebral oxygen supply and consumption during reperfusion after cerebral ischemia. **Neuroscience**, v. 316, p. 321-327, 2016. ISSN 0306-4522.

CHOI-KWON, S.; PARK, K.-A.; LEE, H.-J.; PARK, M.-S.; LEE, J.-H.; JEON, S.-E.; CHOE, M.-A.; PARK, K.-C. Temporal changes in cerebral antioxidant enzyme activities after ischemia and reperfusion in a rat focal brain ischemia model: effect of dietary fish oil. **Developmental Brain Research**, v. 152, n. 1, p. 11-18, 2004. ISSN 0165-3806.

CHOUDHURY, G. R.; DING, S. Reactive astrocytes and therapeutic potential in focal ischemic stroke. **Neurobiol Dis**, v. 85, p. 234-44, Jan 2016. ISSN 1095-953X (Electronic) 0969-9961 (Linking).

CLARKE, J. R.; ROSSATO, J. I.; MONTEIRO, S.; BEVILAQUA, L. R. M.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Posttraining activation of CB1 cannabinoid receptors in the CA1 region of the dorsal hippocampus impairs object recognition long-term memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 90, n. 2, p. 374-381, 2008. ISSN 1074-7427.

COLLINO, M.; ARAGNO, M.; MASTROCOLA, R.; GALLICCHIO, M.; ROSA, A. C.; DIANZANI, C.; DANNI, O.; THIEMERMANN, C.; FANTOZZI, R. Modulation of the oxidative stress and inflammatory response by PPAR-gamma agonists in the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion. **Eur J Pharmacol**, v. 530, n. 1-2, p. 70-80, Jan 13 2006. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999 (Linking).

DASH, P. K.; MOORE, A. N.; KOBORI, N.; RUNYAN, J. D. Molecular activity underlying working memory. **Learn Mem**, v. 14, n. 8, p. 554-63, Aug 2007. ISSN 1549-5485 (Electronic) 1072-0502 (Linking).

DE BUTTE-SMITH, M.; GULINELLO, M.; ZUKIN, R. S.; ETGEN, A. M. Chronic estradiol treatment increases CA1 cell survival but does not improve visual or spatial recognition memory after global ischemia in middle-aged female rats. **Hormones and Behavior**, v. 55, n. 3, p. 442-453, 2009. ISSN 0018-506X.

DE LIMA, M. N.; LARANJA, D. C.; BROMBERG, E.; ROESLER, R.; SCHRODER, N. Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. **Behav Brain Res**, v. 156, n. 1, p. 139-43, Jan 6 2005. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking).

DONG, Y.; LI, Y.; FENG, D.; WANG, J.; WEN, H.; LIU, D.; ZHAO, D.; LIU, H.; GAO, G.; YIN, Z.; QIN, H. Protective effect of HIF-1 α against hippocampal apoptosis and cognitive dysfunction in an experimental rat model of subarachnoid hemorrhage. **Brain Res**, v. 1517, p. 114-121, 2013. ISSN 0006-8993.

DOYLE, K. P.; SIMON, R. P.; STENZEL-POORE, M. P. Mechanisms of ischemic brain damage. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 310-318, 2008. ISSN 0028-3908.

EGASHIRA, Y.; HUA, Y.; KEEP, R. F.; XI, G. Intercellular cross-talk in intracerebral hemorrhage. **Brain Research**, v. 1623, p. 97-109, 2015. ISSN 0006-8993.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v. 31, n. 1, p. 47-59, 1988/11/01 1988a. ISSN 0166-4328.

_____. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behav Brain Res**, v. 31, n. 1, p. 47-59, Nov 1 1988b. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking).

ERFANI, S.; KHAKSARI, M.; ORYAN, S.; SHAMSAEI, N.; ABOUTALEB, N.; NIKBAKHT, F.; JAMALI-RAEUFY, N.; GORJIPOUR, F. Visfatin reduces hippocampal CA1 cells death and improves learning and memory deficits after transient global ischemia/reperfusion. **Neuropeptides**, v. 49, p. 63-68, 2015. ISSN 0143-4179.

FARKAS, E.; LUITEN, P. G. M.; BARI, F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: A model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. **Brain Research Reviews**, v. 54, n. 1, p. 162-180, 2007. ISSN 0165-0173.

FEIGIN, V. L.; LAWES, C. M.; BENNETT, D. A.; BARKER-COLLO, S. L.; PARAG, V. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. **Lancet Neurol**, v. 8, n. 4, p. 355-69, Apr 2009. ISSN 1474-4422 (Print) 1474-4422 (Linking).

FELDMANN, E.; BRODERICK, J. P.; KERNAN, W. N.; VISCOLI, C. M.; BRASS, L. M.; BROTT, T.; MORGENSTERN, L. B.; WILTERDINK, J. L.; HORWITZ, R. I. Major risk factors for intracerebral hemorrhage in the young are modifiable. **Stroke**, v. 36, n. 9, p. 1881-5, Sep 2005. ISSN 1524-4628 (Electronic) 0039-2499 (Linking).

FRASER, M. L.; MOK, G. S.; LEE, A. H. Green tea and stroke prevention: Emerging evidence. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 15, n. 1, p. 46-53, 2007. ISSN 0965-2299.

GARCIA, P. Y.; ROUSSEL, M.; BUGNICOURT, J. M.; LAMY, C.; CANAPLE, S.; PELTIER, J.; LOAS, G.; DERAMOND, H.; GODEFROY, O. Cognitive Impairment and Dementia After Intracerebral Hemorrhage: A Cross-sectional Study of a Hospital-based Series. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 22, n. 1, p. 80-86, 2013. ISSN 1052-3057.

GIRBOVAN, C.; PLAMONDON, H. Resveratrol downregulates type-1 glutamate transporter expression and microglia activation in the hippocampus following cerebral ischemia reperfusion in rats. **Brain Research**, v. 1608, p. 203-214, 2015. ISSN 0006-8993.

GORDAN, M. L.; JUNGWIRTH, B.; OHL, F.; KELLERMANN, K.; KOCHS, E. F.; BLOBNER, M. Evaluation of neurobehavioral deficits following different severities of cerebral ischemia in rats: A comparison between the modified hole board test and the Morris water maze test. **Behav Brain Res**, v. 235, n. 1, p. 7-20, 2012. ISSN 0166-4328.

GRANGER, D. N.; KVIETYS, P. R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. **Redox Biology**, v. 6, p. 524-551, 2015. ISSN 2213-2317.

GU, H.-F.; NIE, Y.-X.; TONG, Q.-Z.; TANG, Y.-L.; ZENG, Y.; JING, K.-Q.; ZHENG, X.-L.; LIAO, D.-F. Epigallocatechin-3-Gallate Attenuates Impairment of Learning and Memory in Chronic Unpredictable Mild Stress-Treated Rats by Restoring Hippocampal Autophagic Flux. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e112683, 2014. ISSN 1932-6203.

HADADHA, M.; VAKILI, A.; BANDEGI, A. R. Effect of the Inhibition of Hydrogen Sulfide Synthesis on Ischemic Injury and Oxidative Stress Biomarkers in a Transient Model of Focal

Cerebral Ischemia in Rats. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 24, n. 12, p. 2676-2684, 2015. ISSN 1052-3057.

HINSON, H. E.; HANLEY, D. F.; ZIAI, W. C. Management of intraventricular hemorrhage. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v. 10, n. 2, p. 73-82, Mar 2010. ISSN 1534-6293 (Electronic) 1528-4042 (Linking).

HONG, J. T.; RYU, S. R.; KIM, H. J.; LEE, J. K.; LEE, S. H.; KIM, D. B.; YUN, Y. P.; RYU, J. H.; LEE, B. M.; KIM, P. Y. Neuroprotective effect of green tea extract in experimental ischemia-reperfusion brain injury. **Brain Research Bulletin**, v. 53, n. 6, p. 743-749, 2000. ISSN 0361-9230.

HSU, Y.-W.; TSAI, C.-F.; TING, H.-C.; CHEN, W.-K.; YEN, C.-C. Green tea supplementation in mice mitigates senescence-induced changes in brain antioxidant abilities. **Journal of Functional Foods**, v. 7, p. 471-478, 2014. ISSN 1756-4646.

HUIJGEN, J.; SAMSON, S. The hippocampus: A central node in a large-scale brain network for memory. **Revue Neurologique**, v. 171, n. 3, p. 204-216, 2015. ISSN 0035-3787.

HWANG, L.; CHOI, I. Y.; KIM, S. E.; KO, I. G.; SHIN, M. S.; KIM, C. J.; KIM, S. H.; JIN, J. J.; CHUNG, J. Y.; YI, J. W. Dexmedetomidine ameliorates intracerebral hemorrhage-induced memory impairment by inhibiting apoptosis and enhancing brain-derived neurotrophic factor expression in the rat hippocampus. **Int J Mol Med**, v. 31, n. 5, p. 1047-56, May 2013. ISSN 1791-244X (Electronic) 1107-3756 (Linking).

IDE, K.; YAMADA, H. Clinical benefits of green tea consumption for cognitive dysfunction. **PharmaNutrition**, v. 3, n. 4, p. 136-145, 2015. ISSN 2213-4344.

IDE, K.; YAMADA, H.; TAKUMA, N.; PARK, M.; WAKAMIYA, N.; NAKASE, J.; UKAWA, Y.; SAGESAKA, Y. M. Green Tea Consumption Affects Cognitive Dysfunction in the Elderly: A Pilot Study. **Nutrients**, v. 6, n. 10, p. 4032-4042, 2014. ISSN 2072-6643.

ISHII, T.; FUKUTA, T.; AGATO, Y.; OYAMA, D.; YASUDA, N.; SHIMIZU, K.; KAWAGUCHI, A. T.; ASAI, T.; OKU, N. Nanoparticles accumulate in ischemic core and penumbra region even when cerebral perfusion is reduced. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 430, n. 4, p. 1201-1205, 2013. ISSN 0006-291X.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Porto Alegre RS: Artmed, 2002.

IZQUIERDO, I.; BARROS, D. M.; MELLO E SOUZA, T.; DE SOUZA, M. M.; IZQUIERDO, L. A.; MEDINA, J. H. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v. 393, n. 6686, p. 635-6, Jun 18 1998. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking).

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiol Learn Mem**, v. 68, n. 3, p. 285-316, Nov 1997. ISSN 1074-7427 (Print) 1074-7427 (Linking).

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory Formation: The Sequence of Biochemical Events in the Hippocampus and Its Connection to Activity in Other Brain Structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 68, n. 3, p. 285-316, 1997. ISSN 1074-7427.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H.; VIANNA, M. R. M.; IZQUIERDO, L. A.; BARROS, D. M. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behavioural Brain Research**, v. 103, n. 1, p. 1-11, 1999a. ISSN 0166-4328.

_____. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behav Brain Res**, v. 103, n. 1, p. 1-11, 1999b. ISSN 0166-4328.

IZQUIERDO, L. A.; VIANNA, M.; BARROS, D. M.; MELLO E SOUZA, T.; ARDENGHI, P.; SANT' ANNA, M. K.; RODRIGUES, C.; MEDINAM, J. H.; IZQUIERDO, I. Short- and Long-Term Memory Are Differentially Affected by Metabolic Inhibitors Given into Hippocampus and Entorhinal Cortex. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 73, n. 2, p. 141-149, 2000. ISSN 1074-7427.

JAYARAM, G.; STAGG, C. J.; ESSER, P.; KISCHKA, U.; STINEAR, J.; JOHANSEN-BERG, H. Relationships between functional and structural corticospinal tract integrity and walking post stroke. **Clinical Neurophysiology**, v. 123, n. 12, p. 2422-2428, 2012. ISSN 1388-2457.

KALARIA, R. N.; AKINYEMI, R.; IHARA, M. Stroke injury, cognitive impairment and vascular dementia. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, 2016. ISSN 0925-4439.

KEEP, R. F.; HUA, Y.; XI, G. Intracerebral haemorrhage: mechanisms of injury and therapeutic targets. **The Lancet Neurology**, v. 11, n. 8, p. 720-731, 2012. ISSN 1474-4422.

KIRKMAN, M. A.; ALLAN, S. M.; PARRY-JONES, A. R. Experimental intracerebral hemorrhage: avoiding pitfalls in translational research. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 31, n. 11, p. 2135-51, Nov 2011. ISSN 1559-7016 (Electronic) 0271-678X (Linking).

KONDO, K.; KURIHARA, M.; MIYATA, N.; SUZUKI, T.; TOYODA, M. Scavenging mechanisms of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epicatechin gallate on peroxy radicals and formation of superoxide during the inhibitory action. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 7-8, p. 855-863, 1999. ISSN 0891-5849.

KONG, L.; WANG, Y.; WANG, X.-J.; WANG, X.-T.; ZHAO, Y.; WANG, L.-M.; CHEN, Z.-Y. Retinoic acid ameliorates blood-brain barrier disruption following ischemic stroke in rats. **Pharmacological Research**, v. 99, p. 125-136, 2015. ISSN 1043-6618.

KRISHNAMURTHI, R. V.; FEIGIN, V. L.; FOROUZANFAR, M. H.; MENSAH, G. A.; CONNOR, M.; BENNETT, D. A.; MORAN, A. E.; SACCO, R. L.; ANDERSON, L. M.; TRUELSEN, T.; O'DONNELL, M.; VENKETASUBRAMANIAN, N.; BARKER-COLLO, S.; LAWES, C. M.; WANG, W.; SHINOHARA, Y.; WITT, E.; EZZATI, M.; NAGHAVI, M.; MURRAY, C. Global and regional burden of first-ever ischaemic and haemorrhagic stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet Glob Health**, v. 1, n. 5, p. e259-81, Nov 2013. ISSN 2214-109X (Electronic)

2214-109X (Linking).

KUMAR, A.; AAKRITI; GUPTA, V. A Review on Animal Models of Stroke: an Update. **Brain Research Bulletin**, 2016. ISSN 0361-9230.

KUTSUNA, N.; YAMASHITA, A.; ERIGUCHI, T.; OSHIMA, H.; SUMA, T.; SAKATANI, K.; YAMAMOTO, T.; YOSHINO, A.; KATAYAMA, Y. Acute stress exposure preceding transient global brain ischemia exacerbates the decrease in cortical remodeling potential in the rat retrosplenial cortex. **Neuroscience Research**, v. 78, p. 65-71, 2014. ISSN 0168-0102.

LEE, J. M.; GRABB, M. C.; ZIPFEL, G. J.; CHOI, D. W. Brain tissue responses to ischemia. **J Clin Invest**, v. 106, n. 6, p. 723-31, Sep 2000. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking).

LEE, Y.-J.; CHOI, D.-Y.; YUN, Y.-P.; HAN, S. B.; OH, K.-W.; HONG, J. T. Epigallocatechin-3-gallate prevents systemic inflammation-induced memory deficiency and amyloidogenesis via its anti-neuroinflammatory properties. **J Nutr Biochem**, v. 24, n. 1, p. 298-310, 2013a. ISSN 0955-2863.

_____. Epigallocatechin-3-gallate prevents systemic inflammation-induced memory deficiency and amyloidogenesis via its anti-neuroinflammatory properties. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 1, p. 298-310, 2013b. ISSN 0955-2863.

LI, L.-X.; CAMPBELL, K.; ZHAO, S.; KNUCKEY, N. W.; MELONI, B. P. The effect of blood pressure (37 vs 45 mmHg) and carotid occlusion duration (8 vs 10 min) on CA1–4 neuronal damage when using isoflurane in a global cerebral ischemia rat model. **Brain Research Bulletin**, v. 86, n. 5–6, p. 390-394, 2011. ISSN 0361-9230.

LI, Q.; ZHAO, H. F.; ZHANG, Z. F.; LIU, Z. G.; PEI, X. R.; WANG, J. B.; LI, Y. Long-term green tea catechin administration prevents spatial learning and memory impairment in senescence-accelerated mouse prone-8 mice by decreasing A β 1-42 oligomers and upregulating synaptic plasticity–related proteins in the hippocampus. **Neuroscience**, v. 163, n. 3, p. 741-749, 2009. ISSN 0306-4522.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, n. 1–2, p. 137-147, 2009. ISSN 1383-5718.

LIU, Y.; AO, L. J.; LU, G.; LEONG, E.; LIU, Q.; WANG, X. H.; ZHU, X. L.; SUN, T. F. D.; FEI, Z.; JIU, T.; HU, X.; POON, W. S. Quantitative gait analysis of long-term locomotion deficits in classical unilateral striatal intracerebral hemorrhage rat model. **Behavioural Brain Research**, v. 257, p. 166-177, 2013. ISSN 0166-4328.

LOETCHUTINAT, C.; KOTHAN, S.; DECHSUPA, S.; MEESUNGNOEN, J.; JAY-GERIN, J.-P.; MANKHETKORN, S. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 72, n. 2–3, p. 323-331, 2005. ISSN 0969-806X.

LOPEZ, M. S.; DEMPSEY, R. J.; VEMUGANTI, R. Resveratrol neuroprotection in stroke and traumatic CNS injury. **Neurochemistry International**, v. 89, p. 75-82, 2015. ISSN 0197-0186.

LUNEC, J.; HOLLOWAY, K. A.; COOKE, M. S.; FAUX, S.; GRIFFITHS, H. R.; EVANS, M. D. Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo?1. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 7, p. 875-885, 2002. ISSN 0891-5849.

MACLELLAN, C. L.; PAQUETTE, R.; COLBOURNE, F. A critical appraisal of experimental intracerebral hemorrhage research. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 32, n. 4, p. 612-27, Apr 2012. ISSN 1559-7016 (Electronic) 0271-678X (Linking).

MACLELLAN, C. L.; SILASI, G.; POON, C. C.; EDMUNDSON, C. L.; BUIST, R.; PEELING, J.; COLBOURNE, F. Intracerebral hemorrhage models in rat: comparing collagenase to blood infusion. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 28, n. 3, p. 516-25, Mar 2008. ISSN 0271-678X (Print) 0271-678X (Linking).

MANZANERO, S.; SANTRO, T.; ARUMUGAM, T. V. Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: Sources and contribution to cell injury. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 5, p. 712-718, 2013. ISSN 0197-0186.

MARRONI, N. P.; MORGAN-MARTINS, M. I.; PORAWSKI, M. **Radicais Livres no Processo Saúde-Doença: Da bancada à clínica**. Curitiba - Brasil: Editora CRV, 2012.

MEDINA, J. H.; SCHRÖDER, N.; IZQUIERDO, I. Two different properties of short- and long-term memory. **Behavioural Brain Research**, v. 103, n. 1, p. 119-121, 1999. ISSN 0166-4328.

MELLO-CARPES, P. B.; DA SILVA DE VARGAS, L.; GAYER, M. C.; ROEHRS, R.; IZQUIERDO, I. Hippocampal noradrenergic activation is necessary for object recognition memory consolidation and can promote BDNF increase and memory persistence. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 127, p. 84-92, 2016. ISSN 1074-7427.

MELLO-CARPES, P. B.; IZQUIERDO, I. The Nucleus of the Solitary Tract → Nucleus Paragigantocellularis → Locus Coeruleus → CA1 region of dorsal hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 100, p. 56-63, 2013. ISSN 1074-7427.

MELLO, P. B.; BENETTI, F.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I. Physical exercise can reverse the deficit in fear memory induced by maternal deprivation. **Neurobiol Learn Mem**, v. 92, n. 3, p. 364-9, Oct 2009. ISSN 1095-9564 (Electronic) 1074-7427 (Linking).

MERGENTHALER, P.; LINDAUER, U.; DIENEL, G. A.; MEISEL, A. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. **Trends in neurosciences**, v. 36, n. 10, p. 587-597, 2013. ISSN 0166-2236 1878-108X.

NAKAMURA, T.; KEEP, R. F.; HUA, Y.; HOFF, J. T.; XI, G. Oxidative DNA injury after experimental intracerebral hemorrhage. **Brain Research**, v. 1039, n. 1–2, p. 30-36, 2005. ISSN 0006-8993.

NAMAL SENANAYAKE, S. P. J. Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1529-1541, 2013. ISSN 1756-4646.

NAYAK, P. K.; KERR, D. S. Functional preservation of hippocampal CA1 by low-dose GYKI-52466 preconditioning in a rat model of hypoxic-ischemic brain injury. **Brain Res**, v. 1613, p. 100-109, 2015. ISSN 0006-8993.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979/06/01 1979. ISSN 0003-2697.

OKUYAMA, S.; MORITA, M.; MIYOSHI, K.; NISHIGAWA, Y.; KAJI, M.; SAWAMOTO, A.; TERUGO, T.; TOYODA, N.; MAKIHATA, N.; AMAKURA, Y.; YOSHIMURA, M.; NAKAJIMA, M.; FURUKAWA, Y. 3,5,6,7,8,3',4'-Heptamethoxyflavone, a citrus flavonoid, on protection against memory impairment and neuronal cell death in a global cerebral ischemia mouse model. **Neurochemistry International**, v. 70, p. 30-38, 2014. ISSN 0197-0186.

PANG, G.; XIE, J.; CHEN, Q.; HU, Z. How functional foods play critical roles in human health. **Food Science and Human Wellness**, v. 1, n. 1, p. 26-60, 2012. ISSN 2213-4530.

PARK, J.-W.; HONG, J.-S.; LEE, K.-S.; KIM, H.-Y.; LEE, J.-J.; LEE, S.-R. Green tea polyphenol (–)-epigallocatechin gallate reduces matrix metalloproteinase-9 activity following transient focal cerebral ischemia. **J Nutr Biochem**, v. 21, n. 11, p. 1038-1044, 2010. ISSN 0955-2863.

PARK, S. K.; JUNG, I. C.; LEE, W. K.; LEE, Y. S.; PARK, H. K.; GO, H. J.; KIM, K.; LIM, N. K.; HONG, J. T.; LY, S. Y.; RHO, S. S. A combination of green tea extract and l-theanine improves memory and attention in subjects with mild cognitive impairment: a double-blind placebo-controlled study. **J Med Food**, v. 14, n. 4, p. 334-43, Apr 2011. ISSN 1557-7600 (Electronic) 1096-620X (Linking).

PARK, Y.; NAM, S.; YI, H.-J.; HONG, H.-J.; LEE, M. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids increase oxidative stress in rats with intracerebral hemorrhagic stroke. **Nutrition Research**, v. 29, n. 11, p. 812-818, 2009. ISSN 0271-5317.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2. New York: Academic Press, 1986.

PENDLEBURY, S. T.; ROTHWELL, P. M. Prevalence, incidence, and factors associated with pre-stroke and post-stroke dementia: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 11, p. 1006-1018, 2009. ISSN 1474-4422.

PICELLI, A.; TAMBURIN, S.; GAJOFATTO, F.; ZANETTE, G.; PRAITANO, M.; SALTUARI, L.; CORRADINI, C.; SMANIA, N. Association between Severe Upper Limb Spasticity and Brain Lesion Location in Stroke Patients. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 162754, 2014. ISSN 2314-6133 2314-6141.

PORCELLO MARRONE, L. C.; DIOGO, L. P.; DE OLIVEIRA, F. M.; TRENTIN, S.; SCALCO, R. S.; DE ALMEIDA, A. G.; GUTIERRES, L. D. C. V.; MARRONE, A. C. H.; DA COSTA, J. C. Risk Factors among Stroke Subtypes in Brazil. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 22, n. 1, p. 32-35, 2013. ISSN 1052-3057.

QUILLFELDT, J. A. **Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats**. Animals Models as Tools in Ethical Biomedical Research, 2006.

RABIEI, Z.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Neuroprotective effect of pretreatment with *Lavandula officinalis* ethanolic extract on blood-brain barrier permeability in a rat stroke model. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, Supplement 1, p. S421-S426, 2014. ISSN 1995-7645.

RITZ, M.-F.; CURIN, Y.; MENDELOWITSCH, A.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Acute treatment with red wine polyphenols protects from ischemia-induced excitotoxicity, energy failure and oxidative stress in rats. **Brain Res**, v. 1239, p. 226-234, 2008. ISSN 0006-8993.

RODRIGUEZ, P.; JIANG, Z.; HUANG, S.; SHEN, Q.; DUONG, T. Q. Methylene blue treatment delays progression of perfusion-diffusion mismatch to infarct in permanent ischemic stroke. **Brain Res**, v. 1588, p. 144-9, Nov 7 2014. ISSN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993 (Linking).

SAAD, M. A.; ABDEL SALAM, R. M.; KENAWY, S. A.; ATTIA, A. S. Pinocembrin attenuates hippocampal inflammation, oxidative perturbations and apoptosis in a rat model of global cerebral ischemia reperfusion. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 1, p. 115-122, 2015. ISSN 1734-1140.

SALMON, D. P.; HEINDEL, W. C.; HAMILTON, J. M.; VINCENT FILOTEO, J.; CIDAMBI, V.; HANSEN, L. A.; MASLIAH, E.; GALASKO, D. Recognition memory span in autopsy-confirmed Dementia with Lewy Bodies and Alzheimer's Disease. **Neuropsychologia**, v. 75, p. 548-555, 2015. ISSN 0028-3932.

SANG, S.; LAMBERT, J. D.; HO, C.-T.; YANG, C. S. The chemistry and biotransformation of tea constituents. **Pharmacological Research**, v. 64, n. 2, p. 87-99, 2011. ISSN 1043-6618.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, NAVDEEP S. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. R453-R462, 2014. ISSN 0960-9822.

SCHIMIDT, H. L.; VIEIRA, A.; ALTERMANN, C.; MARTINS, A.; SOSA, P.; SANTOS, F. W.; MELLO-CARPES, P. B.; IZQUIERDO, I.; CARPES, F. P. Memory deficits and oxidative stress in cerebral ischemia-reperfusion: Neuroprotective role of physical exercise and green tea supplementation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 114, p. 242-250, 2014. ISSN 1074-7427.

SINGH, B. N.; SHANKAR, S.; SRIVASTAVA, R. K. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n. 12, p. 1807-1821, 2011. ISSN 0006-2952.

SPERBER, C.; KARNATH, H.-O. Topography of acute stroke in a sample of 439 right brain damaged patients. **NeuroImage: Clinical**, v. 10, p. 124-128, 2016. ISSN 2213-1582.

SQUIRE, L. R. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. **Psychol Rev**, v. 99, n. 2, p. 195-231, Apr 1992. ISSN 0033-295X (Print) 0033-295X (Linking).

SQUIRE, L. R.; ZOLA, S. M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 24, p. 13515-22, Nov 26 1996. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).

STEIN, M.; HAMANN, G. F.; MISSELWITZ, B.; UHL, E.; KOLODZIEJ, M.; REINGES, M. H. T. In-Hospital Mortality and Complication Rates in Surgically and Conservatively Treated Patients with Spontaneous Intracerebral Hemorrhage in Central Europe: a Population Based Study. **World Neurosurgery**, 2015. ISSN 1878-8750.

SUTHERLAND, B. A.; RAHMAN, R. M. A.; APPLETON, I. Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, n. 5, p. 291-306, 2006. ISSN 0955-2863.

TANG, W.; LI, S.; LIU, Y.; HUANG, M.-T.; HO, C.-T. Anti-diabetic activity of chemically profiled green tea and black tea extracts in a type 2 diabetes mice model via different mechanisms. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1784-1793, 2013. ISSN 1756-4646.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007. ISSN 1357-2725.

WANG, J. Preclinical and clinical research on inflammation after intracerebral hemorrhage. **Prog Neurobiol**, v. 92, n. 4, p. 463-77, Dec 2010. ISSN 1873-5118 (Electronic) 0301-0082 (Linking).

WANG, J. Preclinical and clinical research on inflammation after intracerebral hemorrhage. **Prog Neurobiol**, v. 92, n. 4, p. 463-477, 2010. ISSN 0301-0082.

WARKENTIN, L. M.; AURIAT, A. M.; WOWK, S.; COLBOURNE, F. Failure of deferoxamine, an iron chelator, to improve outcome after collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. **Brain Res**, v. 1309, p. 95-103, Jan 14 2010. ISSN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993 (Linking).

WEINREB, O.; MANDEL, S.; AMIT, T.; YODIM, M. B. H. Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, n. 9, p. 506-516, 2004. ISSN 0955-2863.

WHO. World Health Organization. International Classification of Functioning, Disability and Health (ICF). Geneva: WHO, 2001.

WOJTUNIK-KULESZA, K. A.; ONISZCZUK, A.; ONISZCZUK, T.; WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M. The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 78, p. 39-49, 2016. ISSN 0753-3322.

WU, C. D.; WEI, G.-X. Tea as a functional food for oral health. **Nutrition**, v. 18, n. 5, p. 443-444, 2002. ISSN 0899-9007.

WU, K. J.; HSIEH, M. T.; WU, C. R.; WOOD, W. G.; CHEN, Y. F. Green Tea Extract Ameliorates Learning and Memory Deficits in Ischemic Rats via Its Active Component Polyphenol Epigallocatechin-3-gallate by Modulation of Oxidative Stress and Neuroinflammation. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 163106, n. 10, p. 2, 2012a. ISSN 1741-4288 (Electronic) 1741-427X (Linking).

_____. Green Tea Extract Ameliorates Learning and Memory Deficits in Ischemic Rats via Its Active Component Polyphenol Epigallocatechin-3-gallate by Modulation of Oxidative Stress and Neuroinflammation. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 163106, 2012b. ISSN 1741-4288 (Electronic) 1741-427X (Linking).

XIONG, L.; REIJMER, Y. D.; CHARIDIMOU, A.; CORDONNIER, C.; VISWANATHAN, A. Intracerebral hemorrhage and cognitive impairment. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, 2015. ISSN 0925-4439.

XU, Y.; ZHANG, J. J.; XIONG, L.; ZHANG, L.; SUN, D.; LIU, H. Green tea polyphenols inhibit cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion via modulating oxidative stress. **J Nutr Biochem**, v. 21, n. 8, p. 741-8, Aug 2010. ISSN 1873-4847 (Electronic) 0955-2863 (Linking).

YAIKAR, L.; THAKUR, S. Arjunolic acid, a pentacyclic triterpenoidal saponin of Terminalia arjuna bark protects neurons from oxidative stress associated damage in focal cerebral ischemia and reperfusion. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 5, p. 890-895, 2015. ISSN 1734-1140.

YAN, T.; CHOPP, M.; CHEN, J. Experimental animal models and inflammatory cellular changes in cerebral ischemic and hemorrhagic stroke. **Neuroscience bulletin**, v. 31, n. 6, p. 717-734, 2015. ISSN 1673-7067 1995-8218.

YAN, X.; ZHANG, J.-J.; LI, X.; LEI, Z.; DONG, S.; HUI, L. Green tea polyphenols inhibit cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion via modulating oxidative stress. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 8, p. 741-748, 2010. ISSN 0955-2863.

YANG, Y.; ZHANG, M.; KANG, X.; JIANG, C.; ZHANG, H.; WANG, P.; LI, J. Thrombin-induced microglial activation impairs hippocampal neurogenesis and spatial memory ability in mice. **Behavioral and Brain Functions : BBF**, v. 11, p. 30, 2015. ISSN 1744-9081.

YANG, Z.-B.; LUO, X.-J.; REN, K.-D.; PENG, J.-J.; TAN, B.; LIU, B.; LOU, Z.; XIONG, X.-M.; ZHANG, X.-J.; REN, X.; PENG, J. Beneficial effect of magnesium lithospermate B on cerebral ischemia–reperfusion injury in rats involves the regulation of miR-107/glutamate transporter 1 pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 766, p. 91-98, 2015. ISSN 0014-2999.

YE, Z.-W.; ZHANG, J.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1850, n. 8, p. 1607-1621, 2015. ISSN 0304-4165.

ZEMKE, D.; SMITH, J. L.; REEVES, M. J.; MAJID, A. Ischemia and Ischemic Tolerance in the Brain: an Overview. **NeuroToxicology**, v. 25, n. 6, p. 895-904, 2004. ISSN 0161-813X.

ZHANG, J.; FANG, X.; ZHOU, Y.; DENG, X.; LU, Y.; LI, J.; LI, S.; WANG, B.; XU, R. The Possible Damaged Mechanism and the Preventive Effect of Monosialotetrahexosylganglioside in a Rat Model of Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 24, n. 7, p. 1471-1478, 2015. ISSN 1052-3057.

ZHANG, T.; SU, J.; GUO, B.; WANG, K.; LI, X.; LIANG, G. Apigenin protects blood–brain barrier and ameliorates early brain injury by inhibiting TLR4-mediated inflammatory pathway in subarachnoid hemorrhage rats. **International Immunopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 79-87, 2015. ISSN 1567-5769.

ZHOU, Y.; WANG, Y.; WANG, J.; ANNE STETLER, R.; YANG, Q.-W. Inflammation in intracerebral hemorrhage: From mechanisms to clinical translation. **Prog Neurobiol**, v. 115, p. 25-44, 2014. ISSN 0301-0082.

8. ANEXOS

8.1. Parecer de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA da UNNIPAMPA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)

Pró-Reitoria de Pesquisa

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55) 3413 4321, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 034/2014

Título: Efeitos do tratamento com chá verde (*Camellia sinensis*) no dano oxidativo e déficit de memória induzido pelo Acidente Vascular Encefálico isquêmico e hemorrágico em ratos

Data da aprovação: 17/11/2014

Período de vigência do projeto: De: 11/2014 Até: 11/2017

Pesquisador: PÂMELA BILLIG MELO CARPES

Campus: URUGUAIANA

Telefone: (55) 9661-2454

E-mail: pamelacarpes@unipampa.edu.br



Alessandra Sayuri Kikuchi Tamajusuku

Digitally signed by ALESSANDRA SAYURI KIKUCHI TAMAJUSUKU
NEIS:98256009004
DN: cn=ALESSANDRA SAYURI KIKUCHI TAMAJUSUKU
NEIS:98256009004, o=BR, ou=ICP-
Brasil, ou=RFB e-CPF A3,
email=alessandra.kikuchi@unipampa.edu.br

Professor Adjunto
Coordenadora da CEUA/UNIPAMPA