

Estudo do efeito do ginseng para melhora de vasoespasm cerebral em ratos pós hemorragia subaracnóideia

Study of the effect of ginseng for the amelioration of cerebral vasospasm in rats after subarachnoid hemorrhage

DOI:10.34117/bjdv7n8-125

Recebimento dos originais: 06/07/2021

Aceitação para publicação: 06/08/2021

Isabella Rita Fadel Martinho

Graduanda do curso de Medicina, Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde (FCMS)

Instituição: Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (PUC-SP)

Endereço: Rua Marechal Castelo Branco, nº 91, Jardim Sandra, Sorocaba/SP

E-mail: isa.martinho@hotmail.com

Valquíria Neves Perin

Graduanda do curso de Medicina, Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde (FCMS)

Instituição: Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (PUC-SP)

Endereço: Rua Marechal Castelo Branco, nº 91, Jardim Sandra, Sorocaba/SP

E-mail: valquiriaperin@hotmail.com

Carolina Simão Martini

Graduanda do curso de Medicina, Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde (FCMS)

Instituição: Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (PUC-SP)

Endereço: Rua Sylvio Romero 222 apto. 82

Paulo Henrique Pires de Aguiar

Professor Doutor da área de Neurocirurgia, Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde (FCMS)

Instituição: Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (PUC-SP)

Endereço: Rua David Bem Gurion, nº 1077, São Paulo/SP

E-mail: phpaneurocir@gmail.com

RESUMO

O Vasoespasm cerebral é uma patologia caracterizada pelo estreitamento de artérias cerebrais localizadas na base do encéfalo pós hemorragia subaracnóideia, devido a formação de Oxihemoglobina, proveniente da degeneração dos produtos sanguíneos, que leva ao início de uma cascata de eventos no endotélio vascular, responsáveis por promoverem a contração da parede arterial e, conseqüentemente, a isquemia cerebral secundária.

O Panax ginseng é uma erva asiática conhecida pelo seu poder terapêuticos e farmacológicos, utilizado na Ásia há muito tempo. Estudos em células progenitoras neurais mostraram que o Ginsenosídeo Rb1 tem efeito protetor contra lesões por estresse oxidativo.

O trabalho teve como objetivo a avaliação do efeito protetor contra vasoespasm do Panax ginseng.

Como metodologia, realizou-se um estudo experimental com injeção de sangue autólogo na cisterna magna em vinte ratos, sendo dez do grupo controle e dez do grupo

experimental que haviam sido gavados com *Panax ginseng* por duas semanas. Após o período de espera necessário para criar o vasoespasm, os ratos foram reabordados a fim de medir o fluxo sanguíneo cerebral com probe intracraniano.

Observou-se na análise dos extremos dos valores de velocidade de fluxo obtidos uma possível relação positiva do *Ginseng* na prevenção do Vasoespasm cerebral.

Palavras-chave: Vasoespasm Cerebral, *Panax Ginseng*.

ABSTRACT

Cerebral vasospasm is a pathology characterized by the narrowing of cerebral arteries located at the base of the brain after subarachnoid hemorrhage, due to the formation of oxyhemoglobin, originating from the degeneration of blood products, which leads to the initiation of a cascade of events in the vascular endothelium, responsible for promoting the contraction of the arterial wall and, consequently, secondary cerebral ischemia.

Panax ginseng is an Asian herb known for its therapeutic and pharmacological power, used in Asia for a long time. Studies in neural progenitor cells have shown that Ginsenoside Rb1 has a protective effect against oxidative stress injury.

The aim of this work was to evaluate the protective effect against vasospasm of *Panax ginseng*.

As methodology, an experimental study was performed with injection of autologous blood in the cisterna magna in twenty rats, ten from the control group and ten from the experimental group that had been gavaged with *Panax ginseng* for two weeks. After the waiting period needed to create vasospasm, the rats were re-approached in order to measure cerebral blood flow with an intracranial probe.

It was observed in the analysis of the extremes of flow velocity values obtained a possible positive relationship of *Ginseng* in preventing cerebral vasospasm.

Keywords: Cerebral vasospasm, *Panax Ginseng*.

1 INTRODUÇÃO

O Vasoespasm cerebral é uma patologia caracterizada pelo estreitamento de artérias cerebrais localizadas na base do encéfalo pós hemorragia subaracnóidea, devido a formação de Oxihemoglobina, proveniente da degeneração dos produtos sanguíneos, que leva ao início de uma cascata de eventos no endotélio vascular, responsáveis por promoverem a contração da parede arterial e, conseqüentemente, a isquemia cerebral secundária (KHURANA; MEYER, 2003).

A interrupção do fluxo cerebral leva à supressão da atividade elétrica espontânea, à inibição da excitabilidade sináptica cortical e à inibição da excitabilidade elétrica.

As principais estratégias de tratamento atual consistem em evitar a progressão e tentar reverter o vasoespasm, através do uso de bloqueadores do canal de cálcio, sulfato de magnésio, estatinas, nimodipine e terapia dos 3H (hipertensão, hipervolemia e hemodiluição). Apesar destes, 15 a 20% dos pacientes ainda evoluem à óbito,

O Ginseng é uma erva asiática conhecida pelo seu poder terapêuticos e farmacológicos, utilizado na Ásia há muito tempo. Os Ginsenosídeos são os principais princípios ativos do Ginseng. Atualmente são conhecidos mais de 30 compostos de Ginsenosídeos foram identificados, entre eles o Rb1, Rd, Rg1 e Re são os mais estudados pela literatura devido ao fato de serem o de quantidade mais abundante na composição do no Ginseng.

Ye et al. (2016) em seus estudos em células progenitoras neurais, mostraram que o Ginsenosídeo Rb1 tem efeito protetor contra lesões por estresse oxidativo. Quando administrado o Rb1 ativa o Nrf2 e inicia o translocamento desse para o núcleo da célula neural, onde se inicia uma série de respostas que formarão um complexo de proteína de Nrf2, que são fundamentais para a resposta celular contra danos induzidos pelo t-BHP, pois ativam a transcrição do gene antioxidante HO-1. O HO-1 induz a formação de enzimas que catalisam etapas da degradação oxidativa, portanto tem papel essencial nas respostas anti-inflamatórias, anti-oxidativas e outras respostas biológicas.

Segundo Ye et al. (2011), Rd mostrou-se efetivo para reduzir o acúmulo de radicais livres, especificamente os radicais hidroxila, pois verificou-se que inibem a formação de salicilato de hidroxila. Outro mecanismo que deve ser considerado para os efeitos neuroprotetores do Rd é seu efeito anti-inflamatório mediado pela inibição da atividade microglial, iNOS (GILLIS, C. N. 1997) e expressão de COX-2.

No início da resposta cerebral contra isquemia, ocorre a ativação microglial em regiões de morte neuronal. Essa ativação ajuda o processo de reparo tecidual através da rápida remoção de resíduos, entretanto também induz mediadores citotóxicos como NO e citocinas inflamatórias. Consequentemente, a inibição farmacológica de ativação microglial pós isquemia atenuou a extensão do dano tecidual e comprometimento neurológico (ONG, W. Y. et al 2015). Portanto, os resultados do uso de Rb demonstram que esse pode ser uma importante extensão da janela de tratamento terapêutico contra a isquemia cerebral (LIN, M. et al. 2015)

2 OBJETIVOS

Esse projeto de pesquisa buscou estudar os efeitos preventivos do Ginseng em relação ao vasoespasma em ratos, através da análise do fluxo sanguíneo via Doppler intracraniano e de alterações neuropatológicas.

3 MÉTODOS

Estudo experimental, que se iniciou após aprovação pelo Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA) da FCMS/PUC-SP no dia 20/06/2018, protocolo nº2018/88, respeitando as normas do Conselho Nacional de Controle da Experimentação animal(CONCEA).

3.1 MONTAGEM MODELO EXPERIMENTAL

Foi realizada uma ampla revisão da literatura nas bases de dados eletrônicas Google Acadêmico e Scielo Brasil utilizando como descritores os termos escolhidos na DeCS: Vasoespasmo Intracraniano, Panax e Hemorragia Subaracnóidea.

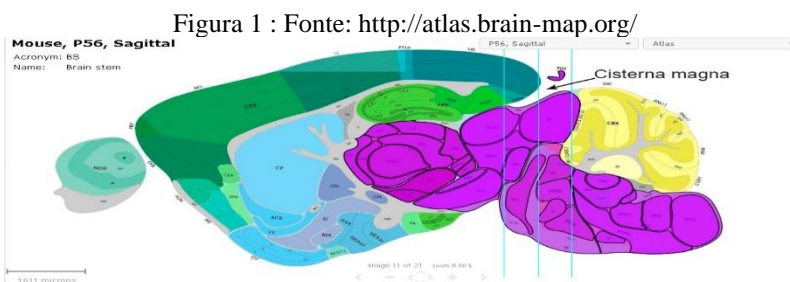
Após esse estudo de coleta de dados, o método de injeção única de sangue autólogo (GULES, I. et al. 2002) foi escolhido como o mais adequado para a indução da hemorragia subaracnóidea desse projeto, uma vez que permite a execução dos experimentos em dia único.

Para análise da ocorrência do vasoespasmo, optou-se por utilizar a velocidade de fluxo sanguíneo cerebral, medida via Doppler intracraniano, como fonte de dados (CARVALHO, C. F; CHAMMAS, M. C.; CERRI, G. G 2008).

Algumas adaptações das metodologias recolhidas na literatura foram necessárias para possibilitar a execução do projeto de pesquisa dentro dos recursos tecnológicos/financeiros disponíveis no campus da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde em Sorocaba.

Tais adaptações foram: injeção do sangue autólogo de maneira manual na cisterna magna, devido a falta do estereotáxico robotizado, e uso do gravador do celular para gerar os gráficos do som, devido a falta do Doppler espectral.

Na análise do anatomopatológico optou-se por fazer três cortes transversal na região da área lesada de cada encéfalo. Dessa forma, é possível abranger de forma eficiente as regiões que circundam a cisterna magna (MAHAT, M. Y. et al 2012)



3.2 ADMINISTRAÇÃO SUBSTÂNCIA ANALISADA

A administração da droga Panax Ginseng foi alterada de via alimentar, como era previsto no projeto de pesquisa, para via gavagem. Tal mudança ocorreu por indicação do veterinário que acompanhou o projeto visando melhor controle da quantidade da substância analisada ingerida pelo rato.

Definiu-se a administração de 2 mL de solução aquosa de concentração 4 mg de Ginsenosídeos por mL via gavagem 1 vez ao dia por 15 dias para o grupo experimental, e a administração de 2 mL de água mineral via gavagem 1 vez ao dia por 15 dias para o grupo controle.

Optou-se no cronograma por realizar o início da gavagem com uma diferença de 7 dias entre cada grupo, possibilitando assim a realização do procedimento cirúrgico experimental em dias diferentes. Isso possibilitou uma melhor execução dos experimentos pois 40 procedimentos em 20 ratos em um dia única geraria sobrecarga dos pesquisadores.

No dia experimental, os ratos foram anestesiados com supervisão do veterinário do biotério com uma dose inicial de 0.5 mL de Cetamina + 0.04 mL de Xilazina, sendo que em alguns ratos a anestesia não bloqueou todos os reflexos da maneira desejada, optando-se por fazer uma dose extra de 0.25 mL de Cetamina + 0.08 mL de Tramadol.

Após a anestesia, os ratos foram posicionados no aparelho estereotáxico com fixação da cabeça, de maneira a facilitar a abordagem cirúrgica craniocervical (figura 2). Após o posicionamento, a pele e os músculos foram infiltrados com anestesia local, e foi feita uma incisão na pele que se estendia pela região suboccipital e pelo arco de C1. Prosseguiu-se cortando o músculo e dissecando as membranas, até atingir a calota craniana do rato.

Com uma broca, abriu-se um orifício na linha média da região rostral do osso da fossa posterior (figura 3). Primeiro, retirou-se 0.3 mL de líquido cefalorraquidiano para depois injetar 0.3 mL de sangue arterial autólogo proveniente da artéria caudal do rato (SANSING, L. H. et al 2011). O sangue é injetado de maneira constante para dentro da cisterna magna através de uma agulha de insulina visando induzir SAH. (figura 4).

O pedaço da calota craniana retirado foi recolocado, e o músculo e a pele que protege a região foram suturados (figura 5). Após o procedimento, os ratos voltaram para suas gaiolas, onde permaneceram o tempo todo sob efeito da anestesia por 4 horas (figura 6).

Após esperar o período necessário para criar o vasoespasmó (WESTERMAIER, T. et al 2009), os ratos foram reoperados: abriu-se os pontos, retirou-se o pedaço da calota do furo já feito anteriormente para inserir o probe intracraniano do Mizuho 20MHz Surgical Doppler Transceiver (figura 7), a fim de medir o fluxo sanguíneo cerebral dos ratos.

Após a medição do fluxo, os ratos foram imediatamente sacrificados com inalação de Halotano e seu encéfalos retirados para envio ao anatomopatológico.



Figura 2: rato posicionado no aparelho estereotáxico



Figura 3: orifício na linha média da região rostral do osso



Figura 4: injeção de sangue



Figura 5: sutura da pele após a retirada da calota craniana



Figura 6: ratos na gaiola após o procedimento



Figura 7: análise do fluxo sanguíneo cerebral

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos resultados, executou-se uma comparação quantitativa das velocidades máximas de fluxo de cada gráfico.

Devido às limitações citadas acima, o gráfico gerado a partir do som do doppler não fornecia os valores da velocidade de fluxo em cm/s. Portanto, para fazer essa comparação cada gráfico foi padronizado através da criação de um eixo X

milimetrado. Possibilitando assim obter-se valores que representam a velocidade máxima de fluxo de cada gráfico.

4 RESULTADOS

4.1 RESULTADO DO DOPPLER

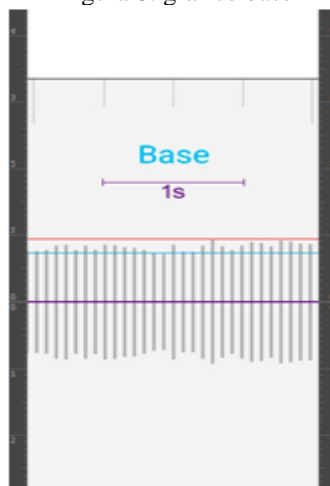
Existe uma correlação (AASLID, R.; HUBER, P.; NORDES, H 1984) entre a diminuição de diâmetro e o aumento da velocidade de fluxo nesta artéria, e a altura do som depende da velocidade do fluxo sanguíneo (CARVALHO, C. F; CHAMMAS, M. C.; CERRI, G. G 2008). Portanto, foi medido via doppler intracraniano a velocidade de fluxo cerebral de cada rato e foi gerado o espectro de frequências, com o uso do gravador do celular.

Cada medição foi realizada por dois minutos e o ponto do espectro de frequências escolhido para análise correspondeu aos critérios: 1) som mais audível; 2) maior ponto de Velocidade Máxima.

Para quantificar o espectro de frequência gerado, foi traçado o mesmo padrão em todos os gráficos gerados, visto que a velocidade máxima corresponde ao ponto de maior pico do espectro. Ao comparar os valores dos padrões correspondentes ao ponto de maior velocidade obtidos em cada gráfico, foi possível estabelecer em quais experimentos houve maior velocidade de fluxo e conseqüentemente maior vasoespasm.

O padrão da velocidade de fluxo sem o vasoespasm foi obtido através da medição do fluxo em um rato que não foi submetido ao modelo de hemorragia subaracnóidea, gerando um espectro que foi denominado de gráfico Base.

Figura 8: gráfico base



Legenda referente às figuras 8 a 28:- Linha Azul: velocidade mínima- Linha vermelha: velocidade máxima

Figura 9: Doppler referente ao Controle 1

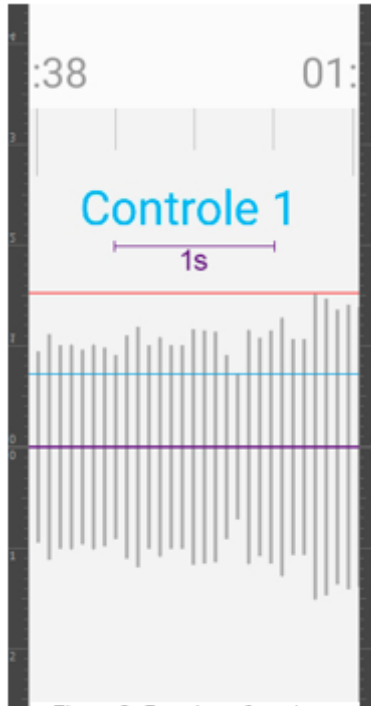


Figura 10: Doppler referente ao Controle 2

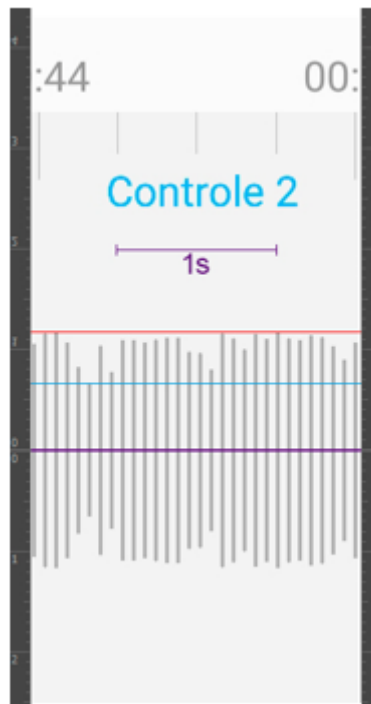


Figura 11: Doppler referente ao Controle 3

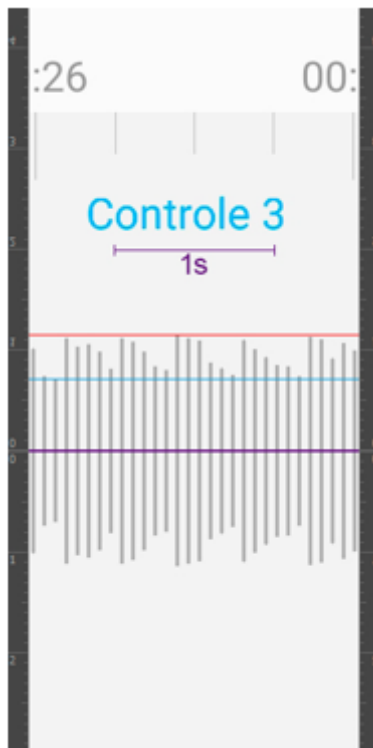


Figura 12: Doppler referente ao Controle 4

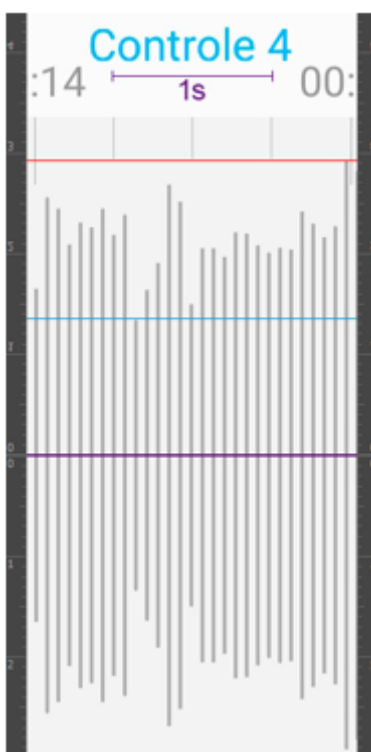


Figura 13: Doppler referente ao Controle 5

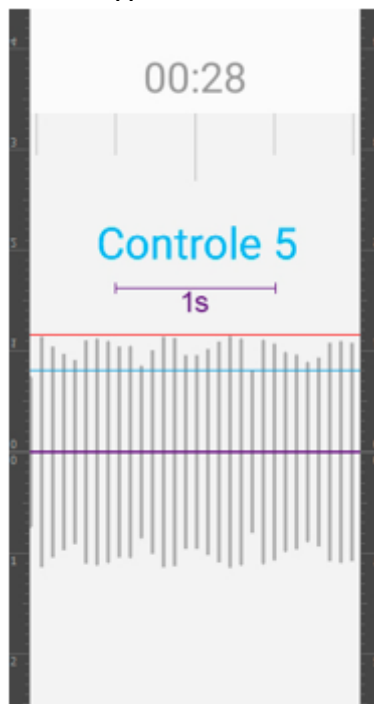


Figura 14: Doppler referente ao Controle 6

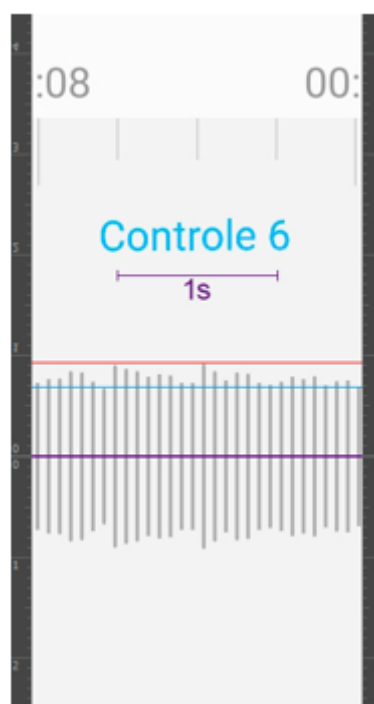


Figura 15: Doppler referente ao Controle 7

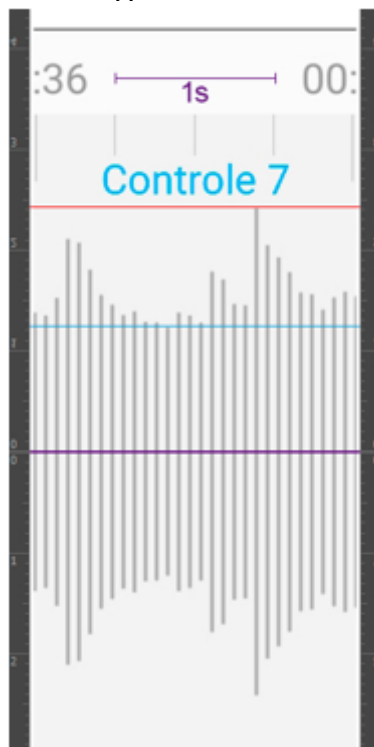


Figura 16: Doppler referente ao Controle 8

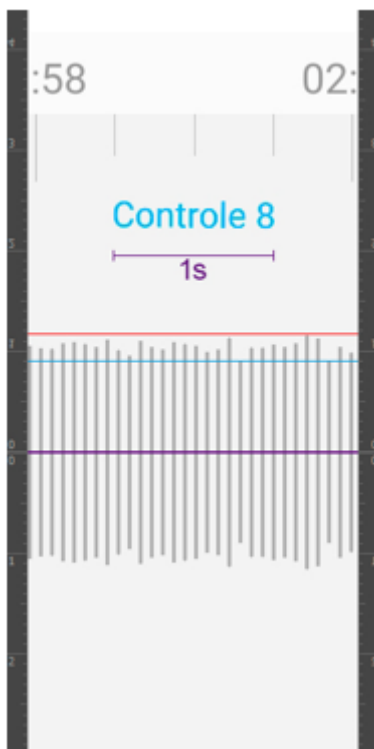


Figura 17: Doppler referente ao Controle 9

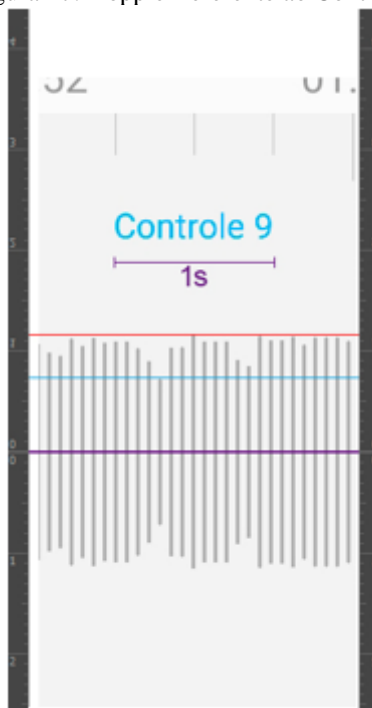


Figura 18: Doppler referente ao Controle 10

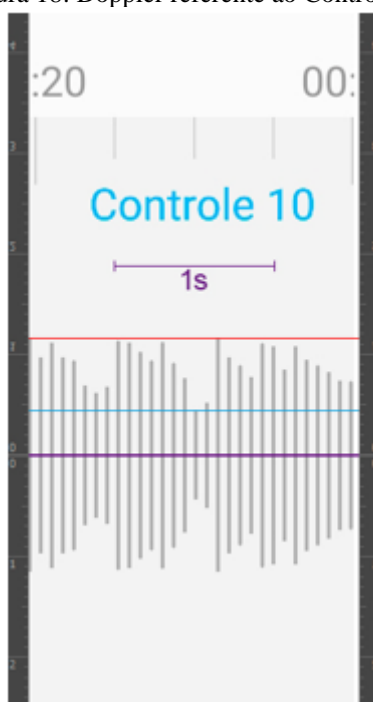


Figura 19: Doppler referente ao Experimento 1

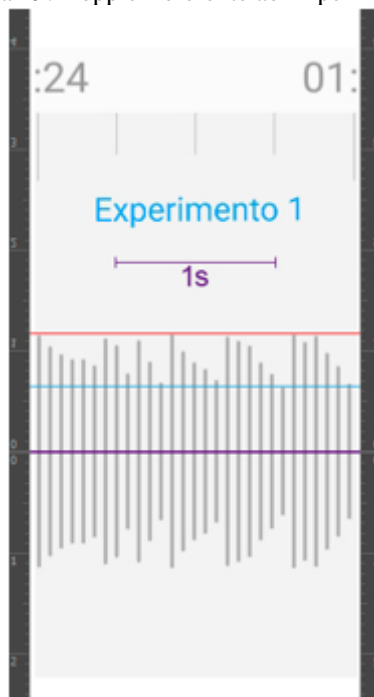


Figura 20: Doppler referente ao Experimento 2

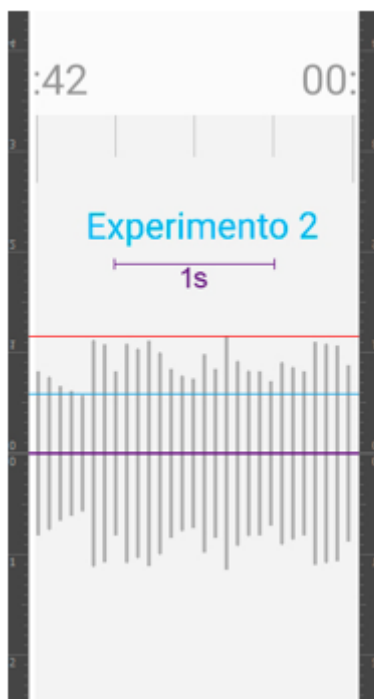


Figura 21: Doppler referente ao Experimento 3

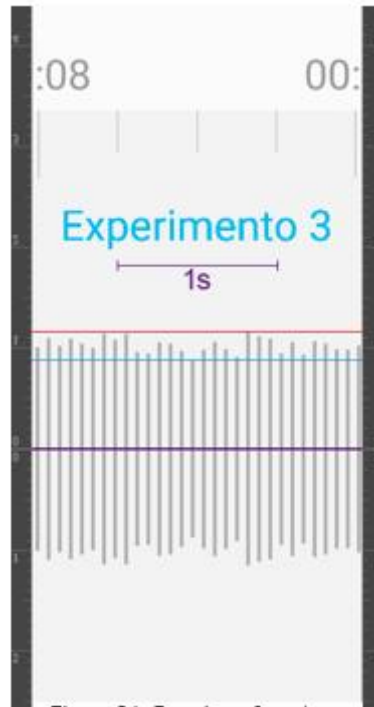


Figura 22: Doppler referente ao Experimento 4

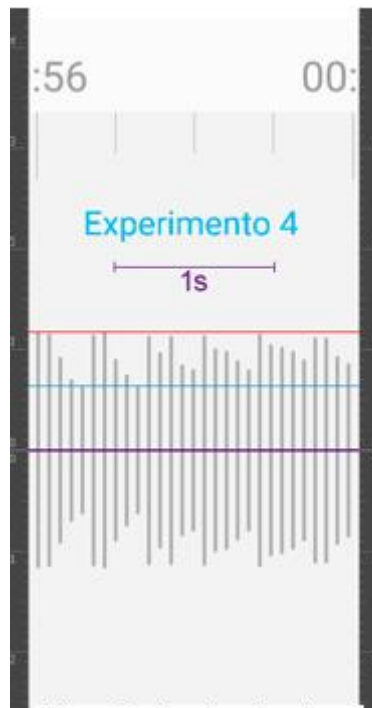


Figura 23: Doppler referente ao Experimento 5

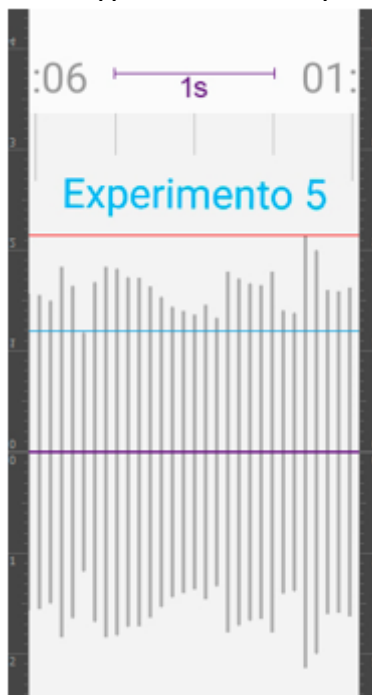


Figura 24: Doppler referente ao Experimento 6

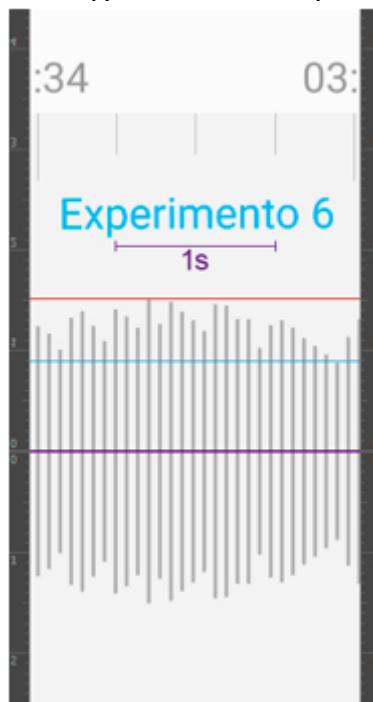


Figura 25: Doppler referente ao Experimento 7

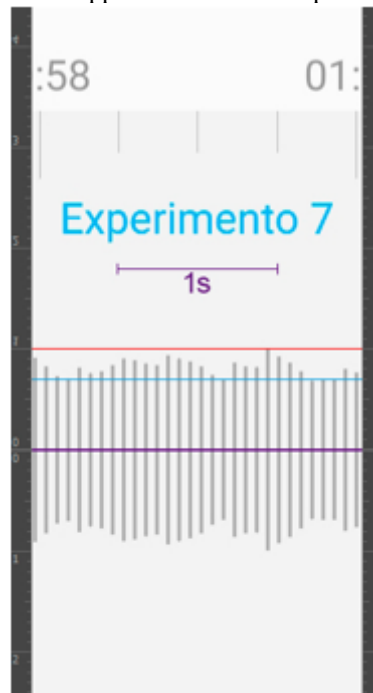


Figura 26: Doppler referente ao Experimento 8

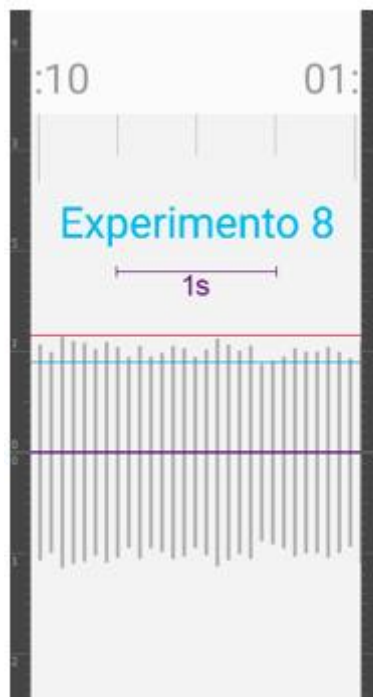


Figura 27: Doppler referente ao Experimento 9

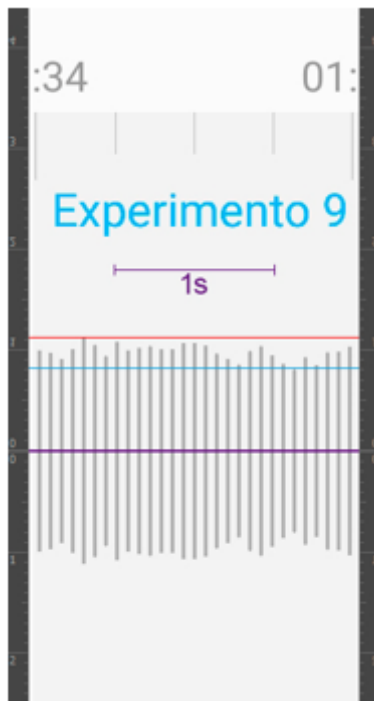
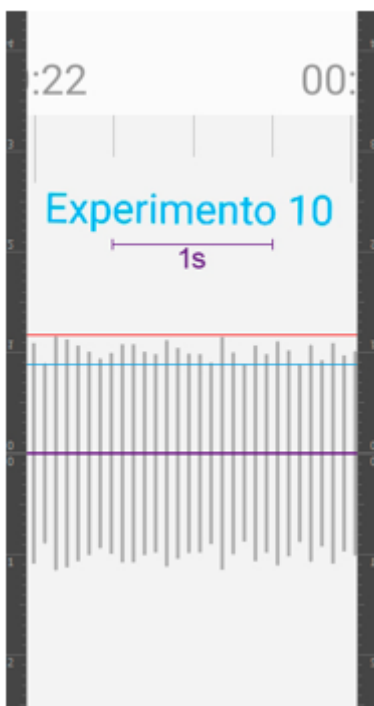


Figura 28: Doppler referente ao Experimento 10



4.1.1 Análise

Tabela 1: Padrão de velocidade máxima. 2018-2019. Fonte: Pesquisadores

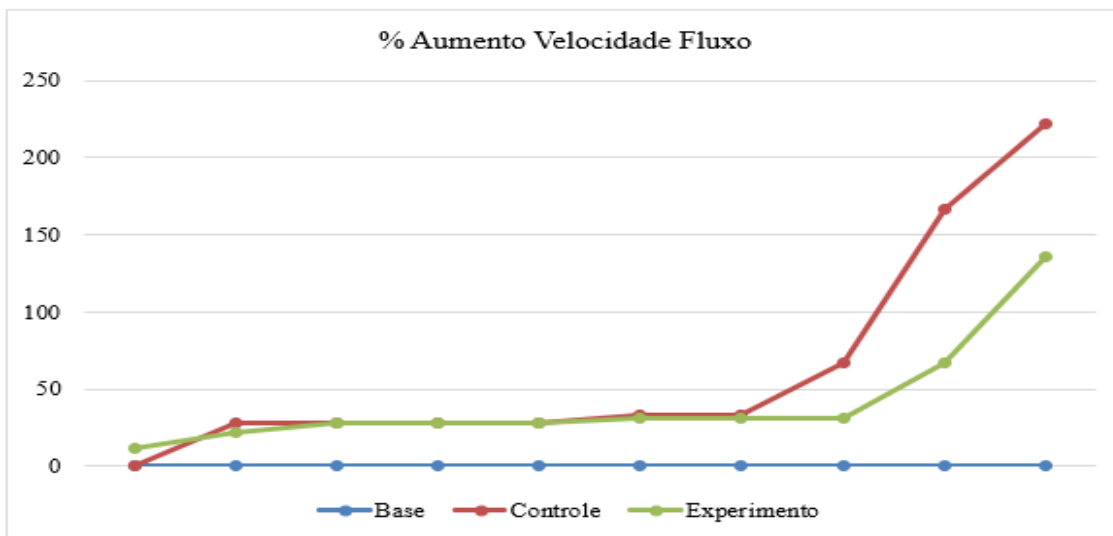
	Grupo Controle	Grupo Experimental	Rato sem Modelo hemorragia (gráfico base)
Padrão Velo. Máxima	Rato 1: 1,5	Rato 1: 1,18	Rato: 0,9
	Rato 2: 1,2	Rato 2: 1,15	
	Rato 3: 1,15	Rato 3: 1,15	
	Rato 4: 2,9	Rato 4: 1,18	
	Rato 5: 1,15	Rato 5: 2,12	
	Rato 6: 0,90	Rato 6: 1,5	
	Rato 7: 2,4	Rato 7: 1,00	
	Rato 8: 1,2	Rato 8: 1,15	
	Rato 9: 1,15	Rato 9: 1,10	
	Rato 10: 1,15	Rato 10: 1,18	

Usando o valor do padrão de velocidade máxima obtido no espectro do Gráfico Base como corte para definir a ocorrência ou não de vasoespasm, todos os valores dos padrões de velocidade máxima (tabela 1) foram convertidos em porcentagem para facilitar a comparação dos dados.

Tabela 2: Porcentagem de aumento de velocidade máxima. 2018-2019. Fonte: Pesquisadores

	Nº ratos no Grupo Controle	Nº ratos no Grupo Experimental
Aumento 0%	1	0
Aumento 11,1%	0	1
Aumento 22,2%	0	1
Aumento 27,7%	4	3
Aumento 31,1%	0	3
Aumento 33,3%	2	0
Aumento 66,6%	1	1
Aumento 135,5%	0	1
Aumento 166,6%	1	0
Aumento 222,2%	1	0

Gráfico 1: Porcentagem de aumento de velocidade máxima. 2018-2019.



Fonte: Pesquisadores

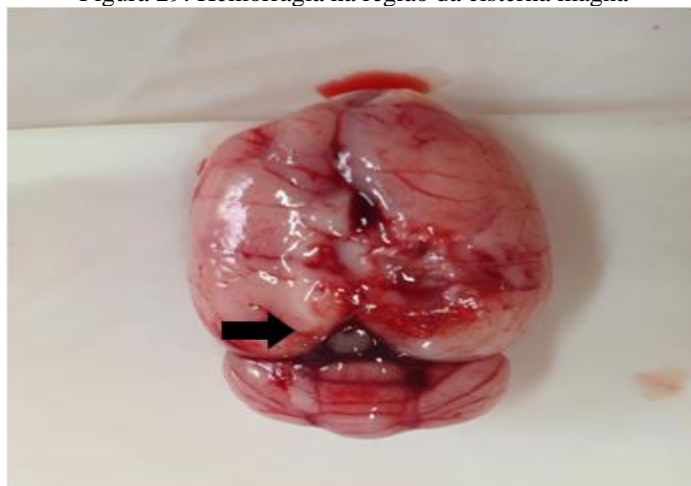
4.2 RESULTADO ANATOMOPATOLÓGICO

A análise das lâminas não identificou área de necrose/infarto cerebral em nenhuma das lâminas. As lâminas com maiores alterações teciduais foram a C4, C7 e E5, sendo que dentre essas a C7 foi a que apresentou um pouco mais de edema e gliose reacional.

5 DISCUSSÃO

O modelo de hemorragia subaracnóidea para criar vasoespasmu funcionou em 19 dos 20 ratos, sendo que o aumento da porcentagem da velocidade fluxo ficou na casa dos 10% em 1 rato, na casa dos 22% em 1 rato, na casa dos 27,7% até 33,3% em 12 ratos, na casa dos 66% em 2 ratos, e passou dos 100% em 3 ratos.

Figura 29: Hemorragia na região da cisterna magna



Não se sabe ao certo o motivo de somente 5 ratos terem resultado em vasoespasmos com aumento de pelo menos 50% na velocidade máxima de fluxo, mas acredita-se que tenha sido por variação mínimas quando o sangue autólogo foi injetado na cisterna magna.

Essas variações podem ter ocorrido devido a limitação técnica do aparelho estereotáxico disponível para o experimento não ser o robotizado, fazendo com que a injeção do sangue ocorresse de maneira manual, permitindo assim a imprecisão humana de variação de posição e/ou velocidade de injeção.

Devido ao tamanho reduzido da área encefálica do rato, qualquer alteração milimétrica na forma de injeção pode levar a mudanças no modelo de hemorragia e consequentemente alteração de vasoespasmos.

Outro fator que pode explicar a diferença na intensidade do vasoespasmos é a propensão genética de cada rato de criar vasoespasmos, visto resulta de complexos mecanismos fisiopatológicos (CAHIL, W. J.; CALVERT, J. H.; ZHANG, J. H. 2006) desencadeados após a HAS, levando a diferentes possibilidades de ativação das vias apoptóticas (WANG, Y. et al. 2018) em cada animal.

Percebeu-se, ao analisar os dados obtidos, que o efeito do Ginseng no vasoespasmos cerebral foi indiferente na faixa de aumento da velocidade de fluxo entre 27 e 33%, visto que exatamente a mesma quantidade de ratos do grupo experimental (6 ratos) e do grupo controle (6 ratos) se encontraram nessa faixa.

Na faixa de aumento de 66% do fluxo o Ginseng também não causou alteração, visto que 1 rato de cada grupo atingiu esse mesmo patamar.

Já na análise dos extremos dos valores de velocidade de fluxo obtidos percebemos uma relação positiva do Ginseng na prevenção do Vasoespasmos cerebral.

Os vasoespasmos de pouca intensidade – aumento da velocidade do fluxo de 10% a 22% – só ocorreram no grupo experimental (2 ratos), indicando um possível efeito de “freio” do Ginseng para não atingir o valor mínimo do aumento da velocidade de fluxo do grupo controle (27,7%).

Em relação aos vasoespasmos de grande intensidade – aumento da velocidade de fluxo de pelo menos o dobro do referencial –, o Ginseng também demonstrou a mesma ação de “freio”. O gráfico 1 mostra como o grupo experimental não atingiu valores de aumento da velocidade de fluxo proporcionais ao do grupo controle.

No anatomopatológico, as lâminas com mais alterações teciduais foram as que atingiram vasoespasmos de grande intensidade, sendo que entre essas a que apresentou um pouco mais de edema e gliose foi do grupo controle.

Portanto, os resultados desse projeto de pesquisa indicaram que o Panax Ginseng exerce o efeito de reduzir a intensidade do vasoespasmo no início do processo e quando a velocidade de fluxo já atingiu pelo menos o dobro da velocidade sem o vasoespasmo.

Esse resultado vai de encontro com os achados de Li et al., 2011, que sugerem que o tratamento com GRb1 diminui o edema cerebral e melhora o vasoespasmo pós hemorragia subaracnóidea em ratos.

Entretanto, somente 26% (5/19) dos ratos dos nossos experimentos se enquadraram nesses critérios que sugerem a correlação positiva do Ginseng para reduzir o vasoespasmo. Os outros 73% (14/19) dos ratos não demonstraram relação entre o uso do Ginseng e alteração no vasoespasmo.

Acredita-se que a falta de significância estatística dos resultados ocorreu devido à dificuldade de reproduzir o modelo de hemorragia, o que resultou em vasoespasmos de intensidades variadas.

No início desse projeto, era esperado que todos os 10 ratos de cada grupo atingissem vasoespasmo de intensidade semelhante, gerando assim duas curvas que poderiam ser comparadas de maneira direta. Entretanto, o gráfico 1 só se comportou da maneira esperada no final da curva analisada, não fornecendo um resultado objetivo para o projeto.

Devido o resultado do gráfico fornecer 2 hipóteses (indiferente e benéfico), que podem ser conflitantes sobre o efeito do Ginseng no vasoespasmo, faz-se necessário maiores estudos visando aumentar a amostra de ratos submetidos ao experimento, buscando a significância estatística necessária para elucidar as hipóteses geradas nesse projeto de pesquisa.

Ademais, os resultados do anatomopatológico foram de encontro com os resultados do Doppler, isso é um fator que corrobora a hipótese encontrada de um efeito benéfico do Ginseng, apesar da baixa significância estatística alcançado por esse projeto de pesquisa.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho teve por objetivo estudar os efeitos preventivos do Ginseng em relação ao vasoespasmismo em ratos através da análise do fluxo sanguíneo via Doppler intracraniano e de alterações neuropatológicas. Tal objetivo foi atingido observou-se uma relação positiva entre “uso do Ginseng e prevenção do vasoespasmismo”, entretanto é necessário aumentar o n para obter melhores dados estatísticos. O projeto de pesquisa executado acrescenta novos dados e hipóteses nos estudos ainda escassos sobre o efeito do Ginseng, principalmente sua relação com o vasoespasmismo cerebral, contribuindo assim para o avanço do estudo científico do tema discutido.

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, M. et al. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo : Departamento de Psicobiologia. Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo, 2004.

AASLID, R.; HUBER, P.; NORDES, H. Evaluation of cerebrovascular spasm with transcranial Doppler ultrasound. *Journal of neurosurgery*, v.60, n.1, p.37-41, Jan 1984.

BISHOP, C. C.; POWELL, S.; RUTT, D. Transcranial Doppler measurement of middle cerebral artery blood flow velocity: a validation study. *Stroke*, v.17, n.5, p.913-915, Sep. 1986.

CAHIL, W. J.; CALVERT, J. H.; ZHANG, J. H. Mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, V.26, N.11, P 1341-1353, Nov 2006.

CARVALHO, C. F; CHAMMAS, M. C.; CERRI, G. G. Princípios físicos do Doppler em ultra-sonografia. *Ciência Rural*, v.38, n.3, p. 872-879, 2008.

DIETRICH, H. H.; DACY, R. G. JR. Molecular keys to the problems of cerebral vasospasm. *Neurosurgery*, v.46, p.517-530, 2000.

GILLIS, C. N. Panax ginseng pharmacology: a nitric oxide link?. *Biochemical pharmacology*, v.54, n.1, p.1-8, Jul 1997.

GULES, I. et al. Comparison of three rat models of cerebral vasospasm. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v.283, n.6, p. H2551-H2559, Dez. 2002.

GURESIR, E. et al. Rat cisterna magna double-injection model of subarachnoid hemorrhage—background, advantages/limitations, technical considerations, modifications, and outcome measures. In *Neurovascular Events After Subarachnoid Hemorrhage*. Cham: Springer, 2015, p. 325-329.

KE, Z. Evaluation of transcranial Doppler flow velocity changes in intracerebral hemorrhage rats using ultrasonography. *Journal of Neuroscience Methods*, v.210, n.2, p.272-280, Sep. 2012.

KHURANA, V. G.; MEYER, F. B. Translational paradigms in cerebrovascular gene transfer. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, v.23, n.11, p.1251- 1262, Nov. 2003.

LIN, M. et al. Ginsenoside Rg1 protects against transient focal cerebral ischemic injury and suppresses its systemic metabolic changes in cerebral injury rats. *Acta pharmaceutica sinica*, v.5, n.3, p. 277-284, Mai 2008.

Li, Y. et al. Treatment with ginsenoside rb1, a component of panax ginseng, provides neuroprotection in rats subjected to subarachnoid hemorrhage-induced brain injury. In *Early Brain Injury or Cerebral Vasospasm*. Vienna: Springer, 2011, p. 75-79

MAHAT, M. Y. et al. An improved method of transcutaneous cisterna magna puncture for cerebrospinal fluid sampling in rats. *Journal of neuroscience methods*, v.211, n.2, p. 272-279, Nov 2015.

ONG, W. Y. et al. Protective effects of ginseng on neurological disorders. *Frontiers in aging neuroscience*, v.7, p.129, Jul 2015.

SANSING, L. H. et al. Autologous blood injection to model spontaneous intracerebral hemorrhage in mice. *Journal of Visualized Experiments*, v. 54, p.e2618, Ago 2011.

WANG, Y. et al. Pseudo Ginsenoside Rh2 induces A549 cells apoptosis via the Ras/Raf/ERK/p53 pathway. *Experimental and therapeutic medicine*, v.15, n.6, p. 4916-4924, Jun 2018.

WESTERMAIER, T. et al. Time-course of cerebral perfusion and tissue oxygenation in the first 6 h after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, v. 29, n.4, p.771-779, Abr 2009.

YE, J. et al. Neuroprotective effects of ginsenosides on neural progenitor cells against oxidative injury. *Molecular Medicine Reports*, v.13, n.4, p.3083-3091, Apr. 2016.

YE, R. Ginsenoside Rd attenuates early oxidative damage and sequential inflammatory response after transient focal ischemia in rats. *Neurochemistry International*, v.58, n.3, p.391-398, Feb. 2011.