

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**AÇÃO NEUROPROTETORA DO EXTRATO ETANÓLICO DA CASCA DE
PEQUI EM CÉREBROS DE RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA E
REPERFUSÃO**

Marina Pacheco Miguel
Orientador: Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo

GOIÂNIA
2011



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TE-DE) na Biblioteca Digital da UFV

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Viçosa-UFV a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFV, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor: **Marina Pacheco Miguel** E-mail: **marinavet2005@yahoo.com.br**

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☒ Sim ☐ Não

Vínculo Empregatício do autor: **Universidade Federal de Viçosa** Agência de fomento:

País: **Brasil** UF: **GO** CNPJ: **95424709168** Sigla:

Título: **Ação neuroprotetora do extrato etanólico da casca de pequi em cérebros de ratos submetidos à isquemia e reperfusão** Palavras-chave: **compostos fenólicos, estresse oxidativo, MAPK, vitamina E.**

Título em outra língua: **Neuroprotection action of pequi shell extract in rats brain submitted to ischemic and reperfusion injury**

Palavras-chave em outra língua: **phenolics compounds, oxidative stress, MAPK, vitamin E**

Área de concentração: **Patologia, Clínica e Cirurgia Animal** Data defesa: (dd/mm/aaaa) **24/03/2011**

Programa de Pós-Graduação: **Ciência Animal**

Orientador(s): **Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo** E-mail: **earaujo@vet.ufv.br**

Co-orientador(1): **Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito** E-mail: **labrito@vet.ufv.br**

Co-orientador(2): **Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti** E-mail: **clorinda@vet.ufv.br**

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ ☒ total ☐ parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinala as permissões:

[] Capítulos. Especifique:

[] Outras restrições:

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, toma-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema de Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Goiania 29 de maio de 2011


Assinatura do(a) autor(a)

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

MARINA PACHECO MIGUEL

**AÇÃO NEUROPROTETORA DO EXTRATO ETANÓLICO DA CASCA DE
PEQUI EM CÉREBROS DE RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA E
REPERFUSÃO**

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal

Área de concentração:

Patologia, Clínica e Cirurgia Animal

Orientador:

Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo - EVZ/UFG

Comitê de Orientação:

Prof^ª. Dr^ª. Maria Clorinda Soares Fioravanti -
EVZ/UFG

Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito- EVZ/UFG

GOIÂNIA

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

	Miguel, Marina Pacheco. Miguel, Marina Pacheco.
M636a	Ação neuroprotetora do extrato etanólico da casca de pequi em cérebros de ratos submetidos à isquemia e reperfusão [manuscrito] / Marina Pacheco Miguel. – 2011. 79 f. Orientador: Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2011. Bibliografia. 1. <i>Caryocar brasiliense</i> . 2. Antioxidantes. 3. Compostos fenólicos. 4. Acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI). I. Título. CDU: 619:616.831-005.1

Dedico este trabalho a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para que os meus dias fossem ricos em felicidade e paz! E, principalmente, ao meu pai Luis Miguel, que mesmo na sua forma invisível, nunca deixou de me orientar, acompanhar e proteger. Amo-te eternamente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter sempre iluminado meu caminho, ter me confortado nos momentos difíceis e ter me dado forças para superar as dificuldades;

Aos meus pais, por todos os ensinamentos que foram cruciais para meu crescimento pessoal e profissional;

À minha avó Geny, a luz da minha vida, por ter sido minha verdadeira mãe, a pessoa que sempre me acolheu, confortou e aconselhou;

À minha tia Norma, por cuidar de mim, da nossa família e da nossa casa com seu jeito “destrambelhado”, mas com muita competência;

Aos grandes amores da minha vida, minha madrastra Andiara e irmãs Yasmim e Jordana, que mesmo do lado norte da América, estavam presentes em meus dias, sendo minhas fontes de inspiração, determinação e força;

À Universidade Federal de Goiás e à Escola de Veterinária e Zootecnia, por terem sido minha casa por quase 11 anos, contribuindo para o meu crescimento profissional;

À Coordenação de Pós-Graduação em Ciência Animal da EVZ/UFG, por permitir o desenvolvimento de mais este trabalho;

Ao Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo, pela orientação, pelos valiosos ensinamentos, pela confiança e apoio durante os anos de convívio e, principalmente, pela amizade que eterniza nossos laços;

Aos meus co-orientadores, Prof^a. Dr^a. Maria Clorinda Soares Fioravanti e Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito, pelos esclarecimentos e conselhos nos momentos de dúvidas e pelo auxílio na execução deste projeto;

À minha grande amiga, Prof^a. Dr^a. Liliana Borges de Menezes, por sua amizade fiel e sincera, por seus ensinamentos e por seu “toque de anjo” em inúmeros momentos da minha vida;

Ao meu querido companheiro, Leandro Guimarães Franco, que esteve comigo durante o experimento auxiliando-me, ensinando-me, apoiando-me e compreendendo minha aflição e nervosismo com sua singular paciência e sensatez. Amo-te;

Aos meus anjos trabalhadores, Ana Carolina Brigolin Parize, Levy Correa Neto, Lorena Lima Barbosa Guimarães e Juliana Carvalho de Almeida Borges, sem os quais, indubitavelmente, eu não teria conseguido terminar o experimento;

Ao amigo-irmão, Danilo Rezende e Silva, pela ajuda no experimento, mas, principalmente, pela imensa preocupação e carinho, torcida para que tudo desse certo e por sempre “pegar no meu pé”;

À Mariana Moreira Andrascko e ao Prof. Dr. Marcelo Seixo de Brito e Silva, grandes cirurgiões e, principalmente, amigos, que realizaram com destreza e paciência as cirurgias nas ratas;

À Prof^a. Dr^a. Suzana da Costa Santos e ao Prof. Dr. Pedro Henrique Ferri que se prontificaram a me auxiliar e ensinar o preparo do extrato de pequi mesmo sem me conhecerem anteriormente;

À Prof^a. Dr^a. Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera, por salvar o experimento cedendo uma sala de pesquisa do Biotério Central da UFG, para que pudéssemos executar o tratamento dos animais;

Ao admirável Prof. Msc. Marcos de Almeida Souza por sua sabedoria, ensinamentos e pela inesquecível história: estagiária e orientador.

Aos meus alunos da Biomedicina e Enfermagem do Campus Jataí (UFG), pela paciência, cooperação e compreensão pelas minhas ausências e pelas reposições de aulas aos finais de semana;

À minha amiga maternal, Prof^a. Dr^a. Moema Pacheco Chediak Matos, pelos conselhos, preocupação e carinho de sempre;

À querida Prof^a. Dr^a. Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura, por quem tenho grande admiração e carinho, por sempre estar disposta a me ajudar;

Ao Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno, Prof^a. Dr^a. Ana Paula Iglesias Santin e Prof^a. Dr^a. Regiani Nascimento Gagno Porto, pela excelente convivência e carinho nesses anos vividos no Setor de Patologia Animal da EVZ/UFG;

Às minhas irmãs de coração, Mariela, Karla, Júlia e Sheila, por terem se tornado uma família inteira para mim. Obrigada por toda compreensão e apoio;

Às companheiras de doutorado e de atividades extra-classe, minha irmãzinha Yandra Lobato do Prado, Lívia Mendonça Pascoal, Sabrina Castilho Duarte, Vanessa Silvestre Ferreira de Oliveira e Leila Maria Leal Parente agradeço infinitamente a preocupação que tiveram comigo nas fases tortuosas

desses anos e pelas palavras de animo e entusiasmo que sempre me ofereceram;

Ao acadêmico de Medicina Veterinária, Guilherme Silveira Rocha, e a residente Juliana Aparecida Silva, pela ajuda prestada durante diferentes fases do experimento;

Aos grandes amigos do Campus Jataí/UFG, Prof. Dr. Alexandre Braoios, Prof^a. Dr^a. Karina Ludovico Perez, Prof. Dr. Igo Gomes Guimarães e Prof^a. Dr^a. Erin Caperuto, pela excelente convivência, pelas infinitas risadas, pelo forte abraço e ombro amigo nos momentos de dificuldades pessoais. Eles fizeram toda a diferença na nova fase da minha vida;

Aos técnicos, Antônio Souza da Silva e João Vilela Teixeira do Laboratório de Patologia Animal (EVZ/UFG), e ao Biomédico Wesley Francisco Neves do Laboratório de Patologia Clínica (HV/UFG), pela boa vontade em auxiliar quando preciso e pelos ensinamentos das análises laboratoriais;

Ao secretário da pós-graduação, Gerson Luiz Barros, por sempre ter me recebido com atenção e presteza;

À funcionária, Joselma Maria Ferreira de Souza, pela excelente convivência, carinho e pelo delicioso café;

Às ratinhas, por terem dado a vida pela ciência e terem “suportado” o amargo extrato da casca de pequi;

A CAPES e FAPEG, pela bolsa de doutorado e ao CNPq pelo financiamento do projeto;

Aos professores convidados, por aceitarem colaborar com a qualidade desta tese participando da banca de qualificação e defesa;

Aos meus animais de estimação, que mesmo com minha ausência, nunca deixaram de me receber com pulos e latidos de alegria;

A todos os amigos, colegas, familiares e professores que fazem parte da minha trajetória. Apesar dos nomes não estarem neste documento, possuem minha gratidão pelo importante papel que exerceram em algum momento da minha passagem por esta morada.

Meus sinceros agradecimentos.

“As pessoas que vencem neste mundo são as
que procuram as circunstâncias de que precisam
e, quando não as encontram, as criam.”
Bernard Shaw

“Que nossos esforços desafiem as
impossibilidades.”
Charles Chaplin

LISTA DE ABRAVIATURAS

AIF.....	fator indutor de apoptose
AMPA.....	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole
ATP.....	adenosina trifosfato
BHE.....	barreira hemato-encefálica
CA.....	cornio de Amon
Ca^{2+}	cálcio
Cl^-	cloreto
ERK.....	quinase regulada por sinal extracelular
ERNs.....	espécies reativas de nitrogênio
EROs.....	espécies reativas de oxigênio
GPx.....	glutationala redutase
GSH.....	glutationala reduzida
GSH-Px.....	glutationala-peroxidase
GSH-Rd.....	glutationala-redutase
H_2O	água
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
HGD.....	hilo do giro denteado
HO_2^-	hidroperoxila
I/R.....	isquemia e reperfusão
IL-1.....	interleucina-1
IL-1 β	interleucina 1 beta
JNK.....	quinase c-jun-NH ₂ -terminal
K^+	potássio
MAPK.....	quinase ativada por mitógeno
Na^+	sódio
NAD^+	nicotinamida-adeninadinucleotídeo
NMDA.....	N-metil-D-aspartato
nNOS.....	óxido nítrico sintetase de neurônios
O_2^-	ânion superóxido
O_2	oxigênio
OH^-	hidroxila
ON.....	óxido nítrico
ONOO $^-$	peroxinitrito
OX.....	xantina oxidase
PARP.....	Poli (ADP-ribose) polimerase
SNC.....	sistema nervoso central
SOD.....	superóxido dismutase
TGF- β	fator de crescimento transformante beta
TNF α	fator de necrose tumoral alfa
XD.....	enzima xantina desidrogenase

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1.1 Fisiopatogenia da isquemia e reperfusão cerebral	10
1.2 Estresse oxidativo após isquemia cerebral	14
1.3 Consequências da isquemia cerebral global transitória	18
1.3.1 Morte celular neuronal após isquemia.....	21
1.3.2 Participação das Map-quinases na lesão isquêmica	24
1.4 Mecanismos antioxidantes	26
1.4.1 Antioxidantes como agentes neuroprotetores	27
1.4.1 Casca de pequi (<i>Caryocar brasiliense</i>) e compostos fenólicos	27
REFERÊNCIAS.....	31
CAPÍTULO 2 – Extrato etanólico da casca de pequi (<i>Caryocar brasiliense</i>) apresenta ação neuroprotetora em ratos submetidos à isquemia e reperfusão...	39
RESUMO.....	39
ABSTRACT	39
INTRODUÇÃO	40
MATERIAL E MÉTODOS	41
Animais e delineamento experimental.....	41
Produção do extrato etanólico da casca de pequi.....	42
Procedimento cirúrgico e obtenção de amostras	43
Avaliação histológica.....	44
Imunoistoquímica	45
RESULTADOS	47
DISCUSSÃO	53
CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
CAPÍTULO 3 – Extrato etanólico da casca de pequi (<i>Caryocar brasiliense</i>) reduz ativação de p-ERK1/2 em cérebros de ratos submetidos à isquemia e reperfusão	63
RESUMO.....	63
ABSTRACT	63
INTRODUÇÃO	64
MATERIAL E MÉTODOS	65
Animais e delineamento experimental.....	65
Produção do extrato etanólico da casca de pequi.....	66
Procedimento cirúrgico e obtenção de amostras	67
Imunoistoquímica	68
RESULTADOS	70
DISCUSSÃO	77
CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS.....	80
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85

RESUMO

Os antioxidantes apresentam efeito benéfico sobre a função endotelial e neuroprotetora em humanos e animais, participando na prevenção e tratamento de doenças isquêmicas cerebrais. A utilização da vitamina E e de fenóis da casca do pequi (*Caryocar brasiliense*) são promissores na ação antioxidante nestas doenças. Dessa forma, este trabalho teve o objetivo de verificar o efeito da suplementação com extrato etanólico da casca de pequi (*C. brasiliense*) na disfunção cerebral em ratos após indução de isquemia global transitória e reperfusão. Para tal, foram utilizados 100 ratos distribuídos aleatoriamente em cinco grupos de 20 indivíduos, que receberam veículo oleoso (grupo controle), extrato etanólico da casca de pequi nas doses 100, 300 e 600 mg/kg de peso (grupos 2, 3 e 4) e 300mg/kg de vitamina E (grupo 5). Os ratos foram suplementados por 30 dias anteriores ao procedimento cirúrgico. Os 20 animais de cada grupo foram subdivididos em momentos (subgrupos) de isquemia de 5, 20 e 45 minutos por oclusão bilateral das artérias carótidas comuns e subgrupo sem isquemia, todos com reperfusão de duas horas. Foram colhidas amostras de cérebro para as análises histológica e imunoistoquímica, sendo utilizados os anticorpos anti-caspase-3 clivada, anti-fosfo-ERK1/2 e anti-fosfo-JNK. No grupo controle, as lesões histológicas, a expressão de caspase-3 clivada, de fosfo-ERK1/2 e de fosfo-JNK progrediram de acordo com o aumento do tempo isquemia. O extrato etanólico da casca de pequi, principalmente nas doses de 300 e 600mg/kg, reduziu o número de neurônios isquêmicos em cérebros de ratos submetidos à isquemia transitória global e reperfusão. Apesar de não haver diferença significativa entre os grupos, o extrato etanólico da casca de pequi reduziu a expressão de caspase-3 clivada e de fosfo-ERK1/2 em relação ao grupo controle e apresentou indícios de aumentar a expressão de fosfo-JNK entre os grupos. Os suplementos utilizados mostraram-se promissores para reduzir as lesões precoces de isquemia e reperfusão cerebral. Dessa forma, conclui-se que o extrato etanólico da casca de pequi possui ação neuroprotetora após lesão de isquemia global transitória e reperfusão em ratos.

Palavras-chaves: compostos fenólicos, estresse oxidativo, MAPK, neuroproteção, vitamina E.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Isquemia é a perda do suprimento sanguíneo por redução do fluxo arterial de um tecido, em que há comprometimento da oferta de substratos metabólicos, incluindo a glicose (COTRAN et al., 2000). Reperusão é o termo utilizado para definir o restabelecimento do fluxo após um período de isquemia (EVORA et al., 1996). O dano celular induzido após perfusão de um órgão isquêmico é denominado lesão de isquemia/reperusão (I/R).

Diversos mecanismos encontram-se envolvidos na fisiopatogênese da lesão secundária à isquemia e reperusão. O principal é a formação de espécies reativas do oxigênio (EROs), que podem causar lipoperoxidação da membrana celular, oxidação de proteínas culminando em sua coagulação e em fragmentação de DNA, disfunção mitocondrial, aumento do cálcio intracelular, ativação de células inflamatórias e produção de citocinas, podendo levar à morte celular. As EROs causam uma vasta quantidade de condições patológicas, incluindo lesões de I/R, doenças neurodegenerativas e envelhecimento (KUROSE et al., 1994; SILVA Jr. et al., 2002).

O entendimento dos mecanismos envolvidos nos danos da I/R é essencial para projetar estratégias terapêuticas e minimizar suas consequências. Após a reoxigenação, a produção de radicais de oxigênio implica em uma cascata de respostas celulares deletérias e precedendo a morte celular, inflamação e, por último, falência do órgão (FONDEVILA et al., 2003). Em condições fisiológicas, os efeitos tóxicos das EROs podem ser prevenidos por algumas enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalases, e também por outros antioxidantes não-enzimáticos. No entanto, quando a produção se torna excessiva, o estresse oxidativo pode ter um efeito deletério na função e integridade estrutural de tecidos biológicos (SILVA Jr. et al., 2002).

As lesões decorrentes de isquemia e reperusão têm sido demonstradas em estudos clínicos e experimentais em uma variedade de modelos, como intestino (FALEIROS et al., 1998), rins (NETTO et al., 2001; RHODEN et al., 2001), músculo esquelético (MORENO et al., 2002), fígado (SILVA Jr. et al., 2002; FONDEVILA et al., 2003) e cérebro (TARDINI &

YOSHIDA, 2003). Um dos modelos de isquemia/reperfusão cerebral estudado é a oclusão temporária das artérias carótidas comuns (KARPIAK et al., 1989).

1.1 Fisiopatogenia da isquemia e reperfusão cerebral

A lesão decorrente da isquemia cerebral permanente ou transitória desenvolve-se a partir de uma série de eventos fisiopatológicos que progridem com o tempo e em regiões cerebrais específicas. A redução do fluxo sanguíneo cerebral em 20% a 30% abaixo do normal é suficiente para iniciar esses eventos (OHTAKI et al., 2005). Além disso, as consequências da isquemia, em diferentes tecidos, dependem de sua duração e das lesões que se desenvolvem durante o estágio de reperfusão tecidual (SILVA Jr. et al., 2002).

A interrupção do fluxo sanguíneo, dependendo do tempo, da intensidade, da velocidade de instalação, da natureza do órgão e da temperatura a que o tecido está submetido, poderá determinar os mais variados graus de lesão celular. No período agudo, em poucos minutos a horas, ocorre depleção de oxigênio (O_2), de reservas energéticas de adenosina trifosfato (ATP) e de glicose, o que induz a célula a iniciar respiração do tipo anaeróbia e, assim, à produção de lactato, desenvolvimento de acidose e ativação de proteases intracelulares (LIMA, 2004).

De acordo com LIPTON (1999), COTRAN et al. (2000), TARDINI & YOSHIDA (2003) e OHTAKI et al. (2005), a falta de energia celular causa a falência da bomba de sódio-potássio (Na^+/K^+), o que resulta em despolarização da membrana plasmática de neurônios e de células da glia, rápida perda de potássio (K^+) e influxo acentuado sódio (Na^+), água (H_2O), cálcio (Ca^{2+}) e cloreto (Cl^-) intracelular, induzindo ao edema citotóxico (degeneração hidrópica). O cálcio citosólico aumenta para aproximadamente 3mM depois de 15 minutos de isquemia global (COTRAN et al., 2000; MURPHY et al., 2002).

Conforme COTRAN et al. (2000) e WHITE et al. (2000), o cálcio livre no citosol é mantido em concentrações baixíssimas em comparação aos níveis extracelulares (1/10.000). No interior da célula, a maior parte do cálcio está sequestrado nas mitocôndrias e retículo endoplasmático. Durante a isquemia,

inicialmente, ocorre o aumento da concentração citosólica de cálcio devido ao influxo através da membrana plasmática e por sua liberação das mitocôndrias e retículo endoplasmático.

Nesse período, concomitante ao aumento citosólico de Ca^{2+} , neurônios glutaminérgicos liberam glutamato, um aminoácido excitatório extracelular iniciador do processo de excitotoxicidade. Posteriormente, ocorre ativação de receptores ionotrópicos extracelulares excitatórios como N-metil-D-aspartato (NMDA) e α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole (AMPA), além de liberação dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes permitindo mais influxo de Ca^{2+} (OHTAKI et al., 2005; GILGUN-SHERKI et al., 2002; KUNZ et al. 2010). A excitotoxicidade pode ser o iniciador dos eventos moleculares que desencadeiam a apoptose ou a inflamação nas áreas de penumbra cerebral, ou seja, local onde a necrose não ocorre rapidamente (GILGUN-SHERKI et al., 2002; KUNZ et al., 2010). Este transtorno amplifica-se com o aumento de sua intensidade e o envolvimento de outros neurônios próximos (HARUKUNI et al., 2006).

A estimulação dos receptores NMDA pelo glutamato promove influxo acentuado de cálcio que se liga a calmodulina e ativa óxido nítrico sintetase de neurônios (nNOS), que converte L-arginina em óxido nítrico (ON) e L-citrulina. Nesta fase, o ON em excesso pode ser neurotóxico, devido à formação de peroxinitrito que causa grave lesão ao DNA. Essas alterações induzem a ação de enzimas como as Poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), que possuem papel-chave na reparação do DNA. PARP-1 é um membro da família PARP responsável por mais de 90% da atividade das proteínas PARPs em células normais. No sistema nervoso central, a excitotoxicidade ativa PARP-1 massivamente. A PARP-1, em resposta a agressões ao DNA, é muito ativada e usa nicotinamida-adeninadinucleotídeo (NAD^+) como substrato para gerar PARP. Acredita-se que um dos principais indutores da morte celular seja a depleção de energia intracelular pelo consumo de NAD^+ por PARP-1 (MERGENTHALER et al., 2004; KANG et al., 2010).

A elevação de Ca^{2+} , ainda, ativa uma série de enzimas, com efeitos potencialmente deletérios, tais como lipases, fosfolipases, proteases, ATPases e endonucleases. A ativação dessas enzimas altera a função celular, desestabiliza a estrutura da membrana plasmática e do citoesqueleto, aumenta a lipólise pelo

metabolismo de ácidos graxos livres, induz a produção de radicais superóxido durante a reperfusão e, por fim, levam a morte celular (Figura 1). Qualquer intervenção que atenuar o aumento de Ca^{2+} citosólico reduz a disfunção e morte celular (WHITE et al., 2000; GILGUN-SHERKI et al., 2002; OHTAKI et al., 2005).

Durante a reperfusão, após poucas horas da estimulação dos receptores NMDA e influxo de Ca^{2+} , ocorre a liberação de mediadores inflamatórios, como fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$), interleucina 1 beta ($\text{IL-1}\beta$) e óxido nítrico sintetase (NOS), os quais atraem e ativam células imunocompetentes, como microglia, astrócitos e leucócitos. As citocinas e NOS, direta ou indiretamente, levam a geração de EROs e à formação de grandes quantidades de radicais livres, como ON, ânion superóxido (O_2^-) peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxinitrito (ONOO^-) (OHTAKI et al., 2005).

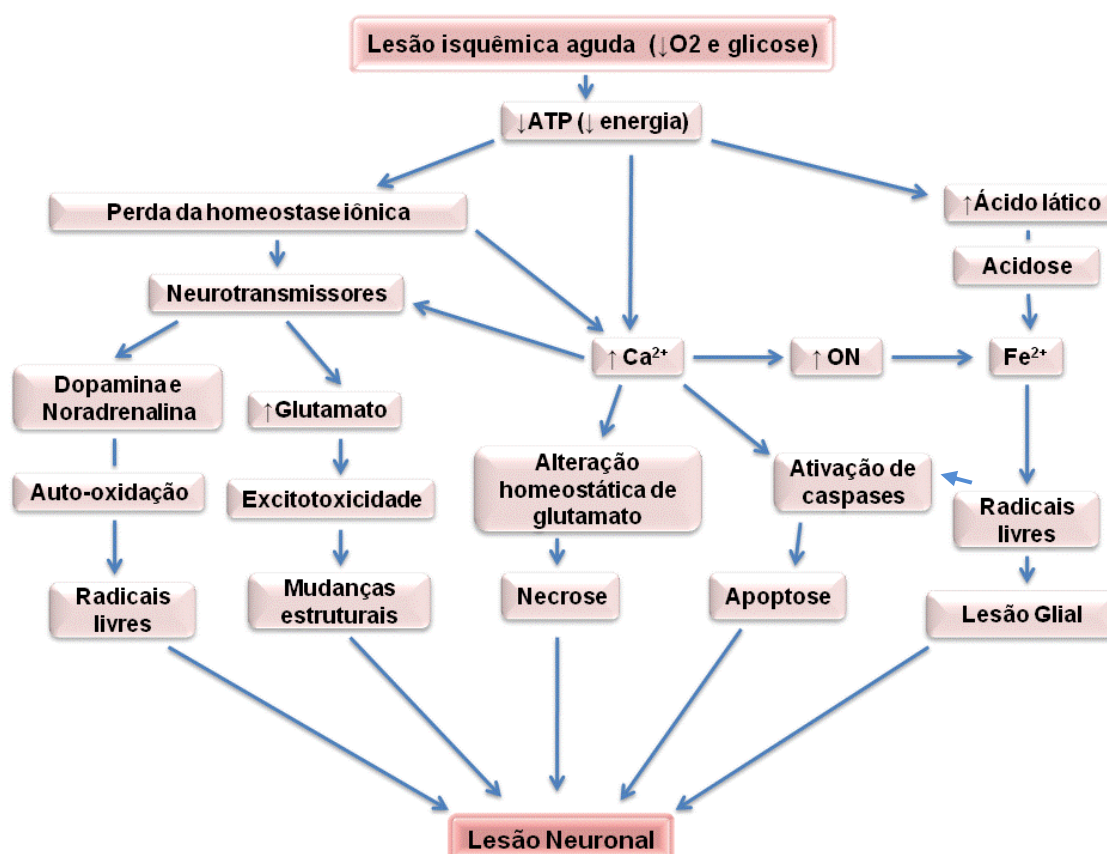


FIGURA 1- Mecanismos de lesão neuronal que podem estar envolvidos no processo de isquemia cerebral. ON: óxido nítrico

Fonte: Adaptado de GILGUN-SHERKI et al. (2002)

Com a despolarização da membrana mitocondrial há influxo maciço de cálcio nas mitocôndrias, lesionando-as de maneira permanente, levando à inibição das enzimas celulares, desnaturando proteínas e causando as alterações celulares típicas de necrose de coagulação ou ativando a apoptose (EVORA et al., 1996; COTRAN et al., 2000; PEREIRA, 2009). Além disso, o fluxo sanguíneo restaurado fornece oxigênio adicional, que pode exacerbar as reações bioquímicas presentes e formar ainda mais EROs (OHTAKI et al., 2005). A gravidade das lesões durante a reperfusão depende, principalmente, da velocidade de retorno do fluxo sanguíneo e do período em que o tecido permaneceu em isquemia (SILVA Jr. et al., 2002).

Outro componente que contribui para a lesão celular é a inflamação. Na zona de isquemia, receptores de adesão celular são ativados e neutrófilos migram através da parede dos vasos sanguíneos, invadem o parênquima e liberam mediadores inflamatórios citotóxicos, NOS e EROs (OHTAKI et al., 2005). Os mediadores inflamatórios mais importantes desses leucócitos são as enzimas lisossômicas, presentes em grânulos; os metabólitos ativos derivados do oxigênio; e produtos do metabolismo do ácido araquidônico, incluindo as prostaglandinas e leucotrienos. Esses produtos são potentes em promover a lesão endotelial e tecidual e amplificam os efeitos do estímulo inflamatório inicial (COTRAN et al., 2000). Além dos neutrófilos, microgliócitos e astrócitos ativados são importantes produtores de várias citocinas pró-inflamatórias e metabólitos tóxicos. Em contrapartida, os astrócitos produzem fatores neuroprotetores como eritropoetina, fator de crescimento transformante beta (TGF- β) e metalotionina (KUNZ et al., 2010).

A unidade neurovascular, que compõe a barreira hemato-encefálica (BHE), é constituída de células endoteliais, astrócitos e neurônios juntamente com a matriz extracelular. A integridade da BHE é baseada na interação entre os podócitos de astrócitos e as células endoteliais. No processo de isquemia e reperfusão, esta unidade pode ser comprometida, interferindo nas funções de proteção e permeabilidade seletiva da BHE. Esse resultado tem origem na ruptura da matriz extracelular após a degradação do colágeno tipo IV, laminina e fibronectina por ação de proteases (catepsinas, ativador de plasminogênio e metaloproteases). Assim, esse é um dos motivos da I/R permitir a migração de

leucócitos, aumentar o risco de hemorragias, edema pós-isquêmico e a extensão da lesão tecidual (MERGENTHALER et al., 2004; KUNZ et al., 2010). Portanto, a lesão cerebral isquêmica é multidimensional e oferece uma ampla gama de alvos para a intervenção neuroprotetora (OHTAKI et al., 2005).

1.2 Estresse oxidativo após isquemia cerebral

Os efeitos deletérios dos radicais livres têm sido estudados por mais de 50 anos. Essas moléculas podem causar danos celulares e teciduais graves quando produzidas em excesso ou quando as defesas antioxidantes inatas são suprimidas (ABRAHÃO, 2007). O termo radical livre define átomos ou moléculas altamente reativos que possuem em sua camada de valência mais externa um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja, apresentam um número ímpar de elétrons naquela órbita. A presença desse elétron não-pareado determina a forte tendência desses átomos e moléculas em realizarem reações de redução (ou ganho de elétrons), além de oxidação (ou perda de elétrons) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; CAMPOS & YOSHIDA, 2004).

Os radicais livres cujos elétrons encontram-se no átomo de oxigênio e nitrogênio são denominados, respectivamente, de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (ABRAHÃO, 2007). Vale salientar que alguns agentes reativos patogênicos não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada, por esse motivo, o termo radical livre não é totalmente adequado (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

As consequências da isquemia, em diferentes tecidos, dependem de sua duração e muitas lesões ocorrem durante a reperusão tecidual devido ao estresse oxidativo. O excesso de produção de substâncias reativas, como EROs, dificulta ou impede a neutralização por agentes antioxidantes endógenos, como glutatona e superóxido dismutase, resultando no estresse oxidativo (FERRARI et al., 1993; GILGUN-SHERKI et al., 2002; SILVA Jr. et al., 2002). Esse processo pode culminar na adaptação, por aumento da resposta antioxidante, no dano tecidual por agressão à fosfolipídios, carboidratos, aminoácidos, DNA ou na morte celular por necrose ou apoptose (KUNZ et al., 2010).

O cérebro é extremamente sensível ao estresse oxidativo devido a presença de grande quantidade de ácidos graxos insaturados, grande reserva de ferro, alta taxa de metabolismo de oxigênio e por apresentar sistema de defesa vulnerável e ineficiente contra EROs (TARDINI & YOSHIDA, 2003; CHONG et al., 2004). As principais lesões causadas por radicais livres são a desestruturação do citoesqueleto celular, peroxidação dos ácidos graxos das membranas celulares e alteração de bombas iônicas. Essas alterações acontecem por uma variedade de mecanismos, como: inativação de enzimas pela oxidação de grupos sulfidríla, alterações do DNA inibindo a síntese de ATP e o consumo das reservas de NAD^+ . Além disso, ocorre inativação direta do ON comprometendo o relaxamento vascular dependente do endotélio e formação de peroxinitrito, molécula altamente reativa, pela reação do ON com ânion superóxido e ativação de citocinas como a interleucina-1 (IL-1) (EVORA et al., 1996; CHONG et al., 2004; KARAMAN et al., 2006).

O metabolismo aeróbio nos seres vivos é realizado no interior da mitocôndria, onde o O_2 sofre redução tetravalente, recebendo quatro elétrons. Com a ação da enzima citocromo oxidase formam-se duas moléculas de H_2O , além de radicais livres superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroperoxila (HO_2^-), devido a reações de redução incompletas (CAMPOS & YOSHIDA, 2004). Em condições fisiológicas, existe um balanço homeostático entre a formação de reação de oxidação/EROs e a remoção desses componentes por antioxidantes endógenos (VICTOR et al., 2004).

O primeiro ponto de ataque da hipóxia é a respiração celular aeróbia. À medida que a tensão do O_2 dentro da célula reduz, há perda da fosforilação oxidativa e diminuição da geração de ATP, exercendo efeitos difusos sobre muitos sistemas intracelulares (COTRAN et al., 2000). A diminuição do aporte de O_2 para o tecido acometido leva à inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial e a queda da produção de adenosina trifosfato. O consumo do estoque de ATP continua e é degradado ADP e AMP e, posteriormente, à adenosina, inosina e hipoxantina (SILVA Jr. et al., 2002; TARDINI & YOSHIDA, 2003).

O acúmulo de cálcio no citosol provoca a ativação da protease calpaína, que promove a quebra de uma ponte peptídica da enzima xantina desidrogenase (XD), levando à formação da enzima xantina oxidase (OX). A OX

necessita de oxigênio para realizar a conversão de hipoxantina em xantina. Na fase de isquemia, portanto, ocorre acúmulo dessas duas substâncias. Com a reperfusão, a hipoxantina é oxidada em xantina e esta em ácido úrico, tendo como subproduto dessa reação a formação do ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila (Figura 2) (SILVA Jr. et al., 2002; WARNER et al., 2004).

Outra origem das EROs é a produção de radicais superóxidos pela quebra de elétrons do sistema de transporte de elétrons dentro da mitocôndria ou pela via da ciclooxygenase do metabolismo do ácido araquidônico (WHITE et al., 2000; KUNZ et al. 2010). Por esse último mecanismo, há a ativação de proteases e fosfolipases inespecíficas induzida pelo acúmulo de Ca^{2+} intracelular no período de reperfusão, que leva à síntese de mediadores pró-inflamatórios como o fator ativador plaquetário e os compostos eicosanóides (leucotrienos, tromboxanos e prostaglandinas) (Figura 3) (CAMPOS & YOSHIDA, 2004).

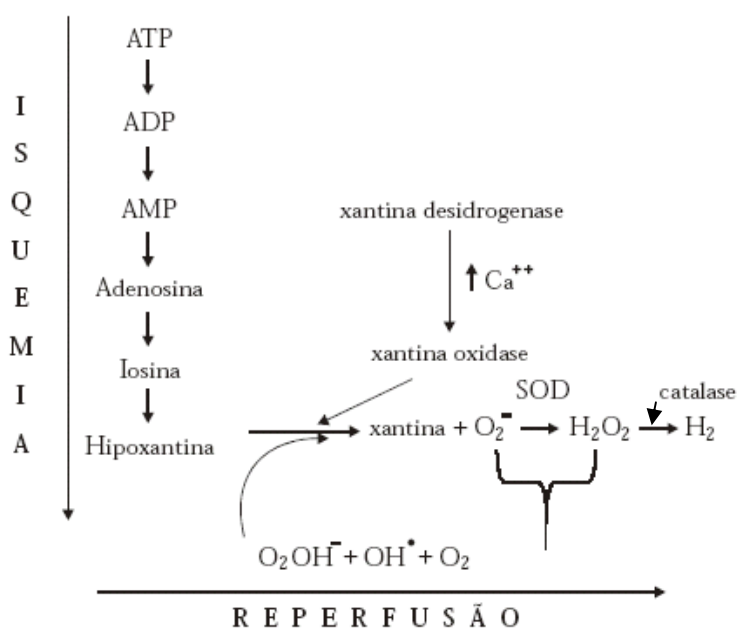


FIGURA 2 - Mecanismo proposto para geração de radicais livres de oxigênio após períodos de isquemia e reperfusão. SOD: superóxido dismutase.

Fonte: CAMPOS & YOSHIDA (2004)

Outro radical livre intimamente envolvido com a lesão de isquemia e reperfusão é o gás solúvel ON. Durante o processo de reperfusão, o ON reage

com o radical superóxido dando origem a um radical altamente reativo e citotóxico, o peroxinitrito (ONOO-) (CAMPOS & YOSHIDA, 2004; KUNZ et al., 2010).

Os radicais livres promovem um ciclo vicioso na mitocôndria, com a inibição de mecanismos de transporte de elétrons e despolarização da membrana, levando a produção excessiva de superóxido. Além disso, o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial leva a tumefação dessa organela e à liberação de moléculas pró-apoptóticas. O estresse oxidativo está intimamente relacionado à excitotoxicidade, perda de energia e desbalanço iônico, sendo todos esses eventos promotores de lesão tecidual neural (KUNZ et al., 2010). Portanto, estudos que focam o entendimento da ação de antioxidantes são de suma importância para estabelecer alvos terapêuticos contra a lesão de isquemia e reperfusão cerebral (GILGUN-SHERKI et al., 2002; MERGENTHALER et al., 2004).

Os radicais livres promovem um ciclo vicioso na mitocôndria, com a inibição de mecanismos de transporte de elétrons e despolarização da membrana, levando a produção excessiva de superóxido. Além disso, o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial leva a tumefação dessa organela e à liberação de moléculas pró-apoptóticas. O estresse oxidativo está intimamente relacionado à excitotoxicidade, perda de energia e desbalanço iônico, sendo todos esses eventos promotores de lesão tecidual neural (KUNZ et al., 2010). Portanto, estudos que buscam o entendimento da ação de antioxidantes são de suma importância para estabelecer alvos terapêuticos contra a lesão de isquemia e reperfusão cerebral (GILGUN-SHERKI et al., 2002; MERGENTHALER et al., 2004).

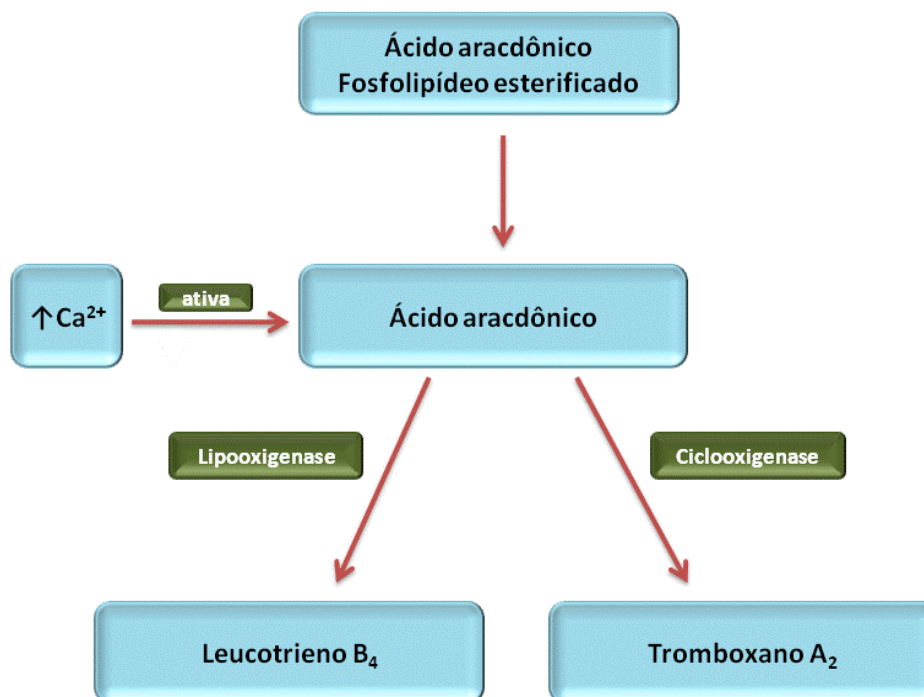


FIGURA 3- Formação de subprodutos de ácido aracdônico no período da reperfusão

Fonte: Adaptado de CAMPOS & YOSHIDA (2004)

1.3 Consequências da isquemia cerebral global transitória

Atualmente, as doenças vasculares cerebrais são a terceira causa de mortalidade no país, em média 49 óbitos em 100.000 habitantes, segundo dados do Ministério da Saúde, sendo ainda responsáveis por consideráveis índices de morbidade (BRASIL, 2005). Dentre estas, 85% a 90% ocorrem por mecanismo isquêmico, o que pode provocar graus variados de lesões no sistema nervoso central (SNC) com repercussões clínicas severas para os pacientes (DIAS et al., 2000; MUNIZ et al., 2004). Estes dados, por si, justificam a investigação da fisiopatologia dos mecanismos envolvidos na lesão neuronal isquêmica e de novos métodos terapêuticos para a prevenção e tratamento das doenças cerebrovasculares.

A isquemia cerebral é definida como a redução do fluxo sanguíneo cerebral a um limite crítico que provoca lesão em todo tecido cerebral (global) ou em uma região localizada (focal). A isquemia cerebral global ocorre comumente

em pacientes que apresentam uma variedade de condições clínicas como diminuição da luz carotídea, parada cardíaca, hipotensão, choque, asfixia e cirurgias cardíacas ou carotídeas complexas (HARUKUNI et al., 2006).

O processo de isquemia cerebral global resulta em um padrão histológico previsível, no qual populações específicas de neurônios são afetadas (necrose isquêmica seletiva) (HARUKUNI et al., 2006). Essa seleção acontece devido ao fenômeno conhecido como vulnerabilidade seletiva neuronal. Análises morfológicas indicam que os neurônios da região do hilo do giro denteado (HGD), neurônios piramidais do corno de Amon 1 (CA1) (Figura 4) e os das camadas 3 e 5 do córtex cerebral (Figura 5) são as células que apresentam maior vulnerabilidade seletiva. As alterações morfológicas de lesão isquêmica nessas células são mais evidentes após seis horas de perfusão. Porém, nos primeiros 15 minutos de perfusão observa-se microvacuolizações, que desaparecem quase totalmente após uma hora do retorno do fluxo sanguíneo (WHITE et al. 2000).

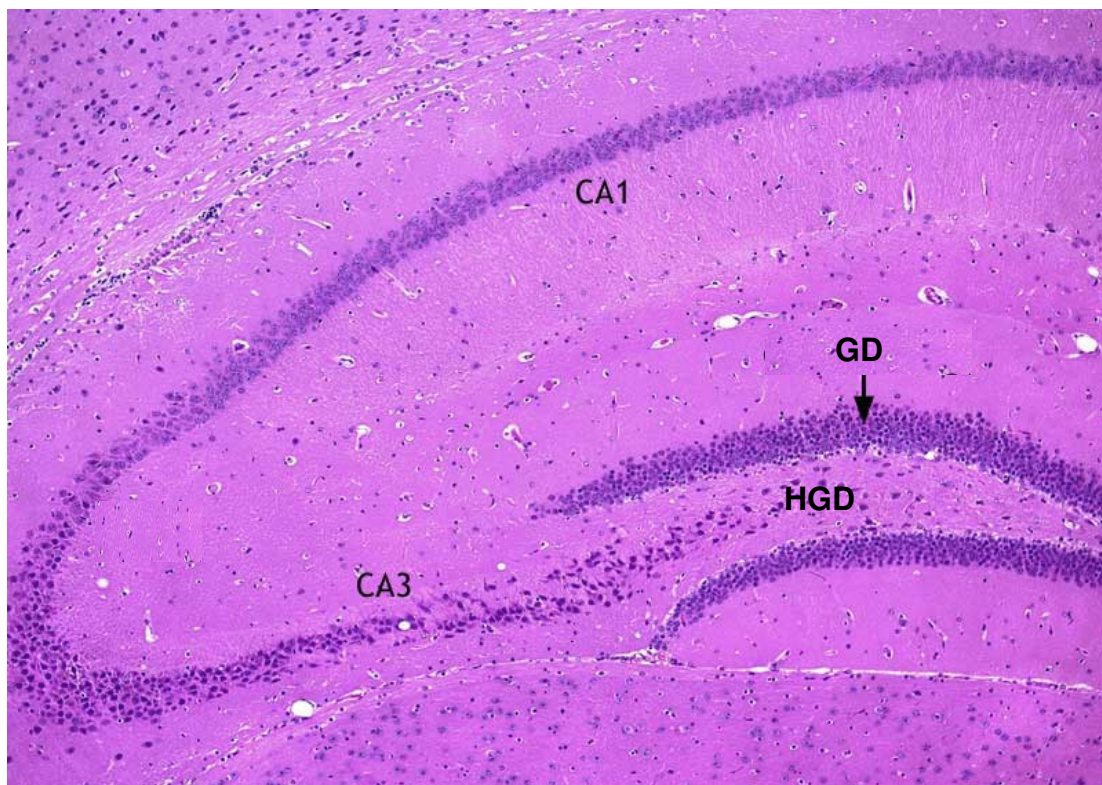


FIGURA 4- Fotomicrografia do Hipocampo. GD: Giro denteado formado por neurônios granulares; HGD: Hilo do giro denteado; CA1 e 3: Corno de Amon 1 e 3 formado por neurônios piramidais

Fonte: Adaptado de http://www.deltagen.com/target/histologyatlas/atlas_files/nervous/cerebrum_hippo_10x.htm

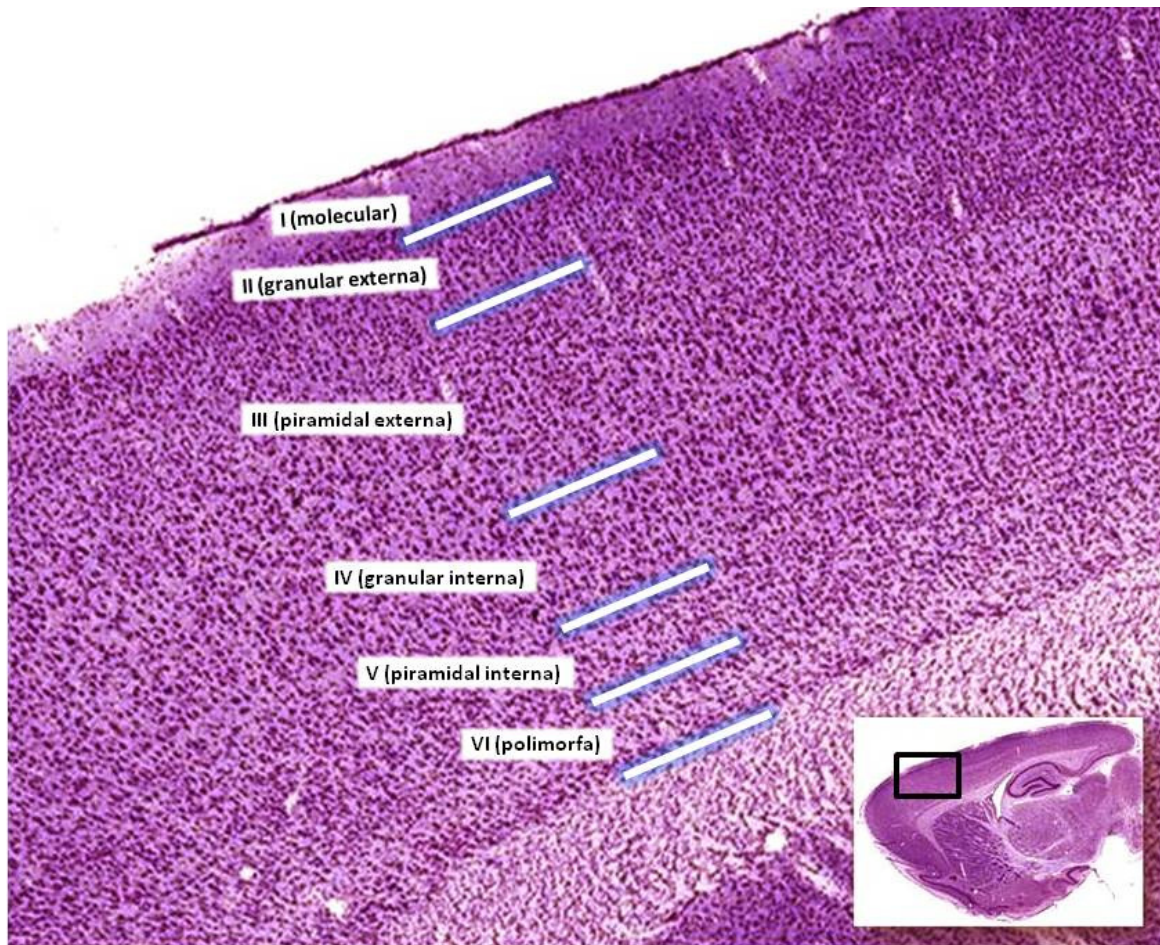


FIGURA 5: Fotomicrografia do córtex frontal de *Rattus norvegicus*, evidenciando a estratificação horizontal de neurônios corticais (seis camadas de Brodman)
 Fonte: Adaptado de: <http://brainmaps.org/HBP-JPG/107/n07c.jpg>

Em adição, a isquemia cerebral causa ruptura da barreira hematoencefálica, o que aumenta a infiltração de fluidos dos vasos para o tecido nervoso resultando em edema vasogênico. O edema cerebral subsequente pode afetar negativamente a perfusão, promovendo um efeito isquêmico tardio por aumento da pressão intracraniana e compressão vascular, além de causar herniação cerebelar (OHTAKI et al., 2005). Estudos quantitativos mostram que a hipoperfusão pós-isquêmica é de aproximadamente 70% em capilares do córtex cerebral que permanece por até 90 minutos após uma isquemia global de 10 a 20 minutos (WHITE et al., 2000). Embora a reperfusão retorne o fluxo sanguíneo cerebral, pode levar à lesão cerebral secundária devido ao influxo de neutrófilos e ao aumento de EROs, edema cerebral e hemorragia. Elevados níveis de EROs podem levar à alteração de proteínas intracelulares e lesão ao DNA por oxidação e por ativação de várias vias que levam à morte celular (HARUKUNI et al., 2006).

Enquanto a isquemia global em seres humanos é principalmente causada por parada cardíaca, poucos estudos em animais utilizam esse processo para provocar a isquemia cerebral global. O modelo que utiliza a oclusão de dois vasos produz isquemia global acentuada, quando se associa hipotensão sistêmica e oclusão de artérias carótidas comuns em ratos (COLBOURNE & AUER, 2010). Essa técnica tem como principais vantagens a facilidade de execução e o baixo índice de falha experimental. Além disso, promove indução de isquemia global direta e de alto grau e o procedimento cirúrgico acontece em um único tempo. Em adição, a abordagem cirúrgica extracranial elimina a invasão ao compartimento que contém líquido cerebrospinal, o dano cirúrgico ao tecido do sistema nervoso e a ruptura mecânica da barreira hematoencefálica (KARPIAK et al., 1989; PENASSO, 2005).

1.3.1 Morte celular neuronal após isquemia

A falha na remoção de aminoácidos excitatórios causa constante ativação de seus receptores, contínua despolarização neuronal e aumento de Ca^{2+} intracelular. Nas regiões isquêmicas, a excitotoxicidade e o exacerbado influxo de Ca^{2+} podem desencadear resposta inflamatória e morte celular, dependendo da intensidade da agressão. A morte celular por necrose isquêmica é observada principalmente em regiões criticamente afetadas e está associada à perda da homeostase de cálcio e glutamato. A indução de apoptose pela excitotoxicidade está associada a eventos isquêmicos moderados e graduativos e depende da ativação de uma sequência de genes (GILGUN-SHERKI et al., 2002; MERGENTHALER et al., 2004; BANO & NICOTERA, 2007). Estas duas formas de morte celular podem coexistir (DEVARAJAN, 2006)

A isquemia cerebral e o estado epilético culminam com o aparecimento de alterações neuronais microscópicas semelhantes, conhecidas por “neurônios isquêmicos” ou “degeneração de neurônios vermelhos” (Figura 6C). À microscopia, neurônios basofílicos podem ser artefatos induzidos pela remoção cerebral imediatamente após adequada fixação por perfusão ou quando a retirada do cérebro acontece tardiamente, mas a fixação por perfusão não é adequada. Por esse motivo, a avaliação em microscopia de luz deve ser cautelosa e, alguns

autores, sugerem que somente neurônios acidofílicos caracterizam a lesão neuronal irreversível (FUJIKAWA, 1996; FUJIKAWA et al., 2000).

Ultraestruturalmente, esses neurônios apresentam retração celular, picnose nuclear com cromatina irregular e condensada e tumefação de organelas citoplasmáticas, especialmente, mitocôndria e retículo endoplasmático. Essas evidências são características de necrose neuronal *in vivo* (FUJIKAWA et al., 2000; COLBOURNE & AUER, 2010).

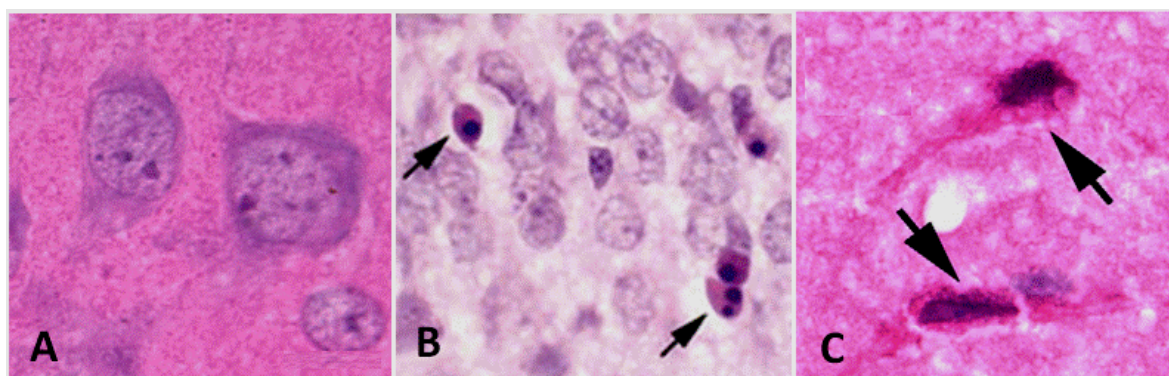


FIGURA 6 – Fotomicrografia de neurônios corticais de ratos. A – morfologia normal, neurônios apresentando núcleo e nucléolo arredondados e citoplasma bem delimitado. B – apoptose, neurônios com fragmentação do núcleo e formação de corpos apoptóticos (setas). C- necrose, neurônios com núcleo picnótico, citoplasma eosinofílico e contraído (setas)

Fonte: A e C- FUJIKAWA et al. (2010) e B- FUJIKAWA et al. (2000)

A apoptose é um processo ativo, ATP-dependente, caracterizado por condensação citoplasmática e nuclear, fragmentação nuclear e do DNA e formação de corpos apoptóticos, que serão facilmente eliminados por fagocitose (Figura 6B) (DEVARAJAN, 2006). Este tipo de morte celular pode ser desencadeado por diferentes vias, dentre elas a ativação direta de caspases, alterações mitocondriais com subsequente ativação de caspases ou por interferência com proteínas citosólicas reguladoras de apoptose (PEREIRA, 2009). Principalmente, em modelos animais, a morte neuronal após isquemia é mediada por ativação direta de caspases (LOVE, 2003).

As caspases são proteases que possuem cisteína em seu sítio ativo, clivam proteínas em sítios com resíduos de ácido aspártico, são constitutivamente expressas no cérebro e podem ser ativadas por estímulos intrínsecos e extrínsecos (KUNZ et al., 2010). Essas enzimas são produzidas como pró-

caspases e ativadas, principalmente, após clivagem proteolítica. As caspases são separadas em ativadoras (8, 9 e 10), que promovem a proteólise, e efetadoras (3, 6 e 7), as quais ativam outras proteases que degradam diferentes substratos da célula, inclusive o DNA (PEREIRA, 2009). A enzima executora mais importante no cérebro é a caspase-3, a qual é ativada precocemente após a isquemia, particularmente em regiões próximas ao infarto (KUNZ et al., 2010). Além dessa, as caspases 1, 8 e 9 estão envolvidas na isquemia cerebral (MERGENTHALER et al., 2004).

No processo de isquemia e reperfusão cerebral, a apoptose é induzida, principalmente, pela ativação de receptores da família TNF ou Fas (*First apoptosis signal*), os quais expõem uma proteína de domínio da morte (p. ex. FADD) que se liga à pró-caspase-8. Uma das vias subsequentes, é a clivagem de caspase-3 que ativa proteases que causam lesão ao DNA (p. ex. CAD) e morte celular. A caspase-8 também é capaz de clivar e ativar uma das proteínas da família Bcl-2, a Bid, que aumenta a permeabilidade mitocondrial e a liberação de citocromo c, iniciando a via mitocondrial de apoptose (Figura 7). A citocromo c é uma proteína que participa da cadeia respiratória mitocondrial, porém quando presente no citosol interage com proteínas ativadoras de proteases apoptóticas (p. ex. Apaf). Esta interação forma um apoptossomo que ativa a caspase-9, a qual cliva caspase-3 seguindo a apoptose (SUGAWARA et al., 2004; PEREIRA, 2009; KUNZ et al., 2010).

Tanto na apoptose dependente de caspases como na independente, os fatores sinalizadores podem ser liberados pela mitocôndria. Na primeira, proteínas da família Bcl e a ativação de caspases são necessárias para a execução da apoptose. Já apoptose independente de caspases, o mediador do processo é o fator indutor de apoptose (AIF). A liberação de AIF pela mitocôndria é induzida pela ativação de PARP-1, que é estimulada por diferentes mecanismos de sinalização celular ainda não é totalmente esclarecido (KANG et al., 2010).

Vale ressaltar que muitos estímulos que iniciam apoptose interpoem seus efeitos com a ativação ou inibição da cascata de ativação de proteínas da família quinase ativada por mitógeno (MAPK) (SANNA et al. 1998).

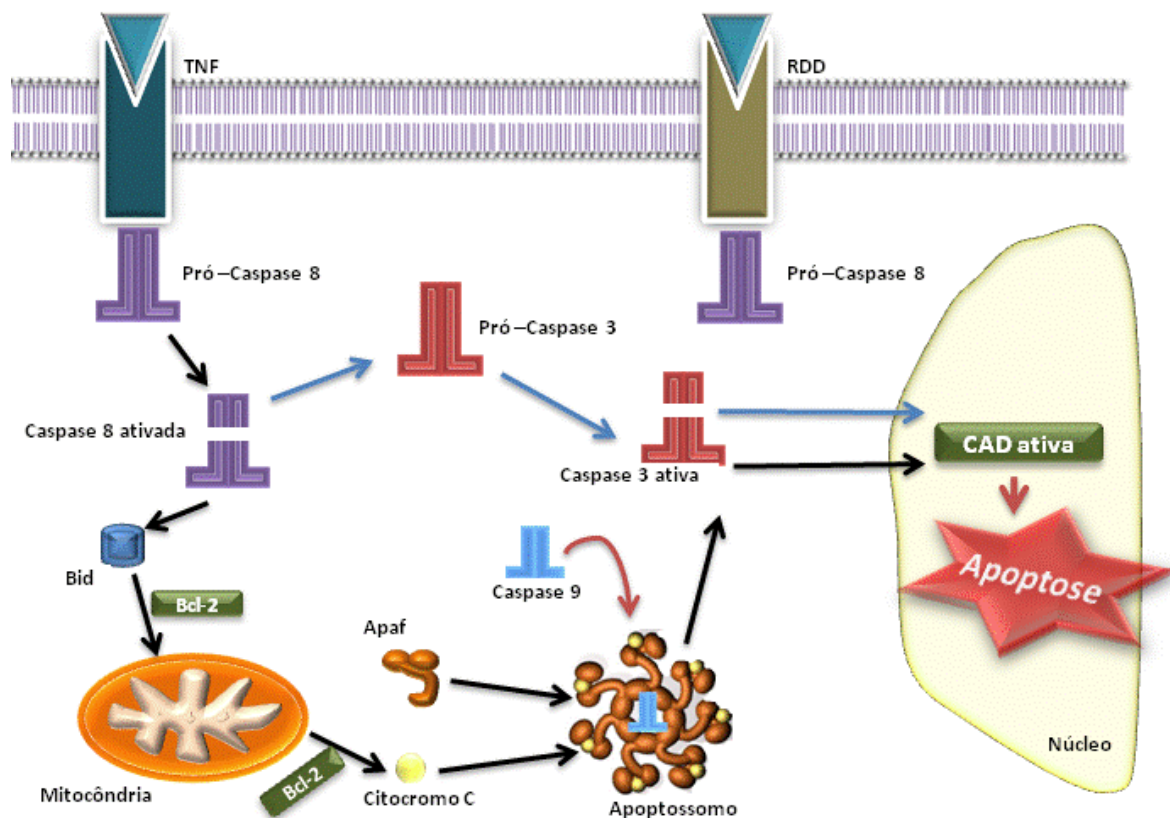


FIGURA 7- Principais vias de ativação de caspases na isquemia e reperfusão cerebral. Via de ativação direta de caspase 3 (seta azul) e via mitocondrial (seta preta). RDD: receptor com domínios de morte, Apaf: fator ativador de proteases apoptóticas
Fonte: Adaptado de SUGAWARA et al. (2004)

1.3.2 Participação das Map-quinases na lesão isquêmica

A isquemia cerebral desencadeia a ativação de diferentes vias intracelulares, dentre elas a das proteínas quinase ativadas por mitógeno (*mitogen activated protein kinases* - MAPK). Essas proteínas regulam os processos de diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (GARRINGTON & JOHNSON, 1999; LENNMYR et al., 2002) ou apoptose (PEREIRA, 2009). Os três maiores subgrupos de MAPKs são: quinase regulada por sinal extracelular (ERK), quinase c-jun-NH₂-terminal (JNK) e p38 (LENNMYR et al., 2002).

A ativação das proteínas quinases ocorre por fosforilação (MORRISON & DAVIS, 2003) em uma cascata de ativação sequencial, iniciada por MAPKKK seguida de ativação das MAPKK em resíduos de serina e treonina. As MAPKK, por sua vez, reconhecem e catalisam a fosforilação num motivo treonina-X-tirosina (Thr-X-Tyr) na alça de ativação das MAPK, onde X corresponde a

diferentes aminoácidos entre os sítios da dupla fosforilação (GARTNER et al., 1992; SLOW et al., 1997). A ativação de MAPK em resposta à isquemia cerebral ainda não está completamente entendida (LENNMYR et al., 2002).

A via de transdução de sinal da proteína quinase ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) é a mais bem descrita em células de mamíferos. Existem cinco tipos de ERK conhecidas: ERK1, ERK2, ERK3, ERK4 e ERK5 (SEGER & KREBS, 1995; CHENG et al., 1996). As ERK 1 e 2 caracterizam-se por apresentarem peso molecular de 44kD e 42kD, sendo referidas coletivamente como ERK1/2. Essas proteínas possuem vários substratos, entre eles a p90, MSK e o fator de crescimento ATF-1, importante na ativação de genes antioxidantes e anti-apoptóticos. No tecido nervoso, apresentam expressão constitutiva (CASILLAS et al., 1993, SUGAWARA et al., 2004, PEREIRA 2009).

A ERK 1/2 é ativada em resposta a fatores de crescimento, estresse oxidativo e influxo de cálcio intracelular (OTANI et al., 2002). Acredita-se que estejam envolvidas em vias de sinalização de sobrevivência celular após isquemia cerebral por inibir a ação de Bad, uma proteína pró-apoptótica da família Bcl-2 (SUGAWARA et al., 2004). Em contraste, alguns estudos recentes mostram que ERK pode estar envolvida em mecanismos de ativação de degeneração e morte celular. BHAT & ZHANG (1999) mostraram que a inativação de ERK1/2 diminui a morte celular *in vitro* de oligodendrócitos quando expostos a H₂O₂. Para SUBRAMANIAM & UNSICKER (2006), ERK1/2 é o indutor predominante de morte neuronal não-apoptótica.

JNK e p38 (ERK 3/4) são ativadas por estresse oxidativo, uma vez que o estímulo ativador inclui a inflamação aguda e a liberação de citocinas, toxicidade ao glutamato e hiperosmolaridade. Ambas as proteínas fosforiladas causam ativação de fatores de transcrição pró-apoptóticos que culminam com apoptose (Figura 8) (MAHERA & SCHUBERTB, 2000; LENNMYR et al., 2002; OTANI et al., 2002). No entanto, a participação de JNK na cascata de apoptose ainda é incerto, haja vista que a família JNK é codificada por três diferentes genes (JNK1, JNK2, JNK3), o que pode gerar isoformas com diferentes ações. Estudo realizado por SANNA et al. (1998), mostrou que JNK1 teve maior expressão em células que expressavam genes inibidores de apoptose quando comparada a

outras JNKs, conferindo a esta proteína o papel de proteção celular contra apoptose.

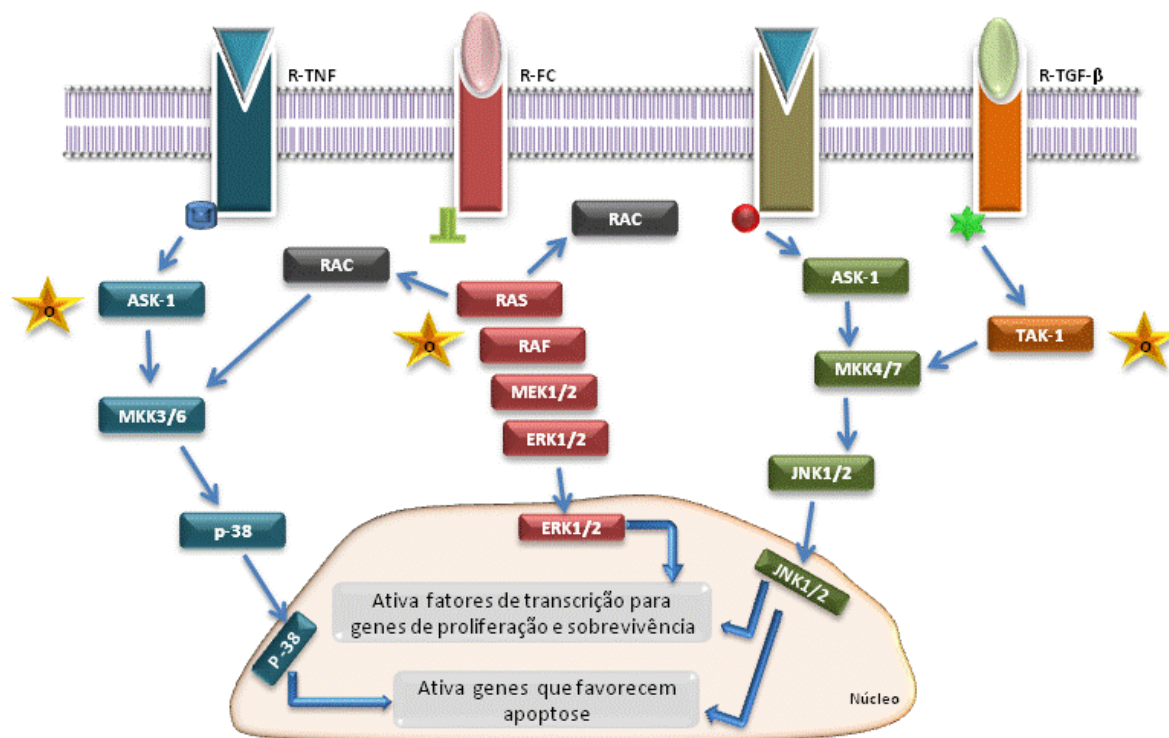


FIGURA 8 – Vias de ativação de MAPK no estresse oxidativo (estrela). R-TNF: Receptor de necrose tumoral; R-FC: Receptor de fator de crescimento; R-TGF- β : Receptor de fator de crescimento transformante β
 Fonte: Adaptado PEREIRA (2009)

1.4 Mecanismos antioxidantes

Em sistemas aeróbios, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Dentre os antioxidantes preventivos ou detoxificadores, que atuam antes do estabelecimento da lesão, temos a glutathiona reduzida (GSH), SOD, catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. Os antioxidantes reparadores, que reparam a lesão ocorrida, são: ácido ascórbico, glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px (CAMPOS & YOSHIDA, 2004). Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (EVORA et al. 1996; FERREIRA & MATSUBARA, 1997; TARDINI & YOSHIDA, 2003).

Além do sistema antioxidante enzimático, também são considerados antioxidantes todas as substâncias que doam ou recebem um elétron de um radical livre, inativando-o. São exemplos o ácido ascórbico (vitamina C), β -caroteno, ácido úrico, α -tocoferol (vitamina E), albumina, transferrina e manitol. Há ainda os que possuem efeito antioxidante indireto, como o alopurinol (inibidor da xantina oxidase), o selênio (presente na glutathione peroxidase), a deferoxamina (quelante do ferro), entre outros (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; CAMPOS & YOSHIDA, 2004).

1.4.1 Antioxidantes como agentes neuroprotetores

A lesão isquêmica cerebral é associada à alta morbidade e mortalidade, então estratégias para aumentar a capacidade protetora deste órgão tem implicações clínicas importantes (VIANNA, 2006). A neuroproteção é um dos meios que visa interromper ou reverter este processo de lesão (PERICO et al., 2005). O termo “neuroproteção” é definido como mecanismos homeostáticos no sistema nervoso central que protegem os neurônios da apoptose ou degeneração em consequência de lesão cerebral aguda ou em doenças neurodegenerativas crônicas (KIM, 2010).

É importante lembrar que os mecanismos de proteção podem ser esgotados quando a lesão celular é muito grave em intensidade ou extensão, por exemplo, nos casos em que o tempo de isquemia é maior do que aquela suportável pelo tecido, impedindo qualquer resposta adaptativa uma vez que até os mecanismos de sobrevivência já foram superados (LIMA, 2008).

Uma quantidade considerável de estudos em seres humanos e animais mostra os efeitos benéficos da ação dos antioxidantes na função endotelial e neuroprotetora, o que é particularmente importante na prevenção e tratamento de doenças isquêmicas e nas desordens neurodegenerativas progressivas (SATO & HALL, 1992; STVOLINSKY et al., 1999; HONG et al., 2001; ZHANG et al., 2004).

Agentes antioxidantes, assim como outros neuroprotetores, para apresentarem alta eficácia devem ser capazes de atravessar a BHE e devem ser oferecidos o mais rápido possível, em um intervalo de tempo que possam reduzir ou prevenir significativamente a lesão cerebral isquêmica, intervalo conhecido

como “janela de neuroproteção”. A janela terapêutica capaz de atenuar a área de infarto cerebral em ratos é de três a quatro horas, que corresponde ao período entre o evento vascular e a perda neuronal irreversível (GILGUN-SHERKI et al., 2002).

A vitamina E é um dos antioxidantes cuja função protetora ao endotélio e de isquemia cerebral é bem estabelecida (BIANCHI & ANTUNES, 1999; ZHANG et al., 2004). Em estudo realizado por ZHANG et al. (2004), ratos que sofreram oclusão da artéria cerebral média e foram tratados com vitamina E apresentaram área de infarto cerebral significativamente menor que não tratados. Em um estudo *in vitro*, os mesmos autores, observaram diminuição da agressão por ON e aumento da expressão de VEGF em cultura de células neuronais tratadas com vitamina E. Esses resultados sugerem que cérebros isquêmicos aumentam a permeabilidade de vitamina E através da BHE e que esta vitamina possui efeito neuroprotetor e diminui os efeitos do processo de isquemia. SATO & HALL (1992), em estudo da ação neuroprotetora das vitaminas E e C em modelo experimental de isquemia e reperfusão, por oclusão unilateral da artéria carótida de ratos e reperfusão de duas e 24 horas, observaram que a Vitamina E associada ao mesilato de tirizalade (molécula derivada de glicocorticóides) apresentava função neuroprotetora após 24 horas de reperfusão.

Outros agentes antioxidantes tem sido utilizados como agentes neuroprotetores. Em estudo realizado por STVOLINSKY et al. (1999), foi demonstrado que após 45 minutos de isquemia por oclusão das artérias carótidas comuns de ratos tratados com antioxidante carnosina, estes apresentaram níveis menores de lactato comparados aos animais controle. Este achado sugere a efetiva ação protetora deste antioxidante no metabolismo do cérebro e na sobrevivência dos animais. HONG et al. (2001) avaliaram experimentalmente o efeito protetor do chá verde em processos de isquemia e reperfusão de cérebro em ratos, por oclusão das artérias carótidas por cinco minutos. Estes autores verificaram ainda que animais tratados com o antioxidante apresentaram menor área de infarto, níveis menores de peróxido de hidrogênio e de lipoperoxidação e menor quantidade de células apoptóticas. Isto sugere que o chá verde pode ser um agente antioxidante eficiente na proteção de lesões de isquemia e reperfusão.

Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e

frequentemente encontrados são os compostos fenólicos, tais como os flavonóides. As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas à sua capacidade de inibir a lipoperoxidação por atuar contra a ação de radicais livres (BIANCHI & ANTUNES, 1999; MOURE et al., 2001).

1.4.2 Casca de pequi (*Caryocar brasiliense*) e compostos fenólicos

Os compostos polifenólicos das plantas são componentes da dieta que possuem uma ampla variedade de efeitos bioquímicos e farmacológicos, como, ação antioxidante, anti-inflamatória e atividades antiproliferativa (SIMONYI et al., 2005; LEOPOLDINI et al., 2011). Nas últimas décadas, os polifenóis tem recebido especial atenção após o estudo epidemiológico chamado de “Paradoxo Francês”, que revelou a baixa incidência de doença cardíaca coronariana na França, apesar da dieta rica em gorduras, em consequência do consumo regular de vinho tinto, que possui altos níveis de resveratrol (LANGE, 2007; LEOPOLDINI et al., 2011; QUIDEAU et al., 2011). Como o estresse oxidativo possui papel fundamental na lesão de isquemia e reperfusão cerebral, o uso de compostos fenólicos como agentes neuroprotetores constitui uma ferramenta para prevenção e/ou tratamento dessas doenças (SIMONYI et al., 2005; KIM, 2010).

O *Caryocar brasiliense*, conhecido popularmente por “pequi”, é um fruto típico do cerrado brasileiro conhecido por sua grande importância na culinária regional. Além disso, o óleo da polpa de pequi é amplamente usado na medicina popular como agente tônico contra asma, gripe, resfriado e doenças broncopulmonares (ROESLER et al., 2007).

Existem poucos estudos que elucidam a atividade biológica deste fruto e a viabilidade de seu uso na medicina. PASSOS et al. (2002) e PASSOS et al. (2003) verificaram em estudo *in vitro* a ação antifúngica da folha, da cera e de partes do fruto contra *Cryptococcus neoformans* e *Paracoccidioides brasiliensis*. PAULA-JUNIOR et al. (2006) observaram que o extrato hidroalcoólico da folha do pequizeiro inibiu a proliferação das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e outras bactérias gram positivas e negativas.

A poupa e o endocarpo constituem 25% da fruta e possuem em sua composição química, aproximadamente, 10% a 27% de lipídeos, 1% a 3% de proteínas, 11% de fibras e de 7% a 11% de carboidratos, além de conter diferentes componentes antioxidantes como carotenóides, vitamina C e compostos fenólicos (ROESLER et al., 2007; MIRANDA-VILELA et al., 2009). Estudos recentes mostram que o *C. brasiliense* possui alta concentração de fenóis, como flavonóide, quercetina e quercetina 3-O-arabinose e componentes ácidos, como ácido gálico e ácido quínico no fruto e na casca, principalmente, quando a extração é etanólica (KHOURI et al., 2007; ROESLER et al., 2007; MIRANDA-VILELA et al., 2009). Esses compostos são antioxidantes naturais que possuem capacidade de reduzir e/ou prevenir o estresse oxidativo presente em doenças crônicas e associadas à idade, como doenças cardiovasculares, carcinogênese e neurodegeneração (LEOPOLDINI et al., 2011; QUIDEAU et al., 2011).

1.5 Justificativa e objetivos gerais

Diante do exposto, há necessidade de ensaio experimental para avaliar a utilização do extrato etanólico da casca de pequi como alternativa viável e de baixo custo para a prevenção de doenças cerebrovasculares isquêmicas. Assim, a utilização deste extrato poderá constituir-se em alternativa viável de terapia antioxidante, com possíveis efeitos benéficos ao endotélio e neurônios, contribuindo para a saúde pública e a exploração econômica sustentável do cerrado.

Na literatura não existem informações sobre a ação neuroprotetora em lesões de isquemia e reperfusão do extrato bruto de diferentes partes de *Caryocar brasiliense*. Portanto, no presente estudo, propôs-se a descrever a ação do extrato etanólico da casca de pequi em diferentes doses em cérebros de ratos submetidos à isquemia global transitória e reperfusão por meio de avaliações microscópica e da expressão de caspase-3 clivada e das formas fosforiladas de ERK1/2 e JNK.

REFERÊNCIAS

1. ABRAHÃO, S. A. **Qualidade da bebida e atividade antioxidante do café *in vivo* e *in vitro***. 2007. 82p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras - UFLA.
2. BANO, D.; NICOTERA, P. Ca^{2+} signals and neuronal death in brain ischemia. **Stroke**, Dallas, v. 38, p. 674-676, 2007.
3. BHAT, N. R.; ZHANG, P. Hydrogen peroxide activation of multiple mitogen-activated protein kinases in an oligodendrocyte cell line: role of extracellular signal-regulated kinase in hydrogen peroxide-induced cell death. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 72, n. 1, p. 112-119, 1999.
4. BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
5. BRASIL. **Cadernos de informação de Saúde** [on line]. 2005. Ministério da Saúde, Datasus. Brasília. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/tabdata/cadernos/cadernosmap.htm>. Acesso em: 02 out. 2007.
6. CAMPOS, E. B. P.; YOSHIDA, W. B. O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. **Jornal Vascular Brasileiro**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 4, p. 357-366, 2004.
7. CASILLAS, A. M.; AMARAL, K.; CHEGINI-FARAHANI, S.; NEL, A. E. Okadaic acid activates p42 mitogen-activated protein kinase (MAP kinase; ERK 2) in B-lymphocyte but inhibits rather than augments cellular proliferation: contrast with phorbol 12-myristate 13-acetate. **The Biochemical Journal**, London, v. 290, p. 545-550, 1993.
8. CHENG, M.; BOULTON, T. G.; COBB, M. H. ERK3 is a constitutively nuclear protein kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 271, p. 8951-8958, 1996.
9. CHONG, Z. Z.; KANG, J. Q.; MAIESE, K. Essential cellular regulatory elements of oxidative stress in early and late phases of apoptosis in the central nervous system. **Antioxidants & Redox Signaling**, Columbus, v. 6, n. 2, p. 277-287, 2004.
10. COLBOURNE, F.; AUER, R. N. Transient global cerebral ischemia produces morphologically necrotic, not apoptotic neurons. In: FUJIKAWA, D. G. **Acute neuronal injury: The role of excitotoxic programmed cell death mechanisms**. Springer Science: North Hills, CA. 1ed., cap. 8, p.121-153, 2010.

11. COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: Patologia estrutural e funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000, 1251p.
12. DEVARAJAN, P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, Washington, v. 17, n. 6, p. 1503-1520, 2006.
13. DIAS, L. A. A.; COLLI, B. O.; NETTO, J. C.; LACHAT, J. J. Avaliação da isquemia cerebral focal induzida pela oclusão da artéria cerebral média e a ação neuroprotetora do cetoprofeno em ratos. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v. 58, n. 4, p. 1047-1054, 2000.
14. EVORA, P. R. B.; PEARSON, P. J.; SECCOMBE, J. F.; SCHAFF, H. V. Atualização: Lesão de isquemia e reperfusão. Aspectos fisiopatológicos e a importância da função endotelial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 4, n. 66, p. 239, 1996.
15. FALEIROS, R. R.; ALVES, G. E. S.; SILVA, R. F.; OLIVEIRA, V. P.; SILVA, G. J. Isquemia arteriovenosa completa como modelo de injúria de isquemia/reperfusão no cólon menor de equinos. **Anais... CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA 3**. Belo Horizonte. 20 a 25 de setembro de 1998.
16. FERRARI, R.; CECONI, C.; CURELLO, S.; ALFIERI, O.; VISIOLI, O. Myocardial damage during ischaemia and reperfusion. **European Heart Journal**, London, v. 14, p. 25-30, 1993.
17. FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Artigo de Revisão: Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-69, 1997.
18. FONDEVILA, C.; BUSUTTIL, R. W.; KUPIEC-WEGLINSKI, J. W. Hepatic ischemia/reperfusion injury: a fresh look. **Experimental and molecular pathology**, New York, v. 2, n. 74, p. 86-93, 2003.
19. FREITAS, F. A. S.; PICCIATO, C. E.; CAMPOS, A. D.; CERRI, J. Estudo da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos de ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v.17, suppl. 3, 2002.
20. FUJIKAWA, D. G. The temporal evolution of neuronal damage from pilocarpine-induced status epilepticus. **Brain Research**, Amsterdam, v. 725, p. 11-22, 1996.
21. FUJIKAWA, D. G.; SHINMEI, S. S.; CAI, B. Kainic acid-induced seizures produce necrotic, not apoptotic, neurons with internucleosomal DNA cleavage: implications for programmed cell death mechanisms. **Neuroscience**, Oxford, v. 98, p. 41-53, 2000.

22. FUJIKAWA, D. G.; ZHAO, S.; KED, X.; SHINMEIE, S. S.; ALLENA, S. G. Mild as well as severe insults produce necrotic, not apoptotic, cells: Evidence from 60-min seizures. **Neuroscience Letters**, Limerick, v. 469, p. 333–337, 2010.
23. GARRINGTON, T. P.; JOHNSON, G. L. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. **Current Opinion in Cell Biology**, Philadelphia, v. 11, n. 211-218, 1999.
24. GARTNER, A.; NASMYTH, K.; AMMERER, G. Signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires tyrosine and threonine phosphorylation of FUS3 and KSS1. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 6, p. 1280-1292, 1992.
25. GILGUN-SHERKI, Y.; ROSENBAUM, Z.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Antioxidant Therapy in Acute Central Nervous System Injury: Current State. **Pharmacological Reviews**, Bethesda, v. 54, n. 2, p. 271–284, 2002.
26. HARUKUNI, I.; BHARDWAJ, A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. **Neurologic Clinics**, Philadelphia, v. 24, p. 1- 21, 2006.
27. HONG, J. T.; RYU, S. R.; KIM, H. J.; LEE, J. K.; LEE, S. H.; YUN, Y. P.; LEE, B. M.; KIM, P. Y. Protective effect of green tea extract on ischemia/reperfusion-induced brain injury in Mongolian gerbils. **Brain Research**, Amsterdam, v. 888, p. 11–18, 2001.
28. KANG, H. C.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. Excitotoxic programmed cell death involves caspase-independent mechanisms. In: FUJIKAWA, D. G. **Acute neuronal injury: The role of excitotoxic programmed cell death mechanisms**. Springer Science: North Hills, CA. 1.ed., cap. 5, p. 79-89, 2010.
29. KARAMAN, A.; TURKMEN, E.; GURSUL, C.; TAS, E.; FADILLIOGLU, E. Prevention of renal ischemia/reperfusion-induced injury in rats by leflunomide. **International Journal of Urology**, Osaka, v. 13, p. 1434-1441, 2006.
30. KARPIAK, S. E.; TAGLIAVIA, A.; WAKADE, C. C. Animal models for the study of drugs in ischemic stroke. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 29, p. 403-414, 1989.
31. KIM, Y. C. Neuroprotective phenolics in medicinal plants. **Archives of Pharmacal Research**, Seoul, v. 33, n. 10, p. 1611-1632, 2010.
32. KHOURI, J.; RESCK, I. S.; POÇAS-FONSECA, M.; SOUSA, T. M. M.; PEREIRA, L. O.; OLIVEIRA, A. B. B.; GRISOLIA, C. K. Anticlastogenic potential and antioxidant effects of an aqueous extract of pulp from the pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb). **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 442-448, 2007.
33. KUNZ, A.; DIRNAGL, U.; MERGENTHALER, P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, Germany, v. 24, p. 495-509, 2010.

34. KUROSE, I.; WOLF, R.; GRISHAM, M. B.; GRANGER, D. N. Modulation of ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction by nitric oxide. **Circulation Research**, Baltimore, n. 74, p. 376-82, 1994.
35. LANGE, D. W. From red wine to polyphenols and back: A journey through the history of the French Paradox. **Thrombosis Research**, Norway, v. 119, p. 403-406, 2007.
36. LENNMYR, F.; KARLSSON, S.; GERWINS, P.; ATA, K. A.; TERÉNT, A. Activation of mitogen-activated protein kinases in experimental cerebral ischemia. **Acta Neurologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 106, p. 333–340, 2002.
37. LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. Review: The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**, Reading, v. 125, p. 288–306, 2011.
38. LIMA, L. V. S. **Associação da ciclosporina "A" ao pré-condicionamento isquêmico em rim de ratos submetidos à isquemia normotérmica e reperfusão**. 2004. 70f. (Doutorado em Clínica Cirúrgica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, São Paulo.
39. LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.)**. 2008. 182p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Ciência dos Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, USP – São Paulo.
40. LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 79, n. 4, p. 1431-1569, 1999.
41. MAHERA, P.; SCHUBERTB, D. Signaling by reactive oxygen species in the nervous system. **Cellular and Molecular Life Science**, Germany, v. 57, p. 1287–1305, 2000.
42. MERGENTHALER, P.; DIRNAGL, U.; MEISEL, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. **Metabolic Brain Disease**, Morgantown, v. 19, n. 3/4, 2004.
43. MIRANDA-VILELA, A. L.; GRISOLIA, C. K.; RESCK, I. S.; MENDONÇA, M. A. Characterization of the major nutritional components of *Caryocar brasiliense* fruit pulp by NMR spectroscopy. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2310-2313, 2009.
44. MORENO, J. B.; FRANCISCHETTI, I.; HAFNER, L. Lesões de isquemia-reperfusão em músculos esqueléticos: fisiopatologia e novas tendências de tratamento, com ênfase em reperfusão controlada. **Jornal Vascular Brasileiro**, São Paulo, v. 1, n. 2, p.113-20, 2002.

45. MORRISON, D. K.; DAVIS, R. J. Regulation of map kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 19, p. 91-118, 2003
46. MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NUNEZ, M. J.; PARAJO, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, Reading, v. 72, p. 145-171, 2001.
47. MUNIZ, L. R. F.; FARIA, M. H. G.; VASCONCELOS, P. R. L. Avaliação metabólica das lesões de isquemia e reperfusão cerebrais após oclusão bilateral das artérias carótidas comuns: estudo experimental em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 19, n. 5, p. 529-534, 2004.
48. MURPHY, E.; CROSS, H. R.; STEENBERGEN, C. Is Na/Ca exchange during ischemia and reperfusion beneficial or detrimental?. **Annals of the New York Academic Sciences**, New York, v. 976, p. 421-30, 2002
49. NETTO, J. M. B.; TUCCI Jr., S.; COLOGNA, A. J.; SUAID, H. J.; MARTINS, A. C. P.; MOLINA, C. A. F.; ROSELINO, J. E. S. Clorpromazina e função mitocondrial na isquemia-reperfusão renal. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 16, suppl. 1, p. 36-40, 2001.
50. OHTAKI, H.; DOHI, K.; NAKAMACHI, T.; YOFU, S.; ENDO, S.; KUDO, Y.; SHIODA, S. Evaluation of brain ischemia in mice. **Acta Histochemica et Cytochemica**, Kyoto, v. 38, n. 2, p. 99-106, 2005.
51. OTANI, N.; NAWASHIRO, H.; FUKUI, S.; NOMURA, N.; YANO, A.; MIYAZAWA, T.; SHIMA, K. Differential activation of mitogen-activated protein kinase pathways after traumatic brain injury in the rat hippocampus. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, Hagerstown, v. 22, p. 327-334, 2002.
52. PASSOS, X. S.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; FERNANDES, O. F. L.; PAULA, T. F.; GARCIA, A. C. F.; SILVA, M. R. R. Atividade Antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 6, p. 623-627, 2002.
53. PASSOS, X. S.; CASTRO, A. C. M.; PIRES, J. S.; GARCIA, A. C. F.; CAMPOS, F. C.; FERNANDES, O. F. L.; PAULA, J. R.; FERREIRA, H. D.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; SILVA, M. R. R. Composition and antifungal activity of the essential oils of *Caryocar brasiliensis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, n. 5, p. 319-324, 2003.
54. PAULA-JUNIOR, W.; ROCHA, F. H.; DONATTI, L.; FADEL-PICHETH, C. M. T.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* cambess leaves hydroethanolic extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 16, p. 625-630, 2006.

55. PEREIRA, F. E. L. Lesões celulares e do Interstício. Cicatrização. Regeneração. In: FILHO, B. **Bogliolo – Patologia Geral**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 82- 139, 2009.
56. PERICO, N.; CODREANU, I.; SCHIEPPATI, A. REMUZZI, G. The future of renoprotection. **Kidney International**, Brussels, n. 68, p. S95–S101, 2005.
57. QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSÉGU L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, Rostock, v. 50, p. 586 – 621, 2011.
58. RHODEN, E. L.; TELÖKEN, C.; SOUTO, C. A. V.; RHODEN, C. R.; LUCAS, M. L.; BELLÓ-KLEIN, A. Effects of L-arginine and L-NAME on renal ischemia-reperfusion in rats. **The International Brazilian Journal of Urology**, Rio de Janeiro, n. 27, p. 78-83, 2001.
59. ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L. C; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.
60. SANNA, M. G.; DUCKETT, C. S.; RICHTER, B. W. M.; THOMPSON, C. B.; ULEVITCH, R. J. Selective activation of JNK1 is necessary for the anti-apoptotic activity of hILP. **Biochemistry**, Washington, v. 95, p. 6015–6020, 1998.
61. SATO, P. H.; HALL, E. D. Tirilazad mesylate protects vitamins C and E in brain ischemia-reperfusion injury. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 58, n. 6, p. 2263-2268, 1992.
62. SEGER, R.; KREBS, E. G. The MAPK signaling cascade. **Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, Bethesda, v. 9, p. 726-735, 1995.
63. SILVA Jr, O. C.; CENTURION, S.; PACHECO, E. G.; BRISOTTI, J. L.; OLIVEIRA, A. F.; SASSO, K. D. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 17, suppl. c3, p.96-100, 2002.
64. SIMONYI, A.; WANG, Q.; MILLER, R. L.; YUSOF, M. SHELAT, P. B.; SUN, A. Y.; SUN, G. Y. Polyphenols in cerebral ischemia: novel targets for neuroprotection. **Molecular Neurobiology**, New York, v. 31, p. 135-147, 2005.
65. SIOW, Y. L.; KALMAR, G. B.; SANGHERA, J. S.; TAI, T.; OH, S. S.; PELECH, S. L. Identification of two essential phosphorylated threonine residues in the catalytic domain of Mekk1. Indirect activation by Pak3 and protein kinase C. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 272, p. 7586-7594, 1997.
66. STVOLINSKY, S. L.; KUKLEY, M. L.; DOBROTA, D.; MATEJOVICOVA, M.; TKAC, I.; BOLDYREV, A. A. Carnosine: An endogenous neuroprotector in the

- ischemic brain. **Cellular and Molecular Neurobiology**, Berlin, v. 19, n. 1, p. 45–56, 1999.
67. SUBRAMANIAM, S.; UNSICKER, K. Extracellular signal-regulated kinase as an inducer of non-apoptotic neuronal death. **Neuroscience**, Oxford, v. 138, p. 1055–1065, 2006.
 68. SUGAWARA, T.; FUJIMURA, M.; NOSHITA, N.; KIM, G. W.; SAITO, A.; HAYASHI, T.; NARASIMHAN, P.; MAIER, C. M.; CHAN, P. H. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. **The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, West Hartford, v. 1, p. 17–25, 2004.
 69. TARDINI, D. M. S.; YOSHIDA, W. B. Lesões cerebrais decorrentes de isquemia e reperfusão na cirurgia de endarterectomia de carótida. **Jornal Vascular Brasileiro**, Porto Alegre, v. 2, n. 2, p.119-28, 2003.
 70. VIANNA, P. T. G. Atualidade do pré-condicionamento e proteção renal. In: CAVALCANTE, I. L.; CANTINHO, F. A. F.; ASSAD, A. R. **Medicina Perioperatória**, Rio de Janeiro: Sociedade de Anestesiologia do Estado de São Paulo, p. 579-582, 2006.
 71. VICTOR, V. M.; ROCHA, M.; FUENTE, M. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 4, p. 327–347, 2004.
 72. WARNER, D. S.; SHENG, H.; BATINIC´-HABERLE, I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. **The Journal of Experimental Biology**, Switzerland, v. 207, p. 3221-3231, 2004.
 73. WHITE, B. C.; SULLIVAN, J. M.; DEGRACIA, D. J.; O'NEIL, B. J.; NEUMAR, R. W.; GROSSMAN, L. I.; RAFOLS, J. A.; KRAUSE, G. S. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v. 179, p. 1–33, 2000.
 74. ZHANG, B.; TANAKA, J.; YANG, L.; SAKANAKA, M.; HATA, R.; MAEDA, N.; MITSUDA, N. Protective effect of vitamin E against focal brain ischemia and neuronal death through induction of target genes of hypoxia-inducible factor-1. **Neuroscience**, Oxford, v. 126, n. 2, p. 433-440, 2004.

CAPÍTULO 2 – Extrato etanólico da casca de pequi (*Caryocar brasiliense*) apresenta ação neuroprotetora em ratos submetidos à isquemia e reperfusão

Pequi (*Caryocar brasiliense*) shell etanolic extract increase neuroprotection in rats subjected to ischemia and reperfusion

RESUMO

O estresse oxidativo gerado na isquemia e reperfusão (I/R) é responsável pela morte celular por necrose ou apoptose. A casca do pequi (*Caryocar brasiliense*), fruto do cerrado brasileiro, possui fenóis que apresentam efeito antioxidante *in vitro*. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito neuroprotetor do extrato etanólico da casca de pequi após I/R cerebral. Para tal, foram utilizados 100 ratos Wistar, divididos em cinco grupos que receberam veículo oleoso (G1), extrato etanólico da casca de pequi nas doses 100, 300 e 600mg/kg de peso (G2, 3 e 4) e 300mg/kg de vitamina E (G5). Foram estabelecidos tempos de isquemia de 5(I⁵), 20(I²⁰) e 45(I⁴⁵) minutos e sem isquemia (I⁰). Os animais foram suplementados por 30 dias e submetidos à isquemia após oclusão bilateral das artérias carótidas comuns e duas horas de reperfusão. Amostras de cérebro foram submetidas às avaliações histológica e imunoistoquímica, sendo utilizado anticorpo caspase-3 clivada no córtex frontal, parietal, occipital e hipocampo. As lesões histológicas progrediram de acordo com o tempo de isquemia. O extrato etanólico da casca de pequi nas doses de 300 e 600mg/kg reduziu neurônios isquêmicos em cérebros de ratos submetidos à I/R. Apesar de não haver diferença significativa entre os grupos, observou-se redução da expressão de caspase-3 clivada nas regiões analisadas dos grupos tratados com antioxidantes. O extrato de pequi é promissor na redução de lesões precoces de I/R cerebral.

Palavras-chave: Antioxidantes, apoptose, caspase-3, neurônios, neuroproteção.

ABSTRACT

Ischemia and reperfusion (I/R) injury generate oxidative stress associated to necrosis or apoptosis. The shell of pequi (*Caryocar brasiliense*), a fruit native to brazilian cerrado, has phenol compounds with *in vitro* antioxidant properties. Thus, the purpose of this study was to evaluate the neuroprotective effect of pequi shell etanolic extract after I/R cerebral injury. One hundred Wistar rats were divided into five groups that received oleous vehicle (G1), pequi shell etanolic extract treatment with 100, 300 e 600mg/kg (G2, 3 and 4), respectively and vitamin E treatment (G5). Ischemia time points were established at 5(I⁵), 20(I²⁰) and 45(I⁴⁵) minutes and no ischemia (I⁰). The rats were supplemented for 30 days and were submitted to bilateral occlusion of common carotid arteries and 2-hour reperfusion. Samples of brain were submitted to histological analysis and anti-caspase 3-cleaved immunohistochemistry in the frontal, parietal, occipital lobes and hippocampus. The histologic lesions increased with ischemic period. The 300 and 600mg/kg of pequi shell etanolic extract decrease ischemic neurons in brain of rats submitted to I/R injury. Although difference was not detected, decreased caspase 3-cleaved expression was observed in all cerebral regions of the treated groups. Pequi extract is potentially employable to reduce cerebral I/R early injury.

Keywords: antioxidants, apoptosis, caspase-3, neurones, neuroprotection.

INTRODUÇÃO

Segundo dados do Ministério da Saúde, as doenças vasculares cerebrais representam importantes causas de mortalidade no Brasil e são responsáveis por consideráveis índices de morbidade (BRASIL, 2005). Dentre estas doenças, 85% a 90% ocorrem por mecanismo isquêmico e determinam lesões cerebrais de graus variados (DIAS et al., 2000; MUNIZ et al., 2004). A isquemia, isoladamente, é bastante lesiva, mas a reperfusão do tecido isquêmico pode levar a uma série de complicações, que podem exacerbar as lesões teciduais (CALVERT et al., 2003). Dessa forma, a compreensão dos mecanismos envolvidos na isquemia e reperfusão (I/R) cerebral é essencial para definir estratégias terapêuticas e minimizar suas consequências (FONDEVILA et al., 2003).

A alteração neuronal no estresse oxidativo deve-se, principalmente, ao fenômeno de excitotoxicidade gerado pela liberação de altos níveis de glutamato, o que promove o incremento do desbalanço iônico neuronal. A perda dos mecanismos regulatórios e protetores da célula fazem com que o neurônio evolua para um processo de morte celular (BANO & NICOTERA, 2007).

Em agressões acentuadas e prolongadas, que culminam com redução abrupta de ATP celular, o tipo de morte celular mais comum é a necrose. Isso acontece devido à alta produção de ácido láctico e influxo de Ca^{2+} citoplasmático, que ativam proteases que degradam a célula (PEREIRA, 2009). Porém, em processos que permitem a célula produzir o mínimo de ATP, pode haver ativação de cascatas que envolvem proteínas indutoras de apoptose, como as caspases. Essas proteínas tornam-se ativadas após clivagem proteolítica, e ao final da cascata de ativação ocorre a quebra de caspase-3, executora de apoptose. Esta enzima é a mais importante no cérebro, sendo ativada precocemente após a isquemia, particularmente em regiões próximas ao infarto (KUNZ et al., 2010).

O hipocampo, principal sede da memória, é a região do cérebro mais utilizada para o estudo das alterações morfofisiológicas decorrentes da isquemia global transitória, pois suas células são altamente vulneráveis à ação de espécies reativas de oxigênio (SHI et al., 2007). A área do hipocampo considerada mais sensível à isquemia é o corno de Ammon 1 (CA1), e a área mais estudada na I/R

cerebral global (PAGNUSSAT, 2005). Adicionalmente, outras áreas são acometidas após isquemia prolongada, como, hilo do giro denteado, CA3, striatum, tálamo, neurônios piramidais das camadas 3 e 5 do córtex frontal (WHITE et al. 2000; COLBOURNE & AUER, 2010) e oligodendrócitos (PETITO et al., 1998). Porém, são escassas as avaliações de neuroproteção e de mecanismos fisiopatológicos da isquemia e reperfusão nestas regiões.

O número de casos e a importância clínica dos acidentes cerebrais isquêmicos incentivaram a realização de pesquisas para descobertas de métodos preventivos e terapêuticos eficazes para redução da morbi-mortalidade desse quadro. Estudos realizados tanto em animais quanto em seres humanos demonstraram que agentes antioxidantes, como a vitamina E, possuem importante efeito neuroprotetor (BIANCHI & ANTUNES, 1999; TAGAMI et al., 1998; ZHANG et al., 2004). Nos últimos anos, foi comprovado que o pequi (*Caryocar brasiliense*), fruto do cerrado que possui grande importância na culinária regional, possui alta concentração de fenóis (KHOURI et al., 2007; ROESLER et al., 2007), antioxidantes vegetais que possuem propriedades benéficas por inibirem a lipoperoxidação, atuando contra a ação de radicais livres (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

Na literatura não existem informações sobre a ação neuroprotetora do extrato de diferentes partes de *Caryocar brasiliense* em lesões de isquemia e reperfusão. Assim, objetivou-se avaliar a ação neuroprotetora do extrato etanólico da casca de pequi em cérebros de ratos submetidos à isquemia global transitória e reperfusão. O presente estudo demonstrou que a ação antioxidante do extrato etanólico da casca de pequi pode reduzir as lesões de isquemia e reperfusão em cérebros de ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido de acordo com os princípios éticos de pesquisa em animais, após avaliação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, protocolo 053/2009 (Anexo 1).

Animais e delineamento experimental

Foram utilizados 100 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, fêmeas, com peso corpóreo entre 250 e 300g, obtidos e mantidos no Biotério Central de Criação da Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás. Os animais foram alojados em gaiolas para ratos em polipropileno (41x34x16cm), forradas com maravalha e aclimatados por período de 15 dias anteriores ao início do experimento. As gaiolas foram mantidas em ambiente com umidade e circulação de ar apropriada, evitando situações de estresse e risco sanitário. Água e ração balanceada apropriada para a espécie foram oferecidas *ad libitum* e a temperatura da sala de experimentação mantida em 22 °C.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos de 20 animais, de acordo com o tipo e a dose de antioxidante suplementado, a saber:

- Grupo 1 (G1) (Controle) – Veículo oleoso;
- Grupo 2 (G2) – Suplementação de 100mg/kg/PV de extrato etanólico da casca de pequi (*C. brasiliense*) diluído em veículo oleoso;
- Grupo 3 (G3) – Suplementação de 300mg/kg/PV de extrato etanólico da casca de pequi (*C. brasiliense*) diluído em veículo oleoso;
- Grupo 4 (G4) – Suplementação de 600mg/kg/PV de extrato etanólico da casca de pequi (*C. brasiliense*) diluído em veículo oleoso;
- Grupo 5 (G5) (controle positivo) – Suplementação de 300mg/kg/PV de vitamina E (TAGAMI et al., 1998) diluído em veículo oleoso.

Cada grupo foi subdividido em quatro momentos (subgrupos) de cinco animais, de acordo com os tempos de isquemia de cinco minutos (I^5), 20 minutos (I^{20}) e 45 minutos (I^{45}) e sem isquemia (I^0). Nesse subgrupo, as artérias foram expostas, mas não ocluídas. Os animais foram pesados para o cálculo da dose do suplemento. Este foi administrado por gavagem, diariamente, durante 30 dias consecutivos, antes da intervenção cirúrgica.

Produção do extrato etanólico da casca de pequi

O extrato da casca de pequi foi obtido de acordo com a técnica descrita por PASSOS et al. (2002) e LIMA (2008). Os frutos foram obtidos de propriedades

localizadas no Estado de Goiás no período de novembro de 2008. A casca e o mesocarpo externo foram separados manualmente do mesocarpo interno (polpa), picados e levados à estufa com ventilação forçada (60°C), por 72 horas. Após a secagem, o conteúdo foi triturado em moinho analítico, padronizado em granulometria de 60 mesh (0,25mm) e armazenado a -20°C.

No Laboratório da Faculdade de Química da UFG foi obtido o extrato etanólico a partir da adição de 1000g do farelo da casca de pequi a 1000 ml de etanol a 95%. Após a percolação a frio em etanol ao abrigo da luz e sob agitação, o sobrenadante foi filtrado e o solvente evaporado à pressão reduzida. Este procedimento conduziu ao extrato bruto etanólico da casca, que foi liofilizado e armazenado a -4°C. O extrato liofilizado foi diluído em veículo oleoso de acordo com as doses propostas para os diferentes grupos.

O veículo oleoso e a vitamina E foram produzidos pela Pharmacia de Manipulação Therapeutica. O veículo era composto de 0,2% de ácido cítrico, 0,5% de BHT, 1% de tween 80, 2% de óleo de gergelim, 0,1g de nipagin, sacarose qsp e água qsp. O mesmo veículo continha 60mg de vitamina E para tratamento do G5.

Procedimento cirúrgico e obtenção de amostras

A técnica para a indução de isquemia foi adaptada de DIAS et al. (2000) e STVOLINSKY et al. (2000), sendo os procedimentos realizados no Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG.

Após 30 dias do início do consumo das dietas, os animais foram submetidos à cirurgia para a oclusão das artérias carótidas comuns (MUNIZ et al., 2004). Os animais foram anestesiados com uma associação de 8mg/kg de cloridrato de xilazina (Calmun[®], Agener União, São Paulo/SP) e 75mg/kg de cloridrato de cetamina (Ketamina[®], Agener União, São Paulo/SP), por via intraperitoneal, para garantir hipotensão (FLECKNELL et al., 2007). As ratas foram mantidas aquecidas a 37-38°C e sob oxigenoterapia durante o procedimento.

O procedimento cirúrgico iniciou-se por incisão longitudinal mediana da pele na região cervical ventral com individualização e reparo bilateral das artérias

carótidas comuns (ACCs), cranialmente à sua bifurcação em artérias carótidas externa (ACE) e interna (ACI) (ponto de oclusão). Procedeu-se a oclusão bilateral e concomitante das ACCs, utilizando fio de náilon 4-0 com um tubo plástico a fim de interromper o fluxo sanguíneo para o encéfalo. Uma checagem visual foi realizada para assegurar que o fluxo sanguíneo foi interrompido. Para os animais do tempo 0 (I^0), a cirurgia foi realizada sem oclusão das artérias carótidas. Independente do tempo de isquemia (cinco, 20 ou 45 minutos), após duas horas de reperfusão, realizou-se anestesia prévia ao deslocamento cervical para eutanásia, e posterior retirada dos encéfalos.

Imediatamente após a eutanásia, amostras do hemisfério esquerdo do encéfalo foram colhidas para análise histológica e imunoistoquímica. As amostras foram fixadas em formalina tamponada a 10%, por 24 horas, e conservadas em etanol a 70%. As amostras foram clivadas em sentido sagital e passaram por desidratação em concentrações crescentes de etanol, diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina e, então, foram feitos cortes de 5 μ m de espessura. Para a realização da imunoistoquímica, os cortes foram aderidos em lâminas silanizadas.

Avaliação histológica

Os cortes foram desparafinados, reidratados e corados com hematoxilina e eosina (HE), de acordo com LUNA (1968). As lâminas foram analisadas às cegas, por um observador, em microscópio óptico de campo claro. Foi realizada uma análise descritiva das regiões do córtex frontal, parietal, occipital e hipocampo (corno de Amon 1 e 3), em aumento de 200X e confirmação em 400X, verificando a possível presença de edema (vacuolização de neurópilo), malácia, infiltrado inflamatório, neurônios isquêmicos e vacuolizados, lesão endotelial, congestão e aumento do espaço perivascular.

A contagem de neurônios com alterações isquêmicas foi realizada em 5 campos aleatórios de cada região, sem sobreposição, em aumento de 400X, de acordo com critérios de FUJIKAWA et al. (2000), CONROY et al. (2001) e PENASSO (2005). Foi calculada a média dos campos por animal e a média por grupo de cada região. Somente foram contados neurônios que apresentavam-se

morfologicamente em formato piramidal e espaço perineuronal aumentado, com citoplasma acidofílico, retraído e com perda de definição da substância de Nissl, núcleo contraído ou picnótico com ausência de nucléolo, achados característicos de necrose neuronal isquêmica (FUJIKAWA, 1996; FUJIKAWA et al., 2000; CONROY et al., 2001).

Para análise estatística, após teste de normalidade, foram aplicados teste de Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney, de acordo com SAMPAIO (2007). Considerou-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A análise estatística foi realizada com o software XLSTAT 2011.

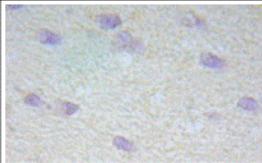
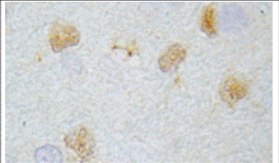
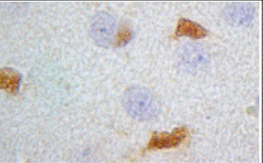
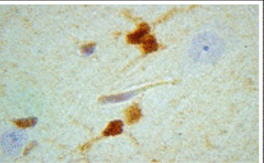
Imunoistoquímica

Cortes histológicos de 5µm de cérebro foram submetidos à imunoistoquímica para avaliação da expressão de anti-caspase-3 clivada. Após desparafinização e desidratação, os cortes foram incubados por 20 minutos em 30ml de peróxido de hidrogênio em 70ml de metanol e 200µl de Triton-X para bloqueio de peroxidase endógena. Para a recuperação antigênica foi empregada a solução de citrato de sódio (pH 6,0) em panela de pressão durante três minutos. Para o bloqueio de reações inespecíficas, os cortes foram incubados por uma hora e meia à temperatura ambiente, com soro albumina bovina (BSA) diluído a 3% em solução tampão de fosfatos (PBS). Em seguida, os tecidos foram incubados durante 18 horas (*overnight*), em câmara úmida e a 4°C, com anti-caspase-3 clivada (D175 – catálogo #9661, *Cell Signaling Technology*, Beverly, MA, USA), na diluição de 1:500, em BSA 1,5%. Para amplificação das reações, os cortes foram lavados e incubados, à temperatura ambiente, em anticorpo secundário e complexo streptoavidina biotina (Universal LSAB™+ kit/HRP, rabbit/mouse/goat, Dako, Califórnia, USA). A reação foi revelada com solução de diaminobenzidina-peroxidase (*Liquid DAB Substrate Chromogen System*®, Dako, Califórnia, USA) por um minuto. Solução tampão de PBS (pH 7,4) foi utilizada para as lavagens entre as etapas. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Mayer, por 30 segundos, e montadas com Entellan (Merck, São Paulo, SP). O controle negativo foi realizado para identificar coloração inespecífica, instilando apenas BSA a 1,5% no momento correspondente ao anticorpo primário.

As lâminas foram analisadas em microscopia de luz e a marcação mensurada por avaliação quantitativa, realizando-se a contagem de neurônios imunoreativos para caspase-3 clivada em aumento de 400X, conforme critérios de QI et al. (2004). Para a contagem foram escolhidos, aleatoriamente e sem sobreposição, 10 campos das regiões de córtex frontal, parietal/occipital e no hipocampo, analisaram-se, aleatoriamente, as regiões CA1 e CA3. Todos os neurônios marcados em cada campo foram contados e o número médio de células por campo foi calculado, sendo obtidos a média e desvio padrão ($\pm$ DP) das células marcadas por área por grupo.

Ainda, as células gliais marcadas foram avaliadas, de forma semiquantitativa, quanto à intensidade de coloração, atribuindo os seguintes escores de tonalidade de coloração: 0= ausente, 1= discreta, 2= moderada e 3= acentuada (Quadro 1), adaptado de FUJIKAWA et al. (2000).

QUADRO 1 – Escores aplicados na análise da intensidade de marcação do anticorpo anti-caspase-3 clivada em células gliais de cérebros de ratos submetidos à isquemia e reperfusão

Escore				
	0 (Ausência de marcação)	1 (Marcação discreta)	2 (Marcação moderada)	3 (Marcação acentuada)
Tonalidade de marcação				

Para análise estatística, como as variáveis não apresentaram normalidade, foi aplicado teste de Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney para verificar diferença entre dois grupos. Considerou-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A análise estatística foi realizada com o software XLSTAT 2011.

RESULTADOS

Avaliação histológica

Não foram observadas alterações relacionadas ao processo de isquemia nos encéfalos dos animais do subgrupo falso operado (I^0 - Sham). Neste

grupo foram encontrados neurônios apresentando citoplasma eosinofílico e retraído, porém raras células apresentaram o núcleo picnótico e ausência de nucléolo. Não foram observados malácia e infiltrado inflamatório nos encéfalos de ratos de nenhum grupo. Nos tempos I⁵, I²⁰ e I⁴⁵ não houve diferença entre os grupos, observando-se vacuolização de neurópilo (*status spongiosus*) na substância branca e na região cortical, além de congestão e aumento do espaço perivascular (espaço de Virchow-Robin). Além disso, observaram-se raros focos de hemorragia e microvacúolos perineuronais, células endoteliais picnóticas e discreta satellitose.

Em todos os grupos e tempos de isquemia, a alteração morfológica comumente encontrada foi acidofilia neuronal associada ou não à retração e aumento da basofilia nuclear neuronal (neurônios isquêmicos). Estas células localizavam-se principalmente na região cortical frontal da maioria dos animais de todos os grupos. Na Tabela 1 encontra-se a contagem de neurônios isquêmicos, por região cerebral analisada, considerando os diferentes tempos de isquemia e os diferentes grupos tratados.

Não houve diferença significativa entre os grupos nos tempos I⁰, I⁵, I²⁰ no córtex frontal. Já em I⁴⁵ houve diminuição significativa de células isquêmicas em G3 e G4 quando comparados a G1, G2 e G5 (Figura 1A e 1B). Porém, não houve diferença estatística entre G2 e G3. Este achado mostra que extrato etanólico da casca de pequi na dose de 600mg/kg/PV reduz a lesão neuronal isquêmica na região frontal em comparação ao grupo não tratado e ao grupo suplementado com vitamina E.

Nas regiões do córtex parietal, occipital e hipocampo não houve diferença significativa entre os grupos em quase todos os momentos de isquemia. No hipocampo, somente G2 apresentou diferença estatística entre os tempos de isquemia e I⁰. Nesta região, em todos os tempos de isquemia dos grupos tratados com extrato etanólico da casca de pequi há indícios de maior quantidade de neurônios isquêmicos na região do CA1 e CA3 (região do hipocampo), quando comparados a G1 e G5 (Figura 1C e 1D).

Tabela 1 - Valores médios, desvio-padrão (s) e avaliação estatística da contagem de neurônios isquêmicos em cérebros de ratos submetidos à isquemia e reperfusão, Goiânia, 2010.

Área cerebral	Grupos	Tempo de isquemia (minutos)			
		I ⁰	I ⁵	I ²⁰	I ⁴⁵
Frontal	G1	0,4±0,3^A	3,2±0,6^B	6,0±2,3^C	5,6±2,6^{aC}
	G2	0,6±0,6^A	3,2±2,7^B	3,5±1,2^B	5,4±2,5^{acB}
	G3	1,5±1,6	2,3±1,8	2,9±1,7	2,4±1,4^{bc}
	G4	0,1±0,2^A	3,6±0,9^B	3,5±1,6^B	1,4±0,8^{bc}
	G5	0,6±0,8^A	1,2±0,7^A	2,5±1,6^A	5,5±0,8^{aB}
Parietal	G1	0,4±0,3^A	3,4±1,5^B	3,1±1,1^C	3,0±2,0^C
	G2	0,6±0,5^A	2,2±2,1^B	2,1±1,7^B	2,7±1,8^B
	G3	0,5±0,5^A	3,1±5,3^A	1,2±1,4^A	2,8±1,4^A
	G4	0,1±0,2^A	4,0±3,8^B	2,8±3,1^B	1,1±0,6^C
	G5	0,3±0,2^A	1,7±0,6^A	1,7±1,4^A	4,1±1,9^B
Occipital	G1	0,3±0,2^A	2,3±1,2^B	2,1±1,4^B	1,6±1,1^B
	G2	0,4±0,4^A	1,0±0,8^{AC}	1,9±0,3^{BC}	3,9±2,4^B
	G3	0,3±0,3^A	1,6±1,0^{AB}	1,8±0,8^B	2,2±1,3^B
	G4	0,1±0,3^A	2,4±1,0^B	1,4±1,0^{BC}	1,0±0,6^C
	G5	0,2±0,1^A	1,1±0,4^B	2,1±1,3^B	1,9±1,3^{aB}
Hipocampo	G1	0,04±0,1	0,5±0,5	1,0±0,7	0,9±1,4
	G2	0,1±0,2^A	2,7±1,8^B	1,6±2,3^B	1,3±1,3^B
	G3	0,1±0,2	4,4±8,2	2,5±2,2	1,0±1,1
	G4	0,1±0,3	3,9±3,6	1,4±3,2	2,3±3,1
	G5	0,1±0,2	0,2±0,2	1,0±1,5	0,1±0,2

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre subgrupos (tempos) ($p < 0,05$).

Onde: G1: controle; G2, G3 e G4: ratos tratados com extrato etanólico da casca de pequi a 100mg/kg, 300 mg/kg e 600 mg/kg, respectivamente e G5: vitamina E. Tempos de isquemia: cinco minutos (I⁵), 20 minutos (I²⁰), 45 minutos (I⁴⁵) e sem isquemia (I⁰).

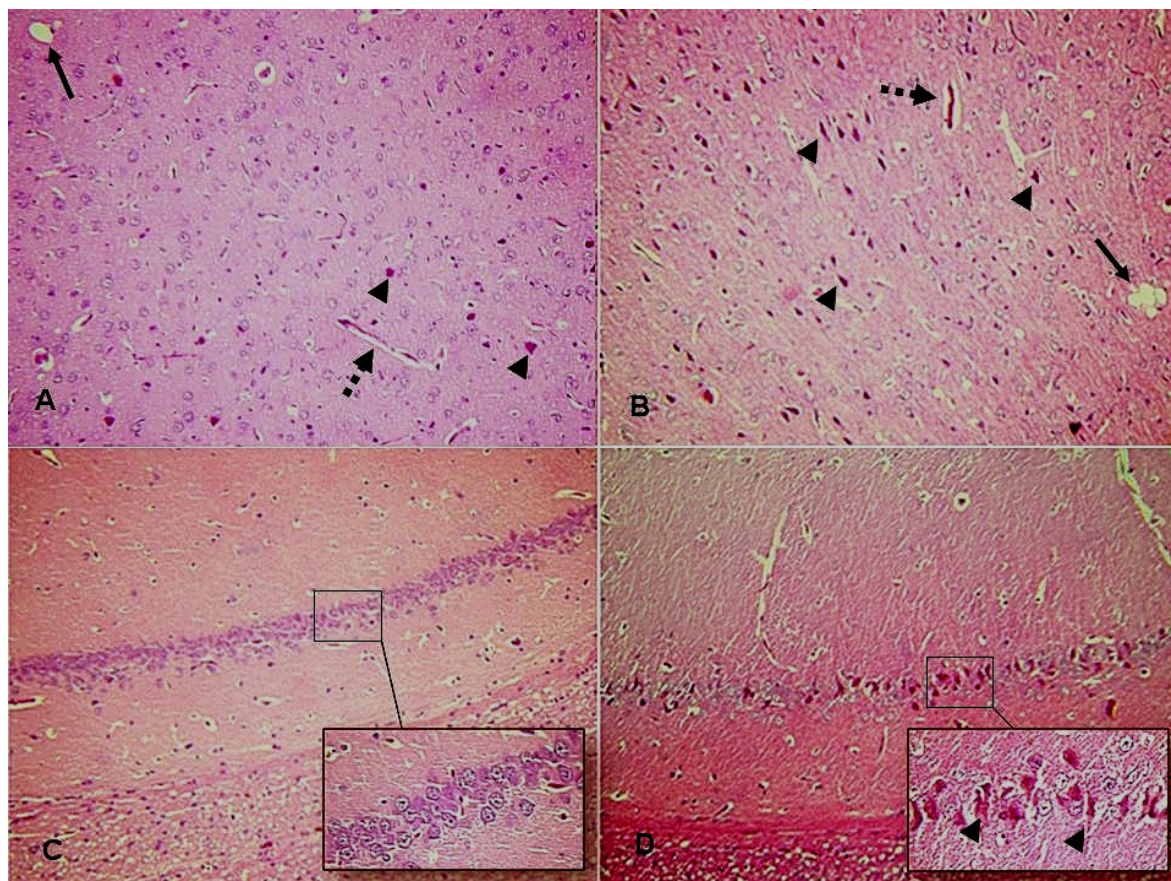


FIGURA 1 – Fotomicrografias de cérebro de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Nas imagens evidenciam-se neurônios isquêmicos (cabeça de seta), aumento do espaço de Virchow-Robin (seta pontilhada) e vacuolização de neurópilo (seta). Em A, córtex frontal do grupo tratado com 600 mg/kg extrato etanólico da casca de pequi (G4) subgrupo 20 minutos de isquemia (I^{20}), apresentando lesões discretas. Em B, córtex frontal do grupo controle (G1) subgrupo 20 minutos de isquemia (I^{20}), apresentando lesão acentuada. Em C, hipocampo (CA1) do grupo controle (G1) subgrupo Sham (I^0), com ausência de lesões. Em D, hipocampo (CA1) do grupo tratado com 600mg/kg de extrato etanólico da casca de pequi (G4) subgrupo 45 minutos de isquemia (I^{45}), com número acentuado de neurônios isquêmicos. Hematoxilina e eosina, 100X. Fotomicrografias em destaque em C e D: 400X.

Caspase-3 clivada

A marcação de caspase-3 clivada foi verificada na maioria das vezes em corpo celular de neurônios, mas também em dendritos e axônio dessas células de todos os cortes estudados, apresentando-se predominantemente em intensidade discreta e, por vezes, com um padrão de marcação granular no

citoplasma dos neurônios. Observaram-se neurônios marcados principalmente na região de córtex frontal.

Acentuado número de células gliais apresentou marcação de caspase-3 clivada em citoplasma e prolongamentos citoplasmáticos, com intensidade variando de discreta à acentuada. Os oligodendrócitos foram o tipo celular principalmente marcado pelo anticorpo, caracterizando a maior sensibilidade e precocidade do aparecimento de lesão isquêmica nessas células. Também houve marcação, em menor número, de astrócitos e microgliócitos.

Nos animais de I⁰ havia raros neurônios marcados. Há indícios que a expressão da proteína aumentou com a progressão dos tempos de isquemia, porém, no córtex frontal, I⁴⁵ apresentou diminuição da expressão de caspase-3 clivada. Esse achado indica que quanto maior o tempo de isquemia cerebral global maior é a ativação de proteínas envolvidas na execução de apoptose. Porém, na região cortical frontal sugerem-se duas situações, ou tempos maiores de isquemia induzem a morte celular por necrose da maioria dos neurônios ou esta região adapta-se a agressão isquêmica por ativação de mecanismos de sobrevivência capazes de reduzir a ativação de apoptose.

Os grupos suplementados não apresentaram expressão de caspase-3 clivada significativamente diferente do grupo controle ($p > 0,05$) (Tabela 2). No entanto, há indícios de que o número de neurônios marcados nos grupos que receberam suplementação antioxidante foi menor comparado ao controle, principalmente no córtex frontal em I⁵ e I²⁰, caracterizando a ação neuroprotetora dos antioxidantes por neutralização de radicais livres, reduzindo a ativação de caspase-3 em lesões de isquemia e reperfusão cerebral.

Nas regiões parietal/occipital, o número de neurônios marcados aumentou de acordo com os tempos de isquemia, exceto no G2. No hipocampo, o número de células marcadas não houve diferença estatística entre os tempos de isquemia, principalmente, em G1, G2 e G3 (Figuras 1A a D), sugerindo que a expressão de caspase-3 clivada nesta região, após lesão de isquemia e reperfusão, acontece tardiamente.

Tabela 2 - Valores médios, desvio-padrão(s) e avaliação estatística da contagem de neurônios marcados com anticorpo caspase-3 clivada nas regiões de córtex frontal, parietal/occipital e hipocampo de cérebros de ratos submetidos à isquemia e reperfusão tratados com extrato etanólico da casca de pequi, Goiânia, 2010.

Área cerebral	Grupos	Tempo de isquemia (minutos)			
		I ⁰	I ⁵	I ²⁰	I ⁴⁵
Frontal	G1	1,2±0,8	9,8±10,6	8,8±5,6	3,2±2,9
	G2	1,4±1,7	4,0±3,7	3,6±3,8	2,2±1,8
	G3	1,8±1,3	2,8±2,2	3,8±4,2	2,6±1,7
	G4	1,0±1,0	5,6±2,9	5,0±3,5	3,6±4,2
	G5	2,0±1,9	3,6±3,2	3,6±1,1	4,0±2,9
Parietal e Occipital	G1	0,2±0,4	2,4±2,3	3,2±3,0	3,0±2,8
	G2	0,4±0,9	0,4±0,5	0,4±0,5	0,4±0,9
	G3	0,0±0,0	1,0±1,0	0,8±0,8	2,2±0,8
	G4	0,0±0,0	0,4±0,9	2,6±1,9	2,0±3,4
	G5	0,0±0,0	0,2±0,4	0,8±0,8	1,8±2,0
Hipocampo	G1	1,0±1,2	1,6±2,1	1,4±1,0	1,5±2,7
	G2	1,0±1,2	1,0±1,0	0,8±0,8	0,6±0,9
	G3	1,0±1,2	0,8±1,3	0,6±0,9	0,6±0,7
	G4	0,0±0,0	0,4±0,5	2,0±3,5	4,0±3,7
	G5	0,4±0,9	0,2±0,4	2,2±3,9	1,4±1,7

Não houve diferença estatística entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis ($p>0,05$).

Onde: G1: controle; G2, G3 e G4: ratos tratados com extrato etanólico da casca de pequi a 100mg/kg, 300 mg/kg e 600 mg/kg, respectivamente e G5: vitamina E. Tempos de isquemia: cinco minutos (I⁵), 20 minutos (I²⁰), 45 minutos (I⁴⁵) e sem isquemia (I⁰).

Apesar de não haver diferença estatística na marcação de células gliais entre os grupos e os tempos de isquemia, observou-se que a frequência de intensidade de marcação no momento I⁴⁵ apresentou-se predominantemente discreta em G3, G4 e de ausente a discreta em G5 em comparação ao G1, que apresentou 100% das amostras com intensidade moderada. Este achado mostra que o extrato etanólico da casca de pequi e a vitamina E reduzem a ativação de apoptose via caspases em períodos de isquemia prolongados. Os grupos tratados nos momentos I⁰, I⁵ e I²⁰ não apresentam diferenças de intensidade de marcação em relação a G1. Além disso, a frequência de intensidade de coloração dessas células em todos os grupos, não segue um padrão de marcação (Tabela 3).

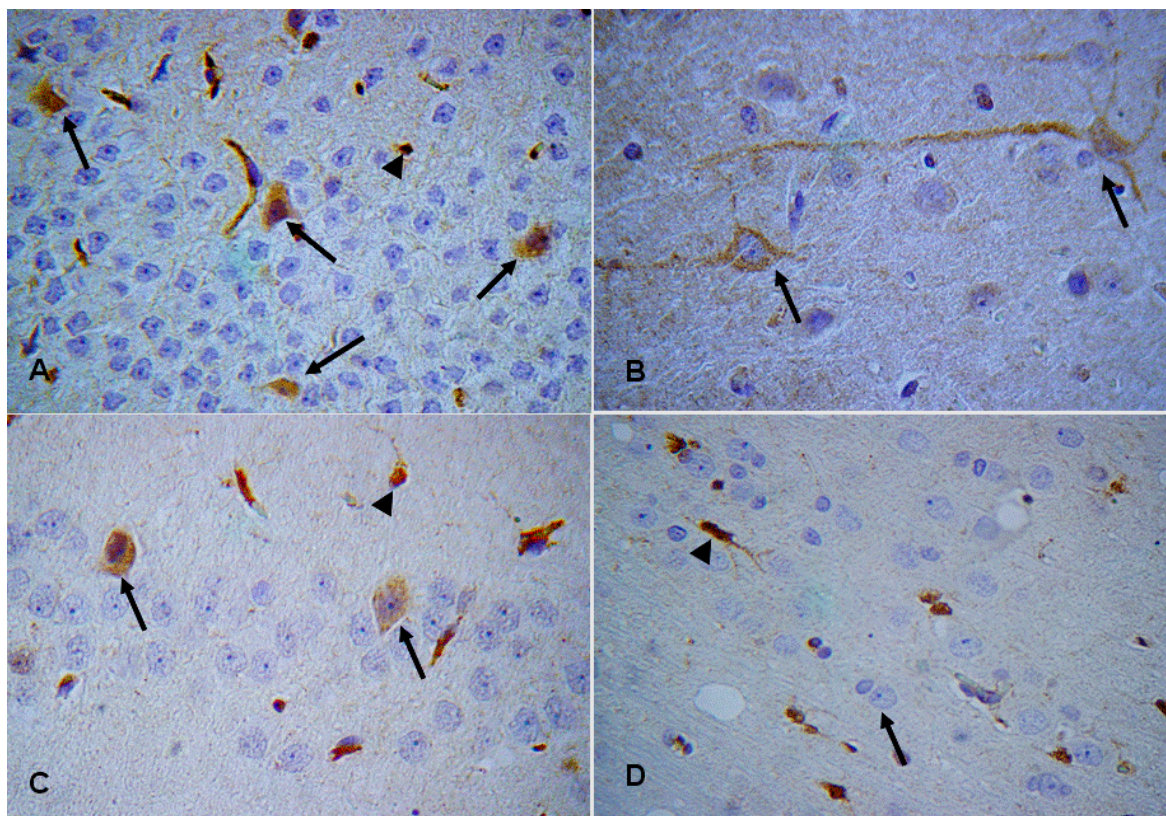


FIGURA 2 – Fotomicrografias de cérebro de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Nas imagens evidenciam-se neurônios marcados com anti-caspase-3 clivada (seta) e células gliais (cabeça de seta). Em A, hipocampo do grupo tratado com 600mg/kg de extrato etanólico da casca de pequi (G5) subgrupo 45 minutos de isquemia (I^{45}), evidenciado vários neurônios com expressão de caspase-3 clivada. Em B, córtex frontal do grupo tratado com 100mg/kg de extrato etanólico da casca de pequi (G2) subgrupo 20 minutos de isquemia (I^{20}), com marcação de corpo celular dendritos e axônio neuronal. Em C, hipocampo do grupo vitamina E (G5) subgrupo 20 minutos de isquemia (I^{20}). Em D, córtex frontal do grupo tratado com 300mg/kg de extrato etanólico da casca de pequi (G3) subgrupo 20 minutos de isquemia (I^{20}), com ausência de marcação neuronal. Imunomarcação com anti-caspase-3 clivada, 400X.

Entre os tempos de isquemia, o G1 apresentou marcação predominantemente discreta nos tempos I^0 , I^5 e I^{20} e moderada em 100% das amostras de I^{45} . No G2, a intensidade de marcação nos tempos I^0 , I^5 e I^{20} variou de discreta a moderada e em I^{45} de moderada a acentuada. Em G3, os tempos I^0 , I^5 apresentaram marcação predominantemente acentuada, I^{20} de moderada a acentuada e em I^{45} , 60% das amostras foram discretas. G4 apresentou marcação moderada a acentuada em I^0 , I^5 , discreta em 60% dos cérebros de I^{20} e discreta

em 80% de I^{45} . No G5 a intensidade discreta foi predominante em I^0 , I^5 , I^{20} e I^{45} , sendo que neste último tempo, 40% das amostras tiveram ausência de marcação. Esses achados mostram que ao longo dos tempos de isquemia nos grupos tratados com 300 e 600mg/kg de extrato etanólico da casca de pequi, principalmente, a vitamina E reduzem a ativação de caspase-3 clivada.

Tabela 3 – Frequência (%) da intensidade de marcação de células gliais (glia) positivos para Caspase-3 clivada em cérebro de ratos submetidos a isquemia e reperfusão, tratados com extrato etanólico da casca de pequi, Goiânia, 2010.

Grupo 1 (%)																
Momentos	I^0				I^5				I^{20}				I^{45}			
Escores	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Glia	20	40	20	20	0	60	20	20	0	60	20	20	0	0	100	0
Grupo 2 (%)																
Escores	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Glia	0	40	40	20	20	20	40	20	0	40	40	20	0	20	40	40
Grupo 3 (%)																
Escores	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Glia	0	40	0	60	20	20	0	60	0	20	40	40	0	60	40	0
Grupo 4 (%)																
Escores	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Glia	0	20	40	40	0	20	40	40	0	60	40	0	0	80	0	20
Grupo 5 (%)																
Escores	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Glia	0	60	20	20	0	40	40	20	0	60	20	20	40	40	0	20

Onde: Escores: 0-ausência de marcação; 1-marcação discreta; 2-marcação moderada e 3-marcação acentuada. Grupos - G1: controle; G2, G3 e G4: ratos tratados com extrato etanólico da casca de pequi a 100mg/kg, 300 mg/kg e 600 mg/kg, respectivamente e G5: vitamina E. Tempos de isquemia - I^0 : sem isquemia, I^5 : cinco minutos; I^{20} : 20 minutos e I^{45} : 45 minutos;

DISCUSSÃO

Este estudo é pioneiro em descrever a ação do extrato etanólico de pequi em lesões de isquemia e reperfusão cerebral em ratos. Estudos anteriores mostraram a atividade antioxidante dos extratos aquoso e etanólico de diferentes partes deste fruto e verificaram a presença de fenóis em diferentes quantidades na casca, polpa e semente (KHOURI et al., 2007; ROESLER et al., 2007; LIMA, 2008). ROESLER et al. (2007) afirmaram que a casca do pequi possui altos níveis

de compostos fenólicos e possui excelente atividade antioxidante, inibindo a lipoperoxidação.

No presente estudo, a alteração mais comumente observada foi a presença de neurônios isquêmicos, caracterizados por eosinofilia e retração citoplasmática e picnose nuclear. Em estudo similar, TARDINI et al. (2003) observaram a mesma alteração, utilizando 30 minutos de isquemia e 60 e 120 minutos de reperfusão após oclusão bilateral de artérias carótidas em ratos Wistar. Também, FUJIKAWA (1996) encontrou neurônios acidofílicos com núcleo picnótico em várias regiões cerebrais ao final da síndrome epilética de 40 minutos, 60 minutos e três horas e sugere que a necrose neuronal pode ser encontrada em estágios precoces pela coloração de hematoxilina e eosina e não somente após várias horas da agressão.

Neste estudo, as regiões anatômicas do cérebro que apresentaram maior quantidade de lesões foram a cortical frontal e parietal. Achado similar foi encontrado por PENASSO (2005), que encontrou lesões mais graves no córtex frontal, parietal, temporal e hipocampo de *Gerbillus* não tratados com dimetilsulfóxido (DMSO), após oclusão permanente da artéria carótida esquerda por sete dias. Observou-se, no presente estudo, aumento do número de neurônios isquêmicos nos maiores tempos de isquemia, principalmente no córtex frontal dos animais do grupo controle. DIJKHUIZEN et al. (1998) relataram que a lesão isquêmica é agravada à medida que o período de hipóxia prolonga-se e HARUKUNI et al., (2006) afirmaram que apesar da reperfusão ser essencial para prevenir a irreversibilidade da lesão celular, nesta fase são produzidas substâncias altamente reativas aos componentes celulares, principalmente após períodos longos de isquemia. Além disso, as lesões foram encontradas, precocemente, no córtex cerebral. DIJKHUIZEN et al. (1998) explicaram que a isquemia cerebral global normalmente não manifesta lesão difusa; ao contrário, são acometidas regiões específicas que apresentam maior vulnerabilidade.

Discreta presença de neurônios isquêmicos nos cérebros do subgrupo Sham (I^0) no presente estudo podem ter sido induzidas pelo método anestésico utilizado. RODRIGUES et al. (2006) afirmaram que apesar da associação xilazina-quetamina promover excelente quadro de analgesia e poucas complicações sistêmicas em ratos Wistar com peso entre 250 a 350g, gera hipotensão

prolongada (acima de 60 minutos) reduzindo pressão sistólica e diastólica em 24% e 38%, respectivamente. Esse protocolo anestésico foi escolhido visando promover redução do fluxo sanguíneo cerebral mais pronunciada, haja vista que ÁBRAHÁM & LÁZÁR (2000) e OUYANG et al. (2007) relataram que a oclusão bilateral das artérias carótidas comuns, em ratos Wistar, reduz o fluxo cerebral em até 50%, sendo necessária a associação com hipotensão ou outros métodos auxiliares para garantir a isquemia.

Vacuolização do neurópilo, alteração microscópica indicativa de edema cerebral, e raros focos de hemorragia foram encontrados no tecido submetido à I/R. De acordo com KUNZ et al. (2010), a barreira hematoencefálica é comprometida no processo de isquemia e reperfusão devido à ruptura da matriz extracelular após a degradação do colágeno tipo IV, laminina, fibronectina e integrinas estruturais de astrócitos e células endoteliais por ação de proteases (catepsinas, ativador de plasminogênio e metaloproteases), sendo um dos motivos do aparecimento de edema pós-isquêmico e de hemorragias. MERGENTHALER et al. (2004) afirmaram que a produção de metaloproteases (MMP2 e MMP9) é induzida uma a três horas após a isquemia cerebral.

No presente estudo, foi possível verificar significativa diminuição de neurônios isquêmicos no córtex frontal nos grupos que receberam extrato etanólico da casca de pequi a 300 e 600 mg/kg, tanto entre os grupos quanto em relação aos tempos de cinco e 20 minutos de isquemia. Mesmo não havendo diferença estatística entre os outros grupos tratados e o grupo controle, nota-se que a quantidade de neurônios acometidos foi menor. Estes achados indicam que o extrato etanólico da casca de pequi e a vitamina E reduzem as lesões isquêmicas no córtex frontal, sendo o primeiro, em doses maiores, mais efetivo que a vitamina. De acordo com KIM (2010), os compostos fenólicos possuem potente atividade neuroprotetora devido à capacidade de modular várias respostas celulares, especialmente a redução de estresse oxidativo.

No presente estudo, os animais tratados com vitamina E apresentaram maior quantidade de células isquêmicas no córtex frontal, parietal/occipital e hipocampo aos 45 minutos de isquemia, sendo semelhante ao grupo controle. ANDERSON & SIMS (2002) afirmaram que, na fase aguda do processo de isquemia e reperfusão, os antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos estão

reduzidos e que seus níveis começam a aumentar dias depois da lesão. Estudo realizado por YOSHIDA et al. (1998) mostrou que, após período de isquemia de 30 minutos e reperfusão de 15 e 30 minutos, a vitamina E estava diminuída em 7% logo após a isquemia, e no período de reperfusão, apresentava níveis ainda menores. Então, neste estudo, possivelmente a quantidade de vitamina E presente no tecido após 45 minutos de isquemia não foi suficiente para evitar as lesões de I/R.

O hipocampo, apesar de ser uma região vulnerável às lesões isquêmicas, neste estudo, não apresentou diferença significativa entre os grupos e tempos de isquemia no que diz respeito aos neurônios isquêmicos. SUGINO et al. (2000) e COLBOURNE & AUER (2010) mostraram, em estudos realizados com roedores, que a típica morte celular acentuada em neurônios piramidais do hipocampo é tardia, ocorrendo entre 24 a 96h após curto evento isquêmico. QI et al. (2004), ao analisarem o hipocampo de pacientes humanos após evento isquêmico, observaram o aparecimento de poucos neurônios piramidais com alterações discretas de isquemia entre quatro a 16 horas após a isquemia. Entretanto, lesões acentuadas nesta região foram verificadas à partir de 24 horas, com agravamento após 72 horas da isquemia. LI et al. (2010) observaram perda discreta de neurônios piramidais de CA1 seis ou 12 horas após isquemia de 10 minutos e lesão acentuada 24 horas após, por meio da oclusão bilateral das artérias carótidas comuns de ratos Wistar.

Somente nos animais tratados com 100, 300 e 600mg/kg de extrato etanólico da casca de pequi, foi possível verificar indícios de que em todos os tempos de isquemia, apresentavam mais células com característica isquêmica em CA1 e CA3. Ainda, observou-se no grupo tratado com 600mg/kg do extrato maior número de neurônios do hipocampo marcados com caspase-3 clivada após 20 e 45 minutos de isquemia. ALMEIDA et al. (2010), utilizaram, por via intraperitoneal, o extrato hidroalcoólico da casca de pequi em camundongos e verificaram toxicidade aguda do produto. Clinicamente, os animais manifestaram excitabilidade seguida de depressão, cianose e morte, mesmo com a fração muito diluída do extrato. Diante disso, sugere-se que o extrato pode possuir substâncias que induzem a degeneração ou até mesmo a morte celular, por necrose e/ou apoptose, de neurônios piramidais de CA1 e CA3 do hipocampo. Portanto, são

necessários estudos direcionados ao efeito tóxico do extrato etanólico da casca de pequi, utilizando diferentes vias de aplicação ou modelos de cultivo celular, comparando os resultados com análises anatomopatológicas e clínicas, além de analisar a composição química do mesmo para assegurar o uso desse extrato na saúde humana e animal.

No presente estudo, observou-se marcação de caspase-3 clivada em pequeno número de neurônios e, em maior quantidade de células gliais. PETITO et al. (1998) afirmaram que o tecido nervoso exposto ao estresse oxidativo, inicialmente apresenta alterações celulares em neurônios e oligodendrócitos. EVORA et al. (1996), ROSENBLUM (1997), OHTAKI et al. (2005) e KUNZ et al. (2010) concordaram que o estresse oxidativo no tecido nervoso induz lesões de excitotoxicidade, por estimular a liberação de grande quantidade de glutamato, além de provocar lipoperoxidação de membrana e oxidação de proteínas. Adicionalmente, afirmaram que esses fatores conjuntamente e associados ao tempo e gravidade da isquemia são responsáveis por causar necrose e/ou apoptose, principalmente, por ativação de caspases.

O número de neurônios marcados por caspase-3 clivada foi baixo e a intensidade de coloração variava de discreta a moderada, em todos os grupos e tempos de isquemia. VELIER et al. (1999), MASSIEU et al. (2004), QI et al. (2004) e LI et al. (2010), em estudo utilizando modelo de isquemia e reperfusão cerebral, mostraram que a marcação imunoistoquímica de caspase-3 clivada começa a aumentar à partir de seis horas após o início do período de reperfusão. Diante disso, sugere-se que o tempo de reperfusão de duas horas pode não ter sido suficiente para permitir a expressão de um maior número de células e a intensidade de coloração acentuada. Entretanto, NAMURA et al. (1998), por meio de *immunoblot*, detectou caspase-3 ativada entre uma a 12 horas de reperfusão, indicando que a ativação dessa enzima acontece desde as primeiras horas de reperfusão.

A contagem de células marcadas nas diferentes regiões cerebrais não apresentou diferença significativa entre os grupos e entre os tempos de isquemia. Porém, há indícios de que o número de células diminuiu nos grupos tratados em relação ao controle, principalmente, no córtex frontal. Para KIM (2010), os compostos fenólicos, e para MASSIEU et al. (2004), a vitamina E, são

neuroprotetores com atividade antioxidantes que podem diminuir apoptose mediada por estresse oxidativo, por inibirem a ativação de caspase-3 e outras proteínas envolvidas neste processo. Desta forma, os produtos utilizados no presente estudo parecem estar envolvidos na diminuição da expressão de caspase-3 clivada.

A expressão de caspase-3 clivada foi maior em células gliais, principalmente oligodendrócitos, em todos os grupos e em todos os tempos estudados. De acordo com PETITO et al. (1998), os oligodendrócitos entram rapidamente em morte celular após períodos curtos de isquemia global, sendo considerados mais sensíveis que neurônios em certas regiões cerebrais. Neste estudo, observamos indícios de que o extrato etanólico da casca de pequi a 300 e 600 mg/kg e mais efetivamente a vitamina E, diminuem a ativação de caspase-3 clivada nestas células em períodos de isquemia de 45 minutos e duas horas de reperfusão.

Os suplementos utilizados são promissores para reduzir as lesões precoces de isquemia e reperfusão cerebral.

CONCLUSÃO

O extrato etanólico da casca de pequi pode possuir atividade neuroprotetora nas dosagens de 300 e 600mg/kg, no tempo de 45 minutos de isquemia, por reduzir o número de neurônios isquêmicos, principalmente na região do córtex frontal.

REFERÊNCIAS

1. ÁBRAHÁMA, H.; LÁZÁR, G. Early microglial reaction following mild forebrain ischemia induced by common carotid artery occlusion in rats. **Brain Research**, Amsterdam, v. 862, p. 63–73, 2000.
2. ALMEIDA, A. C. A.; SOBRINHO, E. M.; PINHO, L. P.; SOUZA, N. S.; MARTINS, E. R.; DUARTE, E. R.; SANTOS, H. O.; BRANDI, I. V.;

- CANGUSSU, A. S.; COSTA, J. P. R. Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 1, p. 200-203, 2010.
3. ANDERSON, M. F.; SIMS, N. R. The effects of focal ischemia and reperfusion on the glutathione content of mitochondria from rat brain subregions. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 81, p. 541–549, 2002.
 4. BANO, D.; NICOTERA, P. Ca^{2+} signals and neuronal death in brain ischemia. **Stroke**, Dallas, v. 38, p. 674-676, 2007.
 5. BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
 6. BONFOCO, E.; KRAIC, D.; ANKARCORONA, M.; NICOTERA, P.; LIPTON, S. A. Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, p. 7162-7166, 1995.
 7. BRASIL. **Cadernos de informação de Saúde** [on line]. 2005. Ministério da Saúde, Datasus. Brasília. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/tabdata/cadernos/cadernosmap.htm>. Acesso em: 31 jul. 2008.
 8. CALVERT, J. W.; ZHOU, C.; NANDA, A.; ZHANG, J. H. Effect of hyperbaric oxygen on apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model. **Journal of Applied Physiology**, v. 95, p. 2072–2080, 2003.
 9. COLBOURNE, F.; AUER, R.N. Transient global cerebral ischemia produces morphologically necrotic, not apoptotic neurons. In: FUJIKAWA, D. G. **Acute neuronal injury: The role of excitotoxic programmed cell death mechanisms**. North Hills: Springer Science, cap. 8, p. 121-153, 2010.
 10. CONROY, B. P.; GRAFE, M. R.; JENKINS, L. W.; VELA, A. H.; LIN, C. Y.; DEWITT, D. S.; JOHNSTON, W. E. Histopathologic consequences of hyperglycemic cerebral ischemia during hypothermic cardiopulmonary bypass in pigs. **The Annals of Thoracic Surgery**, Philadelphia, v. 71, p. 1325 – 1334, 2001.
 11. DIAS, L. A. A.; COLLI, B. O.; NETTO, J. C.; LACHAT, J. J. Avaliação da isquemia cerebral focal induzida pela oclusão da artéria cerebral média e a ação neuroprotetora do cetoprofeno em ratos. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v. 58, n. 4, p. 1047-1054, 2000.
 12. DIJKHUIZEN, R. M.; KNOLLEMA, S.; H. WERP, B.; TER, G. J. H.; WILDT, D. J.; SPRENKEL, J. W. B.; TULLEKEN, K. A. F.; NICOLAY, K. Dynamics of cerebral tissue injury and perfusion after temporary and delayed damage

- delayed damage. Evidence for region-specific sensitivity and delayed damage. **Stroke**, Dallas, v. 29, p. 695-704, 1998.
13. EVORA, P. R. B.; PEARSON, P. J.; SECCOMBE, J. F.; SCHAFF, H. V. Atualização: Lesão de isquemia e reperfusão. Aspectos fisiopatológicos e a importância da função endotelial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 4, n. 66, p. 239, 1996.
 14. FLECKNELL, P. A.; RICHARDSON, C. A.; POPOVIC, A. Laboratory Animals. In: TRANQUILI, W. J.; THURMON, J.C.; GRIMM, K. A. **Lumb & Jones' Veterinary Anesthesia and Analgesia**. 4.ed. Iowa: Blackwell Publishing. cap. 30, p. 765-783, 2007.
 15. FONDEVILA, C.; BUSUTTIL, R. W.; KUPIEC-WEGLINSKI, J. W. Hepatic ischemia/reperfusion injury: a fresh look. **Experimental and molecular pathology**, New York, v. 2, n. 74, p. 86-93, 2003.
 16. FUJIKAWA, D. G. The temporal evolution of neuronal damage from pilocarpine-induced status epilepticus. **Brain Research**, Amsterdam, v. 725, p. 11–22, 1996.
 17. FUJIKAWA, D. G.; SHINMEI, S. S.; CAI, B. Kainic acid-induced seizures produce necrotic, not apoptotic, neurons with internucleosomal DNA cleavage: implications for programmed cell death mechanisms. **Neuroscience**, Oxford, v. 98, p. 41–53, 2000.
 18. FUJIKAWA, D. G.; ZHAOA, S.; KED, X.; SHINMEIE, S. S.; ALLEN, S. G. Mild as well as severe insults produce necrotic, not apoptotic, cells: Evidence from 60-min seizures. **Neuroscience Letters**, Limerick, v. 469, p. 333–337, 2010a.
 19. HARUKUNI, I.; BHARDWAJ, A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. **Neurologic clinics**, Philadelphia, v. 24, p. 1- 21, 2006.
 20. KIM, Y. C. Neuroprotective phenolics in medicinal plants. **Archives of Pharmacal Research**, Seoul, v. 33, n. 10, p. 1611-1632, 2010.
 21. KHOURI, J.; RESCK, I. S.; POÇAS-FONSECA, M.; SOUSA, T. M. M.; PEREIRA, L.O.; OLIVEIRA, A. B. B.; GRISOLIA, C. K. Anticlastogenic potential and antioxidant effects of an aqueous extract of pulp from the pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb). **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 442-448, 2007.
 22. KUNZ, A.; DIRNAGL, U.; MERGENTHALER, P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, Germany, v. 24, p. 495-509, 2010.
 23. LI, J.; HAN, B.; MA, X.; QI, S. The effects of propofol on hippocampal caspase-3 and Bcl-2 expression following forebrain ischemia–reperfusion in rats. **Brain Research**, Amsterdam, v. 1356, p. 11-23, 2010.

24. LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.).** 2008. 182p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Ciência dos Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, USP – São Paulo.
25. LUNA, L. G. **Manual of histological staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**, Washington: Mc Graw Hill, 1968. 258 p.
26. MASSIEU, L.; MORÁN, J.; CHRISTEN, Y. Effect of *Ginkgo biloba* (EGb 761) on staurosporine-induced neuronal death and caspase activity in cortical cultured neurons. **Brain Research**, Amsterdam, v. 1002, p. 76–85, 2004.
27. MERGENTHALER, P.; DIRNAGL, U.; MEISEL, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. **Metabolic Brain Disease**, Morgantown, v. 19, n. 3/4, p. 151-157, 2004.
28. MUNIZ, L. R. F.; FARIA, M. H. G.; VASCONCELOS, P. R. L. Avaliação metabólica das lesões de isquemia e reperfusão cerebrais após oclusão bilateral das artérias carótidas comuns: estudo experimental em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 19, n. 5, p. 529-534, 2004.
29. NAMURA, S.; ZHU, J.; FINK, K.; ENDRES, M.; SRINIVASAN, A.; TOMASELLI, K. J.; YUAN, J.; MOSKOWITZ, M. A. Activation and cleavage of Caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 18, n. 10, p. 3659–3668, 1998.
30. OHTAKI, H.; DOHI, K.; NAKAMACHI, T.; YOFU, S.; ENDO, S.; KUDO, Y.; SHIODA, S. Evaluation of brain ischemia in mice. **Acta Histochemica et Cytochemica**, Kyoto, v. 38, n. 2, p. 99-106, 2005.
31. OUYANG, Y. B.; VOLOBOUEVA, L. A.; XU, L. J.; GIFFARD, R. G. Selective dysfunction of hippocampal CA1 astrocytes contributes to delayed neuronal damage after transient forebrain ischemia **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 27, n. 16, p. 4253– 4260, 2007.
32. PAGNUSSAT, A. S. **Caracterização da morte celular em neurônios da região CA1 do hipocampo de ratos submetidos à isquemia global transitória e reperfusão.** 2005. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – Rio Grande do Sul.
33. PASSOS, X. S.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; FERNANDES, O. F. L.; PAULA, T. F.; GARCIA, A. C. F.; SILVA, M. R. R. Atividade Antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 6, p. 623–627, 2002.
34. PENASSO, P. **Repercussões clínicas e histopatológicas do**

- dimetilsilfóxido em *gerbils* submetidos à isquemia cerebral experimental.** 2005. 94p. Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde) – Universidade de Franca, Franca – São Paulo.
35. PEREIRA, F. E. L. Lesões celulares e do Interstício. Cicatrização. Regeneração. In: FILHO, B. **Bogliolo – Patologia geral**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.82- 139, 2009.
 36. PETITO, C. K; OLARTE, J. P.; ROBERTS, B.; NOWAK, T. S. Jr.; PULSINELLI, W. A. Selective glial vulnerability following transient global ischemia in rat brain. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, Pittsburgh, v. 57, n. 3, p. 231-238, 1998.
 37. QI, J. P.; WU, A. P.; WANG, D. S.; WANG, L. F.; LI, S. X.; XU, F. L. Correlation between neuronal injury and Caspase²³ after focal ischemia in human hippocampus. **Chinese Medical Journal**, Peking, v. 117, n. 10, p. 1507-1512, 2004.
 38. RODRIGUES, S. F.; OLIVEIRA, M. A.; MARTINS, J. O.; SANNOMIYA, P.; TOSTES, R. C. NIGRO, D.; CARVALHO, M. H. C.; FORTES, Z. B. Differential effects of chloral hydrate- and ketamine/xylazine-induced anesthesia by the s.c. route. **Life Sciences**, Elmsford, v. 79, p. 1630–1637, 2006.
 39. ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.
 40. ROSENBLUM, W. I. Histopathologic clues to the pathways of neuronal death following ischemia/hypoxia. **Journal of Neurotrauma**, New York, v. 14, n. 5, p. 313-327, 1997.
 41. SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 3.ed., Belo Horizonte: FEP-MVZ, 2007. 264 p.
 42. SHI, L.; ADAMS, M.; BRUNSO-BECHTOLD, J. K. Subtle alterations in glutamatergic synapses underlie the aging-related decline in hippocampal Function. In: RIDDLE, D. R. **Brain aging: models, methods, and mechanisms**. [on line] Boca Raton: CRC Press, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=frbrainage&part=ch8>. Acesso em: 10 jul. 2010.
 43. STVOLINSKY, S.; KUKLEY, M.; DOBROTA, D.; MEZESOVA, V.; BOLDYREV, A. Carnosine protects rats under global ischemia. **Brain Research Bulletin**, New York, v. 53, n. 4, p. 445–448, 2000.
 44. SUGINO, T.; NOZAKI, K.; TAKAGI, Y.; HATTORI, I.; HASHIMOTO, N.; MORIGUCHI, T.; NISHIDA, E. Activation of mitogen-activated protein kinases after transient forebrain ischemia in gerbil hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 20, n. 12, p. 4506–4514, 2000.

45. TAGAMI, M.; YAMAGATA, K.; IKEDA, K. NARA, Y.; FUJINO, H.; KUBOTA, A.; NUMANO, F.; YAMORI, Y. Vitamin E prevents apoptosis in cortical neurons during hypoxia and oxygen reperfusion, **Laboratory Investigation**, Hagerstown, v. 78, n. 11, p. 1415-1429, 1998.
46. TARDINI, D. M. S.; YOSHIDA, W. B. Lesões cerebrais decorrentes de isquemia e reperfusão na cirurgia de endarterectomia de carótida. **Jornal Vascular Brasileiro**, Porto Alegre, v. 2, n. 2, p. 119-28, 2003.
47. TARDINI, D. M.; TARDINI, S.; YOSHIDA, W. B.; NOVELLI, E. L. B.; SEQUEIRA, J. L. Avaliação de dois modelos experimentais de isquemia e reperfusão cerebral em ratos com oclusão temporária carotídea associada ou não à oclusão vertebral. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 18, n. 6, p. 502-508, 2003.
48. VELIER, J. J.; ELLISON, J. A.; KIKLY, K. K.; SPERA, P. A.; BARONE, F. C.; FEUERSTEIN, G. Z. Caspase-8 and Caspase-3 are expressed by different populations of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke in the rat. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 19, n. 14, p. 5932–5941, 1999.
49. WHITE, B. C.; SULLIVAN, J. M.; DEGRACIA, D. J.; O'NEIL, B. J.; NEUMAR, R. W.; GROSSMAN, L. I.; RAFOLS, J. A.; KRAUSE, G. S. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v. 179, p. 1–33, 2000.
50. YOSHIDA, H.; KONG, Y-Y.; YOSHIDA, R.; ELIA, A. J.; HAKEM, A.; HAKEM, R.; PENNINGER, J. M.; MAK, T. W. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. **Cell**, Cambridge, v. 94, p. 739–750, 1998.
51. ZHANG, B.; TANAKA, J.; YANG, L.; SAKANAKA, M.; HATA, R.; MAEDA, N.; MITSUDA, N. Protective effect of vitamin E against focal brain ischemia and neuronal death through induction of target genes of hypoxia-inducible factor-1. **Neuroscience**, Oxford, v. 126, n. 2, p. 433-440, 2004.

**CAPÍTULO 3 – Extrato etanólico da casca de pequi (*Caryocar brasiliense*)
reduz a ativação de ERK1/2 em cérebros de ratos submetidos à isquemia e
reperfusão**

**Pequi (*Caryocar brasiliense*) shell etanolic extract decreases activation of
ERK1/2 in rat brains subjected to ischemia and reperfusion**

RESUMO

A isquemia cerebral desencadeia a ativação de diferentes vias intracelulares, dentre elas a das proteínas quinase ativadas por mitógeno (*mitogen activated protein kinases* - MAPK). A casca do pequi (*Caryocar brasiliense*), fruto do cerrado brasileiro, possui fenóis que apresentam efeito antioxidante *in vitro*. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar a ação do extrato etanólico da casca de pequi em cérebros de ratos submetidos à I/R por meio da avaliação da expressão das formas fosforiladas (ativas) das quinases ERK 1/2 e JNK. Para tal, foram utilizados 100 ratos Wistar, divididos em cinco grupos que receberam veículo oleoso (G1), extrato etanólico da casca de pequi nas doses 100, 300 e 600mg/kg de peso (G2, 3 e 4) e 300mg/kg de vitamina E (G5). Foram estabelecidos tempos de isquemia de 5(I⁵), 20(I²⁰) e 45(I⁴⁵) minutos e sem isquemia (I⁰). Os animais foram suplementados por 30 dias e submetidos a oclusão bilateral das artérias carótidas comuns e duas horas de reperfusão. Amostras de cérebro foram submetidas à avaliação imunoistoquímica, sendo utilizados os anticorpos p-ERK1/2 e p-JNK. Em G1, a fosforilação de ERK1/2 no córtex cerebral e hipocampo aumentou de acordo com os tempos de isquemia e foi menor nos grupos tratados com extrato etanólico da casca de pequi e vitamina E. A marcação de p-JNK foi observada em células gliais e neurônios de CA3 e mostrou-se mais discreta nos tempos de isquemia dos grupos tratados com antioxidantes. O extrato etanólico da casca do pequi reduziu a ativação de ERK1/2, demonstrando um efeito protetor. O presente estudo demonstrou que a ação antioxidante dessas substâncias pode alterar a expressão de MAPKs em cérebros de ratos submetidos à I/R.

Palavras-chave: apoptose, estresse oxidativo, imunoistoquímica, JNK, MAPK.

ABSTRACT

Cerebral ischemia elicits activation of different signal transduction pathways in the cell, including mitogen activated protein kinases (MAPK). The shell of pequi (*Caryocar brasiliense*), a fruit native to brazilian cerrado, has phenol compounds with *in vitro* antioxidant properties. Therefore, the purpose of the study was to evaluate the effect of pequi (*Caryocar brasiliense*) shell etanolic extract in brain of rats after I/R injury trough evaluation of the expression of phosphorilated (active) forms of ERK 1/2 e JNK. One hundred Wistar rats were sorted into five groups that received oleous vehicle (G1), pequi shell etanolic extract treatment with 100, 300 e 600mg/kg (G2, G3 and G4), respectively and vitamin E treatment (G5).

Ischemia time points were established at 5(I⁵), 20(I²⁰) and 45(I⁴⁵) minutes and no ischemia (I⁰). The rats were supplemented with antioxidants for 30 days and were submitted to bilateral occlusion of the common carotids arteries and 2 hours of reperfusion. Brain samples were submitted to anti-p-ERK1/2 e p-JNK immunohistochemistry. ERK1/2 phosphorylation in G1 increased according to ischemia time in the cerebral cortex and hippocampus. Glial cells and CA3 neurons showed p-JNK immunoreactivity and were discrete in the antioxidant treat groups. Pequi shell etanolic extract decrease ERK1/2 activation after ischemia and reperfusion in rat brains, revealing a protective effect. The present study demonstrated that antioxidant effect of the supplements altered the MAPKs expression in brain of rats after I/R injury.

Keywords: apoptosis, immunohistochemistry, JNK, MAPK, oxidative stress.

INTRODUÇÃO

A isquemia e reperfusão (I/R) cerebral desencadeiam a ativação de diferentes vias intracelulares, dentre elas a das proteínas quinase ativadas por mitógeno (*mitogen activated protein kinases* - MAPK). Os três maiores subgrupos de MAPKs são: proteína quinases reguladas por sinal extracelular (ERK), quinase c-Jun-NH₂-terminal (JNK) e p-38 (LENNMYR et al., 2002).

A ERK é ativada por fosforilação em resposta a fatores de crescimento, estresse oxidativo e influxo de cálcio intracelular (OTANI et al., 2002). A ativação desta proteína está relacionada à sobrevivência, proliferação e diferenciação de várias células (LENNMYR et al., 2002). No sistema nervoso central, há evidências que a ERK participa da sinalização de vias de sobrevivência (SUGAWARA et al., 2004). Porém, para SUBRAMANIAM & UNSICKER (2006), ERK1/2 é o indutor predominante de morte neuronal não-apoptótica.

JNK é ativada em resposta à presença de citocinas inflamatórias, excitotoxicidade por glutamato e hiperosmolaridade. A fosforilação de JNK pode causar alterações em fatores de transcrição que induzem apoptose neuronal (MAHERA & SCHUBERTB, 2000; LENNMYR et al., 2002; OTANI et al., 2002). Porém, estudo realizado por SANNA et al. (1998), mostrou que JNK1 teve maior expressão em células que expressavam genes inibidores de apoptose quando comparada a outras JNKs, conferindo a esta proteína o papel de proteção celular contra apoptose.

O número de casos e a importância clínica dos acidentes cerebrais isquêmicos incentivaram a realização de pesquisas para descobertas de métodos

preventivos e terapêuticos eficazes para redução da morbi-mortalidade desse quadro. Estudos realizados tanto em animais quanto em seres humanos demonstraram que agentes antioxidantes, como a vitamina E, possuem importante efeito neuroprotetor (BIANCHI & ANTUNES, 1999; TAGAMI et al., 1998; ZHANG et al., 2004). Nos últimos anos, foi comprovado que o pequi (*Caryocar brasiliense*), fruto do cerrado que possui grande importância na culinária regional, possui alta concentração de fenóis (KHOURI et al., 2007; ROESLER et al., 2007), antioxidantes vegetais que possuem propriedades benéficas por inibirem a lipoperoxidação, atuando contra a ação de radicais livres (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

Na literatura não existem informações sobre a ação neuroprotetora do extrato de diferentes partes de *Caryocar brasiliense* em lesões de isquemia e reperfusão. Assim, objetivou-se descrever a ação neuroprotetora do extrato etanólico da casca de pequi em cérebros de ratos submetidos à isquemia transitória global e reperfusão por meio da avaliação da expressão de fosfo-ERK1/2 e fosfo-JNK. O presente estudo demonstrou que a ação antioxidante dessas substâncias pode alterar a expressão de MAPKs em cérebros de ratos submetidos à isquemia e reperfusão.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido de acordo com os princípios éticos de pesquisa em animais, após avaliação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, protocolo 053/2009 (Anexo 1).

Animais e delineamento experimental

Foram utilizados 100 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, fêmeas, com peso corpóreo entre 250-300g, obtidos e mantidos no Biotério Central de Criação da Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás. Os animais foram alojados em gaiolas para ratos em polipropileno (41x34x16cm), forradas com maravalha e aclimatados por período de 15 dias anteriores ao início do experimento. As gaiolas foram mantidas em ambiente com

umidade e circulação de ar apropriada, evitando situações de estresse e risco sanitário. Água e ração balanceada apropriada para a espécie foram oferecidas *ad libitum* e a temperatura da sala de experimentação mantida em 22°C.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos de 20 animais, de acordo com o tipo e a dose de antioxidante suplementado, a saber:

- Grupo 1 (G1)(Controle) – Veículo oleoso;
- Grupo 2 (G2) – Suplementação de 100mg/kg/PV de extrato etanólico da casca de pequi (*C. brasiliense*) diluído em veículo oleoso;
- Grupo 3 (G3) – Suplementação de 300mg/kg/PV de extrato etanólico da casca de pequi (*C. brasiliense*) diluído em veículo oleoso;
- Grupo 4 (G4) - Suplementação de 600mg/kg/PV de extrato etanólico da casca de pequi (*C. brasiliense*) diluído em veículo oleoso;
- Grupo 5 (G5) (controle positivo) – Suplementação de 300mg/kg/PV de vitamina E (TAGAMI et al., 1998) diluído em veículo oleoso.

Cada grupo foi subdividido em quatro momentos (subgrupos) de cinco animais, de acordo com os tempos de isquemia de cinco minutos (I^5), 20 minutos (I^{20}) e 45 minutos (I^{45}) e sem isquemia (I^0). Nesse subgrupo, as artérias foram expostas, mas não ocluídas. Os animais foram pesados para o cálculo da dose do suplemento. Este foi administrado por gavagem, diariamente, durante 30 dias consecutivos, antes da intervenção cirúrgica.

Produção do extrato etanólico da casca de pequi

O extrato da casca de pequi foi obtido de acordo com a técnica descrita por PASSOS et al. (2002) e LIMA (2008). Os frutos foram obtidos de propriedades localizadas no Estado de Goiás no período de novembro de 2008. A casca e o mesocarpo externo foram separados manualmente do mesocarpo interno (polpa), picados e levados à estufa com ventilação forçada (60°C), por 72 horas. Após a secagem, o conteúdo foi triturado em moinho analítico, padronizado em granulometria de 60 mesh (0,25mm) e armazenado a -20°C.

No Laboratório da Faculdade de Química da UFG foi obtido o extrato etanólico a partir da adição de 1000g do farelo da casca de pequi a 1000 ml de etanol a 95%. Após a percolação a frio em etanol ao abrigo da luz e sob agitação,

o sobrenadante foi filtrado e o solvente evaporado à pressão reduzida. Este procedimento conduziu ao extrato bruto etanólico da casca, que foi liofilizado e armazenado a -4 °C. O extrato liofilizado foi diluído em veículo oleoso de acordo com as doses propostas para os diferentes grupos.

O veículo oleoso e a vitamina E foram produzidos pela Pharmacia de Manipulação Therapeutica. O veículo era composto de 0,2% de ácido cítrico, 0,5% de BHT, 1% de tween 80, 2% de óleo de gergelim, 0,1g de nipagin, sacarose qsp e água qsp. O mesmo veículo continha 60mg de vitamina E para tratamento do G5.

Procedimento cirúrgico e obtenção de amostras

A técnica para a indução de isquemia foi igual nos três grupos, adaptada de DIAS et al. (2000) e STVOLINSKY et al. (2000), tendo os procedimentos sido realizados no Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da Escola de Veterinária da UFG.

Após 30 dias do início do consumo das dietas, os animais foram submetidos à cirurgia para a oclusão das artérias carótidas comuns (MUNIZ et al., 2004). Os animais foram anestesiados com uma associação de 8mg/kg de cloridrato de xilazina (Calmun[®], Agener União, São Paulo/SP) e 75mg/kg de cloridrato de cetamina (Ketamina[®], Agener União, São Paulo/SP), por via intraperitoneal, para garantir a hipotensão (FLECKNELL et al., 2007). As ratas foram mantidas aquecidas a 37-38 °C e sob oxigenoterapia durante o procedimento.

O procedimento cirúrgico iniciou-se por incisão longitudinal mediana da pele na região cervical ventral com individualização e reparo bilateral das artérias carótidas comuns (ACCs), cranialmente à sua bifurcação em artérias carótidas externa (ACE) e interna (ACI) (ponto de oclusão). Procedeu-se a oclusão bilateral e concomitante das ACCs, utilizando fio de náilon 4-0 com um tubo plástico a fim de interromper o fluxo sanguíneo para o encéfalo. Uma checagem visual foi realizada para assegurar que o fluxo sanguíneo foi interrompido. Para os animais do tempo 0 (I⁰), a cirurgia foi realizada sem oclusão das artérias carótidas. Independente do tempo de isquemia (cinco, 20 ou 45 minutos), após duas horas

de reperfusão, realizou-se anestesia prévia ao deslocamento cervical para eutanásia, e posterior retirada dos encéfalos.

Imediatamente após a eutanásia, amostras do hemisfério esquerdo do encéfalo foram colhidas para análise histológica e imunoistoquímica. As amostras foram fixadas em formalina tamponada a 10%, por 24 horas, e conservadas em etanol a 70%. As amostras foram clivadas em sentido sagital e passaram por desidratação em concentrações crescentes de etanol, diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina e, então, foram feitos cortes de 5µm de espessura e aderidos a lâminas silanizadas para realização de imunoistoquímica.

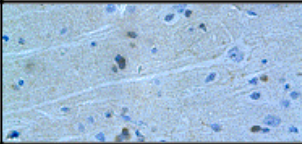
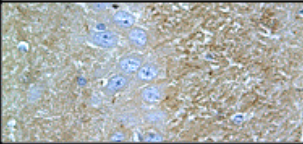
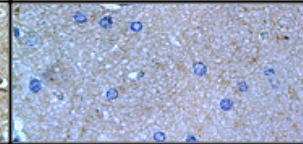
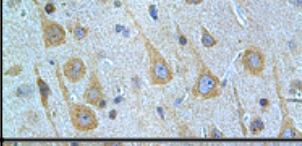
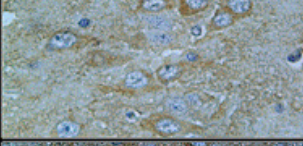
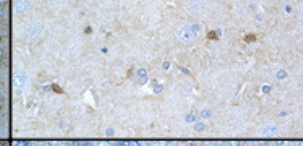
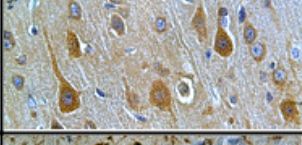
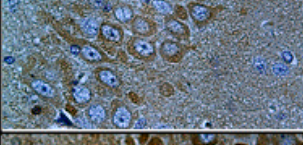
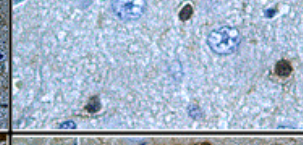
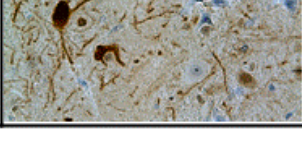
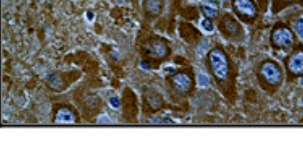
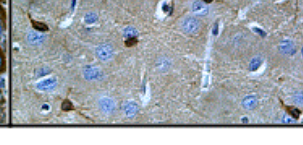
Imunoistoquímica

Após desparafinização e desidratação, os cortes foram incubados por 20 minutos com 30ml de peróxido de hidrogênio, 70ml de metanol e 200µl de Triton- X para bloqueio da atividade da peroxidase endógena. Para a recuperação antigênica foi empregada a solução de citrato de sódio (pH 6,0) em panela de pressão durante três minutos. Para o bloqueio de reações inespecíficas, os cortes foram incubados por uma hora e meia à temperatura ambiente, com soro albumina bovina (BSA) diluído a 3% em solução tampão de fosfatos (PBS). Em seguida, os tecidos foram incubados durante 18 horas (*overnight*), em câmara úmida e a 4°C, com os anticorpos anti-fosfo-ERK 1/2 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) na diluição de 1:200 e anti-fosfo-JNK (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) na diluição de 1:300 em BSA 1,5%. Para amplificação das reações, os cortes foram lavados incubados, à temperatura ambiente, em anticorpo secundário e complexo streptoavidina biotina (Universal LSAB™+ kit/HRP, rabbit/mouse/goat, Dako, Califórnia, USA). A reação foi revelada com solução de diaminobenzidina-peroxidase (*Liquid DAB Substrate Chromogen System*®, Dako, Califórnia, USA) por um minuto. Solução tampão de PBS (pH 7,4) foi utilizado para as lavagens entre as etapas. Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer, por 30 segundos, e montadas com Entellan (Merck, São Paulo, SP). O controle negativo foi realizado para identificar coloração inespecífica, instilando apenas BSA a 1,5% no momento correspondente ao anticorpo primário.

As lâminas foram analisadas quanto à localização e tonalidade de marcação, por microscopia de luz e a marcação mensurada por avaliação semiquantitativa, atribuindo-se os escores de intensidade de coloração relacionados no Quadro 1, adaptados do estudo de FUJIKAWA et al. (2000). Foram observadas a região do córtex cerebral e hipocampo nas lâminas marcadas com p-ERK 1/2 e neurópilo e oligodendrócitos tratados com p-JNK em aumento de 100X, sendo confirmadas em aumento de 400X. A intensidade de marcação foi determinada após avaliação de todas as lâminas tratadas e, posterior definição de tonalidades em escores de gradação de cor.

Para análise estatística, após teste de normalidade, foram aplicados teste de Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney, de acordo com SAMPAIO (2007). Considerou-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A análise estatística foi realizada com o software XLSTAT 2011.

QUADRO 1 – Escores de intensidade de coloração aplicados à análise da marcação dos anticorpos p-pERK1/2 e p-JNK em corpo celular de neurônios e células gliais de cérebros de ratos submetidos à isquemia e reperfusão

Escore	Neurônios: p-ERK1/2	Neurônios: p-JNK	Células gliais: p-JNK
0 (Ausente)			
1 (Discreta)			
2 (Moderada)			
3 (Acentuada)			

RESULTADOS

Análise imunoistoquímica com anticorpo p-ERK 1/2

Poucos neurônios apresentaram expressão de p-ERK, em todos os grupos e tempos de isquemia. A marcação do anticorpo p-ERK 1/2 ocorreu em neurônios corticais, neurônios da região do hipocampo, principalmente, na área do hilo do giro denteado, em vasos sanguíneos e células da glia, nos cinco grupos. O citoplasma de neurônios e núcleo de algumas células foram difusamente marcados, assim como células gliais com evidência de seus prolongamentos citoplasmáticos. Em vasos sanguíneos verificou-se marcação de citoplasma e núcleo das células musculares lisas, todavia, raras células endoteliais isoladas apresentaram-se marcadas, principalmente em I⁴⁵. Os animais submetidos à isquemia apresentaram marcação de células satélites e pericitos, variável entre os grupos.

Houve variação de intensidade na marcação da forma ativa dessa proteína nos diferentes grupos e em todos os subgrupos. A ausência de marcação nos capilares foi observada em 100% das amostras. No tempo I⁰ e I⁵, em todos os grupos, entre 70% a 95% dos animais não apresentaram marcação em neurônios corticais e do hipocampo (Tabela 1). Nesses dois tempos não houve diferença significativa entre os grupos quanto à marcação de neurônios (Figura 2 e 3).

Em I²⁰, G1, G2 e G5 apresentaram marcação variando entre ausente a acentuada, em neurônios corticais, sendo significativamente superior aos grupos G3 e G4, em que a marcação variou de ausente a moderada e 70% a 95% das amostras apresentaram ausência de marcação (Figura 2 e Tabela 1). Nessa região, em I⁴⁵, a expressão de p-ERK1/2 foi significativamente maior em G1 e G5, quando comparados a G2, G3 e G4, em que marcação ausente foi observada em 90% das amostras (Tabela 1).

No hipocampo, em I²⁰, G1 e G5 apresentaram marcação ausente a moderada (Tabela 1). Em G2, variou de ausente a acentuada, sendo significativamente maior que G1, G3 e G4 (Figura 3). A marcação em G3 e G4 foi de ausente a discreta, sendo que 85% a 95% não expressaram p-ERK1/2. No

tempo I^{45} a marcação apresentou-se mais intensa em G1, G2 e G3 (Tabela 1). Neste tempo, G1 foi significativamente diferente de G3, G4 e G5 (Figura 3). Em G5 a marcação variou de ausente a moderada e nos outros grupos de ausente a acentuada (Tabela 1).

Tabela 1 - Frequência da marcação com anticorpo anti-p-ERK1/2 em neurônios corticais (NC) e neurônios do hipocampo (NH) de ratos submetidos a isquemia e reperfusão, Goiânia, 2010.

Grupo 1 (%)																
Momentos	I^0				I^5				I^{20}				I^{45}			
Escores	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
NC	90	10	0	0	75	20	5	0	55	25	10	10	10	45	30	15
NH	75	25	0	0	95	5	0	0	80	15	5	0	30	25	10	25
Grupo 2 (%)																
Escores	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
NC	90	10	0	0	80	35	5	0	50	30	15	5	90	0	0	10
NH	85	15	0	0	90	10	0	0	50	25	20	5	65	5	10	20
Grupo 3 (%)																
Escores	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
NC	85	15	0	0	75	20	5	0	90	10	0	0	90	0	0	10
NH	95	5	0	0	80	20	0	0	95	5	0	0	60	10	10	20
Grupo 4 (%)																
Escores	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
NC	95	5	0	0	70	25	5	0	70	10	15	0	90	10	0	0
NH	95	5	0	0	75	15	10	0	85	15	0	0	75	5	10	10
Grupo 5 (%)																
Escores	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
NC	70	10	20	0	70	30	0	0	35	30	20	10	45	20	35	0
NH	85	15	0	0	95	5	0	0	65	15	20	0	55	40	5	0

Onde: Escores: 0-ausência de marcação; 1-marcação discreta; 2-marcação moderada e 3-marcação acentuada. Grupos - G1: controle; G2, G3 e G4: ratos tratados com extrato etanólico da casca de pequi a 100mg/kg, 300 mg/kg e 600 mg/kg, respectivamente e G5: vitamina E. Tempos de isquemia - I^0 : sem isquemia, I^5 : cinco minutos; I^{20} : 20 minutos e I^{45} : 45 minutos;

A expressão de ERK1/2 fosforilada sem a ação dos antioxidantes, no córtex cerebral, tem indícios de aumentar de I^0 para I^{45} . Na região do hipocampo, a expressão reduziu em I^5 , elevou-se em I^{20} e, mais intensamente, em I^{45} (Figura 4A e B). Nos grupos tratados, especialmente com extrato da casca de pequi, observou-se diminuição da expressão de p-ERK 1/2, principalmente em I^{45} , em neurônios corticais e hipocampais (Figura 4C e D).

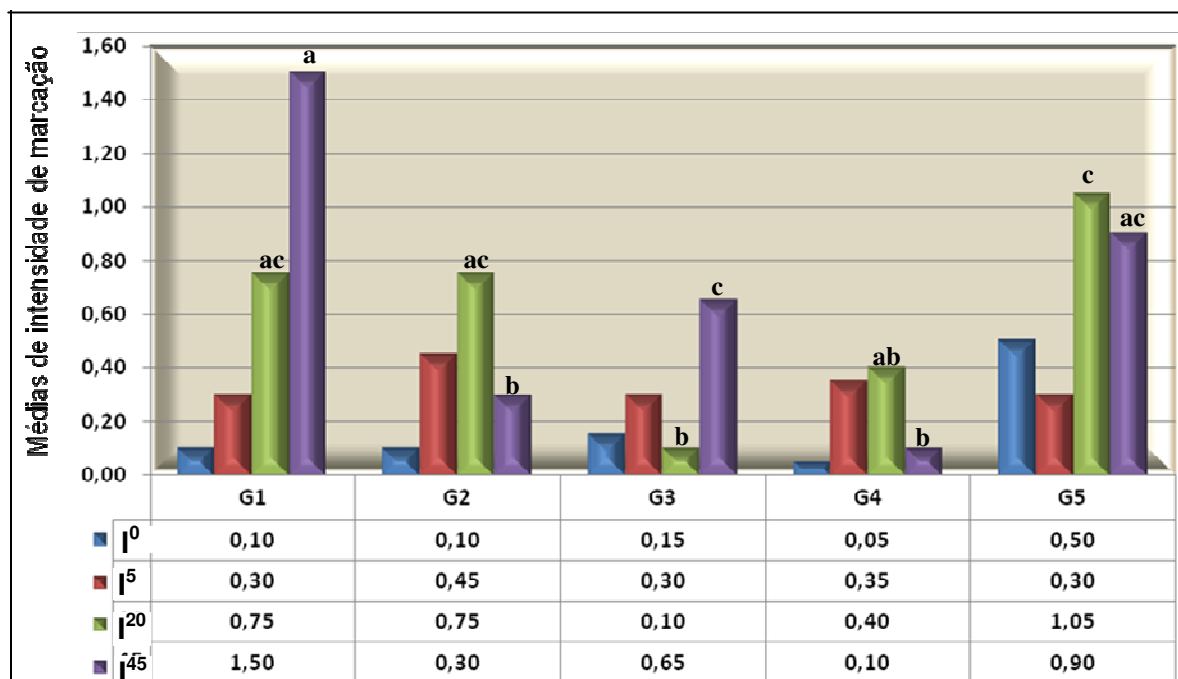


FIGURA 2 – Expressão de p-ERK 1/2 em neurônios do córtex cerebral de ratos submetidos à isquemia e reperfusão após tratamento com extrato etanólico da casca de pequi a 100 (G2), 300 (G3) e 600 (G4) mg/kg, vitamina E (G5) e não tratados (G1). abc- momentos com letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre grupos e momentos sem letras não diferem significativamente ($p > 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

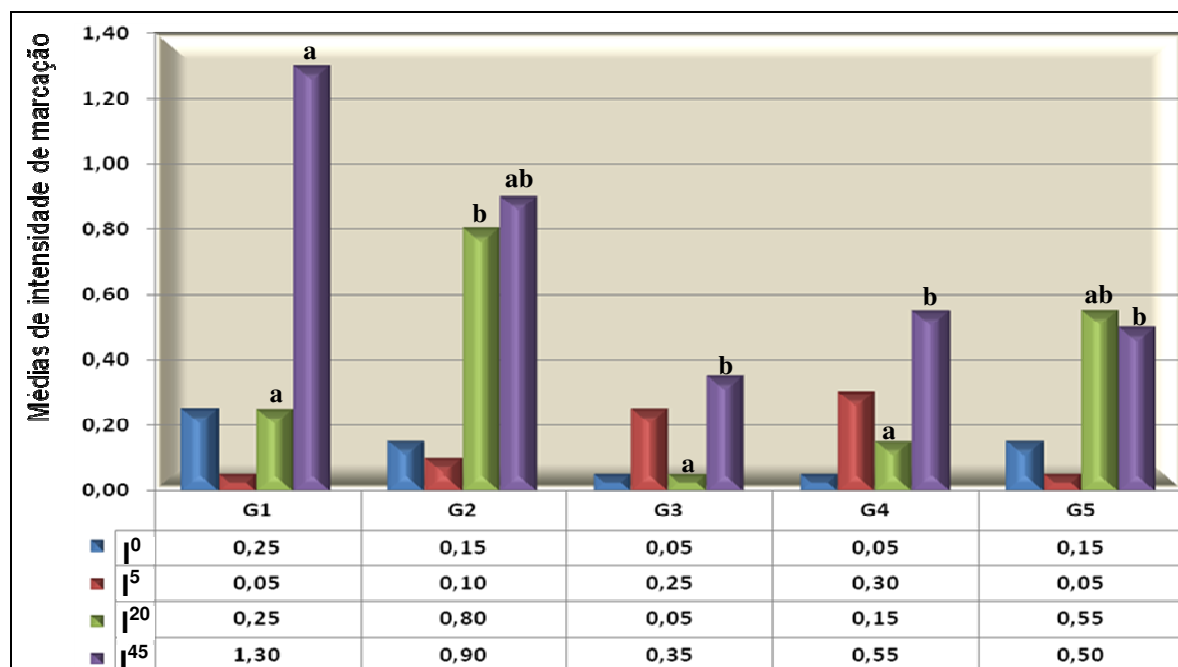


FIGURA 3 – Expressão de p-ERK 1/2 em neurônios do hipocampo de ratos submetidos à isquemia e reperfusão após tratamento com extrato etanólico da casca de pequi a 100 (G2), 300 (G3) e 600 (G4) mg/kg, vitamina E (G5) e não tratados (G1). ab- momentos com letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre grupos e momentos sem letras não diferem significativamente ($p > 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

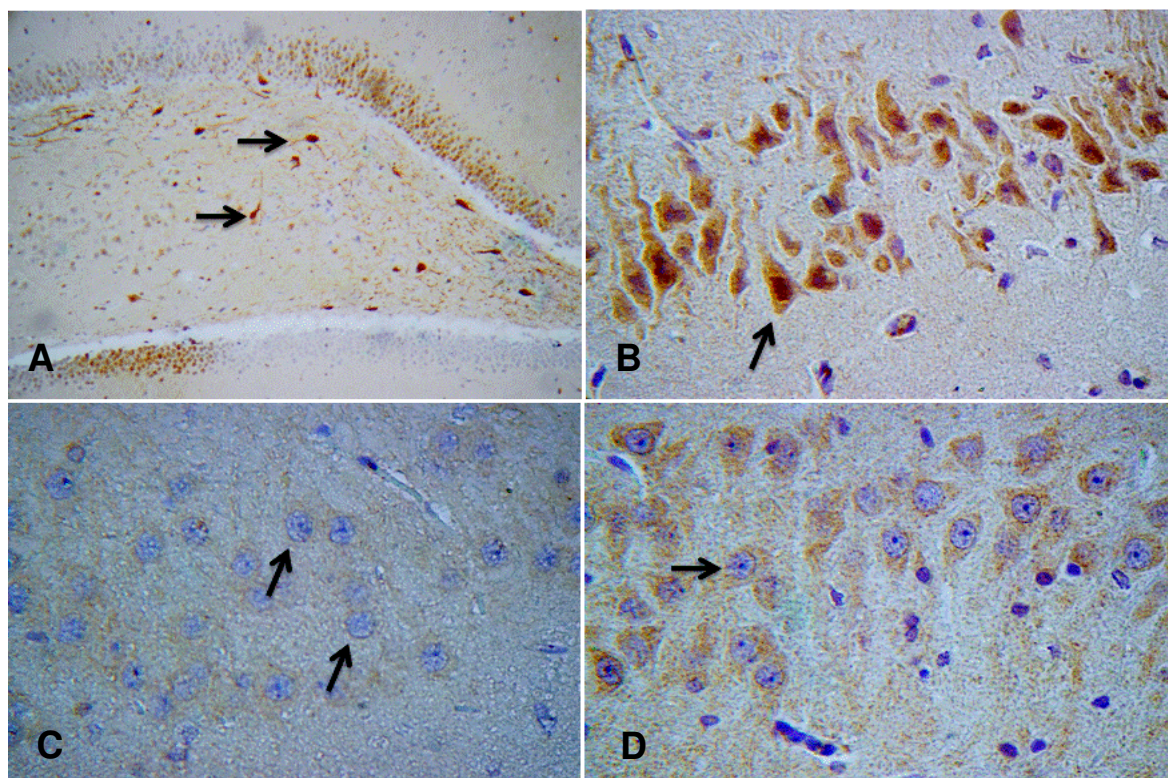


FIGURA 4 – Fotomicrografias do hipocampo de cérebro de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Nas imagens evidenciam-se neurônios com o anticorpo anti-p-ERK1/2 (seta). Em A, hilo do giro dentado do Grupo controle (G1) subgrupo 45 minutos de isquemia (I^{45}). Em B, região CA1 do Grupo controle (G1) subgrupo 45 minutos de isquemia (I^{45}). Em C, região CA1 do Grupo tratado com 600mg/kg de extrato etanólico da casca de pequi (G4) subgrupo 20 minutos de isquemia (I^{20}). Em D, região CA3 do Grupo tratado com 100mg/kg de extrato etanólico da casca de pequi (G2) subgrupo 20 minutos de isquemia (I^{20}). Imunomarcacão com anti-phospho-ERK1/2. A: 100X e B, C e D: 400X.

Análise imunoistoquímica com anticorpo p-JNK

Em todos os grupos, células da glia (astrócitos e oligodendrócitos), da região cortical e da substância branca apresentaram marcação nuclear e citoplasmática pelo anticorpo p-JNK, em todos os tempos estudados (Figura 5B). As células gliais apresentaram diferenças de expressão entre os tempos de isquemia. A marcação neuronal foi observada somente no citoplasma, principalmente em neurônios piramidais de CA3 do hipocampo (Figura 5A), não havendo em nenhum tempo de isquemia marcação nuclear de neurônios em nenhuma das regiões estudadas (Figura 5A e B).

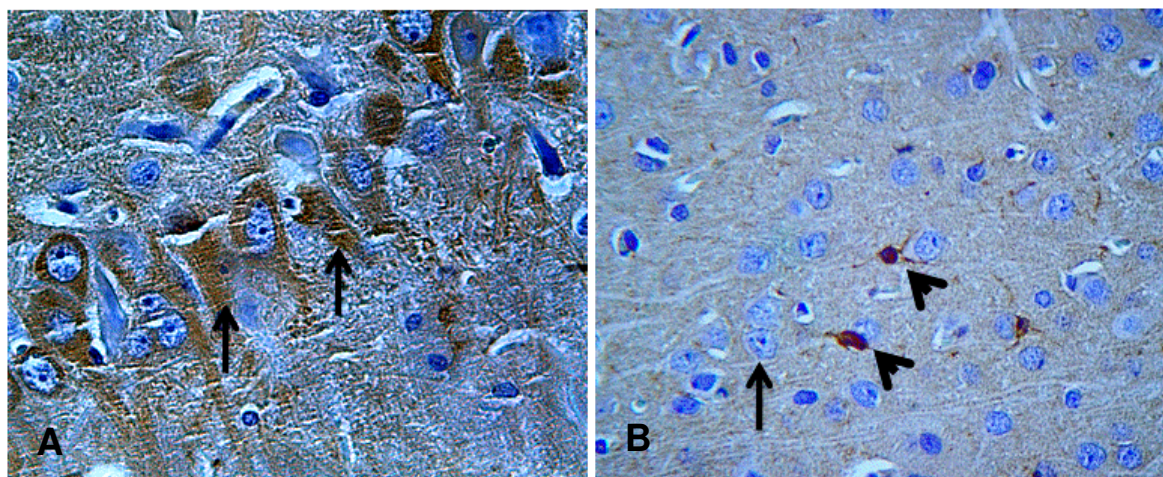


FIGURA 5 – Fotomicrografias do cérebro de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Nas imagens evidenciam-se neurônios (seta) e células gliais (cabeça de seta) marcados com o anticorpo anti-p-JNK. Em A, citoplasma de neurônios CA3 do Grupo tratado com 300mg/kg de vitamina E (G5) subgrupo cinco minutos de isquemia (I^5). Em B, células gliais no córtex cerebral do Grupo tratado com 600mg/kg de extrato etanólico da casca de pequi (G4) subgrupo cinco minutos de isquemia (I^5). Imunomarcação com anti-phospho-JNK, 400X.

A expressão de p-JNK em neurônios piramidais de CA3 não apresentou diferença significativa entre os grupos (Tabela 2). No tempo I^0 de todos os grupos, 60% a 80% dos neurônios apresentaram ausência de marcação. Em I^5 , 40% a 80% das células apresentaram ausência de marcação em todos os grupos e em I^{20} essa mesma porcentagem de neurônios estavam moderadamente marcados. A marcação da maioria das células variou de ausente a moderada em I^{45} .

No G1, 60% das células da glia apresentaram marcação acentuada em I^0 e I^{45} e moderada em I^5 e I^{20} . G2 apresentou, em I^0 , 80% dessas células com marcação discreta e, em I^5 , I^{20} e I^{45} , 60% das amostras foram de intensidade moderada. Observou-se em G3, 80% das amostras de intensidade acentuada em I^0 , 40% das células com marcação acentuada e 40% discreta em I^5 e I^{45} e de moderada a acentuada em I^{20} . Em G4, nos tempos I^0 e I^5 a marcação foi predominantemente moderada e, em I^{20} e I^{45} , 80% das células apresentaram marcação acentuada. Em G5, observou-se marcação predominantemente discreta em I^0 e I^{45} , já em I^5 e I^{20} variou de moderada a acentuada (Tabela 2). Não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum dos tempos.

A expressão de JNK fosforilada sem a ação dos antioxidantes, em neurônios piramidais de CA3, tem indícios de aumentar a intensidade de marcação de I⁰ para I⁴⁵. No grupo tratado com vitamina E, observou-se uma discreta redução da intensidade de marcação em neurônios de CA3 nos tempos I⁵, I²⁰ e I⁴⁵ em relação ao grupo controle. Nos grupos tratados com extrato da casca de pequi, a marcação de neurônios de CA3 foi semelhante ao grupo controle. Em células gliais, a marcação manteve-se intensa em todos os subgrupos do grupo controle. Nos grupos tratados com antioxidantes, a expressão de p-JNK nessas células diminui, principalmente, com uso de 100 e 300mg/kg de peso de extrato etanólico da casca de pequi e com vitamina E.

Tabela 2 - Frequência da marcação com anticorpo anti-p-JNK em neurônios piramidais CA3 e células gliais (glia) de cérebro de ratos submetidos a isquemia e reperfusão, Goiânia, 2010.

Grupo 1 (%)																
Momentos	I ⁰				I ⁵				I ²⁰				I ⁴⁵			
Escore	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
CA3	80	20	0	0	60	0	40	0	0	40	40	20	40	20	40	0
Glia	0	0	40	60	0	0	60	40	0	0	60	40	0	0	40	60
Grupo 2 (%)																
Escore	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
CA3	60	40	0	0	60	0	40	0	40	0	40	20	80	0	20	0
Glia	0	80	0	20	0	20	60	20	0	20	60	20	0	20	80	0
Grupo 3 (%)																
Escore	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
CA3	60	40	0	0	60	0	40	0	20	20	60	0	60	20	20	0
Glia	0	20	0	80	0	40	20	40	0	20	40	40	0	40	20	40
Grupo 4 (%)																
Escore	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
CA3	80	20	0	0	80	0	20	0	0	40	40	20	20	20	40	20
Glia	0	0	100	0	0	40	40	20	0	0	20	80	0	0	20	80
Grupo 5 (%)																
Escore	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
CA3	80	20	0	0	40	40	20	0	20	0	80	0	60	0	40	0
Glia	0	60	40	0	0	40	60	0	0	20	40	40	0	60	20	20

Não houve diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

Onde: Escores: 0-ausência de marcação; 1-marcação discreta; 2-marcação moderada e 3-marcação acentuada. Grupos - G1: controle; G2, G3 e G4: ratos tratados com extrato etanólico da casca de pequi a 100mg/kg, 300 mg/kg e 600 mg/kg, respectivamente e G5: vitamina E. Tempos de isquemia - I⁰: sem isquemia, I⁵: cinco minutos; I²⁰: 20 minutos e I⁴⁵: 45 minutos.

DISCUSSÃO

Este estudo é pioneiro em descrever informações relativas à localização e expressão de p-ERK1/2 e p-JNK em cérebro de ratos submetidos a I/R após uso de extrato etanólico da casca de pequi. CHU et al. (2004) mostraram que p-ERK está presente no tecido nervoso e é ativada por inúmeros estímulos extracelulares, sendo na I/R principalmente por ativação dos receptores de glutamato, devido ao estresse oxidativo. De acordo com SUGINO et al. (2000), a isquemia global transitória promove ativação de ERK1/2, p38 e JNK. Nesse contexto, o presente estudo verificou a diferença de fosforilação de ERK1/2 e JNK nos grupos tratados que receberam vitamina E e extrato etanólico da casca de pequi.

No presente estudo, verificou-se que, no córtex cerebral e hipocampo do grupo controle, a expressão de ERK1/2 fosforilada aumentou à medida que se prolongava os tempos de isquemia, apresentando maior quantidade de amostras com intensidade acentuada, utilizando o tempo de 45 minutos de isquemia após duas horas de reperfusão. Esses achados corroboram o estudo realizado por NAMURA et al. (2001), que observaram após isquemia cerebral global aumento de p-ERK1/2 persistente até uma hora após a reperfusão. Achados semelhantes foram encontrados por FERRER et al. (2003), que observaram aumento da expressão de p-ERK1/2 nas primeiras horas de reperfusão (uma a quatro horas) em neurônios da região acometida por uma hora de isquemia focal.

No presente estudo, os grupos tratados com antioxidantes, apresentaram diminuição da expressão da proteína em comparação ao grupo controle, com variações entre os tempos e de acordo com o suplemento utilizado. Em estudo realizado por GAO et al. (2008) em ratos, foi observado que o pré-condicionamento isquêmico inibe a expressão de p-JNK e p-ERK1/2, sendo que essa encontra-se aumentada de uma a 24 horas após o evento isquêmico sem o tratamento. HICKS et al. (2000) ao avaliar o efeito da hipotermia na ativação de p-ERK após I/R cerebral global, verificou, no hipocampo, aumento da expressão da proteína durante a reperfusão. Todos estes trabalhos associaram a inibição de p-ERK com a sobrevivência celular. Portanto, diante dos achados do presente estudo, sugere-se que a inibição da atividade de ERK1/2 pode contribuir para um

efeito protetor após administração de antioxidantes, já que observamos maior expressão no grupo controle após duas horas de reperfusão em relação aos tratados.

Os grupos tratados com extrato etanólico da casca de pequi, principalmente o grupo que recebeu 600mg/kg, apresentaram menor expressão de p-ERK1/2 quando comparados ao grupo tratado com vitamina E. Dessa forma, pode-se inferir que as ações antioxidante e neuroprotetora do extrato utilizado nesta investigação podem estar envolvidas em inibição precoce da fosforilação de ERK1/2, possivelmente por redução do estresse oxidativo e da ativação dos receptores de glutamato, conforme citado por STANCIU et al. (2000), LI et al. (2008) e SZYDLOWSKA et al. (2010).

Neste trabalho, notou-se expressão de p-ERK em células musculares lisas de pequenos vasos. De acordo com MADDAHI & EDVINSSON (2008), a fosforilação de ERK1/2 em células musculares lisas de vasos sanguíneos está relacionada ao aumento do número de receptores de contratilidade da microvasculatura da região isquêmica. Estes autores verificaram que a inibição de MEK1 (precursor de ERK1/2) até seis horas após a isquemia cerebral reduz a ativação de ERK1/2, de receptores vasculares (endotelina, serotonina e angiotensina) e, conseqüentemente, atenuam o infarto cerebral. Em estudo similar, MADDAHI et al. (2009) verificaram que inibição de fosforilação ERK1/2 reduz a expressão de metaloproteases (MMP-9) e inibidores teciduais de metaloproteases (TIMP-1), diminuindo alterações na barreira hematoencefálica, edema e a área de infarto cerebral.

No presente estudo não se observou expressão de p-JNK em neurônios da região cortical. A fosforilação de JNK foi observada, principalmente, em células da glia, em todos os grupos estudados, tanto na região cortical quanto na substância branca. O mesmo foi observado por LENNMYR et al. (2002), que após seis horas da isquemia cerebral focal não encontrou marcação neuronal e observaram que células da glia da região cortical apresentavam marcação intensa.

No hipocampo, marcação do citoplasma de neurônios piramidais da região CA3 foi vista em todas as amostras. Achado semelhante foi observado por HICKS et al. (2000) em estudo para avaliação de neuroproteção por hipotermia,

em que encontrou expressão mais abundante de p-JNK, após reperfusão, no giro denteado e em CA3; adicionalmente, a localização de ativação de JNK e ERK1/2 aconteceu em regiões diferentes. Em contraste a esse relato, no presente trabalho a maioria das células não foram marcadas pelo anticorpo, o que possivelmente está associado ao tempo de reperfusão de duas horas não ter sido suficiente para a ativação de JNK. De acordo com REPICI et al. (2007), a ativação de p-JNK na região acometida pela isquemia acontece à partir de 3 horas após o evento e tem seu pico seis horas após. No entanto, observou-se marcação de neurônios em CA3 em todos os tempos sem diferença significativa entre os grupos, sendo mais pronunciada aos 20 e 45 minutos de isquemia após duas horas de reperfusão. SUGINO et al. (2000) relataram imunoreatividade de p-JNK em CA3 30 minutos após cinco minutos de isquemia global transitória que continuou até 72 horas após o início da reperfusão.

As proteínas p-ERK1/2 e p-JNK foram expressas em cérebros de ratos após I/R, sendo que, no grupo controle, a ERK1/2 fosforilada apresentou aumento durante os tempos de isquemia. Esta proteína apresentou menor expressão em neurônios de cérebros de ratos tratados com doses mais altas de extrato etanólico da casca de pequi. Este achado demonstra que o extrato promove redução da expressão de ERK1/2 ativada, podendo ser esse um dos mecanismos moleculares envolvidas na neuroproteção conferida pelo extrato.

CONCLUSÃO

O extrato etanólico da casca de pequi pode reduzir a expressão de fosfo-ERK1/2 em neurônios de cérebros de ratos submetidos à isquemia transitória global e reperfusão de duas horas. Não houve diferença de expressão de p-JNK entre os diferentes grupos e tempos de isquemia.

REFERÊNCIAS

1. ALESSANDRINI, A.; NAMURA, S.; MOSKOWITZI, M. A.; BONVENTRE, J. V. MEK1 protein kinase inhibition protects against damage resulting from focal cerebral ischemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 22, 12866-12869, p. 1999.

2. BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p.123-130, 1999.
3. BRECHT, S.; KIRCHHOF, R.; CHROMIK, A.; WILLESEN, M.; NICOLAUS, T.; RAIVICH, G.; WESSIG, J.; WAETZIG, V.; GOETZ, M.; CLAUSSEN, M.; PEARSE, D.; KUAN, C.; VAUDANO, E.; BEHRENS, A.; WAGNER, E.; FLAVELL, R. A.; DAVIS, R. J.; HERDEGEN, T. Specific pathophysiological functions of JNK isoforms in the brain. **European Journal of Neuroscience**, Oxford, v. 21, p. 363–377, 2005.
4. CHU, C. T.; LEVINTHAL, D. J.; KULICH, S. M.; CHALOVICH, E. M.; DEFRANCO, D. B. Oxidative neuronal injury: The dark side of ERK1/2. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 271, p. 2060–2066, 2004.
5. DIAS, L. A. A.; COLLI, B. O.; NETTO, J. C.; LACHAT, J. J. Avaliação da isquemia cerebral focal induzida pela oclusão da artéria cerebral média e a ação neuroprotetora do cetoprofeno em ratos. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 58, n. 4, p. 1047-1054, 2000.
6. FERRER, I; FRIGULS, B.; DALFÓ, E.; PLANAS, M. Early modifications in the expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK), stress-activated kinases SAPK/JNK and p38, and their phosphorylated substrates following focal cerebral ischemia. **Acta Neuropathologica**, New York, v. 105, p. 425-437, 2003.
7. FLECKNELL, P. A.; RICHARDSON, C. A.; POPOVIC, A. Laboratory animals. In: TRANQUILI, W. J.; THURMON, J.C.; GRIMM, K. A. **Lumb & Jones' veterinary anesthesia and analgesia**. 4.ed. Iowa: Blackwell Publishing. cap. 30, p. 765-783, 2007.
8. FUJIKAWA, D. G.; SHINMEI, S. S.; CAI, B. Kainic acid-induced seizures produce necrotic, not apoptotic, neurons with internucleosomal DNA cleavage: implications for programmed cell death mechanisms. **Neuroscience**, Oxford, v. 98, p. 41–53, 2000.
9. FUKUNAGA, K.; MIYAMOTO, E. Role of MAP kinase in neurons. **Molecular Neurobiology**, New York, v. 16, n. 1, p. 79-9, 1998.
10. GAO, Y.; SIGNORE, A. P.; YIN, W.; CAO, G.; YIN, X. M. SUN, F.; LUO, Y.; GRAHAM, S. H.; CHEN, J. Neuroprotection against focal ischemic brain injury by inhibition of c-Jun N-terminal kinase and attenuation of the mitochondrial apoptosis-signaling pathway. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, Hagerstown, v. 25, p. 694-712, 2005.
11. GAO, X.; ZHANG, H.; TAKAHASHI, T.; HSIEH, J.; LIAO, J.; STEINBERG, G. K.; ZHAO, H. The Akt signaling pathway contributes to postconditioning's protection against stroke; the protection is associated with the MAPK and PKC pathways. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 105, p. 943–955, 2008.

12. HICKS, S. D.; PARMELE, K. T.; DEFRANCO, D. B.; KLANN, E.; CALLAWAY, C. W. Hypothermia differentially increases extracellular signal-regulated kinase and stress-activated protein kinase/c-jun terminal kinase activation in the hippocampus during reperfusion after asphyxial cardiac arrest. **Neuroscience**, Oxford, v. 98, n. 4, p. 677–685, 2000.
13. HO, Y.; LOGUE, E.; CALLAWAY, C. W.; DEFRANCO, D. B. Different mechanisms account for extracellular-signal regulated kinase activation in distinct brain regions following global ischemia and reperfusion. **Neuroscience**, Oxford, v. 145, p. 248–255, 2007.
14. KHOURI, J.; RESCK, I. S.; POÇAS-FONSECA, M.; SOUSA, T. M. M.; PEREIRA, L.O.; OLIVEIRA, A. B. B.; GRISOLIA, C. K. Anticlastogenic potential and antioxidant effects of an aqueous extract of pulp from the pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb). **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v.30, n.2, p.442-448, 2007.
15. LENNMYR, F.; KARLSSON, S.; GERWINS, P.; ATA, K. A.; TERÉNT, A. Activation of mitogen-activated protein kinases in experimental cerebral ischemia. **Acta Neurologica Scandinavica**, Copenhagen, v.106, p. 333–340, 2002.
16. LI, Y.; XU, W.; MCBURNEY, M. W.; LONGO, V. D. SirT1 Inhibition Reduces IGF-I/IRS-2/Ras/ERK1/2 signaling and protects neurons. **Cell Metabolism**, Cambridge, v. 8, p. 38–48, 2008.
17. LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.).** 2008. 182p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Ciência dos Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, USP – São Paulo.
18. MADDAHI, A.; CHEN, Q.; EDVINSSON, L. Enhanced cerebrovascular expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 via the MEK/ERK pathway during cerebral ischemia in the rat. **BioMed Central Neuroscience**, v. 10, n. 56, p. 1-12, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2700114/pdf/1471-2202-10-6.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2011.
19. MADDAHI, A.; EDVINSSON, L. Enhanced expressions of microvascular smooth muscle receptors after focal cerebral ischemia occur via the MAPK MEK/ERK pathway. **BioMed Central Neuroscience**, v. 9, n. 85, p. 1-13, 2008. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2202-9-85.pdf> Acesso em: 05 jan. 2011
20. MAHERA, P.; SCHUBERTB, D. Signaling by reactive oxygen species in the nervous system. **Cellular and Molecular Life Science**, Basel, v. 57, p. 1287–1305, 2000.

21. MIELKE, K.; HERDEGEN, T. JNK and p38 stresskinases - degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. **Progress in Neurobiology**, Oxford, v. 61, p. 45 – 60, 2000.
22. MUNIZ, L. R. F.; FARIA, M. H. G.; VASCONCELOS, P. R. L. Avaliação metabólica das lesões de isquemia e reperfusão cerebrais após oclusão bilateral das artérias carótidas comuns: estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 19, n. 5, p. 529-534, 2004.
23. NAMURA, S.; IIHARA, K.; TAKAMI, S.; NAGATA, I.; KIKUCHI, H.; MATSUSHITA, K.; MOSKOWITZ, M. A.; BONVENTRE, J. V.; ALESSANDRINI, A. Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 affords brain protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 20, p. 11569–11574, 2001.
24. OTANI, N.; NAWASHIRO, H.; FUKUI, S.; NOMURA, N.; YANO, A.; MIYAZAWA, T.; SHIMA, K. Differential activation of mitogen-activated protein kinase pathways after traumatic brain injury in the rat hippocampus. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, Hagerstown, v. 22, p. 327–334, 2002.
25. PASSOS, X. S.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; FERNANDES, O. F. L.; PAULA, T. F.; GARCIA, A. C. F.; SILVA, M. R. R. Atividade Antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 6, p. 623–627, 2002.
26. REPICI, M.; CENTENO, C.; TOMASI, S.; FORLONI, G.; BONNY, C.; VERCELLI, A.; BORSELLO, T. Time-course of c-Jun N-terminal Kinase activation after cerebral ischemia and effect of D-JNKI1 on c-Jun and caspase-3 activation. **Neuroscience**, Oxford, v. 150, p. 40-49, 2007.
27. ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.
28. SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 3.ed., Belo Horizonte: FEP-MVZ, 2007. 264 p.
29. SANNA, M. G.; DUCKETT, C. S.; RICHTER, B. W. M.; THOMPSON, C. B.; ULEVITCH, R. J. Selective activation of JNK1 is necessary for the anti-apoptotic activity of hILP. **Biochemistry**, Washington, v. 95, p. 6015–6020, 1998.
30. STANCIU, M.; WANG, Y.; KENTOR, R.; BURKE, N.; WATKINS, S.; KRESSI, G.; REYNOLDS, I.; KLANN, E.; ANGIOLIERI, M. R.; JOHNSON, J. W.; DEFRANCO, D. B. Persistent Activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 275, n. 16, p. 12200–12206, 2000.

31. STVOLINSKY, S.; KUKLEY, M.; DOBROTA, D.; MEZESOVA, V.; BOLDYREV, A. Carnosine protects rats under global ischemia. **Brain Research Bulletin**, New York, v. 53, n. 4, p. 445-448, 2000.
32. SUBRAMANIAM, S.; UNSICKER, K. Extracellular signal-regulated kinase as an inducer of non-apoptotic neuronal death. **Neuroscience**, Oxford, v. 138, p. 1055–1065, 2006.
33. SUGAWARA, T.; FUJIMURA, M.; NOSHITA, N.; KIM, G. W.; SAITO, A.; HAYASHI, T.; NARASIMHAN, P.; MAIER, C. M.; CHAN, P. H. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. **The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, Maryland, v. 1, p. 17-25, 2004.
34. SUGINO, T.; NOZAKI, K.; TAKAGI, Y.; HATTORI, I.; HASHIMOTO, N.; MORIGUCHI, T.; NISHIDA, E. Activation of mitogen-activated protein kinases after transient forebrain ischemia in gerbil hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 20, n. 12, p. 4506-4514, 2000.
35. SZYDLOWSKA, K.; GOZDZ, A.; DABROWKI, M.; ZAWADZKA, M.; KAMINSKA, B. Prolonged activation of ERK triggers glutamate-induced apoptosis of astrocytes: neuroprotective effect of FK506. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 113, p. 904-918, 2010.
36. TAGAMI, M.; YAMAGATA, K.; IKEDA, K. NARA, Y.; FUJINO, H.; KUBOTA, A.; NUMANO, F.; YAMORI, Y. Vitamin E prevents apoptosis in cortical neurons during hypoxia and oxygen reperfusion. **Laboratory Investigation**, Hagerstown, v. 78, n. 11, p. 1415-1429, 1998.
37. TASHKER, J. S.; OLSON, M.; KORNBLUTH, S. Post–Cytochrome c protection from apoptosis conferred by a MAPK pathway in *Xenopus* egg extracts. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 13, p. 393-401, 2002.
38. XIA, Z.; DICKENS, M.; RAINGEAUD, J.; DAVIS, R. J.; GREENBERG, M. E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP Kinases on apoptosis, **Science**, Washington, v. 270, p. 1326-1331, 1995.
39. ZHANG, B.; TANAKA, J.; YANG, L.; SAKANAKA, M.; HATA, R.; MAEDA, N.; MITSUDA, N. Protective effect of vitamin E against focal brain ischemia and neuronal death through induction of target genes of hypoxia-inducible factor-1. **Neuroscience**, Oxford, v.126, n. 2, p. 433-440, 2004.

CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo realizado investigou a ação do extrato etanólico da casca de pequi por meio da avaliação histomorfológica e da expressão de proteínas envolvidas no processo de apoptose e sobrevivência celular, em um modelo experimental de isquemia e reperfusão cerebral global transitória e reperfusão de duas horas com ratos Wistar. Este estudo foi o pioneiro em utilizar o extrato etanólico bruto da casca de pequi como método preventivo de lesões de isquemia e reperfusão cerebral “*in vivo*”.

Diante dos achados, este modelo mostrou-se eficiente para promover lesões de isquemia e reperfusão, quando associada à oclusão de dois vasos com método anestésico que gera hipotensão. Verificou-se, também, que a coloração de rotina de hematoxilina e eosina permite a identificação de neurônios com morfologia isquêmica.

A interrupção da oxigenação cerebral é capaz de desencadear diversas respostas locais e várias condições clínicas e cirúrgicas, como estado de choque e hipotensão acentuada, parada cardíaca, tromboembolias podem ser responsáveis por desencadear o processo isquêmico. A isquemia isoladamente é responsável por causar lesões no tecido nervoso e quanto antes houver o retorno do fluxo sanguíneo menores serão as alterações teciduais. Porém, apesar da fundamental importância da reperfusão para o reestabelecimento das funções normais do tecido em anóxia, o retorno do sangue rico em oxigênio resulta em uma cascata de eventos, que exacerbam o dano tecidual, resultando em perda da função celular e falência do órgão.

Sabendo da fundamental importância da lesão de isquemia e reperfusão após submeter qualquer tecido a este processo, torna-se relevante um entendimento de sua fisiopatologia, além da criação de modelos experimentais de isquemia e reperfusão que sejam simples, reprodutíveis e consistentes, com intuito de testar tratamentos que possam atenuar as lesões decorrentes desse tipo de intervenção.

Então, a realização deste trabalho considerou a possibilidade de que as lesões de isquemia e reperfusão pudessem ser minimizadas com o uso prévio de antioxidantes naturais, podendo assim haver diminuição de morte celular.

Assim, diante de tal perspectiva, consideraram-se, a presença de células morfológicamente em necrose e a avaliação de proteínas envolvidas no processo de apoptose e sobrevivência celular como parâmetros para avaliar a eficácia do extrato etanólico da casca de pequi na prevenção de lesões de isquemia e reperfusão, após períodos de isquemia de 5, 20 e 45 minutos e 2 horas de reperfusão. O extrato etanólico bruto da casca de pequi mostrou ação neuroprotetora por minimizar as lesões celulares, reduzir expressão de proteínas ativadoras de apoptose, como caspase-3 clivada, e proteínas envolvidas com a proteção e sobrevivência celular, como a p-ERK1/2.

Para a identificação das substâncias presentes na casca de pequi que são capazes de promover a neuroproteção faz-se necessário testes químicos para separação e identificação dos compostos presentes nesta parte do vegetal, até mesmo para garantir que não existem substâncias nocivas ao homem e animais.

As expectativas de estudos futuros poderia ser proposta empregando-se outras técnicas, como microscopia eletrônica, que possibilitaria uma avaliação qualitativa das alterações celulares e confirmação da necrose celular; *Western Blot* e o teste de TUNEL, que permitiriam análise quantitativa das proteínas e a identificação de células apoptóticas, podendo dar maior suporte para discussões de sua associação nos mecanismos fisiopatogênicos que culminam com a síndrome da isquemia cerebral. Além disso, a quantificação de proteínas oxidadas e de compostos de lipoperoxidação no tecido cerebral isquêmico traria maiores informações quanto ao efeito antioxidante dos suplementos utilizados.

Outra possibilidade de estudo é a utilização de modelos de isquemia e reperfusão *in vitro*, que possuem importância relevante para o maior entendimento dos mecanismos de ação do extrato etanólico da casca de pequi como agente antioxidante e neuroprotetor. A cultura de células permite a reprodutibilidade do modelo *in vivo*, garantindo a redução do número de animais. Além disso, permite a avaliação da resposta celular à suplementação, isoladamente da ação de outras células e componentes endógenos do tecido que possam interferir na ação do produto.

Os suplementos utilizados são promissores para reduzir as lesões precoces de isquemia e reperfusão cerebral. No entanto, para assegurar o uso do

extrato etanólico da casca de pequi na saúde humana e animal, torna-se imprescindível a realização de testes direcionados ao efeito tóxico do extrato etanólico da casca de pequi e análise da composição química do vegetal. Sugere-se a utilização de estudos que utilizem modelos de cultivo celular ou diferentes vias de aplicação em espécies animais diversas, usando esse extrato em diferentes dosagens e, principalmente, superiores às utilizadas neste estudo. Os modelos *in vivo* devem associar e comparar os achados de índice de mortalidade, análises comportamental, clínicas e anatomopatológicas aos resultados dos testes bioquímicos, moleculares e dos estudos *in vitro*.

O pequi é um fruto do cerrado que possui grande importância na culinária regional e tem conquistado paladares de diversas regiões do Brasil. Além disso, pesquisas mostram que este vegetal possui propriedades benéficas para a saúde humana, seja para tratamento como para prevenção de doenças. Ainda, testes *in vitro* revelaram que as diferentes partes do pequi possuem agentes antioxidantes potentes para a neutralização de radicais livres. Assim, a utilização da casca deste fruto, parte que é descartada, poderá ser empregado como método terapêutico ou preventivo de lesões de isquemia e reperfusão, além de promover um impacto na conscientização ambiental.

Nos últimos tempos a exploração do cerrado e o crescimento da agropecuária tem devastado áreas imensas deste tipo de vegetação. Assim, esta descoberta poderá servir como aviso de que o extermínio do cerrado também colocará fim em importantes possibilidades terapêuticas, a partir do uso de componentes da flora ainda não descobertos ou estudados para essa finalidade.

ANEXO DO CAPÍTULO 1 E 2

ANEXO 1 – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFG



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PROTOCOLO
053/2009

Goiânia, 02 de setembro de 2009

PARECER CONSUBSTANCIADO

I. IDENTIFICAÇÃO:

Título do projeto: “Ação antioxidante do extrato aquoso da casca de pequi (*Caryocar brasiliense*) em cérebro isquêmico de ratos por oclusão bilateral das artérias carótidas comuns ”

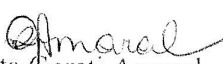
Pesquisador Responsável: Eugenio Gonçalves de Araujo

Pesquisadores Participantes: Luiz Augusto Batista Brito, Maria Clorinda Soares Fioravanti, Marina Pacheco Miguel, Liliane Borges de Menezes, Marcelo Seixo Brito e Silva, Tatyane Penha Sales e Silva, Cesário Bianchi Filho, Eliana Martins Lima, Juliana Carvalho de Almeida Borges, Levy Correia Marques Neto

Local de realização: EV/UFG

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas, **Aprovou**, o projeto acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP/UFG, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão (ões) e publicação (ões) de acordo com as recomendações da Resolução 196/96.


Profª Dra Rita Goreti Amaral
Coordenadora do CEP/UFG