

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

**O EXTRATO ETANÓLICO DA CASCA DE PEQUI REDUZ O
DANO CEREBRAL INDUZIDO EM RATAS SUBMETIDAS À
DIETA HIPERCALÓRICA**

Fernanda Figueiredo Mendes

Orientador: Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo

GOIÂNIA

2017



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, 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:

Nome completo do autor: Fernanda Figueiredo Mendes

Título do trabalho: O extrato etanólico da casca de pequi reduz o dano cerebral induzido em ratas submetidas à dieta hipercalórica.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

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

Fernanda Figueiredo Mendes
Assinatura do(a) autor(ã)²

Ciente e de acordo:

[Assinatura]

Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 05 / 02 / 2018

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

FERNANDA FIGUEIREDO MENDES

**O EXTRATO ETANÓLICO DA CASCA DE PEQUI REDUZ O
DANO CEREBRAL INDUZIDO EM RATAS SUBMETIDAS À
DIETA HIPERCALÓRICA**

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

Área de Concentração:

Patologia, clínica e cirurgia animal

Linha de pesquisa:

Patobiologia animal, experimental e comparada.

Orientador:

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

Comitê de orientação:

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

Dr.^a Yandra Cássia Lobato do Prado – ACECIL-
VET

GOIÂNIA

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Mendes, Fernanda Figueiredo

O extrato etanólico da casca de pequi reduz o dano cerebral induzido em ratas submetidas à dieta hipercalórica [manuscrito] / Fernanda Figueiredo Mendes. - 2017.
56 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo; co orientadora Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti; co-orientador Dr. Yandra Cássia Lobato do Prado.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2017.

Bibliografia. Anexos.

Inclui fotografias, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Antioxidante. 2. cerrado. 3. extrato de plantas. 4. lesão de isquemia e reperfusão cerebral. 5. obesidade. I. Gonçalves de Araújo, Eugênio, orient. II. Título.

CDU 639.09

1 ATA NÚMERO **246** DE DEFESA DE TESE DE **DOUTORADO** DO PROGRAMA DE PÓS-
2 GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA
3 UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, REALIZADA POR **Fernanda Figueiredo Mendes**.
4 Às **14h00min** do dia **17/03/2017**, reuniu-se na Sala de Defesas do Programa de Pós-Graduação em
5 Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Campus II
6 Samambaia, nesta Capital Goiânia - Goiás, a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao
7 julgamento da Defesa de Tese de Doutorado apresentado (a) pelo (a) Pós-Graduando (a) **Fernanda**
8 **Figueiredo Mendes**, intitulada “**Extrato etanólico da casca de pequi atua sobre o dano cerebral**
9 **induzido em ratas submetidas à dieta hipercalórica**”, apresentada para obtenção do **Título de**
10 **Doutor em Ciência Animal**, junto à Área de Concentração: **Patologia, Clínica e Cirurgia Animal**
11 desta Universidade. O Presidente da Comissão Julgadora **Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo**,
12 iniciando os trabalhos, concedeu a palavra ao (a) candidato (a) **Fernanda Figueiredo Mendes** para
13 exposição em **quarenta** minutos do seu trabalho. A seguir, o senhor Presidente concedeu a palavra,
14 pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir o (a) candidato (a),
15 durante o prazo máximo de **vinte** minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder
16 aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição, que se desenvolveu nos termos regimentais, a
17 Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o (a) candidato (a)
18 **Aprovado (a) ou Reprovado (a):**

19 Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo	<u>Aprovada</u>
20 Profª. Dra. Liliana Borges de Menezes Leite	<u>Aprovada</u>
21 Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio	<u>Aprovada</u>
22 Profª. Dra. Vanessa de Souza Cruz Pimenta	<u>Aprovada</u>
23 Prof. Dr. Adílson Donizeti Damasceno	<u>Aprovada</u>

24 Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o (a) candidato (a) **Fernanda**
25 **Figueiredo Mendes**, habilitada [(**Habilitado (a) ou não Habilitado (a)**)]
26 pelo(s) motivo(s) abaixo exposto(s):

27 A candidata apresentou seu trabalho de forma adequada
28 e respondeu com propriedade aos questionamentos da Banca
29 Examinadora.
30 _____
31 _____
32 _____

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



33 _____
34 _____
35 _____
36 _____
37 _____

38 A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da tese:

39 *Extrato etanólico da casca de pequi reduz o*
40 *dano cerebral induzido em ratas submetidas à dieta*
41 *hipercalórica.*
42 _____
43 _____
44 _____

45 Nada mais havendo a tratar, eu **Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo**, lavrei a presente ata que,
46 após lida e achada conforme foi por todos assinada.

47 Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo
48 Profa. Dra. Liliana Borges de Menezes Leite
49 Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio
50 Profa. Dra. Vanessa de Souza Cruz Pimenta
51 Prof. Dr. Adílson Donizeti Damasceno

Eugênio
Liliana
Carlos
Vanessa
Adilson

Dedico esse a minha família, sempre presentes com palavras e atos que me fortaleceram e me fizeram seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas oportunidades, pela força e por todo amor.

Ao Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo, meu orientador, por todas as oportunidades sempre, pelas orientações, por todos os ensinamentos e contribuições para minha formação, crescimento pessoal e profissional e desenvolvimento desse projeto. Além disso agradeço muito a compreensão, o apoio e a convivência harmoniosa por todos esses anos, foi um aprendizado imenso e extremamente gratificante, terá sempre minha enorme gratidão, carinho e admiração.

As minhas co-orientadoras Prof.^a Dr.^a Maria Clorinda Soares Fioravanti e Dr.^a Yandra Cássia Lobato do Prado pelo apoio, ensinamentos e convívio harmonioso.

Ao Prof. Dr. Danilo Ferreira Rodrigues por todo apoio pessoal e profissional, fundamentais para conseguir chegar até aqui.

Aos professores e funcionários do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, em especial a Prof.^a Dr.^a Liliana Borges de Menezes e Prof.^a Dr.^a Mara Rúbia Nunes Celes por todos os ensinamentos, parceria, auxílio e apoio durante minha experiência profissional na instituição e nesse trabalho.

A todos os professores da Escola de Veterinária e Zootecnia e da Universidade Federal de Goiás por todos os ensinamentos, convívio harmonioso e apoio, em especial ao Prof. Dr. Luiz Antônio Franco da Silva que me auxiliou profissional e pessoalmente em vários momentos do doutorado, que me proporcionou a oportunidade de atuação em vários projetos de pesquisa e extensão importantes e interessantes que me fizeram crescer muito, e por todos os ensinamentos sobre ensino, pesquisa e extensão, pilares da docência e do trabalho dentro de uma universidade, ensinamentos esses de valor inestimável para a minha formação. Muito obrigada pela amizade e pelas oportunidades, terá sempre minha gratidão, admiração e carinho.

Aos colegas e amigos da Pós-Graduação que contribuíram de forma direta ou indireta para esse trabalho e pelos vários momentos de apoio, estudo e lazer. Em especial agradeço a Dr.^a Liliane Tanus Benatti, Dr.^a Marina Zimmermann, Dr.^a Ana Carolina Vasques Vilela, Dr. Antônio Dionísio Feitosa Noronha Filho, Dr. Carlos Vinícius de Miranda Faria, Dr.^a Saura Nayane de Souza, Dr.^a Greycieli Almeida, Dr.^a Letícia Melo, Msc. Sabrina Lucas Ribeiro de Freitas, Msc. Jordanna Almeida, Dr.^a Taís

Andrade Dias de Souza, Msc. Karla Márcia da Silva Braga e Prof.^a Dr.^a Vanessa de Sousa Cruz Pimenta.

A todos os alunos que colaboraram para minha formação, crescimento, que me apoiaram e me auxiliaram em vários momentos, em especial a Maria Madalena Santos Costa e João Felipe Freire Oliveira, nunca poderei agradecer o suficiente, mas estarão sempre nas minhas melhores lembranças.

A minha equipe de trabalho maravilhosa e extremamente especial: Prof. Dr. Danilo Ferreira Rodrigues, graduanda Cibelle Cunha dos Santos, Msc. Thamiza Carla Costa dos Santos e MV. Esp. Léo Lindsay Sousa Galvão a minha eterna gratidão, amizade, carinho e admiração. Esse trabalho jamais teria sido possível sem vocês, com quem trabalhei, aprendi e cresci muito.

A todos os funcionários da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, em especial a Vilda Maria dos Reis e Antonio Souza Silva.

Aos Pós-Graduandos da Faculdade de Farmácia-UFG, Msc. Wannessa Lenyse Rocha de Carvalho e Msc. Stone de Sá, pelo auxílio nos procedimentos de caracterização do extrato etanólico da casca de pequi.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia/UFG que possibilitou o desenvolvimento do meu curso de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa de Goiás (FAPEG), pelo apoio financeiro.

A minha família, que me apoiou e me deu forças sempre. Obrigada a todos e especialmente a minha mãe Maria Dulce Figueiredo Mendes, meu pai Fernando Rabello Mendes Filho, meu irmão Adriel Figueiredo Mendes e a minha tia Wanda Maciel.

Aos brasileiros contribuintes que possibilitaram o financiamento desta pesquisa e que acreditam no progresso da ciência.

A todos os animais que possibilitam o nosso aprendizado e crescimento pessoal e profissional.

“Cada minuto da vida é uma nova oportunidade e a vida se torna bela à medida que tal oportunidade não é desperdiçada”.

Carlos Alberto da Silva

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	Considerações iniciais.....	1
1.	Introdução.....	1
2.	Isquemia encefálica transitória.....	2
3	Estresse oxidativo.....	6
3.1	O estresse oxidativo cerebral na via de sinalização da ERK1/2 e da AMPK α	7
4.	Dietas hipercalóricas.....	9
5.	O potencial antioxidante do pequi.....	11
	Referências.....	14
CAPÍTULO 2	O extrato etanólico da casca de pequi reduz lesões de isquemia e reperfusão encefálica induzida em ratas submetidas a dieta hipercalórica.....	18
	Introdução.....	19
	Material e métodos.....	20
1.	O extrato etanólico da casca de pequi.....	20
2.	Dietas.....	21
3.	Tratamento e colheita de sangue.....	21
4.	Procedimentos cirúrgico e colheita de amostras.....	22
5.	Análise histopatológica.....	22
6.	Métodos estatísticos.....	23
	Resultados.....	24
	Discussão.....	28
	Conclusão.....	31
	Referências.....	31
CAPÍTULO 3	Viabilidade neuronal após reperfusão e marcação de p-ERK1/2 e p-AMPKα em ratas alimentadas com dieta hipercalórica e suplementadas com extrato da casca de pequi.....	35
	Introdução.....	36
	Material e métodos.....	37
1.	O extrato etanólico da casca de pequi.....	38
2.	Animais, dietas e delineamento experimental.....	38
3.	Procedimentos cirúrgico e colheita de amostras.....	39
4.	Análise histopatológica.....	39
5.	Imunoistoquímica.....	41
6.	Métodos estatísticos.....	42
	Resultados.....	42
	Discussão.....	45
	Conclusão.....	49
	Referências.....	49
CAPÍTULO 4	Considerações Finais.....	53
ANEXO A	Parecer consubstanciado do Comitê de Ética no Uso de Animais..	55
ANEXO B	Composição da dieta comercial para ratos.....	56

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1	Considerações iniciais	1
FIGURA 1 -	Mecanismo dos eventos patológicos pós isquemia encefálica que determinam o surgimento de morte neuronal seletiva, neuroinflamação e neurotoxicidade.....	5
FIGURA 2 -	Mecanismo de ação das espécies reativas sobre a ERK1/2. Essas estimulam um aumento na ativação da ERK1/2 e bloqueiam a ação das MAPK fosfatases, que são enzimas que controlam essa ativação tornando-a persistente e excessiva e conseqüentemente, em vez de promover proteção, acaba por causar inflamação e morte celular piorando o quadro pós reperfusão.....	8
CAPÍTULO 2	O extrato etanólico da casca de pequi reduz lesões de isquemia e reperfusão encefálica induzida em ratas submetidas a dieta hipercalórica.....	
FIGURA 1 -	Fotomicrografia de encéfalo de rata após indução de isquemia cerebral global por 45 minutos e reperfusão de duas horas, grupo N2. HE. A) Região de substância branca intensamente vacuolizada (seta azul) adjacente ao hipocampo e circundante ao plexo coroide. 2,5X. B) Córtex cerebral parietal apresentando lesões de isquemia e reperfusão cerebral, neurônio isquêmico (seta preta), congestão (seta verde) e vacuolização de neurópilo (seta vermelha). 100x.....	25
CAPÍTULO 3	O extrato da casca de pequi sobre a viabilidade neuronal e expressão de p-erk1/2 e p-ampka pós isquemia encefálica transitória em ratas alimentadas com dieta hipercalórica.....	
FIGURA 1 -	Córtex cerebral de rata do grupo HP após 45 minutos de isquemia e duas horas de reperfusão cerebral induzida. Neurônios considerados inviáveis (cabeças de seta vermelhas) apresentando basofilia, retração, perda de arquitetura neuronal e ausência do corpúsculo de Nissil. Os neurônios considerados viáveis (cabeças de seta pretas) apresentaram-se redondos, de citoplasma claro, n, discretamente basofílico, com arquitetura celular preservada e presença do corpúsculo de Nissil. Coloração violeta cresil 200x. HP – grupo que recebeu dieta hipercalórica e foi suplementado com extrato etanólico da casca de pequi.....	40
FIGURA 2 -	Região do hipocampo do cérebro de rata do grupo N após 45 minutos de isquemia seguidos de duas horas de reperfusão. Demonstração das divisões das zonas CA1, CA2, CA3 e giro denteado (GD) do hipocampo. Hematoxilina e eosina, 50x. N – grupo que recebeu dieta comercial e não foi suplementado com extrato etanólico da casca de pequi.....	41

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2	O extrato etanólico da casca de pequi reduz lesões de isquemia e reperfusão encefálica induzida em ratas submetidas a dieta hipercalórica.....	18
TABELA 1 -	Médias (n=12) das concentrações de triglicérides totais (mg/dl) do sangue periférico de ratas nos tempos (T) 0 e 60 dias de experimento.....	24
TABELA 2 -	Médias (n=12) dos pesos da gordura visceral (g) presente no tecido adiposo retroperitoneal, inguinal e omental de ratas aos 60 dias de experimento.....	25
TABELA 3 -	Escores relativos à distribuição de neurônios isquêmicos encontrados no córtex cerebral de ratas de acordo com a dieta (N=comercial ou H =hipercalórica), suplementação ou não com extrato etanólico da casca de pequi (P) e tempo de reperfusão de duas (T=2) ou quatro (T=4) horas.....	26
TABELA 4 -	Escores relativos à vacuolização de neurópilo no córtex cerebral de ratas de acordo com a dieta (N=comercial ou H =hipercalórica), suplementação com extrato etanólico da casca de pequi (P) e tempo de reperfusão de duas (T=2) ou quatro (T=4) horas.....	26
TABELA 5 -	Escores relativos às lesões no hipocampo cerebral de ratas de acordo com a dieta (N=comercial ou H =hipercalórica), suplementação com extrato etanólico da casca de pequi (P) e tempo de reperfusão de duas (T=2) ou quatro (T=4) horas.....	27
TABELA 6 -	Escores relativos às lesões no plexo coróide hipocampal de ratas de acordo com a dieta (N=comercial ou H =hipercalórica), suplementação com extrato etanólico da casca de pequi (P) e tempo de reperfusão de duas (T=2) ou quatro (T=4) horas.....	28
CAPÍTULO 3	Viabilidade neuronal após reperfusão e marcação de p-ERK1/2 e p-AMPKα em ratas alimentadas com dieta hipercalórica e suplementadas com extrato da casca de pequi.....	35
TABELA 1 -	Quantidade média de neurônios viáveis e inviáveis no córtex cerebral de ratas de acordo com a dieta (N=comercial ou H =hipercalórica), suplementação ou não com extrato etanólico da casca de pequi (P) e tempo de reperfusão (T).....	42
TABELA 2 -	Quantidade média de neurônios viáveis e inviáveis no hipocampo cerebral dos animais nas zonas CA1, CA2 e CA3 de ratas após 45 minutos de isquemia e duas horas de reperfusão de acordo com a dieta (N=comercial ou H =hipercalórica), suplementação ou não com extrato etanólico da casca de pequi (P).....	43
TABELA 3 -	Quantidade média de neurônios viáveis e inviáveis no hipocampo cerebral dos animais nas zonas CA1, CA2 e CA3 após quatro horas de reperfusão de acordo com a dieta (N = comercial ou H = hipercalórica), suplementação ou não com extrato etanólico da casca de pequi (P).....	43
TABELA 4 -	Quantidade média de neurônios viáveis e inviáveis no hipocampo cerebral dos animais na zona do giro denteado de acordo com a dieta (N=comercial ou H =hipercalórica), suplementação ou não com extrato etanólico da casca de pequi (P) e tempo de reperfusão (T).....	44
TABELA 5 -	Quantidade média de neurônios marcados pelos anticorpos p-ERK1/2 e p-AMPK α no córtex cerebral de ratas de acordo com a dieta (N=comercial ou H =hipercalórica), suplementação ou não com extrato etanólico da casca de pequi (P) e tempo de reperfusão (T).....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$	oxigênio singlet.
AMPK α	5' adenosine monophosphate-activated protein kinase.
ATE	Ácido tânico equivalente
BDNF	fator neurotrófico derivado do cérebro
COX ₂	ciclo-oxigenase 2.
EECP	extrato etanólico da casca de pequi.
eNOs	óxido nítrico sintase endotelial.
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinases.
ERNs	espécies reativas de nitrogênio.
EROs	espécies reativas de oxigênio.
GD	giro denteado
GDNF	fator neurotrófico derivado da glia.
H	grupo de animais que receberam dieta hipercalórica.
H2	grupo de animais que receberam dieta hipercalórica submetidos a reperfusão por duas horas.
H4	grupo de animais que receberam dieta hipercalórica submetidos a reperfusão por quatro horas.
HP	grupo de animais que receberam dieta hipercalórica associado ao tratamento com o extrato etanólico da casca de pequi.
HP2	grupo de animais que receberam dieta hipercalórica associado ao tratamento com o extrato etanólico da casca de pequi e passaram por reperfusão de duas horas.
HP4	grupo de animais que receberam dieta hipercalórica associado ao tratamento com o extrato etanólico da casca de pequi e passaram por reperfusão de quatro horas.
ICGT	isquemia cerebral global transitória.
IL6	interleucina 6.
N	grupo de animais que receberam dieta comercial.
N2	grupo de animais que receberam dieta normocalórica submetidos a reperfusão por duas horas.
N4	grupo de animais que receberam dieta normocalórica submetidos a reperfusão por quatro horas.
NI	número de células inviáveis
NP	grupo de animais que receberam dieta comercial associado ao tratamento com o extrato etanólico da casca de pequi.
NP2	grupo de animais que receberam dieta comercial associado ao tratamento com o extrato etanólico da casca de pequi e passaram por reperfusão de duas horas.
NP4	grupo de animais que receberam dieta comercial associado ao tratamento com o extrato etanólico da casca de pequi e passaram por reperfusão de quatro horas.
Nrf2	fator nuclear derivado de eritroide 2.
NV	número de células viáveis.
TFN α	fator de necrose tumoral α .

RESUMO

O objetivo com esse estudo foi determinar o efeito do extrato etanólico da casca de pequi sobre dano cerebral induzido em ratas submetidas a dieta hipercalórica e as expressões das formas ativas da ERK1/2 e AMPK α no córtex cerebral. Utilizaram-se 48 ratas alocadas em dois grupos de 24, de acordo com a dieta utilizada, hipercalórica ou comercial, fornecidas diariamente por 60 dias. Os animais foram distribuídos em dois subgrupos de 12, tratados ou não com o extrato, administrado diariamente 30 dias após o início das dietas. Foi realizada quantificação dos triglicerídeos e indução de isquemia cerebral global seguida de reperfusão. Seguido à eutanásia, colheram-se os encéfalos e pesou-se a gordura visceral. Foram feitas avaliação histopatológica das lesões no encéfalo, quantificação do número de células viáveis e inviáveis no córtex cerebral e hipocampo e células marcadas pelos anticorpos anti p-ERK1/2 e p-AMPK α no córtex cerebral. Havia hipertrigliceridemia e aumento significativo na quantidade de gordura visceral no grupo que recebeu dieta hipercalórica ($p < 0,05$). O grupo que recebeu dieta hipercalórica e foi tratado com o extrato apresentou menos lesões cerebrais de isquemia e reperfusão. O extrato não influenciou o número de células viáveis e inviáveis no córtex cerebral e hipocampo, porém, reduziu significativamente a marcação pela p-ERK1/2 e p-AMPK α no grupo da dieta hipercalórica ($p < 0,05$). Concluiu-se que o extrato etanólico da casca de pequi reduz lesões cerebrais induzidas em ratas alimentadas com dieta hipercalórica e apresenta efeito modulatório sobre a expressão da ERK1/2 e da AMPK α no córtex cerebral.

Palavras-chave: Antioxidante, cerrado, extrato de plantas, lesão de isquemia e reperfusão cerebral, obesidade.

ABSTRACT

The aim was to determine the effect of ethanolic extract of pequi mesocarp on induced brain damage and ERK1/2 and AMPK α active forms in rats subjected to a hypercaloric diet. 48 rats were sorted into two groups of 24 according to the diet used, hypercaloric or commercial, provided daily for 60 days. The animals were separated into two subgroups of 12, treated or not with the extract, given daily for 30 days after diet start. Quantification of triglycerides, induction of global cerebral ischemia followed by reperfusion was performed. Later, euthanasia, brains harvest and visceral fat weighing were performed. Histopathological evaluation of brain lesions, quantification of the number of viable and non-viable cells in the cerebral cortex and hippocampus, and of cells marked by the anti-pKR-ERK1/2 and p-AMPK α antibodies in the cerebral cortex were performed. Hypertriglyceridemia and a significant increase in the amount of visceral fat were observed in the group that received hypercaloric diet (p <0.05). Histopathological evaluations showed that the group that received hypercaloric diet and was treated with the extract had fewer brain lesions of ischemia and reperfusion. The extract did not influence the number of viable and nonviable cells in the cerebral cortex and hippocampus, but significantly reduced p-ERK1 / 2 and p-AMPK α cell labelling in the hypercaloric diet group (p <0.05). In conclusion, ethanolic extract of pequi peel reduces induced brain lesions in rats fed a hypercaloric diet and has a modulatory effect on the expression of ERK1 / 2 and AMPK α in the cerebral cortex.

Keywords: Antioxidant, brain ischemia and reperfusion lesion, cerrado, obesity, plant extract.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. Introdução

As taxas de mortalidade e morbidade ocasionadas por quadros de isquemia e reperfusão cerebral são cada vez mais alarmantes a cada ano. Esses processos são a segunda maior causa de mortes no mundo e ocupam posições importantes em estatísticas relacionadas a gastos com internações, reabilitações e aposentadorias precoces. Além disso, sabe-se que a alimentação com dietas hipercalóricas e o estilo de vida influenciam diretamente no surgimento dessas enfermidades como fatores predisponentes.

Durante a isquemia, ocorrem eventos bioquímicos que reduzem a produção de antioxidantes endógenos. Tais moléculas possuem alta capacidade de doação de elétrons, associada à intensa produção de substratos para a formação de espécies reativas, moléculas reativas instáveis, com capacidade de captação de elétrons.

A reperfusão, primordial para o tratamento de quadros isquêmicos, promove reações bioquímicas que culminam na intensa formação de espécies reativas, que se propagam rapidamente desestabilizando moléculas orgânicas e deteriorando funções celulares. Nesse contexto, os antioxidantes endógenos são ineficientes, pois sua produção apresenta-se reduzida em consequência da isquemia. Com isso, ocorre um quadro chamado de estresse oxidativo, caracterizado pelo desequilíbrio entre a quantidade de espécies reativas e as defesas antioxidantes.

O encéfalo é muito vulnerável ao surgimento de lesões de isquemia e reperfusão, pois é propenso ao surgimento de estresse oxidativo. O órgão apresenta quantidades importantes de substratos para a formação de espécies reativas deletérias e possui poucas defesas antioxidantes.

Além disso, dietas hipercalóricas e obesidade estão diretamente relacionadas com o surgimento de alterações metabólicas, que causam estresse oxidativo generalizado e persistente no organismo. Esse quadro promove a redução da produção das defesas antioxidantes endógenas, tornando o organismo, como um todo, mais vulnerável a lesões de isquemia e reperfusão.

Portanto, estudos voltados para tratamentos dessas enfermidades com antioxidantes exógenos começaram a se destacar. Observou-se que algumas plantas produzem compostos fenólicos com capacidade antioxidante durante seu metabolismo. Por essa razão,

estudos *in vitro* e *in vivo* encontram-se em desenvolvimento utilizando extratos vegetais e avaliando seu potencial antioxidante diante de lesões de isquemia e reperfusão induzidas, além da sua ação em quadros de obesidade e doenças que cursam com estresse oxidativo generalizado.

Os antioxidantes provenientes de vegetais estão relacionados com a quantidade de compostos fenólicos, que são resultantes do metabolismo secundário da planta, para a proteção contra agentes externos como o sol, predadores e contaminações. A incidência solar no cerrado é alta, com longos períodos de estiagem, exigindo muito dos sistemas de proteção desses organismos. Com isso, observou-se que as plantas dessa região apresentam quantidades importantes de compostos fenólicos antioxidantes, com excelente capacidade redutora e de inibição de peroxidação lipídica, como os flavonóides, tornando esses vegetais uma fonte de estudos para o tratamento do estresse oxidativo.

As plantas do cerrado brasileiro, ricas em antioxidantes, são utilizadas popularmente como fitoterápicos e vêm ganhando espaço no meio científico, pois, estudos demonstraram seu potencial antioxidante e de inibição de peroxidação lipídica^{1,2,3}. Neste contexto, destaca-se o pequi, árvore símbolo do cerrado.

A casca do pequi, rica em antioxidantes^{3,4,5}, é um subproduto da comercialização do fruto, do qual atualmente só se utiliza a polpa e as sementes. Por esse motivo, poderá influenciar positivamente no tratamento de doenças que cursam com estresse oxidativo e possuem potencial de uso na indústria farmacêutica e de alimentos. A utilização da casca também potencialmente contribuirá na redução da produção de resíduos e na valorização desse subproduto, o que pode influenciar na melhora da economia da região, além de estimular a sustentabilidade e a conservação do cerrado, atualmente em extensa devastação.

Portanto, esse trabalho teve como objetivo avaliar *in vivo* a ação do extrato etanólico da casca de pequi sobre o estresse oxidativo cerebral induzido em ratas submetidas a dieta hipercalórica.

2. Isquemia encefálica transitória

O encéfalo, localizado dentro do crânio, é um órgão pertencente ao sistema nervoso central e responsável por toda função motora, cognitiva e regulatória do organismo. Essas funções são ativadas por impulsos elétricos produzidos por eventos bioquímicos nos neurônios unidade celular funcional do sistema nervoso central, responsáveis por enviar e receber informações e responder aos estímulos internos e externos. O encéfalo é dividido

anatomicamente em três regiões principais: cérebro, que corresponde aos dois hemisférios maiores, composto pelo telencéfalo, estrutura responsável pelo intelecto, aprendizagem, atividade motora, informações sensitivas entre outras; tronco encefálico, região de ligação entre o cérebro e a medula espinhal, responsável pelo ritmo cardio-respiratório, pressão arterial e nível de consciência; e o cerebelo, que situa-se caudal ao cérebro, dividido em dois hemisférios menores, que determinam equilíbrio, tônus muscular e ajuste da atividade motora^{6,7}.

Esse órgão apresenta mecanismos próprios de regulação da perfusão tecidual por meio de uma relação entre a pressão arterial sistêmica e a pressão intracraniana e com controle bioquímico depende das concentrações de O₂ (oxigênio) e CO₂ (dióxido de carbono) no sangue que promovem vasoconstrição e vasodilatação de acordo com a necessidade⁸. As principais artérias responsáveis pelo suprimento sanguíneo cerebral são as artérias carótidas e vertebrais. Esses vasos distribuem o sangue para o encéfalo pelo polígono de Willis, uma região anatômica de anastomoses, que origina diferentes ramos arteriais, que enviam sangue para variadas áreas do encéfalo, presente na maioria das espécies de mamíferos⁹.

O encéfalo é um órgão exigente quanto ao aporte de oxigênio e nutrientes e apresenta intensa atividade oxidativa fisiológica. O consumo médio de sangue pelo encéfalo corresponde a aproximadamente 15% do débito cardíaco por minuto. A demanda metabólica da substância cinzenta é maior em relação a substância branca, pela primeira apresentar uma maior quantidade de corpos celulares dos neurônios, sendo o cérebro a região anatômica que recebe a maior parte do aporte sanguíneo¹⁰.

A manutenção do funcionamento satisfatório do encéfalo está diretamente relacionada ao suprimento sanguíneo. Apesar de apresentar mecanismos de defesa contra eventos isquêmicos, por ter uma rica rede de anastomoses, ainda sim, é bastante susceptível a formação de lesões de isquemia e reperfusão. Tal susceptibilidade se deve ao fato do órgão apresentar intensa e contínua demanda metabólica, baixas reservas energéticas e ser rico em ferro e gorduras poliinsaturadas, que servem de substrato para reações bioquímicas que promovem a formação de espécies reativas capazes de deteriorar funções celulares. Além disso, apresenta poucas defesas antioxidantes quando comparado a outros órgãos^{11,12,13}.

A isquemia cerebral global se caracteriza por redução abrupta do fluxo sanguíneo para o encéfalo. As principais causas relacionadas a esse quadro são a parada cardíaca, como em casos de infarto; redução abrupta da pressão arterial, como no choque hipovolêmico; e aumento da pressão intracraniana, geralmente ocasionada por trauma crânio encefálico¹⁴.

O quadro isquêmico cerebral é considerado grave e apresenta prognóstico que pode variar de reservado a desfavorável, pelo potencial de causar déficit neurológico importante. Trata-se de uma frequente causa de óbito em pacientes após procedimentos de reanimação cérebro-cardio-pulmonar bem-sucedidos. Observa-se também, que a maioria desses quadros está diretamente relacionada à parada cardíaca por mais de 10 minutos¹⁴.

Durante a parada cardíaca, o encéfalo fica em isquemia e o tempo em que permanece sem fluxo sanguíneo é determinante no prognóstico do paciente. Quanto maior o período, pior é o prognóstico. Com o procedimento bem-sucedido de ressuscitação, ocorre o retorno abrupto do fluxo sanguíneo para o encéfalo, quadro denominado de reperfusão. Com isso, ocorrem três principais eventos fisiopatológicos, que determinam o aparecimento da lesão de isquemia e reperfusão cerebral global: a morte neuronal seletiva, a alteração da dinâmica dos fluidos no encéfalo e a intensa produção de espécies reativas deletérias¹⁴.

O quadro de isquemia encefálica determina morte neuronal seletiva aguda por necrose, principalmente nas zonas do córtex cerebral e hipocampo, por sua maior quantidade de neurônios e por apresentar maior demanda metabólica em relação a outras regiões¹⁵. A redução de oxigênio e nutrientes, provocada pela isquemia, causa redução na produção de ATP (adenosina trifosfato). Quando há oxigênio, a enzima ATP sintase, que fosforila a ADP (adenosina difosfato), é responsável pela produção de ATP para o metabolismo celular, principalmente para a produção e propagação dos potenciais de ação, atividade sináptica e suprimento para funcionamento das bombas iônicas dos neurônios¹⁶.

A ausência de oxigênio e nutrientes provenientes da isquemia resulta na redução da produção de ATP, com a ativação do catabolismo celular para a produção secundária de energia por via anaeróbica, que não é eficiente devido a alta demanda metabólica do neurônio. O sistema anaeróbico de produção de energia é ineficiente e reduz o pH celular, por ter como resultado a produção de ácido láctico.

A falta de ATP em quantidades satisfatórias promove o mau funcionamento da bomba de Na^+/K^+ (sódio e potássio), causando acúmulo de Na^+ no meio intracelular, que atrai água e provoca tumefação celular. A falta da entrada de K^+ na célula resulta em redução da síntese proteica, que altera a permeabilidade das membranas celular e mitocondrial. Ocorre em conjunto influxo de Ca^{++} (cálcio) intracelular, que por disfunção das membranas encontra enzimas da própria célula, ativa as mesmas e promove degradação. Ao mesmo tempo, libera das membranas mitocondriais proteínas que estimulam a interrupção da função neuronal e a morte celular por apoptose^{17,15,18}. Além disso, ocorre a perda da capacidade de manutenção do gradiente iônico das membranas neuronais e despolarização, com liberação intensa sem

recuperação de neurotransmissores, como o glutamato no espaço extracelular, o que estimula inflamação e promove neurotoxicidade¹⁹ (Figura 1).

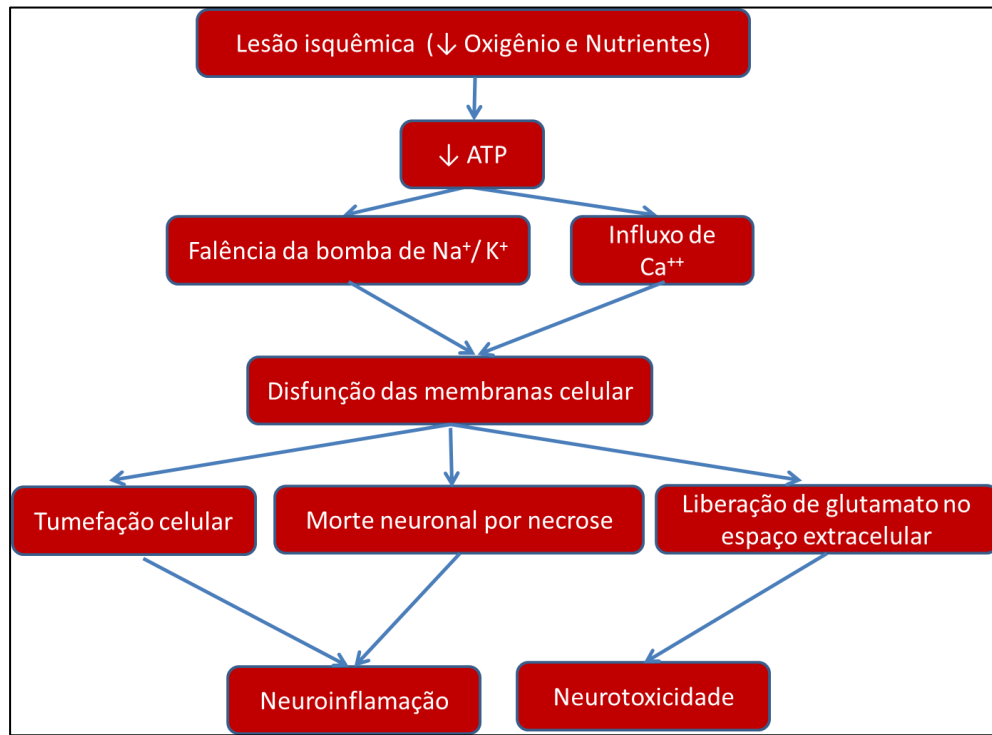


FIGURA 1 – Mecanismo dos eventos patológicos pós isquemia encefálica que determinam o surgimento de morte neuronal seletiva, neuroinflamação e neurotoxicidade.

O retorno abrupto do fluxo sanguíneo promove uma hiperemia reativa pós-isquêmica, que ocorre por liberação de substâncias vasoativas, associada à redução da viscosidade sanguínea para aumento do fluxo¹⁰. Segue-se um quadro de hipoperfusão, que pode durar dias após o quadro isquêmico e que é associado a déficits neurológicos importantes e morte do paciente²⁰. Ocorrem, ainda, alterações de fluxo em diferentes áreas do encéfalo comprometido, de acordo com as concentrações de CO₂ e o grau de acidez tecidual. Pode ter lugar o evento conhecido como fenômeno de não refluxo, que ocorre por acúmulo e adesão em massa de leucócitos e tumefação da glia perivascular, que ocasionam tamponamento vascular impedindo o fluxo em zonas isquêmicas¹⁰.

O processo de isquemia e reperfusão também aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica, ocasionando edema cerebral¹⁵, ao ativar metaloproteinases responsáveis pela degradação da membrana basal e da matriz extracelular da barreira. Esse processo predispõe à infiltração de leucócitos, principalmente neutrófilos, exposição do

encéfalo a agentes tóxicos e infecciosos, e consequente neuroinflamação, ocasionando maior fragilidade dos vasos sanguíneos que podem romper-se e formar focos hemorrágicos²².

3. Estresse oxidativo

A reperfusão causa intensa formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), moléculas instáveis nas quais a ausência da paridade de elétrons em suas camadas finais promove desequilíbrio e reatividade, fazendo com que roubem elétrons de moléculas estáveis para se estabilizar. As espécies reativas, quando produzidas durante os eventos oxidativos normais da célula, são combatidas por antioxidantes endógenos, enzimas de alta capacidade redutora produzidas na própria célula, que estabilizam as espécies reativas doando elétrons e formando moléculas sem reatividade como H₂O. Porém, essas enzimas têm sua produção reduzida ou mesmo inibida durante a fase de isquemia, o que torna essa defesa ineficiente durante a reperfusão, quando há a maior produção de ERNs e EROs. Esta condição caracteriza o estresse oxidativo¹³.

Além dessas propriedades que apontam o encéfalo como um órgão vulnerável ao estresse oxidativo, deve-se destacar que, durante a isquemia e reperfusão cerebral, ocorre a liberação no espaço extracelular de grandes quantidades de glutamato, molécula extremamente oxidável, o que piora o quadro ao promover o aumento da formação de EROs e ERNs e causar citotoxicidade. O dano oxidativo ocasionado ao cérebro é caracterizado por lipoperoxidação intensa, estímulo a processo inflamatório, ativação da cascata de morte celular, degradação e inibição de defesas antioxidantes²³.

A formação intensa de EROs e ERNs na reperfusão perpetua-se no estresse oxidativo, pois com o roubo de elétrons de moléculas estáveis há a formação de mais espécies reativas, formando uma cadeia interminável. Além disso, EROs associadas à presença de grandes quantidades de Ca⁺⁺ ocasionam mudanças na cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, pela utilização excessiva de moléculas de oxigênio, como acceptor final de elétrons, aumentando a formação de EROs como o ¹O₂ (oxigênio *singlet*), extremamente lesivo ao citoplasma. Também ocorrem alterações estruturais, como o aumento da permeabilidade mitocondrial, promovendo a liberação de proteínas que estimulam a apoptose, como o citocromo C¹⁵.

EROs e ERNs também promovem oxidação lipídica ao degradar fosfolipídeos de membrana e, conseqüentemente, promover lise de membranas celulares e de elementos da matriz extracelular, ocasionando deterioração da função e morte celular. A lipoperoxidação

forma aldeídos e radicais alcoxil, que são tóxicos para células adjacentes formando uma reação em cadeia de toxicidade e deterioração. Espécies reativas também oxidam o DNA a ponto de romper as cadeias, o que pode promover reação de morte celular por apoptose ou alterações estruturais que podem tornar a célula ineficiente e mesmo originar mutações que resultam no surgimento de tumores¹³.

Além disso, o estresse oxidativo cerebral promove inflamação, pois as espécies reativas ativam fagócitos, a cascata do ácido araquidônico, vias moleculares que estimulam a liberação de quimiocinas pró-inflamatórias, como a COX-2 e metaloproteinases, além das vias de sinalização que estimulam a ativação de processo inflamatório e de apoptose, como a p38^{24,25}.

3.1. O estresse oxidativo cerebral na via de sinalização da ERK1/2 e da AMPK α

Durante o processo de isquemia e reperfusão, ocorre estímulo à expressão de proteínas de sobrevivência celular para a neuroproteção. A ERK1/2 é uma proteína pertencente ao grupo das MAPKs, proteínas ativadas por mitógenos, regulada por estímulos extracelulares. Essa quinase está envolvida no estímulo de defesas antioxidantes, proliferação e diferenciação celular, entre outros mecanismos de proteção, sendo considerada uma via de pró sobrevivência celular²⁶.

Contudo, o estímulo produzido por estresse oxidativo cerebral faz com que a ERK1/2 seja expressa de forma acentuada e persistente, o que estimula inflamação e morte celular por apoptose. Essa modificação da função se deve ao fato das espécies reativas inibirem as proteínas MAPK fosfatases, enzimas que regulam as quantidades ativas de ERK1/2 na célula, o que determina sua função. Sua inibição promove uma ativação excessiva e persistente, o que acarreta em estímulos deletérios como a apoptose e a neuroinflamação, comuns após o processo de isquemia e reperfusão cerebral²⁷ (Figura 2).

Estudos *in vivo* classificam a expressão reduzida e controlada da ERK1/2 após isquemia e reperfusão cerebral como benéfica. Observou-se que esse tipo de expressão coincidiu com a redução da ativação de metaloproteinase-9 e enzimas pró-inflamatórias como a COX-2 e a iNOs, proteínas associadas ao processo inflamatório e surgimento de danos oxidativos teciduais. Com isso, a utilização de antioxidantes exógenos que promovam a modulação da expressão da ERK1/2 em casos de isquemia e reperfusão cerebral é considerada uma fonte importante de estudos^{24,25}.

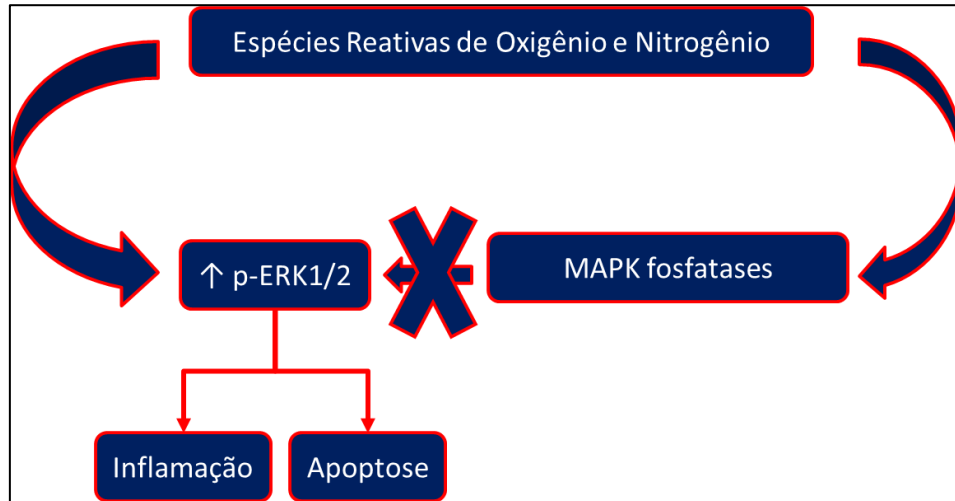


FIGURA 2 – Mecanismo de ação das espécies reativas sobre a ERK1/2. Essas estimulam um aumento na ativação da ERK1/2 e bloqueiam a ação das MAPK fosfatases, que são enzimas que controlam essa ativação tornando-a persistente e excessiva e conseqüentemente, em vez de promover proteção, acaba por causar inflamação e morte celular piorando o quadro pós reperfusão.

A AMPK α é uma proteína de sinalização responsável pelo balanço energético da célula, que se apresenta intensamente expressa durante processos de isquemia e reperfusão cerebral. Os benefícios da expressão dessa proteína durante o estresse oxidativo cerebral são contraditórios, pois dependendo do momento, da quantidade e do tempo de duração, pode resultar em piora nas lesões²⁸.

A ativação da AMPK α é importante em quadros de isquemia e reperfusão cerebral para reequilibrar o metabolismo energético. No entanto, o benefício de sua ativação, intensificada durante o estresse oxidativo, é considerado fator determinante para o surgimento de morte celular²⁹. De forma similar ao observado na ERK1/2, a ativação acentuada e sem controle da AMPK α após isquemia e reperfusão cerebral é deletéria ao encéfalo, estando esse tipo de expressão relacionado a edema, inflamação e morte celular³⁰. Apesar dos mecanismos ainda serem pouco esclarecidos, pesquisas *in vivo* demonstram que a redução ou inibição da ativação exacerbada da AMPK α após o processo de isquemia e reperfusão cerebral promove redução de sinais neurológicos, edema cerebral, processos de autofagia e morte celular por apoptose^{31,32}.

Um importante mecanismo de neuroproteção em quadros de isquemia e reperfusão encefálica consiste na ativação de vias de sobrevivência celular, como a ERK1/2, e vias de estabilização do metabolismo celular, como a AMPK α . Porém, o estresse oxidativo cerebral resulta na ativação intensa e descontrolada dessas vias, causando degradação e morte

celular por apoptose, estímulo a inflamação, edema, agravamento das lesões e maior perda neuronal^{33,27,28}.

4. Dietas hipercalóricas

A obesidade e o sobrepeso são quadros caracterizados pelo acúmulo de gordura de forma exacerbada na cavidade abdominal e no tecido subcutâneo. Tais condições podem deteriorar a saúde em decorrência do desequilíbrio energético, no qual a absorção da energia é maior que o gasto, associado à hipertrofia e hiperplasia de adipócitos. São considerados problemas alarmantes de saúde pública no mundo, por determinar o surgimento de enfermidades como o diabetes insulina-resistente e doenças cardiovasculares. Dietas hipercalóricas estão diretamente relacionadas ao estilo de vida ocidental, no qual *fast foods*, comidas processadas e alimentos que utilizam gorduras saturadas, como palatilizantes, são amplamente utilizados. Além disso, o sedentarismo também é fator determinante, por não ocorrer a queima energética necessária para balancear o organismo, o que gera sobrepeso e obesidade³⁴.

A obesidade promove o surgimento de um processo conhecido como síndrome metabólica, caracterizada por alterações metabólicas como dislipidemias e deposição de gordura com aumento significativo das concentrações de colesterol e triglicerídeos. Com o tecido adiposo acumulado na cavidade abdominal, no estado de catabolismo se inicia um processo de inflamação crônica, com produção e liberação contínua de quimiocinas na corrente sanguínea, com intensa liberação de ácidos graxos livres. Além disso, ocorrem alterações hormonais como a resistência à insulina e leptina, além da redução das concentrações de adiponectina, alterando o metabolismo energético, desacelerando-o. Há também alterações na dinâmica de fluidos do organismo, como o surgimento de hipertensão sistêmica³⁵.

A síndrome metabólica é um quadro no qual o paciente apresenta dislipidemia, com valores de colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade) < 39mg/dL para homens e < 35mg/dL para mulheres, além dos triglicerídeos > 150mg/dL. Além disso, há um aumento significativo no índice de massa corporal, maior que 15% a 20% do esperado, resistência à insulina e tolerância a glicose, aumento da pressão arterial sistêmica acima de 140/90mmHg e aumento das concentrações de proteína C reativa na circulação³⁵.

As dietas hipercalóricas são as principais causadoras de obesidade, sendo determinantes no surgimento da condição conhecida como estresse oxidativo generalizado.

Observou-se em pacientes obesos com síndrome metabólica aumento significativo da lipoperoxidação no plasma sanguíneo e das concentrações em eritrócitos da superóxido dismutase (SOD), enzima que faz parte da primeira linha de defesa antioxidante endógena como mecanismo compensatório³⁶.

Dietas ricas em carboidratos e gorduras saturadas ou trans, conhecidas como dietas de cafeteria ou hipercalóricas, foram consideradas elementos importantes no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, independente do surgimento de sobrepeso³⁷. Dietas hipercalóricas também estão associadas à condição inflamatória subclínica persistente, pois há relação direta entre a inflamação persistente decorrente da dieta e o estresse oxidativo generalizado, o que resulta em doenças cardiovasculares³⁸.

Experimentos *in vivo* demonstraram que ratos alimentados com dieta hipercalórica apresentam ganho de peso significativo, além de estresse oxidativo em órgãos como ovários³⁹ e coração⁴⁰. Observou-se também aumento na peroxidação lipídica no fígado e no plasma sanguíneo²⁷. Com isso, foi estabelecido que dietas hipercalóricas promovem estresse oxidativo generalizado ao aumentar a peroxidação lipídica e reduzir os mecanismos de defesa antioxidante do organismo. O prognóstico é pior caso ocorra um evento isquêmico seguido de reperfusão, pois os processos patológicos seriam ainda mais deletérios, por redução nas defesas antioxidantes endógenas e incremento de deterioração orgânica resultante do estresse oxidativo generalizado^{41,42}.

Em camundongos submetidos à dieta hipercalórica, houve deterioração do hipocampo por estresse oxidativo, decorrente do aumento significativo da peroxidação proteica, em relação aos do grupo controle. Além disso, também ocorreu decréscimo significativo do fator de transcrição Nrf2 (fator nuclear derivado de eritroide 2), sabidamente associado à ativação e produção de defesas antioxidantes. Com isso, concluiu-se que dietas hipercalóricas são deletérias às funções cognitivas do cérebro por promoverem estresse oxidativo⁴².

Na obesidade e sobrepeso, comuns após dietas hipercalóricas, existe maior liberação de adipocinas pelo tecido adiposo hipertrofiado. Em casos de isquemia associada à obesidade, essas moléculas presentes no organismo e grande quantidade tendem a agravar o dano cerebral. As adipocinas, como a interleucina 6 (IL6) e o fator de necrose tumoral α (TFN α), são proteínas pró-inflamatórias provavelmente associadas ao dano cerebral e produzidas no tecido adiposo. Elas induzem o aparecimento de apoptose e infiltração leucocitária pós isquemia, aumentando o dano cerebral⁴³.

O estresse oxidativo generalizado ocasionado pela obesidade está associado com lesão endotelial, o que pode culminar em hipertensão arterial. A formação de ERN's, que reagem com o óxido nítrico endotelial formando peroxinitritos, promove danos ao DNA celular e desacoplamento da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOs). Nessas condições, ocorre a formação de radicais superóxido, exacerbando o estresse oxidativo e o dano endotelial, produzindo resposta inflamatória e alteração dos mecanismos vasodilatadores e anticoagulantes⁴⁴.

5. O potencial antioxidante do pequi

As plantas são consideradas importantes fontes de compostos bioativos antioxidantes, que podem ser utilizados na agroindústria, indústria química, de alimento e farmacêutica. As concentrações desses compostos podem variar muito em relação ao método de extração e o solvente utilizado, porém os de maior interesse são os compostos fenólicos⁴⁵.

O pequi é o fruto do pequizeiro (*Caryocar brasiliense*), uma árvore típica do cerrado brasileiro da família Caryocaraceae. Amplamente apreciado pela culinária regional, é originário do Centro-Oeste do Brasil e apresenta grande importância para a economia local. É sazonal, com a floração entre agosto e novembro e frutificação a partir de setembro até o mês de fevereiro⁴⁶.

Por ser o fruto mais consumido do cerrado brasileiro, impulsiona a economia e apresenta apelo conservacionista, pois a região encontra-se em franca devastação. Os compostos bioativos das plantas do cerrado não são muito explorados em pesquisas, em contraste com plantas amazônicas, por exemplo. Portanto, quanto maior a quantidade de pesquisas sobre compostos bioativos interessantes, mais importância ganha a região².

O pequi apresenta compostos bioativos na polpa e na amêndoa, particularmente lipídeos, em sua maioria ácidos graxos insaturados, como o ácido oléico. Observou-se também altas concentrações de compostos fenólicos e carotenóides, além de possuir fibras, sendo por todas as suas características considerado uma importante fonte de nutrientes⁴⁷.

A casca do pequi é um subproduto não explorado, que gera resíduo orgânico. No entanto, tem sido considerado como fonte interessante de compostos bioativos, principalmente de antioxidantes. Dessa forma, despertou-se o interesse por pesquisas focadas no controle de doenças que cursam com estresse oxidativo^{48,49,50}. O alto potencial antioxidante do extrato hidroetanólico a base de casca de pequi, foi atribuído à uma fração com grande

quantidade de ácido gálico livre, um composto fenólico flavonóide presente na concentração de, $26,54 \pm 1,13$ mg/g de matéria seca⁴⁸.

Os compostos fenólicos são moléculas bioativas, que apresentam anel aromático e grupos hidroxila. São elementos funcionais que dão adstringência, aroma e estabilidade oxidativa aos alimentos e que são detectados em vários vegetais. A capacidade antioxidante de um determinado composto fenólico depende de sua estrutura molecular e tem relação com o posicionamento de seus grupos hidroxila e capacidade de hidroxilação. Corresponde ao acréscimo e substituição de grupos hidroxila na molécula, com doação de elétrons, redução do ferro e inibição de peroxidação lipídica para estabilizar moléculas. Dessa forma, flavonóides como o ácido gálico estão entre os principais compostos em capacidade antioxidante⁵¹.

Avaliações sobre a composição e o potencial antioxidante da casca do pequi, epicarpo e mesocarpo externo demonstraram que sua principal constituição é de água, fibra alimentar e carboidratos. A quantidade de polifenóis pode variar bastante, de acordo com o método de extração e o solvente. Como exemplo, em um estudo onde diferentes métodos de extração foram testados com o objetivo de aumentar a vida de prateleira de linguiças de frango, o extrato hidroetanólico a 80% sob agitação foi o que apresentou as maiores quantidades de polifenóis. Por sua vez, a maior atividade antioxidante foi observada pelo método aquoso, que também apresentou bons resultados quando usado na inibição da oxidação lipídica de acordo com o aumento da concentração de extrato, em linguiças armazenadas por 42 dias⁴⁹.

O extrato etanólico da casca de pequi apresentou alta capacidade antioxidante em teste de meio aquoso DPPH, com concentração baixa de extrato ($9,44 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o extrato etanólico e $17,98 \text{ g.mL}^{-1}$ para o extrato aquoso)⁵. Além disso, foi observada alta capacidade antioxidante em fígado de ratos, em um sistema *in vitro* de microsomas. Nesse teste ocorre o estímulo à oxidação lipídica e o extrato etanólico de casca de pequi demonstrou excelente capacidade de inibição da peroxidação lipídica, 50% de inibição na concentração de $0,78 \mu\text{g.mL}^{-1}$, quando comparado aos resultados obtidos dos extratos de polpa e semente, com concentração de $33,84 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ⁵⁰. O extrato etanólico da casca de pequi também mostrou baixo potencial citotóxico e não apresentou potencial fototóxico³.

A suplementação *in vivo* com o extrato etanólico da casca de pequi sob a indução de isquemia e reperfusão cerebral em ratos, não resultou em diferença significativa, em relação ao grupo controle, quanto às lesões histopatológicas observadas. Porém, observou-se efeito modulatório benéfico sobre a expressão de proteínas MAPKs, especialmente a ERK1/2.

Os resultados são indicativos do potencial antioxidante *in vivo* dos compostos presentes na casca de pequi⁵².

Além do efeito antioxidante observado *in vitro* na utilização de extratos a base de casca de pequi⁵³, observou-se também efeito anti clastogênico, ou seja, previne desestruturação do DNA, ao se utilizar o extrato de polpa^{53,55}. Também foi observado efeito antioxidante *in vitro* de extratos etanólicos ` base de polpa e amêndoa^{56,57}.

Existem poucos estudos *in vivo* que relatam o efeito antioxidante proveniente do pequi sobre enfermidades que cursam com estresse oxidativo^{52,58}. Porém, como suplemento, ele foi testado utilizando a polpa e amêndoa associada a ração em camundongos, alimentados com dieta hipercalórica, com resultados promissores ao promover o aumento dos níveis de lipoproteínas antiaterogênicas⁵⁹.

Diante de todas as evidências mencionadas, acredita-se que o pequi seja um fruto com muito potencial no fornecimento de princípios ativos antioxidantes para o tratamento e prevenção de doenças como a obesidade e enfermidades agudas e crônicas que cursam com estresse oxidativo^{59,3}.

Nesse contexto, o objetivo geral com essa pesquisa foi analisar o efeito do extrato etanólico da casca de pequi sobre o dano cerebral induzido por isquemia e reperfusão encefálica, em ratas submetidas a dieta hipercalórica, que resultou em dois estudos.

O primeiro estudo, intitulado “O extrato etanólico da casca de pequi reduz lesões de isquemia e reperfusão encefálica induzida em ratas submetidas a dieta hipercalórica”, teve por objetivo determinar se o extrato etanólico da casca de pequi reduz lesões de isquemia e reperfusão encefálica induzida em ratas submetidas a dieta hipercalórica. Além disso, procurou-se avaliar se o extrato apresenta alguma ação sobre o processo de deposição de gordura e sobre as concentrações de triglicérides dos animais. Concluiu-se que o extrato efetivamente reduz as lesões, sem influenciar nos níveis de triglicérides e ganho de peso.

No segundo estudo, intitulado “O extrato etanólico da casca de pequi sobre a viabilidade neuronal e expressão de p-ERK1/2 e AMPK α pós isquemia encefálica transitória em ratas alimentadas com dieta hipercalórica”, visou-se determinar se o extrato etanólico da casca de pequi atua sobre a viabilidade neuronal no córtex cerebral e no hipocampo e se esse modula a expressão da p-ERK1/2 e da p-AMPK α após indução de isquemia e reperfusão encefálica em ratas alimentadas com dieta hipercalórica. De fato, não houve efeito sobre a viabilidade neuronal no córtex cerebral, mas o extrato reduziu a ativação de ERK1/2 e da AMPK α com o avançar do tempo de reperfusão no córtex cerebral de ratas alimentadas com dieta hipercalórica.

Referências

1. Gregoris E, Lima GPP, Fabris S, Bertelle M, Sicari M, Stevanato R. Antioxidant properties of Brazilian tropical fruits by correlation between different assays. *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 1-8.
2. Rosso VV. Bioactivities of Brazilian Fruits and the Antioxidant Potential of Tropical Biomes. *Food and Public Health.* 2013; 3(1): 37-51.
3. Roesler R, Lorencini M, Pastore G. Brazilian cerrado antioxidant sources: cytotoxicity and phototoxicity in vitro. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2010; 30(3): 814-821.
4. Machado MTC, Mello BCBS, Hubinger MD. Study of alcoholic and aqueous extraction of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) natural antioxidants and extracts concentration by nanofiltration. *J Food Eng.* 2013; 117: 450-457.
5. Roesler R, Malta LG, Carrasco LC, Holanda RB, Sousa CAS, Pastore GM. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2007; 27(1):53-60.
6. Feitosa MM. Semiologia do sistema nervoso de pequenos animais. In: Feitosa FLF. *Semiologia Veterinária a arte do diagnóstico.* 3rd ed. São Paulo: Roca; 2014.p. 449-546.
7. Marieb EM. *Anatomy & physiology coloring workbook: a complet guide.* 10nd ed. San Francisco: Benjamin Cummings; 2012. 416 p. English.
8. Godoi DA, Antunes MIPP, Arias MVB, Grumadas CE, Reia AZ, Nagashima JK. Retrospective study of anesthetic proceedings realized in dogs and cats undergoing neurosurgeries. *Semina: Ciências Agrárias.* 2009; 30(1): 171-180.
9. Blinder P, SHIH AY, Rafie C, Kleinfeld D. Topological basis for the robust distribution of blood to rodent neocortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2010; 27(28): 12670 – 12675.
10. Ruiz-Ares G, Martínez-Sanchés P, Fuentes B. Enfermedades cerebrovasculares. *Medicine.* 2015; 11(71): 4221-4229.
11. Gilgun-Sherki Y, Rosenbaum Z, Melamed E, Offen D. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol Ver.* 2002; 54(2): 271-284.
12. Posser T. Efeitos biológicos e moleculares de compostos orgânicos sintéticos de selênio sobre o sistema nervoso central e neurotoxicidade do manganês. [Tese]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas; 2009.
13. Tewari A, Mahendru V, Sinha A, Bilotta F. Antioxidants: The new frontier for translational research in cerebroprotection. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol.* 2014; 30(2): 160-171.
14. Mangus DB, Huang L, Applegate PM, Gatling Jw, Zhang J, Applegate II RL. A sitematic review of neuroprotective strategies after cardiac arrest: from bench to bedside (Part I – Protection via specific pathways). *Medical Gas Research.* 2014; 4: 1-9.
15. Mendes FF, Rodrigues DF, Prado YCL, Araújo EG. Isquemia cerebral em cães e gatos. *Enciclopédia Biosfera.* 2013; 9(13): 1361-1386.
16. Nathaniel TI, Williams-Hernandez A, Hunter AL, Liddy C, Peffley DM, Umesiri FE, Imeh-Nathaniel A. Tissue hypoxia during ischemic stroke: Adaptive clues from hypoxia-tolerant animal models. *Brain Research Bulletin.* 2015; 114(2015): 1-12.
17. Martínez-Sánchez P, Fuentes B, Ruiz-Ares G. Ictus isquémico, infarto cerebral y ataque isquémico transitorio. *Medicine.* 2015; 11(71): 4230-4241.
18. Homi HM, Silva Júnior BA, Velasco IT. Fisiopatologia da isquemia cerebral. *Revista Brasileira de Anestesiologia.* 2000; 50(5): 405 – 414.

19. Bickler PE, Donohoe PH. Adaptive responses of vertebrate neurons to hypoxia. *The Journal of Experimental Biology*. 2002; 205: 3579–3586.
20. Sabri M, Lass E, Macdonald RL. Early Brain Injury: A Common Mechanism in Subarachnoid Hemorrhage and Global Cerebral Ischemia. *Stroke Research and Treatment*. 2013; 2013: 1-9.
21. Jivad N, Rabiei Z. Review on herbal medicine on brain ischemia and reperfusion. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2015; 5(10): 789-795.
22. Rojas H, Ritter C, Pizzol F. Mecanismos de disfunção da barreira hematoencefálica no paciente criticamente enfermo: ênfase no papel das metaloproteínases de matriz. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 2011; 23(2): 222-227.
23. Plesnila N. Pathophysiological role of global cerebral ischemia following subarachnoid hemorrhage: the current experimental evidence. *Stroke Res Treat*. 2013; 2013:1-9.
24. Zhang S, Qi Y, Xu Y, Han X, Peng J, Liu K, Sun CK. Protective effect of flavonoid-rich extract from *Rosa laevigata* Michx on cerebral ischemia-reperfusion injury through suppression of apoptosis and inflammation. *Neurochem Int*. 2013;63(5):522-32.
25. Lee HK, Jang JY, Yoo HS, Seong YH. Neuroprotective effect of phytoceramide against transient focal ischemia-induced brain damage in rats. *Arch Pharm Res*. 2015;38(12):2241-50.
26. Sawe N, Steinberg G, Zhao H. Dual roles of MAPK/ERK1/2 signaling pathway after stroke. *J Neurosci Res*. 2008; 86: 1659-1669.
27. Ho Y, Samarasinghe R, Knoch ME, Lewis M, Aizenman E, Defranco DB. Selective inhibition of mitogen-activated protein kinase phosphatases by zinc accounts for extracellular signal regulated kinase ½ dependent oxidative neuronal cell death. *Mol Pharmacol*. 2008; 74(4): 1141-1151.
28. Khan M, Singh I. Inhibition of the AMPK/nNOS pathway for neuroprotection in stroke. *Neural Regen Res*. 2016; 11(3): 398-399.
29. Ronnett GV, Ramamurthy S, Kleman AM, Landree LE, Aja S. AMPK in the Brain: Its Roles in Energy Balance and Neuroprotection. *J Neurochem*. 2009; 109(1): 17-23.
30. Fu L, Huang L, Cao C, Yin Q, Liu J. Inhibition of AMP-activated protein kinase alleviates focal cerebral ischemia injury in mice: Interference with mTOR and autophagy. *Brain Res*. 2016 Nov 1;1650:103-111.
31. Chen W, Wei S, Yu Y, Xue H, Yao F, Zhang M, Xiao J, Hatch GM, Chen L. Pretreatment of rats with increased bioavailable berberine attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury via down regulation of adenosine-5'-monophosphate kinase activity. *Eur J Pharmacol*. 2016;779:80-90.
32. Yang H, Li L, Zhou K, Wang Y, Guan T, Chai C, Kou J, Yu B, Yan Y. Shengmai injection attenuates the cerebral ischemia/reperfusion induced autophagy via modulation of the AMPK, mTOR and JNK pathways. *Pharm Biol*. 2016;54(10):2288-97.
33. Maddahi A, Edvinsson L. Cerebral ischemia induces microvascular pro-inflammatory cytokine expression via the MEK/ERK pathway. *J Neuroinflammation*. 2010; 7(14): 2-13.
34. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs). Global status report on noncommunicable diseases 2014; Berna: World Health Organization; 2014. 298p.
35. Bezerra APM, Oliveira DM. Metabolic Syndrome: molecular basis and reasons for interaction with obesity. *Demetra*. 2013; 8(1): 63-76.
36. Fonseca LJ, Nunes-Souza V, Guedes Gda S, Schettino-Silva G, Mota-Gomes MA, Rabelo LA. Oxidative status imbalance in patients with metabolic syndrome: role of the myeloperoxidase/hydrogen peroxide axis. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:1-14.

37. Ruiz-Núñez B, Dijck-Brouwer J, Muskiet FAJ. The relation of saturated fatty acids with low-grade inflammation and cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2016; 36 (2016): 1-20.
38. Velloso JCR, Parabocz GC, Manente FA, Ribas JT, Lima LW. Alterações metabólicas e inflamatórias em condições de estresse oxidativo. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2013;34(3):305-312.
39. Ahmed AA, Fedail JS, Musa HH, Musa TH, Sifaldin AZ. Gum Arabic supplementation improved antioxidant status and alters expression of oxidative stress gene in ovary of mice fed high fat diet. *Middle East Fertil Soc J*. 2016; 21: 101-108.
40. Fiorino P, Américo ALV, Muller CR, Evangelista FS, Santos F, Leite APO, Farah V. Exposure to high-fat diet since post-weaning induces cardiometabolic damage in adult rats. *Life Sciences*. 2016; 160: 12-17.
41. Heinonen I, Rinne P, Ruohonen S, Ahotupa M, Savontaus E. The effect of equal caloric high fat and western diet on metabolic syndrome, oxidative stress and vascular endothelial function in mice. *Acta Physiol*. 2014; 211: 515-527.
42. Morrison CD, Pistell PJ, Ingram DK, Johnson WD, Liu Y, Fernandez-Kim SO, White CL, Purpera MN, Uranga RM, Bruce-Keller AJ, Keller JN. High fat diet increases hippocampal oxidative stress and cognitive impairment in aged mice: implications for decreased Nrf2 signaling. *J Neurochem*. 2010; 114:1581-1589.
43. Sippel C, Bastian RMA, Giovanella C, Faccin C, Contini V, Dal Bosco S. Processos inflamatórios da obesidade. *Revista de Atenção a Saúde*. 2014; 12(42):48-56.
44. Teles YCF, Monteiro RP, Oliveira MS, Ribeiro-Filho J. O papel do estresse oxidativo na síndrome metabólica. *J Health Sci Inst*. 2015; 33(1): 89-93.
45. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jahurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN, Omar AKM. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng*. 2013; 117(4): 426-436.
46. Santos FS, Santos RF, Dias PP, Zanão Jr LA, Tomassoni F. A cultra do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Acta Iguazu*. 2013; 2(3): 46-57.
47. Lima A, Silva AMO, Trindade RA, Torres RP, Mancini-Filho J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Rev Bras Frutic*. 2007; 29(3): 695-698.
48. Rocha LB, Melo AM, Paula SLA, Nobre SAM, Abreu IN. Gallic acid as the major antioxidant in pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit peel. *Rev Bras Plantas Med*. 2015; 17(4): 592-598.
49. Monteiro SS. Caracterização química da casca de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), avaliação de seus extratos e aplicação em linguiça de frango para aumento do shelf life. [Dissertação]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais; 2013.
50. Roesler R, Catharino RR, Malta LG, Eberlin MN, Pastore G. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2008; 110: 711-717.
51. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 2006; 99:191-203.
52. Miguel MP. Ação neuroprotetora do extrato etanólico da casca de pequi em cérebros de ratos submetidos a isquemia e reperfusão cerebral. [Tese]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia; 2011.

53. Morais ML, Siva ACR, Araújo CRR, Esteves EA, Dessimoni-Pinto NAV. Determinação do potencial antioxidante *in vitro* de frutos do cerrado brasileiro. Rev Bras Frutic. 2013; 35(2):355-360.
54. Miranda-Vilela AL, Resck IS, Grisolia CK. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp. Genet Mol Biol. 2008; 31(4): 956-963.
55. Khoury J; Resck IS, Poças-Fonseca M, Sousa TMM, Pereira LO, Oliveira ABB, Grisolia CK. Anticlastogenic potential and antioxidant effects of an aqueous extract of pulp from the pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb). Genet Mol Biol. 2007; 30(2): 442-448.
56. Machado MTC, Mello BCBS, Hubinger MD. Study of alcoholic and aqueous extraction of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) natural antioxidants and extracts concentration by nanofiltration. J Food Eng. 2013; 117: 450-457.
57. Machado MTC, Mello BCBS, Hubinger MD. Evaluation of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) aqueous extract quality processed by membranes. IChemE. 2015; 95: 304-312.
58. Mendes FF. Efeito neuroprotetor do extrato etanólico da casca de pequi em lesões de isquemia e reperfusão cerebral de ratas submetidas a dieta hipercalórica. [Dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia; 2012.
59. Aguilar EC, Queiroz MCMN, Oliveira DA, Oliveira NJF. Serum lipid profile and hepatic evaluation in mice fed diet containing pequi nut or pulp (*Caryocar brasiliense* Camb.). Ciênc Tecnol Aliment. 2011; 31(4): 879-883.

CAPÍTULO 2 – O EXTRATO ETANÓLICO DA CASCA DE PEQUI REDUZ LESÕES DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO ENCEFÁLICA INDUZIDA EM RATAS SUBMETIDAS A DIETA HIPERCALÓRICA

Resumo

O potencial antioxidante do pequi tem despertado interesse em sua utilização para minimizar os efeitos do estresse oxidativo. Com isso, o objetivo com esse estudo foi avaliar a ação do extrato etanólico da casca de pequi sobre o dano induzido por isquemia e reperfusão encefálica em ratas alimentadas com dieta hipercalórica. Utilizaram-se 48 ratas Wistar distribuídas em dois grupos de 24, de acordo com a dieta, comercial ou hipercalórica, estabeleceram-se subgrupos de 12, tratadas com o extrato ou não, e estipularam-se grupos menores de seis animais separados de acordo com os tempos de reperfusão, duas e quatro horas após isquemia encefálica global transitória induzida. Os animais que receberam dieta hipercalórica apresentaram aumento significativo de triglicérides e quantidade de gordura visceral ($p < 0,05$). Os animais do grupo tratado com o extrato e que receberam dieta hipercalórica apresentaram menor intensidade de vacuolização de neurópilo e menor número de neurônios corticais isquêmicos ($p < 0,05$). Os grupos submetidos a quatro horas de reperfusão, apresentaram menos lesões no plexo coróide hipocampal que os de duas horas ($p < 0,05$). O extrato etanólico da casca de pequi reduziu lesões de isquemia e reperfusão encefálica induzida em animais alimentados com dieta hipercalórica.

Palavras-chave: Antioxidante, *Caryocar brasiliense*, hipertrigliceridemia, isquemia cerebral global transitória.

ETHANOLIC EXTRACT OF PEQUI PEEL IN INDUCED TRANSIENT BRAIN ISCHEMIA LESIONS IN RATS FED WITH HIGH CALORIC DIET

Abstract

The antioxidant potential of pequi to relieve oxidative stress damage has been raising researchers interest. Therefore, the aim of this study was to evaluate the action of the ethanolic extract of pequi peel on the brain damage induced by ischemia and reperfusion in rats fed with hypercaloric diet. 48 Wistar rats were separated into two groups according to the diet, commercial or hypercaloric, sub-divided into subgroups of 24, treated with the extract or not, and separated into smaller groups with six animals according to reperfusion times, two and four hours after induced transient global brain ischemia. Animals that received a hypercaloric diet presented a significant increase of triglycerides and amount of visceral fat ($p < 0.05$). The animals that were treated with the extract and received hypercaloric diet had less neuropilus vacuolization and fewer ischemic cortical neurons ($p < 0.05$). The groups subjected to four hours of reperfusion presented fewer lesions in the hippocampal choroid plexus than the two hours ($p < 0.05$). The ethanolic extract of pequi peel relieved lesions of induced transient brain ischemia in animals fed a high calorie diet.

Keywords: Antioxidants, *Caryocar brasiliense*, hypertriglyceridemia, transient global cerebral ischemia.

Introdução

As doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de morte em seres humanos. Essas enfermidades englobam as doenças cerebrovasculares, como o acidente vascular encefálico, caracterizado por quadros agudos de isquemia do encéfalo, de forma transitória ou permanente, são a segunda maior causa de morte no mundo, além de apresentar a maior taxa de morbidade, resultando em elevado ônus ao sistema de saúde e previdenciário¹.

A isquemia cerebral global transitória (ICGT) tem prognóstico que varia de reservado a desfavorável. É resultante da redução abrupta do aporte sanguíneo para o encéfalo por diminuição da pressão arterial, observada em casos de parada cardíaca, choque circulatório ou aumento da pressão intracraniana, como nos casos de trauma cranioencefálico. Nesses quadros clínicos, é comum a perda seletiva de neurônios em áreas consideradas mais vulneráveis, como córtex cerebral e hipocampo, além de causar lesões em substância branca, que se desdobram em déficits neurológicos graves^{2,3}.

A parada cardíaca é uma das principais causas de ICGT e apresenta baixa taxa de sobrevivência, cerca de 20%, sendo que apenas 8% dos pacientes não apresentam algum grau de déficit neurológico⁴. O dano neurológico promovido pela ICGT é a maior causa de mortes após a realização bem-sucedida do procedimento de reanimação cérebro-cardio-pulmonar⁵.

A ICGT ocasiona lesão neurológica significativa de várias maneiras: morte celular por necrose, desregulação do Ca^+ intracelular com ativação de proteases, toxicidade pela liberação de aminoácidos excitatórios no espaço extracelular e inflamação^{5,6}. Outra forma de lesão que se instala no encéfalo após o retorno abrupto do fluxo sanguíneo é o estresse oxidativo, caracterizado como processo de reperfusão. Nessa situação, espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) são produzidas em excesso, sem adequada neutralização por antioxidantes endógenos. EROs e ERNs têm capacidade de deteriorar estrutura e funções celulares, além de estimular processo inflamatório e morte celular por apoptose⁷.

Os principais fatores de risco relacionados a doenças cardio e cerebrovasculares estão diretamente relacionados ao estilo de vida e nutrição. Atualmente, quadros como sobrepeso, dislipidemias, obesidade, hipertensão e diabetes tipo II, ocasionados principalmente por consumo excessivo de alimentos ricos em elementos energéticos, como gordura e carboidratos, são considerados importantes fatores de risco, que ao predispor os pacientes às doenças cerebrovasculares, causam grande preocupação para a comunidade médica mundial¹.

Estudos relacionados ao uso de antioxidantes exógenos capazes de neutralizar ou reduzir a formação de EROs e ERNs para tratamento do estresse oxidativo cerebral em casos de isquemia e reperfusão foram desenvolvidos^{8,9}. Dentre esses, pesquisas com plantas e seus extratos são relevantes, tanto pelo potencial dos resultados obtidos, quanto pelo apelo conservacionista^{6,10,11}.

O pequi (*Caryocar brasiliense*) é um fruto típico da região do cerrado brasileiro, utilizado pela população da região como alimento e fitoterápico para o tratamento de enfermidades respiratórias. Já foi demonstrada sua atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, por ser rico em compostos fenólicos^{12,13}. A suplementação com polpa de pequi reduziu a peroxidação lipídica no fígado de ratos alimentados com dieta hipercalórica¹⁴. Esse potencial antioxidante em reduzir o processo de peroxidação lipídica também foi observado *in vitro*, ao se utilizar extrato etanólico de casca do fruto. Com isso, o pequi demonstrou ser uma fonte interessante de antioxidantes exógenos para o tratamento de doenças que cursam com o estresse oxidativo¹².

Portanto, com esse estudo objetivou-se avaliar se o tratamento profilático com o extrato etanólico da casca de pequi (EECP) apresenta ação benéfica na isquemia encefálica global transitória induzida, em ratas submetidas a dieta hipercalórica.

Material e métodos

As atividades experimentais foram desenvolvidas nas dependências da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (UFG), em parceria com a Faculdade de Farmácia/UFG e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – UFG (Protocolo n° 072/12, ANEXO A e B).

1. O extrato etanólico da casca de pequi (EECP)

Para a obtenção do EECP, utilizou-se aproximadamente 180 kg de casca fresca de frutos adquiridos no comércio local, provenientes da região sul da Bahia. Após higienização, a casca (epicarpo e mesocarpo externo) foi retirada manualmente, picada, seca em estufa de ar forçado e triturada em moinho analítico, obtendo-se 9kg de casca pulverizada. Em seguida, foi realizada a extração, na proporção de 1 kg de pó de casca para 1 litro de etanol a 95%. O extrato resultante foi submetido à rotoevaporação a frio, resultando em 450 mL de extrato bruto, que foi armazenado a 4°C, técnica adaptada de Roesler *et al.*¹⁵.

As análises físico-químicas do EECP foram realizadas conforme padronizado¹⁷. O teor de fenóis totais presentes no extrato foi determinado pelo método de Folin Denis¹⁸.

O EECP foi fornecido diariamente por 30 dias, via gavagem, na dose de 600mg/kg de peso vivo. O fornecimento iniciou-se 30 dias após o início das dietas, sendo as dosagens ajustadas semanalmente por pesagem dos animais.

2. Dietas

A dieta comercial utilizada foi específica para roedores (Presence®, Presence Nutrição Animal, Paulínea, SP, Brasil), (Composição em ANEXO C).

A dieta hipercalórica consistiu em uma receita previamente padronizada¹⁸, a qual fabricou-se a partir da mistura das proporções de cada ingrediente por peso: 37,5% de ração comercial triturada, 25% de chocolate branco, 25% de amendoim torrado e 12,5% de biscoito de maisena (12,5%). Os ingredientes foram triturados, misturados ao chocolate derretido, peletizados e armazenados a -20 C°. As dietas foram fornecidas diariamente, por 60 dias, à vontade, em quantidades iguais para os grupos.

3. Tratamentos e colheita de sangue

Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de 24°C +/- 2°C, com água e ração à vontade, ciclos de claro e escuro de 12 horas e passaram por período de adaptação de 10 dias.

Foram utilizadas 48 ratas adultas, da linhagem Wistar, pesando em média 200 gramas, alocadas em oito grupos (n=6), de acordo com o tratamento administrado, dieta fornecida e tempo de reperusão. Os animais dos grupos NP2 e NP4 foram tratados com EECP, dieta comercial e submetidos à reperusão por duas horas e quatro horas, respectivamente. Similarmente, os animais dos grupos HP2 e HP4 foram tratados com EECP, porém receberam dieta hipercalórica e foram submetidos à reperusão por duas horas e quatro horas, respectivamente.

Os animais dos grupos N2 e N4 não foram tratados com EECP, receberam dieta comercial e foram submetidos à reperusão por duas horas e quatro horas, respectivamente. Da mesma forma, os animais dos grupos H2 e H4 não foram tratados com EECP, mas receberam dieta hipercalórica e foram submetidos à reperusão por duas horas e quatro horas, respectivamente.

A colheita de sangue periférico da base da cauda foi realizada no dia 0, antes do início das dietas, e aos 60 dias após início das dietas, de todos os animais, para confirmação

da hipertriglicedemia nos grupos H e HP e dos parâmetros de normalidade nos grupos N e NP. Para a dosagem de triglicerídeos, foi utilizado o método colorimétrico enzimático com o aparelho portátil Accutrend Plus® (Roche, São Paulo, SP, Brasil)¹⁹.

4. Procedimento cirúrgico e colheita de amostras

Após o período de tratamento, foi realizada a indução cirúrgica do quadro de isquemia cerebral global por oclusão bilateral e simultânea por ligadura temporária das artérias carótidas comuns, com fio de seda 4-0, associada à hipotensão por meio de anestésicos. Utilizou-se como medicação pré-anestésica a associação de 10mg/kg de cloridrato de tramadol (Cloridrato de Tramadol®, União Química, São Paulo, SP, Brasil) com 3mg/kg de cloridrato de midazolam (Midazolam®, União Química, São Paulo, SP, Brasil) por via intraperitoneal, e para indução e manutenção, o anestésico inalatório isoflurano (Isoforine®, Cristália, Itapira, SP, Brasil). O tempo de isquemia cerebral foi padronizado em 45 minutos para todos os animais. Os tempos de reperfusão foram divididos de acordo com os subgrupos de duas e quatro horas e foi realizada oxigenoterapia durante o pós-operatório, técnica adaptada de Wellons *et al.*²⁰.

Ao final dos tempos preconizados de reperfusão, os animais foram submetidos à eutanásia por overdose anestésica com isoflurano (Isoforine®, Cristália, Itapira, SP, Brasil) em câmara fechada. Os cérebros foram colhidos e mantidos em formol tamponado a 10%, para preparação das lâminas para avaliação histológica.

A avaliação da quantidade de gordura visceral foi realizada por meio da colheita e pesagem do tecido adiposo retroperitoneal, inguinal e omental, para determinar se houve diferença quanto a deposição de gordura abdominal, entre os animais que foram alimentados com a dieta hipercalórica e os animais com dieta comercial. Além disso, foi utilizada a técnica adaptada de Ravagnani *et al.*²¹ para verificar se o EECP apresentou algum efeito sobre a deposição de gordura.

5. Análise histopatológica

As lâminas histológicas foram preparadas e coradas segundo o protocolo rotineiro do laboratório de histopatologia da EVZ/UFG, pela coloração de Hematoxilina-Eosina (HE)²². Em seguida, foram avaliadas por meio descritivo e por escores que determinaram o grau de lesão^{20,8,23} detalhada no Quadro 1. Para tal, foram avaliadas as regiões do córtex cerebral, dividido em três regiões, rostral, média e caudal. Analizou-se a região do hipocampo e suas sub-regiões principais divididas em dorsal e giro denteado. Avaliou-se a região do

plexo coróide adjacente ao hipocampo e realizaram-se comparações entre os grupos e dentro dos subgrupos com duas horas e quatro horas de reperfusão.

QUADRO 1 – Descrição do método qualitativo por escore para avaliação do cérebro dos animais de estudo após tratamentos e indução de isquemia e reperfusão.

Região de avaliação e tipo de lesão a ser avaliada	Descrição dos graus de lesão por escores*			
	0	1	2	3
Substâncias branca e cinzenta do cérebro	Ausência de lesão	Vacuolização e congestão com foco em uma região de avaliação	Vacuolização e congestão em duas regiões de avaliação	Vacuolização e congestão ocupando as três regiões de estudo
Neurônios isquêmicos no córtex cerebral	Ausência de lesão	Presença de neurônios isquêmicos e congestão em uma região de avaliação	Presença de neurônios isquêmicos e congestão em duas regiões de estudo	Presença de neurônios isquêmicos e congestão nas três regiões de estudo
Neurônios isquêmicos na região do hipocampo	Ausência de lesão	Presença de neurônios isquêmicos concentrados em apenas uma área	Presença de neurônios isquêmicos em mais de uma área de estudo	Presença de neurônios isquêmicos associada a intensa vacuolização
Lesões de isquemia e reperfusão no plexo coróide próximo ao hipocampo	Ausência de lesão	Presença de congestão	Presença de congestão associada a vacuolização de epitélio	Presença de congestão, vacuolização de epitélio e perda da arquitetura do revestimento do plexo associada a hemorragia

*Metodologia descritiva adaptada de Mendes *et al.*¹³, Wellons *et al.*²⁰ e Shafri *et al.*²³, com estabelecimento de escores para avaliação qualitativa das lâminas.

6. Métodos estatísticos

Realizou-se a avaliação histopatológica descritiva e o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Foi feita análise estatística pelo teste para dados não paramétricos de Kruskal Wallis associado ao teste de Dunn, para a avaliação da diferença entre os grupos. O teste de Mann Whitney foi utilizado para a avaliação comparativa entre os subgrupos de duas e quatro horas de reperfusão. Os testes ANOVA e Tukey foram utilizados para os dados paramétricos de quantidades de gordura visceral dos animais e concentração de triglicerídeos totais nos

tempos 0 e aos 60 dias de experimento. Todos os testes foram aplicados utilizando o programa estatístico BioEstat[®] versão 5.3.

Resultados

A análise do EECP revelou pH médio de $5,7 \pm 0,456$, teor de sólidos de $29,19\% \pm 0,003$ e densidade média de $0,944 \pm 0,003$ g/mL. O extrato apresentou 88g ATE. Kg⁻¹ de compostos fenólicos totais, o que corresponde a 30,14% do resíduo seco.

As concentrações de triglicerídeos no tempo 0 não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos. Houve aumento significativo nos níveis de triglicerídeos em todos os grupos aos 60 dias de avaliação ($p < 0,05$), porém os grupos H e HP apresentaram hipertrigliceridemia evidente ($p < 0,05$) em relação aos grupos N e NP (Tabela 1). A suplementação com EECP não alterou de forma significativa as concentrações de triglicerídeos.

TABELA 1 – Médias (n=12) das concentrações de triglicerídeos totais (mg/dl) do sangue periférico de ratas nos tempos (T) 0 e 60 dias de experimento.

Período	DIETAS (GRUPOS)			
	Comercial sem EECP (N)	Comercial com EECP (NP)	Hipercalórica sem EECP (H)	Hipercalórica com EECP (HP)
T= 0	143,00 ± 9,67	138,67 ± 9,87	149,67 ± 13,77	139,00 ± 4,81
T= 60*	167,67 ^A ± 5,88	151,17 ^A ± 7,22	230,67 ^B ± 13,44	234,33 ^B ± 12,29
p (T= 60)	0,0000001			

*Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa (testes ANOVA e Tukey entre os grupos).

EECP- Extrato etanólico da casca de pequi.

Os animais dos grupos H e HP apresentaram maior quantidade de gordura visceral aos 60 dias ($p < 0,05$) quando comparados aos grupos N e NP, que não receberam a dieta hipercalórica (Tabela 2). A suplementação com EECP não alterou de forma significativa as quantidades de gordura visceral dos animais do estudo. Porém, deve-se ressaltar que a dieta hipercalórica utilizada foi eficiente em promover o surgimento de hipertrigliceridemia, sobrepeso e deposição de gordura visceral na cavidade abdominal dos animais.

TABELA 2 – Médias (n=12) dos pesos da gordura visceral (g) presente no tecido adiposo retroperitoneal, inguinal e omental de ratas aos 60 dias de experimento.

Período	DIETAS (GRUPOS)			
	Comercial sem EECP (N)	Comercial com EECP (NP)	Hipercalórica sem EECP (H)	Hipercalórica com EECP (HP)
T= 60	8,33 ± 2,42 ^A	5,25 ± 2,86 ^A	26,5 ± 5,77 ^B	24,75 ± 6,28 ^B
p	0,0000001			

*Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa (testes ANOVA e Tukey entre os grupos).

EECP- Extrato etanólico da casca de pequi.

Na avaliação histopatológica notou-se intensa vacuolização de substância branca em todos os animais sem que houvesse qualquer diferença estatística entre os grupos e subgrupos relativos aos tempos de reperfusão, independente do tratamento (Figura 1A). Em todos os grupos, foi possível observar neurônios isquêmicos na região cortical, principalmente nas camadas III (camada piramidal externa), IV (camada granular interna) e V (camada piramidal interna) do córtex, associados à congestão e vacuolização (Figura 1B), principalmente nas camadas IV e V, porém com intensidades diferentes entre os grupos.

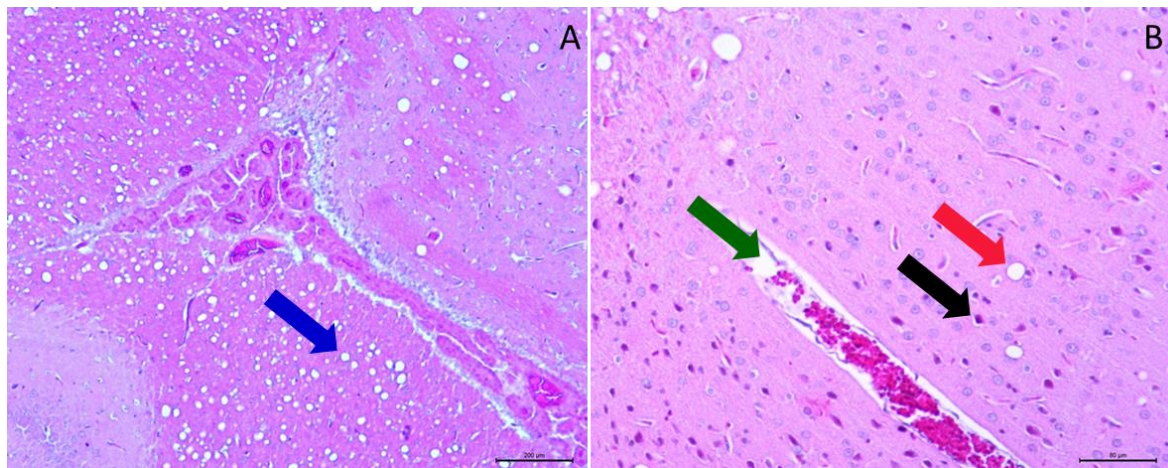


FIGURA 1 – Fotomicrografia de encéfalo de rata após indução de isquemia cerebral global por 45 minutos e reperfusão de duas horas, grupo N2. HE. A) Região de substância branca intensamente vacuolizada (seta azul) adjacente ao hipocampo e circundante ao plexo coróide. 2,5X. B) Córtex cerebral parietal apresentando lesões de isquemia e reperfusão cerebral, neurônio isquêmico (seta preta), congestão (seta verde) e vacuolização de neuropilo (seta vermelha). 100x.

A maior parte das lesões observadas concentrava-se nas regiões do córtex frontal e parietal. Após duas horas de reperfusão, a quantidade e distribuição de neurônios isquêmicos foi significativamente menor ($p < 0,05$) no grupo HP2 em relação ao grupo N2

(Tabela 3). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos às quatro horas e nem quando comparados os subgrupos de duas e quatro horas entre si.

TABELA 3 – Escores relativos à distribuição de neurônios isquêmicos encontrados no córtex cerebral de ratas de acordo com a dieta (N=comercial ou H =hipercalórica), suplementação ou não com extrato etanólico da casca de pequi (P) e tempo de reperfusão de duas (T=2) ou quatro (T=4) horas.

Animal	DIETAS (GRUPOS)							
	N T=2 ^A	NP T=2 ^{AB}	H T=2 ^{AB}	HP T=2 ^B	N T=4	NP T=4	H T=4	HP T=4
1	3	2	2	1	2	1	1	1
2	2	2	2	1	2	2	2	2
3	2	2	2	2	2	2	1	2
4	2	3	2	2	2	3	3	3
5	2	2	2	2	2	2	3	2
6	3	2	2	1	2	2	3	2
p	0,03				0,8574			

Letras diferentes na linha correspondente aos tempos de reperfusão representam diferença estatística após as avaliações pelos testes de Kruskal Wallis e Mann Whitney.

Após duas horas de reperfusão, os animais do grupo HP2 apresentaram, de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$), menor grau de vacuolização de substância cinzenta quando comparados ao grupo H2; porém não houve diferença estatística significativa em relação aos grupos N2 e NP2. Às quatro horas de reperfusão, o grupo HP4 comportou-se de forma similar, demonstrando de forma significativa ($p < 0,05$) menos lesões que os grupos N4 e H4, porém, sem diferença significativa com o grupo NP4 (Tabela 4). Não houve diferença significativa nos subgrupos entre os períodos de reperfusão.

TABELA 4 – Escores relativos à vacuolização de neurópilo no córtex cerebral de ratas de acordo com a dieta (N=comercial ou H =hipercalórica), suplementação com extrato etanólico da casca de pequi (P) e tempo de reperfusão de duas (T=2) ou quatro (T=4) horas.

Animal	DIETAS (GRUPOS)							
	N T=2 ^{AB}	NP T=2 ^{AB}	H T=2 ^A	HP T=2 ^B	N T=4 ^{AB}	NP T=4 ^{ABC}	H T=4 ^{AB}	HP T=4 ^C
1	2	1	3	1	2	2	3	1
2	2	2	3	1	3	2	2	1
3	2	1	3	1	2	2	3	1
4	2	3	3	2	3	3	2	1
5	2	1	2	2	3	1	3	1
6	2	1	2	1	2	3	3	1
p	0,0081				0,0026			

Letras diferentes na linha correspondente aos tempos de reperfusão representam diferença estatística após as avaliações pelos testes de Kruskal Wallis e Mann Whitney.

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos N, H, NP e HP quanto à avaliação das lesões observadas no hipocampo dos animais, e nem entre os subgrupos de duas e quatro horas de reperfusão (Tabela 5).

TABELA 5 – Escores relativos às lesões no hipocampo cerebral de ratas de acordo com a dieta (N=comercial ou H =hipercalórica), suplementação com extrato etanólico da casca de pequi (P) e tempo de reperfusão de duas (T=2) ou quatro (T=4) horas.

Animal	DIETAS (GRUPOS)							
	N		NP		H		HP	
	T=2	T=2	T=2	T=2	T=4	T=4	T=4	T=4
1	2	2	2	1	3	1	2	3
2	3	2	2	1	1	2	1	3
3	3	2	2	2	2	3	2	1
4	1	3	1	2	2	2	2	2
5	1	2	1	1	2	2	1	2
6	3	1	2	1	2	1	3	1
p	0,2238				0,9558			

Foi possível observar neurônios isquêmicos no hipocampo, principalmente na região do giro denteado, além de vacuolização na mesma região em todos os grupos nos dois tempos de reperfusão. Também observou-se alguns neurônios isquêmicos na região dorsal do hipocampo em menor grau quando comparado ao giro denteado em alguns animais, porém não se visualizou vacuolização nessa região.

Ao realizar-se a avaliação descritiva comparando os subgrupos de duas e quatro horas de reperfusão das regiões do hipocampo, evidenciou-se que, independente do tempo de avaliação, o giro denteado foi a região mais afetada nesse estudo.

Não houve diferença entre os grupos N, H, NP e HP quanto às lesões observadas no plexo coróide hipocampal. Contudo, os animais do grupo HP apresentaram lesões menos graves ($p < 0,05$) nessa região às quatro horas de reperfusão quando comparado aos animais de duas horas do mesmo grupo (Tabela 6).

Alterações estruturais acentuadas do plexo coróide próximo a região hipocampal, com presença de congestão, vacuolização do epitélio, perda da arquitetura e hemorragia foram observadas em 60% dos animais (29/48).

TABELA 6 – Escores relativos às lesões no plexo coróide hipocampal de ratas de acordo com a dieta (N=comercial ou H =hipercalórica), suplementação com extrato etanólico da casca de pequi (P) e tempo de reperusão de duas (T=2) ou quatro (T=4) horas.

Animal	DIETAS (GRUPOS)							
	N T=2	NP T=2	H T=2	HP T=2*	N T=4	NP T=4	H T=4	HP T=4*
1	2	3	3	3	2	2	3	2
2	3	3	2	3	3	3	2	2
3	3	3	2	3	2	3	3	2
4	3	3	2	3	2	3	2	2
5	3	2	2	3	3	3	3	2
6	3	2	3	3	3	2	3	3
p	0,0798				0,28			

*Diferença estatística significativa após as avaliações pelo teste de Mann Whitney entre os tempos de reperusão para o grupo HP ($p = 0,0082$).

Discussão

A quantidade de compostos fenólicos presentes no extrato etanólico da casca de pequi nesse estudo foi menor que as encontradas em outras pesquisas^{15,25}. Contudo, o teor de compostos fenólicos pode variar muito de acordo com o método de extração, local e período de aquisição dos frutos^{15,29}. Este fato não determinou ausência de resultados menos significativos quanto à capacidade de neuroproteção, pois observou-se redução estatisticamente significativa das lesões no grupo grupo que recebeu a dieta hipercalórica tratado com o EECP.

Sabe-se que, apesar de haver uma relação entre a quantidade de compostos fenólicos e efeitos benéficos sobre o organismo, a estrutura molecular também é um dos fatores determinantes para a sua atividade, assim como a capacidade de manutenção de sua estrutura e atividade após a absorção pelo sistema gastrointestinal²⁵. Com isso, os resultados observados nesta investigação podem ter relação com a estabilidade molecular dos compostos fenólicos do EECP após absorção.

A dieta hipercalórica utilizada neste estudo ocasionou aumento significativo da deposição de gordura visceral e nas concentrações de triglicerídeos aos 60 dias nos grupos H e HP, como esperado. Resultados similares foram obtidos em estudos com o mesmo tipo de dieta^{25,30}, que descreveram o aumento da deposição de gordura na região visceral induzindo obesidade em ratos. Da mesma forma, foi observado aumento significativo nos níveis de triglicerídeos e na porcentagem de gordura visceral dos animais ao utilizarem a dieta

hipercalórica, determinante no aparecimento de alterações metabólicas como aumento da leptina, redução da adiponectina e alterações cardiovasculares, proporcionando o aumento no risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares associadas a esse tipo de dieta.

O aumento significativo nas concentrações de triglicerídeos observado em todos os grupos aos 60 dias pode ter ocorrido por variações metabólicas que ocorrem com o envelhecimento dos animais³². Porém, o aumento nos grupos H e HP foi significativamente maior do que o observado nos animais que não receberam a dieta, grupos N e NP, o que pode demonstrar a capacidade da dieta em elevar os triglicerídeos. A hipertrigliceridemia vem ganhando visibilidade e começa a ser considerada um fator de risco associado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, acredita-se que triglicerídeo aumentado em jejum tenha relação com o aumento das lipoproteínas ricas em triglicerídeos, que são capazes de piorar quadros de aterosclerose e induzir trombose e inflamação dos vasos^{33,34}.

Não foi observada influência benéfica do EECP nos níveis de triglicerídeos e na deposição de gordura visceral neste trabalho; porém, estes resultados não são suficientes para determinar que não houve qualquer efeito benéfico do EECP sobre o organismo durante o período experimental com a dieta hipercalórica. Em outro estudo que utilizou polpa e semente de pequi também não foi observada influência dessa suplementação sobre os níveis de triglicerídeos dos animais, mas observou-se um aumento significativo de lipoproteínas antiaterogênicas³⁵.

Neste estudo, o grupo HP apresentou redução significativa das lesões ocasionadas pela indução de isquemia e reperfusão encefálica. Acredita-se que o EECP tenha sido responsável por essa redução nos índices de lesão, pois relatos com extratos similares *in vitro* demonstraram alta capacidade de captura de radicais livres em meio hidrofílico e de redução do ferro, que é substrato para formação de EROS^{36,27}. Além disso, em outro trabalho com extrato de casca de pequi produzido a partir de epicarpo e mesocarpo externo, registrou-se alta capacidade de reduzir, ou mesmo inibir, a peroxidação lipídica por neutralização do radical H₂O₂ *in vitro*³⁷.

A isquemia encefálica global, nos períodos estabelecidos, foi capaz de promover lesões clássicas de isquemia e reperfusão no cérebro das ratas. O tempo preconizado para o princípio do surgimento de lesões é de 10 minutos de parada do fluxo sanguíneo e quanto maior o tempo de isquemia, mais graves as lesões observadas pós reperfusão⁵. O período de reperfusão máximo de quatro horas neste protocolo foi curto para se observar lesões como apoptose e infiltrado inflamatório. O processo de reperfusão cerebral é complexo pois fatores intrínsecos pós isquêmicos determinam o surgimento de hiperemia e fluxo inconstante em

diferentes zonas cerebrais pós isquemia encefálica transitória, determinando o surgimento de mais lesões associadas a isquemia, inflamação e ruptura da barreira hematoencefálica, mesmo após o restabelecimento do fluxo sanguíneo principal para o encéfalo. Preconiza-se para humanos que a janela terapêutica de oito horas é o tempo que se tem para tentar restabelecer o fluxo normal e minimizar essas lesões com agentes neuroprotetores³⁸. Nesta pesquisa, o EECF foi fornecido por 30 dias antes do procedimento de indução de isquemia encefálica transitória e acredita-se que possa ter promovido neuroproteção no grupo HP, minimizando os danos.

O efeito neuroprotetor *in vivo* aqui observado deve ser advindo do potencial antioxidante dos compostos fenólicos presentes no EECF utilizado. Essa hipótese se justifica pelo fato da maior parte de lesões ocasionadas por estresse oxidativo no cérebro de forma aguda ser resultante dos altos índices de peroxidação lipídica ocasionadas por EROs formados durante a reperfusão³⁹.

O fato de o grupo HP ter apresentado menores escores de lesões também pode indicar que o EECF apresenta atividade mais efetiva de neuroproteção em animais alimentados com dieta hipercalórica. Existem relatos que demonstraram efeitos benéficos de antioxidantes em reduzir a peroxidação lipídica e aumentar a produção de enzimas antioxidantes endógenas, o que atenua o estresse oxidativo sistêmico em quadros de obesidade induzida por dieta hipercalórica^{41,42}.

Foi observada intensa vacuolização de substância branca em todos os animais, para ambos os tempos de reperfusão. Apesar do estresse oxidativo cerebral induzido poder produzir lesões em substância branca³, nesse estudo o método de indução pode não ter sido suficiente para promover lesões tão intensas e similares em todos os animais, portanto outro elemento pode ter sido determinante no aparecimento de lesões com esse grau de intensidade.

Nesse estudo, imediatamente após a liberação do fluxo sanguíneo para o cérebro, os animais eram mantidos aquecidos e em máscaras de oxigênio a 100% e assim permaneciam até a melhora da função respiratória, pois ao final do procedimento cirúrgico observava-se intensa dispneia nos animais. Apesar do fornecimento de oxigênio fazer parte do tratamento inicial para a isquemia cerebral global, o mesmo é considerado controverso⁴², pois o fornecimento de O₂ a 100%, no momento da reperfusão, pode desencadear uma lesão conhecida por hiperoxia, o que aumenta intensamente a produção de EROs e a peroxidação lipídica no encéfalo, principalmente na substância branca, que se desdobra no aumento da área de lesão, maior desenvolvimento de edema e também está associada a maior perda neuronal⁴³. Essas alterações foram observadas nesse estudo, contudo, o fornecimento de

oxigênio no momento da reperfusão foi fundamental para a sobrevivência dos animais pelo período de estudo, e não poderia ter sido descartado.

Neste trabalho, verificou-se que o extrato etanólico da casca de pequi (*Caryocar brasiliense*) reduziu a vacuolização de substância cinzenta e lesões no plexo coroide hipocampal no quadro de isquemia encefálica transitória induzida em ratas alimentadas com dieta hipercalórica. Contudo, não influenciou a deposição de gordura visceral nem as concentrações de triglicérides.

A redução da vacuolização de neurópilo observada no córtex cerebral dos animais do grupo HP e das lesões de plexo coróide com o avançar do tempo mostram-se como resultados promissores em relação ao uso do EECP como agente neuroprotetor *in vivo*. Mais estudos devem ser realizados para a determinação dos mecanismos de neuroproteção desse extrato e sua atuação sobre o quadro de dislipidemia e obesidade, além da determinação e isolamento de príncípios ativos e estabelecimento de dosagens para a obtenção de respostas orgânicas melhores. O EECP é uma fonte interessante e importante de pesquisa, tanto na área de saúde quanto no aspecto de desenvolvimento sustentável e proteção do bioma cerrado.

Conclusão

O extrato etanólico da casca de pequi (EECP) apresenta ação benéfica na isquemia encefálica global transitória induzida, em ratas submetidas a dieta hipercalórica.

Referências

1. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs). Global status report on noncommunicable diseases 2014; Berna: World Health Organization; 2014. 298p.
2. Ruiz-Ares G, Martínez-Sanchés P, Fuentes B. Enfermedades cerebrovasculares. *Medicine*. 2015; 11(71): 4221-4229.
3. Krafft PR, Bailey EL, Lekic T, Rolland WB, Altay O, Tang J, Wardlaw JM, Zhang JH, Sudlow CLM. Etiology of stroke and choice of models. *Int J Stroke*. 2012; 7: 398-406.
4. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, Das SR, Ferranti S, Després JP, Fullerton HJ, Howard VJ, Huffman MD, Isasi CR, Jiménez MC, Judd SE, Kissela BM, Lichtman JH, Lisabeth LD, Liu S, Mackey RH, Magid DJ, McGuire DK, Mohler III ER, Moy CS, Muntner P, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Nichol G, Palaniappan L, Pandey DK, Pandey DK, Reeves MJ, Rodriguez CJ, Rosamond W, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Woo D, Yeh RW, Turner MB. Heart disease and stroke statistics - 2016 update: A report from the American Heart Association. *Circ*. 2016; 133(4): 447-454.
5. Mangus DB, Huang L, Applegate PM, Gatling Jw, Zhang J, Applegate II RL. A sitematic review of neuroprotective strategies after cardiac arrest: from bench to bedside (Part I – Protection via specific pathways). *Medical Gas Research*. 2014; 4: 1-9.

6. Jivad N, Rabiei Z. Review on herbal medicine on brain ischemia and reperfusion. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2015; 5(10): 789-795.
7. Tewari A, Mahendru V, Sinha A, Bilotta F. Antioxidants: The new frontier for translational research in cerebroprotection. *JOACP.* 2014; 30(2): 160-171.
8. Fukuta T, Asai T, Sato A, Namba M, Yanagida Y, Kikuchi T, Koide H, Shimizu K, Oku N. Neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion injury by intravenous administration of liposomal fasudil. *Int J Pharm.* 2016; 506: 129-137.
9. Oruc S, Gönül Y, Tunay K, Oruc OA, Bozkurt MF, Karavelioglu E, Bagcioglu E, Goskun KS, Cleik S. The antioxidant and antiapoptotic effects of crocin pretreatment on global cerebral ischemia reperfusion injury induced by four vessels occlusion in rats. *Life Sciences.* 2016; 154, 79-86,
10. Surapaneni S, Prakash T, Ansari M, Manjunath PM, Kotresh D, Goli D. Study on cerebroprotective actions of *Clerodendron glandulosum* leaves extract against long term bilateral common carotid artery occlusion in rats. *Biomed Pharmacother.* 2016; 80:87-94.
11. Alcântara GFT, Simões-Neto E, Cruz GMP, Nobre MEP, Neves KRT, Andrade GM, Brito GAC, Viana GSB. Curcumin reverses neurochemical, histological and immunohistochemical alterations in the model of global brain ischemia. *J Tradit Complement Med.* 2015; 1-10.
12. Roesler R, Lorencini M, Pastore G. Brazilian cerrado antioxidant sources: cytotoxicity and phototoxicity in vitro. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2010; 30(3): 814-821.
13. Mendes FF. Efeito neuroprotetor do extrato etanólico da casca de pequi em lesões de isquemia e reperfusão cerebral de ratas submetidas a dieta hipercalórica. [Dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia; 2012.
14. Viana AMF. Efeito da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* cambess) nas alterações hepáticas induzidas pela dieta hiperlipídica em ratos. [Dissertação]. Ouro Preto: Universidade Federal de ouro preto, Escola de Nutrição; 2015.
15. Roesler R, Malta LG, Carrasco LC, Holanda RB, Sousa CAS, Pastore GM. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2007; 27(1):53-60.
16. Brasil. Farmacopeia Brasileira [Brazilian Pharmacopoeia], volume 2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 546p. Portuguese.
17. Mole S, Waterman PGA. Critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies I: Techniques for chemically defining tannins. *Oecologia.* 1987; 72: 137 – 147.
18. Estadella D, Oyama LM, Damaso AR, Ribeiro EB, Nascimento CMO. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition.* 2004; 20(2): 218-224.
19. Corvino SB. Exercício físico no diabete transgeracional de ratas: Efeito na performance reprodutiva e nos hormônios sexuais. [Dissertação]. Botucatu: Universidade estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu; 2012.
20. Wellons III JC, Sheng H, Laskowitz DT, Mackensen GB, Pearlstein RD, Warner DS. A comparison of strain-related susceptibility in two murine recovery models of global cerebral ischemia. *Brain Res.* 2000; 868: 14-21.
21. Ravagnani FCP, Ravagnani CFC, Braga Neto JA, Voltarelli FA, Zavala AAZ, Habitante CA, Inouye CM. Efeito de dietas hiperlipídica com extrato de baru e chocolate sobre a área de adipócitos de ratos submetidos a exercício físico. *Ver Bras Med Esporte.* 2012; 18(3): 190-194.
22. Luna LG. Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3.ed. New York: Mcgrawhill, 1968, 258p.

23. Shafri MAM, Jais AMM, Jaffri JMD, Kim MK, Ithnin H, Mohamed F. Cresyl violet staining to assess neuroprotective and neuroregenerative effects of haruan traditional extract against neurodegenerative damage of ketamine. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2012; 4(4): 163-168.
24. Moura LR, Martins AC, Vaz LAR, Orpinelli SRT, Silva TL, Faleiro MBR, Santos SC, Moura VMBD. Extrato hidroalcoólico da casa do pequi (*Caryocar brasiliense*) em ratos submetidos a aplicação de doxirrubicina. *Ciência Rural.* 2013; 43(1): 100-106.
25. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry.* 2006; 99:191-203.
26. Monteiro SS, Silva RR, Martins SC, Barin JS, Rosa CS. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts of pequi peel (*Caryocar brasiliense Camb*). *IFRJ.* 2015; 22(5): 1985-1992.
27. Ribeiro DM. Propriedades físicas, químicas e bioquímicas de pequi (*Caryocar brasiliense Camb*) de diferentes regiões do cerrado. [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília, Departamento de Nutrição; 2011.
28. Marques ACR, Gabiatti GC, Gravena AAF, Amaral V. Influência das dietas hipercalóricas sobre os parâmetros de obesidade, dislipidemia e hiperglicemia em ratos. *Revista Saúde e Pesquisa.* 2015; 8(1): 55-62.
29. Fiorino P, Américo ALV, Muller CR, Evangelista FS, Santos F, Leite APO, Farah V. Exposure to high-fat diet since post-weaning induces cardiometabolic damage in adult rats. *Life Sciences.* 2016; 160: 12-17.
30. Rosini TC, Silva ASR, Moraes C. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. *Rev Assoc Med Bras.* 2012; 58(3): 383-387.
31. Han SH, Nicholls SJ, Sakuma I, Zhao D, Koh KK. Hypertriglyceridemia and cardiovascular disease: Revisited. *Korean Circ J.* 2016; 46(2): 135-144.
32. Toth PP. Triglyceride-rich lipoproteins as a casual factor for cardiovascular disease. *Vasc Health Risk Manag.* 2016; 12: 171-183.
33. Aguilar EC, Queiroz MCMN, Oliveira DA, Oliveira NJF. Serum lipid profile and hepatic evaluation in mice fed diet containing pequi nut or pulp (*Caryocar brasiliense Camb.*). *Ciênc Tecnol Aliment.* 2011; 31(4): 879-883.
34. Morais ML, Siva ACR, Araújo CRR, Esteves EA, Dessimoni-Pinto NAV. Determinação do potencial antioxidante *in vitro* de frutos do cerrado brasileiro. *Ver Bras Frutic.* 2013; 35(2):355-360.
35. Roesler R, Catharino RR, Malta LG, Eberlin MN, Pastore G. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry.* 2008; 110: 711-717.
36. Martínez-Sánchez P, Fuentes B, Ruiz Ares G. Ictus isquémico, infarto cerebral y ataque isquémico transitorio. *Medicine.* 2015; 11(71): 4230-4241.
37. Barbosa KBF, Costa MNB, Alfenas RCG, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo, conceitos, implicações e fatores modulatórios. *Ver Nutr.* 2010; 23(4):629-643.
38. Heinonen I, Rinne P, Ruohonen S, Ahotupa M, Savontaus E. The effect of equal caloric high fat and western diet on metabolic syndrome, oxidative stress and vascular endothelial function in mice. *Acta Physiol.* 2014; 211: 515-527.
39. Ahmed AA, Fedail JS, Musa HH, Musa TH, Sifaldin AZ. Gum Arabic supplementation improved antioxidant status and alters expression of oxidative stress gene in ovary of mice fed high fat diet. *Middle East Fertil Soc J.* 2016; 21: 101-108.

40. Cheserek MJ, Wu G, Li L, Karangwa E, Shi Y, Le G. Cardioprotective effect of lipoic acid, quercetin and resveratrol on oxidative stress related to thyroid hormone alterations in long-term obesity. *J Nutr Biochem*. 2016; 33: 36-44.
41. Xuan A, Long D, Li J, Ji W, Hong L, Zhang M, Zhang W. Neuroprotective effects of valproic acid following transient global ischemia in rats. *Life Science*. 2012; 90: 463-468.
42. Llitjos JF, Mira JP, Duranteau J, Cariou A. Hyperoxia toxicity after cardiac arrest: What is the evidence? *Ann Intensive Care*. 2016; 6(23): 1-9.
43. Helewyn B, Chazalviel L, Nicole O, Lecocq M, Risso JJ, Abraini JH. Moderately delayed post-insult treatment with normobaric hyperoxia reduces excitotoxin-induced neuronal degeneration but increases ischemia-induced brain damage. *Medical Gas Research*. 2011; 1(2): 1-6.

CAPÍTULO 3 –VIABILIDADE NEURONAL APÓS REPERFUSÃO E MARCAÇÃO DE p-ERK1/2 E p-AMPK α EM RATAS ALIMENTADAS COM DIETA HIPERCALÓRICA E SUPLEMENTADAS COM EXTRATO DA CASCA DE PEQUI

Resumo

O pequi, fruto símbolo do cerrado brasileiro, demonstrou benefícios *in vitro* e *in vivo* sobre estresse oxidativo induzido. O objetivo com esse estudo foi avaliar o efeito do extrato etanólico da casca de pequi sobre a viabilidade celular do córtex cerebral e hipocampo e sobre a expressão de p-ERK1/2 e P-AMPK α no córtex cerebral após indução de isquemia e reperfusão cerebral global induzida em ratas alimentadas com dieta hipercalórica. Foram utilizadas 40 ratas alocadas em quatro grupos: dieta comercial, dieta comercial com tratamento com extrato, dieta hipercalórica e dieta hipercalórica com tratamento com extrato. Foi realizada avaliação quantitativa dos neurônios viáveis e inviáveis no córtex cerebral e hipocampo e das células marcadas pelos anticorpos anti p-ERK1/2 e p-AMPK α no córtex cerebral. O extrato etanólico da casca de pequi não apresentou influência sobre a viabilidade neuronal no córtex cerebral e hipocampo, porém apresentou efeito modulatório sobre a expressão de p-ERK1/2 e p-AMPK α , com redução no córtex cerebral.

Palavras-chave: Antioxidante, *Caryocar brasiliense*, neuroproteção, obesidade.

POST-REPERFUSION NEURON VIABILITY AND p-ERK1/2 AND p-AMPK α MARKING IN RATS FEED WITH HIGH CALORIC DIET AND PEQUI MESOCARP ETHANOLIC EXTRACT

Abstract

Pequi fruit, a symbol of the Brazilian cerrado, has demonstrated *in vitro* and *in vivo* benefits on induced oxidative stress. The objective of this study was to evaluate the effect of the pequi mesocarp ethanolic extract on cell viability of the cerebral cortex and hippocampus and on p-ERK1/2 and P-AMPK α expression in the cerebral cortex after induction of global cerebral ischemia and reperfusion in rats fed with a hypercaloric diet. Fourty female rats were allocated in four groups: commercial diet, commercial diet with extract treatment, hypercaloric diet and hypercaloric diet with extract treatment. Quantitative evaluation of viable and non-viable cerebral cortex and hippocampus neurons and cells marked by the anti-p-ERK1/2 and p-AMPK α antibodies in the cerebral cortex were performed. The ethanolic extract of pequi mesocarp had no influence on neuronal viability in the cerebral cortex and hippocampus, but showed modulatory downregulation effect on p-ERK1/2 and p-AMPK α in the cerebral cortex.

Keywords: Antioxidant, *Caryocar brasiliense*, neuroprotection, obesity.

Introdução

É consenso que dietas hipercalóricas, dislipidemias e obesidade são problemas graves de saúde pública por resultarem em doenças cardio e cerebrovasculares. Essas enfermidades são a principal causa de mortes de pessoas no mundo e apresentam as mais elevadas taxas de morbidade¹. Além disso, uma dieta hipercalórica pode resultar em estresse oxidativo generalizado, o que deteriora de forma significativa o bom funcionamento orgânico, reduzindo as defesas antioxidantes endógenas e aumentando o potencial de danos nos casos de isquemia e reperfusão².

A isquemia cerebral global é ocasionada pela redução abrupta do fluxo sanguíneo para o encéfalo. Como este órgão apresenta uma das maiores demandas metabólicas do organismo, alterações que cursam com a redução da quantidade de oxigênio e nutrientes determinam o aparecimento de lesões graves como morte neuronal seletiva, principalmente nas regiões do córtex e hipocampo, acionamento do metabolismo anaeróbico, excitotoxicidade por liberação de glutamato no espaço extracelular e lesões na substância branca^{3,4,5}.

A reversão do quadro isquêmico por retorno abrupto da circulação para o encéfalo caracteriza a reperfusão. Embora o fenômeno seja fundamental para o tratamento e sobrevivência do paciente, inicia-se uma cascata de eventos bioquímicos e moleculares que resultam em ampla produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs respectivamente). Essas moléculas são instáveis e se utilizam da captação de elétrons de moléculas estáveis para se estabilizar⁶.

As espécies reativas são neutralizadas por antioxidantes, que são moléculas com alta capacidade redutora capazes de estabilizar EROs e ERNs. O desequilíbrio causado pelo excesso de espécies reativas e a baixa produção de antioxidantes para neutralização das mesmas é denominado estresse oxidativo. Este fenômeno resulta em lesões celulares e ativação de mecanismos moleculares de morte celular por necrose e apoptose, além de estimular processo inflamatório⁷.

O estresse oxidativo também aciona mecanismos de defesa moleculares, a fim de manter o funcionamento do encéfalo e estimular as defesas antioxidantes endógenas. Porém, esses mecanismos, quando acionados de forma exacerbada, podem determinar a piora do quadro, como ocorre no aumento da expressão de proteínas de pró-sobrevivência celular como a ERK1/2. Esta quinase é regulada por sinalização extracelular e participa na ativação

de genes antioxidantes e antiapoptóticos; todavia, a proteína também pode ativar cascatas de sinalização de morte celular por apoptose e inflamação⁸.

De forma similar, ocorre a ativação da proteína AMPK α , responsável pelo balanço energético da célula e importante em quadros de isquemia e reperfusão cerebral, para reequilibrar o metabolismo energético. No entanto, os benefícios de sua ativação, intensificada durante o estresse oxidativo, são contraditórios, pois existem evidências que pode ser deletéria e promover morte celular⁹. Essas lacunas estimulam a realização de estudos sobre o uso de antioxidantes exógenos, como os presentes em plantas e medicamentos com agentes neuroprotetores, redutores do estresse oxidativo, que melhoram o estado metabólico de pacientes com dislipidemia e obesidade^{10,11,12,13}.

O pequi (*Caryocar brasiliense*) é um fruto típico do cerrado brasileiro muito apreciado na culinária regional, além de ser uma fonte importante de renda e também utilizado como fitoterápico. A casca, o fruto e a semente demonstraram atividade antioxidante, pois esses são ricos em compostos fenólicos com grande potencial redutor, apresentando-se como uma interessante fonte de estudo com resultados promissores^{14,15,16}.

Estudos *in vitro* demonstraram que extratos de casca de pequi apresentam importantes quantidades de polifenóis, que neutralizam espécies reativas em meio aquoso¹⁷ e apresentam capacidade de redução e inibição da peroxidação lipídica¹⁵. Em pesquisas *in vivo* com o extrato de polpa, observou-se redução tanto da lipoperoxidação no fígado de ratos alimentados ou não com dieta hipercalórica quanto do quadro de esteatose hepática¹⁸. Com isso, o extrato a base de casca de pequi se mostra uma fonte interessante e importante de estudos na área da saúde, em especial na área de controle e tratamento de enfermidades que cursam com estresse oxidativo.

Com o presente estudo objetivou-se avaliar o efeito do extrato etanólico da casca de pequi (EECP) sobre a viabilidade neuronal no córtex e hipocampo cerebral e sobre a expressão das proteínas p-ERK1/2 e p-AMPK α no córtex cerebral diante do quadro de isquemia encefálica global transitória induzida em ratas submetidas a dieta hipercalórica.

Material e Métodos

O estudo foi realizado nas dependências da Universidade Federal de Goiás, na Escola de Veterinária e Zootecnia, em parceria com a Faculdade de Farmácia e do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – UFG (Protocolo n° 072/12, ANEXO A e B).

1. O extrato etanólico da casca de pequi (EECP)

O EECP foi produzido a partir de frutos adquiridos do comércio local proveniente da região sul da Bahia. Os frutos foram higienizados e a casca (epicarpo e mesocarpo externo) foi separada e picada manualmente, seca em estufa de ar forçado a 58°C por 72 horas e triturada em moinho analítico. Em seguida, foi realizada extração alcoólica, utilizando-se 1kg de casca pulverizada em 1 litro de etanol a 95%. O extrato resultante foi submetido a rotoevaporação a frio e armazenado a 4°C, técnica adaptada de Roesler *et al.*¹⁹.

Realizou-se a caracterização físico-química do extrato determinando o teor de sólidos, densidade e pH²⁰. Também foi feita a quantificação de compostos fenólicos totais, taninos totais pelo método de Folin Denis²¹ e dos flavonóides totais por método espectrofotométrico²².

2. Animais, dietas e delineamento experimental

Para o estudo *in vivo*, foram utilizadas 40 ratas da linhagem Wistar, adultas jovens, pesando em média 200 gramas, distribuídas em grupos e subgrupos como descrito no Quadro 1. Os animais foram submetidos a um período de adaptação de 10 dias antes do início dos protocolos experimentais e mantidos em ambiente com temperatura controlada de 24°C +/- 2°C, com água e ração a vontade e ciclos de claro e escuro de 12 horas por todo o período experimental.

QUADRO 1 – Distribuição dos grupos e subgrupos para o estudo, de acordo com o fornecimento do extrato de pequi (EECP), a dieta e o tempo de reperfusão.

Grupo	Subgrupo (n=10 cada)	Tempo de reperfusão (n=5 cada)
EECP (n=20)	NP (dieta normocalórica suplementada com EECP)	NP 2 horas
		NP 4 horas
	HP (dieta hipercalórica suplementada com EECP)	HP 2 horas
		HP 4 horas
Controle (n=20)	N (dieta normocalórica sem EECP)	N 2 horas
		N 4 horas
	H (dieta hipercalórica sem EECP)	H 2 horas
		H 4 horas

Após a adaptação, forneceu-se aos animais dos grupos N e NP ração comercial própria para roedores (Presence®, Presence Nutrição Animal, Paulínea, SP, Brasil), (Composição em ANEXO C) e para os grupos H e HP ração hipercalórica peletizada padronizada²³ composta por 37,5% de ração comercial, 25% de chocolate branco, 25% de

amendoim torrado e 12,5% de biscoito de maisena. As dietas foram fornecida na mesma quantidade, a vontade, por 60 dias.

O tratamento com o EECP foi fornecido por 30 dias diariamente, iniciado 30 dias após o início das dietas, na dose de 600 mg/kg de peso vivo por gavagem. As doses foram ajustadas semanalmente.

3. Procedimento cirúrgico e colheita de amostras

Encerrado o período de 60 dias, foi realizada a indução cirúrgica do quadro de isquemia encefálica transitória, por oclusão bilateral das artérias carótidas comuns, associada à hipotensão induzida por meio anestésico. Para medicação pré-anestésica, utilizou-se 10mg/kg de cloridrato de tramadol (Cloridrato de Tramadol®, União Química, São Paulo, SP, Brasil) e 3mg/kg de cloridrato de midazolam (Midazolam®, União Química, São Paulo, SP, Brasil) por via intraperitoneal e o anestésico inalatório isoflurano (Isoforine®, Cristália, Itapira, SP, Brasil) para indução e manutenção anestésica. Foi padronizado o tempo de 45 minutos de isquemia para todos os animais. Os tempos de reperfusão foram de duas ou quatro horas para os subgrupos (Quadro 1), técnica adaptada de Wellons *et al.*²⁴. Após os procedimentos, foi realizada a eutanásia dos animais por overdose anestésica com isoflurano (Isoforine®, Cristália, Itapira, SP, Brasil) em câmara fechada e os encéfalos foram colhidos, mantidos em formol tamponado a 10% por 48 horas, recortados e posteriormente imersos em álcool etílico a 70%, para preparação das lâminas para as avaliações histoquímicas e imunohistoquímicas.

4. Análise histopatológica

As lâminas histológicas foram preparadas e coradas pela técnica histoquímica de violeta cresil (coloração de Nissl)²⁶ e de hematoxilina e eosina²⁷. As regiões de córtex cerebral e hipocampo foram fotografadas no aumento de 200 x em microscópio de campo claro, acoplado a um sistema de captura de imagem, para a avaliação da viabilidade neuronal dessas regiões segundo, a técnica adaptada de Shafri *et al.*²⁶. O córtex cerebral foi dividido em três regiões rostral, média e caudal. As avaliações consistiram em contagem manual de células viáveis e inviáveis, como descrito na Figura 1, em seis fotomicrografias em uma área de tamanho igual para cada imagem, sendo duas fotomicrografias de cada região.

A contagem foi realizada de forma similar no hipocampo, considerando-se as divisões em quatro regiões: Zonas CA1, CA2 e CA3 e o giro denteado (Figura 2). Foram utilizadas duas fotos por zona, e estabeleceu-se uma área de tamanho igual por

fotomicrografia. Para análise da região do giro denteado, foram utilizadas três fotos e estabeleceu-se área igual para cada fotomicrografia. Para essa região utilizou-se a coloração de hematoxilina e eosina²⁷. A contagem dos neurônios viáveis e inviáveis foi realizada manualmente com o programa de análise de imagens Image J, versão 1.48v, utilizando-se o recurso *cell counter*.

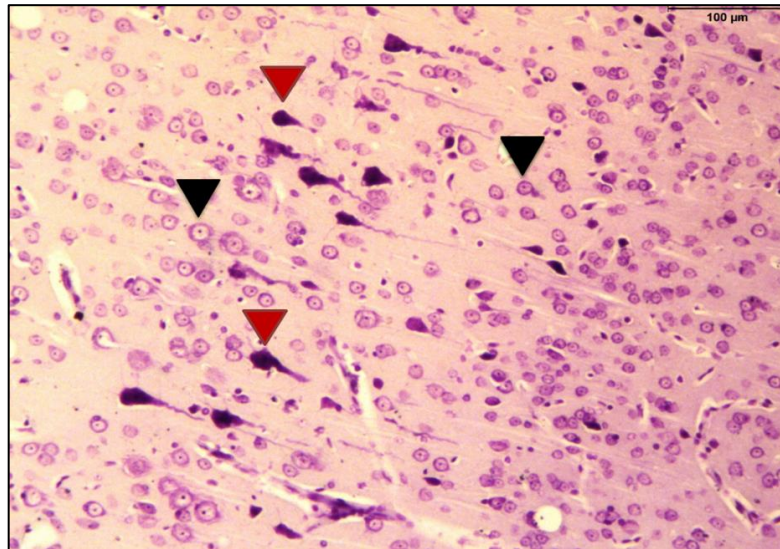


FIGURA 1 – Córtex cerebral de rata do grupo HP após 45 minutos de isquemia e duas horas de reperfusão cerebral induzida. Neurônios considerados inviáveis (cabeças de seta vermelhas) apresentando basofilia, retração, perda de arquitetura neuronal e ausência do corpúsculo de Nissil. Os neurônios considerados viáveis (cabeças de seta pretas) apresentaram-se redondos, de citoplasma claro, n, discretamente basofílico, com arquitetura celular preservada e presença do corpúsculo de Nissil. Coloração violeta cresil 200x.

HP – grupo que recebeu dieta hipercalórica e foi suplementado com extrato etanólico da casca de pequi.

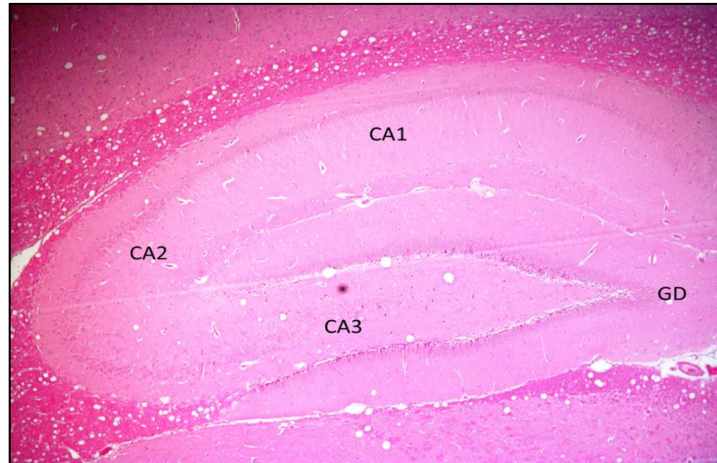


FIGURA 2 – Região do hipocampo do cérebro de rato do grupo N após 45 minutos de isquemia seguidos de duas horas de reperfusão. Demonstração das divisões das zonas CA1, CA2, CA3 e giro denteado (GD) do hipocampo. Hematoxilina e eosina, 50x.
N – grupo que recebeu dieta comercial e não foi suplementado com extrato etanólico da casca de pequi.

5. Imunoistoquímica

As lâminas de imunoistoquímica foram preparadas segundo a técnica adaptada de Araújo *et al.*²⁸. Essas foram desparafinadas, hidratadas, permeabilizadas com sódio dodecil sulfato (SDS) a 1% e realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena. Em seguida, passaram por recuperação antigênica em microondas com potência de 620 watts por oito minutos em solução de citrato de sódio com pH 6. Logo após, realizou-se o bloqueio de reações inespecíficas com leite desnatado e soro albumina bovina e colocou-se os anticorpos anti-phospho-ERK1/2 (*Phospho-p44/42 MAPK®*, *polyclonal antibody*, *Cell Signaling Technology*, Danvers, MA, EUA) na diluição de 1: 500 e anti-phospho-AMPK α (*phospho-AMPK α Thr172®*, *monoclonal antibody*, *Cell Signaling Technology*, Danvers, MA, EUA) na diluição de 1:200, *overnight*. Após esse período colocou-se o anticorpo secundário Kit LSAB $^{\text{®}}$ (*Universal LSAB $^{\text{TM}}$ + kit HRP, rabbit/mouse/goat®*, DAKO, Carpinteria, CA, EUA) e realizou-se a revelação da reação com o cromógeno diamenobenzidina-peroxidase (*Liquid DAB Substrate Chromogen System*, Dako, Carpinteria, CA, EUA).

Foi realizada a contagem manual das células marcadas pelos anticorpos no córtex cerebral, dividido e analisado de forma similar à descrita para a análise histoquímica, adaptado da técnica descrita por Xuan *et al.*²⁹.

6. Métodos estatísticos

Para a análise estatística dos dados foram utilizados o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e os testes ANOVA, Tukey e Scott Knott utilizando o programa estatístico R[®] 3.0.2.

Resultados

Os dados obtidos sobre as análises físico químicas, quantidade de fenóis totais, taninos e flavonóides presentes no EECF estão descritos no Quadro 2.

QUADRO 2 – Dados obtidos das análises físico químicas e quantificação dos fenóis totais, taninos e flavonoides em extrato etanólico da casca de pequi (*Caryocar brasiliense*).

Avaliação	Quantidade média	Porcentagens no extrato
Teor de sólidos	275,72 g/L	29,19% ± 0,003 do extrato
Densidade média	0,944 ± 0,003 g/mL	-
pH médio	de 5,7 ± 0,456	-
Fenóis Totais	88g ATE. Kg ⁻¹	30,14% dos sólidos
Taninos	64,9g ATE. Kg ⁻¹	22,23% dos fenóis totais
Flavonóides	16,8g ER. Kg ⁻¹ .	5,75% dos fenóis totais

ATE – Tanino equivalente.

ER – Equivalente a rutina.

A quantidade de células viáveis no córtex cerebral após duas horas de reperfusão foi significativamente maior nos grupos H e HP em relação ao grupo N e NP ($p < 0,05$) e não se observou diferença entre os grupos quanto ao número de células inviáveis (Tabela 1). Após quatro horas de reperfusão, o grupo NP apresentou menor número de células viáveis em relação aos outros grupos ($p < 0,05$), porém não houve diferença estatística significativa quanto o número de células inviáveis nesse período.

TABELA 1 – Quantidade média de neurônios viáveis e inviáveis no córtex cerebral de ratas de acordo com a dieta (N=comercial ou H =hipercalórica), suplementação ou não com extrato etanólico da casca de pequi (P) e tempo de reperfusão (T).

Tratamento	Viáveis T= 2h	Viáveis T= 4h	Inviáveis T= 2h	Inviáveis T= 4h
N	46.6 ^A	48.8 ^A	42.8 ^A	38.4 ^A
NP	40.2 ^B	35.0 ^B	40.8 ^A	39.2 ^A
H	52.8 ^A	47.2 ^A	39.8 ^A	47.8 ^A
HP	56.8 ^A	48.4 ^A	32.2 ^A	40.6 ^A

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos pelo teste Scott Knott. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) dentro dos grupos entre T= 2h e T= 4h (ANOVA e Tukey).

Ao comparar-se a quantidade média de células viáveis e inviáveis no córtex cerebral entre os tempos de reperfusão para cada grupo, não se observou diferença estatística significativa entre essas variáveis ($p > 0,05$).

Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre o número de células viáveis e nem entre a quantidade de células inviáveis entre os grupos no período de duas horas de reperfusão nas zonas CA1 e CA3 do hipocampo (Tabela 2). Na zona CA2, foi possível observar um menor número de células inviáveis nos grupos NP e HP ($p < 0,05$).

TABELA 2 - Quantidade média de neurônios viáveis e inviáveis no hipocampo cerebral dos animais nas zonas CA1, CA2 e CA3 de ratas após 45 minutos de isquemia e duas horas de reperfusão de acordo com a dieta (N=comercial ou H =hipercalórica), suplementação ou não com extrato etanólico da casca de pequi (P).

Tratamento	Viáveis	Inviáveis	Viáveis	Inviáveis	Viáveis	Inviáveis
	CA1	CA1	CA2	CA2	CA3	CA3
N	142.6 ^A	34.2 ^A	158.0 ^A	37.4 ^A	83.4 ^A	37.8 ^A
NP	199.6 ^A	26.8 ^A	92.0 ^A	20.4 ^B	86.0 ^A	20.2 ^A
H	168.6 ^A	28.2 ^A	140.8 ^A	29.8 ^A	78.8 ^A	27.8 ^A
HP	161.8 ^A	18.2 ^A	136.0 ^A	17.0 ^B	89.4 ^A	25.0 ^A

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos pelo teste Scott Knott.

Após quatro horas de reperfusão, o grupo NP apresentou quantidade menor de células viáveis na zona CA1 comparada aos outros grupos ($p < 0,05$), e o grupo HP apresentou maior número de células viáveis em relação aos outros grupos na zona CA2 ($p < 0,05$). Não se observou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos quanto ao número de células viáveis na zona CA3 e nem entre os grupos quanto o número de células inviáveis nesse período em nenhuma das três zonas (Tabela 3).

TABELA 3 - Quantidade média de neurônios viáveis e inviáveis no hipocampo cerebral dos animais nas zonas CA1, CA2 e CA3 de ratas após quatro horas de reperfusão de acordo com a dieta (N = comercial ou H = hipercalórica), suplementação ou não com extrato etanólico da casca de pequi (P).

Tratamento	Viáveis	Inviáveis	Viáveis	Inviáveis	Viáveis	Inviáveis
	CA1	CA1	CA2	CA2	CA3	CA3
N	153.6 ^A	36.4 ^A	103.8 ^B	29.4 ^A	90.6 ^A	35.8 ^A
NP	103.0 ^B	29.6 ^A	75.0 ^B	39.2 ^A	74.0 ^A	37.2 ^A
H	155.0 ^A	27.6 ^A	94.8 ^B	25.2 ^A	74.0 ^A	21.0 ^A
HP	161.6 ^A	30.6 ^A	134.0 ^A	28.6 ^A	74.2 ^A	23.8 ^A

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos pelo teste Scott Knott.

Ao se comparar os tempos de reperfusão para cada grupo na zona CA1 pode-se observar que o grupo NP apresentava menos células viáveis às quatro horas de reperfusão do que às duas horas ($p = 0.0143$), além disso, também pode-se observar que o grupo HP apresentou mais células inviáveis às quatro horas de reperfusão do que às duas horas ($p = 0.0164$). Quanto a comparação entre os tempos de reperfusão na zona CA2 para cada grupo não houve diferença quanto ao número de células viáveis, porém o grupo HP apresentou aumento significativo na quantidade de células inviáveis às quatro horas ($p = 0.0166$). A comparação entre os tempos de reperfusão na zona CA3 demonstrou que o grupo HP apresentou maior número de células viáveis após duas horas de reperfusão quando comparado às quatro horas ($p = 0.0035$).

Na região do giro denteado do hipocampo (Tabela 4), após duas horas de reperfusão, não houve diferença entre os grupos quanto à quantidade de neurônios identificados viáveis e inviáveis. Todavia, às quatro horas, observou-se menor número de células viáveis no grupo NP quando comparado aos demais ($p < 0,05$), ainda que não houvesse diferença entre os grupos quanto ao número de células inviáveis. Quanto à comparação entre os tempos de reperfusão, o grupo NP apresentou um número significativamente maior ($p = 0,0004$) de células viáveis no giro denteado após duas horas de reperfusão em relação às quatro horas e não houve diferença significativa na quantidade de células inviáveis após duas e quatro horas de reperfusão nos grupos.

TABELA 4 - Quantidade média de neurônios viáveis e inviáveis no hipocampo cerebral dos animais na zona do giro denteado de ratas de acordo com a dieta (N=comercial ou H =hipercalórica), suplementação ou não com extrato etanólico da casca de pequi (P) e tempo de reperfusão (T).

Tratamento	Viáveis T= 2h	Viáveis T= 4h	Inviáveis T= 2h	Inviáveis T= 4h
N	285.4 ^A	261.6 ^A	54.6 ^A	67.4 ^A
NP	266.8 ^A	180.2 ^B	59.2 ^A	68.4 ^A
H	279.6 ^A	258.0 ^A	73.0 ^A	50.6 ^A
HP	276.8 ^A	281.8 ^A	38.6 ^A	64.8 ^A

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos pelo teste estatístico Scott Knott.

Ao se realizar a contagem das células marcadas pelo anticorpo anti-phospho-ERK1/2 (Tabela 5), verificou-se que os animais do grupo N e NP apresentaram mais células marcadas ($p < 0,05$) que os animais dos grupos H e HP após duas horas de reperfusão. Já após quatro horas, os grupos N e H apresentaram menos células marcadas ($p < 0,05$) que o grupo NP. O grupo HP apresentou a menor quantidade de células marcadas ($p < 0,05$) em relação a

todos os grupos. Comparando-se os tempos de reperfusão de duas e quatro horas dentro de cada grupo, notou-se notar redução significativa no número de células marcadas pela phospho-ERK1/2 no grupo HP ($p = 0,0083$) e aumento significativo no grupo NP ($p = 0,03$).

Após duas horas de reperfusão, os animais do grupo N foram os que apresentaram a menor quantidade ($p < 0,05$) de neurônios marcados pelo anticorpo anti-phospho-AMPK α (Tabela 5). Por sua vez, os animais do grupo HP foram os que apresentaram a maior quantidade ($p < 0,05$) de células marcadas quando comparados aos outros grupos. Contudo, após quatro horas de reperfusão, o grupo NP foi o que apresentou maior quantidade de células marcadas em relação aos outros. Houve aumento significativo no número de neurônios marcados por phospho-AMPK α em relação ao tempo de reperfusão nos grupos N ($p = 0.0428$) e NP ($p = 0.8868$). Contudo, o mesmo não ocorreu no grupo HP, no qual observou-se um decréscimo no número de células marcadas com o avançar do tempo ($p = 0,0083$).

TABELA 5 – Quantidade média de neurônios marcados pelos anticorpos p-ERK1/2 e p-AMPK α no córtex cerebral de ratas de acordo com a dieta (N=comercial ou H=hipercalórica), suplementação ou não com extrato etanólico da casca de pequi (P) e tempo de reperfusão (T).

Tratamento	p-ERK1/2	p-ERK1/2	p-AMPK α	p-AMPK α
	T= 2h	T= 4h	T= 2h	T= 4h
N	197.0 ^A	173.6 ^B	144.8 ^{C*}	194.4 ^{B*}
NP	187.8 ^{A*}	220.2 ^{A*}	183.6 ^{B*}	226.8 ^{A*}
H	154.8 ^B	184.2 ^B	197.2 ^B	198.6 ^B
HP	139.0 ^{B*}	127.4 ^{C*}	238.4 ^{A*}	199.4 ^{B*}

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos pelo teste Scott Knott.

*Diferença significativa observada entre os tempos de reperfusão dentro dos grupos pelos testes ANOVA e Tukey.

Discussão

As doses de compostos fenólicos totais encontradas no EECP nesse estudo não foram menores em relação às observadas em outras pesquisas^{19,30,31}. Todavia, sabe-se que as dosagens podem variar bastante de acordo com o local e o período de aquisição dos frutos, além do método de extração utilizado^{19,31}.

A análise do EECP revelou que a maior parte dos compostos fenólicos presentes eram constituídos de taninos (73,75% da quantidade total de fenois). Além dos taninos, também se detectaram flavonoides, em quantidade correspondente a 19% dos fenois totais.

Ainda que os taninos e flavonoides sejam metabólitos secundários de plantas que apresentem capacidade antioxidante, os últimos são mais estudados por essa característica^{32,33}. O EECP apresentou menores doses de taninos e maiores doses de flavonoides em relação ao observado em outro estudo *in vivo* que utilizou extrato hidroalcolóico³⁰.

Não foram observados efeitos benéficos do EECP sobre a viabilidade neuronal no córtex cerebral ou no hipocampo após a indução de isquemia e reperfusão encefálica transitória. Além disso, foi possível observar redução na viabilidade celular no hipocampo, principalmente nos grupos NP e HP, tratados com o EECP, com o avançar do tempo de reperfusão. Resultados similares foram observados em ratos submetidos à isquemia e reperfusão cerebral tratados com o extrato hidroalcolóico a base de casca de pequi; os animais apresentaram maiores índices de necrose nas células do hipocampo, sugerindo um possível efeito tóxico do extrato sobre essas células³⁴. Também foi observado efeito tóxico agudo em estudo realizado com a aplicação via intraperitoneal de solução a base de farelo de casca de pequi em camundongos³⁵.

Outra hipótese condizente com esses resultados é referente ao estado nutricional dos animais do grupo HP, a dieta hipercalórica associada ao fornecimento do EECP. Existem evidências de que dietas hipercalóricas causam estresse oxidativo generalizado nos animais, podendo incrementar os índices de peroxidação lipídica^{10,36}. Em estudo previamente realizado, observou-se que após 16 semanas de dieta hipercalórica oferecida a camundongos, houve aumento do estresse oxidativo cerebral e surgimento de lesões e morte celular principalmente no hipocampo sem a indução de isquemia e reperfusão cerebral, demonstrando a capacidade deletéria da dieta hipercalórica sobre o cérebro³⁷. Com isso, acredita-se que não somente o EECP possa ter promovido perdas neuronais no hipocampo no grupo HP, mas também a condição nutricional dos animais.

Foi observada redução significativa na expressão da phospho-ERK1/2 nos animais do grupo HP com o avançar do tempo de reperfusão, e esse apresentou menos células marcadas em relação aos outros grupos às quatro horas de reperfusão (Tabela 5). Houve também um aumento significativo na expressão no grupo NP com o avançar do tempo de reperfusão, e esse apresentava mais células marcadas do que os outros grupos às quatro horas. O estresse oxidativo é considerado fator estimulante ao aumento da expressão da ERK1/2 no cérebro, porém o efeito desse aumento de ativação ainda é amplamente discutido. Acredita-se que o estímulo causado por estresse oxidativo não determine a ativação de vias de pró sobrevivência e antioxidantes, e sim que estimule aumento de processo inflamatório e morte celular. É possível também que a ativação ERK1/2 apresente efeitos benéficos em casos

específicos de estímulo, como por fatores de crescimento³⁸. A redução da expressão da p-ERK1/2 observada no grupo HP demonstrou que o EECF apresentou capacidade modulatória, porém somente nos animais que receberam a dieta hipercalórica.

A redução da expressão da forma ativa da ERK 1/2 observada em dois dos quatro grupos de estudo (N e HP) pode ser considerada benéfica para o cérebro, levando em conta o tempo de reperfusão empregados no presente experimento. A expressão exacerbada da ERK1/2, em casos de estresse oxidativo, pode ser deletéria quando sua ativação é persistente e determina indução de inflamação, apoptose e aumento da área de lesão^{39,40}.

A questão relativa ao tempo de reperfusão é, de fato, crucial para a real compreensão do papel protetor da ERK1/2 no tecido. Em estudo realizado com o extrato de cebola (*Allium cepa*) foi relatada redução inicial da ativação da ERK1/2 após a indução de estresse oxidativo em neurônios corticais em cultivo; posteriormente, houve incremento na ativação e inibição de proteínas de estresse como a MAPK p38, amplamente ativada inicialmente durante o processo de isquemia e reperfusão⁴¹. Esse decréscimo na ativação foi observado no grupo HP do presente experimento; é plausível, portanto, que o período de quatro horas não tenha sido suficiente para observar se haveria ativação secundária da ERK1/2 como relatado *in vitro*. Ainda, pode-se considerar que o comportamento *in vivo* da ativação da ERK1/2 pode ser diferente, influenciado por outros fatores presentes no tecido.

Reduções da ativação da ERK1/2, tais como descritas na presente pesquisa, foram observadas em investigações similares. Em estudos *in vivo* nos quais se utilizou extrato rico em flavonoides derivado da planta *Rosa leviagata* e fitoceramidas derivadas da soja, observou-se redução na ativação da ERK1/2 que foi considerada benéfica por coincidir com outros achados como a redução da ativação de metaloproteinase-9 e enzimas pró-inflamatórias como a COX-2 e a iNOs, estas associadas ao aumento de processo inflamatório e surgimento de danos oxidativos teciduais^{42,43}.

Apesar do grupo HP apresentar grande quantidade de células marcadas pela phospho-AMPK α às duas horas de reperfusão, também foi observado que houve redução

na quantidade de células marcadas nesse grupo com o avançar do tempo de reperfusão. Ao contrário, nos outros grupos se observou aumento no número de células marcadas às quatro horas de reperfusão. A AMPK α é uma proteína amplamente ativada durante os quadros de estresse oxidativo cerebral, de forma similar à ERK1/2, e o benefício de sua ativação durante o processo de isquemia e reperfusão cerebral ainda é contraditório, acreditando-se que sua expressão dependendo do momento, da quantidade e do tempo de duração pode desencadear piora nas lesões se essa for de forma exacerbada⁴⁴.

É possível que o efeito modulatório do EECp observado sobre a ativação da AMPK α , reduzindo a ativação à medida que o tempo de reperfusão avançou, tenha sido benéfico para o tecido. Porém, essa condição foi observada apenas no grupo HP, demonstrando que o EECp modulou a enzima principalmente em animais que se alimentam com dieta hipercalórica. Estudos *in vivo* utilizando dorsomorphin (componente químico conhecido como inibidor de proteína morfogenética óssea), berberina (componente derivado da planta *Coptis chinensis*, utilizado como chá) e shengmai (componente derivado de plantas utilizado na medicina chinesa) apontam que a redução ou inibição da ativação da AMPK α promove redução de sinais neurológicos, edema cerebral, processos de autofagia e morte celular por apoptose^{45,46,47}.

Estudos do efeito de antioxidantes sobre estresse oxidativo generalizado induzido por dietas hipercalóricas, semelhante ao que foi realizado neste trabalho, demonstram benefícios importantes. Um dos efeitos é o incremento nas defesas antioxidantes endógenas, como o aumento nos níveis enzimáticos de catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase e agentes protetores a nível molecular. Com isso, observou-se a potencialização do efeito de varredura dos antioxidantes exógenos, observado por redução da lipoperoxidação e oxidação de proteínas^{10,48,49}.

Em outro estudo foi observado que dietas hipercalóricas reduzem a atividade de agentes neuroprotetores endógenos, como o fator de transcrição Nrf2 no cérebro³⁷, importante para a promoção de defesas antioxidantes no organismo. A utilização de agentes antioxidantes exógenos derivados de plantas (composto Agavin), como no caso da presente pesquisa, foi capaz de reduzir lesões oxidativas no cérebro de camundongos aumentando os níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), agentes neurotróficos que estimulam neuroproteção, neuroregeneração, neuroplasticidade, e pró sobrevivência celular, além de reduzir lipoperoxidação⁴⁹.

O EECp atuou na redução da expressão da p-ERK1/2 às duas e quatro horas de reperfusão e da p-AMPK α . Inicialmente, havia grande quantidade de células marcadas; porém, houve a redução significativa da marcação com o avançar do tempo de reperfusão, verificada apenas no grupo HP. É possível que o EECp tenha estimulado o organismo a aumentar suas defesas antioxidantes endógenas, além de seu efeito antioxidante de varredura. O EECp pode não ter atuado no aumento da viabilidade celular por questões de dose-resposta. Em estudo *in vitro*, o extrato etanólico da casca de pequi foi capaz de inibir a peroxidação lipídica e reduzir a quantidade de radicais livres em meio aquoso^{19,15}, porém o extrato

utilizado naquela investigação apresentava maiores concentrações de fenóis totais (209,37 g GAE Kg⁻¹) quando comparados aos desta pesquisa (88 g ATE Kg⁻¹).

Vários fatores podem influenciar no efeito de extratos, como o tipo de fenol, a disponibilidade química para redução, a absorção desse no sistema gastrointestinal, a quantidade de extrato fornecida e o tempo de fornecimento. Tais fatores também podem determinar o efeito antioxidante e o efeito modulatório sobre a p-ERK1/2 e a p-AMPK α . Em trabalho realizado em ratos submetidos à aplicação de doxirrubicina para induzir estresse oxidativo cardíaco, não se observou efeito benéfico de um extrato hidroalcolico da casca de pequi³⁰. No entanto, a dose utilizada foi menor, de 300mg/Kg, e por um período menor, por 10 dias, em relação a esta pesquisa, na qual utilizaram-se 600mg/kg por 30 dias. Além disso, na pesquisa citada anteriormente o extrato apresentava quantidades menores de flavonóides, demonstrando que a ação do extrato pode variar muito.

Existem poucas pesquisas *in vitro* e principalmente *in vivo* que trabalham com pequi determinando variáveis físico-químicas dos extratos obtidos. Nesse contexto, este trabalho é pioneiro no estudo *in vivo* do extrato empregado mediante um quadro de isquemia e reperfusão cerebral induzida, associada à dieta hipercalórica. O EECP demonstrou resultados interessantes sobre a modulação de proteínas de pró sobrevivência celular e de metabolismo celular, ERK1/2 e AMPK α , sendo uma fonte potencial de estudo para várias outras pesquisas similares e também com outros tipos de enfermidades.

Conclusão

O extrato etanólico da casca de pequi (*Caryocar brasiliense*) não apresenta efeito benéfico sobre a viabilidade neuronal no córtex cerebral e pode estar relacionado a redução da viabilidade celular no hipocampo. Além disso, apresenta efeito modulatório reduzindo a ativação de ERK1/2 e da AMPK α com o avançar do tempo de reperfusão no córtex cerebral de ratas alimentadas com dieta hipercalórica e submetidas a indução de isquemia encefálica transitória.

Referências

1. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, Das SR, Ferranti S, Després JP, Fullerton HJ, Howard VJ, Huffman MD, Isasi CR, Jiménez MC, Judd SE, Kissela BM, Lichtman JH, Lisabeth LD, Liu S, Mackey RH, Magid DJ, McGuire DK, Mohler III ER, Moy CS, Muntner P, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Nichol G, Palaniappan L, Pandey

- DK, Pandey DK, Reeves MJ, Rodriguez CJ, Rosamond W, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Woo D, Yeh RW, Turner MB. Heart disease and stroke statistics - 2016 update: A report from the American Heart Association. *Circ*. 2016; 133(4): 447-454.
2. Bezerra APM, Oliveira DM. Metabolic Syndrome: molecular basis and reasons for interaction with obesity. *Demetra*. 2013; 8(1): 63-76.
 3. Sabri M, Lass E, Macdonald RL. Early brain injury: A common mechanism in subarachnoid hemorrhage and global cerebral ischemia. *Stroke Res Treat*. 2013; 2013:1-9.
 4. Plesnila N. Pathophysiological role of global cerebral ischemia following subarachnoid hemorrhage: the current experimental evidence. *Stroke Res Treat*. 2013; 2013:1-9.
 5. Ruiz-Ares G, Martínez-Sanchés P, Fuentes B. Enfermedades cerebrovasculares. *Medicine*. 2015; 11(71): 4221-4229.
 6. Barbosa KBF, Costa MNB, Alfenas RCG, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo, conceitos, implicações e fatores modulatórios. *Ver Nutr*. 2010; 23(4):629-643.
 7. Tewari A, Mahendru V, Sinha A, Bilotta F. Antioxidants: The new frontier for translational research in cerebroprotection. *JOACP*. 2014; 30(2): 160-171.
 8. Miguel MP, Menezes LB, Araújo EG. Fisiopatologia do estresse oxidativo após isquemia e reperfusão cerebral e potencial neuroproteção do pequi (*Caryocar brasiliense*). *Enciclopédia Biosfera*. 2012; 8(15): 1960-1976.
 9. Ronnett GV, Ramamurthy S, Kleman AM, Landree LE, Aja S. AMPK in the Brain: Its Roles in Energy Balance and Neuroprotection. *J Neurochem*. 2009; 109(1): 17-23.
 10. Ahmed AA, Fedail JS, Musa HH, Musa TH, Sifaldin AZ. Gum Arabic supplementation improved antioxidant status and alters expression of oxidative stress gene in ovary of mice fed high fat diet. *Middle East Fertil Soc J*. 2016; 21: 101-108.
 11. Annamalai S, Mohanam L, Alwin D, Prabhu V. Effect of combination therapy of melatonin and orlistat on high fat diet induced changes in lipid profile and liver function parameters in serum of rats. *Obesity Medicine*. 2016; 2: 41-45.
 12. Alcântara GFT, Simões-Neto E, Cruz GMP, Nobre MEP, Neves KRT, Andrade GM, Brito GAC, Viana GSB. Curcumin reverses neurochemical, histological and immunohistochemical alterations in the model of global brain ischemia. *J Tradit Complement Med*. 2015; 1-10.
 13. Botelho JRS, Santos AG, Araújo ME, Braga MEM, Gomes-Leal W, Carvalho Junior RN, Meireles MAA, Oliveira MS. Copaíba (*Copaifera* sp.) leaf extracts obtained by CO₂ supercritical fluid extraction: Isotherms of global yield, kinetics data, antioxidant activity and neuroprotective effects. *J Supercrit Fluids*. 2015; 98: 167-171.
 14. Machado MTC, Mello BCBS, Hubinger MD. Study of alcoholic and aqueous extraction of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) natural antioxidants and extracts concentration by nanofiltration. *J Food Eng*. 2013; 117: 450-457.
 15. Roesler R, Lorencini M, Pastore G. Brazilian cerrado antioxidant sources: cytotoxicity and phototoxicity in vitro. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2010; 30(3): 814-821.
 16. Mendes FF. Efeito neuroprotetor do extrato etanólico da casca de pequi em lesões de isquemia e reperfusão cerebral de ratas submetidas a dieta hipercalórica. [Dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia; 2012.
 17. Monteiro SS, Silva RR, Martins SC, Barin JS, Rosa CS. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts of pequi peel (*Caryocar brasiliense* Camb). *IFRJ*. 2015; 22(5): 1985-1992.
 18. Viana AMF. Efeito da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* cambess) nas alterações hepáticas induzidas pela dieta hiperlipídica em ratos. [Dissertação]. Ouro Preto: Universidade Federal de ouro preto, Escola de Nutrição; 2015.

19. Roesler R, Malta LG, Carrasco LC, Holanda RB, Sousa CAS, Pastore GM. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2007; 27(1):53-60.
20. Brasil. Farmacopeia Brasileira [Brazilian Pharmacopoeia], volume 2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 546p. Portuguese.
21. Mole S, Waterman PG. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies II. Techniques for biochemically defining tannins. *Oecologia*. 1987;72(1):148-156.
22. Rolin A, Maciel CPM, Kaneko TM, Consiglieri VO, Salgado-Santos IMN, Velasco MVR. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichilia catigua* Adr. Juss. (Meliaceae) and *Ptycopetalum olcooides* Benthham (Olacaceae) commercial extract. *J AOAC Int*. 2005; 8(4): 1015-1019.
23. Estadella D, Oyama LM, Damaso AR, Ribeiro EB, Nascimento CMO. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition*. 2004; 20(2): 218-224.
24. Wellons III JC, Sheng H, Laskowitz DT, Mackensen GB, Pearlstein RD, Warner DS. A comparison of strain-related susceptibility in two murine recovery models of global cerebral ischemia. *Brain Res*. 2000; 868: 14-21.
25. Ravagnani FCP, Ravagnani CFC, Braga Neto JA, Voltarelli FA, Zavala AAZ, Habitante CA, Inouye CM. Efeito de dietas hiperlipídica com extrato de baru e chocolate sobre a área de adipócitos de ratos submetidos a exercício físico. *Ver Bras Med Esporte*. 2012; 18(3): 190-194.
26. Shafri MAM, Jais AMM, Jaffri JMD, Kim MK, Ithnin H, Mohamed F. Cresyl violet staining to assess neuroprotective and neuroregenerative effects of haruan traditional extract against neurodegenerative damage of ketamine. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2012; 4(4): 163-168.
27. Luna LG. Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3.ed. New York: Mcgrawhill, 1968, 258p.
28. Araújo EG, Bianchi C, Sellk FW. Oscillation on activities of MEK/ERK1/2 during cardiopulmonary bypass in pigs. *Surgery*. 2001; 130(2): 182-191.
29. Xuan A, Long D, Li J, Ji W, Hong L, Zhang M, Zhang W. Neuroprotective effects of valproic acid following transient global ischemia in rats. *Life Science*. 2012; 90: 463-468.
30. Moura LR, Martins AC, Vaz LAR, Orpinelli SRT, Silva TL, Faleiro MBR, Santos SC, Moura VMBD. Extrato hidroalcoólico da casa do pequi (*Caryocar brasiliense*) em ratos submetidos a aplicação de doxirrubicina. *Cienc Rural*. 2013; 43(1): 100-106.
31. Ribeiro DM. Propriedades físicas, químicas e bioquímicas de pequi (*Caryocar brasiliense Camb*) de diferentes regiões do cerrado. [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília, Departamento de Nutrição; 2011.
32. Monteiro JM, Albuquerque UP, Araújo EL, Amorim ELC. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Quim Nova*. 2005; 28(5): 892-896.
33. Machado H, Nagem TJ, Peters VM, Fonseca CS, Oliveira TT. Flavonóides e seu potencial terapêutico. *Bol Cent Biol Reprod*. 2008; 27(1/2): 33-39.
34. Miguel MP. Ação neuroprotetora do extrato etanólico da casca de pequi em cérebros de ratos submetidos a isquemia e reperfusão cerebral. [Tese]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia; 2011.
35. Almeida AC, Sobrinho EM, Pinho L, Souza PNS, Martins ER, Duarte ER, Santos HO, Brandi IV, Cangussu AS, Costa JPR. Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. *Cienc Rural*. 2010;40(1): 1-4.

36. Heinonen I, Rinne P, Ruohonen S, Ahotupa M, Savontaus E. The effect of equal caloric high fat and western diet on metabolic syndrome, oxidative stress and vascular endothelial function in mice. *Acta Physiol.* 2014; 211: 515-527.
37. Morrison CD, Pistell PJ, Ingram DK, Johnson WD, Liu Y, Fernandez-Kim SO, White CL, Purpera MN, Uranga RM, Bruce-Keller AJ, Keller JN. High fat diet increases hippocampal oxidative stress and cognitive impairment in aged mice: implications for decreased Nrf2 signaling. *J Neurochem.* 2010; 114:1581-1589.
38. Sawe N, Steinberg G, Zhao H. Dual roles of MAPK/ERK1/2 signaling pathway after stroke. *J Neurosci Res.* 2008; 86: 1659-1669.
39. Maddahi A, Edvinsson L. Cerebral ischemia induces microvascular pro-inflammatory cytokine expression via the MEK/ERK pathway. *J Neuroinflammation.* 2010; 7(14): 2-13.
40. Ho Y, Samarasinghe R, Knoch ME, Lewis M, Aizenman E, Defranco DB. Selective inhibition of mitogen-activated protein kinase phosphatases by zinc accounts for extracellular signal regulated kinase 1/2 dependent oxidative neuronal cell death. *Mol Pharmacol.* 2008; 74(4): 1141-1151.
41. Lee BK, Jung YS. Allium cepa Extract and Quercetin Protect Neuronal Cells from Oxidative Stress via PKC- ϵ Inactivation/ERK1/2 Activation. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: 1-9.
42. Zhang S, Qi Y, Xu Y, Han X, Peng J, Liu K, Sun CK. Protective effect of flavonoid-rich extract from *Rosa laevigata* Michx on cerebral ischemia-reperfusion injury through suppression of apoptosis and inflammation. *Neurochem Int.* 2013;63(5):522-532.
43. Lee HK, Jang JY, Yoo HS, Seong YH. Neuroprotective effect of phytoceramide against transient focal ischemia-induced brain damage in rats. *Arch Pharm Res.* 2015;38(12):2241-50.
44. Khan M, Singh I. Inhibition of the AMPK/nNOS pathway for neuroprotection in stroke. *Neural Regen Res.* 2016; 11(3): 398-399.
45. Fu L, Huang L, Cao C, Yin Q, Liu J. Inhibition of AMP-activated protein kinase alleviates focal cerebral ischemia injury in mice: Interference with mTOR and autophagy. *Brain Res.* 2016 Nov 1;1650:103-111.
46. Chen W, Wei S, Yu Y, Xue H, Yao F, Zhang M, Xiao J, Hatch GM, Chen L. Pretreatment of rats with increased bioavailable berberine attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury via down regulation of adenosine-5'-monophosphate kinase activity. *Eur J Pharmacol.* 2016;779:80-90.
47. Yang H, Li L, Zhou K, Wang Y, Guan T, Chai C, Kou J, Yu B, Yan Y. Shengmai injection attenuates the cerebral ischemia/reperfusion induced autophagy via modulation of the AMPK, mTOR and JNK pathways. *Pharm Biol.* 2016;54(10):2288-97.
48. Gujjala S, Putakala M, Gangarapu V, Nukala S, Bellamkonda R, Ramaswamy R, Desireddy S. Protective effect of *Caralluma fimbriata* against high-fat diet induced testicular oxidative stress in rats. *Biomed Pharmacother.* 2016;83:167-176.
49. Franco-Robles E, López MG. Agavins Increase Neurotrophic Factors and Decrease Oxidative Stress in the Brains of High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Molecules.* 2016;21(8): 1-15.

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho pode ser considerado desbravador por avaliar o efeito *in vivo* do extrato etanólico da casca de pequi em um quadro induzido de isquemia e reperfusão encefálica em animais submetidos à dieta hipercalórica. É importante ressaltar que pouco se sabe sobre as respostas orgânicas aos extratos de pequi, pois as pesquisas *in vivo* são poucas, assim como pouco se discute sobre toxicidade e dosagens mínimas para obtenção de resultados.

Os resultados mostraram-se interessantes e promissores, pois na dose de 600mg/kg observou-se redução significativa de lesões clássicas de isquemia e reperfusão cerebral induzida, como vacuolização de neurópilo e no plexo coróide hipocampal e apresentou efeito modulatório sobre a p-ERK1/2 diminuindo sua expressão às duas e quatro horas de reperfusão e sobre a p-AMPK α com o avanço do tempo de reperfusão. Porém, os animais que apresentaram esses resultados foram os alimentados com dieta hipercalórica associada ao tratamento com o extrato.

Acredita-se que o extrato tenha implementado defesas antioxidantes dos animais tratados, alimentados com dieta hipercalórica, mesmo que não tenha influenciado positivamente nas concentrações de triglicerídeos e na deposição de gordura abdominal. Existem pesquisas que demonstram potencialização do efeito de antioxidantes exógenos em pacientes com obesidade pois estimula a produção generalizada de antioxidantes endógenos aumentando as defesas dos pacientes.

Atualmente observa-se muita falta de informação quanto a caracterização dos extratos provenientes do pequi utilizados em pesquisas, principalmente *in vivo*. Além da falta de padronização de métodos de extração e de avaliações físico-químicas, que dificultam a comparações entre os produtos finais e seus resultados e estabelecimento de doses e respostas.

Muitas variantes influenciam diretamente na composição do produto final como local, época do ano da colheita, período e tipo de armazenagem, se o fruto era maduro ou não, tipo de solo e alterações climáticas durante o ano. Com isso padronizar métodos de extração e estabelecer dosagens é fundamental para se utilizar extratos como tratamentos, pois os outros fatores são complexos demais para se estabelecer padrões.

Os trabalhos com extratos de plantas são bastante chamativos por apresentar abordagens mais conservacionistas, sustentáveis e estímulo ao desenvolvimento técnico e científico de polos de pesquisa sobre o assunto em regiões estruturalmente mais pobres.

O grupo de pesquisa que desenvolveu o extrato etanólico da casca de pequi, chefiado pelo professor Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo, desenvolve pesquisas com extratos de plantas do cerrado brasileiro em várias áreas de pesquisa médica, como oncologia, isquemia e reperfusão, cultivo celular, biologia molecular e vem se desenvolvendo a cada ano com publicações de trabalhos científicos em eventos e periódicos.

A cada nova pesquisa se busca aperfeiçoar e especificar cada vez mais mecanismos de ação, protocolos de produção, análises, entre outros elementos que tornam o estudo mais consolidado no meio científico. Atualmente começa-se a buscar isolamento de princípios ativos e seus mecanismos de ação *in vitro* e *in vivo* de forma muito mais detalhada e com isso se atrai financiamento de agências de fomento, como nesse projeto que teve apoio financeiro da FAPEG (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás), após concorrer em edital aberto para todo o estado, e outros apoiados por agências de fomento nacionais como CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). Com isso, houve desenvolvimento técnico com a formação de mestres e doutores e estrutural com a aquisição de equipamentos, tornando o laboratório um ponto de referência.

Mais estudos *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados para melhor elucidar as respostas orgânicas ao extrato etanólico da casca de pequi, toxicidade, e mecanismos de ação. Porém, sempre deve ser realizada as análises físico químicas prévias para poder se elucidar reações e criar padrões para extração e fornecimento. Com isso, se vislumbra desenvolver protocolos de tratamentos para a utilização do extrato contra lesões de isquemia e reperfusão e quadros que levam ao estresse oxidativo.

ANEXO A



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 08 de dezembro de 2014.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PEDIDO DE EMENDA DO PROTOCOLO N°. 072/12

I. IDENTIFICAÇÃO:

1. **Título do projeto:** Efeito do extrato etanólico da casca de pequi sobre a expressão das MAPKs no estresse oxidativo cerebral
2. **Pesquisador Responsável:** Fernanda Figueiredo Mendes – Doutoranda EVZ/UFV
3. **Unidade/Órgão do pesquisador:** EVZ/UFV
4. **Pesquisadores Participantes:**
 1. Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo – EVZ/UFV
 2. Prof. Dra. Yandra Cássia Lobato do Prado - EVZ/UFV
 3. Prof. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti - EVZ/UFV
 4. Msc. Danilo Ferreira Rodrigues - Doutorando EVZ/UFV
 5. Msc. Tais Andrade Dias - Doutoranda EVZ/UFV
5. **Unidade onde será realizado:** EVZ
6. **Data de apresentação do protocolo a CEUA:** 12/11/12
7. **Data da apresentação do Pedido de Emenda:** 01/12/14

II - Parecer da CEUA:

Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* 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. Reiteramos a importância deste Parecer Substantiado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar a CEUA-PRPI-UFV o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei n°. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa n°. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em julho de 2015.

III - Data da reunião: 08/12/14.

Dra. Marina Pacheco Miguel
Vice-coordenadora da CEUA/PRPI/UFV

ANEXO B

Composição química da dieta comercial.

Umidade (máx)	130,00 g/kg
Proteína bruta (mín)	230,00 g/kg
Extrato etéreo (mín)	40,00 g/kg
Fibra bruta (máx)	50,00 g/kg
Matéria mineral (máx)	100,00 g/kg
Cálcio (mín)	12,00 g/kg
Cálcio (máx)	13,00 g/kg
Fósforo (mín)	8.500,00 mg/kg
Sódio (mín)	2.700,00 mg/kg
Magnésio (mín)	500,00 mg/kg
Ferro (mín)	180,00 mg/kg
Cobre (mín)	30,00 mg/kg
Manganês (mín)	110,00 mg/kg
Zinco (mín)	110,00 mg/kg
Iodo (mín)	1,00 mg/kg
Cobalto (mín)	2,00 mg/kg
Selênio (mín)	0,20 mg/kg
Vitamina A (mín)	25.500,00 UI/kg
Vitamina D3 (mín)	4.000,00 UI/kg
Vitamina E (mín)	82,00 UI/kg
Vitamina K3 (mín)	6,40 mg/kg
Vitamina B1 (mín)	11,00 mg/kg
Vitamina B2 (mín)	12,00 mg/kg
Niacina (mín)	219,00 mg/kg
Ácido pantotênico (mín)	90,00 mg/kg
Vitamina B6 (mín)	11,00 mg/kg
Ácido fólico (mín)	13,00 mg/kg
Biotina (mín)	0,10 mg/kg
Vitamina B12 (mín)	40,00 mcg/kg
Olina (mín)	1.800,00 mg/kg
Lisina (mín)	12,50 g/kg
Metionina (mín)	3.500,00 mg/kg

Composição básica

Farelo de soja*, milho integral moído, dextrina, casca de arroz, farelo de trigo, farelo de arroz, óleo de soja refinado*, farinha de carne e ossos, farinha de peixe, calcário calcítico, cloreto de sódio (sal comum), óxido de magnésio, sulfato de ferro, sulfato de cobre, monóxido de manganês, óxido de zinco, iodato de cálcio, sulfato de cobalto, selenito de sódio, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, niacina, ácido pantotênico, vitamina B6, ácido fólico, biotina, vitamina B12, cloreto de colina, lisina, metionina, ácido propiônico. Espécies doadoras do gene: **Agrobacterium tumefaciens* e/ou *Arabidopsis thaliana* e/ou *Bacillus thuringiensis* e/ou *Streptomyces viridochromogenes* e/ou *Zea mays*.