



FISIOPATOLOGIA DO ESTRESSE OXIDATIVO APÓS ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL E POTENCIAL NEUROPROTEÇÃO DO PEQUI (*CARYOCAR BRASILIENSE*)

Marina Pacheco Miguel¹, Liliana Borges de Menezes², Eugênio Gonçalves de Araújo³

1. Professora Doutora de Patologia Geral do Curso de Biomedicina, Campus Jataí, Universidade Federal de Goiás (UFG). Coordenação do Curso de Biomedicina, Unidade Jatobá, Campus Jataí, Universidade Federal de Goiás, BR 364, Km 192, Parque Industrial, CEP: 75801-458, Jataí, GO, Brasil. (mapa_mi@hotmail.com)
2. Professora Doutora de Patologia Geral, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, UFG
3. Professor Doutor de Patologia Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia, UFG

Recebido em: 06/10/2012 – Aprovado em: 15/11/2012 – Publicado em: 30/11/2012

RESUMO

As doenças vasculares cerebrais isquêmicas ocorrem em 85 a 90% dos casos e representam uma importante causa de mortalidade no país, sendo ainda responsáveis por consideráveis índices de morbidade. Então, a investigação da fisiopatologia dos mecanismos envolvidos na lesão neuronal e endotelial isquêmica é essencial para projetar novos métodos terapêuticos para a prevenção e tratamento dessas doenças. Diversos mecanismos encontram-se envolvidos na fisiopatogênese da lesão secundária à isquemia e reperfusão, o principal é a formação de espécies reativas do oxigênio. Em condições fisiológicas, seus efeitos tóxicos podem ser prevenidos por algumas enzimas antioxidantes endógenas, e também por outros antioxidantes não-enzimáticos. No entanto, quando a produção se torna excessiva, o estresse oxidativo pode ter um efeito deletério na função e integridade estrutural de tecidos biológicos. Sendo assim, o uso de antioxidantes exógenos, principalmente naturais, tem sido cada vez mais indicado para a prevenção dessas lesões. Então, esta revisão visa elucidar os aspectos fisiopatológicos da isquemia e reperfusão cerebral e a potencial ação antioxidante do pequi do cerrado como futuro método terapêutico.

PALAVRAS-CHAVE: antioxidantes, compostos fenólicos, isquemia e reperfusão, sistema nervoso central

OXIDATIVE STRESS PHISIOPATHOLOGY AFTER CEREBRAL ISQUEMIA AND REFERFUSION AND POTENTIAL PEQUI (*CARYOCAR BRASILIENSE*) NEUROPROTECTION

ABSTRACT

The ischemic cerebrovascular disease occur in 85-90% of cases and represent an important cause of mortality in the country, and are also responsible for considerable morbidity. So the investigation of the pathophysiology of the mechanisms involved in ischemic neuronal and endothelial injury is essential for designing new therapeutic approaches for the prevention and treatment of these diseases. Several mechanisms

are involved in the pathophysiology of injury secondary to ischemia and reperfusion, the main one is the formation of reactive oxygen species. Under physiological conditions, their toxic effects can be prevented by some endogenous antioxidant enzymes, and also by other non-enzymatic antioxidants. However, when production becomes excessive, oxidative stress can have a deleterious effect on the structural integrity and function of biological tissues. Thus, the use of exogenous antioxidants, especially natural has increasingly been indicated for the prevention of lesions. So, this review aims to elucidate the pathophysiology of brain ischemia and reperfusion and the potential antioxidant activity of pequi cerrado as a future therapeutic method.

KEYWORDS: antioxidants, phenolics compounds, ischemia and reperfusion, central nervous system

INTRODUÇÃO

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

Os acidentes vasculares cerebrais foram causa de 172.298 internações em 2011 no país e, em 2010 causaram a morte de 99.159 indivíduos (GARCIA, 2012). A alta incidência de doenças cerebrais isquêmicas e hemorrágicas é devido a mudanças recentes no estilo de vida das pessoas, como o consumo de alimentos ricos em gorduras, o tabagismo e o estresse diário excessivo (OHTAKI *et al.*, 2005). Estes dados, por si, justificam a investigação da fisiopatologia dos mecanismos envolvidos na lesão cerebral isquêmica e de novos métodos terapêuticos para a prevenção e tratamento das doenças cerebrovasculares.

Após a reoxigenação, a produção de radicais de oxigênio implica em danos teciduais e inicia uma cascata de respostas celulares deletérias precedendo a inflamação, morte celular, e por último, falência do órgão (FONDEVILA *et al.*, 2003). Em condições fisiológicas, os efeitos tóxicos das EROs podem ser prevenidos por algumas enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalases, e também por outros antioxidantes não enzimáticos. No entanto, quando a produção se torna excessiva, o estresse oxidativo pode ter um efeito deletério na função e integridade estrutural de tecidos biológicos (SILVA Jr. *et al.*, 2002).

Uma quantidade considerável de estudos em humanos e animais mostram os efeitos benéficos da ação dos antioxidantes na função endotelial e neuroprotetora, o que é particularmente importante na prevenção e tratamento de doenças isquêmicas (HONG *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2004). Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e frequentemente encontrados são os compostos fenólicos, tais como os flavonóides. As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas à sua capacidade de inibir a lipoperoxidação, por atuarem contra a ação de radicais livres (BIANCHI & ANTUNES, 1999). Estudos recentes mostram que o pequi (*Caryocar brasiliense*) possui alta concentração de fenóis e que tanto o extrato aquoso quanto o etanólico da casca demonstram capacidade de neutralizar radicais livres de oxigênio (KHOURI *et al.*, 2007; ROESLER *et al.*, 2007). Este trabalho revisa os aspectos fisiopatogênicos da lesão de isquemia e reperusão cerebral e propõe o uso de partes do pequi como agente antioxidante e neuroprotetor.

FISIOPATOGENIA DA ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL

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

A interrupção do fluxo sanguíneo, dependendo do tempo, da intensidade, da velocidade de instalação, da natureza do órgão e da temperatura a que o tecido está submetido, poderá determinar os mais variados graus de lesão celular. No período agudo, em poucos minutos a horas, ocorre depleção de oxigênio (O₂), de reservas energéticas de adenosina trifosfato (ATP) e de glicose, o que induz a célula a iniciar respiração do tipo anaeróbia e, assim, à produção de lactato, desenvolvimento de acidose e ativação de proteases intracelulares (LIMA, 2008).

De acordo com COTRAN *et al.*, (2000), TARDINI & YOSHIDA (2003), OHTAKI *et al.* (2005), a falta de energia celular causa a falência da bomba de sódio-potássio (Na⁺/K⁺), o que resulta em despolarização da membrana plasmática de neurônios e de células da glia, rápida perda de potássio (K⁺) e influxo acentuado sódio (Na⁺), água (H₂O), cálcio (Ca²⁺) e cloreto (Cl⁻) intracelular, induzindo ao edema citotóxico (degeneração hidrópica). O cálcio citosólico aumenta para aproximadamente 3mM depois de 15 minutos de isquemia global (COTRAN *et al.*, 2000; MURPHY *et al.*, 2002).

Conforme COTRAN *et al.*, (2000) e WHITE *et al.*, (2000), o cálcio livre no citosol é mantido em concentrações baixíssimas em comparação aos níveis extracelulares (1/10.000). No interior da célula, a maior parte do cálcio está sequestrado nas mitocôndrias e retículo endoplasmático. Durante a isquemia, inicialmente, ocorre o aumento da concentração citosólica de cálcio devido ao influxo através da membrana plasmática e por sua liberação das mitocôndrias e retículo endoplasmático.

Nesse período, concomitante ao aumento citosólico de Ca²⁺, neurônios glutamérgicos liberam glutamato, um aminoácido excitatório extracelular iniciador do processo de excitotoxicidade. Posteriormente, ocorre ativação de receptores ionotrópicos extracelulares excitatórios como N-metil-D-aspartato (NMDA) e α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole (AMPA), além de liberação dos canais de Ca²⁺ voltagem-dependentes permitindo mais influxo de Ca²⁺ (OHTAKI *et al.*, 2005; GILGUN-SHERKI *et al.*, 2002; KUNZ *et al.*, 2010). A excitotoxicidade pode ser o iniciador dos eventos moleculares que desencadeiam a apoptose ou a inflamação nas áreas de penumbra cerebral, ou seja, local onde a necrose não ocorre rapidamente (GILGUN-SHERKI *et al.*, 2002; KUNZ *et al.*, 2010). Este transtorno amplifica-se com o aumento de sua intensidade e o envolvimento de outros neurônios próximos (HARUKUNI & BHARDWAJ, 2006).

A estimulação dos receptores NMDA pelo glutamato promove influxo acentuado de cálcio que se liga a calmodulina e ativa óxido nítrico sintetase de neurônios (nNOS), que converte L-arginina em óxido nítrico (ON) e L-citrulina. Nesta fase, o ON em excesso pode ser neurotóxico, devido à formação de peroxinitrito que causa grave lesão ao DNA. Essas alterações induzem a ação de enzimas como as poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), que possuem papel-chave na reparação do DNA. PARP-1 é um membro da família PARP responsável por mais de 90% da

atividade das proteínas PARPs em células normais. No sistema nervoso central, a excitotoxicidade ativa PARP-1 massivamente. A PARP-1, em resposta a agressões ao DNA, é muito ativada e usa nicotinamida-adeninad nucleotídeo (NAD⁺) como substrato para gerar PARP. Acredita-se que um dos principais indutores da morte celular seja a depleção de energia intracelular pelo consumo de NAD⁺ por PARP-1 (MERGENTHALER *et al.*, 2004; KANG *et al.*, 2010).

A elevação de Ca²⁺, ainda, ativa uma série de enzimas, com efeitos potencialmente deletérios, tais como lipases, fosfolipases, proteases, ATPases e endonucleases. A ativação dessas enzimas altera a função celular, desestabiliza a estrutura da membrana plasmática e do citoesqueleto, aumenta a lipólise pelo metabolismo de ácidos graxos livres, induz a produção de radicais superóxido durante a reperfusão e, por fim, levam a morte celular. Qualquer intervenção que atenuar o aumento de Ca²⁺ citosólico reduz a disfunção e morte celular (OHTAKI *et al.*, 2005; WHITE *et al.*, 2000; GILGUN-SHERKI *et al.*, 2002).

Durante a reperfusão, após poucas horas da estimulação dos receptores NMDA e influxo de Ca²⁺, ocorre a liberação de mediadores inflamatórios, como fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina 1 beta (IL-1 β) e óxido nítrico sintetase (NOS), os quais atraem e ativam células imunocompetentes, como microglia, astrócitos e leucócitos. As citocinas e NOS, direta ou indiretamente, levam a geração de EROs e à formação de grandes quantidades de radicais livres, como ON, ânion superóxido (O₂⁻) peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxinitrito (ONOO⁻) (OHTAKI *et al.*, 2005).

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

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

A unidade neurovascular, que compõe a barreira hemato-encefálica (BHE), é constituída de células endoteliais, astrócitos e neurônios juntamente com a matriz extracelular. A integridade da BHE é baseada na interação entre os podócitos de astrócitos e as células endoteliais. No processo de isquemia e reperfusão, esta unidade pode ser comprometida, interferindo nas funções de proteção e permeabilidade seletiva da BHE. Esse resultado tem origem na ruptura da matriz

extracelular após a degradação do colágeno tipo IV, laminina e fibronectina por ação de proteases (catepsinas, ativador de plasminogênio e metaloproteases). Assim, esse é um dos motivos da I/R permitir a migração de leucócitos, aumentar o risco de hemorragias, edema pós-isquêmico e a extensão da lesão tecidual (MERGENTHALER *et al.*, 2004; KUNZ *et al.*, 2010). Portanto, a lesão cerebral isquêmica é multidimensional e oferece uma ampla gama de alvos para a intervenção neuroprotetora (OHTAKI *et al.*, 2005).

ESTRESSE OXIDATIVO APÓS ISQUEMIA CEREBRAL

Os radicais livres cujos elétrons encontram-se no átomo de oxigênio e nitrogênio são denominados, respectivamente, de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (ABRAHÃO, 2007). Vale salientar que alguns agentes reativos patogênicos não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada, por esse motivo, o termo radical livre não é totalmente adequado (FERRARI *et al.*, 1993).

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

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

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

O primeiro ponto de ataque da hipóxia é a respiração celular aeróbia. À medida que a tensão do O_2 dentro da célula reduz, há perda da fosforilação oxidativa e diminuição da geração de ATP, exercendo efeitos difusos sobre muitos sistemas intracelulares (COTRAN *et al.*, 2000). A diminuição do aporte de O_2 para o tecido

acometido leva à inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial e a queda da produção de adenosina trifosfato. O consumo do estoque de ATP continua e é degradado ADP e AMP e, posteriormente, à adenosina, inosina e hipoxantina (SILVA Jr. *et al.*, 2002; TARDINI & YOSHIDA, 2003).

O acúmulo de cálcio no citosol provoca a ativação da protease calpaína, que promove a quebra de uma ponte peptídica da enzima xantina desidrogenase (XD), levando à formação da enzima xantina oxidase (OX). A OX necessita de oxigênio para realizar a conversão de hipoxantina em xantina. Na fase de isquemia, portanto, ocorre acúmulo dessas duas substâncias. Com a reperfusão, a hipoxantina é oxidada em xantina e esta em ácido úrico, tendo como subproduto dessa reação a formação do ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila (SILVA Jr. *et al.*, 2002).

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

Outro radical livre intimamente envolvido com a lesão de isquemia e reperfusão é o gás solúvel ON. Durante o processo de reperfusão, o ON reage com o radical superóxido dando origem a um radical altamente reativo e citotóxico, o peroxinitrito (ONOO-) (KUNZ *et al.*, 2010; CAMPOS & YOSHIDA, 2004).

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

CONSEQUÊNCIAS DA ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL TRANSITÓRIA

A isquemia cerebral é definida como a redução do fluxo sanguíneo cerebral a um limite crítico que provoca lesão em todo tecido cerebral (global) ou em uma região localizada (focal). A isquemia cerebral global ocorre comumente em pacientes que apresentam uma variedade de condições clínicas como diminuição da luz carotídea, parada cardíaca, hipotensão, choque, asfixia e cirurgias cardíacas ou carotídeas complexas (HARUKUNI & BHARDWAJ, 2006).

O processo de isquemia cerebral global resulta em um padrão histológico previsível, no qual populações específicas de neurônios são afetadas (necrose isquêmica seletiva) (HARUKUNI & BHARDWAJ, 2006). Essa seleção acontece devido ao fenômeno conhecido como vulnerabilidade seletiva neuronal. Análises morfológicas indicam que os neurônios da região do hilo do giro denteado (HGD), neurônios piramidais do corno de Amon 1 (CA1) e os das camadas 3 e 5 do córtex cerebral são as células que apresentam maior vulnerabilidade seletiva. As

alterações morfológicas de lesão isquêmica nessas células são mais evidentes após seis horas de reperfusão. Porém, nos primeiros 15 minutos de reperfusão observa-se microvacuolizações, que desaparecem quase totalmente após uma hora do retorno do fluxo sanguíneo (WHITE *et al.*, 2000).

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

MORTE CELULAR NEURONAL APÓS ISQUEMIA

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

A isquemia cerebral e o estado epilético culminam com o aparecimento de alterações neuronais microscópicas semelhantes, conhecidas por “neurônios isquêmicos” ou “degeneração de neurônios vermelhos”. À microscopia, neurônios basofílicos podem ser artefatos induzidos pela remoção cerebral imediatamente após adequada fixação por perfusão ou quando a retirada do cérebro acontece tardiamente, mas a fixação por perfusão não é adequada. Por esse motivo, a avaliação em microscopia de luz deve ser cautelosa e, alguns autores, sugerem que somente neurônios acidofílicos caracterizam a lesão neuronal irreversível (FUJIKAWA *et al.*, 2000).

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

A apoptose é um processo ativo, ATP-dependente, caracterizado por condensação citoplasmática e nuclear, fragmentação nuclear e do DNA e formação de corpos apoptóticos, que serão facilmente eliminados por fagocitose (DEVARAJAN, 2006). Este tipo de morte celular pode ser desencadeado por diferentes vias, dentre elas a ativação direta de caspases, alterações mitocondriais

com subsequente ativação de caspases ou por interferência com proteínas citosólicas reguladoras de apoptose (PEREIRA, 2009). Principalmente, em modelos animais, a morte neuronal após isquemia é mediada por ativação direta de caspases (LOVE, 2003).

As caspases são proteases que possuem cisteína em seu sítio ativo, clivam proteínas em sítios com resíduos de ácido aspártico, são constitutivamente expressas no cérebro e podem ser ativadas por estímulos intrínsecos e extrínsecos (KUNZ *et al.*, 2010). Essas enzimas são produzidas como pró-caspases e ativadas, principalmente, após clivagem proteolítica. As caspases são separadas em ativadoras (8, 9 e 10), que promovem a proteólise, e efetadoras (3, 6 e 7), as quais ativam outras proteases que degradam diferentes substratos da célula, inclusive o DNA (PEREIRA, 2009). A enzima executora mais importante no cérebro é a caspase-3, a qual é ativada precocemente após a isquemia, particularmente em regiões próximas ao infarto (KUNZ *et al.*, 2010). Além dessa, as caspases 1, 8 e 9 estão envolvidas na isquemia cerebral (MERGENTHALER *et al.*, 2004).

No processo de isquemia e reperfusão cerebral, a apoptose é induzida, principalmente, pela ativação de receptores da família TNF ou Fas (*First apoptosis signal*), os quais expõem uma proteína de domínio da morte (p. ex. FADD) que se liga à pró-caspase-8. Uma das vias subsequentes, é a clivagem de caspase-3 que ativa proteases que causam lesão ao DNA (p. ex. CAD) e morte celular. A caspase-8 também é capaz de clivar e ativar uma das proteínas da família Bcl-2, a Bid, que aumenta a permeabilidade mitocondrial e a liberação de citocromo c, iniciando a via mitocondrial de apoptose (Figura 1). A citocromo c é uma proteína que participa da cadeia respiratória mitocondrial, porém quando presente no citosol interage com proteínas ativadoras de proteases apoptóticas (p. ex. Apaf). Esta interação forma um apoptossomo que ativa a caspase-9, a qual cliva caspase-3 seguindo a apoptose (SUGAWARA *et al.*, 2004; PEREIRA, 2009; KUNZ *et al.*, 2010).

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

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

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

A ativação das proteínas quinases ocorre por fosforilação (MORRISON & DAVIS, 2003) em uma cascata de ativação sequencial, iniciada por MAPKKK seguida de ativação das MAPKK em resíduos de serina e treonina. As MAPKK, por sua vez, reconhecem e catalisam a fosforilação num motivo treonina-X-tirosina (Thr-X-Tyr) na alça de ativação das MAPK, onde X corresponde a diferentes aminoácidos entre os sítios da dupla fosforilação (SLOW *et al.*, 1997). A ativação de MAPK em

resposta à isquemia cerebral ainda não está completamente entendida (LENNMYR *et al.*, 2002).

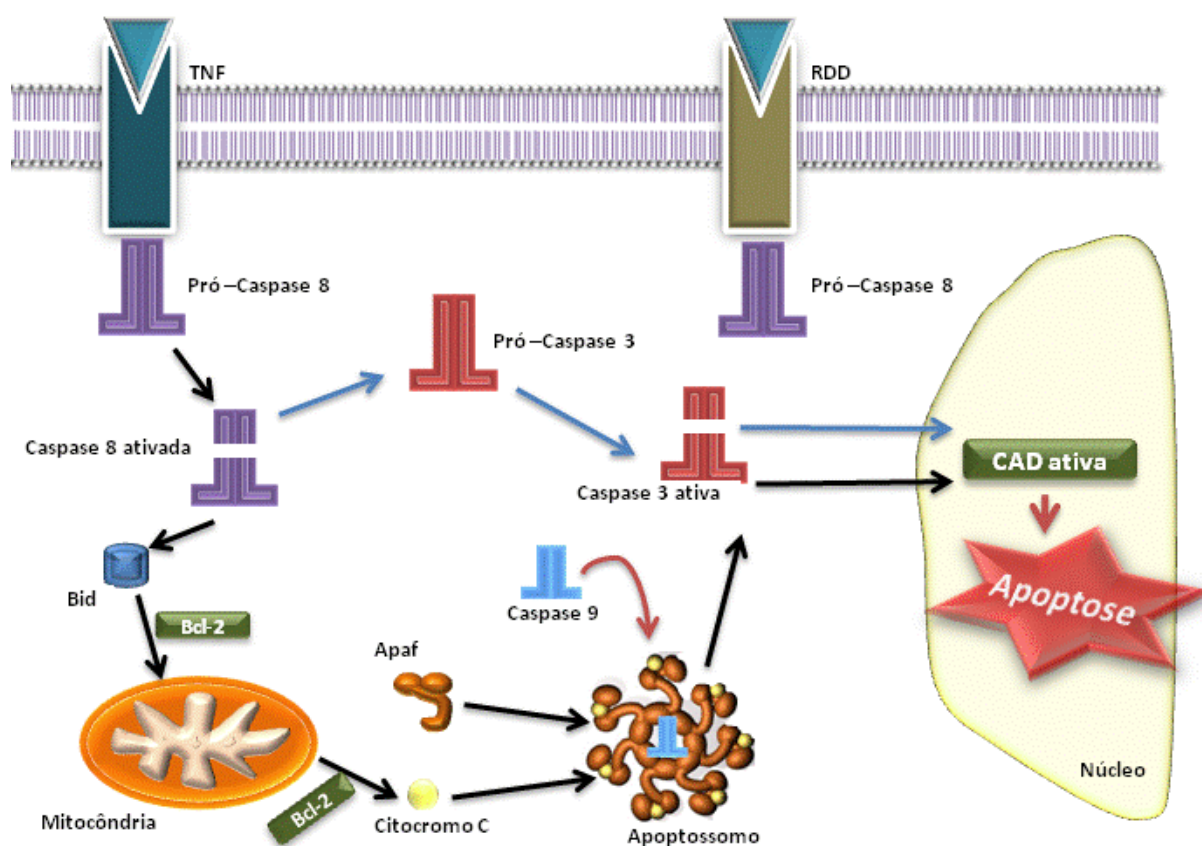


FIGURA 1- Principais vias de ativação de caspases na isquemia e reperfusão cerebral. Via de ativação direta de caspase 3 (seta azul) e via mitocondrial (seta preta). RDD: receptor com domínios de morte, Apaf: fator ativador de proteases apoptóticas.
Fonte: MIGUEL (2011)

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

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

SUBRAMANIAM & UNSICKER (2006), ERK1/2 é o indutor predominante de morte neuronal não-apoptótica.

JNK e p38 (ERK 3/4) são ativadas por estresse oxidativo, uma vez que o estímulo ativador inclui a inflamação aguda e a liberação de citocinas, toxicidade ao glutamato e hiperosmolaridade. Ambas as proteínas fosforiladas causam ativação de fatores de transcrição pró-apoptóticos que culminam com apoptose (Figura 2) (LENNMYR *et al.*, 2002; OTANI *et al.*, 2002). No entanto, a participação de JNK na cascata de apoptose ainda é incerto, haja vista que a família JNK é codificada por três diferentes genes (JNK1, JNK2, JNK3), o que pode gerar isoformas com diferentes ações. Estudo realizado por SANNA *et al.* (1998), mostrou que JNK1 teve maior expressão em células que expressavam genes inibidores de apoptose quando comparada a outras JNKs, conferindo a esta proteína o papel de proteção celular contra apoptose.

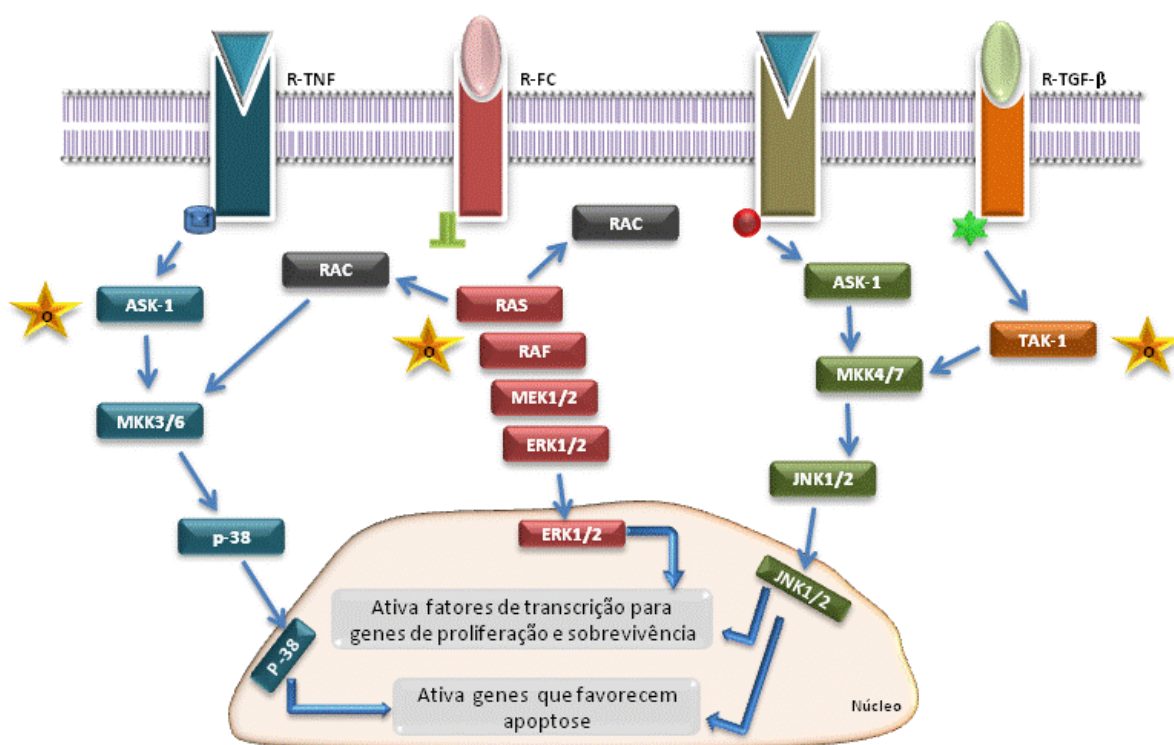


FIGURA 2 – Vias de ativação de MAPK no estresse oxidativo (estrela). R-TNF: Receptor de necrose tumoral; R-FC: Receptor de fator de crescimento; R-TGF-β: Receptor de fator de crescimento transformante β. Fonte: MIGUEL (2011)

MECANISMOS ANTIOXIDANTES

Em sistemas aeróbios, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante (FERRARI *et al.*, 1993). Dentre os antioxidantes preventivos ou detoxificadores, que atuam antes do estabelecimento da lesão, temos a glutatona reduzida (GSH), SOD, catalase, glutatona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. Os antioxidantes reparadores, que reparam a lesão ocorrida, são: ácido ascórbico, glutatona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px (CAMPOS & YOSHIDA, 2004). Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular

(FERRARI *et al.*, 1993; EVORA *et al.*, 1996; TARDINI & YOSHIDA, 2003).

Além do sistema antioxidante enzimático, também são considerados antioxidantes todas as substâncias que doam ou recebem um elétron de um radical livre, inativando-o. São exemplos o ácido ascórbico (vitamina C), β -caroteno, ácido úrico, α -tocoferol (vitamina E), albumina, transferrina e manitol. Há ainda os que possuem efeito antioxidante indireto, como o alopurinol (inibidor da xantina oxidase), o selênio (presente na glutatona peroxidase), a deferoxamina (quelante do ferro), entre outros (FERRARI *et al.*, 1993; CAMPOS & YOSHIDA, 2004).

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

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

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

Agentes antioxidantes, assim como outros neuroprotetores, para apresentarem alta eficácia devem ser capazes de atravessar a BHE e devem ser oferecidos o mais rápido possível, em um intervalo de tempo que possam reduzir ou prevenir significativamente a lesão cerebral isquêmica, intervalo conhecido como “janela de neuroproteção”. A janela terapêutica capaz de atenuar a área de infarto cerebral em ratos é de três a quatro horas, que corresponde ao período entre o evento vascular e a perda neuronal irreversível (GILGUN-SHERKI *et al.*, 2002).

A vitamina E é um dos antioxidantes cuja função protetora ao endotélio e de isquemia cerebral é bem estabelecida (ZHANG *et al.*, 2004; BIANCHI & ANTUNES, 2004). Em estudo realizado por ZHANG *et al.*, (2004), ratos que sofreram oclusão da artéria cerebral média e foram tratados com vitamina E apresentaram área de infarto cerebral significativamente menor que não tratados. Em um estudo *in vitro*, os mesmos autores, observaram diminuição da agressão por ON e aumento da expressão de VEGF em cultura de células neuronais tratadas com vitamina E. Esses resultados sugerem que cérebros isquêmicos aumentam a permeabilidade de vitamina E através da BHE e que esta vitamina possui efeito neuroprotetor e diminui os efeitos do processo de isquemia.

Outros agentes antioxidantes tem sido utilizados como agentes neuroprotetores. HONG *et al.*, (2001) avaliaram experimentalmente o efeito protetor do chá verde em processos de isquemia e reperfusão de cérebro em ratos, por oclusão das artérias carótidas por cinco minutos. Estes autores verificaram ainda que animais tratados com o antioxidante apresentaram menor área de infarto, níveis menores de peróxido de hidrogênio e de lipoperoxidação e menor quantidade de células apoptóticas. Isto sugere que o chá verde pode ser um agente antioxidante eficiente na proteção de lesões de isquemia e reperfusão.

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

PEQUI DO CERRADO (*Caryocar brasiliense*) COMO AGENTE ANTIOXIDANTE

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

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

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

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

Recentemente, MIGUEL (2011) verificou que o extrato etanólico bruto da casca de pequi nas doses de 300 e 600mg/kg possui potencial atividade neuroprotetora após indução de isquemia global transitória cerebral. O autor verificou redução do número de neurônios isquêmicos (indicativos de necrose

isquêmica) e de células marcadas com caspase-3 clivada. Estes achados foram considerados relevantes para a capacidade neuroprotetora da casca de pequi. No entanto, a autora indica que mais estudos precisam ser desenvolvidos para avaliação toxicológica do extrato.

Assim, os achados de vários estudos com diferentes partes do pequi indicam que a elevada quantidade de antioxidantes pode ser importante para estudos e avaliações de sua ação em lesões isquêmicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, S. A. **Qualidade da bebida e atividade antioxidante do café *in vivo* e *in vitro***. 2007. 82p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras - UFLA.

BANO, D.; NICOTERA, P. Ca^{2+} Signals and Neuronal Death in Brain Ischemia. **Stroke**, Dallas, v. 38, p. 674-676, 2007.

BHAT, N. R.; ZHANG P. Hydrogen peroxide activation of multiple mitogen-activated protein kinases in an oligodendrocyte cell line: role of extracellular signal-regulated kinase in hydrogen peroxide-induced cell death. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 72, n. 1, p. 112-119, 1999.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

CAMPOS, E. B. P.; YOSHIDA, W. B. O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. **Jornal Vascular Brasileiro**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 4, p. 357-366, 2004.

CHENG, M.; BOULTON, T. G.; COBB, M. H. ERK3 is a constitutively nuclear protein kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 271, p. 8951-8958, 1996.

COLBOURNE, F.; AUER, R.N. Transient global cerebral ischemia produces morphologically necrotic, not apoptotic neurons. In: FUJIKAWA, D. G. **Acute neuronal injury: The role of excitotoxic programmed cell death mechanisms**. Springer Science: North Hills, CA. 1ed., cap. 8, p.121-153, 2010.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: Patologia estrutural e funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000, 1251p.

DEVARAJAN, P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, Washington, v. 17, n. 6, p. 1503-1520, 2006.

EVORA, P. R. B.; PEARSON, P. J.; SECCOMBE, J. F.; SCHAFF, H. V. Atualização: Lesão de isquemia e reperfusão. Aspectos fisiopatológicos e a importância da função endotelial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 4, n. 66, p. 239, 1996.

FERRARI, R.; CECONI, C.; CURELLO, S.; ALFIERI, O.; VISIOLI, O. Myocardial damage during ischaemia and reperfusion. **European Heart Journal**, London, v. 14, p. 25-30, 1993.

FONDEVILA, C.; BUSUTTIL, R. W.; KUPIEC-WEGLINSKI, J. W. Hepatic ischemia/reperfusion injury: a fresh look. **Experimental and molecular pathology**, New York, v. 2, n. 74, p. 86-93, 2003.

FUJIKAWA, D. G.; SHINMEI, S. S.; CAI, B. Kainic acid-induced seizures produce necrotic, not apoptotic, neurons with internucleosomal DNA cleavage: implications for programmed cell death mechanisms. **Neuroscience**, Oxford, v. 98, p. 41–53, 2000.

GARCIA, N. Ministério amplia assistência a pacientes com AVC. **Portal da Saúde, Agência de Saúde, Ministério da Saúde** [on line]. 2012. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/4790/162/ministerio-da-saude-amplia-assistencia-a-pacientes-com-avc.html>. Acesso em: 02 out. 2012.

GARRINGTON, T. P.; JOHNSON, G. L. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. **Current Opinion in Cell Biology**, Philadelphia, v. 11, n. 211-218, 1999.

GILGUN-SHERKI, Y.; ROSENBAUM, Z.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Antioxidant Therapy in Acute Central Nervous System Injury: Current State. **Pharmacological Reviews**, Bethesda, v. 54, n. 2, p. 271–284, 2002.

HARUKUNI, I.; BHARDWAJ, A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. **Neurologic clinics**, Philadelphia, v. 24, p. 1- 21, 2006.

HONG, J. T.; RYU, S. R.; KIM, H. J.; LEE, J. K.; LEE, S. H.; YUN, Y. P.; LEE, B. M.; KIM, P. Y. Protective effect of green tea extract on ischemia/ reperfusion-induced brain injury in Mongolian gerbils. **Brain Research**, Amsterdam, v. 888, p. 11–18, 2001.

KANG, H. C.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. Excitotoxic programmed cell death involves caspase-independent mechanisms. In: FUJIKAWA, D. G. **Acute neuronal injury: The role of excitotoxic programmed cell death mechanisms**. Springer Science: North Hills, CA. 1.ed., cap. 5, p. 79-89, 2010.

KHOURI, J.; RESCK, I. S.; POÇAS-FONSECA, M.; SOUSA, T. M. M.; PEREIRA, L.O.; OLIVEIRA, A. B. B.; GRISÓLIA, C. K. Anticlastogenic potential and antioxidant effects of an aqueous extract of pulp from the pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb). **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 442-448, 2007.

KIM, Y. C. Neuroprotective Phenolics in Medicinal Plants. **Archives of Pharmacal Research**, Seoul, v. 33, n. 10, p. 1611-1632, 2010.

KUNZ, A.; DIRNAGL, U.; MERGENTHALER, P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, Germany, v. 24, p. 495-509, 2010.

LANGE, D. W. From red wine to polyphenols and back: A journey through the history of the French Paradox. **Thrombosis Research**, Norway, v. 119, p. 403-406, 2007.

LENNMYR, F.; KARLSSON, S.; GERWINS, P.; ATA, K. A.; TERÉNT, A. Activation of mitogen-activated protein kinases in experimental cerebral ischemia. **Acta Neurologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 106, p. 333–340, 2002.

LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. Review: The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**, Reading, v. 125, p. 288–306, 2011.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.)**. 2008. 182p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Ciência dos Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, USP – São Paulo.

LOVE S. Apoptosis and brain ischaemia. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, Oxford, v. 27, p. 267 – 282, 2003.

MERGENTHALER, P.; DIRNAGL, U.; MEISEL, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. **Metabolic Brain Disease**, Morgantown, v. 19, n. 3/4, 2004.

MIGUEL MP. **Ação neuroprotetora do extrato etanólico da casca de pequi em cérebros de ratos submetidos à isquemia e reperfusão**. 2011. 79f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, UFG – Goiânia.

MIRANDA-VILELA, A. L.; GRISOLIA, C. K.; RESCK, I. S.; MENDONÇA, M. A. Characterization of the major nutritional components of *Caryocar brasiliense* fruit pulp by NMR spectroscopy. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2310-2313, 2009.

MORRISON, D. K.; DAVIS, R. J. Regulation of map kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 19, p. 91-118, 2003

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NUNEZ, M. J.; PARAJO, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, Reading, v. 72, p. 145-171, 2001.

MURPHY, E.; CROSS, H. R.; STEENBERGEN, C. Is Na/Ca exchange during ischemia and reperfusion beneficial or detrimental?. **Annals of the New York Academic Sciences**, New York, v. 976, p. 421-30, 2002.

OHTAKI, H.; DOHI, K.; NAKAMACHI, T.; YOFU, S.; ENDO, S.; KUDO, Y.; SHIODA, S. Evaluation of brain ischemia in mice. **Acta Histochemica et Cytochemica**, Kyoto, v. 38, n. 2, p. 99-106, 2005.

OTANI, N.; NAWASHIRO, H.; FUKUI, S.; NOMURA, N.; YANO, A.; MIYAZAWA, T.; SHIMA, K. Differential activation of mitogen-activated protein kinase pathways after traumatic brain injury in the rat hippocampus. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, Hagerstown, v. 22, p. 327–334, 2002.

PASSOS, X. S., SANTOS, S. C., FERRI, P. H., FERNANDES, O. F. L., PAULA, T. F., GARCIA, A. C. F.; SILVA, M. R. R. Atividade Antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 6, p. 623–627, 2002.

PASSOS, X. S.; CASTRO, A. C. M.; PIRES, J. S.; GARCIA, A. C. F.; CAMPOS, F. C.; FERNANDES, O. F. L.; PAULA, J. R. FERREIRA, H. D.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; SILVA, M. R. R. Composition and antifungal activity of the essential oils of *Caryocar brasiliensis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, n. 5, p. 319-324, 2003.

PAULA-JUNIOR, W.; ROCHA, F. H.; DONATTI, L.; FADEL-PICHETH, C. M. T.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hydroethanolic extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 16, p. 625-630, 2006.

PEREIRA, F. E. L. Lesões celulares e do Interstício. Cicatrização. Regeneração. In: FILHO, B. **Bogliolo – Patologia Geral**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 82- 139, 2009.

PERICO, N.; CODREANU, I.; SCHIEPPATI, A. REMUZZI, G. **The future of renoprotection**. **Kidney International**, Brussels, n. 68, p. S95–S101, 2005.

QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSÉGU L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, Rostock, v. 50, p. 586 – 621, 2011.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L. C; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

SANNA, M. G.; DUCKETT, C. S.; RICHTER, B. W. M.; THOMPSON, C. B.; ULEVITCH, R. J. Selective activation of JNK1 is necessary for the anti-apoptotic activity of hILP. **Biochemistry**, Washington, v. 95, p. 6015–6020, 1998.

SEGER R, KREBS EG. The MAPK signaling cascade. **J Fed Am Soc Exp Biol** 1995; 9: 726-735.

SILVA Jr, O. C.; CENTURION, S.; PACHECO, E. G.; BRISOTTI, J. L.; OLIVEIRA, A. F.; SASSO, K. D. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 17, suppl. c3, p.96-100, 2002.

SLOW, Y. L., KALMAR, G. B.; SANGHERA, J. S.; TAI, T.; OH, S. S.; PELECH, S. L. Identification of two essential phosphorylated threonine residues in the catalytic domain of Mekk1. Indirect activation by Pak3 and protein kinase C. **The Journal of**

Biological Chemistry, Bethesda, v. 272, p. 7586-7594, 1997.

SUBRAMANIAM, S.; UNSICKER, K. Extracellular signal-regulated kinase as an inducer of non-apoptotic neuronal death. **Neuroscience**, Oxford, v. 138, p. 1055–1065, 2006.

SUGAWARA, T.; FUJIMURA, M.; NOSHITA, N.; KIM, G. W.; SAITO, A.; HAYASHI, T.; NARASIMHAN, P.; MAIER, C. M.; CHAN, P. H. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. **The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, West Hartford, v. 1, p. 17–25, 2004.

TARDINI, D. M. S.; YOSHIDA, W. B. Lesões cerebrais decorrentes de isquemia e reperfusão na cirurgia de endarterectomia de carótida. **Jornal Vascular Brasileiro**, Porto Alegre, v. 2, n. 2, p.119-28, 2003.

VIANNA, P. T. G. Atualidade do pré-condicionamento e proteção renal. In: CAVALCANTE, I. L.; CANTINHO, F. A. F.; ASSAD, A. R. **Medicina Perioperatória**, Rio de Janeiro: Sociedade de Anestesiologia do Estado de São Paulo, p. 579-582, 2006.

VICTOR, V. M.; ROCHA, M.; FUENTE, M. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 4, p. 327–347, 2004.

WHITE, B. C.; SULLIVAN, J. M.; DEGRACIA, D. J.; O'NEIL, B. J.; NEUMAR, R. W.; GROSSMAN, L. I.; RAFOLS, J. A.; KRAUSE, G. S. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v. 179, p. 1–33, 2000.

ZHANG, B.; TANAKA, J.; YANG, L.; SAKANAKA, M.; HATA, R.; MAEDA, N.; MITSUDA, N. Protective effect of vitamin E against focal brain ischemia and neuronal death through induction of target genes of hypoxia-inducible factor-1. **Neuroscience**, Oxford, v.126, n.2, p.433-440, 2004.