



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

SUSANNE SUELY SANTOS DA FONSECA

EFEITO PROTETOR DA FLAVANA EXTRAÍDA DA ESPÉCIE *Brosimum acutifolium* CONTRA DANOS CAUSADOS POR HIPÓXIA EM CÉLULAS RETINIANAS: UM ESTUDO *IN VITRO*

**BELÉM
2014**

SUSANNE SUELY SANTOS DA FONSECA

EFEITO PROTETOR DA FLAVANA EXTRAÍDA DA ESPÉCIE *Brosimum acutifolium* CONTRA DANOS CAUSADOS POR HIPÓXIA EM CÉLULAS RETINIANAS: UM ESTUDO IN VITRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular – área de concentração em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Pereira Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia

**BELÉM
2014**

SUSANNE SUELY SANTOS DA FONSECA

EFEITO PROTETOR DA FLAVANA EXTRAÍDA DA ESPÉCIE *Brosimum acutifolium* CONTRA DANOS CAUSADOS POR HIPÓXIA EM CÉLULAS RETINIANAS: UM ESTUDO *IN VITRO*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular – área de concentração em Neurociências.

Aprovada: ___/___/___

Prof. Dr. Antônio Pereira Junior
Orientador
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia
Co-orientador
ICS / UFPA

Prof. Dra. Mara Sílvia Pinheiro Arruda
Banca Examinadora
ICEN-UFPA

Prof. Dra. Barbarella de Matos Macchi
Banca Examinadora
ICB/UFPA

Aos meus Pais e irmãos

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por estar presente em minha vida e em meu lar.

Aos meus pais Raimundo Valdenir e Antonia Suely, pelo incentivo, amor e apoio dado em todos os momentos em minha vida, por acreditar e ajudar a concretizar meus sonhos e metas. Aos meus irmãos Diemerson Fonseca e Anderson Fonseca, pelos momentos de carinhos e conversas. Só tenho a agradecer a meu senhor por me presentear com esta família.

Ao meu namorado Chubert Sena, pelo amor, paciência, compreensão e companheirismo de todos os dias. Seu apoio foi imprescindível em minha caminhada me impulsionando a chegar cada vez mais longe, tornando a caminhada mais doce e agradável. Desejo toda felicidade, todas as recompensas e uma sequência de vitórias em sua vida profetizadas por Deus.

A minha prima Mayra Francy por sua amizade e pelos momentos de descontração e amor de irmã, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos de minha vida.

A minha família principalmente Tia Roseli Santos e aos Meus Padrinhos que entenderam minha ausência para a dedicação do mestrado, pela força e amor transmitido que sempre estavam me apoiando e me dando bons conselhos.

Esta conquista sem dúvida não foi fácil, mas foi determinada por Deus para de alguma forma adquirir maturidade e aprendizado. E sou grata por todos os momentos bons e ruins que passei durante esses dois anos e pela oportunidade de recomeçar.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antônio Pereira Júnior e meu co-orientador Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia, por ter me aceito no laboratório de Neuroplasticidade, pela orientação, paciência e apoio científico e por acreditar em meu potencial e incentivo na carreira científica, sem a ajuda de vocês talvez estivesse em outra trajetória e minha família é imensamente grata pelo apoio em um momento difícil em minha vida.

Aos amigos Natasha Silva, Fernanda Anastácia, Tarcyanne Garcia e Keuri Rodrigues pela compreensão da minha ausência, pela verdadeira amizade e palavras de conforto e imenso carinho. É uma dádiva de Deus ter

amigos nos quais você pode compartilhar os vários momentos da vida e sou grata por tê-los ao meu lado. E todos os colegas do LNP, que me acolheram e se tornaram especiais para mim, pelo aprendizado diário.

Agradeço também aos colaboradores do trabalho ao Laboratório de Neuroquímica da UFPA, sob a orientação do professor José Luiz, no qual dei os meus primeiros passos na carreira científica. Ao laboratório de Biologia Estrutura sob a orientação do Prof. Dr. Chubert Sena pela ajuda profissional e por nos disponibilizar o laboratório para as análises de nossas amostras e a todos os alunos e a técnica deste laboratório que se tornaram muito queridos para mim e pelo carinho a mim repassado. Ao Laboratório LANEX coordenado pelo Prof. Dr. Edmar Costa e Prof. Dr^a Elizabeth Yamada que nós cederam o espaço para o desenvolvimento de nosso trabalho e confiança a mim depositada. Ao laboratório Central de Extração da UFPA sob a coordenação da Prof. Dr^a Mara Arruda, pelo apoio científico e por nos disponibilizar o composto estudado. Agradeço a MSc. Nádia Couto pela amizade e por nos ajudar gentilmente no fornecimento deste composto.

A CAPES pela concessão da bolsa e financiamento do projeto neste tempo de trabalho, a UFPA e ICB.

RESUMO

O acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi) causa danos celulares por provocar intensa excitotoxicidade e estresse oxidativo após privação de oxigênio e glicose para uma região do encéfalo. Neste trabalho, investigamos o potencial neuroprotetor da planta amazônica *Brosimum acutifolium* que é rica em flavanas como a 4',7-diidroxi-8-(3,3-dimetilalil)flavana (brosimina b, aqui abreviada como Bb) que apresenta elevado potencial antioxidante. Utilizamos cultura de células retinianas de embrião de galinha submetidas a hipóxia experimental, por privação de oxigênio e glicose, para avaliarmos o potencial antioxidante da Bb através da análise do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Além disso, avaliamos a viabilidade celular (VC) e o perfil oxidativo e antioxidativo após 3, 6 e 24 horas de hipóxia, pela produção de oxigênio reativo (O_2^-) e atividade antioxidante endógena pela enzima catalase, respectivamente. Nossos resultados demonstram que nosso modelo experimental de hipóxia *in vitro* provoca redução tempo-dependente da VC, acompanhada por intenso estresse oxidativo, devido à excessiva produção de oxigênio reativo (O_2^-). O tratamento com Bb (10 μ M) protegeu significativamente a viabilidade celular durante 3 e 6 h de hipóxia experimental em células retiniana cultivadas *in vitro*, além de favorecer o aumento da atividade da enzima catalase em todos os tempos testados. Desta forma, concluímos que a Bb possui ação antioxidante e neuroprotetor por contribuir na defesa contra o estresse oxidativo induzido em condições de hipóxia, tornando-se como uma droga com potencial uso em tratamentos em casos de AVCi *in vivo*.

Palavra Chaves: Brosimina b, *Brosimum acutifolium*, neuroproteção, isquemia, hipóxia, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Ischemic stroke causes neuronal death due to excitotoxicity and oxidative stress. In this work, we investigate the neuroprotective effect of an Amazon plant *Brosimum acutifolium* which is rich in flavanols with antioxidant potential, such as 4',7-dihydroxy-8-(3,3-dimethylallyl) flavanone (brosimin b) (Bb), in an experimental model hypoxia *in vitro*. Neuroprotective effect of Bb was evaluated using cell cultures obtained from chick embryo retinas submitted to hypoxia by deprivation of oxygen and glucose. The antioxidant power of Bb was evaluated by scavenging of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) molecules. The neuroprotective activity was evaluated through the effects on cell viability, oxidative and antioxidant profile after 3, 6 and 24 hours after hypoxia through oxygen reactive elements (O_2^-) analysis and endogenous antioxidant activity power of the catalase enzyme, respectively. We demonstrate that *in vitro* hypoxia causes time-dependent decreasing of cell viability due to the excessive production of O_2^- . On the other hand, the Bb treatment (10 μ M) significantly preserved the cellular viability after 3 and 6 hours of *in vitro* hypoxia. This effect contributed to decrease the oxidative stress generated by production of O_2^- during the 3 initial hours of hypoxia and also induced the increasing in the activity of catalase enzyme in all the tested times. Thus, we show that Bb treatment has antioxidant and neuroprotective effects due to contribute with antioxidant response during the neural hypoxia-induced oxidative stress *in vitro*. These results suggest the use of Bb as a potential drug for ischemic stroke treatment *in vivo*.

Key word: Brosimin b, *Brosimum acutifolium*, neuroprotection, ischemia, hypoxia, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Produção de energia através da quebra da glicose durante a glicólise, ciclo de krebs e fosforilação oxidativa.....	17
FIGURA 2: Regiões formadas na área de lesão após AVCi.....	18
FIGURA 3: Excitotoxicidade induzida por glutamato em condições de hipóxia.....	21
FIGURA 4: Organização da retina de vertebrados disposta em camadas.....	23
Figura 5: Formação dos radicais livres.....	25
FIGURA 6: Estrura química dos flavonoides.....	28
FIGURA 7: Imagem da planta de <i>Brosimum acutifolium</i>	31
FIGURA 8: Estrutura química da brosimina b.....	32
FIGURA 9: Atividade antioxidante: Porcentagem de atividade antioxidante da brosimina b pelo sequestro do radical DPPH.....	42
FIGURA 10: Curva de DPPH remanescente.....	43
FIGURA 11: Viabilidade Celular: Redução da viabilidade celular em culturas retinianas de embrião (E7/C7) de galinha submetidas a hipóxia pela privação de oxigênio e glicose, após 3,6 e 24h de exposição.....	44
FIGURA 12: Viabilidade celular: Efeito do tratamento com a flavana brosimina b em diferentes concentrações (1, 5, 10, 25, 50 e 100 µM) em culturas de células retinianas de embrião de galinha (E7), tratadas por 24h.....	46

FIGURA 13: Viabilidade Celular: Efeito protetor da brosimina b contra danos induzidos em 3, 6 e 24 h de hipóxia.....	47
FIGURA 16: Produção de Oxigênio Reativo: Efeito do tratamento com brosimina b na produção de espécies reativas após 3, 6 e 24 h de hipóxia.....	49
FIGURA 20: Atividade da enzima catalase: Efeito do tratamento com brosimina b na atividade da enzima catalase após 3, 6 e 24 h de hipóxia.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS/ SIGLAS

DMSO: dimetilsufóxido

Bb: Brosimina b

%AA: porcentagem da atividade antioxidante

%[DPPH]rem: porcentagem de DPPH remanescente

SNC: Sistema Nervoso Central

PBS: *Phosphate Buffered Saline*

CMF: *Calcium Medium Free*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

E7: Sétimo estágio embrionário

C7: Sétimo dia de cultivo celular

CAT: Catalase

SOD: superóxido dismutase

NBT: *Nitro Blue Tetrazolium*

ATP: Trifosfato de adenosina

ADP: Difosfato de adenosina

NADH: Dinucleótido de nicotinamida e adenina

AVCi: Acidente vascular cerebral isquêmico

POG: Privação de oxigênio e glicose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 METABOLISMO ENERGÉTICO DO TECIDO NERVOSO.....	16
2.2 AVCi EM MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS DA RETINA.....	20
2.3 ESTRESSE OXIDATIVO E RADICAIS LIVRES.....	22
2.4 SISTEMA DE DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	24
2.4.1. ANTIOXIDANTES NATURAIS E NEUROPROTEÇÃO.....	26
2.5.1. Caracterização da planta <i>Brosimum acutifolium</i> (Huber) Ducke.....	29
3. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivo Geral.....	31
3.2. Objetivos Específicos.....	31
5. MATERIAL E MÉTODOS	32
5.1. OBTENÇÃO DO FLAVONÓIDE.....	32
5.2. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO COMPOSTO BROSIMINA B PELO SEQUESTRO DO RADICAL DPPH.....	33
5.3. CULTURAS PRIMÁRIAS MISTAS DE CÉLULAS DA RETINA EMBRIONÁRIA DE GALINHA.....	34
5.4. MODELO DE HIPÓXIA <i>IN VITRO</i>	35
5.5. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DO MTT.....	35
5.6. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO INTRACELULAR DE ÂNION SUPERÓXIDO.....	36
5.7. ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ENZIMA CATALASE	37
5.8. DOSAGEM DE PROTEÍNA PELO MÉTODO DE BRADFORD.....	38
5.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
6. RESULTADOS	39
6.1. MEDIÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE BROSIMINA B EM SISTEMA LIVRE DE CÉLULAS.....	39
6.2 INDUÇÃO DE HIPÓXIA POR PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE.....	42
6.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR APÓS TRATAMENTO COM BROSIMINA B.....	43

6.4	EFEITO PROTETOR DA BROSIMINA B EM CULTURAS RETIANAS SUBMETIDAS A HIPÓXIA	45
6.5	AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM CULTURAS SUBMETIDAS À HIPÓXIA E TRATADAS COM <i>BROSIMINA B</i>	47
7.	DISCUSSÃO	51
8.	CONCLUSÕES	55
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. INTRODUÇÃO

O acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi) é um problema de saúde pública relevante devido provocar grande número de óbitos altos custos de tratamento aos pacientes sobreviventes. Estima-se que no Brasil ocorram anualmente mais de 68 mil novos casos de AVC (DONNAN *et al*, 2008).

O AVCi se caracteriza por uma interrupção transitória do fluxo sanguíneo para uma determinada região no Sistema Nervoso Central (SNC). Essa interrupção causa uma redução drástica no fornecimento de oxigênio para o tecido nervoso, provocando morte celular imediata, por hipóxia, na área diretamente afetada (PARK *et al*, 2011).

O fluxo sanguíneo e o transporte de oxigênio também são reduzidos nas áreas próximas ao centro isquêmico (HEISS 2012) e é chamada de região de penumbra e permanece viável devido a existência de arteriais colaterais que suprem quantidades sub-ótimas de oxigênio. A área hipóxica pode ser amplificada caso nenhuma providência seja tomada, nos momentos posteriores ao AVCi, para se proteger a área de penumbra (YANG *et al*, 2014).

A recuperação funcional de membros do paciente acometido por AVCi depende, em grande parte, da extensão de tecido nervoso presente na região de penumbra que pode escapar da morte celular, fazendo com que um dos focos terapêuticos mais importantes nas horas seguintes ao AVCi seja resgatar as células dessa região ameaçada (BAGETTA *et al*, 2010; MOUSAVI *et al*, 2010).

Além do dano direto provocado pela isquemia, a principal ameaça à integridade da região de penumbra é a excitotoxicidade decorrente do aumento na concentração extracelular de glutamato, uma consequência dos efeitos da hipóxia nos astrócitos que desempenham o papel de reciclar o glutamato liberado para o meio extracelular pelos neurônios excitatórios (LAKHAN *et al*, 2009; PANDYA *et al*, 2011; LORRIO, GOMEZ-RANGEL, *et al*, 2013; KHANNA *et al*, 2014) e a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) (DIRNAGL *et al*, 1999).

Por esse motivo, é importante criar terapias com o objetivo de suplementar a capacidade antioxidante intrínseca do organismo e evitar a morte neuronal na zona

de penumbra. Vários compostos derivados de produtos naturais da Amazônia têm sido utilizados com sucesso devido a suas propriedades antioxidante (BAGETTA *et al*, 2010;MOUSAVI *et al*, 2010).

No presente trabalho, avaliamos as propriedades antioxidantes do composto 4'7-diidroxí-8-(3,3-dimetilalil)flavana, também denominada de brosimina b (TORRES *et al*, 2000), e sua capacidade em evitar a morte celular em culturas hipóxicas de células retinianas de embrião de galinha.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 METABOLISMO ENERGÉTICO DO TECIDO NERVOSO

O tecido nervoso possui intensa atividade metabólica e, conseqüentemente, possui alto consumo de oxigênio e glicose (GRUETTER 2003;YAN *et al*, 2013). Os maiores responsáveis por esse alto nível de consumo são principalmente os neurônios e células da glia (BOLAÑOS *et al*, 2010). Em termos de metabolismo energético do sistema nervoso, as células-chave são os astrócitos que são os principais fornecedores de substratos energéticos para os neurônios por produzirem lactato através da glicólise e glicogenólise (BOUZIER-SORE & PELLERIN 2013;MULLER *et al*, 2014).

A produção de energia no tecido nervoso depende de 3 mecanismos principais: 1) glicólise, 2) ciclo de Krebs e 3) fosforilação oxidativa (DIRNAGL *et al*, 1999;GRUETTER 2003). Durante a glicólise, a glicose é metabolizada em uma série de etapas enzimáticas formando duas moléculas de piruvato, numa reação independente de oxigênio. A energia é armazenada em adenosina trifosfato (ATP) e na forma reduzida de dinucleótido nicotinamida e adenina (NADH) (BOLANOS *et al*, 2008;HE *et al*, 2013). Em condições normais, o piruvato é oxidado formando gás carbônico (CO₂) e o grupo acetil-coenzima A, que também é oxidada a CO₂ no ciclo de krebs, conservando a energia de oxido-redução (redox) em NADH (ITOH *et al*, 2003;HE *et al*, 2013).

O NADH sofre oxidação para a formação de um padrão de gradiente eletroquímico através da cadeia respiratória da mitocôndria, transferindo elétrons da NADH para O₂ enquanto a enzima ATPase promove a fosforilação do ADP em ATP (HERTZ 2008;BOLAÑOS *et al*, 2010). Esse transporte de elétrons mitocondrial é importante para excitabilidade e sobrevivência de neurônios, assim como as reações de fosforilação de proteínas que contribuem para sinalização sináptica e mudanças ligadas à estrutura e função neuronal (MATTSON *et al*, 2008;HERRERO-MENDEZ *et al*, 2009) (Figura 1).

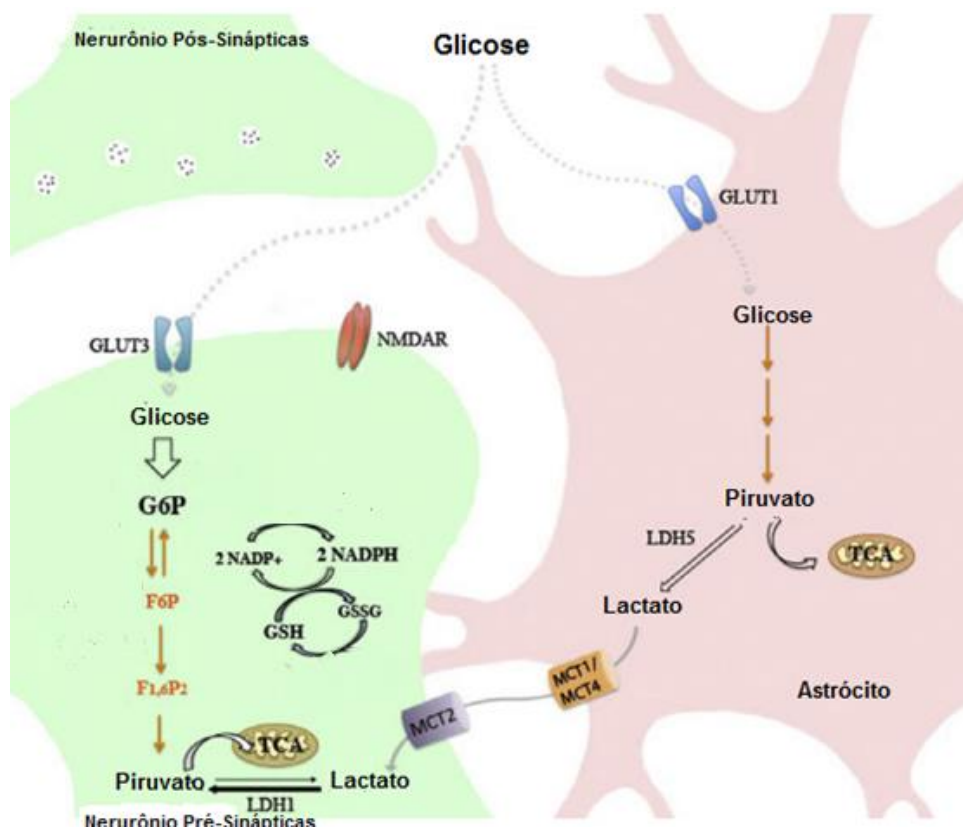


Figura 1: **Metabolização da glicose.** A glicose é acumulada em neurônios e em astrócitos, é fosforilada em glicose-6-fosfato (G6P), através da conversão de NAD^+ em NADH , processo importante na produção do antioxidante glutatona a partir da atividade da enzima glutatona oxidase (GSSG). A G6P é posteriormente convertida em piruvato (glicólise). O piruvato é oxidado através do ciclo de Krebs (TCA) na mitocôndria que, juntamente com a fosforilação oxidativa, produz ATP. Nos astrócitos, o piruvato é usado no ciclo TCA para formar lactato que é transportado para os neurônios através dos transportadores de monocarboxilatos (MCT1/MCT4 e MCT2) para suprir as necessidades neuronais. (RODRIGUEZ-RODRIGUEZ *et al*, 2013).

A privação de nutrientes e energia prejudica a homeostase do sistema nervoso, que é capaz de suportar essa deficiência por pouco tempo, devido à necessidade de produção contínua de energia para manter a atividade neuronal (KHANNA *et al*, 2014). Assim, a privação prolongada de oxigênio, como aquela decorrente de AVCi, leva à produção de ATP por *anaerobiose*, impedindo a metabolização do piruvato na mitocôndria. A redução de piruvato em lactato pode prevenir o estresse oxidativo através da redução do fluxo de elétrons através da fosforilação oxidativa que só ocorre na presença de quantidades limitadas de oxigênio (RANKIN *et al*, 2009).

Além disto, a privação de oxigênio e glicose (POG) leva à formação de duas regiões de lesão distintas do tecido nervoso: 1) o núcleo isquêmico e 2) a área de

penumbra isquêmica. (YANG *et al*, 2014). O núcleo isquêmico consiste em uma intensa área de necrose associada com danos celulares irreversíveis. Na área de penumbra isquêmica, os neurônios são mantidos de maneira precária pela circulação não comprometida pelo evento isquêmico (PANDYA *et al*, 2011; BRETÓN & RODRÍGUEZ 2012).

Na área de penumbra isquêmica ocorrem vários eventos celulares/estruturais e moleculares como: alterações na barreira hematoencefálica, estresse oxidativo, dano mitocondrial, degradação de DNA (cromatina), inflamação do tecido nervoso e despolarização do potencial de membrana como consequência do aumento dos níveis extracelulares de glutamato (KIM *et al*, 2012). Estes eventos podem ocasionar morte celular de maneira secundária, podendo agravar os danos neurológicos primários, (RAWAL *et al*, 2004) (BOLANOS *et al*, 2008; CANDELARIO-JALIL 2009; ZHU *et al*, 2012; KHANNA *et al*, 2014).

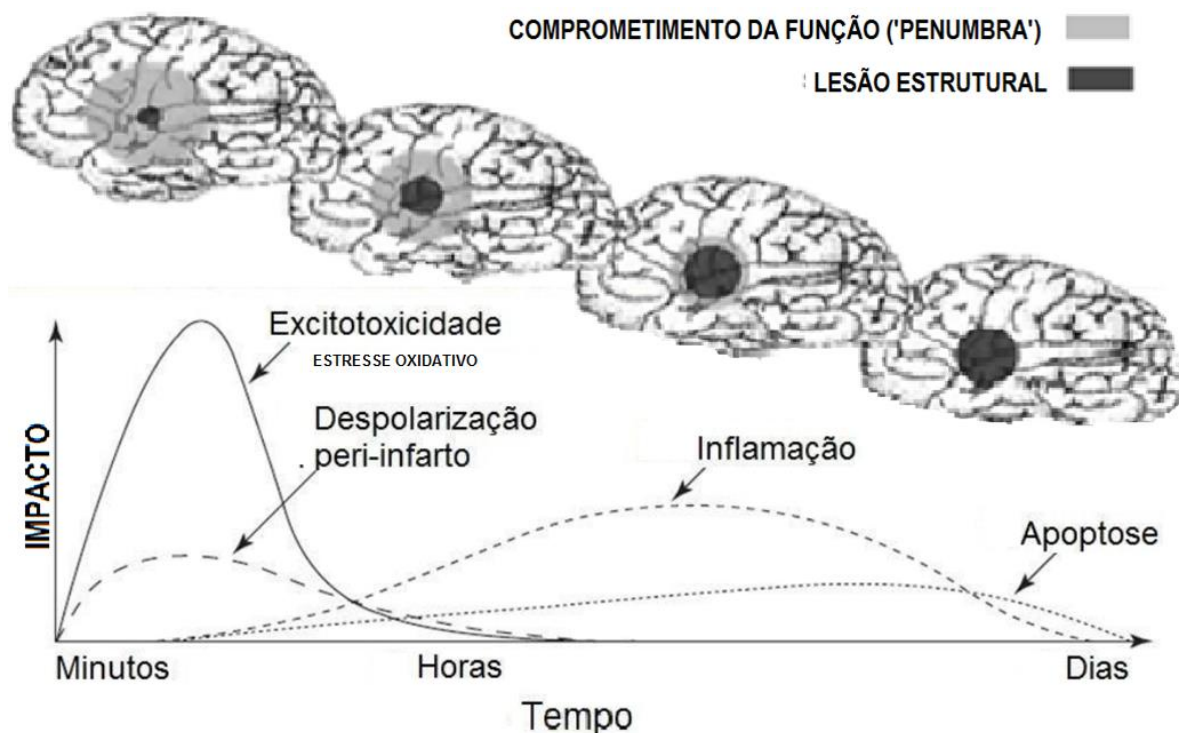


Figura 2: **Evolução temporal do AVCi e formação da área de lesão.** As áreas de cor preta representam o núcleo isquêmico e as áreas de cor cinza representam a área de penumbra isquêmica. O gráfico representa os danos fisiopatológicos gerados na área de penumbra durante a evolução temporal da lesão. Adaptado de (DIRNAGL *et al*, 1999).

O aumento da concentração extracelular de glutamato decorrente do extravasamento do neurotransmissor em grandes quantidades das células mortas

na área do centro isquêmico e está também associado com o comprometimento da função recaptadora astrocitária que podem causar lesão neuronal por excitotoxicidade (figura 3) (PUYAL *et al*, 2013). A alta concentração extracelular de glutamato faz com que os receptores AMPA e NMDA sejam estimulados de maneira prolongada, contribuindo para aumentar a entrada maciça de íons cálcio nos neurônios. O cálcio é um sinalizador intracelular importante que ativa enzimas responsáveis por processos catabólicos e produção de ERO, contribuindo para a morte celular (MOSKOWITZ *et al*, 2010; LAY *et al*, 2014).

Portanto, é importante controlar esses eventos que contribuem para os danos celulares na área de penumbra e evitar o espalhamento da perda tecidual. Neste contexto, uma das estratégias é bloquear ou impedir a formação de espécies reativas de oxigênio utilizando compostos com propriedades antioxidantes, incluindo extratos naturais (BARBOSA MDO *et al*, 2012; JITTIWAT & WATTANATHORN 2012; LEE *et al*, 2012; FOROUZANFAR *et al*, 2013; HALDER *et al*, 2013).

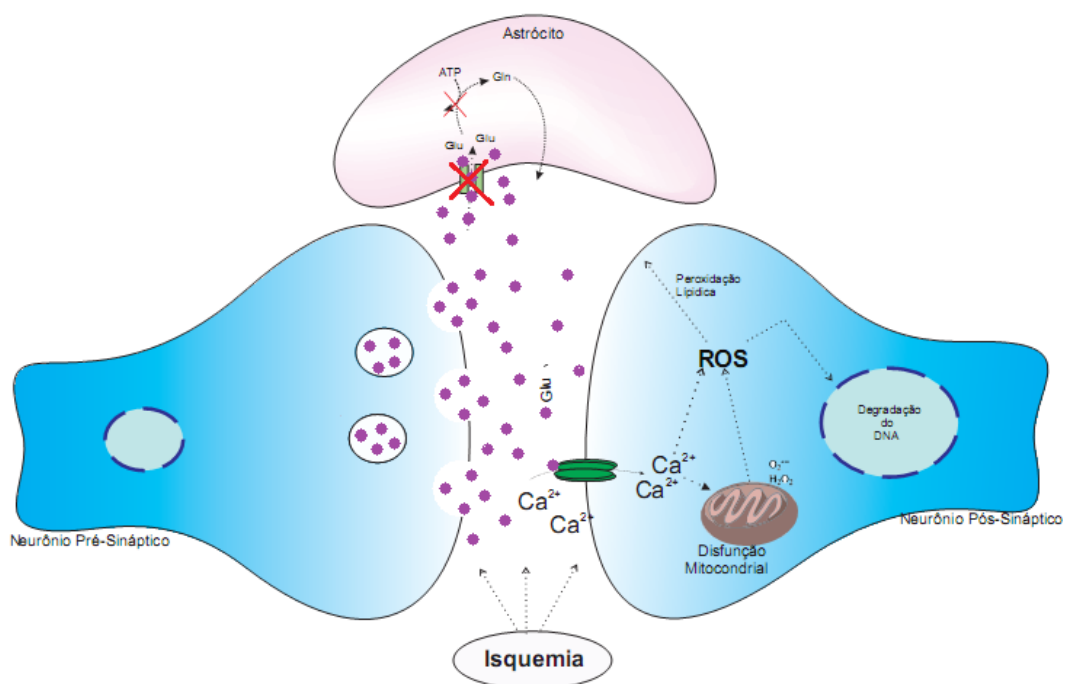


Figura 3: **A liberação excessiva de glutamato (Glu) após AVCi.** Desenho esquemático mostrando excitotoxicidade induzida por glutamato em condições de hipóxia, levando ao aumento dos níveis intracelulares de Ca^{+2} e, conseqüentemente, levando a morte celular.

2.2 AVCi EM MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO* DE CÉLULAS DA RETINA

A retina das aves deriva da camada interna do olho primordial do embrião que, por sua vez, originaram-se das células do epitélio germinativo do embrião, enquanto a camada externa do olho primordial, em contato com agregação mesenquimal, dá origem à esclera e à coróide que, posteriormente, formará o epitélio pigmentar da retina. (MEY & THANOS 2000). Este tecido apresenta a mesma origem embrionária do SNC e sua complexidade neuroquímica é semelhante às outras regiões deste sistema (MEY & THANOS 2000; STENKAMP & CAMERON 2002).

O tecido retiniano possui 6 tipos de neurônios: bastonetes, cones, células bipolar, células amácrinas, células horizontais e células ganglionares. Esses tipos celulares encontram-se organizados em camadas celulares. Há também presença de células gliais (por exemplo, astrócitos e micróglia) e células endoteliais (BRINGMANN *et al*, 2009; BASSETT & WALLACE 2012) (Figura 4).

O desenvolvimento completo da retina da galinha leva cerca de três semanas, até a eclosão dos ovos. Neste período, há formação de vários tipos celulares que irão compor a retina. Na primeira semana de desenvolvimento há formação das células gliais de *Müller* que estão presentes em toda extensão da retina. Em seguida, ocorre a formação das células bipolares, amácrinas e ganglionares (FISCHER 2005).

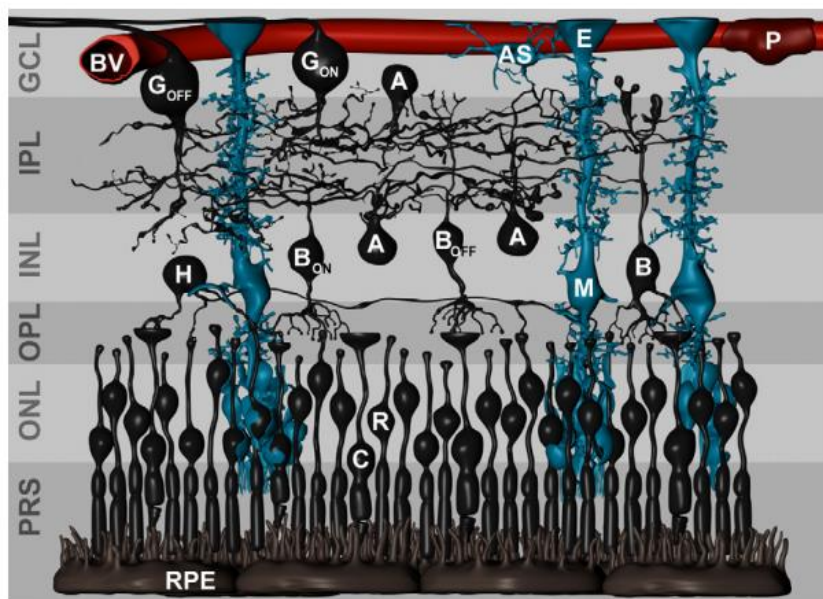


Figura 4: **Organização celular da retina de vertebrados.** Distribuição em camadas: camada de células ganglionares (GCL), camada plexiforme interna (IPL). A camada nuclear interna (INL) com células bipolares (B), horizontais (H), amácricas (A) e células de Muller (M). Camada plexiforme externa (OPL), camada nuclear externa (ONL) onde encontramos cones (C) e bastonetes (R). E camada de fotorreceptores (PRS). (BV) vasos sanguíneos, (Goff) células ganglionares tipo off; (Gon) células ganglionares tipo on; (As) astrócitos (BRINGMANN *et al*, 2009).

Algumas doenças que afetam outras regiões do SNC também podem afetar a retina, devido à origem embrionária comum dessas estruturas (BENAVENTE *et al*, 2001;MEAD *et al*, 2002;ONG *et al*, 2013). Em modelos experimentais de isquemia induzida pela oclusão da artéria cerebral média em ratos adultos, foi demonstrado que também ocorrem déficits retinianos e que estes dependem da severidade da lesão. Também foi demonstrado que o grau das lesões isquêmicas pode ser inferido pelos efeitos no eletroretinograma (ERG) (ALLEN *et al*, 2014). Em outro trabalho envolvendo retina e isquemia, LI e colaboradores (2009) demonstraram que durante o bloqueio da artéria carótida interna em camundongos C57BL/6N ocorre estresse oxidativo intenso que causa morte celular no tecido retiniano e esses danos podem ser atenuados com a utilização de substâncias antioxidantes como, por exemplo, a leutína.

2.3. ESTRESSE OXIDATIVO E RADICAIS LIVRES

A oxidação é um processo que ocorre naturalmente nos organismos multicelulares, mesmo em processos fisiológicos normais como a respiração celular (SALVADOR & HENRIQUES 2003). Na respiração celular, cerca de 2 a 5% de oxigênio reagem com vários compostos e produzem moléculas altamente instáveis conhecidas por radicais livres (RL) (ANTUNES-NETO *et al*, 2005; NIFOROU *et al*, 2014). Os RL são principalmente produzidos na mitocôndria, através da fosforilação oxidativa (BALABAN *et al*, 2005).

Estes radicais possuem efeitos benéficos e importantes nas reações bioquímicas do organismo como, por exemplo, as espécies reativas de oxigênio que podem contribuir com mecanismos de transdução de sinal, transcrição genética e a regulação da atividade da guanilato ciclase solúveis. Além disso, as espécies reativas de nitrogênio como o óxido nítrico (NO), podem regular o relaxamento das células dos músculos lisos vasculares e também podem induzir a sua proliferação (DEORA *et al*, 2000).

O problema começa, quando a quantidade de RL está muito elevada no organismo, excedendo suas defesas, numa condição conhecida por estresse oxidativo (DROGE 2002; VARA & PULA 2014). O estresse oxidativo pode ocasionar vários danos celulares como o aumento da peroxidação lipídica e degradação de moléculas-chave como enzimas, carboidratos e DNA. (DO NASCIMENTO *et al*, 2008).

Entre os RLs destacam-se as espécies reativas de oxigênio (EROs) que se distribuem em dois grupos: os radicalares como hidroxila ($\text{HO}\cdot$), superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), peroxila ($\text{ROO}\cdot$) e alcoxila ($\text{RO}\cdot$); os não-radicalares que incluem o oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso (FERREIRA *et al*, 1997; BARREIROS *et al*, 2006); as espécies reativas de nitrogênio, como o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$) (SALVADOR & HENRIQUES 2003) ver Figura 5.

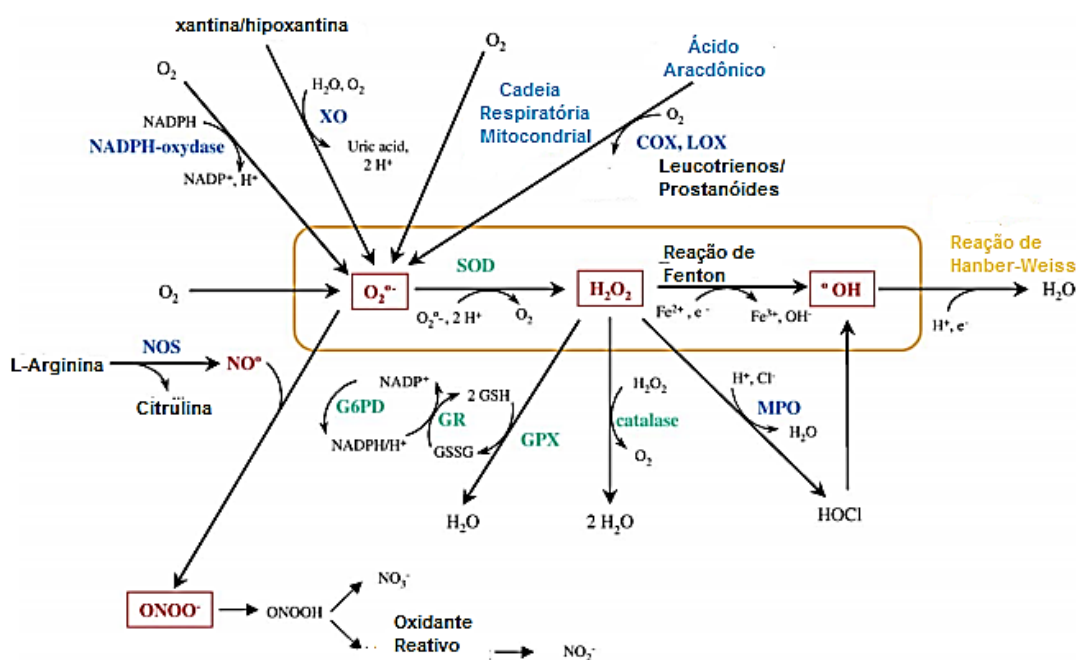


Figura 5: **Principais Fontes de Radicais Livres:** O radical superóxido é produzido principalmente por: (1) via metabólica do ácido araquidônico, (2) cadeia respiratória mitocondrial, (3) oxidação da xantina e hipoxantina pela xantina oxidase e (4) de NADPH-oxidase. Ao reagir com o óxido nítrico, RL forma peroxinitrito ou pode ser degradado pela superóxido dismutase produzindo peróxido de hidrogênio. O Peróxido pode então (1) ser catabolizado pela catalase ou peroxidase da reação da glutaciona, (2) reagir com Fe^{2+} para formar radical hidroxila através a reação de Fenton ou (3) ser degradada pela mieloperoxidase, outra fonte de radicais hidroxila. COX (ciclooxigenase); G6PD (glicose-6-fosfato-desidrogenase), a GSH (glutaciona reduzida), GR (glutaciona-redutase), GPX (glutaciona peroxidase) a GSSG (glutaciona oxidada), LOX (lipoxigenase); MPO (mieloperoxidase), adaptado de (MARGAILL *et al*, 2005).

A produção de EROs pode ser estimulada por hipóxia tecidual, como verificado no hipocampo de ratos submetidos à privação de oxigênio e glicose (POG) *in vitro*, induzindo estresse oxidativo e morte celular (SIQUEIRA *et al*, 2004). A geração de EROs se inicia através da formação de superóxido que, posteriormente, é reduzido formando peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e água (GANDHI & ABRAMOV 2012). Esses reagentes intermediários interagem com outras moléculas formando EROs secundárias como as provenientes da peroxidação lipídica, ácido sulfônico e disulfeto (SINGAL *et al*, 2011).

A produção de espécies reativas está associada com o processo natural de envelhecimento e com inúmeras doenças do SNC e doenças neurodegenerativas

como Alzheimer, Parkinson e o AVC (MATTSON *et al*, 2008;MANGIALASCHE *et al*, 2009;WANG & MICHAELIS 2010). Tendo em vista a importância clínica do combate aos radicais livres, analisamos no presente trabalho o potencial de agentes antioxidantes extraídos de produtos naturais da Amazônia para combater os efeitos das ERO em cultura hipóxica de células de retina de embrião de galinha.

2.4. SISTEMA DE DEFESAS ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes são compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos do estresse oxidativo. Antioxidante é qualquer substância que, em baixas concentrações, atrasa ou inibe significativamente a oxidação dos sistemas biológicos (BARREIROS *et al*, 2006).

Essas defesas antioxidantes compreendem variedade de substâncias que podem atuar em diferentes níveis de proteção de células e tecidos, impedindo a formação ou permitindo o sequestro dos radicais livres (SIES & STAHL 1995). Atuando desta forma, os antioxidantes podem evitar, por exemplo, a degradação do DNA, diminuir a peroxidação lipídica, prevenir contra a incidência de alguns tipos de câncer, além de doenças cardíacas isquêmicas e catarata (SUN *et al*, 2008).

Esses compostos podem ser classificados como: 1) antioxidantes enzimáticos e 2) antioxidantes não enzimáticos. Em geral, a proteção endógena do organismo é feita por antioxidantes enzimáticos que compreendem num conjunto de enzimas complementares como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (SIES & STAHL 1995). Estas enzimas atuam, respectivamente, contra o radical superóxido e contra o peróxido de hidrogênio (SIES 1993).

Estas enzimas tentam equilibrar o estado redox da célula. Assim, quando ocorre um desbalanço provocado pelo aumento da produção de oxigênio reativo (O_2^-) na mitocôndria através da fosforilação oxidativa, essas enzimas são ativadas. Primeiramente, ocorre ativação de superóxido dismutase mitocondrial com ligação de manganês (Mn-SOD) e, em seguida, ocorre a ativação de superóxido dismutase citosólica com ligação de cobre e zinco (Cu / Zn-SOD) para a conversão de O_2^- em H_2O_2 . Esta espécie reativa formada pode ser eliminada pelas células através das

reações catalisadas por enzimas como catalase (CAT) e glutathiona peroxidase, que convertem H_2O_2 em água (figura 5) (MATTSON *et al*, 2008). O H_2O_2 também é uma fonte importante para a produção de outros radicais como o radical hidroxila ($OH\cdot$), que em quantidade excessiva na célula pode ocasionar peroxidação lipídica (MARGAILL *et al*, 2005) Portanto, é importante fortalecer as defesas antioxidantes endógenas a fim de restabelecer o equilíbrio redox da célula com antioxidantes não enzimáticos.

Alguns produtos naturais possuem compostos antioxidantes não enzimáticos como o α -tocoferol, β -caroteno, vitamina C, flavonoides entre outros (MISHRA & TIWARI 2011). Estes compostos são sequestradores de EROs, bloqueando a etapa de inicialização da cadeia radicalar, ou impedindo a sua formação (RAMALHO & JORGE 2006). Isso acontece quando o hidrogênio de um antioxidante é abstraído por um radical livre, formando espécies inativas que não possuem a capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas (DUARTE-ALMEIDA *et al*, 2006). As ações antioxidantes de substâncias extraídas de plantas da Amazônia são candidatas promissoras para o combate ao estresse oxidativo induzido por AVCi e, conseqüentemente, podem promover Neuroproteção das células localizadas na área de penumbra isquêmica.

2.4.1. ANTIOXIDANTES NATURAIS E NEUROPROTEÇÃO

Os antioxidantes naturais, ou compostos essenciais presentes nos micronutrientes de plantas como os polifenóis, RRR- α -tocoferol e carotenóides atuam respectivamente contra o aumento da peroxidação lipídica sobre o oxigênio reativo, radical peróxil ou alcóxil e outros compostos produzidos por fotoexcitação (SIES & KRINSKY 1995; KRINSKY *et al*, 2003).

Os polifenóis destacam-se entre os antioxidantes naturais e podem ser classificados em flavanóides e não-flavanóides (FERRAZZANO *et al*, 2011). Os flavanóides são metabólicos secundários presentes nas plantas, possuindo a fórmula C₆-C₃-C₆ constituída por dois anéis aromáticos em sua estrutura química (Figura 6) e desempenham várias funções benéficas ao organismo (FRAGA *et al*, 2010).

Estes compostos apresentam deficiência natural de elétrons e são doadores de hidrogênios, sendo portanto muito reativos e com uma grande capacidade antioxidante que pode ser regulada por diferenças pequenas na sua estrutura química (HAVSTEEN 2002). Dentre essas diferenças, constam as variações dos tipos e grupos químicos em seus anéis aromáticos, da posição dos grupos hidroxilas e de sua capacidade de receber elétrons desemparelhados de moléculas e/ou radicais (RODRIGUES *et al*, 2006; SCHAUSS *et al*, 2006; SUN *et al*, 2008; AMIC *et al*, 2014). E essas variações podem influenciar sua adsorção pelas células ou sua penetração na membrana plásmática (OLLILA *et al*, 2002).

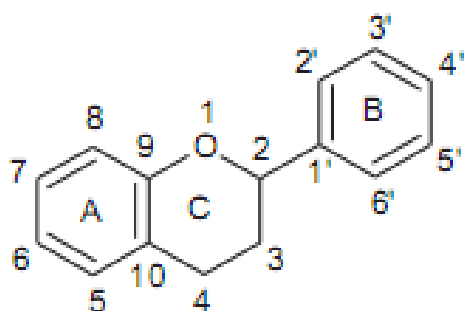


Figura 6: Estrutura química dos flavonoides. FRAGA *et al*, 2010

Os flavanóides podem desempenhar papel importante na prevenção de doenças cerebrovasculares, na modulação de processos inflamatórios, na inibição da agregação plaquetária, na prevenção e progressão do câncer (CHIN *et al*, 2008). Além disso, contribuem para a melhora da aprendizagem e memória espacial, como foi observado em ratos jovens quando submetidos a uma dieta suplementada com 8,7 mg ou 17,4 mg de flavonoides por dia durante 3 semanas (RENDEIRO *et al*, 2014). Também ajudam a prevenir a neurodegeneração associada à doenças de Parkinson, doença de Alzheimer e contribuir com a melhora do fluxo sanguíneo prevenindo os danos provocados por AVCi (FLORIAN *et al*, 2006; SPENCER *et al*, 2009; GUTIERREZ-MERINO *et al*, 2011).

Extratos contendo grande quantidade de polifenóis, como os presentes no extrato de uva, podem diminuir a neurotoxicidade gerada por excesso de glutamato em meio de culturas de células do hipocampo de camundongos (NARITA *et al*, 2011). Esta proteção está associada à afinidade dos polifenóis com os alvos moleculares que atuam contra a excitotoxicidade gerada pelo glutamato (JANG *et al*, 2013; LEE *et al*, 2013).

O Extrato etanólico da espécie vegetal *Gynostemma pentaphyllum*, erva muito encontrada nos países Asiáticos, apresentam flavonoides em sua composição química (TSAI *et al*, 2010), que podem atuar como antioxidante, induzindo o aumento da expressão das enzimas glutathione redutase e superóxido dismutase. Estas enzimas combatem os danos induzidos por hipóxia em modelo experimental de privação de oxigênio e glicose (POG) em culturas primárias de astrócitos e em fatias hipocâmpais de ratos da linhagem *Wistar* (SCHILD *et al*, 2012).

Compostos isolados de plantas podem potencializar os efeitos neuroprotetores contra danos isquêmicos. ArunaDevi e colaboradores (2010) mostraram que o composto 5,7,3',4',5'-penta-dihidroflavanol-3-O-(2''-O-galloyl)- β -D-glucopiranosido (AP1), um polifenol proveniente do extrato de *Anogeissus pëndulos*, pode reduzir o volume da área de infarto, diminuir o edema da área de lesão no tecido nervoso e reduzir a peroxidação lipídica em modelo experimental de isquemia focal transiente do córtex cerebral de ratos adultos. Este composto também apresentou ação antioxidante em testes *in vitro* de cultura de células de neuroblastoma Neuro2A.

A utilização ampla e o potencial antioxidante dos flavonoides extraídos de plantas, especialmente a subclasse flavana, motivou nosso grupo de trabalho a avaliar as propriedades protetoras do composto 4',7-diidroxiflavan-3,3-dimetilalil (brosimsina b) proveniente da *Brosimum acutifolium* subsp *acutifolium* em modelo experimental *in vitro* de hipóxia em culturas de células retinianas.

2.5. A FLAVANA EXTRAÍDA DA ESPÉCIE *Brosimum acutifolium*

2.5.1. Caracterização da planta *Brosimum acutifolium* (Huber) Ducke

Brosimum acutifolium (Huber) Ducke é uma espécie pertencente ao gênero *Brosimum*, família Moraceae, ordem Rosales (figura 7). É uma planta com distribuição ampla no mundo (ROMANIUC-NETO *et al*, 2014). No Brasil, é distribuída amplamente em todo território nacional, sendo a *Brosimum acutifolium* *subsp acutifolium* (Huber) Ducke encontrada principalmente no Maranhão, Mato Grosso, Acre, Amazonas e Pará. É conhecida popularmente como mururé da terra-firme ou mercúrio vegetal. É uma planta arbórea que possui cerca de 40 metros de altura, encontrada em hábitat de terra-firme não inundáveis (TORRES *et al*, 2000;ROMANIUC-NETO *et al*, 2014).



Figura 7: ***Brosimum acutifolium***. Fotografia mostrando um ramo com folhas da espécie vegetal. (COUTO,2013).

Na região amazônica, esta planta é usada popularmente como anti-inflamatório e antirreumático (TEIXEIRA *et al*, 2000 apud PASSOS, *et al.*, 1995). O mururé possui composição fitoquímica rica em flavanas como a flavana (4'-hidroxi-7,8-(2,2-dimethylpiran) e a brosimina b (4',7-dihidroxi-8-(3,3-dimetilalil)flavana) (TORRES *et al*, 1997;COUTO 2013). Também já foram isoladas outras flavanas obtidas da casca do caule da planta como a 4,7-dihidroxi-8-prenilflavana (TORRES *et al*, 2000) e acutifolin A,B,C,D,E e F (TAKASHIMA & OHSAKI 2001;HU *et al*, 2008). Esta espécie vegetal também possui compostos pertencentes a outras classes como

chalconas (SHIROTA *et al*, 1998), terpenos, cumarina e lignanas (MORETTI *et al*, 2006).

A presença de grande quantidade de flavonoides nesta espécie de planta tem gerado vários questionamentos sobre os efeitos destes compostos em sistemas biológicos, principalmente por que a subclasse das flavanas podem contribuir na proteção aos danos oriundos de estresse oxidativo assim como os danos consequentes à inflamação. Em modelo experimental de cultura de macrófagos de camundongos tratados com S1, esta molécula apresentou importante ação anti-inflamatória quando as células foram estimuladas por lipopolisacarídeo (LPS) e interferon gamma (IFB-y), inibindo a produção de óxido nítrico e a diminuição de citocinas pró-inflamatórias (MORAES 2013).

O composto Brosimina b extraído da planta *Brosimum acutifolium* (Huber) Ducke também apresentou atividade antioxidante contra a produção excessiva de oxigênio reativo induzido por processos inflamatórios em modelo experimental *in vitro* (COUTO 2013) e em concentrações elevadas apresentou atividade anticancerígena *in vitro* (MAUES 2013). Por sua ação antioxidante, o composto Brosimina b tornou-se um promissor candidato à combater o estresse oxidativo provocado por AVCi.

Entretanto, são necessários mais estudos para qualificar e quantificar a atividade antioxidante dos compostos da planta *Brosimum acutifolium*, principalmente relacionados a flavana 4',7-diidroxi-8-3,3-dimetilalil)flavana (Figura 8), bem como os possíveis efeitos antioxidantes e neuroprotetores da Brosimina b em modelos experimentais de lesão no sistema nervoso central.

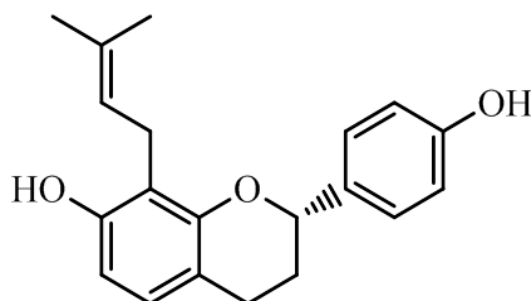


Figura 8: **Estrutura Molecular química da brosimina b.** Extraída da subespécie vegetal *Brosimum acutifolium* (Huber) Ducke. Fonte Torres *et al*, 2000.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito protetor do composto brosimina b, isolada de *Brosimum acutifolium subsp acutifolium*(Huber) Ducke, em cultura de células retinianas de embrião de galinha em modelo experimental de hipóxia induzida por privação de oxigênio e glicose.

3.2. Objetivos Específicos

- 1) Avaliar a capacidade antioxidante do composto brosimina b em sistema livre de células;
- 2) Avaliar a viabilidade celular de culturas de células da retina de embrião de galinha submetidas à hipóxia induzida por privação de oxigênio e glicose durante 3, 6 e 24 horas;
- 3) Avaliar a viabilidade celular de culturas retinianas de embrião de galinha após 24 hora de tratamento com diferentes concentrações de brosimina b;
- 4) Analisar a viabilidade das células da retina de embrião de galinha em culturas submetidas à hipóxia induzida por privação de oxigênio e glicose durante 3, 6 e 24 horas e tratadas com o composto brosimina b;
- 5) Avaliar o efeito antioxidante do composto brosimina b sobre a produção do radical livre ânion superóxido em culturas de células da retina embrionária de galinha submetidas à hipóxia durante 3, 6 e 24 horas;

- 6) Avaliar o efeito do tratamento com brosimina b sobre a resposta da atividade da enzima catalase em culturas de células da retina embrionária de galinha, submetidas à hipóxia durante 3, 6 e 24 horas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. OBTENÇÃO DO FLAVONÓIDE

O composto 4',7-diidroxí-8-(3,3-dimetilalil)flavana (brosimina b, figura 8) foi isolado por Couto (2013) e gentilmente cedido pelo Laboratório Central de Extração da Universidade Federal do Pará, sob a coordenação da Professora Dr^a. Mara Arruda.

Resumidamente, o material botânico da espécie *Brosimum acutifolium* subs. *acutifolium* foi coletado no município de Moju, Estado do Pará, identificado e registrado no herbário IAN da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) da Amazônia Oriental (exsicata de número 187036).

O composto foi isolado do extrato hidroalcoólico extraído das cascas do caule da espécie vegetal *B. acutifolium* subsp. *Acutifolium*, pelo método de cromatografia líquida de alta eficácia (CLAE), segundo metodologia descrita por Couto (2013).

5.2. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO COMPOSTO BROSIMINA B PELO SEQUESTRO DO RADICAL DPPH

Para avaliar a capacidade antioxidante do composto brosimina b, foi utilizada a técnica do sequestro do radical DPPH \cdot (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). O DPPH é um radical livre de coloração púrpura que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico. A atividade antioxidante é avaliada pela redução do radical DPPH formando difinenil-picril-hidrazina, um composto de coloração amarelada numa reação que é estabilizada após 30 minutos do seu início (BRAND-WILLIAMS *et al*, 1995; SOUSA *et al*, 2007). A redução pode ser acompanhada, portanto, pela diminuição nos valores de absorbância da solução que pode ser quantificada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 515 nm (BRAND-WILLIAMS *et al*, 1995).

O ensaio depende da preparação de uma curva-padrão de absorbância de DPPH, utilizando-se concentrações crescentes de brosimina b (1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 μ M), diluída em 99,5% dimetilsulfóxido (DMSO) e 99,8% metanol. Como padrão/controle para atividade antioxidante utilizou-se ácido ascórbico nas mesmas concentrações. Para o branco da reação, utilizamos metanol e para controles positivos brosimina b/metanol, DPPH/metanol e ácido ascórbico/metanol na concentração de 120 μ M.

A cada concentração de brosimina b ou ácido ascórbico acrescentou-se 180 μ L de DPPH (120 μ M) e após 30 min de reação as amostras foram analisadas em leitor de microplaca a 515 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em porcentagem de DPPH remanescente ([DPPH] $_{rem}$), %IC₅₀, % sequestradora de DPPH e % de atividade antioxidante (AA), determinados de acordo com Sousa *et al*, (2007).

5.3. CULTURAS PRIMÁRIAS MISTAS DE CÉLULAS DA RETINA EMBRIONÁRIA DE GALINHA

Os protocolos experimentais do presente trabalho foram submetidos à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação (CEPAE/UFPA; autorização nº 19314). O uso e os cuidados na manipulação dos animais seguiram as normas estabelecidas pela Society for Neuroscience (Handbook for Use of Animals in Neuroscience Research. Washington, D.C.: SfN, 1991. <http://www.sfn.org>).

Para a cultura primária de células da retina de embrião de galinha utilizamos ovos fertilizados de *Gallus gallus domesticus* (galinha), *White Leghorn*, cedidos pela empresa MAKARÚ LTDA, localizada na cidade de Ananindeua-PA. Estes ovos foram datados de acordo com os critérios de Hamburger e Hamilton (1951). Os ovos foram incubados a 37°C e utilizados no sétimo dia de estágio embrionário (E7) e as culturas foram preparadas como descrito previamente por do Nascimento e colaboradores (1998) (DO NASCIMENTO *et al*, 1998).

Em condições assépticas, os ovos foram banhados em etanol 70% e os embriões foram cuidadosamente retirados e levados para a câmara de fluxo laminar (linha 600/Pachene). Os globos oculares foram colocados em placa de petri contendo meio livre de cálcio e magnésio (CMF do acrônimo inglês *Calcium Medium Free*) a 4°C para serem enucleados e as retinas dissecadas.

As retinas foram transferidas para tubo de ensaio contendo tripsina 0,05%, diluída em Tampão Fosfato Salino (PBS do acrônimo inglês *Phosphate Buffered Saline*), para dissociação química durante 5 minutos em banho-maria à 37° C. Após a dissociação química, o tecido foi submetido à dissociação mecânica com sucessivas aspirações com o pipetador.

As células foram cultivadas em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) em placas de cultura de células de 24 poços, mantidas em estufa e com atmosfera constituída de 95% de ar e 5% de CO₂ a 37°C. As células cultivadas foram utilizadas após sete dias de cultivo (C7), período no qual apresentam uma monocamada contendo neurônios e células da glia.

5.4. MODELO DE HIPÓXIA *IN VITRO*

Induzimos hipóxia experimental *in vitro* adaptando o protocolo de Park *et al* (2011) por privação de oxigênio e glicose (POG). Para isso, as placas de culturas de células foram submetidas à meio de cultura DMEM sem FBS contendo baixa concentração de glicose (5.5 mM) (meio privado) e com privação de oxigênio (anoxia) por 3, 6 ou 24 horas. Para garantir a privação de oxigênio, as placas de cultura de células foram vedadas com fita adesiva (3M), impedindo assim a entrada de oxigênio proveniente da estufa de CO₂. Para as culturas de células controle (não submetidas a POG), utilizamos DMEM com glicose a 25 mM com 10% de FBS e as estas culturas não foram vedadas com a fita adesiva. Para avaliar o efeito da brosimina b durante a hipóxia, as culturas foram tratadas com 10µM do composto no momento do início da indução de hipóxia e cultivadas durante 3, 6 ou 24 h.

5.5. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DO MTT

A análise colorimétrica com *Thiazolil Blue Tetrazolium* (MTT) baseia-se na capacidade que as células viáveis apresentam em reduzir a forma oxidada do MTT à formazan, um composto de coloração azulada que pode ser quantificado por espectrofotometria (MOSMANN 1983).

Culturas controle (não hipóxicas) foram incubadas com ou sem brosimina b (1, 5, 10, 25, 50 ou 100 µM), diluída em DMSO (0,006%), por 24 h, enquanto que culturas hipóxicas foram incubadas com ou sem brosimina b (10 µM) por 3, 6 ou 24 h e a viabilidade celular de acordo com Mosmann (1983).

Após tratamentos, o meio de incubação foi descartado, as células lavadas com PBS e incubadas com 200 µl de MTT (0.5mg/ml) por 3 h. Posteriormente, as células foram homogeneizadas com DMSO para solubilizar os cristais de formazan (produto final da redução do MTT) e a análise colorimétrica foi realizada em leitor microplacas (Elx800/Biotek) à 570 nm, sendo o branco da reação 150 µl de DMSO.

5.6. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO INTRACELULAR DE ÂNION SUPERÓXIDO

Para determinar a produção intracelular de ânion superóxido, utilizamos o método de quantificação do *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT) adaptado de Choi *et al.* (2006). O NBT é um composto químico que apresenta coloração amarela que reage com oxigênio reativo ($O_2^{\cdot-}$) no meio intracelular. Durante esta reação, ocorre a redução do NBT em cristais de formazam que apresentam coloração púrpura. Estes cristais de formazam podem ser solubilizados na presença de hidróxido de potássio e DMSO para posterior quantificação em leitor de microplaca à leitura de luz com comprimento de ondas de 620 nm.

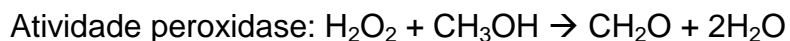
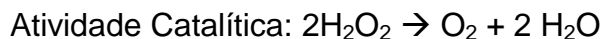
Após os diferentes períodos de hipóxia (3, 6 ou 24 h) e tratamento com brosimina b (10 μ M), as placas com culturas de células foram cuidadosamente lavadas com PBS e incubadas com meio POG (culturas hipóxicas) ou meio normal (culturas controle), contendo NBT (1 mg/ml) por 2h em estufa de CO_2 . Em seguida, o meio de incubação foi removido e as células foram novamente lavadas com PBS e lavadas com metanol. A membrana celular foi solubilizada com hidróxido de potássio a 2 M e os cristais de formazam foram solubilizados em DMSO a 99,5% e quantificados por espectrofotometria.

5.7. ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ENZIMA CATALASE

Após os diferentes períodos de hipóxia (3, 6 ou 24 h) e tratamento com brosimina b (10 μ M), as culturas de células foram lavadas duas vezes com PBS à 4 °C e o conteúdo intracelular obtido após ruptura das células por vibração sônica (10 segundos) em PBS. As amostras foram centrifugadas (mpw-350/MPW) a 14.000 G por 10 min a 4 °C e o sobrenadante retirado para análise da atividade da enzima e quantificação de proteína total.

Para quantificar a atividade da enzima catalase, utilizou-se o método indireto, medindo-se a atividade peroxidase dessa enzima. A catalase reage com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em meio alcoólico, produzindo aldeído e água. O aldeído gerado reage com o cromógeno 4-amino-3hidrazino-5-mercaptopurpald, formando um heterobiocíclico com aldeído em uma reação de oxidação. Esta reação gera uma coloração rosa proporcional à quantidade de aldeído formado pela atividade da catalase, o que pode ser determinado em espectrofotômetro a 540nm. Utilizamos como curva padrão diferentes concentrações de formaldeído (5 – 75 μ M).

Esquema da Atividade Peroxidativa da catalase:



5.8. DOSAGEM DE PROTEÍNA PELO MÉTODO DE BRADFORD

Os resultados obtidos pelo ensaio enzimático da catalase foram normalizados pelo conteúdo total de proteína presentes nas amostras e então expressos em micrograma por miligrama de proteína ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de *proteína*).

Os níveis totais de proteína foram quantificados pelo método de Bradford (1976) que se baseia na ligação do corante brilhante azul de comassie G-250 nas proteínas da amostra. Este corante livre, em condições ácidas, apresenta coloração avermelhada e quando se liga às proteínas presentes nas amostras torna-se estável e apresenta coloração azul. Esta mudança de coloração pode ser analisada por espectrofotometria a comprimento de onda de 595 nm.

O cromógeno azul brilhante de comassie G-250 (0,1 mg/mL), foi preparado em 5 % de etanol e 8,5 % de ácido fosfórico. Esta solução reagiu com 5 μl das amostras durante 2 min e então a absorvância foi determinada em leitor de microplaca. Utilizamos como curva padrão de absorvância concentrações conhecidas de albumina de soro bovino (BSA a 200, 250, 375, 500 e 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

5.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados descritivos foram expressos como média \pm desvio padrão ($n \geq 3$). Para análise estatística intragrupos e intergrupos experimentais utilizamos análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste Tukey. A significância estatística foi estabelecida em 0.05.

6. RESULTADO

6.1. MEDIÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE BROSIMINA B EM SISTEMA LIVRE DE CÉLULAS

Os resultados da avaliação da atividade antioxidante (AA) de soluções com diferentes concentrações (1, 5, 10, 25, 50, 100 e 120 μM) de ácido ascórbico (padrão) e de brosimina b, foram determinados pelo ensaio de DPPH. Nossos resultados demonstram que o composto brosimina b possui capacidade elevada de sequestro do radical DPPH, caracterizando uma AA também elevada (figura 9). Esta atividade é muito semelhante a do padrão ácido ascórbico. Desta forma, a quantidade antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração inibitória (CI_{50}), assim quanto maior o sequestro deste radical pelo antioxidante menor será a CI_{50} e maior a %AA.

O CI_{50} foi calculado através da correlação entre a porcentagem de DPPH remanescente (%DPPH) e as concentrações de brosimina b e ácido ascórbico (figura 10). Obtendo-se IC 50% de 55,16 μM para a brosimina b e 36,91 μM para o ácido ascórbico. O resultado deste ensaio indica que as concentrações de 1, 5, 10, 25, 50 e 100 μM podem ser utilizadas em nosso modelo experimental para avaliar a citotoxicidade e a concentração de 10 μM para avaliar a atividade neuroprotetora contra POG.

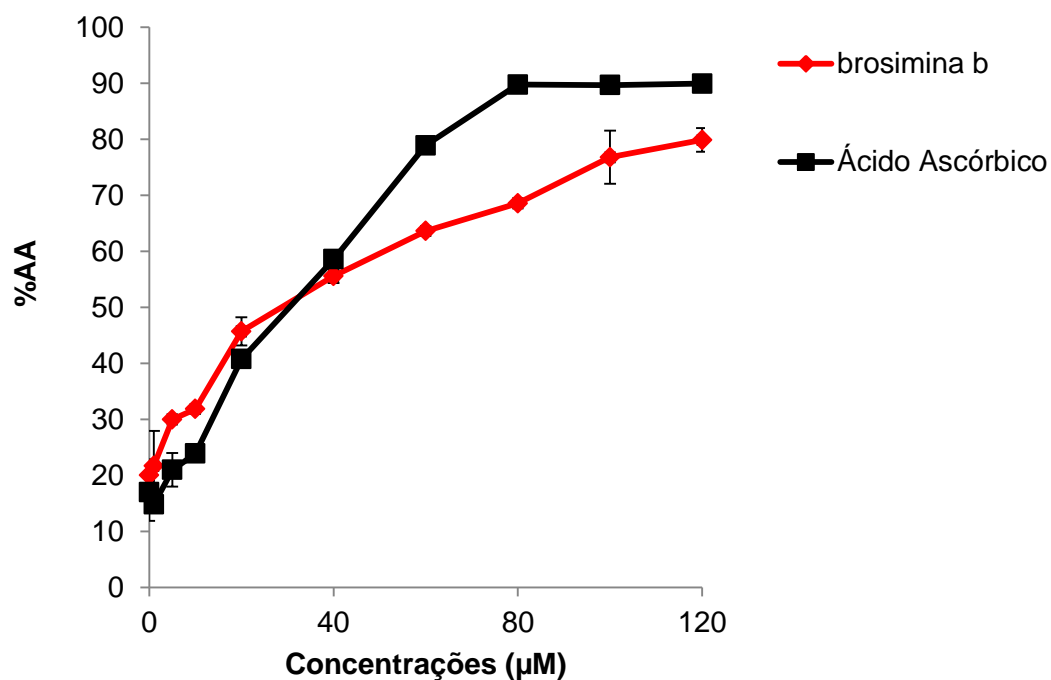


Figura 9: **Atividade antioxidante do composto brosimina b:** Porcentagem de atividade antioxidante da brosimina b pelo sequestro do radical DPPH. A linha preta representa a curva de atividade antioxidante do ácido ascórbico e linha vermelha representa a curva de atividade antioxidante do composto brosimina b. As concentrações utilizadas foram 0, 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 µM. A leitura em foi realizada após 30 min do início da reação. * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA, teste Tukey).

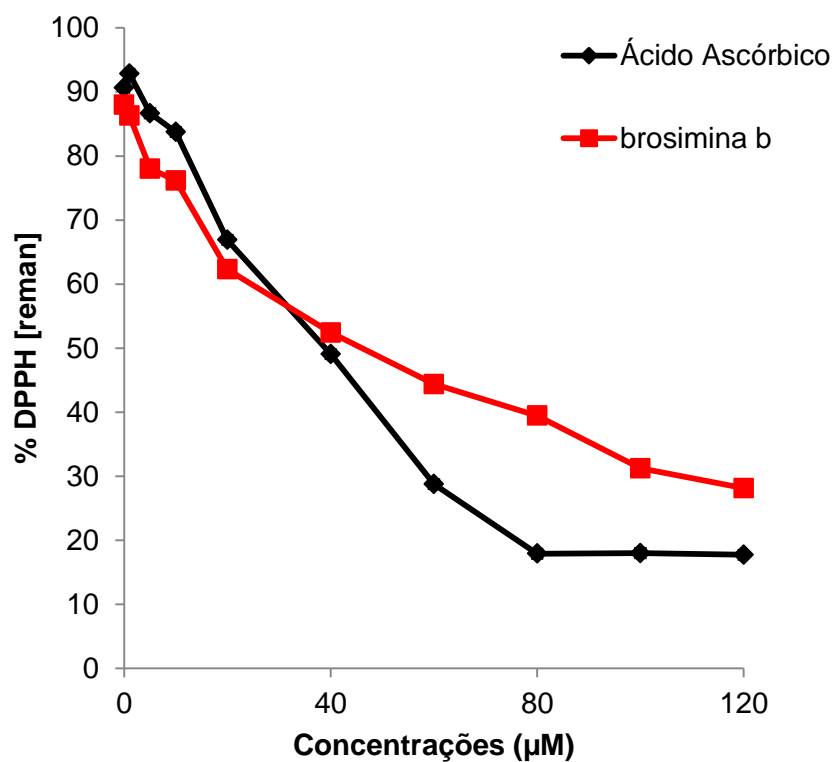


Figura 10: **Comportamento cinético da flavana brosimina b frente ao DPPH.** A linha preta representa a curva cinética do ácido ascórbico e a linha vermelha representa a curva cinética da flavana brosimina b. * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA, teste Tukey).

6.2 INDUÇÃO DE HIPÓXIA *IN VITRO* POR PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE

Nossos resultados mostram que as culturas mistas de células da retina de embrião de galinhas submetidas ao protocolo experimental *in vitro* de POG, , sofreram redução da viabilidade celular, e que esta redução é dependente do tempo de exposição à hipóxia. Nos tempos de 3, 6 e 24 h, observamos redução da viabilidade celular, respectivamente, quando comparamos com culturas de células controles (figura 11). Nossos resultados demonstram que o protocolo experimental de hipóxia por POG diminuiu a viabilidade celular nos diferentes intervalos de tempo. Portanto, assumimos que as condições experimentais *in vitro* mimetizam a privação de oxigênio e glicose que acontece durante um evento isquêmico *in vivo*.

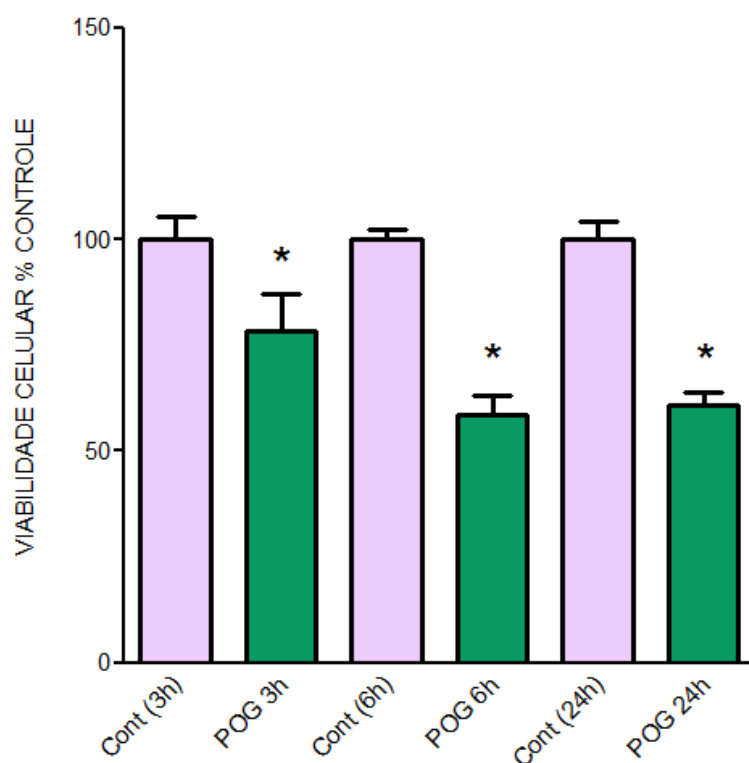


Figura 11: **Viabilidade Celular:** Redução da viabilidade celular em culturas de células retinianas de embrião de galinha (E7/C7) submetidas à hipóxia pela privação de oxigênio e glicose com 3, 6 ou 24 h de exposição ao meio de cultura privado. As barras lilás representam as culturas de células controles nos respectivos intervalos de tempo. As barras verdes representam as culturas de células submetidas ao protocolo experimental *in vitro* de hipóxia. * $p < 0,05$ vs controle e 3h de hipóxia (ANOVA, pós-teste Tukey).

6.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR APÓS TRATAMENTO COM BROSIMINA B

Avaliamos a viabilidade celular das culturas de células submetidas a diferentes concentrações de 1, 5, 10, 20, 25, 50 e 100 μM de brosimina b (Bb) dissolvidos no meio de cultura DMEM com alta glicose sem suplementação de FBS . Estas concentrações foram baseadas nos resultados obtidos a partir dos nossos resultados experimentais de IC 50% do composto. Nossos resultados mostram que o tratamento com a concentração de 10 μM de brosimina b em cultura de células retinianas promove aumento significativo na viabilidade celular quando comparado as concentrações de 25, 50 e 100 μM desta flavana, estas concentrações tornam-se citotóxicas, reduzindo a viabilidade celular em aproximadamente 90% (figura 12).

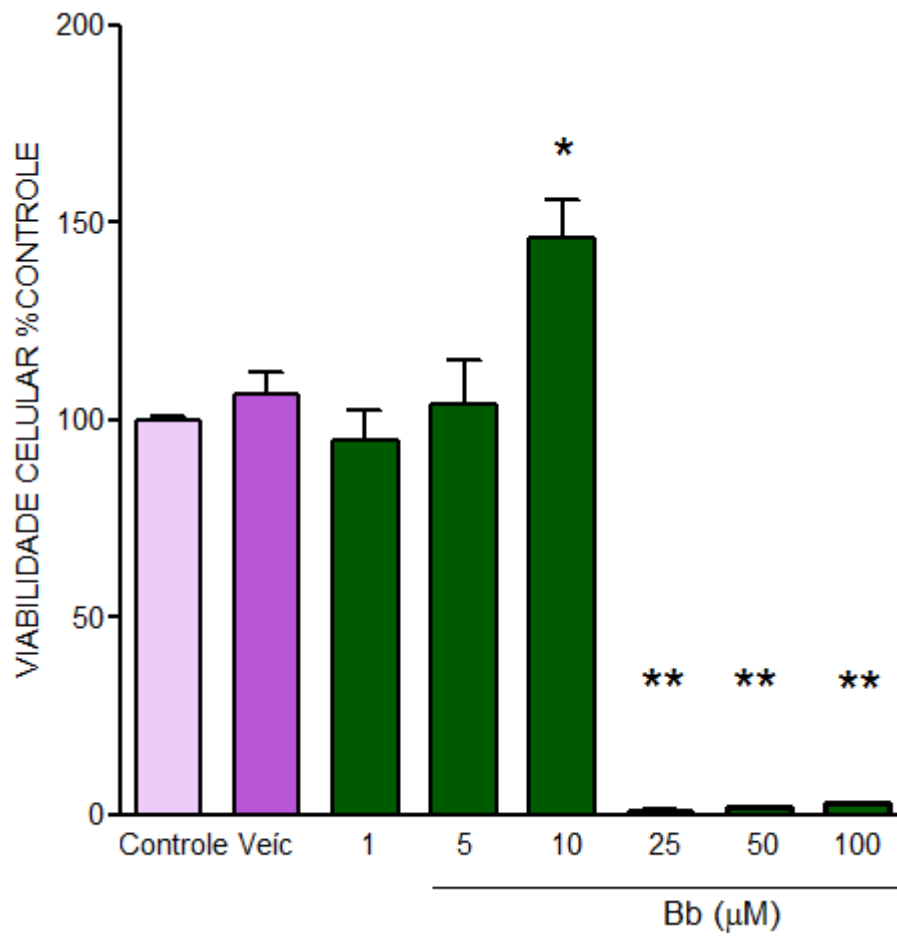


Figura 12: **Viabilidade celular ao tratamento com concentrações crescentes de brosimina b**: O efeito do tratamento com concentrações crescentes da flavana brosimina b (1, 5 e 10, 25, 50 e 100 μM) em culturas mistas de células retinianas de embrião de galinha (E7) durante 24h em meio DMEM. Note que a partir da concentração 25 μM de tratamento, a viabilidade celular se aproxima de zero. * $p < 0,05$ vs controle, F: 4,390 (ANOVA, pós-teste tukey).

6.4 EFEITO PROTETOR DA BROSIMINA B EM CULTURAS RETIANAS SUBMETIDAS A HIPÓXIA

A partir dos nossos resultados experimentais da viabilidade celular à diferentes concentrações de brosimina b, utilizamos a concentração de 10 μ M para tratar as cultura de células que estavam sendo submetidas a hipóxia *in vitro* por PGO durante 3,6 e 24h. Também utilizamos culturas-controle com DMEM, glicose (25 mM), 10% de FBS e/ou veículo do composto brosimina b (DMSO 0.006%), que foram avaliadas nos mesmos tempos acima. Verificamos que houve redução de aproximadamente 30%, 40% e 50% da viabilidade celular, respectivamente, em relação as culturas-controle e veículo. O tratamento com 10 μ M de brosimina b promoveu proteção contra a morte celular provocada por 3h de hipóxia, aproximando a viabilidade a níveis basais (ver Figura 14). Após 6h de hipóxia, o tratamento com Bb promoveu aumento da viabilidade celular de aproximadamente 20%, em relação as células submetidas somente a 6h de POG. Após 24h de hipóxia, as células não foram protegidas contra a morte celular, mesmo quando tratadas com o composto Bb (Figura 14).

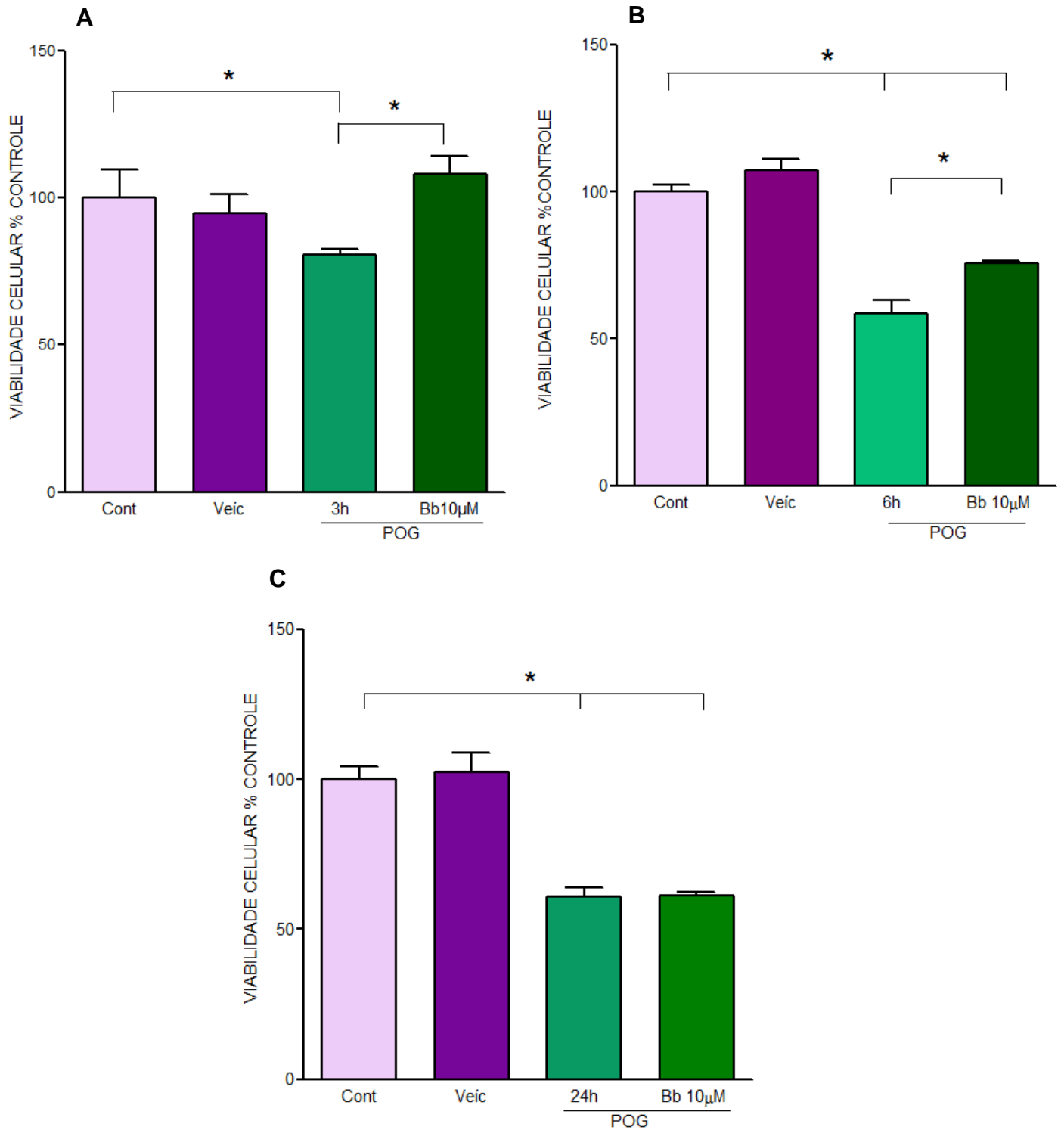


Figura 14: **A viabilidade celular, em condições de hipóxia *in vitro*, foi aumentada pelo tratamento com brosimina b:** Efeito protetor da brosimina b (Bb) contra danos promovidos por POG após (A) 3h, (B) 6h e (C) 24h. As barras representam os grupos experimentais: controle (barra lilás), veículo (barra roxa), POG (verde claro), POG+ Bb 10 m (Bb) (barra verde escuro). N=4, * $p < 0,01$, F: 12,31 vs controle e hipóxia 3h. (ANOVA, pós-teste tukey).

6.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE OXIGÊNIO REATIVO EM MODELO *IN VITRO* DE HIPÓXIA APÓS TRATAMENTO COM BROSIMINA B.

Para avaliarmos a quantidade de oxigênio reativo pelo método do NBT, após tratamento com 10 μ M de Bb em culturas retinianas submetidas a indução de hipóxia por POG, e em culturas controles. Nossos resultados demonstram que as culturas de células controle/veículo e Bb apresentam níveis baixos de oxigênio reativo que, por sua vez, se elevaram significativamente após 3, 6 e 24h de hipóxia. Nossos resultados mostram que as culturas submetidas a 3h de POG e tratadas com 10 μ M de brosimina b apresentaram redução do oxigênio reativo, mas essa redução não atingiu os níveis encontrados sob condições controle de cultura de células. Esta redução não foi observada após 6 e 24h de hipóxia (Figura 17).

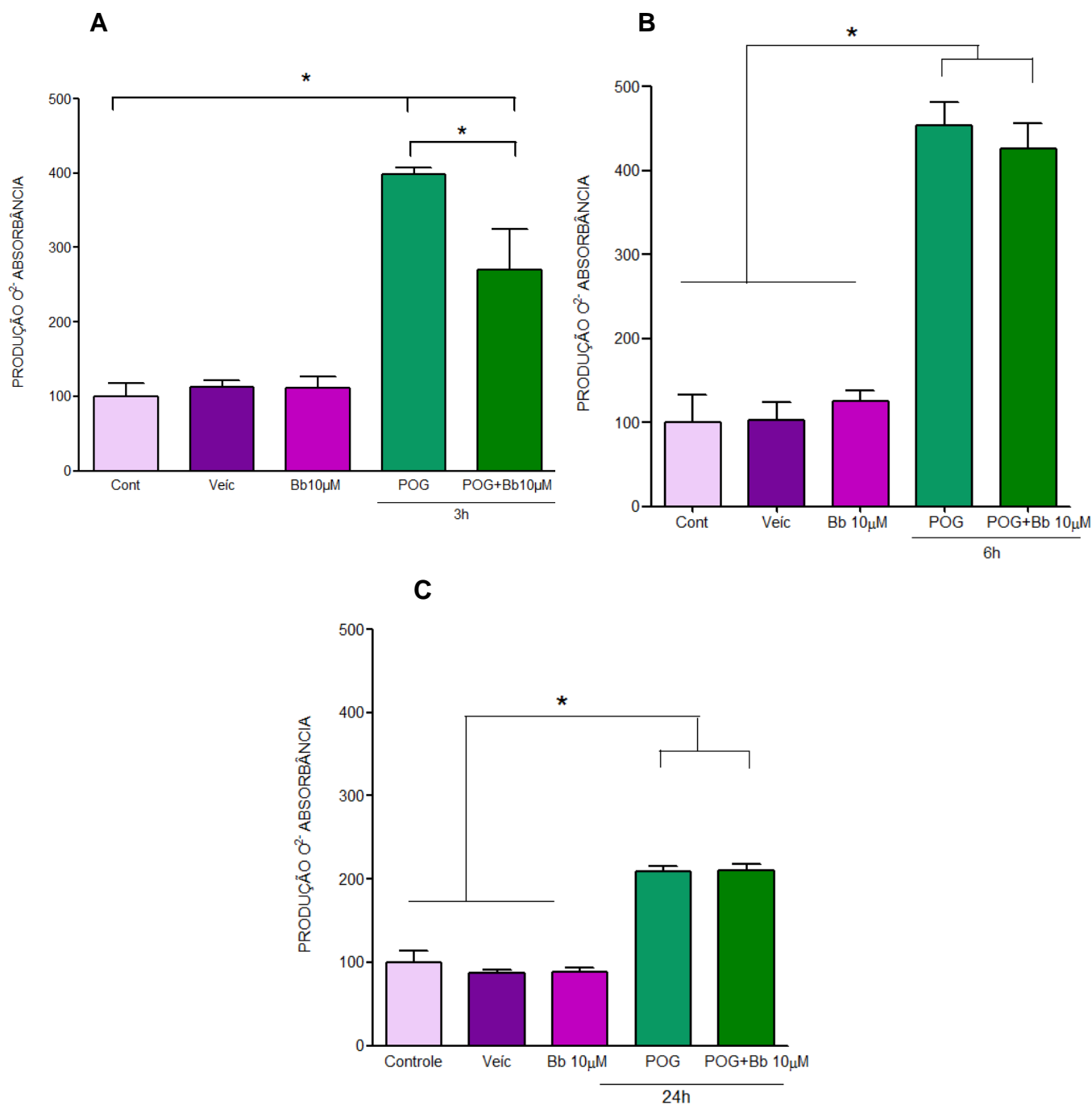


Figura 17: **Produção de Oxigênio Reativo:** Efeito do tratamento com brosimina b após 3, 6 ou 24 h de hipóxia experimental *in vitro* (A, B e C, respectivamente). As barras em diferentes tons de roxo representam as culturas de células controles, veículo e tratamento com brosimina b 10µM, respectivamente. As barras em diferentes tons de verde representam as culturas submetidas a 3h de POG e POG mais tratamento com brosimina b 10µM, respectivamente. N=4, *p< 0,01 vs controle e hipóxia 3h. F: 103,0 (ANOVA, pós-teste tukey).

6.6. ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ENZIMA CATALASE EM MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO* DE HIPÓXIA.

Avaliamos a atividade antioxidante da enzima catalase através da análise de sua ação peroxidativa, medindo a quantidade de formaldeído gerado quando as culturas de células foram submetidas a 3, 6 e 24h de hipóxia *in vitro* por privação de oxigênio e glicose (POG). Nossos resultados demonstram que após 3h de hipóxia, a atividade enzima catalase encontra-se significativamente reduzida. Entretanto, quando tratada com o composto brosimina b 10 μ M, ocorre aumento da atividade desta enzima que, por sua vez, permanece elevada após 6 e 24 h durante POG tratadas com brosimina b (Figura 20).

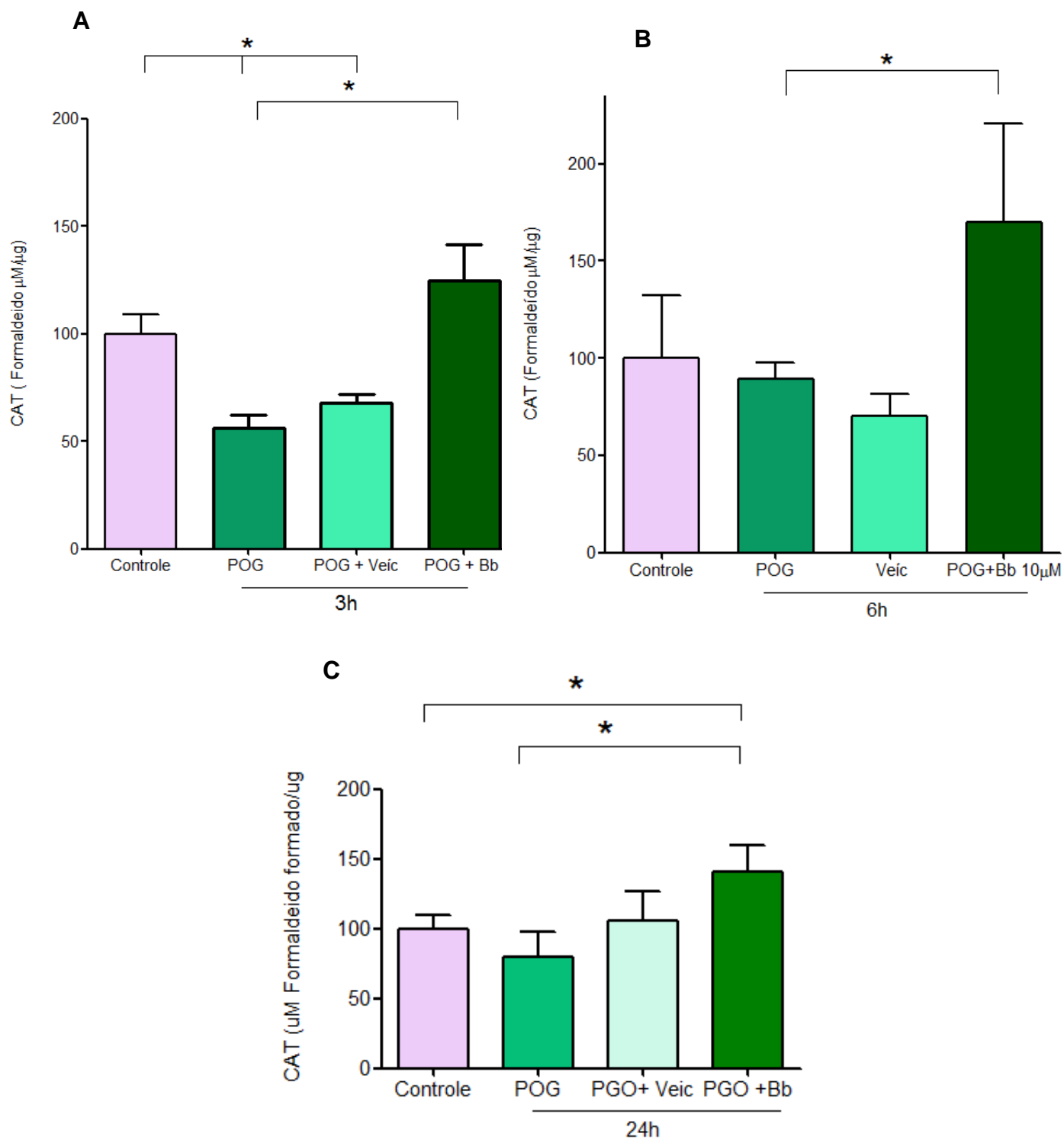


Figura 20: **Atividade da enzima catalase após hipóxia *in vitro***. Efeito do tratamento com brosimina b na atividade da enzima catalase após 3h de hipóxia. A barra lilás representa o controle, as barras em tons de verde representam, respectivamente, as culturas submetidas a 3h de POG e POG mais tratamento com 10µM de brosimina b, respectivamente. N=4, *p< 0,01 vs controle e hipóxia 3h, F: 26,6. (ANOVA, pós-teste tukey).

7. DISCUSSÃO

Após lesão isquêmica, a sobrevivência dos neurônios e das células da glia são ameaçada pela queda súbita na produção de energia (ATP), provocada pela privação de oxigênio e glicose, e por eventual reperfusão sanguínea promovida por vasos sanguíneos colaterais após o ponto de obstrução (HERTZ 2008). Dentre as várias alternativas que estão sendo estudadas para a proteção das células nervosas após isquemia tecidual, a utilização de produtos naturais parece ser uma das alternativas mais promissoras (LEE *et al*, 2012).

No presente trabalho, avaliamos o efeito protetor da flavana brosimina b (Bb), obtida a partir do extrato hidroalcolólico da casca da planta *Brosimum acutifolium subsp acutifolium*, em culturas de células retinianas de embrião de galinha submetidas às condições experimentais *in vitro* de hipóxicas induzida pela privação de oxigênio e glicose (POG).

Primeiramente, a atividade antioxidante da flavana Bb foi avaliada pelo método do DPPH (DUARTE-ALMEIDA *et al*, 2006) em sistema livre de células, utilizando como padrão comparativo o ácido ascórbico. Observamos que o composto apresenta perfil antioxidante semelhante ao do ácido ascórbico, uma antioxidante consagrado e largamente utilizado. Mostrando que ele realmente apresenta atividade antioxidante.

Misbah *et al* (2013), demonstram que o extrato bruto de *Ficus deltoidea*, uma planta pertencente à família *Moraceae*, muito usada para regular a quantidade de açúcar no sangue, possui compostos fenólicos capazes de sequestrar o radical DPPH, além de controlar os níveis glicêmicos em ratos diabéticos. Couto (2013), também demonstrou que as flavana Bb, e outros compostos presentes na *Brosimum acutifolium subsp acutifolium*, possuem atividade antioxidante elevada nas concentrações de 2, 5, 10 e 15 μ M.

Esses resultados demonstram que flavonoides, como o composto brosimina b, são doadores de hidrogênio e podem atuar como agentes antioxidantes e também apresentam efeito sobre a viabilidade celular em cultura de células (GARCIA *et al*, 2013; LAY *et al*, 2014; ZHANG *et al*, 2014). A família *Moraceae* é bem conhecida pelas suas propriedades antioxidantes, podem contribuir no combate de lesões

traumáticas e/ou bioquímicas no sistema nervoso central, como aqueles provenientes de lesão isquêmica, além de potencializar os efeitos do sistema de defesa antioxidante do organismo (FLORIAN *et al*, 2006; LEE *et al*, 2012; KHAN *et al*, 2013).

Um dos principais efeitos da hipóxia em cultura de células é a redução da viabilidade celular. No presente estudo, investigamos o efeito da POG na viabilidade celular de culturas mista de células retinianas de embrião de galinha. Nossos resultados demonstram que há redução da viabilidade celular após 3, 6 e 24 h de POG. Além disso, observamos que em 6 e 24h de POG, a viabilidade celular se estabiliza, desta forma, nossa hipótese é que em culturas mistas retinianas apresenta possível resposta proliferativa de células gliais que podem atuar como promotores de eventos neuroprotetores, combatendo assim a redução da viabilidade após 3 e 6h de POG, como demonstrado em nossos resultados.

Durante os primeiros 30 minutos de hipóxia, ocorre o esgotamento das reservas de oxigênio-glicose da célula, o que induz apoptose neuronal que pode progredir rapidamente se houver o prolongamento da duração do tempo da isquemia (WISE-FABEROWSKI *et al*, 2001; LIU *et al*, 2013).

Shelat (2013) demonstrou que durante a POG ocorre redução significativa da sobrevivência neuronal no decorrer do tempo de exposição, com queda acentuada da viabilidade celular a partir de 12 h. Este dano pode ser amenizado com a utilização do polímero F-68, que promoveu proteção dose-dependente contra a redução da viabilidade em culturas de neurônios do hipocampo.

A flavana Bb que utilizamos no presente trabalho apresenta características promissoras no combate a hipóxia no tecido nervoso. Em nosso modelo experimental, esta flavana não apresentou citotoxicidade na concentração de 10 μ M e foi capaz de aumentar significativamente a viabilidade celular (normoxia) em relação às culturas de células controle e veículo, sugerindo um possível efeito na proliferação celular. Entretanto, ainda são necessários ensaios citoquímicos para comprovar nossa hipótese. Em concentrações acima de 25 μ M (25, 50 e 100 μ M), a Bb apresentou citotoxicidade com queda na viabilidade celular das células da retina de embrião de galinhas cultivadas *in vitro*.

Uma das possibilidades de explicação de nossa hipótese é devido aos resultados de NONES e colaboradores (2012), que demonstraram que os flavonoides, como a hesperidina podem induzir proliferação celular com aumento de aproximadamente 41% da viabilidade celular em culturas primárias mistas tratadas por 24h com esse composto. Além disso, a hesperidina atua na proliferação de células da glia que, por sua vez, contribuem com a sobrevivência neuronal. Estes resultados, juntamente com os do presente trabalho, sugerem que os flavonoides podem ser usados como uma estratégia terapêutica viável no combate às doenças neurodegenerativas.

Em nosso trabalho, 10 μ M de Bb além de aumentar a viabilidade celular, protegeu as células submetidas a 3 e 6h de POG. Forouzanfar *et al* (2013), demonstraram que o pré-tratamento com extratos de romã aumentou a viabilidade celular em culturas de células PC12 após 6 e 12h de privação de glicose e BSA, aumentando as defesas antioxidantes.

A redução da viabilidade celular após exposição prolongada à POG (hipóxia) é acompanhada pelo aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs), provocando intenso estresse oxidativo no meio e, conseqüentemente, morte neuronal por prejudicar estruturas celulares imprescindíveis para a manutenção das células, por exemplo mitocôndrias e cromatina, ou provocar alterações na sinalização celular (SAITO *et al*, 2005). Estes danos estão presentes na região de penumbra isquêmica formada durante o AVCi e podem permanecer por dias ou semanas (HE *et al*, 2013). No presente trabalho replicamos, em nosso modelo experimental, o estresse oxidativo com aumento significativo de EROs como o oxigênio reativo após 3, 6 e 24h de hipóxia.

As EROs também ativam cascatas de sinalização causadoras de morte celular por apoptose (CHELLUBOINA *et al*, 2014). Assim, é importante controlar a produção de EROs na região de penumbra para preservação desse tecido. Uma das alternativas é a utilização de compostos naturais, que têm demonstrado cada vez mais sua viabilidade como agentes antioxidantes em vários sistemas corporais (MIURA *et al*, 2009; LORRIO, ROMERO, *et al*, 2013).

É relatado na literatura que compostos como os flavonoides podem combater o intenso estresse oxidativo em culturas de células em condições isquêmicas,, restabelecendo as defesas antioxidantes (WANG & MICHAELIS 2010; XU *et al*, 2012; FOROUZANFAR *et al*, 2013). Em nosso trabalho, a flavana Bb contribuiu no combate ao estresse oxidativo gerado após 3 horas de POG. Entretanto, essa flavana não foi eficiente em proteger contra a produção de oxigênio reativo pós 6 ou 24 h de POG. Desta forma, nossos resultados sugerem que após 6 horas de isquemia este composto deve estar atuando em outra via de sinalização celular, que não esteja ligada, necessariamente, ao estresse oxidativo. Ainda são necessários mais estudos referentes ao mecanismo de atuação deste composto.

As EROs são mediadores importantes em uma série de doenças neurodegenerativas, como por exemplo a doença de Alzheimer, desafiando as defesas antioxidantes naturais do organismo, como as enzimas glutathione peroxidase, catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). (VAKILI *et al*, 2014). Em nosso estudo a concentração de 10µM de Bb mostrou-se eficaz em promover o aumento da atividade da enzima catalase após 3, 6 e 24h de POG. ZITTA (2010) mostraram utilizando culturas de células HT-1080 (linhagem celular de fibrosarcoma) que durante tratamento com catalase, nas concentrações 12 e 120 U/ml durante 24h de hipóxia, a CAT reduziu os níveis de peróxido de hidrogênio combatendo o estresse oxidativo.

Outros compostos extraídos de plantas, como o ginsenosídeo Rd (GSRd) proveniente da planta *Panax ginseng*, também apresentam a propriedade de atenuar o estresse oxidativo e aumenta a atividade das enzimas antioxidantes, como a catalase, em culturas primárias de neurônios do hipocampo após 2h de POG, seguida por reoxigenação de 24h (YE *et al*, 2009). É importante compreender que ainda dispomos de poucas estratégias terapêuticas, logo o sucesso do tratamento de AVCi agudo continua sendo um dos grandes desafios da medicina clínica. No combate ao aumento dos níveis de EROs no tecido nervoso causado pela isquemia, uma das manobras mais importantes é reforçar as defesas antioxidantes intrínsecas do organismo. Os flavonoides podem contribuir para aumentar a eficiência dos antioxidantes endógenos, como a catalase (GUO *et al*, 2011).

Ademais, a ação antioxidante dessa flavana ainda é pouco conhecida, fazendo-se necessários mais estudos para a elucidação dos mecanismos biológicos e rotas de atuação bioquímicas intrínsecas que geram efeito cito protetor no tecido nervoso, principalmente para estratégias de tratamento e combate aos efeitos deletérios provocados por AVCi. Neste contexto, os compostos extraídos de produtos naturais, em especial o composto brosimina b, tornam-se atraentes para se desenvolver estratégia que sejam eficazes em promover Neuroproteção das células nervosas em sofrimento na zona de penumbra provocada por AVCi.

8. CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam que o composto 4',7-diidroxi-8-(3,3-dimetilalil)flavana (Brosimina b) protege, sob condições experimentais *in vitro*, as células retinianas de embriões de galinhas submetidas a condições hipóxicas (POG), provavelmente pelas suas propriedades antioxidantes intrínsecas e pela atuação na melhoria das defesas antioxidantes celulares endógenas. Esses achados são incentivos para a realização de estudos adicionais, em estratégias experimentais *in vivo*, com o objetivo de investigar a possibilidade de utilizar a Brosimina b para resgatar as células nervosas em sofrimento na zona de penumbra após AVCi.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, R. S., SAYEED, I., CALE, H. A. *et al.* Severity of middle cerebral artery occlusion determines retinal deficits in rats. Exp Neurol **254**: 206-215.2014.

AMIC, A., MARKOVIC, Z., DIMITRIC MARKOVIC, J. M. *et al.* Towards an improved prediction of the free radical scavenging potency of flavonoids: the significance of double PCET mechanisms. Food Chem **152**: 578-585.2014.

ANTUNES-NETO, J. M. F., SILVA, L. P. & MACEDO, D. V. Oxidative Stress Biomarkers: New Possibilities of Monitoring in Physical Training. Rev bras de Ciênc e Movimento **13**(3): 73-80.2005.

BAGETTA, G., MORRONE, L. A., ROMBOLA, L. *et al.* Neuropharmacology of the essential oil of bergamot. Fitoterapia **81**(6): 453-461.2010.

BALABAN, R. S., NEMOTO, S. & FINKEL, T. Mitochondria, oxidants, and aging. Cell **120**(4): 483-495.2005.

BARBOSA MDO, C., BOUSKELA, E., CYRINO, F. Z. *et al.* Effects of babassu nut oil on ischemia/reperfusion-induced leukocyte adhesion and macromolecular leakage in the microcirculation: observation in the hamster cheek pouch. Lipids Health Dis **11**: 158.2012.

BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M. & DAVID, J. P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. Química Nova **29**(1): 113-123.2006.

BASSETT, E. A. & WALLACE, V. A. Cell fate determination in the vertebrate retina. Trends Neurosci **35**(9): 565-573.2012.

BENAVENTE, O., ELIASZIW, M., STREIFLER, J. Y. *et al.* Prognosis after transient monocular blindness associated with carotid-artery stenosis. N Engl J Med **345**(15): 1084-1090.2001.

BOLAÑOS, J. P., ALMEIDA, A. & MONCADA, S. Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? Trends in Bioch Scien **35**(3): 145-149.2010.

BOLANOS, J. P., DELGADO-ESTEBAN, M., HERRERO-MENDEZ, A. *et al.* Regulation of glycolysis and pentose-phosphate pathway by nitric oxide: impact on neuronal survival. Biochim Biophys Acta **1777**(7-8): 789-793.2008.

BOUZIER-SORE, A. K. & PELLERIN, L. Unraveling the complex metabolic nature of astrocytes. Front Cell Neurosci **7**: 179.2013.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E. & BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Sci and Technol **28**(1): 25-30.1995.

BRETÓN, R. R. & RODRÍGUEZ, J. C. G. Excitotoxicity and Oxidative Stress in Acute Ischemic Stroke 2012.

BRINGMANN, A., PANNICKE, T., BIEDERMANN, B. *et al.* Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. Neurochem Int **54**(3-4): 143-160.2009.

CANDELARIO-JALIL, E. Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: considerations for the development of novel neurotherapeutics. Curr Opin Investig Drugs **10**(7): 644-654.2009.

CHELLUBOINA, B., KLOPFENSTEIN, J. D., GUJRATI, M. *et al.* Temporal regulation of apoptotic and anti-apoptotic molecules after middle cerebral artery occlusion followed by reperfusion. Mol Neurobiol **49**(1): 50-65.2014.

CHIN, Y. W., CHAI, H. B., KELLER, W. J. *et al.* Lignans and other constituents of the fruits of *Euterpe oleracea* (Acai) with antioxidant and cytoprotective activities. J Agric Food Chem **56**(17): 7759-7764.2008.

COUTO, N. M. G. (2013). AVALIAÇÃO CROMATOGRÁFICA E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS E FLAVANAS DA ESPÉCIE *Brosimum acutifolium* subs. *acutifolium* (MORACEAE)

Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Pará: 1-100.

DEORA, A. A., LANDER, H. M. & Role of Nitric Oxide and Other Radicals in Signal Transduction NITRIC OXIDE **1**(2): 251-263.2000.

DIRNAGL, U., IADECOLA, C. & MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. Trends Neurosci **22**(9): 391-397.1999.

DO NASCIMENTO, J. L., OLIVEIRA, K. R., CRESPO-LOPEZ, M. E. *et al.* Methylmercury neurotoxicity & antioxidant defenses. Indian J Med Res **128**(4): 373-382.2008.

DO NASCIMENTO, J. L., VENTURA, A. L. & PAES DE CARVALHO, R. Veratridine- and glutamate-induced release of [3H]-GABA from cultured chick retina cells: possible involvement of a GAT-1-like subtype of GABA transporter. Brain Res **798**(1-2): 217-222.1998.

DONNAN, G. A., FISHER, M., MACLEOD, M. *et al.* Stroke. Lancet **371**(9624): 1612-1623.2008.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev **82**(1): 47-95.2002.

DUARTE-ALMEIDA, J. M., R.J., S., M.I., G. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. Ciência e Tecnologia de Alimentos **26**(1): 446-452.2006.

FERRAZZANO, G. F., AMATO, I., INGENITO, A. *et al.* Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. Molecules **16**(2): 1486-1507.2011.

FERREIRA, A. L. A., MATSUBARA, L. S. & Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Revista da Associação Médica Brasileira **43**(1): 61-68.1997.

FISCHER, A. J. Neural regeneration in the chick retina. Prog Retin Eye Res **24**(2): 161-182.2005.

FLORIAN, T., NECAS, J., BARTOSIKOVA, L. *et al.* Effects of prenylated isoflavones osajin and pomiferin in premedication on heart ischemia-reperfusion. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub **150**(1): 93-100.2006.

FOROUZANFAR, F., AFKHAMI GOLI, A., ASADPOUR, E. *et al.* Protective Effect of Punica granatum L. against Serum/Glucose Deprivation-Induced PC12 Cells Injury. Evid Based Complement Alternat Med **2013**: 716730.2013.

FRAGA, C. G., GALLEANO, M., VERSTRAETEN, S. V. *et al.* Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. Mol Aspects Med **31**(6): 435-445.2010.

GANDHI, S. & ABRAMOV, A. Y. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. Oxidative Medicine and Cellular Longevity **1**(1): 1-11.2012.

GARCIA, G. X., LARSEN, S. W., PYE, C. *et al.*The functional group on (E)-4,4'-disubstituted stilbenes influences toxicity and antioxidative activity in differentiated PC-12 cells. Bioorg Med Chem Lett **23**(23): 6355-6359.2013.

GRUETTER, R.Glycogen: the forgotten cerebral energy store. J Neurosci Res **74**(2): 179-183.2003.

GUO, H., HU, L. M., WANG, S. X. *et al.*Neuroprotective effects of scutellarin against hypoxic-ischemic-induced cerebral injury via augmentation of antioxidant defense capacity. Chin J Physiol **54**(6): 399-405.2011.

GUTIERREZ-MERINO, C., LOPEZ-SANCHEZ, C., LAGOA, R. *et al.*Neuroprotective actions of flavonoids. Curr Med Chem **18**(8): 1195-1212.2011.

HALDER, S. K., MATSUNAGA, H., YAMAGUCHI, H. *et al.*Novel neuroprotective action of prothymosin alpha-derived peptide against retinal and brain ischemic damages. J Neurochem **125**(5): 713-723.2013.

HAVSTEEN, B. H.The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol Ther **96**(2-3): 67-202.2002.

HE, X., SANDHU, H. K., YANG, Y. *et al.*Neuroprotection against hypoxia/ischemia: δ -opioid receptor-mediated cellular/molecular events. Journal Cellular and Molecular Life Sciences **70**(13): 2291-2303.2013.

HEISS, W. D.The ischemic penumbra: how does tissue injury evolve? Ann N Y Acad Sci **1268**: 26-34.2012.

HERRERO-MENDEZ, A., ALMEIDA, A., FERNÁNDEZ, E. *et al.*The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. Nature Cell Biology **11**(6): 747-752.2009.

HERTZ, L.Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective. Neuropharmacology **55**(3): 289-309.2008.

HU, G., LIU, K. & WILLIAMS, L. J.The Brosimum allene: a structural revision. Org Lett **10**(23): 5493-5496.2008.

ITOH, Y., ESAKI, T., SHIMOJI, K. *et al.*Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4879-4884.2003.

JANG, J. Y., KIM, H. N., KIM, Y. R. *et al.* Hexane extract from *Polygonum multiflorum* attenuates glutamate-induced apoptosis in primary cultured cortical neurons. J Ethnopharmacol **145**(1): 261-268.2013.

JITTIWAT, J. & WATTANATHORN, J. Ginger pharmacopuncture improves cognitive impairment and oxidative stress following cerebral ischemia. J Acupunct Meridian Stud **5**(6): 295-300.2012.

KHAN, M. A., RAHMAN, A. A., ISLAM, S. *et al.* A comparative study on the antioxidant activity of methanolic extracts from different parts of *Morus alba* L. (Moraceae). BMC Res Notes **6**: 24.2013.

KHANNA, A., KAHLE, K. T., WALCOTT, B. P. *et al.* Disruption of ion homeostasis in the neurogliovascular unit underlies the pathogenesis of ischemic cerebral edema. Transl Stroke Res **5**(1): 3-16.2014.

KIM, J. Y., JEONG, H. Y., LEE, H. K. *et al.* Neuroprotection of the leaf and stem of *Vitis amurensis* and their active compounds against ischemic brain damage in rats and excitotoxicity in cultured neurons. Phytomedicine **19**(2): 150-159.2012.

KRINSKY, N. I., LANDRUM, J. T. & BONE, R. A. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. Annu Rev Nutr **23**: 171-201.2003.

LAKHAN, S. E., KIRCHGESSNER, A. & HOFER, M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. Journal of Translational Medicine **7**: 97.2009.

LAY, M. M., KARSANI, S. A., MOHAJER, S. *et al.* Phytochemical constituents, nutritional values, phenolics, flavonols, flavonoids, antioxidant and cytotoxicity studies on *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl fruits. BMC Complement Altern Med **14**: 152.2014.

LEE, J., HONG, Y. J., YANG, J. S. *et al.* Inhibitory effects of acorn extract on glutamate-induced calcium signaling in cultured rat hippocampal neurons. Biol Pharm Bull **36**(3): 331-338.2013.

LEE, J. J., YANG, H., YOO, Y. M. *et al.* Morusinol extracted from *Morus alba* inhibits arterial thrombosis and modulates platelet activation for the treatment of cardiovascular disease. J Atheroscler Thromb **19**(6): 516-522.2012.

LIU, D. M., WANG, Z. H., LIU, L. *et al.* Acetylpuerarin increases cell viability and reduces apoptosis in rat hippocampal neurons following oxygen-glucose deprivation/reperfusion. Mol Med Rep **8**(5): 1453-1459.2013.

LORRIO, S., GOMEZ-RANGEL, V., NEGREDO, P. *et al.* Novel multitarget ligand ITH33/IQM9.21 provides neuroprotection in in vitro and in vivo models related to brain ischemia. Neuropharmacology **67**: 403-411.2013.

LORRIO, S., ROMERO, A., GONZALEZ-LAFUENTE, L. *et al.* PP2A ligand ITH12246 protects against memory impairment and focal cerebral ischemia in mice. ACS Chem Neurosci **4**(9): 1267-1277.2013.

MANGIALASCHE, F., POLIDORI, M. C., MONASTERO, R. *et al.* Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. Ageing Res Rev **8**(4): 285-305.2009.

MARGAILL, I., PLOTKINE, M. & LEROUET, D. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. Free Radic Biol Med **39**(4): 429-443.2005.

MATTSON, M. P., GLEICHMANN, M. & CHENG, A. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. Neuron **60**(5): 748-766.2008.

MAUES, L. A. L. (2013). Avaliação da atividade antiproliferativa e antineoplásica de flavonoides da espécie *Brosimum acutifolium* em modelos de glioblastoma in vitro. Programa de Pós-Graduação em Neurociências em Biologia Celular, Universidade Federal do Pará: 1-100.

MEAD, G. E., LEWIS, S. C., WARDLAW, J. M. *et al.* Comparison of risk factors in patients with transient and prolonged eye and brain ischemic syndromes. Stroke **33**(10): 2383-2390.2002.

MEY, J. & THANOS, S. Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis. Brain Res Brain Res Rev **32**(2-3): 343-379.2000.

MISHRA, B. B. & TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. Eur J Med Chem **46**(10): 4769-4807.2011.

MIURA, S., ISHIDA-NAKAJIMA, W., ISHIDA, A. *et al.* Ascorbic acid protects the newborn rat brain from hypoxic-ischemia. Brain Dev **31**(4): 307-317.2009.

MORAES, W. P. (2013). Caracterização do mecanismo de ação antiinflamatória do flavonóide bas1 isolado da planta *brosimum acutifolium*. Programa de Pós-

Graduação em Neuroências e Biologia Celular, Universidade Federal do Pará: 1-100.

MORETTI, C., GAILLARD, Y., GRENAND, P. *et al.* Identification of 5-hydroxytryptamine (bufotenine) in takini (*Brosimumacutifolium* Huber subsp. *acutifolium* C.C. Berg, Moraceae), a shamanic potion used in the Guiana Plateau. J Ethnopharmacol **106**(2): 198-202.2006.

MOSKOWITZ, M. A., LO, E. H. & IADECOLA, C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. Neuron **67**(2): 181-198.2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.1983.

MOUSAVI, S. H., TAYARANI-NAJARAN, Z., ASGHARI, M. *et al.* Protective effect of *Nigella sativa* extract and thymoquinone on serum/glucose deprivation-induced PC12 cells death. Cell Mol Neurobiol **30**(4): 591-598.2010.

MULLER, M. S., FOX, R., SCHOUSBOE, A. *et al.* Astrocyte glycogenolysis is triggered by store-operated calcium entry and provides metabolic energy for cellular calcium homeostasis. Glia **62**(4): 526-534.2014.

NARITA, K., HISAMOTO, M., OKUDA, T. *et al.* Differential neuroprotective activity of two different grape seed extracts. PLoS One **6**(1): e14575.2011.

NIFOROU, K., CHEIMONIDOU, C. & TROUGAKOS, I. P. Molecular chaperones and proteostasis regulation during redox imbalance. Redox Biol **2**: 323-332.2014.

OLLILA, F., HALLING, K., VUORELA, P. *et al.* Characterization of flavonoid-biomembrane interactions. Arch Biochem Biophys **399**(1): 103-108.2002.

ONG, Y. T., DE SILVA, D. A., CHEUNG, C. Y. *et al.* Microvascular structure and network in the retina of patients with ischemic stroke. Stroke **44**(8): 2121-2127.2013.

PANDYA, R. S., MAO, L., ZHOU, H. *et al.* Central nervous system agents for ischemic stroke: neuroprotection mechanisms. Cent Nerv Syst Agents Med Chem **11**(2): 81-97.2011.

PARK, S. H., KIM, J. H., PARK, S. J. *et al.* Protective effect of hexane extracts of *Uncaria sinensis* against photothrombotic ischemic injury in mice. J Ethnopharmacol **138**(3): 774-779.2011.

PUYAL, J., GINET, V. & CLARKE, P. G. Multiple interacting cell death mechanisms in the mediation of excitotoxicity and ischemic brain damage: a challenge for neuroprotection. Progress in Neurobiology **105**: 24-48.2013.

RAMALHO, C. V. & JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. Química Nova **29**(4): 755-760.2006.

RANKIN, E. B., RHA, J., SELAK, M. A. *et al.* Hypoxia-inducible factor 2 regulates hepatic lipid metabolism. Mol Cell Biol **29**(16): 4527-4538.2009.

RAWAL, A., MUDDESHWAR, M. & BISWAS, S. Effect of *Rubia cordifolia*, *Fagonia cretica* linn, and *Tinospora cordifolia* on free radical generation and lipid peroxidation during oxygen-glucose deprivation in rat hippocampal slices. Biochem Biophys Res Commun **324**(2): 588-596.2004.

RENDEIRO, C., FOLEY, A., LAU, V. C. *et al.* A role for hippocampal PSA-NCAM and NMDA-NR2B receptor function in flavonoid-induced spatial memory improvements in young rats. Neuropharmacology **79**: 335-344.2014.

RODRIGUES, R. B., LICHTENTHALER, R., ZIMMERMANN, B. F. *et al.* Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (acai) seeds and identification of their polyphenolic compounds. J Agric Food Chem **54**(12): 4162-4167.2006.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, P., ALMEIDA, A. & BOLANOS, J. P. Brain energy metabolism in glutamate-receptor activation and excitotoxicity: role for APC/C-Cdh1 in the balance glycolysis/pentose phosphate pathway. Neurochem Int **62**(5): 750-756.2013.

ROMANIUC-NETO, S., CARAUTA, J. P. P., VIANNA, F.M.D.M. *et al.* (2014). "Moraceae " in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Retrieved 18. Fev, 2014, from <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB167>.

SAITO, A., MAIER, C. M., NARASIMHAN, P. *et al.* Oxidative stress and neuronal death/survival signaling in cerebral ischemia. Mol Neurobiol **31**(1-3): 105-116.2005.

SALVADOR, M. & HENRIQUES, J. A. P. Radicais Livres e a resposta celular ao estresse oxidativo.2003.

SCHAUSS, A. G., WU, X., PRIOR, R. L. *et al.* Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai). J Agric Food Chem **54**(22): 8604-8610.2006.

SCHILD, L., COTTE, T., KEILHOFF, G. *et al.*Preconditioning of brain slices against hypoxia induced injury by a *Gynostemma pentaphyllum* extract - Stimulation of anti-oxidative enzyme expression. Phytomedicine **19**(8-9): 812-818.2012.

SHIROTA, O., SEKITA, S., HIRAYAMA, H. *et al.*Two chalcone-prenylcoumarin diels-alder adducts from *Brosimum rubescens*. Phytochemistry **47**(7): 1381–1385.1998.

SIES, H.Strategies of antioxidant defense. Eur J Biochem **215**(2): 213-219.1993.

SIES, H. & KRINSKY, N. I.The present status of antioxidant vitamins and beta-carotene. Am J Clin Nutr **62**(6 Suppl): 1299S-1300S.1995.

SIES, H. & STAHL, W.Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. Am J Clin Nutr **62**(6 Suppl): 1315S-1321S.1995.

SINGAL, A. K., JAMPANA, S. C. & WEINMAN, S. A.Antioxidants as therapeutic agents for liver disease. Liver Int **31**(10): 1432-1448.2011.

SIQUEIRA, I. R., CIMAROSTI, H., FOCHESSATTO, C. *et al.*Age-related susceptibility to oxygen and glucose deprivation damage in rat hippocampal slices. Brain Res **1025**(1-2): 226-230.2004.

SOUSA, M. M. C., SILVA, R. H., VIEIRA-JR, M. G. *et al.*Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Revista Química Nova **30**(2): 351-355.2007.

SPENCER, J. P., VAUZOUR, D. & RENDEIRO, C.Flavonoids and cognition: the molecular mechanisms underlying their behavioural effects. Arch Biochem Biophys **492**(1-2): 1-9.2009.

STENKAMP, D. L. & CAMERON, D. A.Cellular pattern formation in the retina: retinal regeneration as a model system. Molecular Vision **8**(8): 280-293.2002.

SUN, A. Y., WANG, Q., SIMONYI, A. *et al.*Botanical phenolics and brain health. Neuromolecular Med **10**(4): 259-274.2008.

TAKASHIMA, J. & OHSAKI, A.Acutifolins A-F, a new flavan-derived constituent and five new flavans from *Brosimum acutifolium*. J Nat Prod **64**(12): 1493-1496.2001.

TORRES, S. L., ARRUDA, M. S., ARRUDA, A. C. *et al.* Flavonoids from *Brosimum acutifolium*. Phytochemistry **53**(8): 1047-1050.2000.

TORRES, S. L., MONTEIRO, J. C. M., ARRUDA, M. S. P. *et al.* TWO FLAVANS FROM *BROSIMUM ACUTIFOLIUM*. Phytochemistry **44**(2): 347–349.1997.

TSAI, Y. C., LIN, C. L. & CHEN, B. H. Preparative chromatography of flavonoids and saponins in *Gynostemma pentaphyllum* and their antiproliferation effect on hepatoma cell. Phytomedicine **18**(1): 2-10.2010.

VAKILI, A., SHARIFAT, S., AKHAVAN, M. M. *et al.* Effect of lavender oil (*Lavandula angustifolia*) on cerebral edema and its possible mechanisms in an experimental model of stroke. Brain Res **1548**: 56-62.2014.

VARA, D. & PULA, G. Reactive Oxygen Species: Physiological Roles in the Regulation of Vascular Cells. Curr Mol Med.2014.

WANG, X. & MICHAELIS, E. K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. Front Aging Neurosci **2**: 12.2010.

WISE-FABEROWSKI, L., RAIZADA, M. K. & SUMNERS, C. Oxygen and glucose deprivation-induced neuronal apoptosis is attenuated by halothane and isoflurane. Anesth Analg **93**(5): 1281-1287.2001.

XU, T., LI, D. & JIANG, D. Targeting cell signaling and apoptotic pathways by luteolin: cardioprotective role in rat cardiomyocytes following ischemia/reperfusion. Nutrients **4**(12): 2008-2019.2012.

YAN, L. J., XIAO, M., CHEN, R. *et al.* Metabolic Dysfunction of Astrocyte: An Initiating Factor in Beta-amyloid Pathology? Aging Neurodegener **1**(1): 7-14.2013.

YANG, Y., ZHANG, X., CUI, H. *et al.* Apelin-13 protects the brain against ischemia/reperfusion injury through activating PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways. Neuroscience Letters **7**(568): 44-49.2014.

YE, R., LI, N., HAN, J. *et al.* Neuroprotective effects of ginsenoside Rd against oxygen-glucose deprivation in cultured hippocampal neurons. Neurosci Res **64**(3): 306-310.2009.

ZHANG, K., DING, W., SUN, J. *et al.* Antioxidant and antitumor activities of 4-aryl coumarins and 4-aryl-3,4-dihydrocoumarins. Biochimie.2014.

ZHU, H., WANG, Z., XING, Y. *et al.* Baicalin reduces the permeability of the blood-brain barrier during hypoxia in vitro by increasing the expression of tight junction proteins in brain microvascular endothelial cells. J Ethnopharmacol **141**(2): 714-720.2012.