

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO
DOUTORADO EM NUTRIÇÃO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BASES EXPERIMENTAIS DA
NUTRIÇÃO**

MARIANA SÉFORA BEZERRA SOUSA

**EFEITOS DO EXTRATO DE MURICI (*BYRSONIMA
CRASSIFOLIA* (L.) KUNTH) SOBRE O SISTEMA NERVOSO
DE RATOS IDOSOS E SÉPTICOS: ANÁLISE DA
DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL E SUA RELAÇÃO
COM O *STATUS* OXIDATIVO CEREBRAL**

RECIFE-PE

2018

Mariana Séfora Bezerra Sousa

**Efeitos do extrato de murici (*Byrsonima crassifolia* (L.)
Kunth) sobre o sistema nervoso de ratos idosos e
sépticos: análise da depressão alastrante cortical e sua
relação com o *status* oxidativo cerebral**

Tese apresentada ao Programa de Pós – graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Nutrição.
Área de concentração: Bases Experimentais da Nutrição.

Orientadora: Dr^a. Ângela Amâncio dos Santos

Prof^a do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE

Recife-PE

2018

Catálogo na fonte:
bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

S725e Sousa, Mariana Séfora Bezerra.
Efeitos do extrato de murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) sobre o sistema nervoso de ratos idosos e sépticos: análise da depressão alastrante cortical e sua relação com o status oxidativo cerebral / Mariana Séfora Bezerra Sousa. – Recife: o autor, 2018.
84 f.; il.; 30 cm.

Orientadora: Ângela Amâncio dos Santos.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em nutrição.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Estresse oxidativo. 2. Cérebro. 3. Antioxidantes. I. Santos, Ângela Amâncio (orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018 - 076)

Mariana Séfora Bezerra Sousa

Efeitos do extrato de murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) sobre o sistema nervoso de ratos idosos e sépticos: análise da depressão alastrante cortical e sua relação com o *status* oxidativo cerebral

Tese apresentada ao Programa de Pós –
graduação em Nutrição, Universidade Federal
de Pernambuco, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Nutrição.
Área de concentração: Bases Experimentais da
Nutrição.

Tese aprovada em: 23 de fevereiro de 2018.

Banca examinadora:

Dra. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa / UFPE

Dr. Eduardo Carvalho Lira / UFPE

Dra. Gisélia de Santana Muniz / UFPE

Dra. Elizabeth do Nascimento / UFPE

Dr. Ricardo Abadie Guedes / UFPE

Recife – PE

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Francisco de Souza Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE

Nicodemos Teles Pontes Filho

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

Elizabeth do Nascimento

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

Margarida Angélica da Silva Vasconcelos

CORPO DOCENTE PERMANENTE

Alcides da Silva Diniz

Carol Virgínia Góis Leandro

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Elizabeth do Nascimento

Ester Ribeiro Gouveia

Ilma Kruze Grande de Arruda

João Henrique da Costa Silva

Margarida Angélica da Silva Vasconcelos

Marília de Carvalho Lima

Patrícia Moreira Azoubel

Pedro Israel Cabral de Lira

Poliana Coelho Cabral

Raul Manhães de Castro

Rubem Carlos Araújo Guedes

Sandra Lopes de Souza

Thayza Christina Montenegro Stamford

Tânia Lúcia Montenegro Stamford

CORPO DOCENTE COLABORADOR

Adriano Eduardo Lima da Silva

Ângela Amâncio dos Santos

Leonie Asfora Sarubbo

Malaquias Batista Filho

Raquel Canuto

Raquel da Silva Aragão

*A minha mãe Ilza,
Exemplo de mulher e mestre...
Disposta a fazer o melhor todos os dias...
Aprendi a amar o meu trabalho vendo como amava o seu!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por cada anjo colocado ao meu lado e por me dar forças e coragem para continuar. Por estar sempre em mim e comigo, me guiando e me protegendo.

“Minha força é a fé que carrego no fundo do peito.”

A Profa. Dra. Ângela Amâncio, pela oportunidade, orientação e por me mostrar que com diplomacia, gentileza e calma podemos vencer uma “guerra”.

A minha mãe Ilza, gigante guerreira, meu exemplo de força, coragem e bom-humor, por segurar a minha mão nos momentos mais difíceis, caminhando junto comigo e ajudando a construir o que hoje eu sou.

*“She told me, daughter, sometimes it may seem dark
But the absence of the light is a necessary part
Just know, you're never alone,
You can always come back home.”*

Aos meus irmãos Miguel e Mariza, pelo amor e por acreditarem e confiarem em mim! Quando eu não acredito, eles me dão o “empurrão” necessário para continuar!

Ao Diego Buarque, o maior e melhor presente que essa terra me deu, por ser a calma no meio da turbulência, o ombro amigo na hora das lágrimas (foram muitas), a luz no meio da escuridão, a mão estendida na hora do tropeço, a alegria no meio da tempestade! Por você eu me desconstruí para poder me reconstruir um pouco melhor!

*“And in this crazy life
And through these crazy times
It's you
You're every minute of my every day!”*

À Heloísa Monteiro, por ter me ajudado a dar os primeiros passos no laboratório de Neurofisiologia e por ter desenvolvido parte deste trabalho comigo! Dizem que ela é a calma, e eu, a agitação; o fato é que nos complementamos e talvez por isso nossa parceria tenha dado tão certo! Obrigada por toda paciência e companheirismo.

À Danielle Viana, pela amizade, carinho e companheirismo nas nossas baladas laboratoriais! Quantas vezes você ouviu minhas lamentações!? Sempre tão atenciosa e gentil...obrigada!!

À Ricielle Augusto e Ivan Jr., por toda a paciência e tempo dedicados a mim quando eu estava aprendendo as técnicas bioquímicas e pela amizade construída ao longo destes anos. Vocês são demais!!!

Aos alunos de iniciação científica do laboratório de neurofisiologia, Vanessa Gondim, Ana Cristina Alves, Adson Cruz, Luís Gustavo e, principalmente, lasmmyn Holanda, pela ajuda durante os experimentos e pelos momentos de descontração compartilhados no laboratório.

Aos também companheiros de pós-graduação Gisele, Emerson, Dionísio e Humberto pelo apoio e pelas conversas e momentos de descontração.

As amigas Cíntia Silva, Débora Nascimento, Frankeline Gonçalves e Mariana de Moraes... por, apesar da distância, tornarem essa jornada, chamada vida, mais doce e feliz.

*"A glória da amizade não é somente a mão estendida,
o sorriso carinhoso e a delícia da companhia.
É também a inspiração espiritual que vem quando você descobre
que alguém acredita e confia em você."*

Ao meu grande amigo Jefferson Lima (Jeff), o irmão que a vida me deu, por sempre me ajudar a transformar as dificuldades em possibilidades! Obrigada por todo apoio, carinho, atenção e cuidados a mim dedicados!

À Dra. Dijannah Cota, pela disponibilidade e por sempre tirar as minhas dúvidas sobre química e técnicas laboratoriais.

Ao professor Dr. Eduardo Lira por ceder gentilmente o seu laboratório, pela disponibilidade e por literalmente colocar a "mão na massa", me ensinando o protocolo de sepse.

À professora Dra. Luciana Lima, pela identificação e quantificação dos compostos fenólicos.

Ao Prof. Reginaldo, pela disponibilidade em nos ajudar sempre que os equipamentos resolviam não funcionar, mas principalmente por ser sempre tão gentil com todos os alunos.

Aos funcionários do Biotério pelo fornecimento e cuidado com os animais, especialmente à veterinária Cláudia Oliveira;

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE, por nos possibilitar, com sua estrutura fantástica, a obtenção dos extratos de murici.

À Universidade Federal de Pernambuco – UFPE pela oportunidade de realizar este trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Nutrição e de Fisiologia e Farmacologia da UFPE.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela bolsa concedida.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Na poesia de Cora Coralina aprendi
Que as dificuldades são superadas
Com a tessitura das palavras.
Nas palavras de Clarice Lispector descobri
Que a superação transforma as pessoas.
Na dramaturgia de Ariano Suassuna vi
Que os conflitos são recriados
Por meio da arte.
Na ficção de Rachel de Queiroz senti
Que a fé preenche o vazio que existe
Dentro de cada um.
Não tenho a força de Anita Garibaldi
A coragem de Ana Nery
Nem a ousadia de Olga.
Tenho dentro de mim
Persistência e determinação
Desfaço-me e teço-me.”*

Maria Ilza Bezerra

RESUMO

A depressão alastrante cortical (DAC) se caracteriza por uma diminuição propagável da atividade elétrica do córtex cerebral e está associada ao estresse oxidativo. Várias condições podem levar ao aumento da produção de radicais livres, como o envelhecimento e a sepse, e assim, alterar a DAC. O murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) é um fruto rico em compostos antioxidantes e, portanto, pode apresentar efeito neuroprotetor. O objetivo desse trabalho foi Investigar o efeito do extrato do murici sobre a velocidade de propagação da DAC e o estresse oxidativo no córtex cerebral de ratos adultos, idosos e sépticos. O extrato do murici foi obtido por trituração dos frutos liofilizados em acetona, seguida de agitação magnética, eliminação do solvente em rotaevaporador e reconstituição em solução de carboximetilcelulose 0,5% e óleo de soja 10%. O protocolo experimental *in vivo* foi dividido em dois experimentos. No experimento 1, animais adultos (90-120 dias; n = 30) e idosos (600-700 dias; n = 28) foram suplementados com extrato de murici (150 mg/kg/dia ou 300 mg/kg/dia), por quinze dias, de forma orogástrica. Após o período de suplementação, os animais foram submetidos ao registro eletrofisiológico da DAC e à avaliação do estresse oxidativo cerebral. No experimento 2, animais adultos (90-120 dias; n = 40) foram suplementados previamente com extrato de murici ou solução veículo de forma semelhante ao experimento anterior. Porém, após o período de suplementação, os animais foram, primeiramente, submetidos à sepse experimental por ligadura e perfuração cecal (CLP) e, em seguida, ao registro eletrofisiológico da DAC e à avaliação do estresse oxidativo cerebral. Os dados foram avaliados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA), seguida do teste Holm Sidak, com nível de significância de 5%. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais. No primeiro experimento, nossos resultados mostraram que o extrato do murici na dose mais alta (300 mg/kg/dia) acelerou a velocidade da DAC, enquanto que a mais baixa (150 mg/kg/dia) desacelerou a propagação da DAC, tanto nos animais adultos, quanto nos idosos. Na condição adulto, as concentrações de malondialdeído (MDA) foram maiores no grupo suplementado com 300 mg/kg/dia. O envelhecimento aumentou as concentrações de MDA e reduziu a atividade da catalase no córtex cerebral dos ratos. Por outro lado, os animais idosos suplementados com extrato de murici, em ambas as doses, apresentaram níveis mais baixos de MDA quando comparados ao seu controle. No segundo experimento, a sepse reduziu a velocidade da DAC e aumentou os níveis de MDA no córtex cerebral dos animais. Contudo, os ratos sépticos previamente suplementados com extrato de murici apresentaram velocidades de propagação da DAC mais altas e menor estresse oxidativo, independentemente da dose testada. Esses resultados reforçam os achados de que o envelhecimento e a sepse levam ao estresse oxidativo, retardando a propagação da DAC. Por outro lado, o extrato de murici, em ambas as doses, é capaz de atenuar o dano oxidativo em ratos idosos e sépticos e, dessa forma, modular a DAC.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Cérebro. Antioxidantes.

ABSTRACT

Cortical spreading depression (CSD) is an electrophysiological phenomenon characterized by a propagable decrease of the electrical activity of the cerebral cortex and it is associated with oxidative stress. Several physiologic or pathologic conditions (such as aging or sepsis) can increase free radicals production and change CSD. Murici (*Byrsonimacrassifolia* (L.) Kunth) is a fruit rich in antioxidant compounds and, thus, can present a neuroprotector effect. The aim of this work was to investigate the effect of the extract of murici on the propagation velocity of CSD and oxidative stress in the cerebral cortex of adult, aged and septic rats. The murici extract was obtained by crushing the fruits lyophilized in acetone PA, followed by magnetic stirring, elimination of the solvent in a rotavaporator and reconstitution in a solution of 0.5% carboxymethylcellulose and 10% soybean oil. The experimental protocol *in vivo* was divided into two experiments. *In vivo* experimental protocol was divided in two approaches. In the first, adult (90 – 120 days; n =30) and aged animals (600 – 700 days; n = 28) were supplemented with extract of murici (150 mg/kg/day e 300 mg/kg/day) per gavage for fifteen days. Control group received vehicle solution (0.5% carboxymethylcellulose and 10% soybean oil). After that, animals were submitted to CSD electrophysiological record and cerebral oxidative stress evaluation. In the second approach, adult animals (90 – 120 days; n=40) were previously supplemented with extract of murici, or vehicle solution as described for the first approach. After the supplementation period, the animals were submitted to sepsis induction by cecal ligation and pucture (CLP) followed by CSD electrophysiological record and cerebral oxidative stress evaluation. The statistical significance was analyzed by using an ANOVA followed by *post-hoc* Holm–Sidak. All experimental procedures had been previously approved by the Institutional Ethics Committee for Animal Research (protocol n° 23076.020868/2014-51). Our results showed that extract of murici in the highest dose (300 mg/kg/day) increased the velocity of CSD, whereas the smallest (150mg/kg/day) decreased the propagation of CSD in both adult and aged animals. In adult rats, the concentrations of malondyaldehyde (MDA) were higher in the group that received 300 mg/kg/day. The aging increased MDA concentrations and decreased catalase activity in the cerebral cortex of the rats. On the other hand, aged animals supplemented with extract of murici in both doses presented lower MDA levels in comparison to the control group. In the second approach, it was observed that sepsis reduced the velocity of CSD and increased MDA levels in the cerebral cortex of the animals. However, the septic rats previously supplemented with extract of murici presented higher velocities of propagation of CSD and lower oxidative stress, independently of the tested dose. These results corroborate the findings that aging and sepsis lead to oxidative stress, which deaccelerates the CSD propagation. On the other hand, the extract of murici, a source of antioxidant compounds, in both doses, is able to attenuate the oxidative damage in aged and septic rats and, thus, modulates CSD.

Keywords: Oxidative stress. Brain. Antioxidants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig. 1 -	Principais fontes de geração de radicais livres.....	20
Fig. 2 -	Integração da rede de defesas antioxidantes no organismo.....	22
Fig. 3 -	Resposta inflamatória à sepse.....	26
Fig. 4 -	Resposta do cérebro à infecção sistêmica.....	27
Fig. 5 -	Representação esquemática da depressão alastrante cortical (DAC).....	28
Fig. 6 -	Eletrocorticograma (ECoG) e Variação Lenta de Voltagem (VLV) registradas, simultaneamente, em um ponto cortical durante a DAC.....	29
Fig. 7 -	Representação fotográfica dos frutos do Murici (<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) Kunth).....	30
Fig. 8 -	Fluxograma de obtenção dos extratos de murici.....	38
Fig. 9 -	Registro eletrofisiológico (variação lenta de voltagem) da depressão alastrante cortical (DAC) em ratos adultos (90-120 dias de idade) e idosos (600-700 dias de idade) suplementados com 150 mg/kg/dia (MUR-150) e 300 mg/kg/dia (MUR-300) de extrato de murici (<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) Kunth) por quinze dias.....	48
Fig. 10 -	Status oxidativo do córtex cerebral de ratos adultos (90-120 dias de idade) e idosos (600-700 dias de idade) suplementados com 150 mg/kg/dia (MUR-150) e 300 mg/kg/dia (MUR-300) de extrato de murici (<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) Kunth) por quinze dias.....	50
Fig. 11 -	Valores de glicemia (mg/dL) de ratos adultos (90-120 dias de idade) sépticos previamente suplementados com 150 mg/kg/dia (SEPSE+MUR-150) e 300 mg/kg/dia (SEPSE + MUR-300) de extrato de murici (<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) Kunth) por quinze dias, nos tempos 0 hora (antes da sepse) e 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 horas após a sepse.....	51
Fig. 12 -	Registro eletrofisiológico (variação lenta de voltagem) da depressão alastrante cortical (DAC) em ratos adultos (90-120	

dias de idade) sépticos suplementados com 150 mg/kg/dia (Sepse + MUR-150) e 300 mg/kg/dia (Sepse + MUR-300) de extrato de murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) por quinze dias..... 53

Fig. 13 - Status oxidativo do córtex cerebral de ratos adultos (90-120 dias de idade) sépticos previamente suplementados com 150 mg/kg/dia (SM-150) e 300 mg/kg/dia (SM-300) de extrato de murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) por quinze dias..... 55

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Teores de compostos antioxidantes no extrato de murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth)..... 46
- Tabela 2** - Velocidade de propagação da depressão alastrante cortical (mm/min) em ratos adultos (90-120 dias de idade, n = 30) e idosos (600-700 dias de idade, n = 28) suplementados com 150 mg/kg/dia (MUR-150) e 300 mg/kg/dia (MUR-300) de extrato de murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) por quinze dias..... 47
- Tabela 3** - Velocidade de propagação da depressão alastrante cortical (mm/min) em ratos adultos (90-120 dias de idade) sépticos e sépticos previamente suplementados com 150 mg/kg/dia (MUR-150) e 300 mg/kg/dia (MUR-300) de extrato de murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) por quinze dias..... 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CLP	Cecal ligation and puncture
DAC	Depressão Alastrante Cortical
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DCFDI	2,6-diclorofenol indofenol
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
GPx	Glutathiona peroxidase
GR	Glutathiona redutase
IL	Interleucina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MDA	Malondialdeido
Nrf2	Nuclear factor-E2-related factor
NF-Kb	Fator nuclear kappa B
NMDA	N-metil-D-Aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PMSF	Fenilmetilsulfonilflúor
SOD	Superóxido dismutase
SNC	Sistema nervoso central
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VLV	Variação lenta de voltagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN).....	19
2.2 Sistemas de defesa antioxidante.....	21
2.3 Estresse oxidativo.....	22
2.4 Depressão alastrante cortical (DAC).....	28
2.5 Murici (<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) Kunth).....	32
3 HIPÓTESES.....	35
4 OBJETIVOS.....	36
5 MÉTODOS.....	37
5.1 Protocolo <i>in vitro</i>: obtenção e caracterização do extrato de murici.....	37
5.2 Protocolo experimental para o ensaio <i>in vivo</i>.....	40
5.3 Protocolo de sepse.....	42
5.4 Cirurgia para registros eletrofisiológicos.....	43
5.5 Análise da depressão alastrante cortical - registros eletrofisiológicos.....	43
5.6 Avaliação do <i>status</i> oxidativo no córtex cerebral.....	44
5.7 Análise estatística.....	45
6 RESULTADOS.....	46
7 DISCUSSÃO.....	56
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
APÊNDICE A.....	79
APÊNDICE B.....	80
ANEXO A.....	81
ANEXO B.....	82
ANEXO C.....	83
ANEXO D.....	84

1 INTRODUÇÃO

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) é um processo fisiológico e contínuo, que ocorre principalmente nas mitocôndrias. ERO, em concentrações fisiológicas, são essenciais para a homeostase e sinalização celular (LIOCHEV, 2013). Entretanto, em determinadas situações, como o envelhecimento e a sepse, os níveis de ERO excedem a capacidade de defesa antioxidante do organismo. Neste caso, os mesmos podem se acumular e desencadear o estresse oxidativo, o qual está implicado em danos a proteínas, lipídios e DNA, prejudicando, assim, a função celular (JIA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2017).

Todos os tecidos dos mamíferos estão susceptíveis ao ataque de radicais livres, incluindo o cérebro. Esses radicais podem alterar a eletrofisiologia do sistema nervoso central. Por exemplo, há relatos de que a propagação da depressão alastrante cortical (DAC) é influenciada tanto por ERO, como por agentes com atividade antioxidante (GUEDES; ABADIE-GUEDES; BEZERRA, 2012, MENDES-DA-SILVA et al., 2014). A DAC é um fenômeno eletrofisiológico caracterizado por redução propagável da atividade elétrica do cérebro. Ela tem sido associada a patologias de interesse clínico, como a epilepsia e a enxaqueca com aura (SÁNCHEZ-PORRAS et al., 2014).

Por outro lado, dentre as estratégias para incrementar o potencial antioxidante do corpo e reduzir o dano oxidativo estão o aumento da ingestão de antioxidantes dietéticos. Estes complementam as ações dos antioxidantes endógenos e formam uma rede cooperativa de defesa antioxidante (POWERS et al., 2004). Um alimento considerado fonte valiosa de compostos antioxidantes é o murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) (MALTA et al., 2012, MARIUTTI et al., 2013).

O murici é um fruto típico das regiões Norte e Nordeste do Brasil, sendo rico em fibras alimentares (SILVA et al., 2008), vitamina C ($84 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) (VIEIRA et al., 2010), compostos fenólicos e carotenoides (BARRETO et al., 2009). Dentre as suas propriedades, sugerem-se como alternativa para modulação do dano oxidativo e, conseqüentemente, para promoção da saúde da população. Vários estudos têm demonstrado o potente efeito antioxidante de folhas, frutos e sementes de murici *in vitro* (SOUZA et al., 2012; MARIUTTI et al. 2013, 2014) e *in vivo* (PEREZ-GUTIERREZ et al., 2010; MUNIZ RAMIREZ et al., 2013). Contudo, não há dados na

literatura a respeito dos efeitos do consumo dos frutos de murici sobre o sistema nervoso. Dessa forma, o presente trabalho avaliou *in vivo* os efeitos da suplementação do murici sobre a eletrofisiologia do sistema nervoso, por meio do registro da DAC, e sobre o estresse oxidativo cerebral em animais adultos, idosos e adultos sépticos.

Os resultados da presente investigação estão contidos em dois artigos originais. O primeiro foi submetido no periódico “BMC Neuroscience”, intitulado de “*Murici (Byrsonima crassifolia L. Kunth) extract counteracts the effects of aging on cortical spreading depression and oxidative stress in the brain cortex*”. O segundo foi submetido à revista “International Journal of Food Sciences and Nutrition” com o título de “*Murici (Byrsonima crassifolia L. Kunth) extract reverts the brain oxidative stress and electrophysiological changes caused by sepsis in rats*”.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN)

Radicaís livres podem ser definidos como moléculas que possuem elétrons desemparelhados no orbital atômico, constituindo espécies altamente reativas, como o hidroxil (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1999). Existem ainda espécies reativas de oxigênio (ERO) que não são radicalares, como o peróxido de hidrogênio. O nitrogênio também pode gerar espécies reativas, como o peroxinitrito e o óxido nítrico. O óxido nítrico (ON) é uma espécie reativa de nitrogênio (ERN) sintetizada nos organismos vivos a partir da ação da enzima óxido nítrico sintase sobre o aminoácido L-arginina e que apresenta potente efeito vasodilatador, atuando na regulação da pressão arterial. (VASCONCELLOS et al., 2007).

A formação de ERO e ERN ocorre no citoplasma, nas membranas celulares e nas mitocôndrias (BARBOSA et al., 2010). As mitocôndrias produzem a maior parte das ERO, pois consomem mais de 95% de todo o oxigênio usado durante o processo de obtenção de energia. Na mitocôndria, o oxigênio é reduzido à água por meio da adição de 4 elétrons. Neste processo, parte do oxigênio escapa e resulta na produção de espécies reativas, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\bullet}). Por sua vez, o radical superóxido pode reagir diretamente com o óxido nítrico (NO), gerando peroxinitrito (ERN) (CADENAS; DAVIES, 2000) (FIGURA 1).

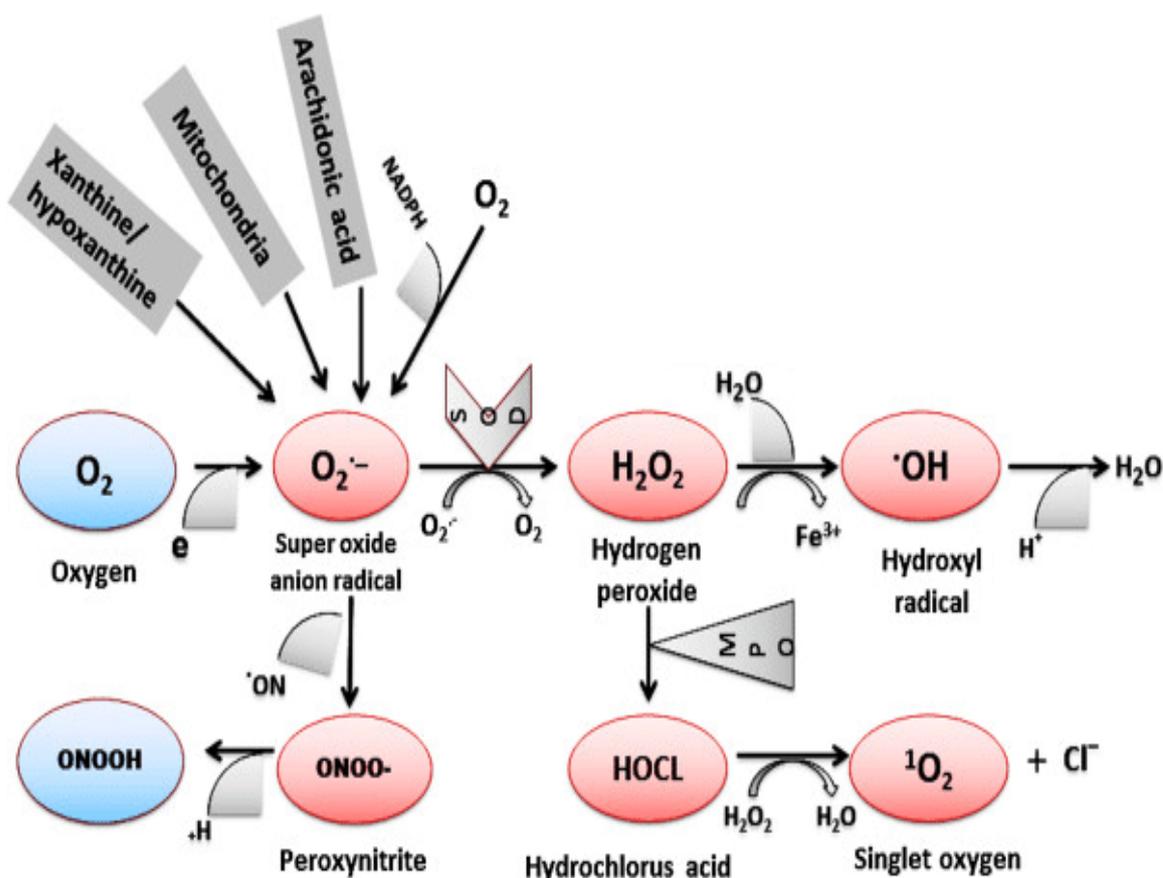
Endogenamente, espécies reativas também podem ser formadas por meio da ação de NAD(P)H oxidases (geram superóxido ao transferirem elétrons do NADPH ao oxigênio), xantina oxidase (catalisa a conversão da hipoxantina em xantina, gerando superóxido), mieloperoxidases (responsável pela geração de ácido hipocloroso) e lipoxigenases (catalisam a quebra do ácido araquidônico, gerando radicais livres como o superóxido) (LEOPOLD; LOSCALZO, 2009).

A produção de ERO e ERN é inevitável nos organismos aeróbios. Tais espécies reativas são extremamente importantes na sinalização celular, regulando, por exemplo, os processos imunológicos e a proliferação celular, por meio do controle da expressão gênica (LIOCHEV, 2013). Porém, durante períodos de

estresse ambiental, os seus níveis podem aumentar dramaticamente e danificar macromoléculas, como proteínas, lipídios e o DNA (OZCAN; OGUN, 2015).

A resposta transcricional celular às ERO é mediada principalmente pela ativação de proteínas quinases e dos fatores de transcrição AP-1 (proteína ativadora - 1) e NF-kappaB, os quais aumentam a expressão de genes envolvidos na síntese de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1) e de moléculas de adesão celular (HIGDON; FREI, 2003). Ainda, ERO podem participar de diversos aspectos da progressão tumoral, por exemplo: proliferação celular (por meio da ativação da *proteína* kinase regulada por sinais extracelulares (ERK 1/2) e evasão de apoptose (envolvendo ativação do NF-kB e do fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)) (SOSA et al., 2013).

Figura 1 - Principais fontes de geração de radicais livres.



O ânion superóxido é produzido principalmente nas mitocôndrias e pode reagir com o óxido nítrico para gerar peroxinitrito ou ser degradado pela superóxido dismutase (SOD), gerando peróxido de hidrogênio. Esse pode então reagir com o Fe^{2+} para formar radicais hidroxil através da reação de Fenton, ou ser degradado pela mieloperoxidase, formando ácido hipocloroso.

Fonte: SHAH et al., 2014.

2.2 Sistemas de defesa antioxidante

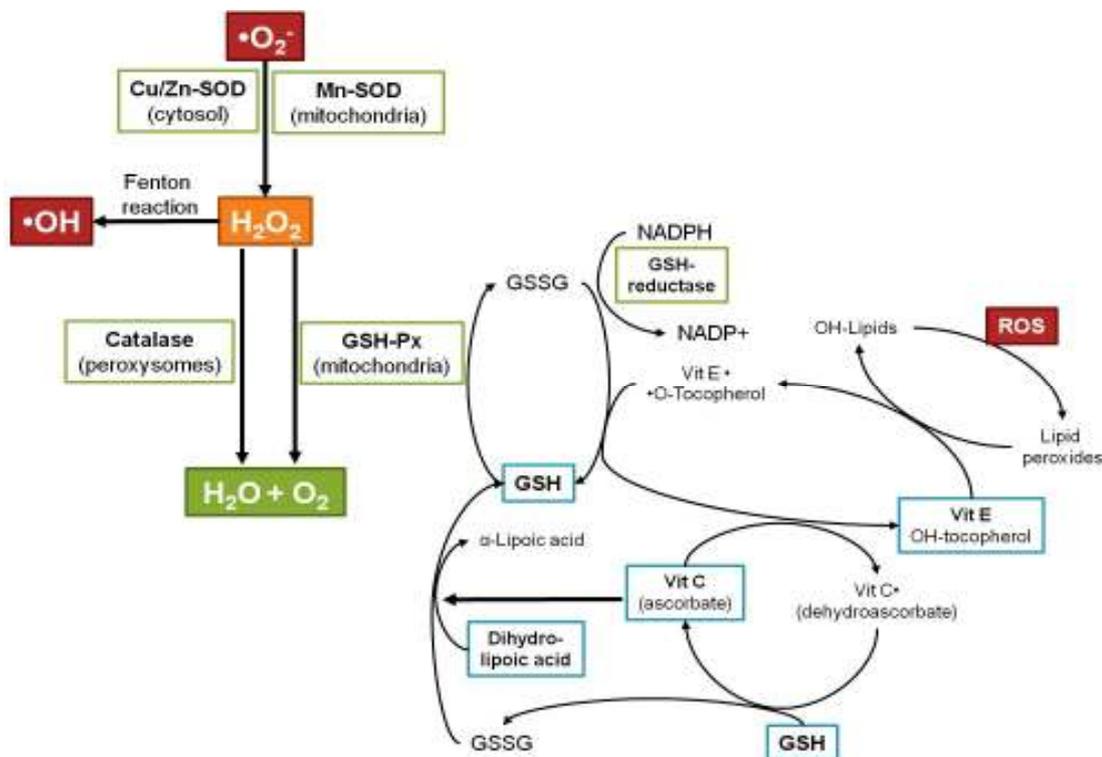
Os efeitos oxidativos biológicos das ERO são controlados por um amplo espectro de mecanismos antioxidantes endógenos e exógenos (FLORES-MATEO et al., 2014). Antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que em pequenas concentrações são capazes de retardar ou inibir a oxidação do substrato (HALLIWEL, 1995). Eles podem ser classificados como antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (RATNAM et al., 2006).

Dentre a classe dos antioxidantes não enzimáticos, destacam-se os antioxidantes dietéticos, como a vitamina C, carotenóides (luteína, zeaxantina), polifenóis (ácido gálico, quercetina), vitamina E e alguns minerais como zinco e selênio. Polifenóis são um grupo importante de fitoquímicos originados naturalmente do metabolismo secundário de plantas. Estão envolvidos no crescimento e reprodução dos vegetais, na pigmentação e como agentes que oferecem resistência a patógenos e a condições de estresse (BRAVO, 1998). Estes compostos podem atuar diretamente sobre os radicais livres ou podem modular, por exemplo, a atividade das enzimas antioxidantes (ATAIE; SHADIFAR; ATAEE, 2016).

Os principais antioxidantes enzimáticos incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). A SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio (VALKO et al., 2006); enquanto que a catalase (CAT) protege as células por meio da catálise da decomposição do H_2O_2 a oxigênio molecular e água (por meio da eliminação do H_2O_2 , previne a formação do radical hidroxil, contra o qual não há sistema enzimático de defesa). A GPx é uma seleno proteína que catalisa a decomposição de H_2O_2 ou um hidroperóxido (ROOH) à água, em um processo dependente da oxidação da glutathione (GSH) (MONROY; FERNÁNDEZ-MEJÍA, 2013) (FIGURA 2).

Ressalta-se, no entanto, que a ação destes antioxidantes pode ser bifásica, uma vez que em doses elevadas podem ser observados efeitos pró-oxidantes (POLYAKOV et al., 2001; RIETJENS et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2006).

Figura 2 - Integração da rede de defesas antioxidantes no organismo.



GSH, Glutathione; GSH-Px, glutathione peroxidase; GSSG, glutathione oxidized; GSH, glutathione reduced; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; ROS, reactive oxygen species.

Fonte: MONROY; FERNÁNDEZ-MEJÍA, 2013.

2.3 Estresse oxidativo

Quando a produção das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio excede os mecanismos de defesa antioxidante, tem-se o estresse oxidativo (SIES, 1985). A fisiopatologia do envelhecimento, de doenças inflamatórias, doenças neurodegenerativas, diabetes e câncer estão associadas ao estresse oxidativo (OZCAN; OGUN, 2015).

Um dos principais eventos decorrentes do estresse oxidativo é a peroxidação lipídica, caracterizada pelo ataque das ERO aos ácidos graxos poli-insaturados, gerando aldeídos reativos, como o malondialdeído (MDA). Os peróxidos lipídicos gerados nesse processo são citotóxicos e genotóxicos, podendo, inclusive, levar à perda da funcionalidade da membrana (NIKI et al., 2005). ERO também produzem derivados carbonilados ao oxidarem os resíduos de aminoácidos de proteínas. A carbonilação leva a disfunções em enzimas, reduzindo-lhes a atividade catalítica e

prejudicando, por exemplo, a contração muscular e a função cerebral (MAROSI et al., 2012).

Dentre os vários sistemas do organismo humano, o sistema nervoso é um dos mais vulneráveis ao estresse oxidativo. Nesse sentido, têm sido descritos alguns fatores que poderiam explicar a susceptibilidade cerebral às ERO, por exemplo, as concentrações elevadas de ácidos graxos poli-insaturados presentes nesse órgão; o alto consumo de oxigênio para produção de energia e a deficiência relativa em antioxidantes. Todos parecem tornar o cérebro alvo importante de ERO, as quais têm sido relacionadas com doenças neurodegenerativas (BRADBURY, 2011; CENCIONI et al., 2013). Neste contexto, Pamplona et al. (2005) detectaram concentrações elevadas de marcadores do dano oxidativo (MDA, proteínas carboniladas, 8-hidroxiguanosina) no cérebro de pacientes com doenças de *Alzheimer*. Outros estudos experimentais sugerem que os radicais livres exercem papel importante na propagação da depressão alastrante cortical (DAC) (GUEDES et al., 2012; READ; PARSONS, 2000).

Estresse oxidativo e envelhecimento

O envelhecimento é um processo natural e fisiológico. Com a melhoria das condições de vida, observa-se um aumento na expectativa de vida das pessoas. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), atualmente, cerca de 810 milhões de pessoas são idosas, constituindo 12% da população mundial. A projeção da OMS é que esse número alcance 2 bilhões de pessoas em 2050 ou 22% da população global. Contudo, o envelhecimento está associado com maior incidência de várias doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como hipertensão, diabetes e *Alzheimer* (OMS, 2015). Portanto, investigar medidas que possam melhorar a qualidade de vida dos idosos é um dos principais desafios da atualidade.

O estresse oxidativo é um dos elementos-chave no processo do envelhecimento. Segundo a “*Teoria dos Radicais Livres*”, esses elementos seriam os responsáveis pelo dano ao DNA, lipídios e proteínas, o que, cumulativamente, levaria a mutações e morte celular (HARMAN, 1956). Não obstante, há evidências de que as mitocôndrias desempenham um papel crucial na mediação e ampliação do estresse oxidativo que impulsiona o processo de envelhecimento (PAYNE; CHINNERY, 2015). Isto porque é observado no envelhecimento um declínio da

função mitocondrial, o que associado ao acúmulo de mutações do DNA mitocondrial, prejudicam o funcionamento da cadeia respiratória, resultando em um aumento adicional da produção de ERO e danos oxidativos (BRATIC; LARSSON, 2013). Entretanto, a relação precisa entre disfunção mitocondrial e envelhecimento ainda precisa ser melhor elucidada (CUI et al., 2011).

A oxidação do DNA por ERO gera 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, um produto capaz de mutar o DNA e, assim, acelerar o envelhecimento e a carcinogênese (SOSA et al., 2013). Adicionalmente, o envelhecimento está associado com redução das defesas antioxidantes (VUCEVIĆ et al., 2013; JIA et al., 2015), gerando, assim, um ciclo-vicioso. Mutlu-Türkoğlu et al. (2003) verificaram, por exemplo, concentrações séricas elevadas de malondialdeído (MDA) e proteínas carboniladas em indivíduos idosos. Foram também observados aumentos na lesão do DNA e redução no potencial antioxidante.

Por outro lado, em uma população idosa com alto risco cardiovascular, observou-se aumento da atividade plasmática de glutathione peroxidase (GPx) e LDL-oxidada. Nesse trabalho, a maior atividade da GPx foi interpretada como uma resposta defensiva saudável contra a lesão oxidativa (FLORES-MATEO et al., 2014).

Tem sido mostrado ainda que o aumento de radicais livres e a redução das defesas antioxidantes parecem ser um dos fatores que contribuem para o início e/ou progressão de problemas neurológicos, incluindo *Alzheimer* (ZHAO; ZHAO, 2013). Experimentalmente, Tatarkova et al. (2016) verificaram oxidação aumentada de lipídios e proteínas no córtex cerebral de ratos idosos. Enquanto Jia et al. (2015) detectaram redução de GSH, SOD e aumento de ERO. O estresse oxidativo, por sua vez, parece ser o principal fator responsável pelo declínio cognitivo em idosos, levando à redução da qualidade de vida (BAIERLE et al., 2015).

Por outro lado, estudos recentes têm mostrado que a suplementação com antioxidantes pode melhorar anormalidades neurológicas relacionadas ao envelhecimento, via modulação do estresse oxidativo (JIA et al., 2015, KANEAI et al., 2016, BOUAMAMA et al., 2017).

Estresse oxidativo e sepse

A sepse pode ser definida como uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica (*SIRS*, do inglês *Systemic Inflammatory Response Syndrome*) associada à infecção (BENNETT, 2012). Infelizmente, é uma das principais causas de morte nos hospitais e está potencialmente associada com disfunção cerebral (ANNANE; SHARSHAR, 2015). Estima-se que 25% dos pacientes com sepse severa morrerão durante a hospitalização (MAYR; YENDE; ANGUS, 2014).

A fisiopatologia da sepse é complexa e entre os mecanismos envolvidos, destaca-se a participação dos radicais livres. Em ratos (CATALÃO et al., 2016; NING et al., 2017) e em humanos (BAVUNOGLU et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017) sépticos o estresse oxidativo é bem documentado. Em animais submetidos à sepse por ligação e perfuração cecal, o estresse oxidativo e as alterações mitocondriais persistem até 10 dias após a cirurgia (COMIN et al., 2011).

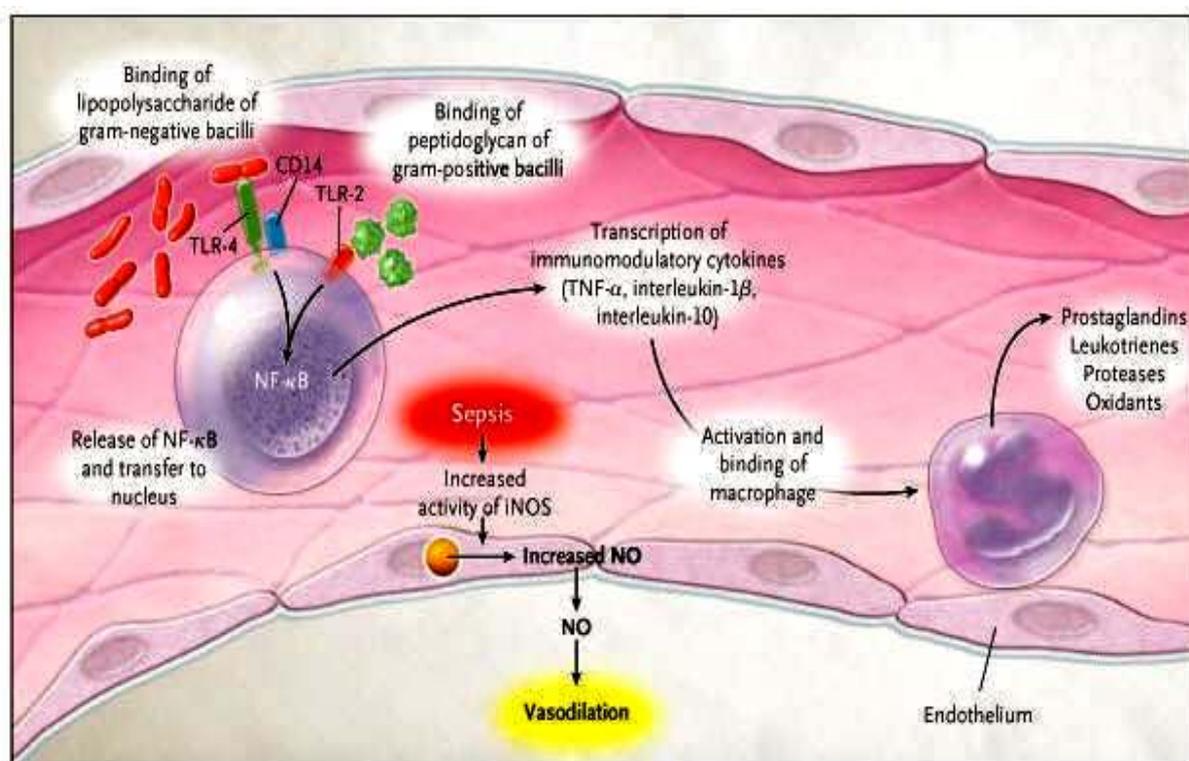
A resposta inflamatória e a produção de ERO têm início, quando microrganismos patogênicos, ao invadirem a circulação sanguínea, ativam a imunidade inata. As células de defesa (monócitos, macrófagos, neutrófilos) reconhecem os componentes bacterianos (lipopolissacarídeo - LPS e proteoglicanos) e desencadeiam a transcrição de mediadores imunomodulatórios, como o fator de necrose tumoral- α (TNF $-\alpha$), interleucina-1 (IL-1) e ERO (HELAL et al., 2015) (FIGURA 3).

Os mecanismos subjacentes ao estresse oxidativo na sepse são complexos e incluem disfunção mitocondrial (BOZZA et al., 2013) e desequilíbrio *redox* (DAGA et al., 2016), os quais podem atingir o cérebro. A respiração mitocondrial prejudicada altera a produção de ATP e, conseqüentemente, o metabolismo das células neurais (LEWIS; BILLIAR; ROSENGART, 2016). Foi demonstrado que a sepse inibe a atividade da bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ no córtex cerebral de ratos, aparentemente, via estresse oxidativo, uma vez que o tratamento com o antioxidante n-acetilcisteína preveniu este efeito (JEREMIAS et al., 2012).

Um importante mecanismo de proteção contra os radicais livres gerados na sepse são as enzimas superóxido dismutase e catalase. Neste contexto, o desequilíbrio nas atividades das enzimas antioxidante SOD (COSTA et al., 2016) e catalase (AYAR et al., 2017) em pacientes sépticos tem sido relacionado com a alta morbidade e mortalidade. Warner et al. (1995) detectaram aumento da atividade da

enzimas SOD e catalase plasmáticas em pacientes sépticos, especialmente nos não sobreviventes. Semelhantemente, Ayar et al. (2017) observaram aumento da atividade da catalase em crianças com sepse. Já Guerreiro et al (2010) detectaram aumento da atividade da SOD, mas não da catalase, em pacientes não sobreviventes à sepse (GUERREIRO et al., 2010). Contrariamente, Costa et al (2016) observaram que os pacientes com choque séptico apresentaram menor atividade de SOD1 nos eritrócitos, o que foi associado ao risco aumentado para injúria renal.

Figura 3: Resposta inflamatória à sepse.



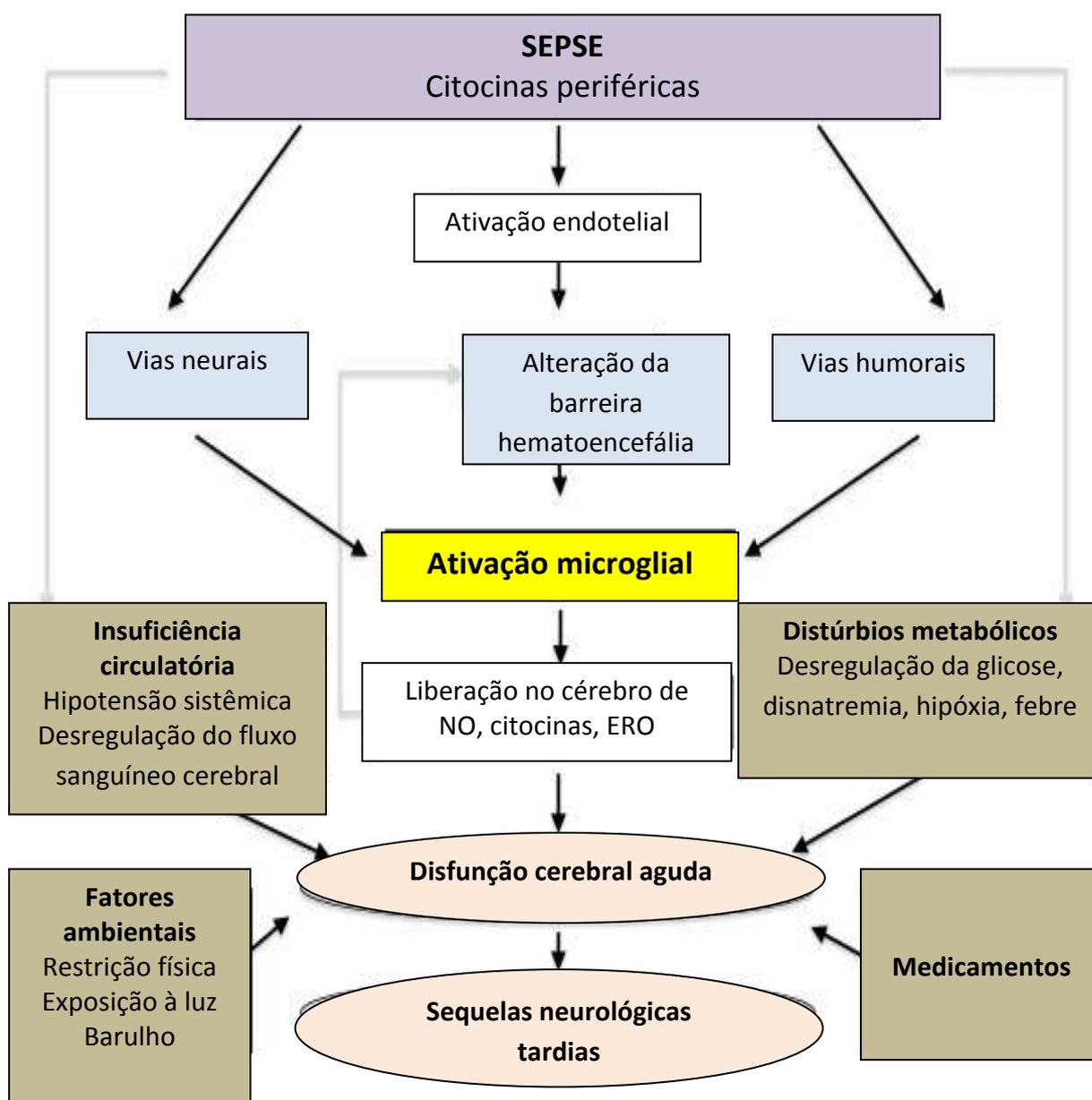
NO, óxido nítrico; NOS, óxido nítrico sintase; TNF- α, fator de necrose tumoral-α; TLR-2 e 4, Toll Like receptor-2 e 4; NF-κB, fator de transcrição NF-Kb; CD14, principal receptor do lipopolissacarídeo; iNOS, enzima óxido nítrico sintase induzível.

Fonte: HELAL et al., 2015.

A sepse também aumenta a atividade da sintase do óxido nítrico, levando à maior síntese deste composto, uma espécie reativa de nitrogênio que promove vasodilatação e consequente hipotensão arterial (HELAL et al., 2015). O óxido nítrico e demais citocinas ativam as células endoteliais cerebrais, aumentando a

permeabilidade da barreira hematoencefálica. Essa alteração permite que as citocinas distribuídas pela circulação periférica alcancem o sistema nervoso central. No cérebro, os mediadores pró-inflamatórios induzem a ativação da microglia, a qual produz mais ERO e citocinas, gerando um ciclo vicioso que leva à morte neuronal. Estes fatores estão associados a sequelas neurológicas tardias em sobreviventes da sepse, como o declínio cognitivo (SONNEVILLE et al., 2013) (FIGURA 4).

Figura 4: Resposta do cérebro à infecção sistêmica



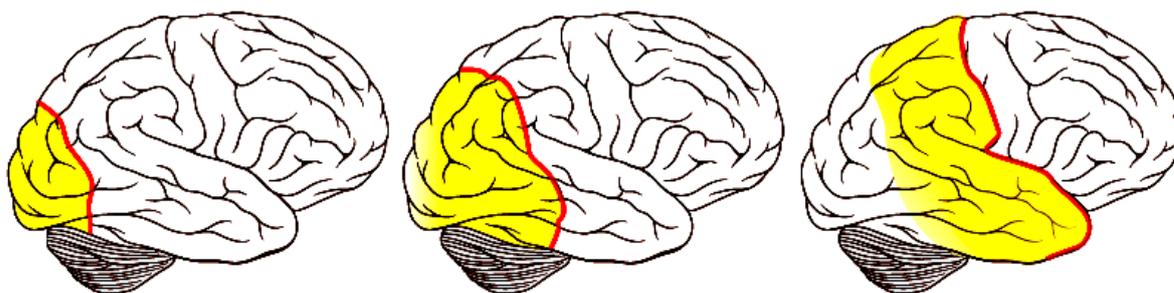
ERO, espécies reativas de oxigênio; NO, óxido nítrico.

Fonte: SONNEVILLE et al., 2013.

2.4 Depressão alastrante cortical (DAC)

A depressão alastrante cortical (DAC) é um fenômeno eletrofisiológico que foi descrito pela primeira vez por Aristides Leão, em 1944. O fenômeno se caracteriza por redução marcante da atividade elétrica do córtex cerebral após um período de hiperexcitabilidade neuronal. Essa diminuição da atividade elétrica pode ser deflagrada por estímulos elétricos, mecânicos ou químicos e se propaga de forma concêntrica e reversível, com velocidade média de 2 a 5 mm/min (FIGURA 5).

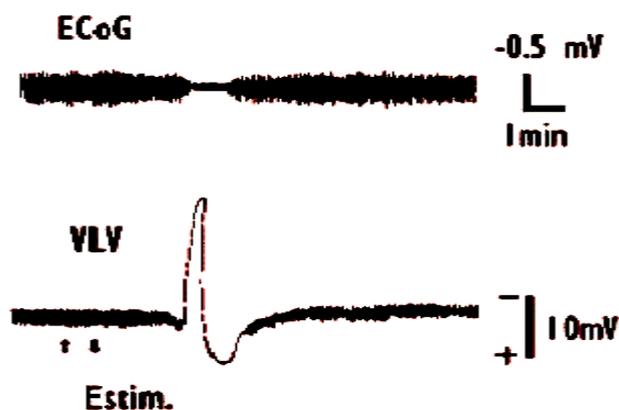
Figura 5: Representação esquemática da depressão alastrante cortical (DAC).



Fonte: Disponível em: <http://www.scilogsg.de/graue-substanz/cortical-spreading-depression-migraene-letzte/>

Graficamente, a DAC pode ser visualizada no eletroencefalograma, pois durante este fenômeno ocorre uma depressão na amplitude deste, de modo que o registro gráfico da atividade neuronal se torna praticamente isoeletrico (LEÃO, 1944; 1947). A DAC é acompanhada pelo aparecimento de uma variação lenta de voltagem (VLV), a qual também se propaga de forma concêntrica e é igualmente reversível. A VLV se apresenta como uma forma de onda bem definida, expressando com clareza o início e o final do fenômeno (FIGURA 6). Por essa razão, é muito utilizada para calcular a velocidade com que a DAC se propaga pelo tecido cortical (GUEDES et al., 2004) (FIGURA 6).

Figura 6: Eletrocorticograma (ECoG) e Variação Lenta de Voltagem (VLV) registradas, simultaneamente, em um ponto cortical durante a DAC.



Nota-se, no ECoG, a redução da amplitude das ondas eletrográficas, no momento em que ocorre a VLV, característica da DAC.

Fonte: GUEDES et al., 2004.

A DAC tem sido demonstrada em várias espécies de vertebrados, incluindo o homem, e pode ser iniciada por uma variedade de estímulos. Ela tem sido estudada em diferentes sistemas experimentais *in vivo* e *in vitro*, usando, principalmente, cloreto de potássio (KCl) como agente estimulatório (SMITH et al., 2006). Em nosso laboratório, usamos a DAC como ferramenta de estudo da neuroexcitabilidade e, portanto, da função cerebral. Os resultados demonstram que a velocidade com que DAC se propaga pelo tecido cortical é associada com a susceptibilidade do cérebro ao fenômeno e, por conseguinte, com a excitabilidade cerebral.

Este fenômeno é exclusivo para o sistema nervoso central (SNC) e parece envolver tanto neurônios, como as células gliais, especialmente astrócitos. Estes últimos contribuem para o balanço iônico, regulam as concentrações de neurotransmissores e fornecem energia (lactato, alanina e glutamina) para os neurônios. Os astrócitos são capazes de remover os íons potássio e o glutamato e, assim, limitar a DAC. Dessa forma, parece ser mais difícil evocar a DAC em cérebros de animais com número elevado de astrócitos (SMITH et al., 2006). Interessantemente, Peinado et al. (1998) relataram que no córtice parietal do rato envelhecido há um aumento de 20% no número de astrócitos. Provavelmente, este aumento decorre da resposta à necessidade de corrigir possíveis desequilíbrios homeostáticos durante o envelhecimento, como fagocitar mileina degenerada, e

para preencher os espaços desocupados pela perda de ramos dendríticos de neurônios (PETERS, 2007).

Clinicamente, a DAC tem sido relacionada a processos patológicos, tais como a enxaqueca com aura, a hemorragia intracerebral, o traumatismo craniano, o acidente vascular cerebral isquêmico e a epilepsia (SÁNCHEZ-PORRAS et al., 2013; SHIBATA; SUZUKI, 2017). Dessa forma, estratégias terapêuticas que visem modular a neuroexcitabilidade podem ser importantes para a prevenção e tratamento dessas patologias.

Durante a DAC o cérebro sofre inúmeras alterações, como falha na homeostase de íons (aumento de potássio e redução de cálcio, cloreto e sódio extracelulares), efluxo de aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato), aumento do consumo de oxigênio e glicose, e aumento do fluxo sanguíneo cerebral (LAURITZEN et al., 2011). Além disso, estudos experimentais mostram que a DAC altera a produção de ERO (VIGGIANO et al., 2011; GRINBERG et al., 2013). Neste contexto, Viggiano et al. (2011) detectaram aumento nas concentrações de peróxido de hidrogênio e na atividade da enzima SOD e redução de superóxido no córtex cerebral de ratos após uma hora da DAC. Interessantemente, ERO produzidas durante a DAC podem se difundir para outras áreas cerebrais, como o sistema trigeminal nociceptivo e, assim, contribuir para o desenvolvimento da dor durante a enxaqueca (SHATILLO et al., 2013). Essa ativação trigeminal parece decorrer ainda da ação de vias inflamatórias ativadas durante a DAC (WANG, 2013). É importante ressaltar que a síntese de mediadores pró-inflamatórios durante a DAC estimula a produção de mais ERO (GRINBERG et al., 2013).

No trabalho de Grinberget al. (2013), a depressão alastrante (DA) induziu estresse oxidativo na microglia e em astrócitos e produção aumentada de mediadores inflamatórios (TNF- α) em cultura de fatias de hipocampo. Além disso, diminuiu o limiar elétrico para evento subsequente de DA, via sinalização do TNF- α . Esses dados são reforçados pelos achados de Pusic et al. (2014) em que a potenciação da DA ocorreu via estresse oxidativo microglial.

Adicionalmente, em cultura de fatias de hipocampo, a DA induziu perda significativa da integridade da mielina e aumento de TNF- α e interferon- γ . Este, por sua vez, aumentou o estresse oxidativo, reduziu os níveis de glutathiona e reduziu o limiar elétrico para DA. Similarmente, a DA ativou esfingomielinases, aumentou o estresse oxidativo e promoveu um rompimento estrutural da bainha de mielina *in*

vivo (PUSIC et al., 2015). Redução no teor de mielina cerebral tem sido associada a aumento da excitabilidade neuronal e, por conseguinte, a maior susceptibilidade à DAC em ratos (MERKLER et al., 2009).

Por outro lado, ERO e citocinas pró-inflamatórias podem aumentar a excitabilidade neuronal e iniciar a DAC, gerando, assim, um ciclo vicioso e perpetuando o estresse oxidativo (GRINBERG et al., 2012; CIPOLLA et al., 2012). A sepsé é uma condição patológica relacionada com estresse oxidativo e inflamação. No entanto, não há estudos na literatura que mostrem os efeitos da septicemia sobre a DAC.

Sabe-se que uma rede adequada de antioxidantes endógenos e exógenos é essencial para manutenção da homeostase redox. Neste contexto, serão apresentados abaixo trabalhos demonstrando que antioxidantes dietéticos reduzem a neuroexcitabilidade e sugerindo que ERO são elementos-chave na iniciação da DAC.

El-Bachá et al. (1998), por exemplo, observaram que animais tratados com dieta deficiente nas vitaminas C e E apresentam maior susceptibilidade à DAC, provavelmente, devido ao aumento nas concentrações de radicais livres no cérebro. Bezerra et al. (2005) observaram redução da velocidade da DAC em ratos suplementados com carotenóides provenientes de resíduo de camarão (30 µg/kg/dia). Semelhantemente, a astaxantina antagonizou os efeitos do etanol, reduzindo a velocidade da DAC, de maneira dependente da dose (ABADIE-GUEDES et al., 2008). Recentemente, Abadie-Guedes, Bezerra e Guedes (2016) mostraram que a suplementação aguda com α -tocoferol (300 mg/kg) neutralizou os efeitos do etanol sobre a DAC, retornando as velocidades de propagação da DAC para níveis semelhantes ao do grupo controle.

Em ratos neonatos, a dexametasona, a qual induz estresse oxidativo cerebral, aumentou a velocidade de propagação da DAC. Este efeito, todavia, foi abolido pela suplementação das vitaminas C (200 mg/kg) e E (100 mg/g). Contrariamente, a suplementação única destas vitaminas, na ausência de dexametasona, não modulou a neuroexcitabilidade (LOPES-DE-MORAIS et al., 2014). Em contraste, o tratamento crônico com ácido ascórbico (60 mg/kg/dia) aumentou a velocidade de propagação da DAC em animais (MONTE-GUEDES et al., 2011). Contudo, esse efeito é dependente da dose; pois, Mendes-da-Silva et al. (2014) verificaram menor

susceptibilidade à DAC e menor peroxidação lipídica no córtex cerebral de ratos suplementados com 30 mg/kg/dia desta vitamina.

Em testes *in vitro*, o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) reduziu, a excitabilidade neuronal e, conseqüentemente, a susceptibilidade à DAC, via ação antioxidante (GRINBERG et al., 2012).

2.5 Murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth)

Byrsonima crassifolia (L.) Kunth é uma espécie de fruteira pertencente à família Malpighiaceae, gênero *Byrsonima*, o qual possui mais de 150 espécies (VIEIRA et al., 2010). Geralmente, ocorre na região Amazônia e no Nordeste brasileiro (LORENZI, 2009).

Popularmente, folhas e caule do muricizeiro têm sido utilizados como agente terapêutico, por sua ação cicatrizante e anti-inflamatória (GUSMÃO et al., 2006). Já os frutos, quando maduros, apresentam polpa succulenta, com coloração amarela, sabor adocicado e cheiro característico, podendo ser consumida *in natura* ou sob a forma de sucos, geleias, sorvetes e licores (ALVES; FRANCO, 2003) (FIGURA 7).

Figura 7: Representação fotográfica dos frutos do Murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth)



Fonte: SOUSA, 2013.

Estudos têm investigado as possíveis propriedades terapêuticas desta planta. Extratos de folha de *Byrsonima crassifolia*, por exemplo, apresentam efeito antidepressivo *in vivo*, o que foi associado à presença dos compostos quercetina 3-O-xilosideo, rutina, quercetina e hesperidina (HERRERA-RUIZ et al., 2011). Em outro estudo, este extrato foi capaz de inibir a formação de ERO em fibroblastos expostos à irradiação ultravioleta (SOUZA et al., 2012).

O extrato de folhas de muricizeiro apresenta ainda propriedade antimutagênica, devido, provavelmente, à presença de taninos, flavonoides e terpenoides que protegeriam as células contra danos e modificações oxidativas no DNA (MENDANHA et al., 2010). Por sua vez, o extrato lipofílico da casca de *Byrsonima crassifolia* atuou como anti-inflamatório em modelo animal de dermatite (MALDINI et al., 2009). Em 2013, Muniz Ramirez et al. observaram que o extrato hexânico de sementes de *Byrsonima crassifolia* inibiu a inflamação aguda e crônica em ratos, em um processo relacionado com a redução na produção de óxido nítrico. Esta atividade anti-inflamatória foi comparável aos padrões anti-inflamatórios (dexametasona e diclofenaco de sódio). Pérez Gutiérrez e Muñoz-Ramirez (2013) mostraram que esse extrato, na forma de pomada, acelerou a cicatrização de feridas em ratos diabéticos, promovendo a regeneração dos tecidos e aumentando a atividade das enzimas SOD e catalase. No entanto, poucos estudos têm investigado *in vivo* os efeitos benéficos dos frutos de *Byrsonima crassifolia* sobre a saúde.

Os frutos de *Byrsonima crassifolia* são uma boa fonte de fibras alimentares (SILVA et al., 2008), vitamina C ($84 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) (VIEIRA et al., 2010), compostos fenólicos e carotenoides (BARRETO et al., 2009). Mariutti et al. (2013) identificaram a luteína ($17,3 \text{ } \mu\text{g/g}$ de peso seco) e a zeaxantina ($3,5 \text{ } \mu\text{g/g}$ de peso seco) como os principais carotenóides presentes no murici. Ainda, o extrato destes carotenóides mostrou, *in vitro*, potente atividade *scavenger* do radical peroxil, sendo quase 13 vezes mais potente que o α -tocoferol. No estudo de Souza et al. (2008), o extrato metanólico de murici, rico em polifenóis ($2,9 \text{ mg /g}$ de matéria seca) aumentou a resistência da LDL (lipoproteína de baixa densidade) à oxidação.

Em modelo animal de diabetes, o extrato hexânico do murici apresentou efeito hipoglicêmico, hipolipidêmico e antioxidante (incrementou a atividade das enzimas antioxidantes no fígado - SOD e catalase, restaurou as concentrações de glutathiona e reduziu as concentrações substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico -TBARS) (PEREZ-GUTIERREZ et al., 2010). No estudo de Malta et al. (2012), o extrato

etanólico do murici, que continha ácido ferúlico e resveratrol, apresentou atividade antimutagênica *in vivo*.

Os principais polifenóis identificados no murici são o ácido gálico e a quercetina (GORDON et al., 2011). Recentemente, Mariutti et al. (2014) identificaram também catequina, epicatequina, rutina e kampferol em extrato hidrofílico de murici, sendo a quercetina o composto majoritário (2,72 µg/mL). Este extrato agiu eficazmente contra os radicais peroxil, hipocloroso, hidroxil e ânion superóxido e inibiu a oxidação da hemoglobina, a peroxidação lipídica e a depleção de glutathione em eritrócitos humanos. Além disso, tem sido relatada a ação do extrato acetônico do murici contra o peroxinitrito (GORDON et al., 2011).

Todavia, não há relatos na literatura quanto aos possíveis efeitos do murici sobre o sistema nervoso. Considerando-se que a propagação da DAC está envolvida com ERO e que o envelhecimento e a sepsis são condições que aumentam a sua produção, acredita-se que o murici, o qual é fonte de compostos antioxidantes, atuaria como uma alternativa no combate ao estresse oxidativo e, por conseguinte, na modulação da DAC, aumentando a resistência do córtex cerebral a este fenômeno.

3 HIPÓTESES

- O extrato do murici reduzirá a excitabilidade cortical, avaliada pela DAC, e o estresse oxidativo no córtex cerebral de ratos adultos, de maneira dependente da dose (150 e 300 mg/kg);
- O extrato de murici, nas doses de 150 e 300 mg/kg, previnirá a alteração eletrofisiológica e o estresse oxidativo cerebrais provocados pelo envelhecimento, de maneira dose-dependente;
- A sepse aumentará o dano oxidativo cerebral, aumentando a susceptibilidade do cérebro à DAC e o pré-tratamento com extrato de murici, nas doses de 150 e 300 mg/kg, antagonizará este efeito.

4 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da suplementação do extrato de frutos de murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth), em diferentes dosagens, sobre a depressão alastrante cortical (DAC) e o *status* oxidativo cerebral de ratos em diferentes fases da vida e na sepse.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar *in vitro* o extrato dos frutos do murici com relação aos compostos antioxidantes;
- Investigar os efeitos do consumo do extrato murici em ratos adultos, idosos e em ratos adultos sépticos quanto aos seguintes parâmetros:
 - susceptibilidade cerebral ao fenômeno eletrofisiológico da DAC;
 - peroxidação lipídica no córtex cerebral;
 - glutatona reduzida e razão glutatona reduzida/ glutatona oxidada no córtex cerebral;
 - atividade de enzimas antioxidantes no córtex cerebral (catalase – CAT e superóxido dismutase – SOD).

5 MÉTODOS

5.1 Protocolo *in vitro*: obtenção e caracterização do extrato de murici

Obtenção dos frutos do Murici

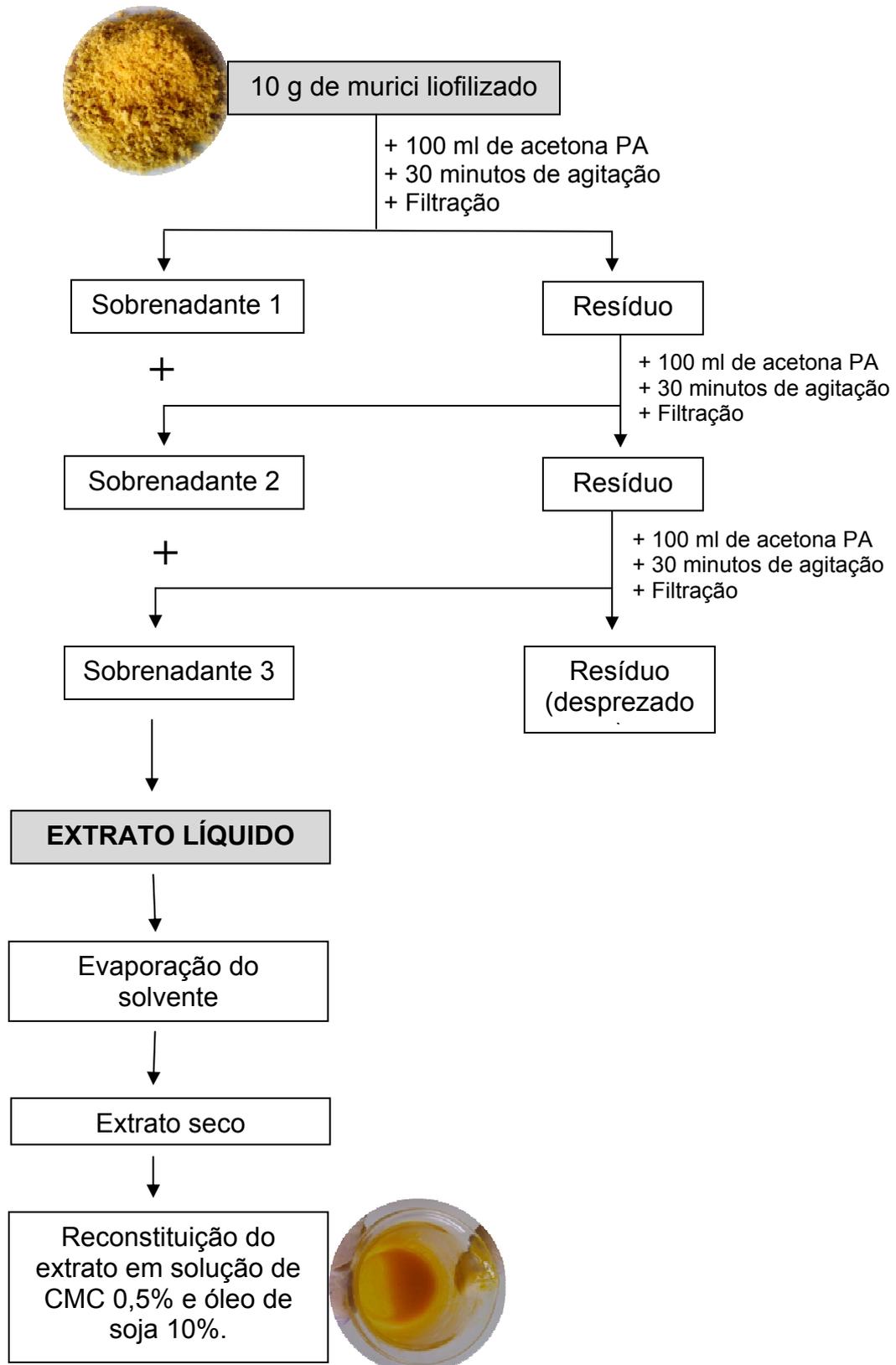
Os frutos do murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) foram obtidos de produtores rurais, em Araiozes, Maranhão, Brasil. Foram coletados 30 kg de frutos na safra de 2014. O reconhecimento da espécie foi realizado anteriormente por especialista do Instituto de Botânica - USP (ANEXO B).

Os frutos foram selecionados (descarte dos frutos podres e verdes), lavados com água corrente, sanitizados com hipoclorito de sódio 150 ppm por 15 minutos, lavados novamente com água potável, congelados e transportados para o Laboratório de Neurofisiologia da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Posteriormente, a partir da retirada dos caroços, obteve-se uma mistura de polpa e pele dos frutos, a qual foi triturada, liofilizada (liofilizador modelo AISI 304, série Enterprise II, Terroni[®], Brasil) e acondicionada em sacos de polietileno, ao abrigo da luz, a -20 °C, até o momento da obtenção dos extratos.

Obtenção do extrato dos frutos de murici

A obtenção dos extratos dos frutos (polpa e pele) de murici foi realizada segundo Broinizi et al. (2008), com modificações. Os frutos (polpa e pele) liofilizados foram, inicialmente, submetidos à extração com acetona PA na proporção 1:10 (m/V), durante 30 minutos, em agitador magnético, à temperatura ambiente, seguida de filtração em funil de haste longa. O resíduo resultante foi novamente extraído com acetona na mesma proporção anterior, seguindo o mesmo procedimento. O sobrenadante foi coletado e o resíduo foi submetido novamente à agitação magnética, sempre ao abrigo da luz. O extrato final foi obtido a partir da junção dos três sobrenadantes (FIGURA 8).

Figura 8: Fluxograma de obtenção dos extratos de murici.



Em seguida, o solvente foi eliminado em evaporador rotatório (modelo RV 10 digital, IKA[®], Staufen, Alemanha) com pressão reduzida, à temperatura de 30 °C, e o extrato pesado e reconstituído em solução de carboximetilcelulose (CMC) 0,5% e óleo de soja 10% (FIGURA 8).

Caracterização dos compostos antioxidantes do extrato de murici

Determinação de vitamina C

O ácido ascórbico (Vitamina C) foi analisado pelo método de Tilmans, que se baseia na redução do sal sódico 2,6-diclorofenol indofenol (DCFI) pelo ácido ascórbico (IAL, 2008). Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico por grama de extrato de murici.

Determinação de carotenóides totais

A análise do teor de carotenoides foi realizada segundo o método descrito por Rodriguez-Amaya (2001), com adaptações. Os carotenoides foram transferidos da acetona para o éter etílico usando funil de separação. Em seguida, eles foram quantificados por espectrofotometria no UV-visível, pela leitura da absorbância do extrato no comprimento de onda de 445 nm (λ_{\max} de absorção da luteína em éter etílico). A concentração de carotenoides totais foi calculada a partir da Lei de Lambert-Beer, em que $C = (A \times V) / E$, onde C é a concentração de carotenoides totais (μg), A é a absorbância do extrato a 445 nm, V é o volume (mL) e E é o coeficiente de absorvidade da luteína em éter etílico, que corresponde a 2480. O conteúdo foi expresso em mg de carotenóides totais por grama de extrato de murici.

Determinação de fenólicos totais

O conteúdo total de polifenóis foi medido espectrofotometricamente a 725 nm, após diluição dos extratos e reação com reagente de Folin-Ciocalteu, estabilizado com solução saturada de carbonato de sódio (MIRA et al., 2008). Os resultados foram expressos, com base em curva analítica, em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato.

Perfil de compostos fenólicos

A análise do perfil de compostos fenólicos do extrato de murici foi realizada em cromatógrafo líquido (*Ultimate 3000 Dionex*®, com coluna analítica *Acclaim*®120 *Dionex C-18* - 250 mm x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel foi constituída pela mistura gradiente de metanol e solução aquosa de ácido fórmico. O fluxo da fase móvel foi mantido em 0,5 mL.min⁻¹, temperatura do forno de 36 °C, volume de injeção de 20µL e comprimentos de onda de 280 a 368 nm.

Padrões puros de compostos fenólicos foram utilizados para a identificação nas amostras, tais como: rutina, miricetina, quercetina, caempferol, ácido gálico, ácido vanílico, ácido caféico, ácido ferúlico, ácido siríngico, catequina e epicatequina.

A quantificação dos fenólicos foi realizada por meio de curva analítica em metanol, com padronização externa e as amostras diluídas a 10% com metanol e filtradas a 0,45 µm (LIMA et al., 2011; PORGALI; BYUKTUNCEL, 2012). Os resultados foram expressos em miligramas por grama de extrato.

Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

5.2 Protocolo experimental para o ensaio *in vivo*

Foram utilizados 120 ratos albinos machos (ANEXO C), da linhagem *Wistar*, do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. Destes, 22 animais morreram durante os experimentos, totalizando 98 ratos. Todos os procedimentos experimentais descritos foram aprovados previamente pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPE (CEUA 23076.020868/2014-51) (ANEXO D).

No período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno, à temperatura ambiente de 22 ± 1 °C, com ciclo claro-escuro de 12 h (início da fase clara às 6 h) e acesso livre à ração comercial “Presence” (Evalis®) e água.

O protocolo experimental *in vivo* foi dividido em dois experimentos:

- **Experimento 1:** Efeitos do extrato de murici sobre a depressão alastrante cortical e o *status* oxidativo cerebral de ratos adultos e idosos.

Animais adultos (90 - 120 dias de idade) e idosos (600 – 700 dias de idade) foram suplementados de forma orogástrica com extrato de murici por quinze dias. O extrato foi administrado sempre no mesmo horário, às 12h, nas doses de 150 mg/kg/dia ou 300 mg/kg/dia. O tempo de suplementação e as doses de extrato usadas foram determinados com base nos resultados de Perez-Gutierrez et al. (2010) e de um estudo piloto realizado em nosso laboratório. Os animais controles receberam volume equivalente (1 mL/kg) da solução veículo (carboximetilcelulose 0,5% e óleo de soja 10%). Ao final do tratamento foram obtidos os seguintes grupos experimentais:

G1: animais adultos controle (n =10)

G2: animais adultos suplementados com murici (150 mg/kg; n =10)

G3: animais adultos suplementados com murici (300 mg/kg; n =10)

G4: animais idosos controle (n = 8)

G5: animais idosos suplementados com murici (150 mg/kg; n =10)

G6: animais idosos suplementados com murici (300 mg/kg; n =10)

No dia seguinte após o término da suplementação, os animais foram anestesiados com uma solução de uretana a 10% e cloralose a 0,4%, via intraperitoneal, e submetidos ao registro eletrofisiológico da DAC. Em seguida, os cérebros dos animais foram retirados para posterior análise do estresse oxidativo cerebral.

- **Experimento 2:** Efeitos do extrato de murici sobre a depressão alastrante cortical e o *status* oxidativo cerebral de ratos adultos sépticos.

Animais adultos (90 - 120 dias de vida) foram suplementados com extrato de murici por quinze dias, de forma semelhante a que foi realizada no experimento 1. Após o período de suplementação, os animais foram submetidos, primeiramente, à cirurgia de sepse e, em seguida, ao registro eletrofisiológico da DAC. Foram, então, formados os grupos experimentais a seguir:

G7: animais adultos controle (*sham*; n =10)

G8: animais adultos sépticos (n =10)

G9: animais adultos e sépticos suplementados com murici (150 mg/kg; n =10)

G10: animais adultos e sépticos suplementados com murici (300 mg/kg; n =10)

5.3 Protocolo de sepse

Após a suplementação com extrato de murici, todos os animais dos grupos G7 a G10 foram mantidos em jejum de 12 h e, então, submetidos à sepse ou à cirurgia fictícia (*sham*). Nos animais adultos dos grupos G8 a G10 foi realizado o modelo de sepse conhecido por CLP (do inglês, "*cecal ligation and puncture*") conforme Hubbard et al. (2005), com adaptações. Inicialmente, os animais foram anestesiados com uma solução de uretana a 10% e cloralose a 0,4% (1mL/100g), via intraperitoneal. Em seguida, foi realizada uma laparotomia na linha média do animal, a fim de expor o ceco, o qual foi ligado com uma linha de sutura em sua base, abaixo da válvula íleo-cecal. O ceco foi perfurado 2 vezes com agulha de 16 gauge, espremido para expulsão das fezes e retornado para cavidade peritoneal, e a laparotomia suturada. No grupo G7 foi realizada uma cirurgia fictícia (*sham*), onde os animais foram submetidos a todos os procedimentos cirúrgicos, mas o ceco não foi ligado, nem perfurado. Imediatamente após a cirurgia de sepse ou *sham*, administrou-se solução salina 0,9% (50 ml /kg), por via subcutânea, nos animais, para retardar o choque séptico. Logo em seguida, realizou-se a cirurgia para os registros eletrofisiológicos e a análise da DAC, a qual teve duração de sete horas. Esse tempo de registro foi usado com base nos resultados de Vieira et al. (2014) para indução do estresse oxidativo cerebral em ratos sépticos e em resultados de um estudo piloto realizado em nosso laboratório.

Adicionalmente, a glicemia dos animais foi aferida através de um glicosímetro comercial On Call Plus (Acon[®]). O sangue foi coletado por meio de um pequeno corte na extremidade da cauda dos animais. Os níveis de glicose dos animais foram monitorados durante as sete horas em que ocorreram os registros eletrofisiológicos.

5.4 Cirurgia para registros eletrofisiológicos

Os animais foram submetidos ao registro eletrofisiológico da depressão alastrante cortical (DAC), conforme Monteiro et al. (2015). Inicialmente, foi realizada uma traqueostomia para introdução de uma cânula de polietileno. Em seguida, foi feita uma incisão e a remoção da pele e do periósteo para exposição do crânio. Por meio de trepanação, foram feitos três orifícios (2-3 mm de diâmetro) no hemisfério cerebral direito, alinhados paralelamente à linha média. O primeiro orifício (no osso frontal) foi usado para aplicar o estímulo para provocar a DAC (KCl 2%). Os outros dois orifícios (no osso parietal) foram utilizados para registrar a onda de propagação da DAC. A temperatura retal do animal foi mantida durante todo o procedimento em 37 ± 1 °C.

5.5 Análise da depressão alastrante cortical - registros eletrofisiológicos

A DAC foi provocada através de estímulo químico (KCl a 2%), aplicado por um minuto, sobre o córtex cerebral na região frontal. Os registros eletrofisiológicos foram feitos utilizando-se eletrodos impolarizáveis (tipo “Ag-AgCl”), conectados a um eletromiógrafo configurado para esse fim. A variação lenta de voltagem, que acompanha a DAC, foi registrada nos dois pontos corticais parietais. As variações corticais de voltagem foram registradas contra um eletrodo de referência comum, colocado sobre o osso nasal, no qual o potencial é invariável.

A aplicação de KCl para deflagração da DAC foi repetida a cada 20 minutos por um período de 4 horas (grupos G1 a G6) ou de 7 horas (grupos G7 a G10). Dessa forma, três mensurações da DAC eram geralmente obtidas em cada hora. Ao final, foi calculada a média das velocidades de propagação da DAC obtidas nos registros. A velocidade de propagação da DAC foi calculada com base na distância entre os dois eletrodos registradores e no tempo gasto pela DAC para percorrer esta distância e foi expressa em mm/min.

Ao final do registro eletrofisiológico, os animais foram sacrificados e seus cérebros removidos. O córtex cerebral isolado foi processado para análises bioquímicas posteriores.

5.6 Avaliação do *status* oxidativo no córtex cerebral

Preparo do homogeneizado do córtex cerebral

O córtex cerebral foi isolado e homogeneizado com tampão tris-base 50 mM, EDTA 1 mM (pH 7,4), fenilmetilsulfonilflúor (PMSF) 200 mM e ortovanadato de sódio 100 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 1000 x G, por 10 minutos, a 0 °C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C para análises posteriores, as quais foram realizadas em triplicata.

Avaliação da peroxidação lipídica no córtex cerebral

A peroxidação lipídica foi mensurada por meio da produção de metabólitos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), principalmente o malondialdeído (MDA), no homogenato cerebral, segundo o método descrito por Ohkawa et al. (1979). Neste ensaio, a reação foi realizada em dodecil sulfato de sódio 8,1%, ácido acético 20% e ácido tiobarbitúrico 0,8%. Para realização dos cálculos, foi feita uma curva padrão de 1,1,3,3-tetrametoxipropano. A mensuração foi realizada espectrofotometricamente, a 532 nm, em leitor de placas (Thermo Scientific, Varioskan Flash Spectral Scanning Multimode Reader). Os resultados foram expressos em nM equivalentes de MDA/mg proteína.

Quantificação de glutathiona reduzida (GSH) e razão glutathiona reduzida/ glutathiona oxidada (GSH/GSSG)

Os níveis de GSH e GSSG foram analisados de acordo com Hissin e Hilf (1976), usando espectrofluorímetro com 350 nm de excitação e 420 nm de emissão. Na análise da GSH o meio da reação era composto por tampão fosfato 100 mM com EDTA 5 mM (pH 8,0) e ortoftaldeído 1 mg/mL (OPT). Para o ensaio da GSSG foram usados hidróxido de sódio 0,1 M, OPT (1 mg/mL) e N-etilmaleimida 0,04 M (NEM). Os resultados foram expressos em nM de GSH e GSSH por mg de proteína, usando uma curva padrão de GSH e GSSG, respectivamente. Com base nestes resultados, calculou-se a razão GSH/GSSG.

Atividade de enzimas antioxidantes no córtex cerebral

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada de acordo com a metodologia de Misra e Fridovich (1972). O meio de reação foi composto por tampão carbonato 0,05 M com EDTA 0,005 M (pH 10,2) e epinefrina 150 mM. As absorbâncias foram lidas a cada 15 segundos, por 2 minutos, a 480 nm. Os resultados foram expressos em unidades/mg proteína (U/mg proteína), em que cada unidade representa a quantidade de enzima que provoca 50% de inibição da oxidação de epinefrina

Para avaliação da atividade da catalase (CAT), o meio de reação foi composto por peróxido de hidrogênio 300 mM e tampão fosfato 50 mM (pH 7,0), conforme Aebi (1984). As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro, a cada 10 segundos, durante 2 minutos, a 240 nm. Os resultados foram expressos em unidades/mg de proteína (U/mg proteína).

Determinação de proteínas totais no córtex cerebral

A determinação de proteínas totais no córtex cerebral foi realizada conforme Bradford (1976), utilizando-se uma curva padrão com solução de albumina.

5.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. Para comparação das médias aritméticas, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste Holm Sidak, usando o software GraphPad Prism, versão 5.0 para Windows (San Diego, CA, USA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DO EXTRATO DE MURICI

A caracterização dos compostos antioxidantes do extrato de frutos de murici, incluindo os teores de ácido ascórbico, carotenóides totais, polifenóis totais, ácido gálico e quercetina estão na Tabela 1. O extrato de fruto de murici pode ser considerado uma boa fonte de ácido ascórbico e de carotenóides. Contudo, a análise química mostrou que os polifenóis são os compostos majoritários, sendo a quercetina o principal polifenol identificado.

Tabela 1: Teores de compostos antioxidantes no extrato de murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth).

Compostos antioxidantes	Concentração (mg/g de extrato)
Ácido ascórbico	0,24 ± 0,03
Carotenóides totais	0,57 ± 0,02
Fenólicos totais	8,36 ± 0,54
Ácido gálico	0,22 ± 0,04
Quercetina	1,29 ± 0,23

EFEITOS DO EXTRATO DE MURICI SOBRE A DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL EM RATOS ADULTOS E IDOSOS

A ANOVA mostrou diferenças significativas nas velocidades de propagação da DAC entre os grupos adultos e idosos suplementados com extrato de murici ($F [5, 639] = 1889,38; p < 0,05$). As comparações *post-hoc* mostraram que os animais idosos apresentavam velocidades de propagação da DAC menores do que os animais adultos. Quanto ao extrato do murici a dose mais alta (300 mg/kg/dia) acelerou, enquanto que a mais baixa (150 mg/kg/dia) desacelerou a propagação da DAC, tanto nos animais adultos, quanto nos idosos (Tabela 2).

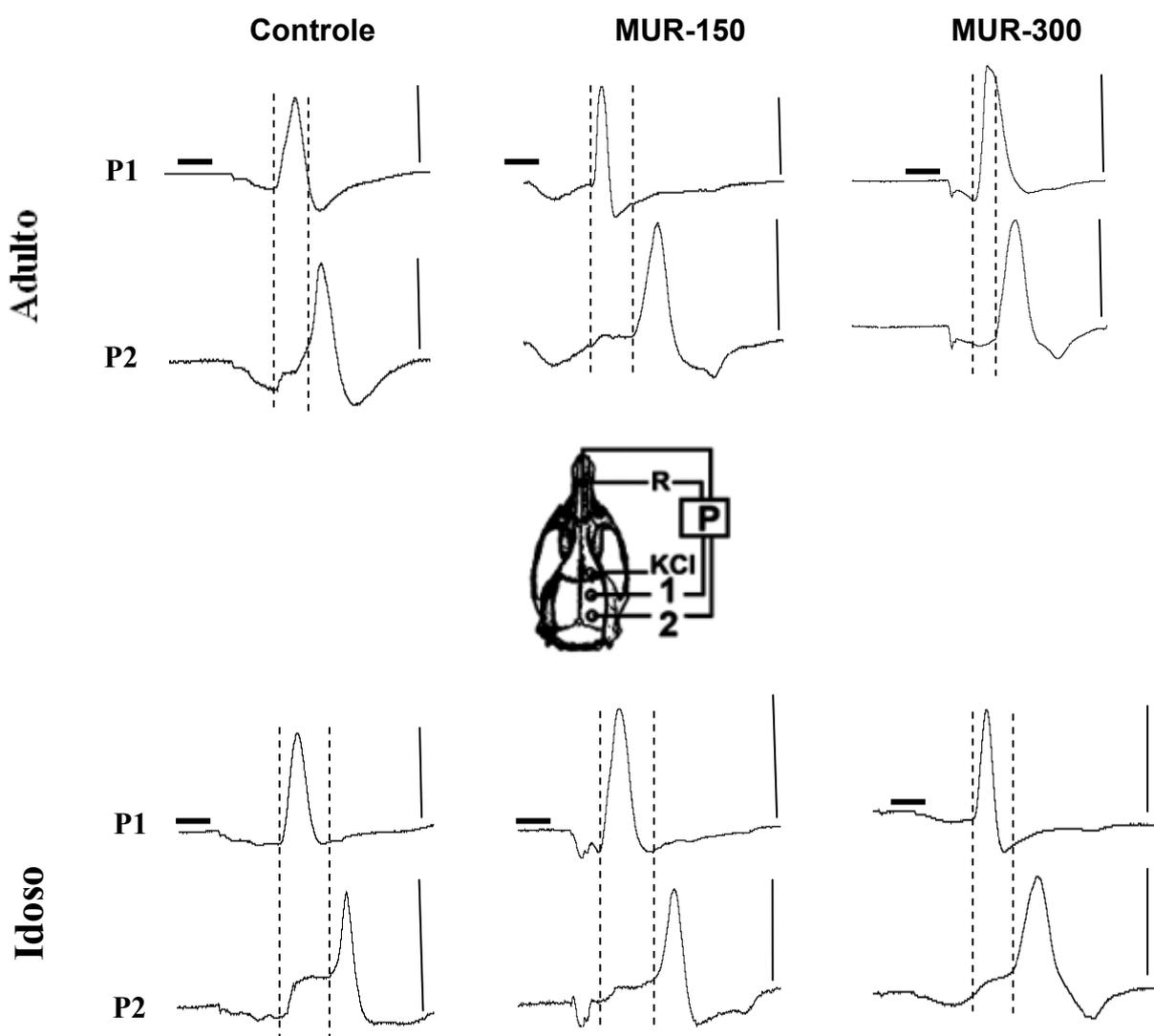
Tabela 2: Velocidade de propagação da depressão alastrante cortical (mm/min) em ratos adultos (90-120 dias de idade, n = 30) e idosos (600-700 dias de idade, n = 28) suplementados com 150 mg/kg/dia (MUR-150) e 300 mg/kg/dia (MUR-300) de extrato de murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) por quinze dias.

Grupos experimentais	Velocidade da DAC (mm/min)	
	Adulto	Idoso*
Controle	3,62 ± 0,22	2,54 ± 0,11
MUR-150	2,65 ± 0,23 ^a	2,24 ± 0,08 ^a
MUR-300	4,46 ± 0,32 ^{a,b}	3,47 ± 0,11 ^{a,b}

Valores estão apresentados como média ± desvio-padrão. ^ap < 0,05 quando comparado com o grupo controle da mesma idade. ^bp < 0,05 quando comparado com o grupo MUR-150 da mesma idade. O asterisco indica que todos os grupos idosos diferem significativamente do grupo adulto correspondente (p < 0,05).

Os registros eletrofisiológicos de três ratos adultos e de três ratos idosos dos grupos experimentais (controle, MUR-150 e MUR-300) estão apresentados na Figura 9 e confirmam a presença da DAC após a aplicação com KCl. De um modo geral, a aplicação tópica de KCl a 2% durante 1 min em um ponto do córtex frontal, no hemisfério direito, provocou uma única onda de DAC, propagada sem interrupção, a qual foi registrada por dois eletrodos localizados na superfície parietal do mesmo hemisfério.

Figura 9: Registro eletrofisiológico (variação lenta de voltagem) da depressão alastrante cortical (DAC) em ratos adultos (90-120 dias de idade) e idosos (600-700 dias de idade) suplementados com 150 mg/kg/dia (MUR-150) e 300 mg/kg/dia (MUR-300) de extrato de murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) por quinze dias.



As barras verticais sólidas à direita indicam 10 mv (variação lenta negativa). As barras horizontais sob as linhas do registro P1 indicam o tempo (1 minuto) de estimulação com KCL 2% para deflagrar a DAC. Uma vez deflagrada no córtex frontal, a DAC foi registrada pelos 2 eletrodos corticais localizados no córtex parietal (diagrama central - P1 e P2). Um terceiro eletrodo do mesmo tipo foi localizado nos ossos nasais e serviu como uma referência comum (R) para os eletrodos de registro. As linhas pontilhadas verticais indicam a latência de uma onda DAC cruzando a distância entre os dois eletrodos.

Fonte: Autor

EFEITOS DO EXTRATO DE MURICI SOBRE O STATUS OXIDATIVO DO CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS ADULTOS E IDOSOS

O *status* oxidativo do córtex cerebral de ratos adultos e idosos foi avaliado por meio da mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), da razão glutathiona reduzida/glutathiona oxidada (GSH/GSSG) e da atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) (FIGURA 10).

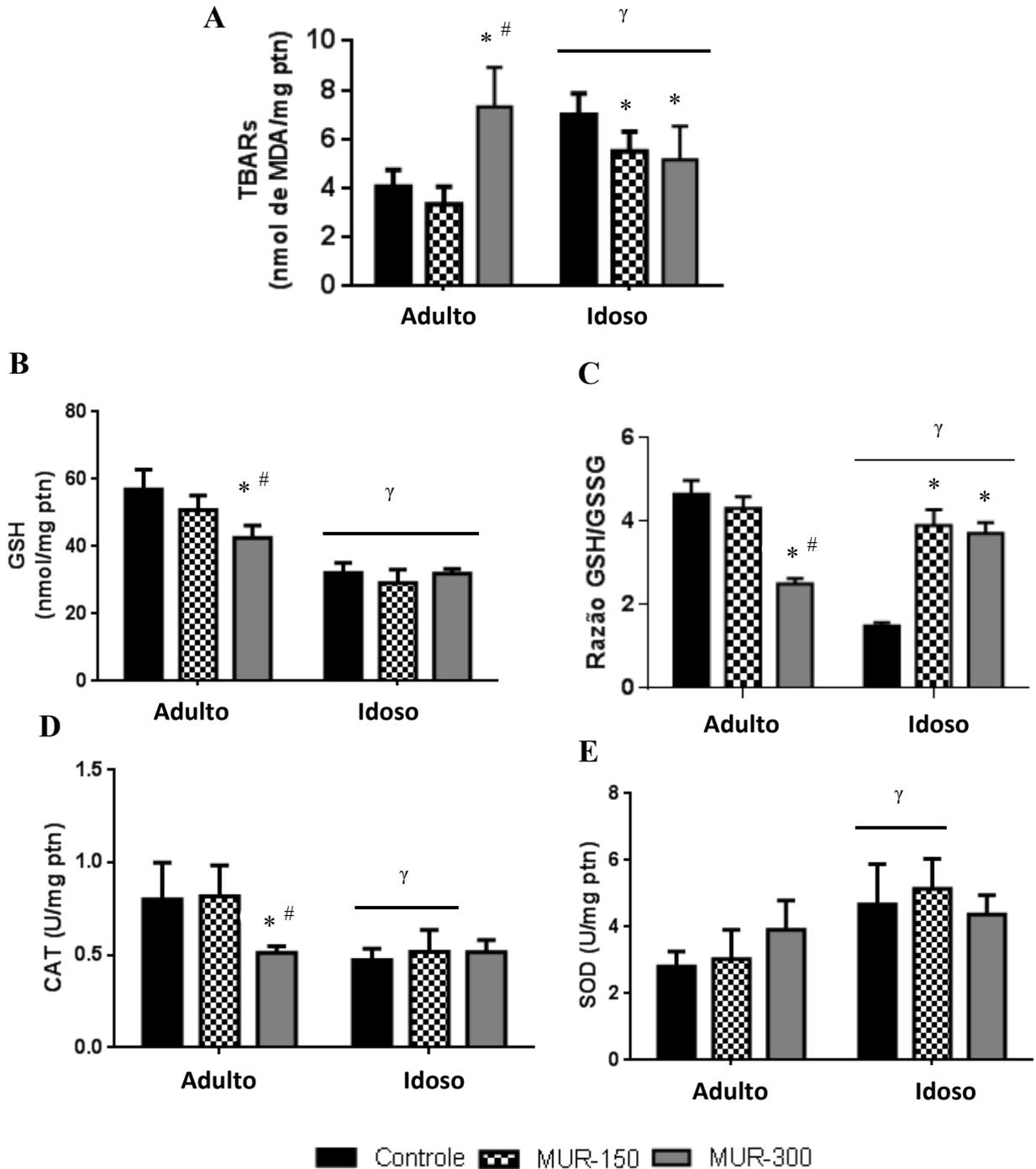
ANOVA revelou que o tratamento com extrato de murici alterou significativamente as concentrações de malondialdeído no córtex cerebral de ratos adultos e idosos ($F [5,52] = 18,134; p < 0,05$). Na condição adulto, as concentrações de MDA foram maiores no grupo MUR-300 quando comparado ao respectivo grupo controle ($p < 0,05$). Comparações *post-hoc* mostraram que o envelhecimento aumentou as concentrações de MDA no córtex cerebral de ratos. Por outro lado, os animais idosos suplementados com extrato de murici, em ambas as doses, apresentaram níveis mais baixos de MDA quando comparados ao seu controle ($p < 0,05$) (FIGURA 10 - A).

As concentrações de GSH e a razão GSH/GSSG estão apresentadas na Figura 10 - B e C, respectivamente. O extrato de murici, na maior dose (300 mg/kg/dia), reduziu as concentrações de GSH e a razão GSH/GSSG no córtex cerebral dos ratos adultos, assim como o envelhecimento ($p < 0,05$). Por outro lado, o extrato de murici, em ambas as doses, foi capaz de modificar essa condição nos animais idosos, aumentando a razão GSH/GSSG.

Quanto às enzimas antioxidantes, comparações *post-hoc* revelaram que em animais adultos, o extrato de murici na maior dose (300 mg/kg/dia) inibiu a atividade da enzima catalase, de forma semelhante ao envelhecimento. Em animais idosos, o extrato de murici não modificou a atividade desta enzima (FIGURA 10 - D).

Além disso, ANOVA revelou que o tratamento com extrato de murici não modificou significativamente a atividade da enzima SOD no córtex cerebral de animais adultos e idosos (FIGURA 10 - E) ($p > 0,05$).

Figura 10: Status oxidativo do córtex cerebral de ratos adultos (90-120 dias de idade) e idosos (600-700 dias de idade) suplementados com 150 mg/kg/dia (MUR-150) e 300 mg/kg/dia (MUR-300) de extrato de murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) por quinze dias.

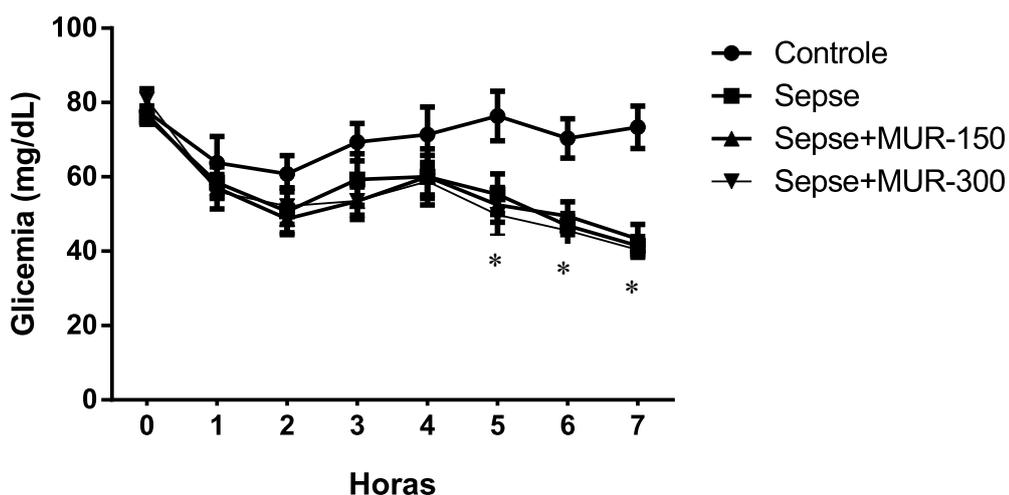


Valores estão apresentados como média \pm desvio-padrão. $n = 6 - 8$ animais por grupo. A) Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), B) Níveis de Glutaciona reduzida (GSH), C) Razão Glutaciona reduzida/Glutaciona oxidada, D) Atividade da enzima catalase (CAT), E) Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle da mesma idade. # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo MUR-150 da mesma idade. $\gamma p < 0,05$ quando comparado com o grupo jovem correspondente. **Fonte:** Autor.

PADRÃO GLICÊMICO DOS ANIMAIS ADULTOS SÉPTICOS PREVIAMENTE SUPLEMENTADOS COM EXTRATO DE MURICI

A glicemia de jejum (T0) não diferiu significativamente entre os animais de todos os grupos. Uma hora após a cirurgia de sepse ou sham (T1), a glicemia dos animais caiu e assim permaneceu ao longo de quatro horas (T1 a T4) de experimento, não havendo diferenças entre os grupos. A partir da quinta hora (T5), observou-se redução significativa da glicemia dos animais sépticos e sépticos previamente suplementados com extrato de murici, quando comparados com o grupo controle sham. Essa diferença permaneceu até o fim do experimento, após as 7 horas de cirurgia (T7) (FIGURA 11).

Figura 11: Valores de glicemia (mg/dL) de ratos adultos (90-120 dias de idade) sépticos previamente suplementados com 150 mg/kg/dia (SEPSE+MUR-150) e 300 mg/kg/dia (SEPSE + MUR-300) de extrato de murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) por quinze dias, nos tempos 0 hora (antes da sepse) e 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 horas após a sepse.



Valores estão apresentados como média \pm desvio-padrão. n = 7 animais por grupo. *p < 0.05 quando comparado com o grupo controle.

Fonte: Autor.

EFEITOS DO EXTRATO DE MURICI SOBRE A DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL EM RATOS ADULTOS SÉPTICOS

Registros eletrofisiológicos na superfície cortical de um rato *Wistar* de cada condição estudada (controle sham, sepse e sepse suplementados previamente com extrato de murici nas doses de 150 e 300 mg/kg/dia) estão apresentados na Figura 12. A variação lenta de potencial nos registros denota a presença da DAC após estimulação com KCl. De um modo geral, a aplicação tópica de KCl a 2% durante 1 minuto no orifício localizado no hemisfério direito do córtex frontal provocou uma única onda de DAC que se propagou sem interrupção até o córtex parietal, onde foi registrada. A variação lenta de potencial foi recuperada gradualmente após a DAC (FIGURA 12).

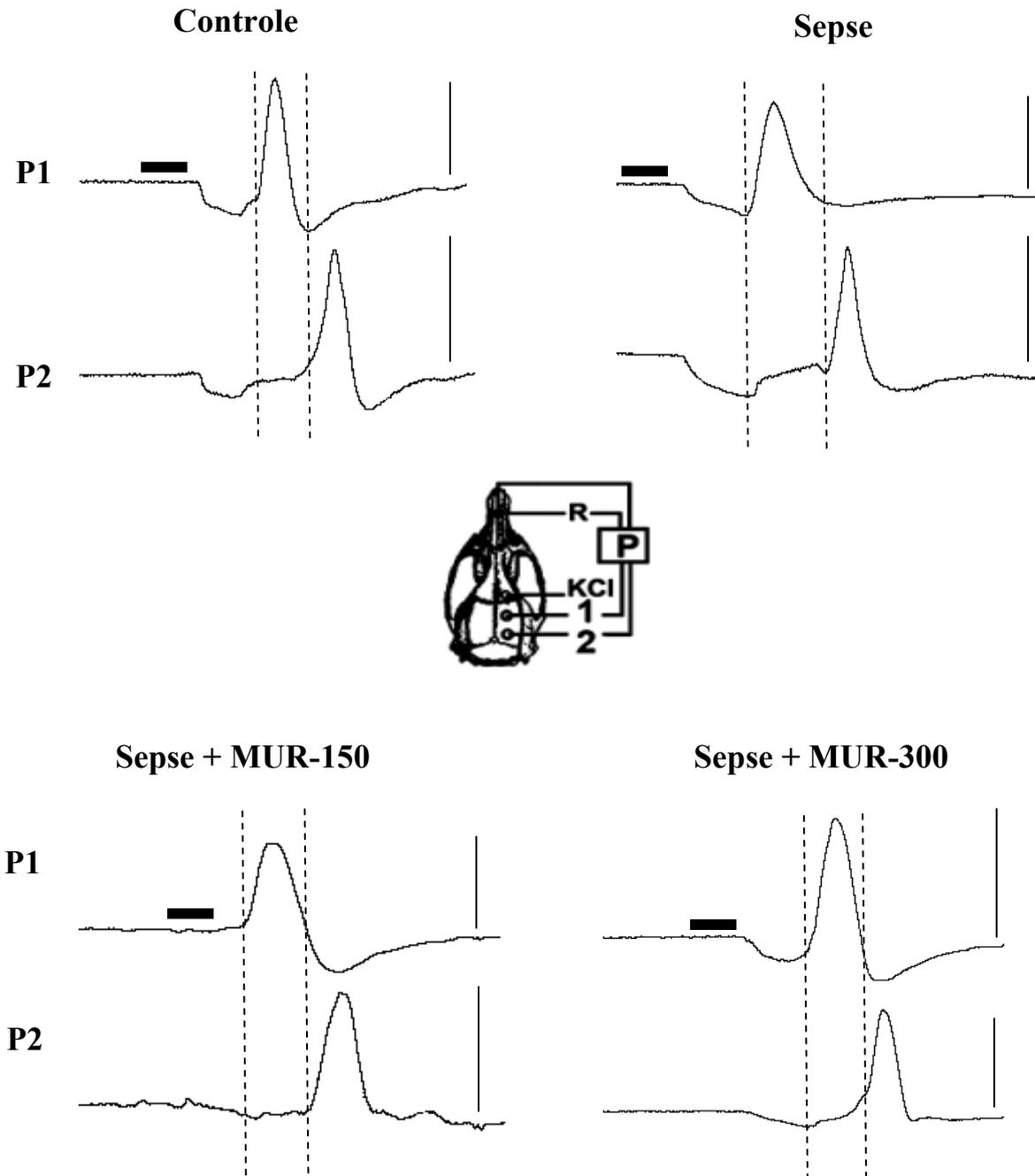
A ANOVA de uma via revelou que a sepse e o extrato de murici exerceram efeitos significantes sobre a velocidade de propagação da DAC ($F [3,812] = 1071,81$; $p < 0,05$). Comparações *post-hoc* mostraram que a velocidade foi menor no grupo sepse ($p < 0,05$). Ratos sépticos que foram previamente suplementados com extrato de murici nas doses de 150 e 300 mg/kg/dia apresentaram velocidades de propagação da DAC mais altas ($p < 0,05$), independentemente da dose testada (TABELA 3).

Tabela 3: Velocidade de propagação da depressão alastrante cortical (mm/min) em ratos adultos (90-120 dias de idade) sépticos previamente suplementados com 150 mg/kg/dia (MUR-150) e 300 mg/kg/dia (MUR-300) de extrato de murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) por quinze dias.

Grupos Experimentais	Velocidade da DAC (mm/min)
Controle	3,70 ± 0,14
Sepse	2,76 ± 0,16*
Sepse + MUR-150	3,35 ± 0,23*#
Sepse + MUR-300	3,43 ± 0,15*#

Valores estão apresentados como média ± desvio-padrão. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle. # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo sepse.

Figura 12: Registro eletrofisiológico (variação lenta de voltagem) da depressão alastrante cortical (DAC) em ratos adultos (90-120 dias de idade) sépticos suplementados com 150 mg/kg/dia (Sepse+ MUR-150) e 300 mg/kg/dia (Sepse+ MUR-300) de extrato de murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) por quinze dias.



As barras verticais sólidas à direita indicam 10 mv (variação lenta negativa). As barras horizontais sob as linhas do registro P1 indicam o tempo (1 minuto) de estimulação com KCl 2% para deflagrar a DAC. Uma vez deflagrada no córtex frontal, a DAC foi registrada pelos 2 eletrodos corticais localizados no córtex parietal (diagrama central - P1 e P2). Um terceiro eletrodo do mesmo tipo foi localizado nos ossos nasais e serviu como uma referência comum (R) para os eletrodos de registro. As linhas pontilhadas verticais indicam a latência de uma onda DAC cruzando a distância entre os dois eletrodos. **Fonte:** Autor.

EFEITOS DO EXTRATO DE MURICI SOBRE O STATUS OXIDATIVO DO CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS ADULTOS SÉPTICOS

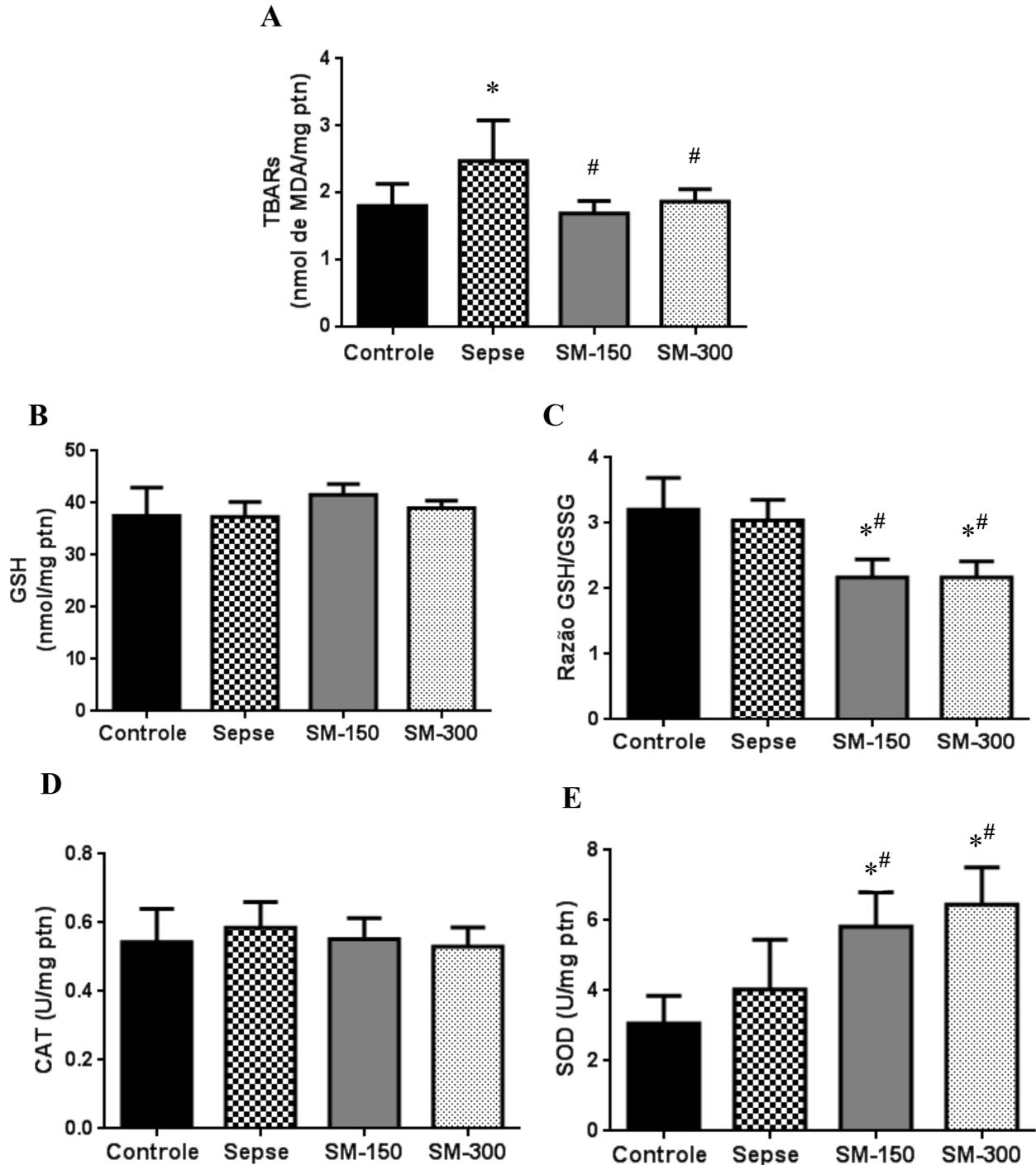
O *status* oxidativo do córtex cerebral de ratos adultos sépticos ou sépticos previamente suplementados com extrato de murici foi avaliado por meio da mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), da razão glutathiona reduzida/glutathiona oxidada (GSH/GSSG) e da atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) (FIGURA 13).

ANOVA revelou que o tratamento com extrato de murici alterou significativamente as concentrações de malondialdeído no córtex cerebral dos animais sépticos ($F [3,34] = 8,635$; $p < 0,05$). Comparações *post-hoc* mostraram que a sepse aumentou as concentrações de MDA ($2,47 \pm 0,60$ nM MDA/mg proteína), quando comparada ao grupo controle sham ($1,79 \pm 0,33$ nM MDA/mg proteína) ($p < 0,05$). Por outro lado, os animais sépticos que foram previamente suplementados com extrato de murici, nas doses de 150 e 300 mg/kg/dia, apresentaram valores de MDA mais baixos, $1,69 \pm 0,20$ e $1,86 \pm 0,21$ nM MDA/mg proteína, respectivamente, se comparados ao grupo controle (FIGURA 13 – A).

As concentrações de GSH e a razão GSH/GSSG estão apresentadas na Figura 13 - B e C, respectivamente. As concentrações de GSH não diferiram significativamente entre os grupos ($F [3,30] = 2,971$; $p = 0,0475$). A condição sepse não alterou a razão GSH/GSSG. No entanto, o extrato do murici, em ambas as doses, reduziu a razão GSH/GSSG ($p < 0,05$).

A avaliação da atividade das enzimas antioxidantes por meio da ANOVA mostrou que a condição sepse e o extrato de murici não modificaram significativamente a atividade da enzima catalase no córtex cerebral dos animais (FIGURA 13 – D). Todavia, comparações *post-hoc* revelaram que animais jovens sépticos suplementados previamente com extrato de murici na dose maior (300 mg/kg) exibiram aumento da atividade da enzima SOD ($6,45 \pm 1,06$ U/mg proteína), quando comparados ao grupo controle ($3,06 \pm 0,79$ U/mg proteína) e séptico ($3,75 \pm 1,38$ U/mg proteína), independentemente da dose testada (FIGURA 13 - E).

Figura 13: Status oxidativo do córtex cerebral de ratos adultos (90-120 dias de idade) sépticos previamente suplementados com 150 mg/kg/dia (SM-150) e 300 mg/kg/dia (SM-300) de extrato de murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) por quinze dias.



Valores estão apresentados como média \pm desvio-padrão. n = 8 animais por grupo. A) Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), B) Níveis de Glutathiona reduzida (GSH), C) Razão Glutathiona reduzida/Glutathiona oxidada, D) Atividade da enzima catalase (CAT), E) Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). *p < 0.05 quando comparado com o grupo controle. #p < 0.05 quando comparado com o grupo sepse. **Fonte:** Autor.

7 DISCUSSÃO

EFEITOS DO EXTRATO DE MURICI SOBRE A DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL E O *STATUS* OXIDATIVO CEREBRAL DE RATOS ADULTOS E IDOSOS

Neste estudo, a depressão alastrante cortical (DAC) foi usada como modelo experimental para identificar como a suplementação com extrato de murici pode afetar a eletrofisiologia do córtex cerebral. Observou-se um efeito diferencial do extrato de murici a depender da dose suplementada em ambas as idades estudadas (animais adultos e idosos). Ele promoveu um efeito desacelerador na propagação da DAC quando a dose administrada era de 150 mg/kg/dia e, um efeito acelerador quando essa era dose duplicada (300 mg/kg/dia) (TABELA 2). A desaceleração da DAC é compatível com um efeito antioxidante do extrato de murici; enquanto que sua aceleração está relacionada a um efeito pró-oxidante do extrato em animais adultos. Considerando-se as evidências obtidas no trabalho de Mendes-da-Silva et al. (2014), tais dados se assemelham aos obtidos com a vitamina C.

Neste trabalho, a menor dose de extrato de murici, que é fonte importante de carotenóides, conduziu à desaceleração da DAC, corroborando achados anteriores em que a suplementação com carotenóides, como a astaxantina, reverteu os efeitos do consumo crônico de etanol sobre a aceleração da DAC (BEZERRA et al., 2005, ABADIE-GUEDES et al., 2008). O etanol é um agente deletério para o cérebro porque leva à produção de ERO e, conseqüentemente, ao estresse oxidativo (GONG et al., 2017).

A DAC é um fenômeno eletrofisiológico que tem sido implicado em desordens neurológicas, como a epilepsia e a enxaqueca com aura (SÁNCHEZ-PORRAS, 2014). Dentre os fatores capazes de influenciar a ocorrência da DAC, tem-se a presença de ERO (READ; PARSONS, 2000). Estudos experimentais indicam que o aumento da excitabilidade neuronal necessário para iniciar a DAC pode ser provocado por radicais livres (GRINBERG; VAN DRONGELEN; KRAIG, 2012; MALKOV et al., 2014). Não obstante, a DAC *per se* aumenta a produção de ERO no cérebro de ratos (VIGGIANO et al., 2011). Portanto, os antioxidante do extrato de

murici podem ser uma alternativa terapêutica para a prevenção e tratamento de patologias associadas com a DAC.

Vários fatores ambientais podem aumentar a produção de ERO e levar ao estresse oxidativo, como o envelhecimento. O estresse oxidativo é considerado um dos elementos-chave no processo do envelhecimento (HARMAN, 1956) e de doenças neurodegenerativas, como *Alzheimer*, ao promover a oxidação de proteínas, lipídios e DNA, modificando dessa forma, a funcionalidade das células (YIN et al., 2016). Tatarkova et al. (2016) identificaram que o estresse oxidativo no córtex cerebral de ratos idosos é devido à disfunção mitocondrial. No presente trabalho, o envelhecimento reduziu a velocidade de propagação da DAC, como previamente descrito por Guedes, Amorim e Teodósio (1996) e Batista-de-Oliveira et al. (2012). Adicionalmente, os ratos idosos exibiram atividade da SOD elevada, o que indica aumento na produção de superóxido, e uma diminuição na atividade da catalase. Todas estas alterações indicam um possível acúmulo de peróxido de hidrogênio no córtex cerebral, o que promove dano oxidativo, tal como indicado pelo aumento dos níveis de MDA nesses animais. No entanto, o tratamento com extrato de murici neutralizou o desequilíbrio redox induzido pelo envelhecimento, uma vez que reduziu os níveis de MDA. Outro estudo, mostrou um efeito antioxidante do extrato de murici na dose de 300 mg/kg/dia em ratos diabéticos (PEREZ-GUTIERREZ et al., 2010).

As vias pelas quais o envelhecimento reduz a propagação da DAC não estão claras, mas provavelmente há a participação de múltiplas vias de sinalização e não somente o envolvimento de radicais livres. À medida que o cérebro envelhece, ERO oxidam canais iônicos de cálcio e potássio e alteram os receptores, como o NMDA (N-metil-D-Aspartato) (PATEL; SESTI, 2016), os quais são necessários para a iniciação e propagação da DAC (TOTTENE; URBANI; PIETROBON, 2011). Os neurotransmissores ácido gama-aminobutírico (GABA) e glutamato, por exemplo, estão reduzidos no córtex dorsolateral pré-frontal de indivíduos idosos (NODA et al., 2017), o que também pode ser um fator a influenciar a neuroexcitabilidade. Além disso, ratos idosos apresentam maior número de astrócitos no córtex cerebral (PEINADO et al., 1998), o que também dificulta a deflagração da DAC (SMITH et al., 2006).

Os mecanismos pelos quais o extrato de murici module a propagação da DAC ainda não foram totalmente esclarecidos, especula-se que tais efeitos

eletrofisiológicos são decorrentes da ação de compostos bioativos presentes no extrato. Este extrato é rico em compostos antioxidantes como o ácido ascórbico, carotenóides e polifenóis, especialmente a quercetina (Tabela 1). As xantofilas, como a luteína e a zeaxantina, são os carotenóides predominantes, representando 94% dos carotenóides totais (MARIUTTI; RODRIGUES; MERCADANTE, 2013).

A ação antioxidante da quercetina é bem estabelecida; ela atua como um potente doador de elétrons para as ERO, sequestrando o peróxido de hidrogênio e age como um quelante de metais oxidantes (SUGANTHY et al., 2016). A quercetina também aumenta os níveis de GSH, via ativação do fator de transcrição “*Nuclear factor-E2-related factor*” (Nrf2) (ARREDONDO et al., 2010), além de restaurar os níveis de serotonina no cérebro de ratos (ZARGAR et al., 2016). A serotonina é um importante neurotransmissor envolvido no controle neural e sua depleção está associada com aumento da excitabilidade cortical (SUPORN SILPCHAI et al., 2006; LE GRAND et al. 2011; SAENGJAROENTHAM et al., 2015).

Por sua vez, as xantofilas representam cerca de 70% dos carotenóides totais em todas as regiões cerebrais (JOHNSON et al., 2013), e estão concentradas seletivamente nas membranas lipídicas, as quais são especialmente susceptíveis ao dano oxidativo. Essa localização é ideal para as xantofilas atuarem como antioxidantes lipossolúveis, que é o mecanismo mais aceito através do qual a luteína e a zeaxantina protegem o tecido neural contra os radicais livres e, conseqüentemente, contra doenças neurodegenerativas (WIDOMSKA, ZAREBA, SUBCZYNSKI, 2016). Contudo, os efeitos fisiológicos das xantofilas vão além da ação antioxidante. Luteína e zeaxantina podem estar envolvidas na funcionalidade das membranas sinápticas, sendo capazes de alterar a fluidez, a troca de íons, a difusão de oxigênio e a estabilidade da membrana, modulando a comunicação neuronal através das junções *gap* (ERDMAN JR. et al., 2015).

A mielina cortical, que forma uma bainha isolante em torno dos axônios para acelerar a velocidade do impulso nervoso, pode estar envolvida na estabilização do conteúdo de íons extracelulares, sendo um fator determinante para a velocidade de propagação da DAC. Neste sentido, a desmielinização cortical está associada com a aceleração da DAC (MERKLER et al., 2009). Por outro lado, a luteína pode se acumular na mielina e influenciar sua integridade estrutural, mantendo a comunicação adequada entre os neurônios (ERDMAN JR. et al., 2015) e, assim, reduzir a velocidade da DAC em animais adultos saudáveis.

Porém, ácido ascórbico, carotenoides e polifenóis podem atuar como pró-oxidantes se presentes em concentrações elevadas ou na presença de metais de transição (POLYAKOV et al., 2001; RIETJENS et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2006). Tem sido demonstrado que ratos suplementados com ácido ascórbico na dose de 30 mg/kg/dia apresentam níveis reduzidos de MDA no córtex cerebral de ratos e desaceleração da velocidade da DAC; enquanto que as doses de 60 mg/kg/dia e de 120 mg/kg/dia aumentam os níveis de MDA e aceleram a DAC (MENDES-DA-SILVA et al., 2014). Resultado semelhante ao que foi encontrado em nosso estudo nos ratos adultos saudáveis suplementados com 300 mg/kg de extrato (TABELA 2, FIGURA 10-A).

Nossos achados parecem reforçar a ideia de que determinadas substâncias podem exercer ações pró ou antioxidantes a depender da dosagem utilizada. Desse modo elas podem modular diferentemente a propagação da DAC.

EFEITOS DO EXTRATO DE MURICI SOBRE A DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL E O *STATUS* OXIDATIVO CEREBRAL DE RATOS SÉPTICOS

Além do envelhecimento, a sepse é outra condição que pode alterar a produção de ERO. Neste estudo, demonstrou-se pela primeira vez que a sepse desacelera a DAC, e que a administração prévia de extrato de murici antagoniza este efeito e protege o cérebro contra o dano oxidativo em ratos adultos (TABELA 3, FIGURA 13).

No nosso estudo, o efeito da sepse em reduzir a velocidade de propagação da DAC foi semelhante ao da pilocarpina (GUEDES; VASCONCELOS, 2008). Essa droga, em altas doses, pode induzir *status* epiléptico, o que aumenta marcadamente o estresse oxidativo no córtex cerebral de ratos (TEJADA et al., 2007).

Outro mecanismo que pode estar envolvido na resposta encontrada seria o desequilíbrio no metabolismo de aminoácidos e de neurotransmissores. Dentre estes sistemas de neurotransmissão, os sistemas gabaérgico e serotoninérgico, provavelmente estão envolvidos nos mecanismos subjacentes a neuroexcitabilidade durante a sepse (DAL-PIZZOL; TOMASI; RITTER, 2014). Kadoi e Saito (1996) observaram aumento na atividade do receptor do ácido gama-aminobutírico-A (GABA_A) no cérebro de ratos sépticos. O GABA é o principal neurotransmissor

inibitório do cérebro e as drogas agonistas do receptor GABA_A são capazes de reduzir a velocidade de propagação da DAC (HOLLAND; AKERMAN; GOADSBY, 2010). Quanto à serotonina, seus níveis estão aumentados no plasma (LI et al., 2016) e no córtex cerebral de ratos sépticos (SHIMIZU et al., 1999). Por sua vez, alguns trabalhos têm relatado que o aumento da disponibilidade cerebral da serotonina através de fármacos como a fluoxetina (MONTEIRO et al., 2015) e o citalopram (GUEDES et al., 2002), reduz a excitabilidade cortical.

Dentro do conjunto de alterações sistêmicas produzidas pela infecção, destaca-se o desbalanço no metabolismo da glicose (BRANCO et al., 2007). Em ratos, a peritonite é caracterizada pelas fases de hiperglicemia (2h), euglicemia (6h) e hipoglicemia (24h). Essa hipoglicemia parece decorrer da captação elevada de glicose pelos tecidos ricos em macrófagos, como é o caso do tecido intestinal (MAITRA; WOJNAR; LANG, 2000). Geralmente, os baixos níveis glicêmicos impostos pela peritonite levam à redução da respiração mitocondrial e da produção de ATP (LEWIS; BILLIAR; ROSENGART, 2016). Estes dois fatores podem contribuir para redução da propagação da DAC (SONN; MAYEVSKY, 2001). Em nosso trabalho, não se observou hiperglicemia inicial nos animais. Porém, após 4h de sepse, a fase de euglicemia foi seguida de queda significativa da glicemia, o que indica a severidade do processo infeccioso (MILLER et al., 1980; RATTARASARN, 1997). De fato, 20% dos animais morreram durante a sepse e foram excluídos da pesquisa.

As taxas elevadas de morbidade e de mortalidade na sepse estão associadas à disfunção cerebral aguda. Essa disfunção é um quadro de encefalopatia com fisiopatologia complexa que resulta de resposta inflamatória à infecção, produção excessiva de ERO, ativação microglial exacerbada, perfusão cerebral prejudicada e alteração na ação de neurotransmissores (SONNEVILLE et al., 2013). Em conjunto, tais fatores têm sido implicados no declínio cognitivo de pacientes sobreviventes à sepse (GOTZ et al., 2014; ANNANE; SHARSHA, 2014). Portanto, o uso de antioxidantes, como o extrato de murici, representa uma alternativa terapêutica que pode impactar positivamente nas funções neurais.

Pacientes adultos com sepse grave exibem níveis séricos elevados de MDA, um biomarcador da peroxidação lipídica induzida pelo estresse oxidativo (LORENTE et al., 2013). Em nosso trabalho, a mensuração dos níveis de MDA foi realizada através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no córtex cerebral de ratos

sépticos, e mostrou que as membranas lipídicas do cérebro são alvos importantes das ERO (FIGURA 13). Estes resultados estão de acordo com Barichello et al. (2006) e Vieira et al. (2014), que reportaram aumento de MDA no córtex cerebral após a sepse. Esse aumento do estresse oxidativo está associado ao incremento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (YOKOO et al., 2012), que são capazes de ativar a microglia, levando a produção de mais citocinas e ERO no sistema nervoso (HENRY et al., 2009, BOZZA et al., 2013).

Por outro lado, a administração prévia com extrato de murici preveniu os efeitos da sepse sobre a DAC, o aumento da peroxidação lipídica e aumentou a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e da glutathione peroxidase (indicada pela menor razão GSH/GSSG). Semelhantemente, Perez-Gutierrez et al. (2010) observaram redução de MDA e aumento da atividade da enzima SOD e de GSSG no fígado de ratos diabéticos suplementados com extrato de murici (300 mg/kg/dia).

A SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio, por meio de oxidações e reduções sucessivas dos íons metálicos presentes no sítio ativo (VALKO et al., 2006), contribuindo para a redução de ERO circulantes. Em pacientes com choque séptico, COSTA et al. (2016) verificaram elevação sérica de MDA e atividade eritrocitária reduzida da SOD1. Nesse trabalho, a atividade elevada da SOD1 eritrocitária foi associada com proteção contra injúria renal, o que reforça a importância da SOD como um dos principais antioxidantes endógenos.

Já a glutathione peroxidase catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em água, protegendo as células do estresse oxidativo. Mas sua atividade está reduzida no plasma de pacientes sépticos (LEE et al., 2017). Neste trabalho, não verificamos alterações nas concentrações de glutathione reduzida e oxidada no cérebro de ratos sépticos. Todavia, o provável aumento da atividade da GPx no cérebro de ratos sépticos pré-tratados com extrato de murici parece ter sido crucial para redução do estresse oxidativo cerebral.

Em nossos achados hipotetizamos que o mecanismo mais provável está baseado nas propriedades bioativas dos componentes do extrato de murici, marcadamente a quercetina e a luteína, que são moléculas antioxidantes e antiinflamatórias (LIAO; LIN, 2015, CHENG et al., 2015). Nós sugerimos que a neutralização de radicais livres pela luteína e quercetina seria um possível

mecanismo pelo qual o extrato de murici poderia antagonizar os efeitos da sepse sobre a DAC.

O efeito neuroprotetor da quercetina contra o estresse oxidativo provocado pela sepse tem sido reportado em ratos, em que o tratamento prévio com quercetina reduziu os níveis de MDA e de óxido nítrico (EL-GAWADA; KHALIFA, 2001) e preservou a função vascular (GERIN et al., 2015). Ainda há evidências de que a quercetina reduz a liberação da proteína HMGB1 (*High Mobility Group Box 1*) e a função inflamatória em animais endotoxêmicos, via inibição do fator de transcrição NF-kappa B (TANG et al., 2009). Outro possível mecanismo envolve a participação da luteína na supressão da resposta inflamatória da microglia, via ativação do fator transcricional Nrf2 (*Nuclear factor-E2-related factor*), resultando em níveis mais baixos de TNF- α , IL-1 e óxido nítrico e expressão reduzida da ciclooxigenase-2 (WU et al., 2015).

Em conclusão, a sepse reduziu significativamente a excitabilidade cortical de ratos, aumentando a resistência para a DAC. Nossos resultados fornecem evidências claras do efeito neuroprotetor do extrato de murici contra o dano oxidativo e a alteração eletrofisiológica provocada pela sepse. Acrescentamos que os efeitos do murici merecem ser explorados mais amplamente. Por exemplo, através de estudos comportamentais que possam avaliar seu impacto sobre o dano cognitivo imposto pela encefalopatia séptica.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato do murici modulou a excitabilidade cortical, avaliada pela DAC, e o estresse oxidativo no córtex cerebral de ratos jovens, de maneira dependente da dose. A menor dose (150 mg/kg/dia) reduziu a velocidade da DAC; enquanto que a maior dose (300 mg/kg/dia) acelerou a DAC e aumentou o estresse oxidativo.

O envelhecimento e a sepse aumentaram o estresse oxidativo e reduziram a neuroexcitabilidade cortical em ratos, observada através das menores velocidades de propagação da DAC. Por outro lado, o extrato de murici exerceu efeito antagônico, reduzindo o dano oxidativo e melhorando as alterações eletrofisiológicas provocadas por estas condições.

Considerando-se a importância da manutenção do estado *redox* das células do sistema nervoso para a redução do risco de doenças neurodegenerativas e de complicações neurológicas associadas ao estresse oxidativo, o consumo moderado de frutos de murici pode contribuir positivamente para a saúde da população. Contudo, mais estudos são necessários para esclarecer a extensão da atividade neuroprotetora deste fruto.

Os resultados obtidos sugerem perspectivas que poderiam ampliar o conhecimento sobre os temas relevantes que foram abordados neste estudo:

- Determinação dos efeitos do extrato de murici sobre a atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx);
- Investigação dos efeitos do extrato de murici sobre biomarcadores inflamatórios (TNF- α , IL-1) e dano neuronal (Fluoro-Jade C);
- Avaliação dos efeitos do extrato de murici sobre o metabolismo de neurotransmissores, tais como GABA e serotonina;
- Estudo comportamental dos possíveis efeitos do extrato de murici sobre o dano cognitivo imposto pela sepse;
- Análise das ações antioxidantes da quercetina e luteína sobre o fenômeno da depressão alastrante cortical em ratos adultos, idosos e sépticos;
- Avaliação dos efeitos do extrato de murici sobre a DAC em diferentes estados nutricionais.

REFERÊNCIAS

ABADIE-GUEDES, R. et al. Dose-dependent effects of astaxanthin on cortical spreading depression in chronically ethanol-treated adult rats. **Alcohol Clin Exp Res.**, v.32, p.1417–21, 2008.

ABADIE-GUEDES, R.; GUEDES, R.C.A.; BEZERRA, R.S. The Impairing Effect of Acute Ethanol on Spreading Depression is Antagonized by Astaxanthin in Rats of 2 Young-Adult Ages. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 36, n. 9, 2012.

ABADIE-GUEDES, R.; BEZERRA, R.S.; GUEDES, R.C. Alpha-Tocopherol Counteracts the Effect of Ethanol on Cortical Spreading Depression in Rats of Various Ages, With and Without Ethanol Abstinence. **Alcohol Clin Exp Res.**, v.40, n.4, 2016.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.**, v. 105, p. 105:121-6, 1984.

ALVES, G. L.; FRANCO, M. R. B. Headspace gas chromatography–mass spectrometry of volatile compounds in murici (*Byrsonima crassifolia* L. Rich). **Journal of Chromatography**, v. 985, n. 4, p. 297-301, 2003.

ANNANE, D.; SHARSHAR, T. Cognitive decline after sepsis. **Lancet Respir Med.**, v.3, n.1, 2015.

ARREDONDO, F. et al. After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 738–747, 2010.

ATAIE, A.; SHADIFAR, M.; ATAEE, R. Polyphenolic Antioxidants and Neuronal Regeneration. **Basic Clin Neurosci.**, v.7, n.2, 2016.

AYAR, G. et al. Effects of paraoxonase, arylesterase, ceruloplasmin, catalase, and myeloperoxidase activities on prognosis in pediatric patients with sepsis. **Clin Biochem.** 2017.

BAIERLE, M. et al. Relationship between Inflammation and Oxidative Stress and Cognitive Decline in the Institutionalized Elderly. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2015.

BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, v. 23, n. 4, 2010.

BARRETO, G.P.M.; BENASSI, M.T.; MERCADANTE, A.Z. Bioactive Compounds from Several Tropical Fruits and Correlation by Multivariate Analysis to Free Radical Scavenger Activity. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.20, n.10, p.1856-1861, 2009.

BARICHELLO, T. et al. Oxidative variables in the rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. **Crit Care Med.**, v.34, p. 886–889, 2006.

BATISTA-DE-OLIVEIRA, M. et al. Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: A spreading depression analysis. **Experimental Gerontology.**, v. 47, p. 452–457, 2012.

BAVUNOGLU, I. et al. Oxidative stress parameters and inflammatory and immune mediators as markers of the severity of sepsis. **J Infect Dev Ctries.**, v. 10, n. 10, 2016.

BENNETT, S.R. Sepsis in the intensive care unit. **Surgery**, v.30, n.12, 2012.

BEZERRA, R.S. et al. Shrimp carotenoids protect the developing rat cerebral cortex against the effects of ethanol on cortical spreading depression. **Neurosci Lett.**, v. 391, p. 51–5, 2005.

BOUAMAMA, S. et al. Effects of exogenous vitamin A, C, E and NADH supplementation on proliferation, cytokines release, and cell redox status of lymphocytes from healthy aged subjects. **Appl Physiol Nutr Metab.**, 2017.

BOZZA, F.A. et al. Bioenergetics, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the pathophysiology of septic encephalopathy. **Shock**, v. 39, n. 7, 2013.

BRADBURY, J. Docosahexaenoic acid (DHA): An ancient nutrient for the modern human brain. **Nutrients**, v.3, p. 529–554, 2011.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v.72, p. 248-54, 1976.

BRANCO, R.G. et al. Glycemic control and insulin therapy in sepsis and critical illness. **J Pediatr.**, v.83, 2007.

BRATIC, A.; LARSSON, N. The role of mitochondria in aging. **The Journal of Clinical Investigation**, v.123, n. 3, 2013.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, Vol. 56, No. 11, pp.317-333, 1998.

BROINIZI, P.R.B. et al. Propriedades antioxidantes em subproduto do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a lipoperoxidação e o perfil de ácidos graxos poliinsaturados em ratos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 44, n. 4, 2008.

CADENAS, E.; DAVIES, K.J.A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, n. 3/4, p. 222–230, 2000.

CATALÃO, C.H. et al. Brain Oxidative Stress During Experimental Sepsis Is Attenuated by Simvastatin Administration. **Mol Neurobiol.**, 2016.

CENCIONI, C. et al. Oxidative stress and epigenetic regulation in ageing and age-related diseases. **Int J Mol Sci.**, v. 14, n. 9, p. 17643-63, 2013.

CHENG, F. Lutein protects against ischemia/reperfusion injury in rat skeletal muscle by modulating oxidative stress and inflammation. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v.37, n.4, p.329–334, 2015.

CIPOLLA, M. J. et al. Pregnant serum induces neuroinflammation and seizure activity via TNF α . **Exp. Neurol.**, v. 234, p.398–404, 2012.

COMIM, C.M. et al. Alterations in Inflammatory Mediators, Oxidative Stress Parameters and Energetic Metabolism in the Brain of Sepsis Survivor Rats. **Neurochem Res.**, v.36, p. 304–311, 2011.

COSTA, N.A. et al. Erythrocyte superoxide dismutase as a biomarker of septic acute kidney injury. **Ann. Intensive Care**, v.6, n.95, 2016.

CUI, H. et al. Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. **Journal of Signal Transduction**, v. 2012, Article ID 646354, 2011.

DAGA, M.K. et al. Markers of Oxidative Stress and Clinical Outcome in Critically ill Septic Patients: A Preliminary Study from North India. **J ClinDiagn Res.**, v.10, n.8, 2016.

DAL-PIZZOL, F.; TOMASI, C.D.; RITTER, C. Septic encephalopathy: does inflammation drive the brain crazy? **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 36, 2014.

EL-BACHÁ, R.S.; LIMA-FILHO, J.L.; GUEDES, R.C.A. Dietary antioxidant deficiency facilitates cortical spreading depression induced by photo-activated riboflavin. **Nutr Neurosci.**, v. 1, p. 205–12, 1998.

EL-GAWAD, H.M.; KHALIFA, A.E. Quercetin, coenzyme Q10, and L-canavanine as protective agents against lipid peroxidation and nitric oxide generation in endotoxin-induced shock in rat brain. **Pharmacological Research.**, v. 43, n 3, 2001.

ERDMAN JR., J.W. et al. Lutein and Brain Function. **Foods**, v. 4, n. 4, p. 547–564, 2015.

FLORES-MATEO, G. E. et al. Oxidative Stress Is Associated with an Increased Antioxidant Defense in Elderly Subjects: A Multilevel Approach. **PLoS ONE**, v.9, n.9, 2014.

GERIN, F. et al. The Effects of Quercetin on Acute Lung Injury and Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress in the Rat Model of Sepsis. **Inflammation**, 2015.

GONG, Y.S. et al. Chronic Ethanol Consumption and Thiamine Deficiency Modulate β -Amyloid Peptide Level and Oxidative Stress in the Brain. **Alcohol Alcohol.** v.9, n.52, p.159-164, 2017.

GORDON, A. et al. Phenolic Constituents and Antioxidant Capacity of Four Underutilized Fruits from the Amazon Region. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, n.14, p.7688–7699, 2011.

GÖTZ, T. et al. Long-term sequelae of severe sepsis: cognitive impairment and structural brain alterations – na MRI study (LossCog MRI). **BMC Neurology**, v.14, 2014.

GRINBERG, Y. Y., VAN DRONGELEN, W.; KRAIG R. P. Insulin-like growth factor-1 lowers spreading depression susceptibility and reduces oxidative stress. **J. Neurochem.**, v. 122, p. 221–229, 2012.

GRINBERG, Y.Y. et al. Insulin-like growth factor-1 abrogates microglial oxidative stress and TNF- α responses to spreading depression. **Journal of Neurochemistry**, v. 126, p. 662-672, 2013.

GUEDES, R.C.A.; AMORIM, L.F.; TEODÓRIO, N.R. Effect of aging on cortical spreading depression. **Braz J Med Biol Res.**, v. 29, p. 1407–12, 1996.

GUEDES, R.C.A. et al. Citalopram has an Antagonistic Action on Cortical Spreading Depression in Well-nourished and Early-malnourished Adult Rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 5, n.2, p. 115-123, 2002.

GUEDES, R. C. A.; ROCHA-DE-MELO, A. P.; TEODOSIO, N. R. Nutrição adequada: a base do funcionamento cerebral. **Cienc. Cult.** [online], v.56, n.1, pp. 32-35, 2004.

GUEDES, R.C.; VASCONCELOS, C.A. Sleep-deprivation enhances in adult rats the antagonistic effects of pilocarpine on cortical spreadingdepression: a dose-response study. **Neurosci Lett.**, v.442, n.2, 2008.

GUEDES, R.C.A. ; ABADIE-GUEDES, R. ; BEZERRA, R. S. The use of cortical spreading depression for studying the brain actions of antioxidants. **Nutritional Neuroscience**, p. 111-119, 2012.

GUERREIRO, M.O. et al. Plasma superoxide dismutase activity and mortality in septic patients. **J Trauma**, v.69, n.6, 2010.

GUSMÃO, E.; VIEIRA, F.A.; FONSECA JÚNIOR, E.M. Biometria de frutos e endocarpos de murici (*Byrsonimaverbascifolia* Rich. Ex A. Juss.). **Cerne**, v.12, n.1, pp.84-91, 2006.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. **Biochemical Pharmacology**, v.49, p.1341-1348, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine** (3rded.). Oxford University Press, 1999.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **J Gerontol.**, v. 11, n. 3, p. 298-300, 1956.

HELAL, S.M. et al. Immunomodulation in critically ill septic patients. **Menoufia Med J.**, v.28, n.1, 2015.

HENRY, C.J. et al. Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1 β and anti-inflammatory IL-10 cytokines. **Brain Behav. Immun.**, v. 23, p.309–317, 2009.

HERRERA-RUIZ, M. et al. Antidepressant effect and pharmacological evaluation of standardized extract of flavonoids from *Byrsonimacrassifolia*. **Phytomedicine**, v. 18, n.14, p.1255-1261, 2011.

HIGDON, J.V.; FREI, B. Obesity and Oxidative Stress: A Direct Link to CVD? **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.23, p. 365-367, 2003.

HISSIN, P.J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal Biochem.**, v. 74, p. 214-26, 1976.

HOLLAND, P.R.; AKERMAN, S.; GOADSBY, P.J. Cortical spreading depression-associated cerebral blood flow changes induced by mechanical stimulation are modulated by AMPA and GABA receptors. **Cephalalgia**, v.30, n.5, p. 519–527, 2010.

HUBBARD, W.J. et al. Cecal ligation and puncture. **Shock**, v.24, p. 52–7, 2005.

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos** /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008 p. 1020.

JEREMIAS, I.C. The Decrease on Na⁺, K⁺-ATPase Activity in the Cortex, but not in Hippocampus, is Reverted by Antioxidants in an Animal Model of Sepsis. **Mol Neurobiol.**, v. 46, p.467–474, 2012.

JIA, Z. et al. Erythropoietin Attenuates the Memory Deficits in Aging Rats by Rescuing the Oxidative Stress and Inflammation and Promoting BDNF Releasing. **Mol Neurobiol.**, 2015.

JOHNSON, E.J. et al. Relationship between Serum and Brain Carotenoids, α -Tocopherol, and Retinol Concentrations and Cognitive Performance in the Oldest Old from the Georgia Centenarian Study. **Journal of Aging Research**, 2013.

KADOI, Y.; SAITO, S. An alteration in the gamma-aminobutyric acid receptor system in experimentally induced septic shock in rats. **Crit Care Med.**, v.24, n.2,1996.

KANEAI, N. et al. Tocotrienol improves learning and memory deficit of aged rats. **J. Clin. Biochem. Nutr.**, v. 58, n. 2, 2016.

LAURITZEN, M. et al. Clinical relevance of cortical spreading depression in neurological disorders: migraine, malignant stroke, subarachnoid and intracranial hemorrhage, and traumatic brain injury. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 31, p. 17–35, 2011.

LEÃO, A. A. P. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. **Journal of Neurophysiology**, v.7, p. 359-390, 1944.

LEÃO, A.A.P. Further observation, on spreading depression of activity in cerebral cortex. **Journal of Neurophysiology**, (10): 409-414, 1947.

LEE, W.J. et al. Comparison of glutathione peroxidase-3 protein expression and enzyme bioactivity in normal subjects and patients with sepsis. **Clin Chim Acta.**, 2017.

LE GRAND, S.M. et al. Serotonin Depletion Leads to Cortical Hyperexcitability and Trigeminal Nociceptive Facilitation via the Nitric Oxide Pathway. **Headache**, v.51, p.1152-1160, 2011.

LEOPOLD, J.A.; LOSCALZO, J. Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v.47, p.1673–1706, 2009.

LEWIS, A.J.; BILLIAR, T.R.; ROSENGART, M.R. Biology and Metabolism of Sepsis: Innate Immunity, Bioenergetics, and Autophagy. **Surg Infect (Larchmt)**, v.17, n.3, 2016.

LI, Y. Sepsis-induced elevation in plasma serotonin facilitates endothelial hyperpermeability. **Sci Rep.**, v.6, 2016.

LIAO, Y.R.; LIN, J.Y. Quercetin intraperitoneal administration ameliorates lipopolysaccharide-induced systemic inflammation in mice. **Life Science**, v.137, 2015.

LIMA, D.B. et al. Evaluation of phenolic compounds content and in vitro antioxidant activity of red wines produced from *Vitis labrusca* grapes. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 2011.

LIOCHEV, S.I. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. **Free Radical Biology and Medicine**, 2013.

LOPES-DE-MORAIS, A. et al. Neonatal dexamethasone accelerates spreading depression in the rat, and antioxidant vitamins counteract this effect. **Brain Research**, v. 1 5 9 1, p. 9 3 – 1 0 1, 2014.

LORENTE, L. et al. Sustained high serum malondialdehyde levels are associated with severity and mortality in septic patients. **Crit Care**, v.17, 2013.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**, vol. 1. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2009.

MAITRA, S.R.; WOJNAR, M.M.; LANG, C.H. Alterations in tissue glucose uptake during the hyperglycemic and hypoglycemic phases of sepsis. **Shock**, v.13, n.5. 2000.

MALKOV, A. et al. Reactive oxygen species initiate a metabolic collapse in hippocampal slices: potential trigger of cortical spreading depression. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.34, . 1540–1549, 2014.

MALTA, L.G. et al. *In vivo* analysis of antigenotoxic and antimutagenic properties of two Brazilian Cerrado fruits and the identification of phenolic phytochemicals. **Food Research International**, v. 49, n.1, p. 604-611, 2012.

MARIUTTI, L.R.B.; RODRIGUES, E.; MERCADANTE, A.Z. Carotenoids from *Byrsonima crassifolia*: Identification, quantification and in vitro scavenging capacity against peroxy radicals. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 31, p. 155–160, 2013.

MARIUTTI, L.R.B. et al. The Amazonian fruit *Byrsonima crassifolia* effectively scavenges reactive oxygen and nitrogen species and protects human erythrocytes against oxidative damage. **Food Research International**, v. 64, p. 618-625, 2014.

MAROSI, K. et al. Long-term exercise treatment reduces oxidative stress in the hippocampus of aging rats. **Neuroscience**, v. 226, p. 21-8, 2012.

MAYR, F.B.; YENDE, S.; ANGUS, D.C. Epidemiology of severe sepsis. **Virulence**, v. 5, n.1, p. 4–11, 2014.

MENDANHA, D.M. et al. Modulatory effect of *Byrsonima verbascifolia* (Malpighiaceae) against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genet. Mol. Res.**, v.9, n.1, p. 69-77, 2010.

MENDES-DA-SILVA, R.F. et al. Prooxidant versus antioxidant brain action of ascorbic acid in wellnourished and malnourished rats as a function of dose: a cortical spreading depression and malondialdehyde analysis. **Neuropharmacology**, n. 86, p.155-160, 2014.

MERKLER, D. et al. Propagation of Spreading Depression Inversely Correlates with Cortical Myelin Content. **Ann Neurol.**, v.66, p.355–365, 2009.

MILLER, S.I. et al. Hypoglycemia as a manifestation of sepsis. **Am J Med.**, v.68, n.5, 1980.

MIRA, N.V.M. et al. Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados e não pigmentados de arroz (*Oryza saliva* L.). **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 994-1002, 2008.

MISRA, P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J. Biol. Chem.**, v. 247, p. 3170-3175, 1972.

MONTE-GUEDES, C.K.R. et al. Chronic treatment with ascorbic acid enhances cortical spreading depression in developing well-nourished and malnourished rats. **Neurosci Lett.**, v. 496, p. 191–4, 2011.

MONTEIRO, H. M.C. et al. Physical exercise versus fluoxetine: antagonistic effects on cortical spreading depression in Wistar rats. **Eur J Pharmacol.**, v.5, 2015.

MUNIZ- RAMIREZ, A.; FLORES COTERA, L.B.; PEREZ GUTIERREZ, R.M. Anti-inflammatory activity of the hexane extract of *Byrsonima crassifolia* seeds in experimental animal models. **Altern Ther Health Med.**, v. 19, n.1, p. 26-36, 2013.

MUTLU-TÜRKOĞLU, U. et al. Age-related increases in plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in elderly subjects. **Clin. Biochem.**, v.36, n.5, 2003.

NIKI, E. et al. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 338, n. 1, p. 668-76, 2005.

NING, Q. et al. Neurodegenerative changes and neuroapoptosis induced by systemic lipopolysaccharide administration are reversed by dexmedetomidine treatment in mice. **Neurol Res.**, 2017.

NODA, Y. et al. Characterization of the influence of age on GABAA and glutamatergic mediated functions in the dorsolateral prefrontal cortex using paired-pulse TMS-EEG. **Aging**, v. 9, 2017.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem.**, v.95, p.351-8, 1979.

OLIVEIRA, Y.P. et al. Oxidative stress in sepsis. Possible production of free radicals through an erythrocyte-mediated positive feedback mechanism. **Braz J Infect Dis.**, v.21, n.1, 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **World report on ageing and health**. Geneva, World Health Organization, 2015. Disponível em: <http://www.who.int/ageing/events/world-report-2015-launch/en/>.

OZCAN, A.; OGUN, M. Biochemistry of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. In: GOWDER, S.J.T. (Ed.). **Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress**. Rijeka: InTech, 2015. p.37-58.

PAMPLONA, R. et al. Proteins in human brain cortex are modified by oxidation, glycoxidation, and lipoxidation: effects of Alzheimer disease and identification of lipoxidation targets. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p.21522–21530, 2005.

PATEL, R.; SESTI, F. Oxidation of ion channels in the aging nervous system. **Brain Res.**, v.15, 2016.

PAYNE, B.A.I.; CHINNERY, P.F. Mitochondrial dysfunction in aging: Much progress but many unresolved questions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1847, 1347–1353, 2015.

PEINADO, M.A. et al. Quantitative and ultrastructural changes in glia and pericytes in the parietal cortex of the aging rat. **Microsc Res Tech.** v. 1, n.43, p. 34-42, 1998.

PEREZ-GUTIERREZ, R.M. et al. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antiglycation effects of *Byrsonima crassifolia* fruit and seed in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **Plant Foods Hum Nutr.**, v. 65, n. 4, p. 350-357, 2010.

PÉREZ GUTIÉRREZ ,R.M.; MUÑIZ RAMIREZ, A. Hexane extract of the seeds of *Byrsonimacrassifolia* accelerates wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats.**Chin J Integr Med.**, 2013.

PETERS, A. **The Effects of Normal Aging on Nerve Fibers and Neuroglia in the Central Nervous System.** In: Riddle DR, editor. *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms.* Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2007.

POLYAKOV, N.E. et al. Carotenoids as scavengers of free radicals in a Fenton reaction: antioxidants or pro-oxidants? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 3, p. 398–404, 2001.

POWERS, S.K. et al. Dietary antioxidants and exercise.**J Sports Sci.**, v. 22, p. 81-94, 2004.

PORGALI, E.; BÜYÜKTUNCEL, E. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. **Food Research International**, v.45, n.1, 2012.

PUSIC, K.M. et al. Spreading depression requires microglia and is decreased by their M2a polarization from environmental enrichment. **Glia**, n. 62, p.1176–1194, 2014.

PUSIC, A.D. et al. Spreading depression transiently disrupts myelin via interferon-gamma signaling. **Exp Neurol.**, v. 264, p. 43–5, 2015.

RATNAM, D.V. et al. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, p. 189-207, 2006.

RATTARASARN, C. Hypoglycemia in sepsis: risk factors and clinical characteristics. **J Med Assoc Thai.**, v.80, n.12, 1997.

READ, S.J.; PARSONS, A.A. Sumatriptan modifies cortical free radical release during cortical spreading depression. A novel antimigraine action for sumatriptan? **Brain Res.**, v, 870, n. 1-2, p. 44-53, 2000.

RIETJENS, I.M.C.M. et al. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoid. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 11, p. 321–333, 2002.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. **A guide to carotenoid analysis in food**. Washington: Internation Life Sciences Institute. 2001.

SAENGJAROENTHAM, C. et al. Serotonin depletion can enhance the cerebrovascular responses induced by cortical spreading depression via the nitric oxide pathway, **Int. J. Neurosci.**, v.125, n.2, 2015.

SÁNCHEZ-PORRAS, R.; ROBLES-CABRERA, A.; SANTOS, E. Despolarización cortical extendida: um nuevo mecanismo fisiopatológico em lãs enfermedades neurológicas. **Med Clin.**, v.142, n. 10, p. 457-462, 2014.

SIES, H. **Oxidative stress: Introductory remarks**. In: Sies H (ed.). **Oxidative Stress**. Amsterdam: Academic Press, 1985. p.1-7.

SILVA, M.R. et al. Caracterização química de frutos nativos do cerrado. **Ciência Rural**, v.38, n.6, p.1790-1793, 2008.

SHAH, D. et al. Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. **Journal of Biomedical Science**, v.21, n.23, 2014.

SHATILLO, A. et al. Cortical spreading depression induces oxidative stress in the trigeminal nociceptive system. **Neuroscience**, v. 253, p. 341–349, 2013.

SHIBATA, M.; SUZUKI, N. Exploring the role of microglia in cortical spreading depression in neurological disease. **J Cereb Blood Flow Metab.**, 2017.

SHIMIZU, I. et al. Sepsis facilitates brain serotonin activity and impairs learning ability in rats. **Brain Research**, v. 830, 1999.

SMITH, J.M. Physiological studies of cortical spreading depression. **Biol. Rev.**, v. 81, pp. 457–481, 2006.

SONN, J.; MAYEVSKY, A. The effect of ethanol on metabolic, hemodynamic and electrical responses to cortical spreading depression. **Brain Research**, v.908, 2001.

SONNEVILLE, R. et al. Understanding brain dysfunction in sepsis. **Annals of Intensive Care**, v.3, n.15, 2013.

SOSA, V. et al. Oxidative stress and cancer: an overview. **Ageing Research Reviews**, v.12, p. 376–390, 2013.

SOUSA, M. S. B. **Mecanismos de ação antioxidante de extratos de murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth)**. 2013. Dissertação (Mestrado em Nutrição em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. doi:10.11606/D.6.2013.tde-24052013-153230. Acesso em: 2017-01-30.

SOUZA, J.N.S. et al. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological *in vitro* assays. **Food Chem.**, v. 106, n.1, p. 331-339, 2008.

SOUZA, R.O. et al. Photochemoprotective effect of *Byrsonima crassifolia* extract against oxidative damage induced by UVA radiation in fibroblast cell culture. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n.1, p.105, 2012.

STECKERT, A.V. et al. Sepsis in the Central Nervous System and Antioxidant Strategies with Nacetylcysteine, Vitamins and Statins. **Current Neurovascular Research**, v.11, 2014.

SUGANTHYA, N. et al. Bioactive effects of quercetin in the central nervous system: Focusing on the mechanisms of actions. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 892–908, 2016.

SUPORNILPCHAI, W. et al. Serotonin depletion, cortical spreading depression, and trigeminal nociception. **Headache**, v.46, n.1, 2006.

TANG, D. et al. Quercetin Prevents LPS-Induced High-Mobility Group Box 1 Release and Proinflammatory Function. **Am J Respir Cell Mol Biol.**, v. 41, p. 651–660, 2009.

TATARKOVA, Z. et al. The Effect of Aging on Mitochondrial Complex I and the Extent of Oxidative Stress in the Rat Brain Cortex. **Neurochem Res.**, 2016.

TEJADA, S. et al. Antioxidant response and oxidative damage in brain cortex after high dose of pilocarpine. **Brain Res Bull.**, v.71, n.4, 2007.

TOTTENE, A.; URBANI, A.; PIETROBON, D. Role of different voltage-gated Ca^{2+} channels in cortical spreading depression: specific requirement of P/Q-type Ca^{2+} channels. **Channels**, v.5, n.2, 2011.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1–40, 2006.

VASCONCELOS, S. M. L.; SILVA, M. A. M.; GOULART, M. O. F. Pró-oxidantes e antioxidantes de baixo peso molecular oriundos da dieta: estrutura e função. **Nutrire**, v. 31, n. 3, p. 95-118, dez. 2006.

VASCONCELOS, S. M. L. et al . Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quím. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VIEIRA, R.F. et al. **Frutas nativas da região centro-oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010.

VIEIRA, A. et al. Increased on Oxidative Brain Injury in the Diabetic Rats Following Sepsis. **Synapse**, v.68, p.410-418, 2014.

VIGGIANO, A. et al. Cortical spreading depression affects reactive oxygen species production. **Brain Res.**, v. 1368, p. 11-8, 2011.

VUCEVIC, D. et al. Influence of aging on ethanol-induced oxidative stress in digestive tract of rats. **Hum Exp Toxicol.**, v. 32, n. 7, p. 698-705, 2013.

WANG, M.. Cortical spreading depression and calcitonin gene-related peptide: A brief review of current progress. **Neuropeptides**, v. 47, p. 463–466, 2013.

WIDOMSKA, J.; ZAREBA, M.; SUBCZYNSKI, W.K. Can Xanthophyll-Membrane Interactions Explain Their Selective Presence in the Retina and Brain? **Foods**, v. 5, n.7, 2016.

WARNER, A. et al. Prognostic Role of Antioxidant Enzymes in Sepsis: Preliminary Assessment. **Clinical Chemistry**. v. 41, n. 6, 1995.

WU, W. et al. Lutein suppresses inflammatory responses through Nrf2 activation and NF- κ B inactivation in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglia. **Mol. Nutr. Food Res.**, v.59, 2015.

YIN, F. et al. Energy metabolism and inflammation in brain aging and Alzheimer's disease. **Free Radic Biol Med.**, v.100, 2016.

YOKOO, H. et al. Neurodegenerative Evidence in Mice Brains with Cecal Ligation and Puncture-Induced Sepsis: Preventive Effect of the Free Radical Scavenger Edaravone. **Plos one**, v. 7, n.1, 2012.

ZARGAR, S. et al. Therapeutic role of quercetin on oxidative damage induced by acrylamide in rat brain. **Pharmaceutical Biology**, 2015.

ZHAO, Y; ZHAO, B.Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2013.

APÊNDICE A – Artigo submetido no periódico BMC Neuroscience

Confirmation of your submission to ^_BMC^_ ^_Neuroscience^_ - NROS-D-17-00165

Yahoo/Entrada

 **BMC Neuroscience Editorial Office** <em@editorialmanager.com>
Para: Mariana Séfora Sousa

27 de dez de 2017 às 15:36 ★

NROS-D-17-00165
Murici (Byrsonima crassifolia L. Kunth) extract counteracts the effects of aging on cortical spreading depression and oxidative stress in the brain cortex
Mariana Séfora Sousa; Iasmym Holanda; Heloísa Monteiro; Angela Santos
BMC Neuroscience

Dear Mrs. Sousa,

Thank you for submitting your manuscript 'Murici (Byrsonima crassifolia L. Kunth) extract counteracts the effects of aging on cortical spreading depression and oxidative stress in the brain cortex' to BMC Neuroscience.

The submission id is: NROS-D-17-00165
Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following website:

If you have forgotten your password, please use the 'Send Login Details' link on the login page at <http://nros.edmgr.com/>. For security reasons, your password will be reset.

Best wishes,

Editorial Office
BMC Neuroscience
<https://bmcneurosci.biomedcentral.com/>

APÊNDICE B – Artigo submetido no periódico International Journal of Food Sciences and Nutrition

← Voltar ↩ ↶ ↷

📁 Arquivar

📁 Mover

🗑 Apagar

🛡 Spam

...

☰ ▲ ▼ ✕

Dear Dr Amancio-dos-Santos:

Your manuscript entitled "Murici (Byrsonima crassifolia L. Kunth) extract reverts the brain oxidative stress and electrophysiological changes caused by sepsis in rats" has been successfully submitted online and is presently being considered for publication in International Journal of Food Sciences and Nutrition.

Your manuscript ID is CIJF-2018-0138.

Please quote the above manuscript ID in all future correspondence. If your contact details change please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/cjif> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Centre after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/cjif>.

Thank you for submitting your manuscript to International Journal of Food Sciences and Nutrition.

Kind regards

International Journal of Food Sciences
and Nutrition Editorial Office

ANEXO A - Artigo publicado em colaboração com o grupo de Neurofisiologia

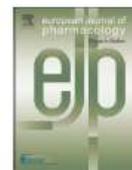
European Journal of Pharmacology 762 (2015) 49–54



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejphar



Neuropharmacology and analgesia

Physical exercise versus fluoxetine: Antagonistic effects on cortical spreading depression in Wistar rats



Helóisa Mirelle Costa Monteiro^a, Nathália Lima Barreto-Silva^b,
Gracyelle Elizabete dos Santos^b, Amanda de Santana Santos^b,
Mariana Séfora Bezerra Sousa^a, Ângela Amâncio-dos-Santos^{b,*}

^a Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, 50670-901 Recife-PE, Brazil

^b Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, 50740-600 Recife-PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 March 2015

Received in revised form

11 May 2015

Accepted 18 May 2015

Available online 21 May 2015

Keywords:

Body parameters

Brain excitability

Central nervous system

Treadmill

ABSTRACT

The antidepressant fluoxetine and physical exercise exert similar effects on the serotonergic system by increasing brain serotonin availability, and both show antagonistic action on cortical excitability. Here we provide the first assessment of the interaction of the two together on cortical spreading depression (CSD) in young adult rats. Wistar rats (40–60 days of life) received fluoxetine (10 mg/kg/d, orogastrically) or an equivalent volume of water. Half of the animals from each condition were assigned to perform physical exercise in a treadmill, and the other half formed the sedentary (non-treadmill) control groups. Body parameters (Lee index and thoracic and abdominal circumferences) and the velocity of CSD propagation were investigated. Fluoxetine+exercise animals had less weight gain (78.68 ± 3.19 g) than either the fluoxetine-only (93.34 ± 4.77 g) or exercise-only group (97.04 ± 3.48 g), but body parameters did not differ among them. The velocity of CSD propagation was reduced in the fluoxetine-only and exercise-only groups compared to sedentary water controls (3.24 ± 0.39 mm/min). For the fluoxetine+exercise group, CSD velocity values were significantly lower (2.92 ± 0.22 mm/min) than for fluoxetine only (3.03 ± 0.35 mm/min); however, they were similar to values for the exercise-only group (2.96 ± 0.23 mm/min). These findings confirm the similar effects of fluoxetine and exercise and suggest a greater effect of physical exercise in reducing brain excitability.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Serotonin, or 5-hydroxytryptamine (5-HT), is a neurotransmitter that is widely distributed in the central nervous system. This monoamine is important in many behaviors, including sleep, appetite, memory, sexual behavior, neuroendocrine function, and mood (Sghendo and Mifsud, 2012). It also interferes in food behavior, promoting satiety and reducing body weight ([Guimarães et al., 2006, Voigt and Fink, 2015]) and seems to decrease brain excitability ([Pardo-Peña et al., 2014, Tarlaci, 2009]).

The selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) fluoxetine is an antidepressant that increases brain serotonin availability (Qu et al., 2009). Because of some reports that physical exercise also increases brain serotonin (Lan et al., 2014; Meeusen et al., 1996), physical exercise could be suggested as a less expensive strategy

for the same result.

A relationship between serotonin and brain excitability has been reported with other SSRIs (Amâncio-dos-Santos et al., 2006; Guedes et al., 2002). Citalopram can reduce the occurrence of spontaneous high-frequency oscillations that occur in epileptic seizures (Pardo-Peña et al., 2014). Escitalopram promotes a decreased frequency, duration, and intensity of episodes of migraine (Tarlaci, 2009). Additionally, serotonin exerts an antagonistic effect on cortical spreading depression (CSD) ([Amâncio-dos-Santos et al., 2006, Amâncio-dos-Santos et al., 2013, Guedes et al., 2002, Read and Parsons, 2000]). CSD has been described as a slowly propagating wave of depression of spontaneous cortical electrical activity that occurs with chemical, electrical, or mechanical stimulation of one point of cortical tissue (Leão, 1944). The CSD wave consists of reducing (“depression”) of the electrical activity of brain tissue that spreads (“spreading”) concentrically and reversibly (Leão, 1944). Simultaneous with the depression of spontaneous electrical activity, a slow direct-current (DC) potential change (SPC) appears in the cortical region where the CSD is observed, and this “all or none” signal clearly marks the beginning and the end of the phenomenon (Leão, 1947). Thus, the SPC is

* Correspondence to: Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Av. da Engenharia, S/N Cidade Universitária, 50740-600 Recife, PE-Brazil. Fax: +55 81 2126 8976.

E-mail addresses: helo-mcm@hotmail.com (H. Mirelle Costa Monteiro), angela.asantos@yahoo.com, angela.asantos@ufpe.br (Â. Amâncio-dos-Santos).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.05.027>

0014-2999/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO B – Reconhecimento da espécie dos frutos.



SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO DE BOTÂNICA

Caixa Postal 3005
01061-970 São Paulo, SP - Brasil

LAUDO DE IDENTIFICAÇÃO

A amostra de planta que nos foi submetida a identificação, por Mariana Sefora Bezerra Sousa, corresponde a:

Família: Malpighiaceae

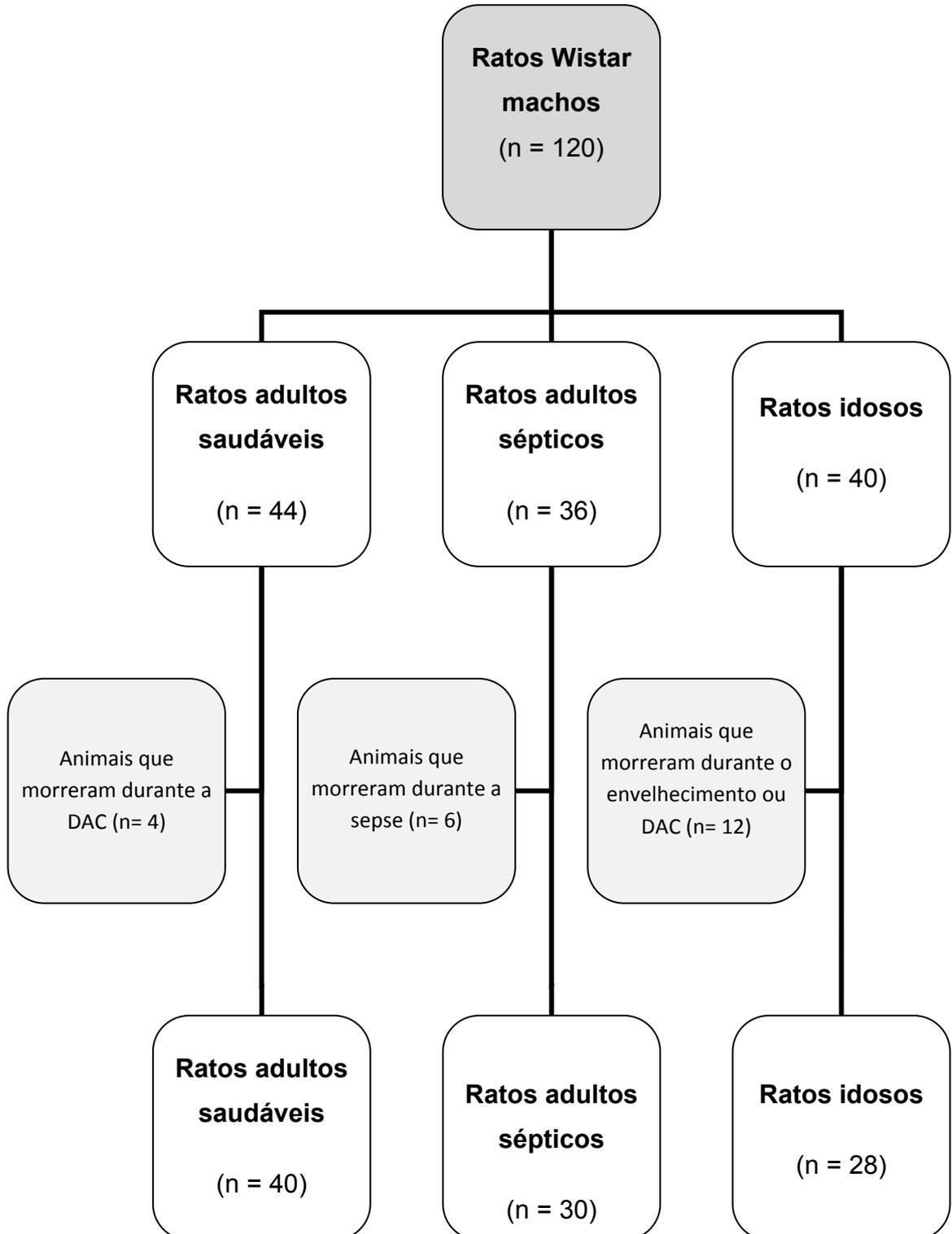
Espécie: *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth

Dra. Maria Candida Henrique Mamede
Pesquisador Científico

São Paulo, 28 de agosto de 2012

Obs. Este laudo de identificação é exclusivo de Mariana Sefora Bezerra Sousa, não podendo ser repassado para nenhum outro fim, pois trata do resultado da análise de uma única amostra. Fica também vedada a menção ou utilização do nome ou sigla do Instituto de Botânica, em qualquer tipo de publicidade comercial, seja qual for o veículo publicitário, principalmente se o nome do Instituto for utilizado para qualificar produção industrial sobre a qual o mesmo não exerça qualquer meio de controle.

ANEXO C – Fluxograma do número de animais usados neste estudo



ANEXO D – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 07 de agosto de 2014.

Ofício nº 37/2014

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.ª Ângela Amâncio dos Santos**
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.020868/2014-51

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Efeitos do murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) sobre o sistema nervoso de ratos jovens e idosos submetidos ao exercício físico: análise da depressão alastraste cortical e sua relação com o status Oxidativo cerebral.”**

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério de Criação do Departamento de Nutrição; Animais: ratos heterogênicos; Linhagem: Wistar; Sexo: macho; Nº total de animais: 120

Atenciosamente

Prof.ª Marcia Vasconcelos
Vice-Presidente do CEUACB-UFPE
SUPE 219636

CCB: Integrar para doação