

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto De Ciências Básicas Da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências

Andrey Vinicios Soares Carvalho

**ESTUDO DOS MECANISMOS NEUROPROTETORES DO EXTRATO DE
JABUTICABA (*Plinia trunciflora*) NO MODELO ANIMAL DE HIPÓXIA-ISQUEMIA
NEONATAL**

Porto Alegre

2021

**ESTUDO DOS MECANISMOS NEUROPROTETORES DO EXTRATO DE
JABUTICABA (*Plinia trunciflora*) NO MODELO ANIMAL DE HIPÓXIA-ISQUEMIA
NEONATAL**

Andrey Vinicios Soares Carvalho

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Porto Alegre

2021

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto pela confiança, oportunidade e aprendizagem.

Às agências de fomento CAPES e CNPq pelos recursos para execução deste projeto e pela bolsa.

Ao Prof. Dr. Eduardo Konrath pelo extrato usado neste estudo.

A todos os meus colegas do laboratório 35 pela parceria e ajuda nos experimentos, em especial à Luz Elena, Ana Paula e Felipe por estarem sempre dispostos a me auxiliar e me ensinar.

À minha querida colega Danielli Lucho pela amizade, companheirismo e risadas compartilhadas.

Ao Rafael Ribeiro pela colaboração neste trabalho, além disto, principalmente por todo o carinho, apoio e amor.

Aos meus pais que sempre me incentivaram e acreditaram no meu potencial para alcançar meus sonhos.

Muito obrigado a todos, sem vocês este trabalho não seria possível!

Sumário

LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELA.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
1. Introdução	13
1.1 Hipóxia-Isquemia Neonatal	13
1.3. Neuroproteção mediada por agentes naturais.....	21
2. Hipótese de Trabalho	25
3. Justificativa.....	25
3. Objetivos.....	26
3.1 Objetivo Geral.....	26
3.2 Objetivos Específicos	26
4. Materiais e Métodos	27
4.1 Aspectos Éticos.....	27
4.2 Animais.....	27
4.3 Desenho Experimental.....	28
4.3.1 Experimento 1 – <i>Estudo comportamental e histológico</i>	28
4.3.2 Experimento 2 – <i>Estudo de possíveis mecanismos neuroprotetores</i>	28
4.4 Modelo Experimental de Hipóxia-Isquemia Neonatal	29
4.5 Administração do Extrato de <i>Plinia trunciflora</i>	30
4.6 Testes Comportamentais.....	30
4.6.1 Teste de Campo Aberto	31
4.6.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevada	31

4.6.3 Labirinto Aquático de Morris	31
4.7 Análise Histológica	32
4.8 Análises Bioquímicas	33
4.8.1 Medida de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS)	33
4.8.2 Medida das Concentrações de Glutathione Reduzida (GSH)	33
4.8.3 Medida da Atividade da Superóxido Dismutase (SOD).....	34
4.8.4 Medida da Atividade de Glutathione peroxidase (GPx).....	34
4.8.5 Quantificação de Interleucinas	35
4.9 Análise Estatística	35
5. Resultados	37
5.1 Avaliação Comportamental	37
5.1.1 Análise do Teste do Campo Aberto.....	37
5.1.2 Análise do Teste do Labirinto em Cruz Elevado	38
5.1.3 Análise do Labirinto Aquático de Morris	40
5.2 Análise do Volume de Lesão	41
5.3 Quantificação dos Parâmetros Bioquímicos.....	43
5.3.1 Quantificação de Substâncias Reativas ao TBA-RS (Malondialdeído)	43
5.3.2 Quantificação dos Níveis de Glutathione Reduzida	44
5.3.3 Análise da Atividade da Superóxido Dismutase	45
5.3.4 Análise da Atividade da Glutathione Peroxidase.....	46
5.4 Quantificação de Interleucinas	47
6. Discussão.....	49
7. Conclusão	58
8. Referências	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos fisiopatológicos da lesão HI.....	16
Figura 2 – Representação de Cianidina-3-O-glicosideo.....	25
Figura 3 – Análise do Campo Aberto.....	38
Figura 4 – Análise do Labirinto em Cruz Elevado.....	39
Figura 5 – Análise do Labirinto Aquático de Morris.....	41
Figura 6 – Análise Volumétrica.....	42
Figura 7 – Medida de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS).....	44
Figura 8 - Quantificação dos Níveis de Glutaciona Reduzida.....	45
Figura 9 – Medida da Atividade da Superóxido Dismutase.....	46
Figura 10 – Medida da Atividade da Glutaciona Peroxidase.....	47
Figura 11 – Quantificação do imunocontéudo de proteínas do hipocampo.....	48

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Conteúdo de macronutrientes e fenóis identificados na casca e polpa da Jaboticaba (<i>P. trunciflora</i>) fresca.....	24
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de Variância

ATP: Trifosfato de Adenosina

CAT: Catalase

DPN: Dia Pós-Natal

EPT: Extrato de *Plinia Trunciflora*

ERN: Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

GPx: Glutathione Peroxidase

GSH: Glutathione Reduzida

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HI: Hipóxia-Isquemia neonatal

HO•: Radical Hidroxila

IL: Interleucina

NK: *Natural Killer*

NO•: Óxido Nítrico

O²⁻: Superóxido

ONOO⁻: Peroxinitrito

PMAD: Padrão Molecular Associado ao Dano

SAL: Salina

SNC: Sistema Nervoso Central

SOD: Superóxido-dismutase

TBA-RS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral- α

Resumo

A hipóxia-isquemia neonatal (HI) é a principal causa de óbito perinatal e de lesões que acometem o Sistema Nervoso Central (SNC). A fisiopatologia da HI decorre a partir da diminuição ou interrupção do aporte sanguíneo para o SNC, ocasionando morte celular, neuroinflamação e produção de espécies reativas de oxigênio. Atualmente, não existe um tratamento totalmente eficaz para a HI, desta forma, estudos investigam possíveis intervenções que possam prevenir ou recuperar os prejuízos causados pela HI. Neste contexto, diversas pesquisas experimentais sobre a ação de extratos vegetais demonstram que os efeitos nocivos da HI podem ser atenuados. A *Plinia trunciflora* é uma espécie de jabuticabeira nativa do Brasil e uma planta rica em antocianinas, um composto fenólico com propriedades antioxidantes. Há relatos na literatura que o extrato de *Plinia trunciflora* (EPT) foi capaz de reduzir o estresse oxidativo tanto em cultura celular, quanto em roedores. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a possível ação neuroprotetora da administração do EPT em ratos Wistar submetidos à HI neonatal através de testes comportamentais, análises histológicas e bioquímicas. Animais de ambos os sexos foram submetidos ao procedimento cirúrgico no sétimo dia pós-natal (DPN7). Para induzir a HI, foi realizado a oclusão permanente da artéria carótida comum direita, seguido pela exposição à privação parcial de oxigênio (8% de O₂) por 60 minutos; os animais do grupo Sham receberam apenas dissecação da artéria carótida. O EPT (10mg/kg) ou solução Salina (0,9%) foi administrado via intraperitoneal nos intervalos de 1, 24, 48 e 72 horas após a HI. Desta forma, os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: Sham+Sal, HI+Sal, Sham+EPT e HI+EPT. No DPN10 foram coletadas amostras (hipocampo, córtex e estriado) para as análises dos parâmetros de homeostase redox e dosagem de interleucinas (IL). A partir do DPN45, a memória de referência espacial e o comportamento do tipo-ansioso dos animais foram avaliados. Ao final dos testes, os animais foram eutanasiados e o encéfalo foi coletado para as análises histológicas. Na análise dos parâmetros de homeostase redox foi observado que a HI provocou o aumento de lipoperoxidação no hipocampo e no córtex; este efeito foi prevenido pelo EPT. A atividade da enzima SOD não foi alterada, entretanto, a atividade da GPX aumentou nos animais HI+Sal e se manteve diminuída nos animais HI+EPT. Além disto, os animais HI+Sal

apresentaram uma redução nos níveis de defesa antioxidante (GSH), e esse efeito não foi observado no grupo HI+EPT. A HI provocou um aumento nos níveis de IL-1 β e o EPT foi capaz de prevenir esse efeito. A análise do campo aberto mostrou que os animais HI+Sal apresentaram um maior número cruzamentos quanto comparado aos animais Sham+Sal. No teste do labirinto em cruz elevado os animais do grupo HI+Sal permaneceram mais tempo no braço aberto em comparação aos animais Sham, e essa alteração comportamental pôde ser prevenida nos animais HI+EPT. No teste do labirinto aquático de Morris, os animais HI+Sal apresentaram déficits de aquisição quando comparados aos animais Sham+Sal e este prejuízo cognitivo pôde ser revertido pelo EPT. A análise histológica mostrou que os animais HI+Sal apresentaram uma diminuição do volume das estruturas encefálicas estudadas, hemisférios cerebrais, córtex cerebral, hipocampo e estriado, quando comparado aos animais Sham+Sal; a perda tecidual foi prevenida nos animais tratados com EPT. Os resultados sugerem que a administração do extrato de *Plinia trunciflora* foi capaz de prevenir ou atenuar as consequências da hipóxia-isquemia neonatal sobre a homeostase redox, a integridade do tecido nervoso e o comportamento, parâmetros avaliados no presente trabalho. Os possíveis mecanismos de neuroproteção do EPT devem ser melhor estudados.

Palavras-chave: Hipóxia-isquemia neonatal (HI), Jabuticaba, *Plinia trunciflora*, neuroproteção, estresse oxidativo, neuroinflamação, testes comportamentais.

Abstract

Neonatal hypoxia-ischemia (HI) is the main cause of perinatal death and injuries affecting the Central Nervous System (CNS). The pathophysiology of HI as a consequence of the reduction or interruption of cerebral blood supply, lead to cell death, neuroinflammation and production of reactive oxygen species. Currently, there is no fully effective treatment for HI, therefore, studies investigate possible interventions able to prevent or to recover HI-damage. In this context, several experimental studies regarding the action of plant extracts have demonstrated a positive effect against HI insult. *Plinia trunciflora* is a species of jaboticaba tree native to Brazil and a plant rich in anthocyanins, a phenolic compound with antioxidant properties. There are reports in the literature that the extract of *Plinia trunciflora* (EPT) was able to reduce oxidative stress both in cell cultures and in rodents. Thus, the aim of this study was to evaluate a neuroprotective action of the administration of EPT in Wistar rats suffering neonatal HI. For this purpose, animals of both sexes were submitted to the surgical procedure at postnatal day 7 (PND7) to induce HI. The right common carotid artery was permanently occluded, following by the exposure to oxygen deprivation (8% O₂) for 60 minutes. Animals in the Sham group were subjected to carotid artery dissection without the exposure to hypoxia condition. EPT (10mg/kg) or saline solution (0.9%) was administered intraperitoneally at intervals of 1, 24, 48 and 72 hours after HI insult. Thus, animals were divided into 4 experimental groups: Sham+Sal, HI+Sal, Sham+EPT and HI+EPT. On PND10 a cohort of animals were euthanized for sample collection (hippocampus, cortex and striatum) to further analysis of redox homeostasis parameters and interleukin (IL) dosage. From the PND45, the spatial reference memory and anxious-like behavior were evaluated. After behavioral assessment, animals were euthanized, and the brain was collected for histological analysis. In the analysis of redox homeostasis parameters, it was observed that HI caused an increase in lipoperoxidation in the right hippocampus and cortex, and this effect was prevented by EPT. No changes were observed in the SOD enzyme activity, however, GPX activity increased in the HI+Sal group and remained attenuated in the HI+EPT. Furthermore, the HI+Sal animals showed a reduction in antioxidant defense (GSH) levels and this effect was not observed in the HI+EPT group. HI induced an increase in IL-1 β levels and the EPT was able to prevent it. Open field analysis showed that HI+Sal animals had a

greater number of crosses when compared to Sham+Sal animals. In the plus maze test, HI+Sal animals spent more time in the open arms when compared to Sham animals, being reduced in animals that received EPT. In the Moris water maze test, HI+Sal animals showed learning deficits when compared to Sham+Sal animals and this cognitive impairment can be reversed by EPT. Histological analysis showed that HI+Sal animals suffered a decrease in the volume of brain structures: cerebral hemispheres, cerebral cortex, hippocampus, striatum when compared to Sham+Sal animals and this tissue loss was prevented in the HI+EPT group. The results suggest that the administration of *Plinia trunciflora* extract was able to prevent or attenuate the consequences of neonatal hypoxia-ischemia on redox homeostasis, nervous tissue integrity and behavior, parameters evaluated in the present work. Possible EPT neuroprotection mechanisms should be further studied.

Keywords: Neonatal hypoxia-ischemia (HI), Jaboticaba, *Plinia trunciflora*, neuroprotection, oxidative stress, neuroinflammation, behavioral tests.

1. Introdução

1.1 Hipóxia-Isquemia Neonatal

A hipóxia-isquemia (HI) é uma das principais causas de lesões que acometem o Sistema Nervoso (SN) em idade neonatal. Mundialmente, estima-se que 0,7-1,2 milhões de recém-nascidos são afetados pela HI por ano e 23% das mortes infantis são geradas por complicações da HI (Lawn et al., 2005). A incidência da HI é cerca de 1–8/1000 nascidos vivos a termo em países desenvolvidos, e quase 25/1000 nascidos vivos a termo em países emergentes. Atualmente, com os avanços da medicina neonatal tem se observado significativa melhora na sobrevivência de recém-nascidos prematuros extremos (Airede, 1991; De Haan et al., 2006).

O evento hipóxico-isquêmico promove condições desfavoráveis para o desenvolvimento encefálico, o que pode contribuir para o surgimento de diversas patologias neurológicas, como por exemplo: paralisia cerebral, epilepsias, anormalidades motoras e transtornos de aprendizagem (Dilenge et al., 2001). Estas deficiências cognitivas e intelectuais dependem do grau de acometimento da lesão encefálica, o qual pode ser classificado de leve a grave (Graham et al., 2008).

Em recém-nascidos com HI leve, a probabilidade de morte é de 10% e o risco de distúrbios no neurodesenvolvimento é de 30%, enquanto que em pacientes com HI grave o risco de morte chega a 60% e todos os indivíduos correm alto risco de desenvolver deficiências neurológicas (Graham et al., 2008).

A maioria dos casos de HI acontece durante a gestação, entretanto há possibilidade de ocorrência também durante ou após o parto. De acordo com estudos clínicos, 20% dos casos de HI decorrem de eventos pré-natais e 35% estão relacionados à distúrbios maternos; 10% dos casos acontecem no período pós-natal

e 35% dos casos de HI surgem em decorrência de complicações durante o trabalho de parto (Marcondes et al, 2002). Desta forma, as principais causas da HI estão relacionadas com disfunções circulatórias e/ou complicações obstétricas como a hipóxia materna, infecções intrauterinas, o descolamento prematuro da placenta e a compressão do cordão umbilical que podem interferir na transferência de substratos e levar à asfixia fetal (Ferriero, 2001; Volpe, 2009).

A privação de oxigênio e do fluxo sanguíneo podem gerar danos ao encéfalo que afetam o desenvolvimento cognitivo e motor do recém-nascido (Volpe, 2009). As consequências da HI são sistêmicas e podem gerar alterações no sistema cardiovascular, respiratório, renal e metabólico do paciente, contudo, o sistema nervoso central (SNC) é o mais comprometido (Vannucci and Perlman, 1997).

Assim como observado em humanos, animais submetidos ao modelo experimental de HI apresentam prejuízos motores e cognitivos, como dificuldade de aprendizado e memória. Além disto, os animais também podem demonstrar alterações comportamentais como hiperatividade e níveis elevados de comportamento do tipo-ansioso (Arteni et al., 2010; Zhang et al., 2016). Estas mudanças comportamentais são acompanhadas de perda do tecido nervoso e de alterações celulares e metabólicas. (Arteni et al., 2010; Mestriner et al., 2013; Pagnussat et al., 2009).

1.2 Modelo Experimental de Hipóxia-Isquemia Neonatal

Novas estratégias de tratamento ou prevenção, assim como o esclarecimento dos mecanismos de lesão da HI necessitam do uso de modelos experimentais em pesquisas pré-clínicas. Evidências demonstram semelhanças no desenvolvimento

encefálico de ratos de 7 dias de idade com recém-nascidos a termo (Rice et al., 1981). O modelo experimental mais usado para reproduzir as lesões do SNC encontradas em humanos após um quadro de asfixia consiste na oclusão permanente de uma das artérias carótidas comuns, e posterior exposição dos animais a uma atmosfera de hipóxia (geralmente 8% de oxigênio) (Rice et al., 1981).

Este modelo experimental é composto por duas intervenções que causam danos localizados predominantemente no hemisfério ipsilateral à carótida ocluída, sendo o hemisfério contralateral afetado em menor grau ou não apresentando danos morfológicos (Jansen & Low, 1996; Rice et al., 1981). A lesão tecidual pode ser observada no córtex cerebral, substância branca periventricular e subcortical, no estriado (núcleos da base), no tálamo e principalmente no hipocampo (Arteni et al., 2010; Pereira et al., 2007). Além disto, dados prévios do nosso grupo de pesquisa demonstram que a HI em animais causa dados comportamentais, histológicos e bioquímicos, como efeitos deletérios relacionais a memória espacial, a atrofia de diversas estruturas encefálicas, o aumento de espécies reativas e a diminuição das defesas antioxidantes (Dafre et al., 2003; Sanches et al., 2015).

1.3 Mecanismos Fisiopatogênicos da Hipóxia-Isquemia Neonatal

A lesão HI é entendida como um processo evolutivo que resulta na morte celular por ativação de diferentes mecanismos (Figura-1) (Davidson et al., 2015). Este processo de lesão se inicia no momento do evento hipóxico-isquêmico e permanece após o período de recuperação (Hassell et al., 2015). Sendo assim, é possível classificar a progressão da lesão HI em diferentes fases: lesão primária, fase latente, lesão secundária e terciária (crônica) (Lee et al., 2017).

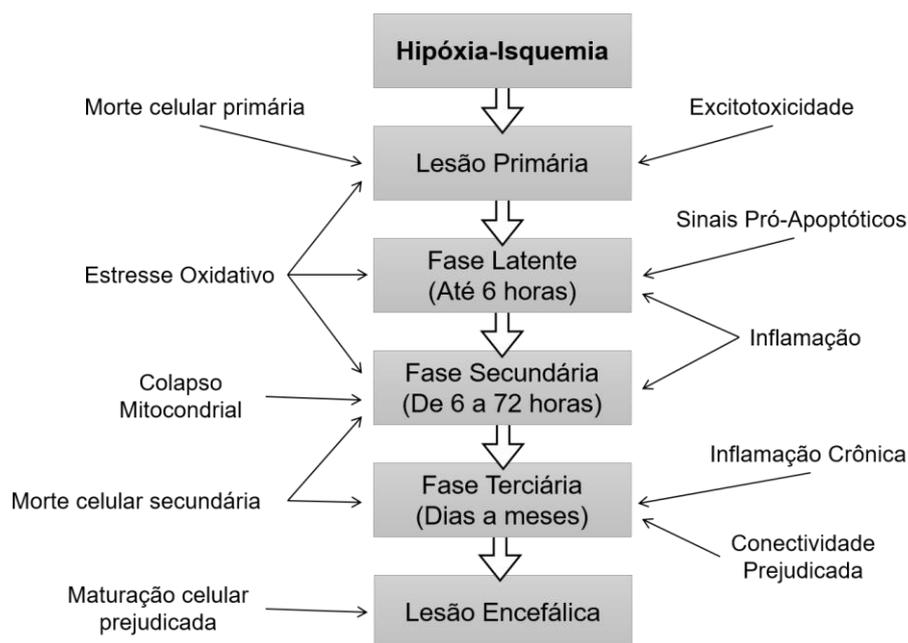


Figura 1 – Mecanismos fisiopatológicos da lesão HI. (Adaptado de Davidson et al., 2015)

A lesão primária acontece imediatamente após o insulto, sendo caracterizada pela diminuição do suprimento de glicose e oxigênio, que causa uma falha energética primária e desencadeia uma cascata de eventos bioquímicos que afetam a atividade de neurônios (Korc et al., 1995; Prandini et al., 2005). A falta de glicose e oxigênio contribuem para a redução da síntese de ATP (adenosina trifosfato) que prejudica a atividade das bombas iônicas, como a bomba Na^+/K^+ ATPase e promove um desequilíbrio iônico, invertendo as concentrações iônicas, e a despolarização celular e consequente liberação de neurotransmissores, especialmente do aminoácido excitatório glutamato (Du Plessis and Johnston, 1997; E.F Sanches et al., 2013). A inversão de concentrações iônicas intracelular causa um processo de tumefação celular e a ruptura da membrana plasmática, desencadeando o processo de morte celular por necrose (Barks & Silverstein, 1992; Portera-Cailliau et al., 1997). A falha energética permanece durante a fase latente, a qual ocorre até as 6 primeiras horas após o evento hipóxico (Johnston, 2001). Contudo, durante este

período muitos neurônios podem se recuperar do insulto, ou pelo menos parcialmente.

A lesão secundária está relacionada com a reperfusão do tecido lesado que acontece de 6 a 72 horas após a lesão (Cho et al., 2020). Nesta fase, se observa recuperação inicial do metabolismo celular por consequente aumento da oxigenação (Cho et al., 2020). Neste momento ocorre a falha energética “secundária” com o grande influxo de Ca^{2+} , culminando em disfunção mitocondrial, aumento da liberação excessiva de radicais livres e consequentemente dano tecidual por estresse oxidativo, e a neuroinflamação (Lai and Yang, 2011; Shankaran et al., 2012; Volpe, 2009). A morte celular por apoptose tem seu auge 24 horas após a lesão HI, sendo os neurônios e a linhagem de oligodendrócitos as células mais atingidas (Bennet et al., 2006).

Os radicais livres são átomos ou moléculas que contém um número desigual de elétrons na camada de valência mais externa e tem a capacidade de existir de forma independente (Southorn; Powis, 1988; Halliwell and Gutteridge, 2007). Os radicais livres podem ser formados pela perda de um elétron de um não-radical ou pelo ganho de um elétron por um não-radical (Halliwell and Gutteridge, 2007). Além disto, quando um radical livre reage com um composto não-radical, gera uma sequência de reações em cadeia de transferência de elétrons (redox) que leva a formação de um produto radical livre que, por sua vez, reage produzindo um terceiro radical (Maxwell, 1995). O termo genérico, espécies reativas de oxigênio (ERO) inclui os radicais formados pela redução do superóxido (O_2) e radicais hidroxila (HO^{\bullet}), mas também alguns não-radicais derivados do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Além das EROs, existem as espécies reativas de nitrogênio

(ERN), tendo como representantes principais o óxido nítrico (NO^{\bullet}) e o peroxinitrito (ONOO^{-}) (Halliwell and Gutteridge, 2007).

Espécies reativas são importantes para a fisiologia da célula, atuando como moléculas de sinalização celular para diversos mecanismos celulares. As espécies reativas são frequentemente produzidas e neutralizadas pelo sistema de defesas antioxidantes (Boveris et al., 1973). Entretanto, quando produzidas em altas concentrações ou quando há um declínio na atividade dessas defesas, as espécies reativas podem causar danos às células. O desequilíbrio entre a formação de espécies reativas e os antioxidantes é descrito como estresse oxidativo, e este mecanismo está envolvido com diversas patologias (Halliwell and Gutteridge, 2007).

As defesas antioxidantes podem ser constituídas por defesas enzimáticas ou não-enzimáticas. Defesas enzimáticas atuam cataliticamente removendo os radicais livres, como por exemplo, a enzima superóxido-dismutase (SOD) que converte superóxido (O_2^{\bullet}) em peróxido de hidrogênio, que também é uma ERO. O peróxido de hidrogênio pode ser reduzido pela ação das enzimas catalase (CAT) ou da glutathione peroxidase (GPx) que o converte em água e oxigênio. As defesas não-enzimáticas agem aprisionando as ERO e ERN, como por exemplo a glutathione reduzida (GSH), α -tocoferol, ácido ascórbico e a bilirrubina (Halliwell and Gutteridge, 2007).

O SNC neonatal é especialmente suscetível aos danos celulares causados pelo aumento da liberação de radicais livres após a lesão HI, esta sensibilidade deve-se às suas características: ácidos graxos insaturados abundantes, alta taxa de consumo de oxigênio, menor quantidade de defesas antioxidantes, alto teor de água e baixa mielinização (Mavelli et al., 1982).

A mitocôndria é a organela celular responsável pela produção de energia, durante a fase secundária da HI, com a reperfusão e a reoxigenação, o metabolismo mitocondrial é acelerado na tentativa de compensar a falha energética por meio do aumento da síntese de ATP (Mavelli et al., 1982). O alto consumo de O₂ pela mitocôndria, neste processo, significa uma alta atividade da cadeia respiratória, culminando em um aumento na produção do radical superóxido pela dispersão dos elétrons (Mavelli et al., 1982).

Devido a superprodução de espécies reativas durante o processo de lesão da HI, o sistema de defesas antioxidantes é sobrecarregado pelo estresse oxidativo. Sabe-se que a produção excessiva de espécies reativas induzida pela HI causa o aumento do produto da peroxidação lipídica (malondialdeído) e também dos níveis de nitratos e nitritos. Além disto, o estresse oxidativo pode levar a danos adicionais, como por exemplo: a desnaturação de proteínas, inativação de enzimas, dano ao DNA, liberação de Ca²⁺ dos depósitos intracelulares e danos ao citoesqueleto (Gaschler and Stockwell, 2017).

A membrana celular é altamente suscetível à peroxidação induzida por espécies reativas que contribuem para o dano encefálico pela sua capacidade de atacar a porção de ácidos graxos presentes no citoplasma e nas membranas celulares. Desta forma os ácidos graxos poli-insaturados estão propensos ao comprometimento peroxidativo, que por sua vez levam à fragmentação das membranas, especialmente no encéfalo em desenvolvimento (Gaschler and Stockwell, 2017).

A ativação da resposta imunológica é um dos fatores mais importantes na determinação da gravidade da lesão, sendo mais graves as sequelas quanto maior

for a resposta imune (Jin et al., 2009). A resposta inflamatória aguda no SNC inicia com a infiltração de leucócitos periféricos e ativação da micróglia e de astrócitos. Estas células gliais detectam padrões moleculares associados ao dano (PMADs) e tornam-se reativas, atuando como secretores de citocinas pró-inflamatórias (Zhao et al., 2013).

As células microgлияis são ditas como células de defesa no tecido nervoso e quando estimuladas pela presença de PMADs, alteram sua morfologia e adquirem a capacidade de fagocitose. Os astrócitos, ao detectarem PMADs, tornam-se reativos em um processo de reatividade astrocitária, onde é observado hipertrofia destas células e a formação da cicatriz astrocítica nas áreas mais danificadas pela lesão (Burda & Sofroniew, 2014; Liu & McCullough, 2013).

A liberação de citocinas pelas células gliais, incluindo interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10) e TNF- α , funcionam como um sinalizador celular de inflamação, como por exemplo: a interleucina-1 β (IL-1 β) que promovem o agravamento da resposta inflamatória e conseqüentemente a mobilização de células de defesa em todo o organismo, como linfócitos T e células *natural killer* (NK), para o SNC e ocasiona aumento da morte de células nervosas (Fathali et al., 2013). Em contrapartida, a liberação de interleucina-10 (IL-10) tem papel antagônico na resposta inflamatória, produzida também pelas células gliais, esta citocina regula a resposta inflamatória inibindo o recrutamento de células de defesa para o tecido nervoso (Albrecht et al., 2019).

A lesão terciária, também chamada de fase crônica, é caracterizada pela astrogliose reativa, neuroinflamação crônica, alterações epigenéticas e o reparo tecidual. Durante este processo também há morte celular, ainda que em menor

quantidade em comparação a lesão secundária, que podem acontecer de dias a meses após o evento hipóxico-isquêmico. As células remanescentes têm seu desenvolvimento afetado e apresentam conexões anômalas,;a partir disto, no longo prazo, acontece a redução do volume das estruturas encefálicas (Davidson et al., 2015).

De modo geral, a lesão HI causa prejuízos ao SNC de diversas maneiras e isso se reflete na maturação e na função cerebral. Clinicamente, o tratamento mais utilizado em recém-nascidos que sofrem HI é a hipotermia terapêutica. Porém, a hipotermia terapêutica não promove recuperação completa mesmo nos casos moderados (Wassink et al., 2018). Em pesquisas pré-clínicas foram investigados diversos agentes neuroprotetores capazes de prevenir ou retardar o processo de lesão, como por exemplo: eritropoietina, melatonina, terapia com células-tronco, entre outras (Procianoy et al., 2001). Desta forma, é importante estudar outras estratégias de recuperação para os efeitos deletérios da HI, como o uso de agentes naturais que possam contribuir para a inibição dos fatores de progressão da lesão.

1.3. Neuroproteção mediada por agentes naturais

Nas últimas décadas, pesquisas com o foco em plantas medicinais como agentes neuroprotetores contra os prejuízos ocasionados pela HI têm mobilizado o interesse de vários grupos de pesquisa, especialmente devido à sua segurança biológica, custo-benefício, disponibilidade, possibilidade de uso prolongado e poucos efeitos colaterais. Dentre estes agentes naturais destaca-se a presença de compostos polifenólicos, como os flavonóides, que apresentam efeitos neuroprotetores, não somente sobre a HI, mas também em outros modelos de distúrbios neurológicos experimentais (Mohsenpour et al., 2021)

A maioria dos compostos derivados de agentes naturais foram descritos como substâncias com efeitos anti-apoptóticos, anti-inflamatórios e antioxidantes. Neste contexto, podemos citar a utilização de extratos de plantas, como por exemplo o extrato de *Punica granatum*, extrato de *Huperzia quadrifariata*, extrato de semente de uva e outros (Odorczyk et al., 2017; Tu et al., 2019; West et al., 2007). Além disto, há estudos que utilizam compostos isolados de plantas, como por exemplo: resveratrol, coumestrol e canabidiol, entre outros. Todos estes agentes naturais demonstram efeitos benéficos na prevenção ou no tratamento em animais submetidos à HI (Alvarez et al., 2008; Anastacio et al., 2019; Anastácio et al., 2014).

A *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel pertence à família Myrtaceae, assim como as espécies *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel e *Plinia jaboticaba* (Vell.) Kausel. Estas espécies de jaboticabeiras são nativas do Brasil, são espécies mais presentes no Sul e Sudeste do país e apresentam características muito semelhantes entre si (Lorenzi et al., 2006; Sobral et al., 2014). A jaboticaba é uma fruta que possui o formato e o tamanho de uma uva, apresentando coloração escura que vai de roxo à preto, sabor agradável e doce e polpa branca; sua casca é uma fonte potencial de antioxidantes naturais (Carvalho-Silva, et al., 2011; Ribeiro et al., 2010). A jaboticaba é muito consumida na forma *in natura*, entretanto, por ser muito perecível, ela é normalmente utilizada na fabricação de geléias, sucos, vinhos, licores e vinagres (Wilbank, M. V.; Chalfun, N. N. J.; Andersen, 1983). Na medicina tradicional há relatos do uso do chá de casca de *P. cauliflora* para o tratamento de doenças como asma, angina, disenteria e infecções cutâneas (Morton, 1987).

Esta fruta contém uma série de compostos fenólicos que possivelmente desempenham efeitos benéficos à saúde, tornando a fruta um alimento funcional.

Estudos já demonstraram que a jabuticaba, especificamente as espécies *P. cauliflora* e *P. jabuticaba*, apresenta importante atividade biológica, notadamente atividade antioxidante, a qual tem sido atribuída principalmente aos flavonóis e antocianinas que estão concentrados em sua grande maioria na casca do fruto (Leite-Legatti et al., 2012; Reynertson et al., 2006; Wu et al., 2012).

Os compostos fenólicos são moléculas que estão presentes em frutas e vegetais que apresentam diversos efeitos biológicos, incluindo as atividades anti-inflamatória, antiaterogênica, vasodilatadora, antimicrobiana e, principalmente, antioxidantes. Estes compostos podem exercer atividade antioxidante por meio da redução direta de EROs, ERNs, ou de forma indireta, como por exemplo, por meio da modulação dos complexos transportadores de elétrons da cadeia mitocondrial (Fraga et al., 2010; Sandoval-Acuña et al., 2014).

A caracterização dos componentes da *P. trunciflora* revelou a presença de diversos macronutrientes e fenóis na casca e na polpa da fruta (Tabela 1). Foi observado que a *P. trunciflora* é uma importante fonte de fibras e carboidratos (Calloni et al., 2015). Além disto, a casca desta fruta apresenta grande quantidade de antocianinas, que são moléculas bioativas capazes de gerar efeitos antioxidantes (Calloni et al., 2015).

Componentes	Casca	Polpa
Carboidratos (g 100g ⁻¹)	11.54 ± 0.01	13.11 ± 0.01
Lipídeos (g 100g ⁻¹)	0.25 ± 0.01	0.17 ± 0.05
Proteínas (g 100g ⁻¹)	1.00 ± 0.03	0.21 ± 0.02
Humidade (%)	75.18 ± 0.85	86.46 ± 0.43
Fibras Totais (g 100g ⁻¹)	8.45 ± 0.01	0.15 ± 0.01
Cinzas (g 100g ⁻¹)	0.58 ± 0.01	0.23 ± 0.02
Conteúdo fenólico total (mg GAE 100g ⁻¹)	313.7 ± 4.26	162.2 ± 7.67
Conteúdo de antocianinas (mg cyn-3-glu 100g ⁻¹)	242.75 ± 14.25	1.1 ± 0.21

Tabela 1 – Conteúdo de macronutrientes e fenóis identificados na casca e polpa da Jabuticaba (*P. trunciflora*) fresca. (Adaptado de Calloni et al., 2015).

Além disto, a caracterização da *P. trunciflora* por meio de espectrometria de massa revelou a presença de compostos fenólicos como a cianidina-3-O-glicosídeo (Figura 2) e a delphinidina-3-O-glicosídeo, que são moléculas com alta interação com o SNC e são capazes de interagir com os complexos transportadores de elétrons e, assim, reduzir os danos oxidativos/nitrosativos (Carrasco-Pozo et al., 2012; Scola et al., 2013; Sharma et al., 2011; Subramaniam and Chesselet, 2013; Taddei et al., 2012; Xie et al., 2012). Estudo *in vitro* com o extrato de *P. trunciflora* promoveu uma redução do estresse oxidativo/nitrosativo em fibroblastos de pulmão humano, por meio da modulação da função mitocondrial (Calloni et al., 2015).

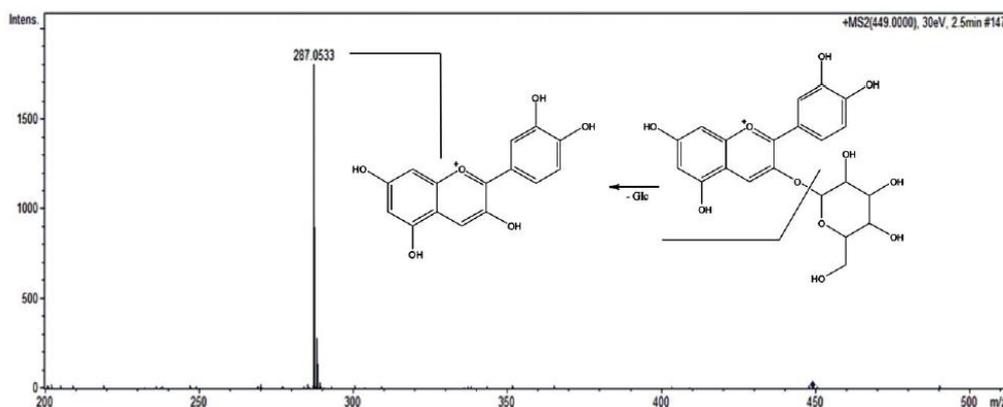


Figura 2 - Cianidina-3-O-glicosídeo da casca de *P. trunciflora* (Calloni et al., 2015).

2. Hipótese de Trabalho

Considerando a necessidade de novas alternativas terapêuticas para o tratamento dos efeitos da lesão HI neonatal e o potencial antioxidante e anti-inflamatório da *Plinia trunciflora*, trabalhamos com a hipótese de que a administração do extrato de *P. trunciflora* por via intraperitoneal possa contribuir para a proteção do SNC de ratos neonatos submetidos a HI.

3. Justificativa

Novas estratégias terapêuticas devem ser desenvolvidas para combater ou prevenir os prejuízos neurológicos que afetam o desenvolvimento cognitivo e motor de indivíduos acometidos pela HI, neste sentido, a utilização de produtos naturais tem sido bem explorada pela indústria farmacêutica nas últimas décadas, e muitas das substâncias extraídas de agentes naturais têm a capacidade de influenciar o funcionamento do SNC, como por exemplo os agentes utilizados para o tratamento de depressão, ansiedade e epilepsia, entre outros. O interesse por plantas medicinais que possam substituir fármacos sintéticos traz muitas vantagens considerando sua segurança, custo-benefício, disponibilidade, uso a longo prazo e

efeitos colaterais limitados. Este trabalho investigou se o extrato do *Plinia trunciflora* tem efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes capazes de produzir neuroproteção em animais submetidos a HI experimental.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a possível ação neuroprotetora do extrato de *P. trunciflora* sobre a hipóxia-isquemia encefálica neonatal em ratos Wistar por meio de parâmetros bioquímicos, histológicos e comportamentais.

3.2 Objetivos Específicos

- 1) Avaliar o comprometimento funcional, na idade adulta, em animais submetidos à HI neonatal e tratados com extrato de *P. trunciflora* em testes comportamentais: Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado, Labirinto Aquático de Morris.
- 2) Avaliar os efeitos do extrato de *P. trunciflora* sobre a severidade da lesão causado pela HI através da análise do volume de lesão em hipocampo, córtex cerebral, estriado e hemisférios por meio da técnica de Hematoxilina-Eosina.
- 3) Verificar os parâmetros de homeostase redox (TBA-RS, GSH, GPx e SOD) no hipocampo, córtex e estriado dos animais, 72 horas após a lesão.
- 4) Quantificar os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias, como IL-1 β e IL-10 no hipocampo dos animais, por meio da técnica de Western Blot.

4. Materiais e Métodos

4.1 Aspectos Éticos

Os experimentos realizados no presente estudo obedecem às normas propostas pelos Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com *Principles of Laboratory Animal Care* (NIH publication 85-23, 1985), a Lei Federal nº 11.794/2008, a resolução normativa nº37, de 15 de fevereiro de 2018 e a Resolução Normativa nº30, de 02 de fevereiro de 2016 do CONCEA - Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos – DBCA. Os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS, sob aprovação nº: 38571.

4.2 Animais

Para este trabalho foram utilizadas ninhadas de ratos Wistar obtidas no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica/UFRGS, Porto Alegre, RS. As ninhadas eram compostas por 8 filhotes (4 filhotes machos e 4 fêmeas). Os filhotes foram mantidos com suas mães em caixas padrão com dimensões 41 cm (comprimento) x 34 cm (largura) x 16 (altura) cm devidamente identificadas de acordo com a Resolução Normativa CONCEA Nº 15, de 2013, em cama de maravalha de pinus selecionada e autoclavada. A troca da maravalha dos ratos foi realizada pelos funcionários do Biotério do Departamento de Bioquímica. A prole foi mantida com a rata-mãe até o dia pós-natal 21 (DPN21), neste dia ocorreu o desmame da prole. Após o desmame as ratas-mães foram previamente anestesiadas em câmara com uso do anestésico inalatório isoflurano e decapitadas com a utilização de guilhotina. Após o desmame as ninhadas foram distribuídas em

caixas padrão de no máximo 4 ratos por caixa. Todos os animais foram mantidos em ciclos claro e escuro de 12h em salas climatizadas (± 22 °C) com alimentação e água *ad libitum* durante todas as etapas do projeto. Os procedimentos propostos no presente projeto foram realizados por experimentadores treinados no manejo dos animais,

4.3 Desenho Experimental

No DPN7 animais de ambos os sexos foram divididos em 4 grupos experimentais, considerando-se a indução do insulto HI e o tratamento recebido: Sham+Sal, HI+Sal, Sham+EPT e HI+EPT. Os animais EPT receberam quatro injeções via intraperitoneal (i.p.) do extrato de *Plínia trunciflora* (EPT) após o procedimento cirúrgico para a indução da HI (descrito no tópico 4.4); a administração foi realizada 1, 24, 48 e 72 horas depois da HI. Os animais do grupo controle (Sal) receberam injeções de solução salina 0,9% nos mesmos períodos.

4.3.1 Experimento 1 – *Estudo comportamental e histológico*

A partir do DPN45 os animais foram submetidos a testes comportamentais para avaliar os níveis de ansiedade e a capacidade cognitiva, nos seguintes testes comportamentais: Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado e o Labirinto Aquático de Morris. Após a conclusão dos testes comportamentais (DPN55), os animais foram anestesiados profundamente com Isoflurano inalatório e decapitados com a utilização de guilhotina. Os encéfalos foram retirados e preparados para confecção de lâminas histológicas.

4.3.2 Experimento 2 – *Estudo de possíveis mecanismos neuroprotetores*

Para compreender os mecanismos que contribuem para a progressão da lesão e a possível proteção das consequências da HI mediada pelo EPT, foram realizadas

análises bioquímicas em diversas estruturas encefálicas. Avaliou-se a resposta inflamatória e o estresse oxidativo. Para estas análises os animais foram eutanasiados 3 horas após a última injeção de extrato, no DPN10.

4.4 Modelo Experimental de Hipóxia-Isquemia Neonatal

Aos 7 dias de vida, os animais foram anestesiados com isoflurano inalatório (4% para indução e 1.5 % para manutenção) e submetidos ao procedimento cirúrgico de oclusão carotídea, com duração máxima de 10 minutos por animal. Os animais foram anestesiados e posicionados em decúbito dorsal. Durante o procedimento foi realizada uma incisão na linha média da face anterior da região cervical, sendo então a artéria carótida comum direita identificada, isolada das estruturas adjacentes e ocluída com fio cirúrgico de seda 4.0 (isquemia). Os animais do grupo Sham (controle cirúrgico) foram anestesiados, e submetidos a incisão e tiveram a carótida exposta, porém sem oclusão e não sofreram hipóxia. Após o procedimento, os animais permaneceram aquecidos a 37°C durante um período de recuperação de 15 minutos antes de serem devolvidos às caixas moradia, onde permaneceram por um intervalo de 2 horas junto às mães. Para realizar a hipóxia, os animais foram colocados em uma câmara e expostos a uma atmosfera hipóxica (8% de oxigênio e 92% de nitrogênio, com fluxo de 5 L/min) durante 60 minutos em grupos de quatro a seis animais. A câmara de hipóxia permaneceu parcialmente submersa em banho-maria a 37°C a fim de manter a temperatura corporal dos ratos lactentes dentro dos limites fisiológicos. Ao final da hipóxia, os animais foram retirados da câmara, permaneceram durante 15 minutos sob aquecimento para recuperação e posteriormente devolvidos à caixa de origem junto às mães (Arteni et al., 2010).

4.5 Administração do Extrato de *Plinia trunciflora*

Os extratos aquosos de *P. trunciflora* foram obtidos a partir da fruta inteira liofilizada e triturada. Assim, o liofilizado foi extraído com água destilada acidificada com HCl (pH 1,5) em banho de ultrassom durante 1 hora. A solução foi resfriada a 4°C durante 12 horas. Após esse período, a solução foi filtrada e liofilizada (Kuskoski et al., 2005). O extrato assim obtido foi empregado para doseamento de polifenóis e antocianinas totais. O extrato liofilizado foi mantido em frasco âmbar envolvido por papel alumínio de forma a impedir a passagem de luz. O extrato de *P. trunciflora* foi administrado na concentração de 10mg/kg diluído em salina (0,9%), na frequência já descrita acima. Para garantir a estabilidade dos elementos ativos presentes no extrato, o mesmo foi preparado diariamente, uma vez que os componentes antioxidantes (princípios ativos presentes no extrato) poderiam ser degradados devido a fotossensibilidade (Kuskoski et al., 2005). A dose foi determinada a partir de uma revisão na literatura de trabalhos que utilizaram extratos via i.p. no modelo de HI (Anastacio et al., 2019; Odorcyk et al., 2017).

4.6 Testes Comportamentais

Os seguintes testes comportamentais foram realizados a partir dos 45 dias de vida: Campo aberto, labirinto em cruz elevado e labirinto aquático de Morris. Para sua realização foram utilizados equipamentos pertencentes ao Departamento de Bioquímica – UFRGS. Foram avaliados 47 ratos Wistar a partir do DPN 45, sendo que 11 animais pertenceram ao grupo Sham+SAL, 10 ao grupo HI+SAL, 14 ao grupo Sham+EPT e 12 ao grupo HI+EPT. Os animais foram filmados durante os testes e os dados foram analisados por meio software *Any-Maze*.

4.6.1 Teste de Campo Aberto

A atividade exploratória dos animais foi avaliada através do teste do campo aberto. Os animais foram colocados em uma caixa de madeira de 50x50x39 (comprimento x altura x profundidade) dividido em 12 quadrantes iguais. Os animais foram colocados no quadrante posterior esquerdo e observou-se a permanência na zona periférica/central e o número de cruzamentos entre os quadrantes, durante 300 segundos (Durán-Carabali et al, 2018)

4.6.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

O teste do labirinto em cruz elevado consiste na avaliação de comportamento tipo-ansioso e exploração do animal. Esse teste foi realizado em um aparato no formato de cruz suspenso a 500 mm do chão e possui 4 braços que apresentam o comprimento de 400 mm por diâmetro de 200 mm, sendo dois braços abertos e dois fechados (com a altura de 300 mm nas paredes). O teste foi realizado por 5 minutos para cada animal, sendo executado por dois avaliadores e as variáveis registradas foram: tempo de permanência nos braços fechados e abertos, e também, o número de movimentos verticais como *rearings* e *head deepings*. O comportamento natural do animal é a permanência nos braços fechados sendo os braços abertos aversivos e uma menor atividade exploratória (Simpson et at., 2011).

4.6.3 Labirinto Aquático de Morris

A memória espacial dos animais foi avaliada utilizando o labirinto aquático de Morris. Este teste foi realizado em um tanque circular de 200cm de diâmetro, sendo 40 cm de profundidade cobertos por água (temperatura de $\pm 23^{\circ}\text{C}$), situada em uma sala contendo pistas visuais nas paredes que o cercam. Uma plataforma com 10 cm de diâmetro encontra-se submersa 2 cm abaixo da superfície da água. Este tanque foi dividido, virtualmente, em 4 quadrantes designados como Norte, Sul, Leste e

Oeste. A posição da plataforma permaneceu no mesmo local durante todo o período de treino. Os animais realizaram 4 “trials” por dia, durante 5 dias consecutivos. Após 24 horas a fase de treino foi realizado o teste, que consiste em uma sessão de 60 segundos sem a plataforma, que se avaliou a memória de longa duração para a posição da plataforma. No dia do teste (probe trial) os animais foram colocados individualmente no labirinto em um mesmo ponto, o mais longe possível da posição da plataforma. Foram analisados: Curva de aprendizado e tempo de latência para encontrar a plataforma no dia do teste (Sanches et al., 2013).

4.7 Análise Histológica

Após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados profundamente com Isoflurano e submetidos à perfusão transcardíaca com solução salina (0,9%), seguido de uma solução de paraformaldeído (4%). Os encéfalos foram removidos e mantidos na mesma solução de paraformaldeído por 24 horas. Em seguida, os encéfalos foram crioprotetidos com a graduação de sacarose 15% e 30% diluída em Tampão Fosfato a 4°C, após foram congelados em isopentano resfriado em nitrogênio líquido (- 30°C) e armazenadas a - 80°C. No equipamento criostato (CM1850, Leica), realizou-se cortes coronais de 30µm com um intervalo de 100 µm e as lâminas contendo as fatias foram coradas com Hematoxilina e Eosina. A análise volumétrica foi realizada pelo método de Cavalieri (Arteni et al., 2010). As imagens das áreas foram capturadas com uma câmera de vídeo acoplada a um microscópio (Nikon) utilizando-se o software Image-J. Nesta análise foram utilizados 8 animais para cada grupo (Sanches et al., 2013).

4.8 Análises Bioquímicas

Para a realização das análises bioquímicas (DPN10), os animais foram anestesiados com o anestésico inalatório Isoflurano e decapitados. Para a análise dos parâmetros de estresse oxidativo utilizou-se amostras de hipocampo, córtex e estriado direito e para a quantificação de proteínas utilizou-se amostras do hipocampo direito. Após a coleta, as amostras foram imediatamente armazenadas a -80°C . O número de animais usados para este experimento é de 4-7 por grupo.

4.8.1 Medida de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS)

A medida de níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) foi realizada de acordo com o método de Yagi como algumas modificações. Utilizou-se 100 μL de sobrenadante de tecido encefálico contendo 0,3mg de proteína, adicionados a 200 μL de TCA 10%. Após centrifugação, 300 μL do sobrenadante foram tratados com ácido tiobarbitúrico 0,67% na proporção de 1:1. Esta mistura foi levada a um banho fervente durante 1 hora e, após, resfriada em água à temperatura ambiente. A coloração rósea resultante foi extraída com 400 μL de butanol. A fluorescência da fase orgânica foi medida em um comprimento de onda de excitação de 515nm e emissão de 553nm. Concomitantemente, foi feita uma curva de calibração usando 1, 1, 3, 3 – tetrametoxipropano, na qual todos os pontos foram tratados da mesma forma que as amostras. Os resultados foram expressos como nmol TBA-RS/mg de proteína (Yagi et al., 1998)

4.8.2 Medida das Concentrações de Glutathiona Reduzida (GSH)

As concentrações de GSH foram determinadas através do método descrito por Browne e Armstrong. As amostras foram diluídas em 10 volumes de tampão fosfato de sódio, pH 8,0, contendo EDTA 5 mM. Adicionou-se 100 μL dessa preparação 100 μL de o-ftaldialdeído (1 mg/mL preparado em metanol) e a mistura

foi incubada durante 15 min à temperatura ambiente e posteriormente lida em espectrofluorímetro a 350 nm (excitação) e 420 nm (emissão). As concentrações de GSH foram calculadas a partir de uma curva padrão de GSH (0,001 – 1 mM) como nmol/mg de proteína (Browne et al., 1998)

4.8.3 Medida da Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida mediante a utilização do Kit Randox. O método baseia-se na formação do vermelho de formazan através da reação do ânion superóxido (produzido no meio a partir de um sistema xantina-xantina oxidase) e do cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazólio gerando um complexo rosa que é lido a 505 nm. A inibição de formação do cromógeno será proporcional à atividade da SOD (Marklund et al., 1985).

4.8.4 Medida da Atividade de Glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi determinada pelo método de Wendel e utilizou-se hidroperóxido de tert-butila como substrato. Em cubeta de quartzo foram adicionados os seguintes reagentes: 600µL de tampão fosfato de potássio 100mM, pH 7,0, contendo EDTA 1mM, 10µL de azida sódica 40mM, 15µL de glutathiona 100mM, 15µL de glutathiona redutase 10U/mL, 10µL de NADPH 10mM e 10µL de amostra (0,1 – 0,3µg de proteína). Esta mistura foi incubada a 25°C durante 1 minuto, a fim de estabilizar o meio, e após foram adicionados 50µL de hidroperóxido de tert-butila 10mM para iniciar a reação. Os brancos serão preparados substituindo a amostra por tampão fosfato. A queda da absorbância a 340nm foi acompanhada durante 240 segundos e a atividade da GPx foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção do NADPH a 340nm de 6,2mM⁻¹ cm⁻¹. A atividade da GPx foi calculada como U/mg de proteína (1U = 1 µmol NADPH consumido/min) (Wendel et al., 1981)

4.8.5 Quantificação de Interleucinas

Determinou-se os níveis de IL-1 β e IL-10 por meio da técnica de Western Blotting previamente descrita. Inicialmente, o tecido foi homogeneizado e determinada a concentração de proteínas. Para este experimento, utilizou-se uma concentração de proteínas equivalentes entre as amostras (40 μ g de proteínas totais) para a corrida no NuPAGE® 4–12% Bis-Tris Gels. Logo após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose, as quais foram bloqueadas por 2 horas e incubadas *overnight*, na temperatura de 4°C, com o anticorpo primário. Anti-IL-1 β (1:1000, Abcam), Anti-IL-10 (1:1000, Abcam) e Anti- α -Tubulina (1:2000, Sigma-Aldrich). As membranas foram lavadas com T-TBS (por 4 vezes/5 min) e incubado com anticorpo secundário (Anti-Rabbit ou Anti-Mouse na concentração de 1:1000) por 2 horas em temperatura ambiente (22°C \pm 2). As proteínas foram detectadas através de quimiluminescência com o auxílio do fotodocumentador GE-LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences). Os dados quantificados como a razão entre a densidade óptica da proteína de interesse e α -Tubulina no mesmo blot. Os resultados estão expressos como porcentagem em relação ao grupo controle (Sham+Sal) (Durán-Carabali et al, 2018).

4.9 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada pelo Modelo Linear Generalizado executado pelo *software* SPSS-21. Foram considerados como fatores fixos a lesão (sham ou HI) e o tratamento (EPT ou salina). A normalidade dos dados foi avaliada por meio de Kolmogorov-Smirnov. Os dados obtidos nos testes comportamentais (campo aberto, labirinto em cruz elevado e probe do teste do labirinto aquático de Morris), análises bioquímicas e histológicas foram analisadas por meio de uma ANOVA de

uma via, seguida pelo teste de comparações múltiplas Tukey. ANOVA de medidas repetidas foi usada para avaliar os resultados da fase de aquisição do labirinto aquático de Morris. Uma vez que um efeito principal ou uma interação entre fatores foi encontrado, o teste *post-hoc* Tukey foi usado para comparar as diferenças entre grupos. Significância foi aceita sempre que $P \leq 0,05$. Os dados são expressos como médias \pm erro padrão. As diferenças significativas consideradas relevantes e discutidas foram: Diferenças entre animais HI+Sal e grupo de controle (Sham+Sal); Diferenças entre animais HI+EPT e seu grupo controle (Sham+EPT); Diferenças entre animais HI+Sal e HI+EPT. O número de animais estimado para cada técnica foi baseado em estudos prévios com metodologia similar.

5. Resultados

5.1 Avaliação Comportamental

5.1.1 Análise do Teste do Campo Aberto

A análise do teste do campo aberto não revelou diferenças significativas no tempo em que os animais permaneceram na zona central ($F_{(3,44)} = 1,166$, $p=0,3333$) ou na periférica ($F_{(3,44)} = 1,092$, $p=0,3626$). Entretanto, os animais do grupo HI+Sal apresentaram maior número de cruzamentos entre os quadrantes ($F_{(3,44)} = 8,501$, $p=0,0001$) quando comparados aos animais Sham+Sal, os animais do grupo HI+EPT não demonstraram diferenças significativas no número de cruzamentos em comparação aos demais grupos (Figura-3). Esses dados sugerem que o modelo de HI induz uma hiperlocomoção nos animais e este comportamento foi prevenido pela administração do EPT.

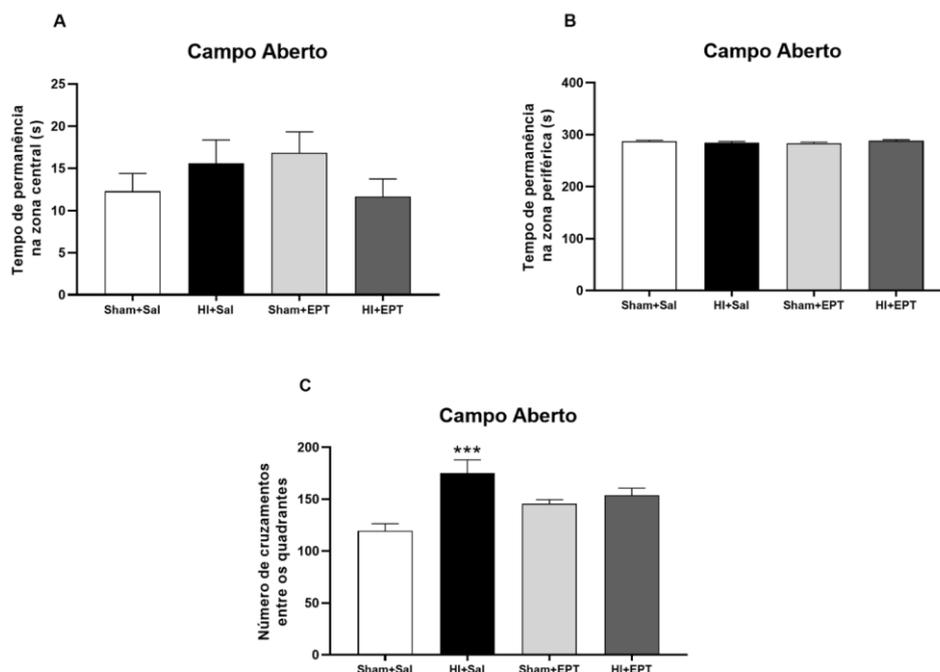


Figura 3 – Análise do Campo Aberto. A) Tempo de permanência dos animais na zona central. B) Tempo de permanência na zona periférica. C) Número de cruzamentos entre os quadrantes. Dados analisados por ANOVA de uma via seguido por Tukey. (n=10-14 animais por grupo). Dados expressos por médias \pm erro padrão. Diferença aceita quando $p < 0,05$ *** Comparação entre HI+SAL e Sham+SAL, $p < 0,0001$.

5.1.2 Análise do Teste do Labirinto em Cruz Elevado

A avaliação do teste do labirinto em cruz elevado demonstrou que os animais do grupo HI+Sal permaneceram mais tempo no braço aberto do que os animais Sham+Sal ($F_{(3,44)} = 5,689$, $p=0,0022$), os animais do grupo HI+EPT não demonstraram diferenças significativas entre os grupos. Além disto, os animais HI+Sal permaneceram menos tempo no braço fechado do que os animais Sham+Sal ($F_{(3,44)} = 2,824$, $p=0,0496$), e não foram observadas diferenças entre os animais do grupo HI+EPT. Os animais HI+Sal apresentaram um maior número *Rearings* quando comparado com os animais Sham+Sal ($F_{(3,44)} = 5,247$, $p=0,0035$), nesta análise não se observou diferenças entre os animais HI+EPT e os demais grupos. Na contagem

do número de *Head Deepings* foi possível observar uma tendência que os animais HI+Sal tiveram um maior número deste comportamento quando comparado com os animais Sham+Sal, neste parâmetro os animais do grupo HI+EPT não diferiram dos animais dos outros grupos ($F_{(3,44)} = 2,810$, $p=0,0504$) (Figura-4). Este teste sugere que os animais HI apresentam um comportamento do tipo-ansioso ao se exporem por mais tempo nos braços abertos, bem como um aumento na atividade exploratória, sendo o EPT foi capaz de prevenir parcialmente essa alteração comportamental.

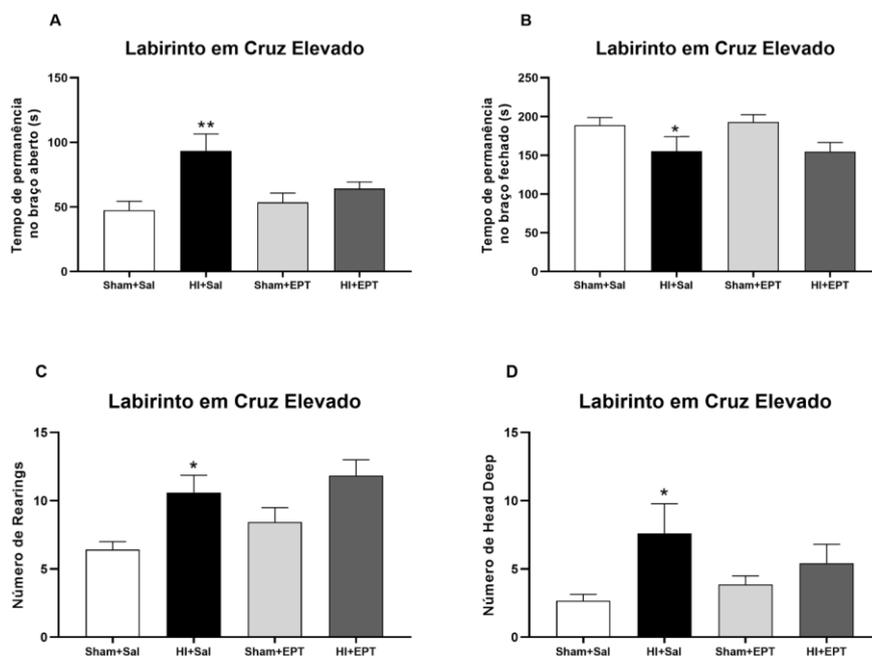


Figura 4 – Análise Labirinto em Cruz Elevado. A) Tempo que os animais permaneceram no braço aberto expressos em segundos. B) Tempo que os animais permaneceram no braço fechado expressos em segundos. C) Número de *Rearings* realizados durante o teste. D) Número de *Head Deepings* realizados durante o teste. Dados analisados por ANOVA de uma via seguido por Tukey. ($n=10-14$ animais por grupo). Dados expressos por médias \pm erro padrão * Comparação entre aos animais HI+SAL e Sham+SAL. Diferença aceita quando $p<0,05$. * $p<0,05$ ** $p<0,001$.

5.1.3 Análise do Labirinto Aquático de Morris

A análise de medidas repetidas do labirinto aquático de Morris revelou que os animais HI+Sal tiveram seu desempenho cognitivo prejudicado quando comparado aos animais do grupo Sham+Sal ($F_{(3,44)} = 23,068$, $p=0,0004$). Os animais Sham+Sal e Sham+EPT tiveram uma aprendizagem contínua durante o treinamento de encontrar a plataforma, já os animais HI+Sal apresentaram maior dificuldade nesta tarefa em relação ao grupo Sham+Sal, observada a partir do segundo dia de treino. No último dia de treino os animais do grupo HI+EPT tiveram um desempenho similares aos animais dos grupos Sham, porém superior ao animais HI+Sal ($F_{(3,44)} = 8,279$, $p=0,0002$) (Figura-5a). De maneira semelhante, a análise da área sob a curva do treinamento demonstrou que os animais do grupo HI+Sal gastam mais tempo para encontrar a plataforma quando comparado aos animais Sham+Sal. Além disto, os animais HI+EPT demonstram um aumento da latência em relação aos animais Sham+EPT e uma diminuição em relação aos animais HI+Sal ($F_{(3,44)} = 23,07$, $p<0,0001$) (Figura-5b). A análise do Probe indicou que os animais do grupo HI+Sal tiveram uma latência maior em relação aos animais Sham+Sal ($F_{(3,44)} = 6,463$, $p=0,0010$) (Figura-5c), já os animais do grupo HI+EPT não apresentaram diferenças significativas em comparação aos demais grupos. Estes dados sugerem que a lesão HI dificulta o processo de aprendizagem e que o EPT foi capaz de manter o nível de aquisição de novas memórias.

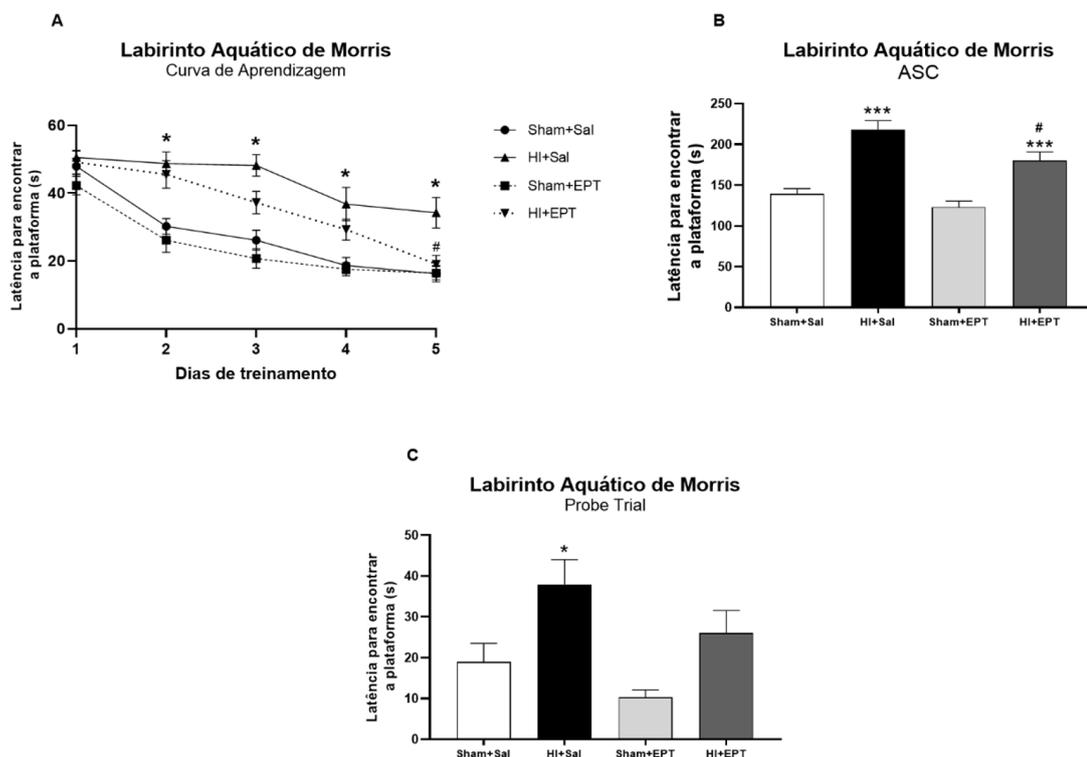


Figura 5 – Análise do treinamento do Labirinto Aquático de Morris. A) Curva de aprendizagem durante os cinco dias de treinamento. Dados analisados por ANOVA medidas repetidas. B) Performance geral dos animais expressos em área sob a curva de aprendizagem. C) Latência ao cruzar pela primeira vez a área da plataforma durante o probe trial. Dados expressos por médias \pm erro padrão. Dados analisados por ANOVA de medidas repetidas e ANOVA de uma via seguido por Tukey, (n=10-14 animais por grupo). * Comparação entre HI+SAL e Sham+SAL. # Comparação entre HI+EPT e HI+Sal. * # Diferença aceita quando $p < 0,05$. *** $p < 0,001$.

5.2 Análise do Volume de Lesão

Observou-se a razão volumétrica entre as estruturas do lado ipsilateral (direito) e contra-lateral (esquerdo) à lesão. A análise volumétrica revelou que os animais do grupo HI+Sal tiveram uma redução no hemisfério ($F_{(3,26)} = 6,314$, $p=0,0023$) no hipocampo ($F_{(3,31)} = 6,032$, $p=0,0023$), no córtex cerebral ($F_{(3,31)} = 4,634$, $p=0,0086$) e no estriado direito ($F_{(3,26)} = 3,921$, $p=0,0196$) quando comparados aos animais Sham+Sal, no entanto, os animais HI+EPT não expressaram diferenças

significativas em comparação aos demais grupos, indicando que o EPT foi capaz de induzir uma proteção tecidual nos animais submetidos à HI. (Figura-6).

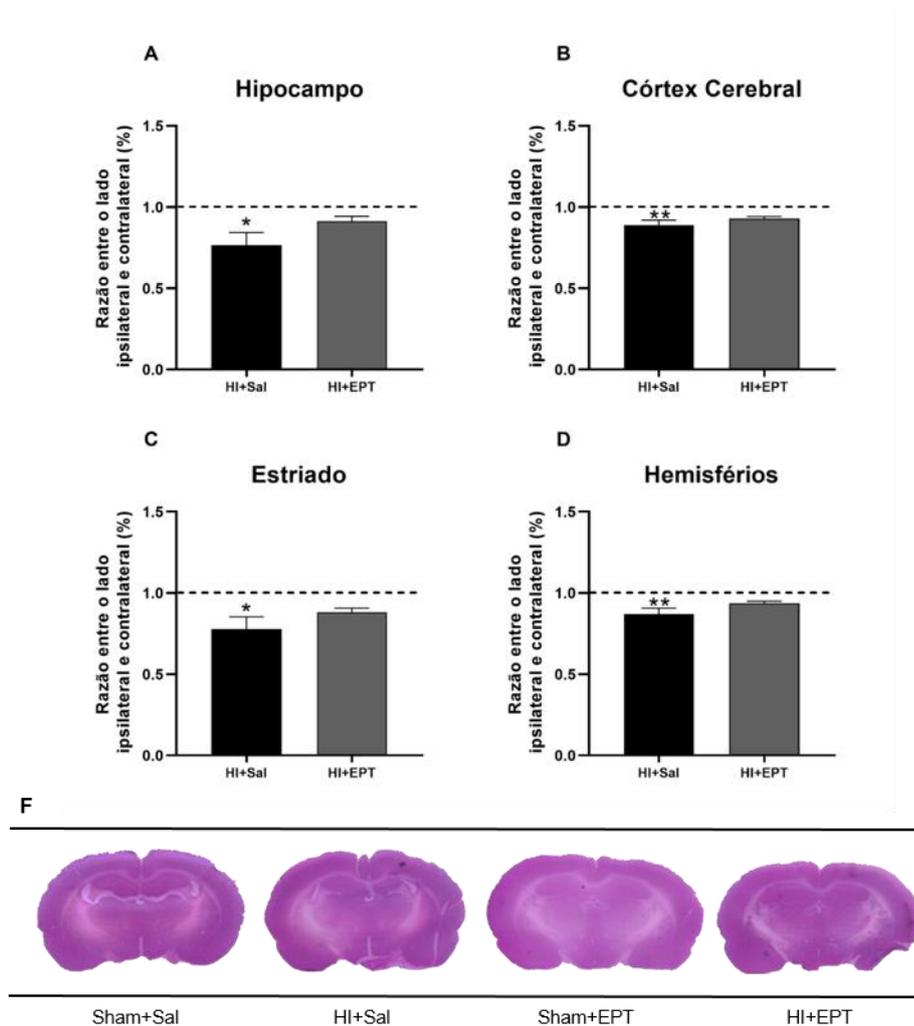


Figura 6 – Análise Volumétrica. Dados dos animais Sham estão representados pela linha pontilhada. A) Relação volumétrica entre o hipocampo direito pelo esquerdo. B) Relação volumétrica entre o córtex cerebral direito pelo esquerdo. C) Relação volumétrica entre o estriado direito pelo esquerdo. D) Relação volumétrica entre o hemisfério direito pelo esquerdo. F) Imagens representativas de coloração de hematoxilina e eosina em secções coronais a nível de hipocampo (Bregma -3.30 mm) de animais adultos. Dados expressos por médias \pm erro padrão. (n=8 animais por grupo). Dados analisados por ANOVA de uma via seguido por Tukey. * Comparação entre HI+SAL e Sham+SAL. * Diferença aceita quando $p < 0,05$. ** $p < 0,001$.

5.3 Parâmetros Bioquímicos

5.3.1 Quantificação de Substâncias Reativas ao TBA-RS (Malondialdeído)

A quantificação dos níveis de malondialdeído (MDA) no hipocampo revelou um aumento na oxidação de lipídeos nos animais do grupo HI+SAL em comparação aos animais Sham+SAL ($F_{(3,17)} = 15,81$ $p < 0,0001$), além disto os animais do grupo HI+EPT apresentaram redução na lipoperoxidação em comparação ao grupo HI+SAL ($p = 0,0200$). A avaliação dos níveis de MDA no córtex cerebral demonstrou que os animais do grupo HI+SAL apresentaram maior lipoperoxidação que os animais Sham+SAL ($F_{(3,16)} = 5,733$, $p = 0,0073$), e não houveram diferenças significativas no grupo HI+EPT quando comparado com os demais grupos. A avaliação dos níveis de MDA no estriado não demonstrou diferenças significativas entre os grupos ($F_{(3,16)} = 0,1257$, $p = 0,9435$) (Figura-7). Esses achados sugerem que a HI causa danos aos lipídeos no hipocampo e córtex cerebral, contudo, o EPT preveniu a lipoperoxidação nessas estruturas.

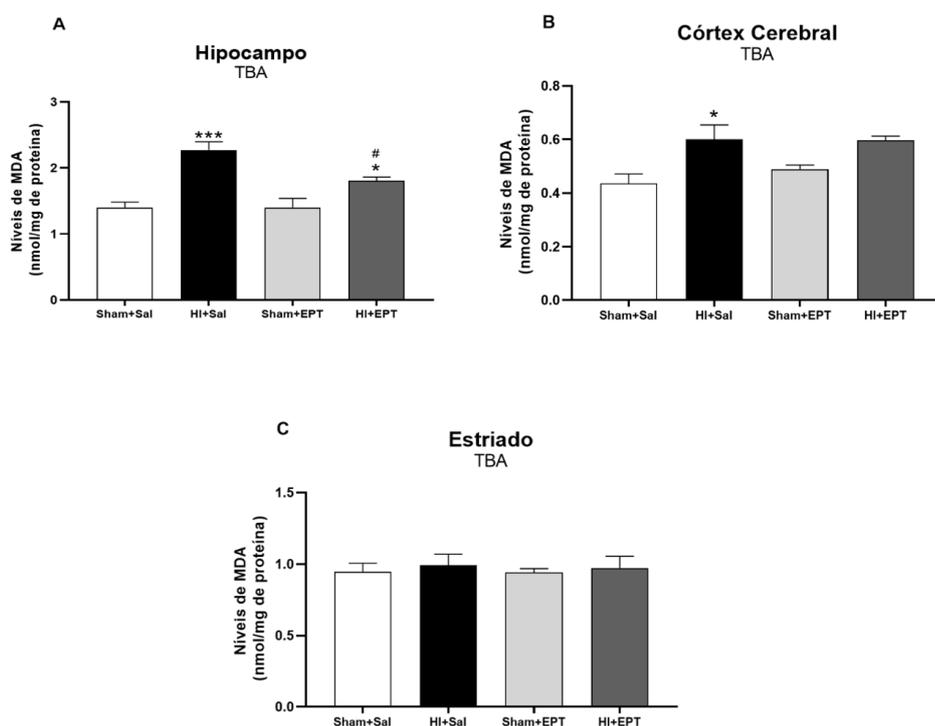


Figura 7 – Medida de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS). A) Quantificação dos níveis de MDA no hipocampo. B) Quantificação dos níveis de MDA no córtex cerebral. C) Quantificação dos níveis de MDA no estriado. Dados expressos por médias \pm erro padrão. (n=4-5 animais por grupo). Dados analisados por ANOVA de uma via seguido por Tukey. * Comparação entre HI+SAL e Sham+SAL. # Comparação entre HI+EPT e HI+Sal. * # Diferença aceita quando $p < 0,05$. *** $p < 0,0001$.

5.3.2 Quantificação dos Níveis de Glutathiona Reduzida

A quantificação dos níveis de GSH no hipocampo demonstrou que os animais HI+Sal apresentaram uma redução significativa desta molécula em relação ao grupo Sham+Sal, além disso, os animais HI+EPT apresentaram um aumento significativo quando comparado aos animais HI+Sal ($F_{(3,19)} = 30,62$, $p = 0,0001$). A dosagem de GSH no córtex cerebral revelou que os animais do grupo HI+SAL e HI+EPT tiveram uma diminuição significativa quando comparado com seus respectivos Sham ($F_{(3,15)} = 11,27$, $p = 0,0004$). A concentração de GSH no estriado não apresentou diferenças

significativas entre os grupos ($F_{(3,16)} = 0,1748$, $p=0,9119$) (Figura-8). Esses dados indicam que houve maior neutralização de EROs pela GSH nos animais HI, e que os animais HI+EPT tiveram menor produção de espécies reativas.

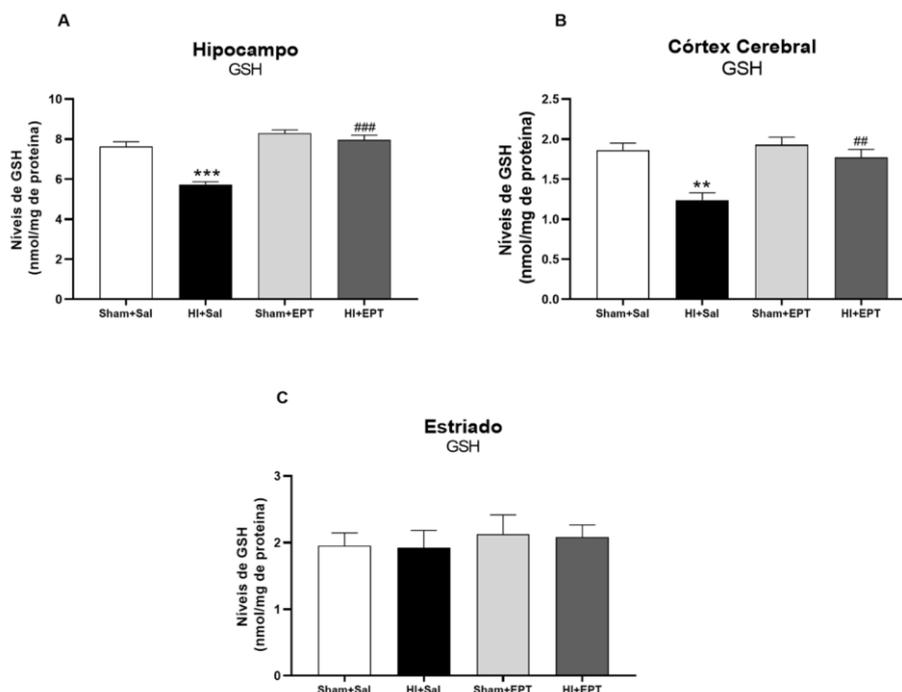


Figura 8 - Quantificação dos Níveis de Glutathiona Reduzida. A) Dosagem dos níveis de GSH no hipocampo. B) Dosagem dos níveis de GSH no córtex cerebral. C) Dosagem dos níveis de GSH no estriado. Dados expressos por médias \pm erro padrão. (n=5-7 animais por grupo) Dados analisados por ANOVA de uma via seguido por Tukey. * Comparação entre HI+SAL e Sham+SAL. # Comparação entre HI+EPT e HI+SAL. ** / ### Diferença aceita quando $p < 0,001$. *** / ### $p < 0,0001$.

5.3.3 Análise da Atividade da Superóxido Dismutase

A atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) não apresentou alterações significativas entre os grupos quando investigada no hipocampo ($F_{(3,20)} = 0,9650$, $p=0,4286$), córtex cerebral ($F_{(3,15)} = 2,115$, $p=0,1412$) e no estriado ($F_{(3,15)} = 0,4790$, $p=0,7017$) (Figura-9).

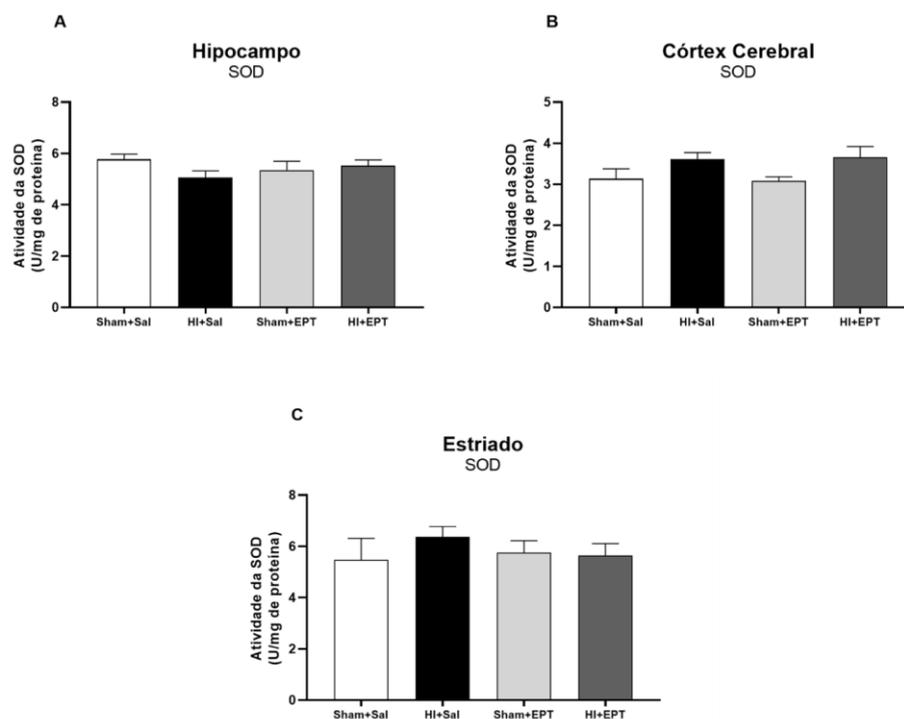


Figura 9 – Medida da Atividade da Superóxido Dismutase. A) Atividade da SOD medida no hipocampo. B) Atividade da SOD medida no córtex cerebral. C) Atividade da SOD medida no estriado. Dados expressos por médias \pm erro padrão. (n=4-7 animais por grupo). Dados analisados por ANOVA de uma via seguido por Tukey. Diferença mínima aceita quando $p < 0,05$.

5.3.4 Análise da Atividade da Glutaciona Peroxidase

A determinação da atividade da enzima antioxidante Iglutaciona peroxidase (GPx) no hipocampo apresentou um aumento significativo nos animais do grupo HI+Sal quando comparados aos animais do grupo Sham+Sal, no entanto, os animais do grupo HI+EPT apresentaram diminuição da atividade enzimática quando comparado aos animais HI+Sal ($F_{(3,16)} = 12,79$, $p=0,0002$). A mensuração da atividade da GPx no córtex cerebral demonstrou um aumento nos animais do grupo HI+Sal em relação aos animais Sham+Sal, os animais HI+EPT apresentaram uma redução quando comparado aos animais HI+Sal ($F_{(3,16)} = 17,09$ $p < 0,0001$). A determinação da atividade da GPx no estriado foi significativamente aumentada nos

animais do grupo HI+Sal comparado com os animais Sham+Sal ($F_{(3,15)} = 8,222$ $p=0,0018$), os animais HI+EPT não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Figura-10).

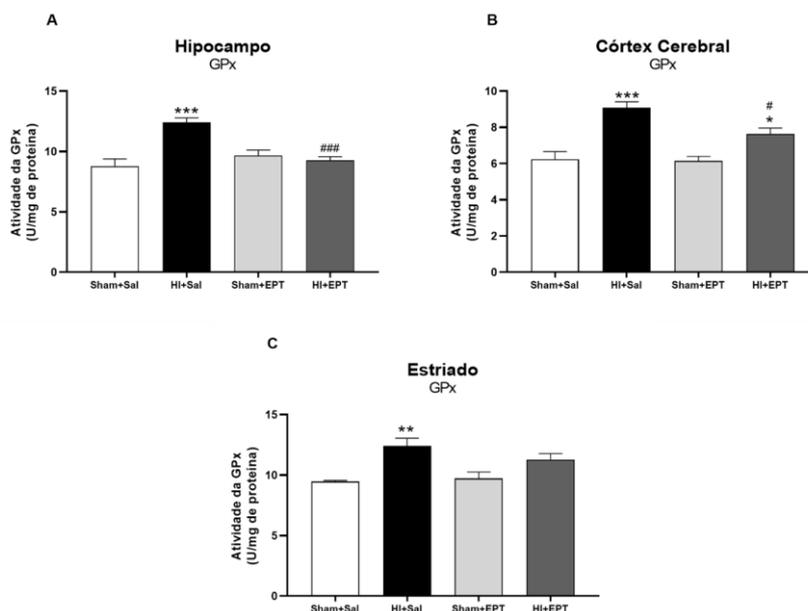


Figura 10 – Medida da Atividade da Glutaciona Peroxidase. A) Atividade da GPx medida no hipocampo. B) Atividade da GPx medida no córtex cerebral. C) Atividade da GPx medida no estriado. Dados expressos por médias \pm erro padrão. (n=4-6 animais por grupo). Dados analisados por ANOVA de uma via seguido por Tukey. * Comparação entre HI+SAL e Sham+SAL. # Comparação entre HI+EPT e HI+Sal. * # Diferença aceita quando $p<0,05$. ** $p<0,001$. *** / ### $p<0,0001$.

5.4 Quantificação de Interleucinas

A quantificação dos níveis de IL-1 β no hipocampo revela que os animais do grupo HI+Sal tiveram uma produção mais acentuada desta interleucina em comparação aos animais do grupo Sham+Sal ($F_{(3,13)} = 3,800$ $p=0,0372$), os animais do grupo HI+EPT não apresentaram diferenças significativas quando comparados aos demais animais. A análise da quantificação dos níveis de IL-10 no hipocampo

não apresentou alterações significativas entre os grupos ($F_{(3,14)} = 0,3567$ $p=0,7851$) (Figura-11).

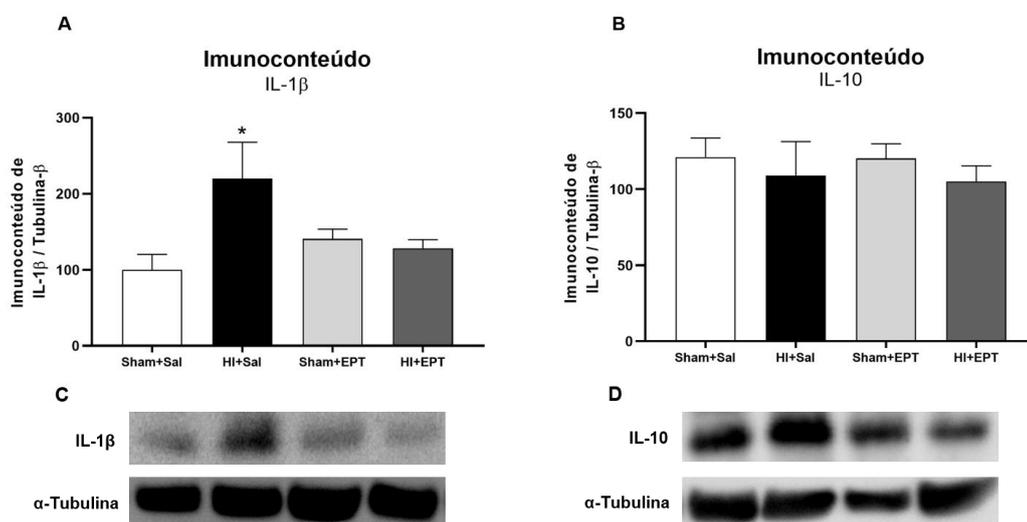


Figura 11 – Quantificação do imunoconteúdo de proteínas do hipocampo. A) Níveis de Interleucina-1 β . B) Níveis de Interleucina-10. C) Imagem representativa do blot de IL-1 β . D) Imagem representativa do blot de IL-10. Dados expressos por médias \pm erro padrão. (n=4-5 animais por grupo). Dados analisados por ANOVA de uma via seguido por Tukey. * Comparação entre HI+Sal e Sham+Sal. * Diferença aceita quando $p<0,05$.

6. Discussão

Esse trabalho investigou os efeitos da administração do EPT após a indução do modelo de HI neonatal. Observamos que os animais que sofreram HI demonstraram, na idade adulta, prejuízos relacionados à memória espacial de referência, comportamentos do tipo-ansioso e aumento da locomoção. Contudo, aqueles animais que foram submetidos à HI e receberam a administração i.p. do EPT não apresentaram os deficits cognitivos, motores e comportamentais, evidenciando assim o efeito neuroprotetor do EPT sobre os parâmetros comportamentais analisados. Além disto, a administração do EPT promoveu efeitos benéficos sobre a preservação ao dano tecidual causado pela lesão hipóxico-isquêmica às estruturas encefálicas, principalmente o hipocampo ipsilateral à oclusão da carótida, região que é amplamente reconhecida como a mais afetada no modelo de HI neonatal (Sanches et al., 2013). No contexto pró-oxidante e neuroinflamatório mediado pela HI, o EPT demonstrou potencial em prevenir os efeitos deletérios da HI sobre o desequilíbrio redox e a inflamação. Este trabalho demonstra pela primeira vez o potencial efeito neuroprotetor do extrato de *Plinia trunciflora* em ratos Wistar submetidos à HI neonatal.

Animais HI apresentam déficits de aprendizagem e comportamentos do tipo-ansioso e hiperlocomoção

O teste do campo aberto é conhecido por avaliar a atividade locomotora e exploratória dos animais (Durán-Carabali et al., 2019). No presente trabalho, não foi evidenciado alteração no tempo de permanência na zona periférica ou central. Entretanto, os animais HI realizaram um maior número cruzamentos entre os quadrantes, evidenciando um aumento na atividade locomotora (Arteni et al., 2010).

O comportamento do tipo-ansioso pode ser analisado através do teste do labirinto em cruz elevado (Sanches et al., 2013). Neste teste vimos que os animais submetidos à HI permaneceram a maior parte do tempo no braço aberto do aparato, realizaram um maior número de movimentos exploratórios verticais (*rearings* e *head deepings*) que os animais do grupo controle. O aumento da atividade locomotora espontânea em ambientes novos é um comportamento natural dos roedores, que requer circuitos neuronais complexos para execução deste comportamento (Arteni et al., 2010; Sanches et al., 2012). Nos roedores, este comportamento é controlado por regiões do hemisfério direito e alterações comportamentais como as observadas nos animais HI, podem estar relacionadas a danos estruturais à integralidade destas áreas cerebrais, principalmente córtex pré-frontal e estriado (Afonso et al., 1993; Sullivan and Gratton, 2002).

Confirmando nossos achados, Sanches et al. (2013) demonstrou o efeito do comportamento tipo-ansioso em animais submetidos à HI no DPN3, quando a avaliação no labirinto em cruz elevado foi realizada no DPN60. E Arteni et al. (2010) observou que ratos machos submetidos à HI no DPN7 apresentam aumento dos níveis de ansiedade na idade adulta (DPN90). Uma possível explicação sobre este efeito envolve o sistema dopaminérgico que é afetado pela HI, e causa uma redução na ativação dos receptores D2 no estriado (Filloux et al., 1996). Sabe-se que o controle inibitório tônico exercido pelo córtex pré-frontal na hiperlocomoção é induzido por agonistas dopaminérgicos, estimulados principalmente por receptores semelhantes aos D2 (Arteni et al., 2010; Sanches et al., 2015). Desta forma, nossos dados sugerem que a HI gera alteração de tônus inibitório realizado pelo córtex pré-frontal sobre as estruturas subcorticais, como o estriado, que potencialmente levam

ao aumento da locomoção e atitudes impulsivas em um ambiente novo, excedendo o comportamento defensivo inato dos roedores.

O EPT demonstrou uma redução no tempo de permanência dos animais HI nos braços abertos e manifestações exploratórias verticais, o que sugere um possível efeito ansiolítico. Sacchet e colaboradores (2015) demonstraram que o EPT pode conter agentes que apresentam propriedades ansiolíticas que podem estar relacionados com a melhora da ansiedade de animais submetidos à situação de estresse.

Os prejuízos na memória espacial de referência causados pela HI já estão bem consolidados na literatura (Durán-Carabali et al., 2019; Sanches et al., 2015). O labirinto aquático de Morris é um teste que avalia este tipo de memória, em nosso estudo observamos que os animais submetidos à HI apresentaram um desempenho inferior aos animais controle (Sham), sendo assim, eles demonstraram maior dificuldade para encontrar a plataforma submersa no decorrer do treinamento e também no *probe trial*. Além do mais, os animais HI que receberam EPT apresentaram uma latência para encontrar a plataforma menor que os animais HI que não receberam EPT durante o treinamento, porém, quando analisarmos a área sob a curva (ASC) observamos que os animais do grupo HI+EPT apresentaram diferenças significativas para o grupo HI+Sal e também para o grupo Sham+Sal, sugerindo que o EPT foi parcialmente eficaz na prevenção dos prejuízos relacionados a aprendizagem.

De acordo com Sanches (2015) e Durán-Carabali (2019) os déficits na memória causados pela HI estão correlacionados principalmente com a perda tecidual do hipocampo, além de outras regiões encefálicas como o córtex pré-frontal

e o corpo caloso (Jin et al., 2009). Está muito bem esclarecido que o hipocampo é uma das principais estruturas relacionadas ao processo de aprendizagem e uma lesão neuronal neste local desencadeia um declínio cognitivo (Pereira et al., 2007). Neste estudo nós observamos uma diminuição do hipocampo dos animais HI+Sal e também uma preservação desta estrutura nos animais HI+EPT, o que explicaria os resultados encontrados.

Os danos histológicos observados em animais HI foram prevenidos pelo EPT

Diversas estruturas encefálicas podem ser afetadas pela HI, entretanto neste modelo experimental não é possível determinar qual será a extensão e o grau de severidade da lesão encefálica, pois variados fatores podem interferir na plasticidade e neurogênese, o que alteraria o grau de lesão (Arteni et al., 2010; Durán-Carabali et al., 2019; Sanches et al., 2012). No presente estudo observamos o comprometimento de algumas regiões que puderam ser detectadas na idade adulta por meio da análise volumétrica da relação ipsilateral/contralateral à carótida ocluída. Observamos que a HI causa atrofia unilateral ao hemisfério, córtex, estriado e hipocampo. Ademais, o tratamento com EPT foi capaz de preservar o tecido nervoso da lesão HI, isto se reflete na melhor performance nos testes comportamentais do grupo HI+EPT quando comparado aos animais HI+Sal. Outros estudos utilizando extratos vegetais como forma de tratamento para a HI também demonstraram que são capazes de reduzir os danos teciduais quando administrados após a HI, como por exemplo o extrato de alcalóides de *Huperzia quadrifarita* (Odorcyk et al., 2017).

É bem fundamentado que os danos teciduais decorrentes da HI estão relacionados ao aumento da ativação das vias de morte celular, como apoptose e necrose, além do aumento da resposta inflamatória e da produção de EROs que

podem contribuir para a severidade da lesão (Davidson et al., 2015). Os eventos fisiopatológicos da HI se originam a partir da falha metabólica causada pela restrição do fluxo sanguíneo para o tecido nervoso (Davidson et al., 2015). De alguma forma, ainda não bem esclarecida, o EPT foi capaz de atuar esta cascata bioquímica que ocorre após o insulto. Uma das hipóteses está relacionada com a atividade mitocondrial, em um estudo *in vitro* o extrato produzido a partir da casca de *P. trunciflora* foi capaz de manter a função mitocondrial minimizando o ataque de espécies reativas a fibroblastos (Calloni et al., 2015).

O EPT previne a liberação de interleucinas pró-inflamatórias em ratos submetidos à HI

A neuroinflamação é uma característica presente no quadro pós-HI, assim como são o recrutamento de células de defesa periféricas, ativação dos macrófagos locais (microglia) e dos astrócitos (Zhao et al., 2013). Além dos mecanismos descritos, neurônios lesados produzem várias citocinas, incluindo interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10) e TNF- α , que ativam a resposta inflamatória e desencadeiam processos bioquímicos que levam à falha de energia secundária e a morte de células neuronais (Albrecht et al., 2019). A falha energética secundária ocorre entre 6 a 48 horas após a HI, gerando um prolongamento dos processos de necrose e apoptose podendo perdurar por dias ou até semanas após a lesão (Albrecht et al., 2019).

Na quantificação dos imunocorredores de interleucinas no hipocampo ipsilateral, observamos que a HI causa um aumento da IL-1 β enquanto o extrato mantém atenuado os níveis desta interleucina. Conforme descrito por Albrecht et al., (2019) a HI gera um aumento da liberação desta interleucina frente a lesão causada

aos neurônios. Dentre os compostos identificados no extrato metanólico da jabuticaba (*P. cauliflora*) liofilizado, destaca-se o composto flavonoide quercetina. Embora este composto ainda não tenha sido identificado na *P. trunciflora*, podemos sugerir que algum composto semelhante ou que desempenhe os mesmos efeitos anti-inflamatórios esteja presente no EPT, como os encontrados em tratamentos usando quercetina, ou resveratrol os quais causam uma supressão de IL-1 β , IL-6 e também TNF- α em animais submetidos à HI (Le et al., 2019; Wu et al., 2019). Além disto, animais lesados e que receberam pré-tratamento com pterostilbeno apresentaram uma diminuição significativa na pontuação neurológica, além de melhorar o comprometimento da memória de trabalho e o déficit motor (Li et al., 2016). Estes efeitos neuroprotetores foram acompanhados da inibição da apoptose e diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α) e dos fatores de transcrição (p-65 e NF- α) na região CA1 do hipocampo (Li et al., 2016).

Neste estudo, também observamos que os níveis de IL-10 estão levemente diminuídos nos animais HI, embora este dado não seja significativo, podemos salientar que esta interleucina anti-inflamatória não é modulada pelo EPT. Nossos dados sugerem que a HI aumenta a resposta inflamatória frente ao insulto celular e que o EPT é capaz de prevenir estes danos e limitar a produção de IL-1 β .

O EPT previne os danos causados pelas espécies reativas no córtex e hipocampo

O encéfalo utiliza cerca de 20% do oxigênio consumido pelo organismo, o que indica alta atividade oxidativa. Além disto, o tecido neurológico tem alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados, o que significa que este tecido é mais suscetível à lipoperoxidação (Li et al., 2002). Neste estudo observamos que a HI aumenta os níveis de lipoperoxidação no hipocampo e córtex cerebral, ocasionando à geração

de aldeídos e alcanos potencialmente nocivos, que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA-RS). Contudo, verificamos que o EPT foi capaz de prevenir estes danos aos lipídeos no córtex cerebral e atenuar este efeito principalmente no hipocampo.

A peroxidação de ácidos graxos insaturados de fosfolipídios das membranas plasmáticas pode resultar em significativa perda da integridade da membrana, sendo este um dos efeitos mais importantes dos danos oxidativos (Mavelli et al., 1982). Além disto, alterações na oxidação de aminoácidos geram efeitos importantes nas funções celulares, pois proteínas oxidadas perdem sua atividade biológica e se tornam sensíveis à proteólise (Stadtman, 1990). Conforme observado por Odorcky (2020) ratos submetidos à HI são mais suscetíveis ao dano lipídico, causado pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio em virtude da falha mitocondrial. Contudo, autores descrevem que a *P. trunciflora* é capaz de prevenir o dano aos lipídios e as proteínas em ratos diabéticos, desempenhando uma importante função antioxidante (Calloni et al., 2020; Sacchet et al., 2015).

Na HI observa-se o inchamento mitocondrial e perda do potencial de membrana mitocondrial, estes processos patológicos são clássicos em eventos hipóxicos e/ou isquêmicos (Odorcyk et al., 2021). Isto ocorre pelo aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular decorrente das despolarizações excessivas dos neurônios e da falha de bomba de $Na^+ - K^+$ ATPase (Sanderson et al., 2013). Este mecanismo patológico leva a uma falha metabólica com diminuição da produção de ATP e o aumento de espécies reativas de oxigênio (Davidson et al., 2015; Sanderson et al., 2013).

As avaliações dos parâmetros oxidativos revelaram que não houve alteração na atividade da enzima SOD no hipocampo, no córtex e no estriado ipsilateral à lesão. A função desta enzima é eliminar o ânion superóxido através da reação de dismutação dessa ERO em peróxido de hidrogênio. Entretanto, provavelmente a atividade desta enzima esteja alterada em outros tempos de avaliação, como visto por Pereira et al. (2009) que demonstrou que a atividade da SOD está aumentada na idade adulta, o que demonstra o padrão complexo da atividade dessa enzima.

Por outro lado, observamos que a atividade da enzima GPx está aumentada nos animais HI e que o EPT foi capaz de prevenir esse efeito no hipocampo e parcialmente no córtex cerebral. Da mesma forma observamos que a concentração da molécula antioxidante GSH está reduzida no hipocampo e córtex cerebral dos animais HI e normalizada nos animais que receberam o EPT. O aumento da produção de EROs causado pela HI, aumenta a atividade da enzima antioxidante GPx para suprir a necessidade de converter peróxido de hidrogênio a água, oxidando a GSH ao seu correspondente dissulfeto (GSSG). Além do mais, há relatos que EPT tem função antioxidante, porém este mecanismo ainda não é bem elucidado (Calloni et al., 2015; Sacchet et al., 2015).

Integrando os resultados acima discutidos, sugerimos a que perda neuronal causada pela HI é mediada principalmente pelos déficits energéticos e alterações moleculares decorrentes da falta do suprimento de oxigênio e glicose; e que a morte de neurônios se reflete em alterações na morfologia das estruturas encefálicas e prejudica o funcionamento do SNC. O EPT foi capaz de proteger os neurônios do ataque de espécies reativa e essa neuroproteção contribuiu para a sobrevivência

celular e integridade tecidual, fatores importantes para um melhor prognóstico funcional após insultos neonatais como a HI.

7. Conclusão

Embora os mecanismos de neuroproteção promovidos pelo EPT ainda sejam pouco conhecidos, as evidências apresentadas neste trabalho somadas às informações já descritas na literatura sugerem que os compostos bioativos identificados na *P. trunciflora*, como as antocianinas, podem ser responsáveis pelos efeitos benéficos do extrato pelo seu potencial antioxidante (Aparecida De Assis et al., 2009; Calloni et al., 2015). Neste estudo observamos os prejuízos cognitivos, histológicos e bioquímicos causados pela HI, os quais foram majoritariamente prevenidos pelo EPT, indicando que a *P. trunciflora* apresenta grande potencial neuroprotetor. Novos estudos são necessários para desvendar os possíveis mecanismos de ação dos componentes bioativos da *P. trunciflora*.

8. Referências

- Afonso, D., Santana, C., Rodriguez, M., 1993. Neonatal lateralization of behavior and brain dopaminergic asymmetry. *Brain Res. Bull.* 32, 11–16. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(93\)90312-Y](https://doi.org/10.1016/0361-9230(93)90312-Y)
- Airede, A.I., 1991. Birth asphyxia and hypoxic-ischaemic encephalopathy: Incidence and severity. *Ann. Trop. Paediatr.* 11, 331–335. <https://doi.org/10.1080/02724936.1991.11747524>
- Albrecht, M., Zitta, K., Groenendaal, F., van Bel, F., Peeters-Scholte, C., 2019. Neuroprotective strategies following perinatal hypoxia-ischemia: Taking aim at NOS. *Free Radic. Biol. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.02.025>
- Alvarez, F.J., Lafuente, H., Rey-Santano, M.C., Mielgo, V.E., Gastiasoro, E., Rueda, M., Pertwee, R.G., Castillo, A.I., Romero, J., Martínez-Orgado, J., 2008. Neuroprotective effects of the nonpsychoactive cannabinoid cannabidiol in hypoxic-ischemic newborn piglets. *Pediatr. Res.* 64, 653–658. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e318186e5dd>
- Anastacio, J.B.R., Sanches, E.F., Nicola, F., Odorcyk, F., Fabres, R.B., Netto, C.A., 2019. Phytoestrogen coumestrol attenuates brain mitochondrial dysfunction and long-term cognitive deficits following neonatal hypoxia–ischemia. *Int. J. Dev. Neurosci.* 79, 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2019.10.009>
- Anastácio, J.R., Netto, C. a., Castro, C.C., Sanches, E.F., Ferreira, D.C., Noschang, C., Krolow, R., Dalmaz, C., Pagnussat, A., 2014. Resveratrol treatment has neuroprotective effects and prevents cognitive impairment after chronic cerebral hypoperfusion. *Neurol. Res.* 36, 627–633. <https://doi.org/10.1179/1743132813Y.0000000293>
- Aparecida De Assis, S., Velloso, J.C.R., Brunetti, I.L., Khalil, N.M., Leite, K.M.D.S.C., Martins, A.B.G., Oliveira, O.M.M.D.F., 2009. Antioxidant activity, ascorbic acid and total phenol of exotic fruits occurring in Brazil. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 60, 439–448. <https://doi.org/10.1080/09637480701780641>
- Arteni, N.S., Pereira, L.O., Rodrigues, A.L., Lavinsky, D., Achaval, M.E., Netto, C.A., 2010. Lateralized and sex-dependent behavioral and morphological effects of unilateral neonatal cerebral hypoxia-ischemia in the rat. *Behav. Brain Res.* 210, 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.02.015>
- Calloni, C., Agnol, R.D., Martínez, L.S., de Siqueira Marcon, F., Moura, S., Salvador, M., 2015. Jaboticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) fruit reduces oxidative stress in human fibroblasts cells (MRC-5). *Food Res. Int.* 70, 15–22. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2015.01.032>
- Calloni, C., Martínez, L.S., Gil, D.F., da Silva, D.M., Rosales, P.F., Agostini, F., Moura e Silva, S., Parmegiani Jahn, M., Salvador, M., 2020. Jaboticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) improved the lipid profile and immune system and reduced oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Food*

Biochem. 44. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13383>

- Carrasco-Pozo, C., Mizgier, M.L., Speisky, H., Gotteland, M., 2012. Differential protective effects of quercetin, resveratrol, rutin and epigallocatechin gallate against mitochondrial dysfunction induced by indomethacin in Caco-2 cells. *Chem. Biol. Interact.* 195, 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.12.007>
- Clerici, M.T.P.S., Carvalho-Silva, L.B., 2011. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. *Food Res. Int.* 44, 1658–1670. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.020>
- Davidson, J.O., Wassink, G., van den Heuij, L.G., Bennet, L., Gunn, A.J., 2015. Therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy - Where to from here? *Front. Neurol.* <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00198>
- De Haan, M., Wyatt, J.S., Roth, S., Vargha-Khadem, F., Gadian, D., Mishkin, M., 2006. Brain and cognitive-behavioural development after asphyxia at term birth. *Dev. Sci.* 9, 350–358. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7687.2006.00499.x>
- Dilenge, M.E., Majnemer, A., Shevell, M.I., 2001. Long-term developmental outcome of asphyxiated term neonates. *J. Child Neurol.* <https://doi.org/10.1177/08830738010160110201>
- Durán-Carabali, L.E., Arcego, D.M., Sanches, E.F., Odorcyk, F.K., Marques, M.R., Tosta, A., Reichert, L., Carvalho, A.S., Dalmaz, C., Netto, C.A., 2019. Preventive and therapeutic effects of environmental enrichment in Wistar rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. *Behav. Brain Res.* 359, 485–497. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.11.036>
- Fathali, N., Ostrowski, R.P., Hasegawa, Y., Lekic, T., Tang, J., Zhang, J.H., 2013. Splenic Immune Cells in Experimental Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Transl. Stroke Res.* 4, 208–219. <https://doi.org/10.1007/s12975-012-0239-9>
- Ferriero, D.M., 2001. Oxidant mechanisms in neonatal hypoxia-ischemia, in: *Developmental Neuroscience*. pp. 198–202. <https://doi.org/10.1159/000046143>
- Filloux, F.M., Adair, J., Narang, N., 1996. The temporal evolution of striatal dopamine receptor binding and mRNA expression following hypoxia-ischemia in the neonatal rat. *Dev. Brain Res.* 94, 81–91. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(96\)00053-3](https://doi.org/10.1016/0165-3806(96)00053-3)
- Fraga, C.G., Galleano, M., Verstraeten, S. V., Oteiza, P.I., 2010. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol. Aspects Med.* <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.006>
- Gaschler, M.M., Stockwell, B.R., 2017. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>
- Graham, E.M., Ruis, K.A., Hartman, A.L., Northington, F.J., Fox, H.E., 2008. A systematic review of the role of intrapartum hypoxia-ischemia in the causation of neonatal encephalopathy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*

<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2008.06.094>

- Jin, Y., Silverman, A.J., Vannucci, S.J., 2009. Mast cells are early responders after hypoxia-ischemia in immature rat brain. *Stroke*. 40, 3107–3112. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.549691>
- Kuskoski, E.M., Asuero, A.G., Troncoso, A.M., Mancini-Filho, J., Fett, R., 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnol. Aliment.* 25, 726–732. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>
- Lai, M.-C., Yang, S.-N., 2011. Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 609813. <https://doi.org/10.1155/2011/609813>
- Lawn, J.E., Cousens, S., Zupan, J., 2005. 4 Million neonatal deaths: When? Where? Why? *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)71048-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71048-5)
- Le, K., Chibaatar Daliv, E., Wu, S., Qian, F., Ali, A.I., Yu, D., Guo, Y., 2019. SIRT1-regulated HMGB1 release is partially involved in TLR4 signal transduction: A possible anti-neuroinflammatory mechanism of resveratrol in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Int. Immunopharmacol.* 75. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105779>
- Leite-Legatti, A.V., Batista, A.G., Dragano, N.R.V., Marques, A.C., Malta, L.G., Riccio, M.F., Eberlin, M.N., Machado, A.R.T., de Carvalho-Silva, L.B., Ruiz, A.L.T.G., de Carvalho, J.E., Pastore, G.M., Maróstica, M.R., 2012. Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. *Food Res. Int.* 49, 596–603. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.044>
- Li, D., Song, T., Yang, L., Wang, X., Yang, C., Jiang, Y., 2016. Neuroprotective actions of pterostilbene on hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats through upregulation of heme oxygenase-1. *Int. J. Dev. Neurosci.* 54, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.08.005>
- Li, J., Wang, H., Stoner, G.D., Bray, T.M., 2002. Dietary supplementation with cysteine prodrugs selectively restores tissue glutathione levels and redox status in protein-malnourished mice. *J. Nutr. Biochem.* 13, 625–633. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00218-8](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00218-8)
- Lorenzi, H., LaRocca, L.L., Instituto Plantarum de Estudos da Flora., 2006. Brazilian fruits & cultivated exotics (for consuming in natura). Instituto Plantarum de Estudos da Flora.
- Mavelli, I., Rigo, A., Federico, R., Ciriolo, M.R., Rotilio, G., 1982. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in developing rat brain. *Biochem. J.* 204, 535–540. <https://doi.org/10.1042/bj2040535>
- Mohsenpour, H., Pesce, M., Patruno, A., Bahrami, A., Pour, P.M., Farzaei, M.H., 2021. A review of plant extracts and plant-derived natural compounds in the prevention/treatment of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1–37. <https://doi.org/10.3390/ijms22020833>

- Morton, J., 1987. Jackfruit in: Fruits of warm climates [WWW Document]. Julia F. Mort. Mama, F. L.
- Odorcyk, F.K., Ribeiro, R.T., Roginski, A.C., Duran-Carabali, L.E., Couto-Pereira, N.S., Dalmaz, C., Wajner, M., Netto, C.A., 2021. Differential Age-Dependent Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress, and Apoptosis Induced by Neonatal Hypoxia-Ischemia in the Immature Rat Brain. *Mol. Neurobiol.* 58, 2297–2308. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02261-1>
- Odorcyk, F.K., Sanches, E.F., Nicola, F.C., Moraes, J., Pettenuzzo, L.F., Kolling, J., Siebert, C., Longoni, A., Konrath, E.L., Wyse, A., Netto, C.A., 2017. Administration of *Huperzia quadrifariata* Extract, a Cholinesterase Inhibitory Alkaloid Mixture, has Neuroprotective Effects in a Rat Model of Cerebral Hypoxia-Ischemia. *Neurochem. Res.* 42, 552–562. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2107-6>
- Pereira, L.O., Arteni, N.S., Petersen, R.C., da Rocha, A.P., Achaval, M., Netto, C.A., 2007. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 87, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2006.07.003>
- Procianoy, R.S., De, R., Silveira, C., 2001. ARTIGO DE REVISÃO S63 *Jornal de Pediatria Síndrome hipóxico-isquêmica Hypoxic-ischemic syndrome*, *Jornal de Pediatria*.
- Reynertson, K.A., Wallace, A.M., Adachi, S., Gil, R.R., Yang, H., Basile, M.J., D'Armiento, J., Weinstein, I.B., Kennelly, E.J., 2006. Bioactive depsides and anthocyanins from jaborcaba (*Myrciaria cauliflora*). *J. Nat. Prod.* 69, 1228–1230. <https://doi.org/10.1021/np0600999>
- Ribeiro, A.O., Silva, A.F., Castro, A.H.F., 2010. Identificação de espécies da família Asteraceae, revisão sobre usos e triagem fitoquímica do gênero *Eremanthus* da Reserva Boqueirão, Ingaí-MG. *Rev. Bras. Plantas Med.* 12, 456–465. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722010000400009>
- Sacchet, C., Mocelin, R., Sachett, A., Bevilaqua, F., Chitolina, R., Kuhn, F., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Roman Junior, W.A., Rosemberg, D.B., Dal Magro, J., Conterato, G.M.M., Piato, A.L., 2015. Antidepressant-Like and Antioxidant Effects of *Plinia trunciflora* in Mice. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2015, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/601503>
- Sanches, E.F., Arteni, N., Nicola, F., Aristimunha, D., Netto, C.A., 2015. Sexual dimorphism and brain lateralization impact behavioral and histological outcomes following hypoxia-ischemia in P3 and P7 rats. *Neuroscience* 290, 581–593. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.12.074>
- Sanches, E.F., Arteni, N.S., Nicola, F., Boisserand, L., Willborn, S., Netto, C.A., 2013. Early hypoxia-ischemia causes hemisphere and sex-dependent cognitive impairment and histological damage. *Neuroscience* 237, 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.01.066>

- Sanches, E.F., Arteni, N.S., Spindler, C., Moysés, F., Siqueira, I.R., Perry, M.L., Netto, C.A., 2012. Effects of pre- and postnatal protein malnutrition in hypoxic-ischemic rats. *Brain Res.* 1438, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.12.024>
- Sanderson, T.H., Reynolds, C.A., Kumar, R., Przyklenk, K., Hüttemann, M., 2013. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: Pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation. *Mol. Neurobiol.* <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8344-z>
- Sandoval-Acuña, C., Ferreira, J., Speisky, H., 2014. Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. *Arch. Biochem. Biophys.* <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.05.017>
- Scola, G., Kim, H.K., Young, L.T., Andreatza, A.C., 2013. A fresh look at complex i in microarray data: Clues to understanding disease-specific mitochondrial alterations in bipolar disorder. *Biol. Psychiatry.* <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.06.028>
- Shankaran, S., Pappas, A., McDonald, S.A., Vohr, B.R., Hintz, S.R., Yolton, K., Gustafson, K.E., Leach, T.M., Green, C., Bara, R., Huitema, C.M.P., Ehrenkranz, R.A., Tyson, J.E., Das, A., Hammond, J., Peralta-Carcelen, M., Evans, P.W., Heyne, R.J., Wilson-Costello, D.E., Vaucher, Y.E., Bauer, C.R., Dusick, A.M., Adams-Chapman, I., Goldstein, R.F., Guillet, R., Papile, L.-A., Higgins, R.D., 2012. Childhood Outcomes after Hypothermia for Neonatal Encephalopathy. *N. Engl. J. Med.* 366, 2085–2092. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1112066>
- Sharma, L.K., Fang, H., Liu, J., Vartak, R., Deng, J., Bai, Y., 2011. Mitochondrial respiratory complex I dysfunction promotes tumorigenesis through ROS alteration and AKT activation. *Hum. Mol. Genet.* 20, 4605–4616. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr395>
- Sobral, M., Proença, C., Souza, M., Mazine, F., Lucas, E., 2014. Lista de espécies da flora do Brasil. [WWW Document]. *Jard. Botânico do Rio Janeiro.*
- Stadtman, E.R., 1990. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic. Biol. Med.* 9, 315–325. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90006-5](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90006-5)
- Subramaniam, S.R., Chesselet, M.F., 2013. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 106–107, 17–32. [https://doi.org/S0301-0082\(13\)00040-3](https://doi.org/S0301-0082(13)00040-3) [pii]r10.1016/j.pneurobio.2013.04.004
- Sullivan, R.M., Gratton, A., 2002. Behavioral effects of excitotoxic lesions of ventral medial prefrontal cortex in the rat are hemisphere-dependent. *Brain Res.* 927, 69–79. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)03328-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)03328-5)
- Taddei, M.L., Giannoni, E., Raugei, G., Scacco, S., Sardanelli, A.M., Papa, S., Chiarugi, P., 2012. Mitochondrial Oxidative Stress due to Complex I Dysfunction Promotes Fibroblast Activation and Melanoma Cell Invasiveness. *J. Signal Transduct.* 2012, 684592. <https://doi.org/10.1155/2012/684592>

- Tu, X., Wang, M., Liu, Y., Zhao, W., Ren, X., Li, Y., Liu, H., Gu, Z., Jia, H., Liu, J., Li, G., Luo, L., 2019. Pretreatment of Grape Seed Proanthocyanidin Extract Exerts Neuroprotective Effect in Murine Model of Neonatal Hypoxic-ischemic Brain Injury by Its Antiapoptotic Property. *Cell. Mol. Neurobiol.* 39, 953–961. <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00691-7>
- Vannucci, R.C., Perlman, J.M., 1997. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 100, 1004–14. <https://doi.org/10.1542/peds.100.6.1004>
- Volpe, J.J., 2009. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *Lancet Neurol.* [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70294-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70294-1)
- Wassink, G., Davidson, J.O., Lear, C.A., Juul, S.E., Northington, F., Bennet, L., Gunn, A.J., 2018. A working model for hypothermic neuroprotection. *J. Physiol.* 596, 5641–5654. <https://doi.org/10.1113/JP274928>
- West, T., Atzeva, M., Holtzman, D.M., 2007. Pomegranate polyphenols and resveratrol protect the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Dev. Neurosci.* 29, 363–72. <https://doi.org/10.1159/000105477>
- Wilbank, M. V.; Chalfun, N. N. J.; Andersen, O.O., 1983. The jaboticaba in Brazil. *Proc. Am. Soc. Horticulural Sci.* 27, 57–69.
- Wu, M., Liu, F., Guo, Q., 2019. Quercetin attenuates hypoxia-ischemia induced brain injury in neonatal rats by inhibiting TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Int. Immunopharmacol.* 74. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105704>
- Wu, S.B., Dastmalchi, K., Long, C., Kennelly, E.J., 2012. Metabolite profiling of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark-colored fruit juices. *J. Agric. Food Chem.* 60, 7513–7525. <https://doi.org/10.1021/jf301888y>
- Xie, X., Zhao, R., Shen, G.X., 2012. Impact of cyanidin-3-glucoside on glycated LDL-induced NADPH oxidase activation, mitochondrial dysfunction and cell viability in cultured vascular endothelial cells. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 15867–15880. <https://doi.org/10.3390/ijms131215867>
- Zhao, J., Chen, Y., Xu, Y., Pi, G., 2013. Effect of intrauterine infection on brain development and injury. *Int J Dev Neurosci* 31, 543–549. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2013.06.008>