

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Avaliação da Atividade Neuroprotetora do Extrato de Kava
(*Piper Methysticum*) em Modelos *in vitro* de Lesão Celular

Alexandre Altino Tavares

Orientadora

Christianne Gazzana Salbego

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do
grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2003

O que é um cérebro capaz de produzir um espírito que o concebe? O que é um espírito capaz de produzir um cérebro que o produz? Que é um conhecimento que não poderia emergir não apenas sem um cérebro e um espírito, mas também sem uma linguagem e uma cultura? O que é um conhecimento que, mesmo sendo construção e tradução, aspira refletir a natureza das coisas?

Edgar Morin

Agradecimentos

À Prof^a Dr^a. Christianne Salbego, pela excelente orientação, exemplo, amizade e dedicação;

Às Professoras Elisabete Rocha, Vera Trindade e Stela Rates, pelo constante incentivo e amizade, e por me mostrarem que educar é muito mais que ensinar o que está escrito nos livros;

Aos colegas do Laboratório de Neuroproteção e Transdução de sinais, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho, e de uma forma especial a Helena Cimarosti minha grande companheira no começo, Ana Horn e Lauren Valentin e as bolsistas Melissa e Chris, as quais foram sem dúvida alguma essenciais para a conclusão deste trabalho;

Aos Professores Guido Lenz e Rodrigo Leal que juntamente com a Prof^a Vera Trindade avaliaram este trabalho, ao Professor Richard Rodnight pelo exemplo e apoio, e a todos os colegas, professores e funcionários do Curso de Pós Graduação em Bioquímica da UFRGS, um excelente centro de formação e pesquisa, do qual a ciência colhe e ainda colherá muitos frutos.

Índice

1.Introdução	10
1.1. Isquemia Cerebral	10
1.1.1. Mecanismos de morte celular envolvidos na isquemia cerebral	11
1.1.2. Vulnerabilidades diferenciadas das populações celulares	14
1.1.3. Morte neuronal isquêmica seletiva no hipocampo	14
1.1.4. Proteínas de Interesse	15
1.1.4.1. HSP27	15
1.1.4.2. iNOS	17
1.1.5. Modelos experimentais de isquemia cerebral	18
1.1.5.1. Cultura Organotípica	19
1.1.5.2. Fatias hipocampais submetidas à POG	20
1.2. Kava	20
1.2.1. Características botânicas da kava	21
1.2.2. Produtos comercializados derivados da kava	21
1.2.3. Descrição dos princípios ativos	23
1.2.4. Atividade farmacológica	24
1.2.5. Estrutura química das kavalactonas	25
1.3. A Idéia	26
2. Objetivo	27
3. Materiais e Métodos	28
3.1. Materiais	28
3.1.1. Animais	28
3.1.2. Reagentes e outros materiais	28
3.1.2.1. Cultura organotípica, fatias hipocampais submetidas à POG e tratamentos	28
3.1.2.2. Marcação das fosfoproteínas	29
3.1.2.3. Eletroforese	29
3.1.2.4. Eletrotransferência e imunodeteção protéica	29
3.2. Métodos	30
3.2.1. Preparo das culturas organotípicas	30
3.2.2. Indução de dano celular por privação de oxigênio e glicose (POG), nas culturas organotípicas	32
3.2.3. Preparo das fatias hipocampais	33
3.2.4. Indução de dano celular por privação de oxigênio e glicose (POG), nas fatias hipocampais	34
3.2.5. Obtenção do extrato de kava e adição da droga às fatias	34
3.2.6. Avaliação da morte celular por análise da incorporação de iodeto de propídeo e microscopia de fluorescência	35
3.2.7. Quantificação da incorporação de iodeto de propídeo	36
3.2.8. Marcação das fosfoproteínas com fosfato radioativo	37
3.2.9. Eletroforese unidimensional	38

3.2.10. Eletrotransferência para membrana de nitrocelulose e imunodeteccção	39
3.2.10.1. Eletrotransferência	39
3.2.10.1.1. Detecção de fosfoproteínas transferidas	39
3.2.10.1.2. Tratamento das membranas de nitrocelulose provenientes dos experimentos realizados com fatias hipocampais.	40
3.2.10.2. Imuno-reação	40
3.2.11. MTT – Medida da viabilidade mitocondrial	41
4. Resultados	43
4.1. Escolha da dose e avaliação do modelo	43
4.2. Avaliação do efeito neuroprotetor do extrato de kava em culturas organotípicas submetidas à POG	45
4.3. Efeito do extrato de kava sobre o imunoconteúdo e fosforilação da proteína HSP27 em culturas organotípicas submetidas a POG.	47
4.4. Avaliação do efeito neuroprotetor do extrato de kava em fatias hipocampais submetidas à POG	50
4.5. Efeito do extrato de kava sobre o imunoconteúdo da proteína iNOS em fatias hipocampais submetidas à POG.	52
5. Discussão	54
6. Conclusões	61
7. Perspectivas	62
8. Referências Bibliográficas	63

Lista de Figuras

Figura 1. A - Desenho representativo da Kava. B - Nativo das ilhas fiji fazendo apresentação da kava em um ritual.....	22
Figura 2. Estrutura química dos constituintes alfa-pirona substituídos da kava.	23
Figura 3. Estrutura química dos constituintes 5,6-diidro-alfa-pirona substituídos da kava.. ..	24
Figura 4. Estrutura geral das kavalactonas.....	25
Figura 5. Efeito de diferentes doses de kava e MK-801 sobre a lesão induzida por POG de 40 minutos em Culturas Organotípicas de hipocampo de ratos.....	44
Figura 6. Quantificação da morte celular em resposta à POG por 40 minutos na região CA1 em Culturas Organotípicas na presença de DMSO ou kava 7 µg/ml.....	46
Figura 7a. Alterações no imunocontéudo da HSP27 em resposta à POG por 40 min. na região CA1 em culturas organotípicas.....	48
Figura 7b. Alterações na porcentagem da proteína fosforilada (HSP27) em resposta à POG por 40 min. na região CA1 em culturas organotípicas.....	49
Figura 8. Verificação da viabilidade celular através do método de MTT em fatias de hipocampo de rato submetidas à POG por 60 minutos e tratadas e não tratadas com extrato de kava 7 µg/ml e DMSO 0,1%.....	51
Figura 9. Verificação do imunocontéudo da proteína iNOS em amostras controle e em resposta à POG de 60 min. em fatias hipocampais tratadas e não tratadas com kava e DMSO.....	53

Lista de Tabelas

Tabela 1. Meio de Cultivo.....	30
Tabela 2. HBSS.....	31
Tabela 3. Meio de POG.....	32
Tabela 4. solução krebs-Henseleit modificada - meio de pré-incubação.....	33
Tabela 5. solução krebs-Henseleit modificada – Meio Controle.	34
Tabela 6. Meio de Krebs Ringer.....	38
Tabela 7. Solução de Lise para Eletroforese Unidimensional (Solução A).....	38
Tabela 8. Solução de Lise para Eletroforese Unidimensional (Solução B).....	38

Lista de Abreviaturas

- 2VO - oclusão dos 2 vasos (*2-Vessel Occlusion*)
4VO - oclusão dos 4 vasos (*4-Vessel Occlusion*)
ATP - adenosina tri-fosfato
CA - corno de Ammon (*Cornus Ammonis*)
DG - giro denteado (*Dentate Gyrus*)
DMSO - dimetil sulfóxido
EPD - dia pós-natal equivalente (*Equivalent Postnatal Day*)
GABA - ácido gama-amino butírico (*γ-aminobutyric acid*)
HBSS - solução salina balanceada de Hanks (*Hank's Balanced salt Solution*)
HSP - proteína de choque térmico (*heat shock protein*)
iNOS - óxido nítrico sintase induzível (*inducible Nitric Oxide Synthase*)
IP - iodeto de propídio
MAPKAP quinase 2 - proteína quinase ativada pela proteína quinase ativada por mitógenos
MEM - meio essencial mínimo (*Minimum Essential Media*)
M-TBS – solução de leite em pó dissolvida em TBS (*milk - tris buffer saline*)
MTT - 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide
NMDA - N-Metil-D-Aspartato
ON - óxido nítrico (*NO -Nitric Oxide*)
PKC - proteína quinase C (*protein kinase C*)
POG - privação de oxigênio e glicose
PRAK - proteína quinase ativada/regulada pela p38
SDS - dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecil sulfate*)
SNC - sistema nervoso central
TBS - salina tamponada com tris (*tris buffer saline*)
TCA - ácido tricloroacético (*trichloroacetic acid*)
TEMED - tetrametil-etilenodiamina
Tris - Tris hidroximetil-aminometano
T-TBS - salina tamponada com tris acrescida de Tween-20 (*Tween-20 - tris buffer saline*)

Resumo

As doenças cerebrovasculares, popularmente conhecidas como derrames, são uma das principais causas de morbidade e mortalidade entre adultos e idosos. Contudo, muitos pacientes que sofrem derrame sobrevivem e experimentam as conseqüências do insulto por muitos anos, muitas vezes a nível emocional, motor ou intelectual. Dentre estas lesões, destaca-se a isquemia cerebral. Existem modelos experimentais de isquemia cerebral *in vivo* e *in vitro*. Os modelos *in vitro* são realizados em culturas ou fatias de tecido cerebral submetidas à Privação de Oxigênio e Glicose (POG), que mimetizam condições traumáticas similares, mas não idênticas às produzidas *in vivo*. A investigação da atividade de substâncias potencialmente neuroprotetoras a partir da comparação da morte celular entre culturas ou fatias de tecido cerebral controle e tratadas é facilitada neste tipo de modelo experimental. Após a injúria, as culturas são expostas a métodos de avaliação da viabilidade ou dano celular como, por exemplo, o corante fluorescente iodeto de propídeo, que marca seletivamente células mortas ou em curso de morte, ou MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) que mede a viabilidade mitocondrial possibilitando uma posterior quantificação. As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Um exemplo é a planta kava-kava ou somente kava (*Piper Methysticum*) a qual chamou a atenção dos pesquisadores devido à sua utilização nas ilhas do Pacífico sul. Foi demonstrada a possibilidade da kava possuir uma variedade de atividades farmacológicas importantes, entre elas a atividade de neuroproteção. Esse trabalho tem como objetivo avaliar a atividade neuroprotetora do extrato de kava-kava (*Piper methysticum*) em modelos *in vitro* de morte neuronal em fatias de hipocampo de ratos, investigar o envolvimento da proteína de choque térmico HSP27 (*Heat Shock Protein*) no processo de morte e neuroproteção induzida pela kava, bem como investigar o efeito da lesão induzida por POG sobre o imunoconteúdo da proteína Oxido Nítrico Sintase induzível (iNOS). Os resultados dos experimentos por nós realizados nas culturas organotípicas submetidas à POG por 40 minutos e tratadas com extrato de kava (7µg/ml) demonstraram uma significativa redução, na ordem de 58% na intensidade da morte neuronal na região CA1 do hipocampo em resposta à injúria. Em fatias hipocampais submetidas à POG por 60 minutos a adição do extrato de kava 7µg/ml aumentou em 15% a viabilidade celular, confirmando a atividade neuroprotetora sugerida para esta planta. As culturas expostas à POG e tratadas com kava apresentaram um aumento significativo no imunoconteúdo da proteína HSP27, esse aumento é acompanhado de um aumento da fosforilação, uma vez que a percentagem de proteína fosforilada se mantém igual. As fatias lesionadas tratadas com kava apresentaram uma diminuição significativa no imunoconteúdo da iNOS na ordem de 35 % em relação as fatias lesionadas tratadas com DMSO (Dimetilsulfoxido). Estes dados podem sugerir que um dos mecanismos da neuroproteção observada para o extrato de kava, possa envolver essas proteínas.

1. Introdução

1.1. Isquemia Cerebral

As doenças cerebrovasculares, popularmente conhecidas como derrames, são uma das principais causas de morbidade e mortalidade entre adultos e idosos. Essas doenças estão intimamente ligadas a uma variedade de fatores de risco como hipertensão, hipercolesterolemia e diabetes (PRICE, 1999). Contudo, muitos pacientes que sofrem derrame sobrevivem e experimentam as conseqüências do insulto por muitos anos, muitas vezes a nível emocional, motor ou intelectual. Este grupo requer uma grande demanda de cuidados e tratamentos médicos. Entretanto, nenhum sintoma precoce nem tratamentos que conduzam à prevenção da ocorrência ou redução das conseqüências clínicas dos derrames tem sido encontrado (TER HORST & KORF, 1997).

A maioria dos derrames são causados por uma interrupção aguda do suprimento de sangue arterial para o cérebro, geralmente por um trombo, levando à isquemia do tecido; uma minoria de derrames são causados por ruptura de um vaso sangüíneo, levando à hemorragia (PRICE, 1999).

O metabolismo energético normal no cérebro tem algumas características especiais, que incluem uma taxa metabólica alta, estoques de energia limitados e uma alta dependência do metabolismo aeróbico de glicose. Por essa razão, o cérebro é mais vulnerável ao dano isquêmico do que outros tecidos. O tipo mais freqüente de isquemia em humanos é a **isquemia focal**, que é a interrupção do fluxo de sangue para uma parte do cérebro. Outro tipo é a **isquemia global**, que resulta da interrupção transitória do fluxo sangüíneo para todo o cérebro, como ocorre durante uma parada cardíaca. Além dos danos causados pela falta de oxigênio e metabólitos durante a isquemia, a volta da circulação sangüínea (reperfusão) pode aumentar ainda mais o dano neuronal, especificamente em áreas vulneráveis do cérebro (TAYLOR *et al.*, 1996).

Nos Estados Unidos os derrames são causadores de sérias incapacitações permanentes, com cerca de 600.000 pessoas sofrendo um novo ou recorrente derrame a cada ano. Três milhões de norte americanos são permanentemente

incapacitados por derrames isquêmicos, e 31% dos sobreviventes de derrames necessitam de ajuda para cuidarem de si mesmos, 20% necessitam de ajuda para caminhar, 71% tem a capacidade vocal diminuída quando examinados em uma média de 7 anos depois, e 16% precisam ser sustentados pelo governo. Direta e indiretamente os derrames custaram em 1998 aproximadamente 43,3 bilhões de dólares. Além disso, as ressucitações cardiopulmonares para vítimas de paradas cardíacas, dentro ou fora de hospitais, sucedidas de recirculação espontânea atingem cerca de 70.000 pacientes por ano nos Estados Unidos. Pelo menos 60% desses pacientes morrem no hospital como resultado de um extenso dano cerebral; somente 3 a 10% dos pacientes ressuscitados voltam a sua vida normal. Assim, injúrias cerebrais por isquemia global cerebral transitória completa (parada cardíaca) e isquemia cerebral focal (derrame isquêmico) atingem um grande número de pacientes levando à morte ou incapacitação permanentes (WHITE *et al.*, 2000).

No Brasil não existem dados estatísticos classificados e organizados sobre o tema, como os que são apresentados para os Estados Unidos, mas certamente esses devem ser proporcionalmente maiores no Brasil, devido às baixas condições sócio-econômicas e falta de acesso à saúde da maioria da população.

Uma das principais estratégias terapêuticas pesquisadas é a neuroproteção, visando reduzir a vulnerabilidade do tecido cerebral à isquemia. Como o SNC é mais vulnerável à isquemia que a maioria dos outros tecidos, é fundamental que os mecanismos celulares envolvidos nesta vulnerabilidade possam ser identificados e bloqueados (PRICE, 1999).

1.1.1. Mecanismos de Morte Celular Envolvidos na Isquemia Cerebral

Conforme exposto acima o cérebro é muito sensível à hipóxia-isquemia, devido ao seu alto consumo de oxigênio combinado com seus baixos estoques de carboidratos. Estudos experimentais identificaram quatro processos dominantes que, sozinhos ou combinados, levam ao dano neuronal: aumento de cálcio intracelular, neurotoxicidade mediada por receptores glutamatérgicos, formação de radicais livres e acidose láctica (TAYLOR *et al.*, 1996).

A liberação de excessivas quantidades de glutamato e de outros aminoácidos excitatórios no espaço extracelular durante a isquemia causa a superativação de

receptores, contribuindo para o dano neuronal. Este processo é chamado de excitotoxicidade. (CHOI & ROTHMAN, 1990).

A exposição dos neurônios ao glutamato pode causar um edema neuronal, devido à despolarização mediada por Na^+ , Cl^- e água. Esta água que entra pode levar à lise osmótica das células prejudicando o funcionamento neuronal. Uma excessiva quantidade de Ca^{++} entra através dos canais modulados por receptores de aminoácidos excitatórios, ativando diversas enzimas que podem aumentar o dano celular (FAROOQUI *et al.*, 1994).

Os níveis de Ca^{++} extracelular decrescem durante a isquemia, presumivelmente devido ao influxo deste para as células lesadas, aumentando a concentração interna de Ca^{++} . Este aumento se deve também à liberação de Ca^{++} dos estoques internos. A perda da homeostase do cálcio está envolvida na degeneração neuronal (FAROOQUI *et al.*, 1994). O aumento da concentração de cálcio interno constitui uma etapa chave na injúria induzida pela exposição das células neuronais a concentrações tóxicas de glutamato, semelhante ao observado na isquemia (CHOI, 1995). O cálcio ativa fosfolipases, proteases, quinases e fosfatases, além de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (SWEENEY *et al.*, 1995).

A isquemia e a reperfusão favorecem a formação de radicais livres. Depois da isquemia, as mitocôndrias estão debilitadas em função da abstinência de oxigênio. O oxigênio que volta a circular pode não ser usado totalmente pela fosforilação oxidativa, gerando radicais livres extremamente danosos para o tecido (PHILLIS, 1996). Observa-se também há uma redução nos antioxidantes endógenos, e os que existem são usados na tentativa de consumir os radicais que estão sendo produzidos. O principal agente é o radical hidroxil, que causa, principalmente, peroxidação lipídica das membranas dos neurônios vulneráveis (SWEENEY *et al.*, 1995).

A ativação de receptores NMDA (receptor glutamatérgico ionotrópico) gera óxido nítrico (ON) de maneira Ca^{++} -dependente, aumentando a neurotoxicidade ocasionada pelo glutamato. Como o ON pode agir também como uma molécula sinalizadora, vários estudos foram feitos para determinar o seu papel na isquemia. As evidências obtidas sugerem que o ON possa ser tanto protetor quanto destrutivo, dependendo

do estágio de evolução do processo isquêmico e da fonte de ON (IADECOLA, 1997; CHAN, 1996).

A acidose láctica afeta drasticamente o metabolismo e as funções celulares, contribuindo deste modo, para o dano neuronal. Os níveis de ácido láctico aumentam bruscamente devido à glicólise anaeróbica, que é uma fonte alternativa de ATP durante a isquemia. A glicólise anaeróbica, juntamente com a alta pressão de CO₂, causa uma acidose que pode baixar o pH da célula para 6,0. Outra fonte geradora de acidose é a hidrólise do ATP que gera prótons, os quais não podem ser reciclados pela fosforilação oxidativa, pois a isquemia leva rapidamente ao seu bloqueio (FAROOQUI *et al.*, 1994).

A fim de reduzir a morbidade neurológica, é fundamental entender os mecanismos envolvidos na injúria e reparo neuronal para projetar uma terapia clinicamente efetiva. Ainda não existem protocolos terapêuticos clinicamente efetivos em melhorar os danos cerebrais causados pela isquemia cerebral e reperfusão (WHITE *et al.*, 2000). Nos anos 80, ensaios clínicos com indução de coma barbitúrica ou antagonistas de cálcio falharam na redução dos sintomas neurológicos do dano causado pela parada cardíaca e ressucitação. Mais recentemente, tanto o “scavenger” de radicais livres [tirilizad] quanto o antagonista de receptor de glutamato [selfotel] têm se mostrado ineficazes no tratamento clínico dos derrames. Assim, a síntese teórica que conduziu a estes ensaios foi inadequada (WHITE *et al.*, 2000). Então examinemos novas informações a respeito da injúria neuronal e reparo:

1. Muitos fenômenos observados durante a isquemia cerebral e reperfusão podem estar ocorrendo devido ao dano à membrana lipídica, especificamente pela lipólise durante a isquemia e pela peroxidação mediada por radicais de ácidos graxos poliinsaturados durante a reperfusão (WHITE *et al.*, 2000).
2. A síntese protéica em neurônios cerebrais vulneráveis é rápida e persistentemente inibida no início da tradução durante a reperfusão pós-isquêmica (WHITE *et al.*, 2000).
3. Mecanismos apoptóticos são disparados em neurônios vulneráveis durante o início da reperfusão, e estes mecanismos incluem modificações no início da

tradução, ativação de proteólise e endonucleases (WHITE *et al.*, 2000).

4. Esses eventos não só exacerbam o dano a moléculas críticas durante a reperfusão, como também prejudicam a competência de processar o reparo celular (WHITE *et al.*, 2000).

5. A competência celular para defesa antioxidativa, início de tradução, inibição de apoptose, e reparo ao dano de organelas celulares é regulada em um nível fundamental por mecanismos de transdução de sinal envolvendo, por exemplo, fatores de crescimento (WHITE *et al.*, 2000).

Já que, como vimos, a morte neuronal induzida pela isquemia envolve múltiplos e independentes mecanismos (danos por radicais-livres, ativação de proteólise, indução de apoptose e prejuízo da biossíntese protéica), a intervenção clínica com uma única droga será ineficaz (WHITE *et al.*, 2000). As pesquisas devem voltar-se para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas multidrogas.

1.1.2. Vulnerabilidades Diferenciadas das Populações Celulares

Os neurônios diferem em sua sensibilidade ao insulto isquêmico e em sua habilidade para recuperar-se de tal injúria. Assim, algumas populações neuronais de distintas regiões do cérebro apresentam-se mais suscetíveis do que outras ao dano neuronal causado por uma isquemia. Este fenômeno clássico da neuropatologia é conhecido como “vulnerabilidade seletiva” e os possíveis fatores que o determinam têm sido amplamente pesquisados na tentativa de elucidá-lo. Essa morte celular seletiva tem sido mais intensivamente estudada na formação hipocampal (DAVIS & ANTONAWICH, 1991).

1.1.3. Morte Neuronal Isquêmica Seletiva no Hipocampo

O hipocampo é uma estrutura que caracteriza a vulnerabilidade seletiva ao insulto isquêmico (SCHREIBER & BAUDRY, 1995), fato que pode ser constatado tanto *in vivo* como *in vitro*. *In vivo*, por exemplo, 5 minutos de isquemia global causam morte tardia em quase todas as células piramidais da região CA1 sem afetar as outras populações celulares, enquanto que 20 minutos causam a morte celular dos neurônios em CA3 mas quase não afetam as células granulares do giro

denteado (GD) (KIRINO & SANO, 1984; KIRINO *et al.*, 1985) ou os interneurônios em CA1 (FERRER *et al.*, 1995).

Uma das hipóteses para explicar a vulnerabilidade das células da área CA1 refere-se ao aumento na liberação de glutamato durante a isquemia. Conforme exposto acima superativando receptores, conseqüentemente, há excesso de cálcio livre na célula, ativando proteases, endonucleases, síntese de radicais livres, além da ativação de “genes de morte celular” (SCHREIBER & BAUDRY, 1995). Isso ocorre só em CA1.

Além disso, as populações de células vulneráveis do hipocampo não se degeneram de maneira semelhante. As do hilo degeneram dentro de 24 horas, enquanto que as piramidais da região CA1 não morrem até 3-4 dias depois do insulto. Este fenômeno é chamado de “morte neuronal tardia” (HSU *et al.*, 1994). Alguns estudos bioquímicos e morfológicos sugerem que essa morte neuronal tardia pode acontecer por apoptose (SCHREIBER & BAUDRY, 1995).

1.1.4. Proteínas de Interesse

1.1.4.1. HSP 27

A HSP27 é um dos membros do grupo das pequenas Proteínas de Choque Térmico (Heat Shock Proteína – HSP), que protege vários tipos de células contra o estresse, por exemplo, choque térmico, estresse oxidativo e isquemia (MEHLEN *et al.*, 1996; WAGSTAFF *et al.*, 1996, 1999; GARRIDO *et al.*, 1997; LOKTIONOVA *et al.*, 1998; SCHNEIDER *et al.*, 1998; BRAR *et al.*, 1999; ROGALLA *et al.*, 1999). No SNC de mamíferos, ela é uma proteína constitutiva, expressa principalmente em astrócitos e a expressão aumentada da proteína confere resistência ao estresse (LANDRY *et al.*, 1989; LAVOIE *et al.*, 1993; PLUMIER *et al.*, 1996; PLUMIER *et al.*, 1997). A atividade da HSP27 pode ser regulada de duas maneiras: através do aumento de expressão em condições estressantes e por fosforilação (CHAUFOUR *et al.*, 1996; LARSEN *et al.*, 1997; COOPER *et al.*, 2000).

A fosforilação da HSP27 é mediada por duas proteínas quinases, a MAPKAP quinase-2 (proteína quinase ativada pela proteína quinase ativada por mitógenos) e a PRAK (proteína quinase ativada pela p38), ambas ativadas pela via de transdução

de sinal responsiva a estresse, a p38 (STOKOE *et al.*, 1992; LARSEN *et al.*, 1997; NEW *et al.*, 1998; KATO *et al.*, 2001).

Quando desfosforilada, a HSP27 forma grandes agregados intracelulares de até 800 kDa, sendo que a fosforilação altera a estrutura quaternária da proteína, formando agregados menores (LAMBERT *et al.*, 1999; ROGALLA *et al.*, 1999). A HSP27 desempenha diferentes funções dentro da célula de acordo com seu estado de fosforilação.

As funções da HSP27, relacionadas com a proteção celular, são:

Chaperona. Vários estudos têm mostrado que os oligômeros de HSP27, ou seja, quando a proteína está desfosforilada, atuam dentro das células como chaperonas *in vitro*, evitando a desnaturação das proteínas ou auxiliando a renaturação (JAKOB *et al.*, 1993; EHRNSPERGER *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 1997; LEROUX *et al.*, 1997; GUO & COOPER, 2000). Rogalla e colaboradores (1999) demonstraram que a fosforilação da HSP27, com a conseqüente diminuição dos agregados intracelulares, diminui, e até mesmo bloqueia, sua capacidade de evitar a desnaturação da citrato sintase *in vitro*, demonstrando que a atuação da HSP27 como chaperona depende da presença de grandes oligômeros.

Modulação dos Filamentos de Actina: Quando desfosforilada, a HSP27 pode estar sob forma de dímeros ou tetrâmetros, que parecem ser responsáveis pela modulação dos filamentos de actina. A HSP27 se liga à região terminal da actina, impedindo que outras moléculas se liguem. Quando esta HSP27 é fosforilada em resposta ao estresse, ela se desliga da actina e permite a polimerização, a modulação da estabilidade e a reorganização dos filamentos (LAVOIE *et al.*, 1993; LAVOIE *et al.*, 1995; LOKTIONOVA & KABAKOV, 1998; SCHNEIDER *et al.*, 1998).

Modulação do processo apoptótico: Estudos recentes têm mostrado que a HSP27 pode ser um bloqueador da apoptose em diversas etapas do processo, o que poderia explicar as várias atividades protetoras exercidas pela proteína (GARRIDO *et al.*, 1999; WAGSTAFF *et al.*, 1999; CHARETTE *et al.*, 2000; PANDEY *et al.*, 2000; KATO *et al.*, 2001). A expressão aumentada de HSP27 protege neurônios contra a falta de fatores tróficos, um conhecido indutor de apoptose (WAGSTAFF *et al.*, 1999) e inibe a ativação das pró-caspases 9 e 3 (GARRIDO *et al.*, 1999; PANDEY *et al.*, 2000; BRUEY *et al.*, 2000). Nestes dois casos, não há

informações sobre o estado de fosforilação da HSP27 no processo. Entretanto, trabalhos recentes demonstraram que a HSP27 pode bloquear a apoptose induzida pelo receptor **Fas**, mas precisa estar fosforilada para que isso aconteça (CHARETTE & LANDRY, 2000; CHARETTE *et al.*, 2000).

Diante de funções tão amplas e tão importantes para a sobrevivência das células, cada vez mais a HSP27 vem despertando a atenção de pesquisadores interessados em neuroproteção.

1.1.4.2. iNOS

A síntese de óxido nítrico (ON) pela óxido nítrico sintase induzível (iNOS, também referida como *inflammatory NOS*) parece contribuir para a neurotoxicidade e para o conseqüente dano tecidual em algumas doenças neurodegenerativas. A produção de óxido nítrico aumenta em todos os estágios da isquemia cerebral e esse aumento é devido tanto pela ativação desta enzima quanto pela indução de sua expressão gênica (DE ALBA *et al.*, 1998). As vias celulares envolvidas na produção de óxido nítrico e na morte celular incluem a formação do peróxido nitrito a partir da reação do óxido nítrico com ânions superóxido (DAWSON & DAWSON, 1996) como também efeitos estimulatórios sobre enzimas intracelulares, tais como a proteína quinase C (PKC) (MAIESE *et al.*, 1993) e ciclooxygenase/lipoxigenase (SWIERKOSZ *et al.*, 1995; HOLZHUTTER *et al.*, 1997). A expressão da forma induzível da óxido nítrico sintase (iNOS) tem sido caracterizada em diferentes tipos celulares em conseqüência dos processos inflamatórios e em muitos casos tem sido descrito tanto o efeito deletério como o protetor (HENECA & FEINSTEIN, 2001).

No cérebro foi demonstrado por Moro e colaboradores em 1998, que a iNOS é expressa não somente na glia, mas também em neurônios. Essa expressão ocorre muito rapidamente após a isquemia (2-3 horas após a isquemia) sugerindo que o ON pode participar do processo patogênico desencadeado nos estágios iniciais da isquemia cerebral (MORO *et al.*, 1998).

1.1.5 Modelos Experimentais de Isquemia Cerebral

Para tornar possível a investigação dos mecanismos envolvidos na morte celular e o estudo de drogas que atuam como agentes neuroprotetores, utilizam-se modelos experimentais de isquemia cerebral os quais são capazes de reproduzir as condições isquêmicas com razoável acurácia.

Existem modelos experimentais de isquemia cerebral *in vivo* e *in vitro*. Para estudar a isquemia cerebral *in vivo* são usados, além de ratos, modelos animais que incluem coelhos, gatos, cães, cabras, macacos, entre outros. Algumas vezes são usados, também, modelos humanos (FAROOQUI *et al.*, 1994).

Um modelo de isquemia cerebral *in vivo* requer a oclusão das quatro principais artérias extracranianas no rato (oclusão dos quatro vasos, 4-VO) (PULSINELLI & BRIERLEY, 1979). Outro modelo de isquemia combina oclusão bilateral das artérias carótidas comuns com redução da pressão arterial média (oclusão dos dois vasos, 2-VO) (SMITH *et al.*, 1984). Existem ainda outros modelos utilizados para induzir isquemia em ratos, como o aumento artificial da pressão intracraniana (LJUNGGREN *et al.*, 1974), parada cardíaca (BLOMQVIST & WIELOCH, 1985), oclusões vasculares intratorácicas (LEMAY *et al.*, 1988) e compressão no pescoço (DIEMER & SIEMKOWICKZ, 1981)

Os modelos experimentais de isquemia *in vitro* utilizam células ou tecido cerebral expostos a condição de privação de oxigênio e glicose (POG) e são assim chamados porque, na verdade, são modelos onde se produzem condições similares, mas não idênticas, às produzidas *in vivo*. Estes modelos permitem estudar a resposta celular ao insulto isquêmico através de um sistema no qual as condições podem ser perfeitamente controladas. Danos hipoglicêmicos e hipóxicos podem ser produzidos facilmente em cultura de células reduzindo-se o nível de glicose no meio de cultura e colocando-se a cultura em uma câmara anaeróbica, respectivamente (FAROOQUI *et al.*, 1994).

Apesar da privação de glicose e oxigênio ser a causa da maior perturbação durante a isquemia *in vitro*, o sangue contém muitos outros fatores que podem determinar a ocorrência do dano isquêmico. Além do mais, durante a isquemia *in vivo*, há o acúmulo de produtos neurotóxicos no meio extracelular. Durante os estudos *in vitro*, a cultura de células é geralmente cercada por excesso de meio

extracelular que atenua o acúmulo destes produtos. Esses são os principais obstáculos dos estudos da isquemia por POG. (FAROOQUI *et al.*, 1994).

1.1.5.1. Cultura Organotípica

As culturas organotípicas de tecidos cerebrais têm se tornado uma importante alternativa para estudar a morte neuronal induzida por excitotoxinas (ABDEL-HAMID & TYMIANSKI, 1997), hipóxia (PRINGLE *et al.*, 1997), hipoglicemia (TASKER *et al.*, 1992) e hipóxia/hipoglicemia para simular a isquemia (NEWELL *et al.*, 1995; BERNAUDIN *et al.*, 1998; CIMAROSTI *et al.*, 2001).

Esse modelo de culturas foi desenvolvido em 1981 por Gähwiler (GÄHWILER, 1981) e foi modificado por Stoppini e colaboradores em 1991 (STOPPINI *et al.*, 1991). Basicamente, trata-se de um método que mantém fatias do tecido a ser cultivado em uma interface entre o ar e o meio de cultivo, podendo permanecer por diversas semanas. Uma das principais características da cultura organotípica é a de manter a organização do tecido *in vivo*, por exemplo, a organização existente no hipocampo (STOPPINI *et al.*, 1991; BUCHS *et al.*, 1993; GÄHWILER *et al.*, 1997). A idade dessas culturas é denotada em EPD, dia pós-natal equivalente (*equivalent postnatal day*), o qual corresponde à idade que o animal tinha quando as fatias foram colocadas em cultivo somado ao número de dias de permanência *in vitro* (BRUCE *et al.*, 1995). O perfil de fosforilação apresentado pelas culturas organotípicas em resposta à POG, é bastante semelhante ao perfil de resposta apresentado por animais submetidos a isquemia cerebral global transitória (TAVARES *et al.*, 2001).

As culturas organotípicas de hipocampo são uma excelente alternativa para o estudo da isquemia cerebral, pois essas culturas mantêm muitos aspectos da isquemia *in vivo*, como a morte neuronal tardia e a vulnerabilidade seletiva (STRASSER & FISCHER, 1995; LAAKE *et al.*, 1999; NORABERG *et al.*, 1999; CIMAROSTI *et al.*, 2001).

1.1.5.2. Fatias Hipocampais Submetidas à POG

Uma alternativa para a metodologia *in vitro* é a utilização do tecido cerebral sem prévio cultivo. Neste método utiliza-se, por exemplo, fatias de hipocampo (400µm de espessura) que imediatamente após serem extraídas são expostas a condição de privação de oxigênio e glicose. Este modelo foi primeiramente descrito por Moro e colaboradores em 1998 e vem sendo extensamente usado como modelo para o estudo de eventos isquêmicos, inclusive na investigação de danos e neuroproteção (MORO *et al.*, 1998, CÁRDENAS *et al.*, 2000).

1.2. A Kava

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem uma gama quase inacreditável de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (SIMÕES *et al.*, 2000).

Durante séculos a humanidade usou extratos de partes vegetais para o tratamento de várias doenças. Devido aos bons efeitos produzidos por estes, a medicina folclórica em todo o mundo tem sido extensivamente explorada (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988).

O grande interesse em descobrir novos agentes terapêuticos levou à realização de muitos estudos farmacológicos gerando novos conhecimentos sobre as plantas de uso tradicional. Essas novas informações implicam a reatualização e a revisão de conceitos e conteúdos sob um prisma mais abrangente (SIMÕES *et al.*, 2000).

Um exemplo é a planta kava-kava (*Piper Methysticum*) que chamou a atenção dos pesquisadores devido a sua utilização nas ilhas do Pacífico Sul, onde foi relatado o efeito de relaxamento muscular e sono tranquilo pelos povos que a utilizavam.

Mais tarde, através de estudos mais abrangentes desta mesma planta, foi demonstrada a possibilidade da kava possuir uma variedade de outras atividades farmacológicas importantes, entre elas a atividade de neuroproteção (BACKHAUß & KRIESGLSTEIN, 1992)

1.2.1. Características Botânicas da Kava

A planta kava ou kava-kava, *Piper methysticum*, Forst, (BRUNETON, 1991; SINGH, 1992; ROBBERS *et al.*, 1996; SIMÕES *et al.*, 2000), apresenta-se como um arbusto alto, podendo atingir 15 m de altura (FOSBERG & SACCHET, 1975). É bem ramificado, sendo suas ramificações grosseiras e razoavelmente suculentas, ereto, robusto, perene e pertencente à família Piperaceae (SINGH, 1992).

Suas folhas têm formato de coração, são pontiagudas, verdes e regulares em ambos os lados. São folhas de aproximadamente 15 cm de comprimento (SINGH, 1992), e são largas (FETROW & AVILA, 1999).

A planta cresce em altitudes entre 150 e 300m acima do nível do mar e desenvolve-se bem em terrenos pedregosos quando selvagem e também quando cultivada (SINGH, 1992). Quando cultivada, a planta geralmente é colhida quando atinge 2 a 2,5 m de altura. Em condições quentes e úmidas e com muita luz solar, a planta cresce até uma altura de 6 m (SINGH, 1992).

A raiz, com cerca de 60 cm e não muito profunda, pode atingir 5 a 8 cm de espessura na maturidade, o que ocorre 3 a 5 anos após o plantio. Sua resistência e seu sabor aumentam com a idade (SINGH, 1992).

O plantio da kava é muito semelhante ao da cana-de-açúcar, por meio de seções da haste, de cujos nós crescem os brotos ou “olhos”. A haste é cortada em pequenas seções, com o cuidado de não quebrar os nós. As seções são colocadas em valas preenchidas com lama, até brotarem quando então são removidas e plantadas em valas rasas (SINGH, 1992). Para a colheita das raízes, são necessários 2 a 3 anos de desenvolvimento da planta. Estas são então parcialmente arrancadas e os fragmentos restantes continuam a crescer, gerando novas plantas e permitindo nova colheita após algum tempo, não exigindo replante (SINGH, 1992).

1.2.2. Produtos Comercializados Derivados da Kava

A kava é uma planta nativa das ilhas do Pacífico Sul muito conhecida por suas raízes e rizoma, base de uma bebida intoxicante consumida, tradicionalmente, em cerimônias e celebrações (JAMIESON *et al.*, 1989; BRUNETON, 1991; SINGH, 1992; ROBBERS *et al.*, 1996; FETROW & AVILA, 1999), graças à sua capacidade



Figura 1. A - Desenho representativo da Kava. **B** - Nativo das ilhas Fiji fazendo apresentação da kava em um ritual (SHINGH, 1992).

de tornar as pessoas mais descontraídas e relaxadas (SINGH, 1992). Esta bebida foi também introduzida nas comunidades aborígenes da Austrália, onde tornou-se uma droga de abuso pela ausência de um controle ritualístico de seu consumo (SINGH, 1992).

Historicamente, esta bebida era feita pelas mulheres da ilha que mascavam as hastes das raízes e as folhas da planta kava e cuspiam o conteúdo dentro de uma bacia misturando-o com água, leite de coco ou outros sucos de frutas (FETROW & AVILA, 1999).

Hoje, preparações farmacológicas da kava são comercializadas em vários países da Europa como um ansiolítico suave segundo alguns autores (SCHELOSKY *et al.*, 1995), ou como um eficaz agente sedativo, segundo outros (HE *et al.*, 1997).

No Brasil, além da especialidade farmacêutica Kawa-Kawa[®] (Lab Dr. Ritter, Alemanha) são também comercializados o Laitan[®] (BYK), constituído de extrato seco de *Piper methysticum* e o pó Kawa-Kawa^{SG} (Galena) também constituído de extrato

seco da mesma planta, destinado à manipulação, os quais possuem indicação terapêutica como antidepressivo, anti-estresse, ansiolítico, relaxante muscular e sedativo (RATES & SANTOS, 1997).

1.2.3. Descrição dos Princípios Ativos

Os efeitos farmacológicos da kava induziram numerosas investigações químicas que resultaram no isolamento de duas séries de compostos estreitamente relacionados que são ou alfa-pironas substituídas (FIGURA 2) ou 5,6 diidro-alfa-pironas substituídas (FIGURA 3) e alguns outros compostos variados (SINGH, 1992). A ação farmacológica da kava parece residir, principalmente, em vários membros desta família de alfa-pironas, que são também conhecidas como kavapironas (DAVIES *et al.*, 1992) ou kavalactonas (BRUNETON, 1991), as quais são encontradas no extrato lipo-solúvel de kava (resina de kava) (DAVIES *et al.*, 1992). Esta resina é preparada a partir das raízes e rizomas de kava através da extração com solventes orgânicos (JAMIESON *et al.*, 1989).

O conteúdo de kavalactonas totais na raiz de kava pode variar entre 3-20% do peso seco (HE *et al.*, 1997).

Até o momento, 15 kavalactonas já foram isoladas e destas, 9 foram totalmente identificadas (LOUZADA, 2000).

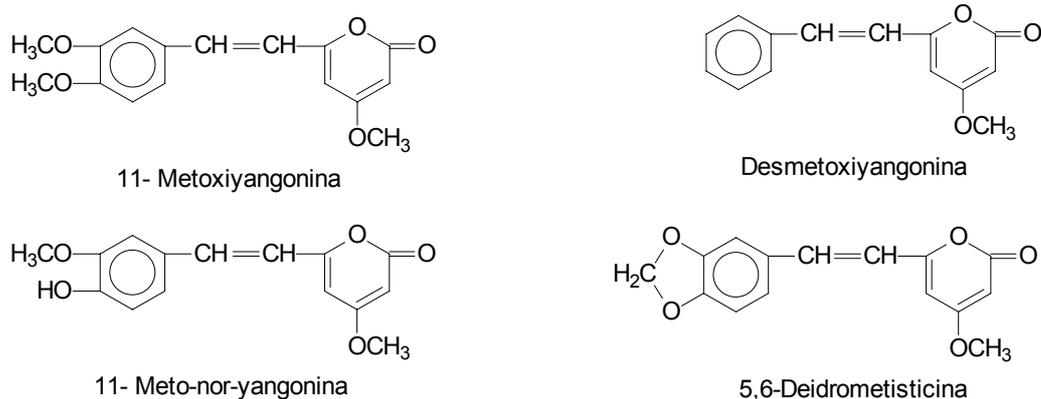


Figura 2. Estrutura química dos constituintes alfa-pirona substituídos da kava. Baseado em SINGH, 1992.

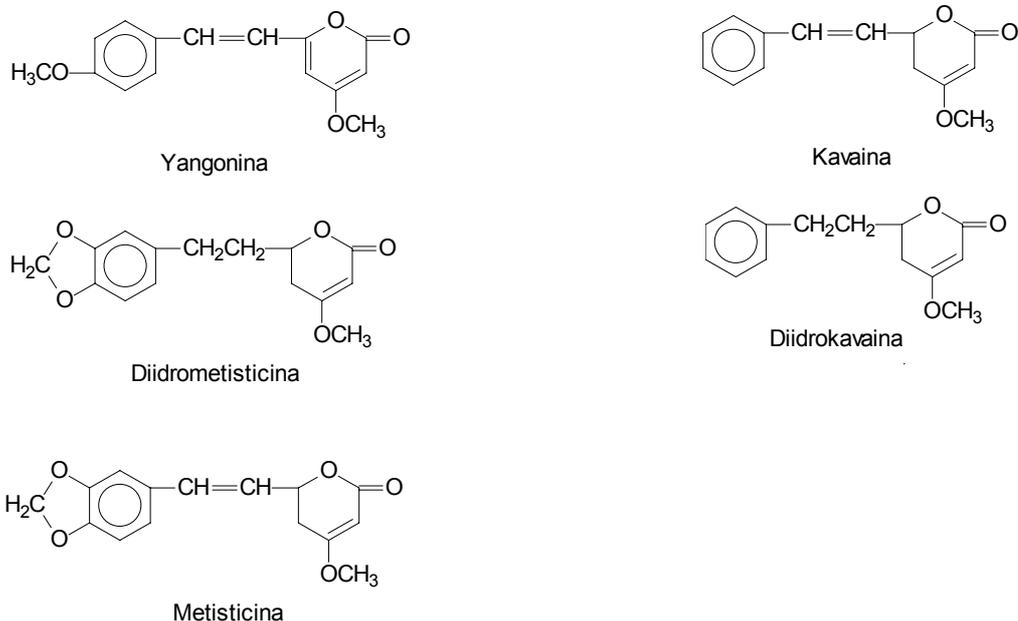


Figura 3. Estrutura química dos constituintes 5,6-diidro- α -pirona substituídos da kava. Baseado em SINGH, 1992.

Metisticina, diidrometisticina, kavaína, diidro kavaína e yangonina constituem os principais compostos da resina de kava e são, geralmente, considerados os responsáveis pela ação farmacológica da kava no homem e em experimentos animais (DAVIES *et al.*, 1992; BACKHAUß & KRIEGLSTEIN, 1992).

Além destas, é relatada a presença de 5,6-deidro kavaína, 5,6-deidrometisticina (HE *et al.*, 1997; SINGH 1992), tetraidroyangonina, 11-metoxiyangonina, 11-metoxi-nor-yangonina, desmetoxiyangonina (DUKE, 1992; SINGH, 1992), entre outros.

1.2.4. Atividade Farmacológica

As atividades farmacológicas mais relatadas para as kavalactonas, segundo dados científicos, são relaxante muscular, sedativa e ansiolítica. Esta última parece ser a mais bem fundamentada em humanos (RATES & SANTOS, 1997). Além destas, são relatadas outras atividades farmacológicas como analgesia, anestesia local (DAVIES *et al.*, 1992), antifúngica (HUSSEIN & LEVESQUE, 1997),

espasmolítica (GROS *et al.*, 1985) e anticonvulsivante (BACKHAUß & KRIEGLSTEIN, 1992). Segundo Kretzschmar e Meyer (1969), metisticina e diidrometisticina são descritas como os constituintes do extrato de kava de maior atividade anticonvulsivante. (BACKHAUß & KRIEGLSTEIN, 1992).

Vários estudos indicam que compostos capazes de bloquear o estímulo neuronal protegem o tecido neuronal contra danos (MELDRUM *et al.*, 1985; GOLDBERG *et al.*, 1988; BODE-GREUEL *et al.*, 1990). Muitas drogas anticonvulsivantes tal como dizocilpina (MELDRUM, 1986; WONG *et al.*, 1986), memantina (KORNHUBER *et al.*, 1989) e fenciclidina (HAYES & BALSTER, 1985) já mostraram proteger o tecido cerebral contra danos isquêmicos.

1.2.5. Estrutura Química das Kavalactonas

As moléculas das kavalactonas são formadas a partir de um esqueleto aril-etileno- α -pirona. Como já descrito anteriormente no item 1.2.3 deste trabalho, os principais compostos da resina de kava são alfa-pironas substituídas e 5,6- diidro-alfa-pironas substituídas (SINGH, 1992), ou podem ser também ditas como 4-metóxi-alfa-pironas com o grupo aril-etileno ligado ao carbono da posição 6 (FIGURA 4) (LOUZADA, 2000).

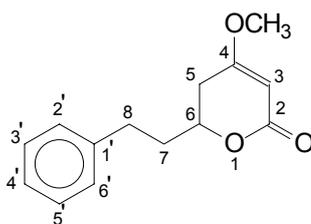


Figura 4. Estrutura geral das kavalactonas. Baseado em LOUZADA, 2000.

Em alguns casos o C₆ pode apresentar quiralidade indicando a existência de moléculas opticamente ativas, ou seja, pares de enantiômeros que podem, inclusive, levar a diferentes respostas biológicas (ALLINGER *et al.*, 1978).

1.3. A Idéia

Em 1992 Cord Backhaus e Josef Krieglstein, baseados na hipótese que o extrato de kava tinha um comprovado efeito anticonvulsivante e drogas anticonvulsivantes tal como os antagonistas não competitivos de NMDA, dizocilpina (MELDRUM, 1986; WONG *et al.*, 1986), memantina (KORNHUBER *et al.*, 1989) e fenciclidina (HAYES & BALSTER, 1985) reduziam a injúria cerebral causada pela isquemia, testaram o efeito neuroprotetor do extrato de kava e seus constituintes, em um modelos de isquemia focal em ratos e camundongos.

Os autores no final deste estudo chegaram às seguintes conclusões: o efeito de neuroproteção do extrato de kava foi observado nos dois modelos de isquemia focal utilizados, efeitos similares foram encontrados para a metisticina e diidrometisticina, sugerindo que o efeito de neuroproteção do extrato de kava poderia ser ,principalmente, mediado por estes dois compostos (BACKHAUß & KRIEGLSTEIN, 1992).

Foi principalmente inspirados neste estudo que resolvemos testar o extrato de Kava e seu potencial efeito neuroprotetor, frente a modelos de “isquemia cerebral *in vitro*” já desenvolvidos e validados em nosso laboratório. Dados anteriores demonstraram que a resposta das culturas organotípicas à lesão induzida por POG, foi bastante similar a resposta apresentada por animais submetidos à isquemia cerebral transitória, sugerindo que este modelo é bastante apropriado para o estudo das lesões isquêmicas e drogas neuroprotetoras (CIMAROSTI, *et al.*, 2001; TAVARES, *et al.*, 2001).

2. Objetivo

Os objetivos deste trabalho são:

1. Avaliar a atividade neuroprotetora do extrato de kava-kava (*Piper methysticum*) em modelos *in vitro* de morte neuronal em fatias de hipocampo de ratos;
2. Investigar o envolvimento da proteína HSP27 no processo de morte e neuroproteção induzida pela kava;
3. Verificar o efeito da lesão induzida por POG sobre o imunoconteúdo da proteína Oxido Nítrico Sintase indizível (iNOS).

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

3.1.1. Animais

Para este estudo foram utilizados ratos Wistar, machos, com idade entre 6 a 8 dias pós-natal e animais adultos entre 2 e 3 meses, procedentes do Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética a qual responde este Departamento.

3.1.2. Reagentes e Outros Materiais

3.1.2.1. Cultura Organotípica, Fatias Hipocampais Submetidas a POG e Tratamentos

As membranas (30 mm), as placas de seis e vinte e quatro poços e as placas de Petri (35 mm), todas descartáveis e estéreis, eram, respectivamente, Millicell[®]-CM, Millipore; *Cell Culture Cluster*, Costar[®] e *Tissue Culture Dish*, Corning[®].

Meio Essencial Mínimo (MEM – *Minimum Essential Media*; N^o 12370-037), soro de cavalo (N^o 26050-088), Solução Balanceada de Sais de Hank (HBSS – *Hank's Balanced Salt Solution*; N^o 24020-109) foram provenientes da Gibco. Bicarbonato de sódio e glicose eram da Merck; HEPES e glutamina, da Sigma; fungizona, da Gibco e garamicina da Schering-Plough.

CaCl₂, KCl e NaCl foram provenientes da Merck; sacarose, da Synth; KH₂PO₄, da Reagen; Na₂HPO₄, da Nuclear; MgCl₂, da Isofar e MgSO₄, da Riedel.

Os comprimidos de LAITAN[®] utilizados para obtenção do extrato de kava foram comprados em farmácia comercial, na cidade de Porto Alegre.

O Iodeto de Propídeo (IP) era proveniente da Sigma e o MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide, foi adquirido da Sigma Chemicals.

As vidrarias e as seringas de plástico utilizadas nas culturas eram lavadas com detergente Extran alcalino da Merck. A vidraria era esterilizada por auto-clavagem, a 121°C e 1 atm, por 40 minutos e, posteriormente, mantida em estufa seca, a 50°C, até o momento de uso. O material cirúrgico era esterilizado durante 30 minutos, em becker contendo álcool 70° GL iodado, sob lâmpada ultra-violeta, em capela de fluxo laminar. Os meios e as demais soluções eram esterilizados por filtração através de filtros, estéreis e descartáveis, Millex®-GS (0,22 µm) da Millipore. A água destilada deionizada, utilizada para preparar as soluções, era proveniente do aparelho Milli-Q.

3.1.2.2. Marcação das Fosfoproteínas

[³²P] NaHPO₄ foi proveniente da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), São Paulo.

3.1.2.3. Eletroforese

Acrilamida, bisacrilamida, persulfato de amônio, citocromo, β-mercaptoetanol, azul de bromofenol, agarose, dodecil sulfato de sódio (SDS), Tris hidroximetilaminometano (Tris) e tetrametil-etilenodiamina (TEMED) eram procedentes da Sigma. Uréia, NaOH, H₃PO₄, glicerol e HCl foram obtidos da Merck. Filmes de raio-X (13 x 18 cm, X-Omat) e outros materiais fotográficos eram Kodak. Placas intensificadoras de impressão (13 x 18 cm) eram Cronex, DuPont. Os demais reagentes, todos p. a., eram provenientes da Reagen.

3.1.2.4. Eletrotransferência e Imunodeteção Protéica

Tris, glicina, SDS, Tween-20 foram provenientes da Sigma; metanol, NaCl e ácido acético, da Merck. A membrana de nitrocelulose era procedente da Bio-Rad. Os anticorpos Anti-HSP-27 e Anti-NOS2 e os anticorpos secundários Anti-IGG goat e IGG Rabbit, foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology, a Peroxidase conjugada

a estreptoavidina e reagentes para detecção do luminol eram procedentes da Amersham.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparo das Culturas Organotípicas

As culturas organotípicas de fatias hipocâmpais foram preparadas e mantidas de acordo com o método de interface, como originalmente descrito por Stoppini e colaboradores (1991). Membranas de 30 mm de diâmetro, estéreis, porosas (0,4 μm), transparentes e de baixa ligação a proteínas foram usadas como suporte para os explantes.

Primeiramente, essas membranas eram colocadas dentro de uma placa de seis poços, onde se adicionava 1 mL de meio de cultivo em cada poço.

O meio de cultivo consistia de uma mistura de Meio Essencial Mínimo (MEM – *Minimum Essential Media*), soro de cavalo e Solução Balanceada de Sais de Hank (HBSS – *Hank's Balanced Salt Solution* Tabela 2), sendo suplementado com bicarbonato de sódio, HEPES, glicose, glutamina e acrescido de fungizona e garamicina (Tabela 1). O pH do meio era ajustado em 7,3 e, posteriormente, era filtrado em filtros descartáveis de 0,22 μm , em condições estéreis.

Tabela 1. Meio de Cultivo.

COMPOSTO	CONC.
MEM	50%
Soro de cavalo	25%
HBSS	25%
Bicarbonato	4 mM
HEPES	25 mM
Glicose	36 mM
Glutamina	2 mM
Fungizona	1%
Garamicina	36 $\mu\text{L}\%$

Ratos de entre 6 e 8 dias de idade, em média 3 por experimento, foram decapitados, as cabeças imediatamente colocadas em placa de Petri e levadas para a capela de fluxo laminar. Todos os passos seguintes foram realizados dentro da capela, sob estritas condições assépticas. Cada cérebro foi rapidamente removido, os hipocampos dos dois hemisférios dissecados, sendo colocados sobre o disco de Teflon de um fatiador de tecido McIlwain (The Mickle Laboratory Engineering Co). Fatias transversais de 400 μm de espessura foram cortadas e, transferidas para uma placa de Petri contendo HBSS (Tabela 2), pH 7,2, previamente esterilizado, onde foram gentilmente separadas com o auxílio de pincéis.

Tabela 2. HBSS

COMPOSTO	CONC.
CaCl ₂	1,26 mM
KCl	5,36 mM
NaCl	136,89 mM
Glicose	36,08 mM
KH ₂ PO ₄	0,44 mM
Na ₂ HPO ₄	0,34 mM
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,49 mM
MgSO ₄ .6H ₂ O	0,44 mM
HEPES	25 mM
Fungizona	1%
Garamicina	36 $\mu\text{L}\%$

Subseqüentemente, fatias da região dorsal do hipocampo foram selecionadas e transferidas para as membranas (Millicell[®]-CM) dentro dos poços da placa de cultivo (*Cell Culture Cluster*, Costar[®]), usando-se, para isso, uma pipeta Pasteur de plástico, estéril e descartável, de ponta larga. Usualmente, de quatro a seis fatias por membrana foram cultivadas, sendo duas fatias de cada animal.

Ao final, o meio de cultivo era trocado e a placa de seis poços colocada dentro de uma incubadora a 37°C, com atmosfera enriquecida com 5% de CO₂. Nesse ambiente, as fatias de hipocampo foram cultivadas por 14 dias, o meio sendo trocado regularmente a cada três dias.

3.2.2. Indução de Dano Celular por Privação de Oxigênio e Glicose (POG) nas culturas Organotípicas

Após 14 dias em cultivo, as culturas a serem expostas à POG foram aleatoriamente escolhidas e transferidas para outra placa de seis poços estéril, onde foram feitas três lavagens com um meio denominado meio de privação de oxigênio e glicose (meio POG) (Tabela 3), previamente esterilizado. Na última lavagem, o meio era deixado por 10 minutos com a finalidade de depletar os estoques de glicose, uma vez que as células em presença de oxigênio e ausência de glicose metabolizam seus estoques internos de glicose. A seguir o meio era rapidamente trocado por outro de idêntica composição, porém nitrogenado para promover o deslocamento o oxigênio presente. Para isso, o meio POG foi previamente borbuhlado com nitrogênio por 30 minutos antes de ser utilizado.

A placa foi então colocada dentro de uma câmara de anóxia, a qual era imediatamente fechada e tinha o oxigênio do seu interior depletado, através de sucessivas aplicações de vácuo e nitrogênio. O conjunto com pressão positiva de nitrogênio foi mantido dentro de uma estufa a 37°C por 40 minutos. (LAAKE, *et al.*, 1999; CIMAROSTI *et al.*, 2001; TAVARES, *et al.*, 2001)

Tabela 3. Meio de POG

COMPOSTO	CONC.
CaCl ₂	1,26 mM
KCl	5,36 mM
NaCl	136,89 mM
Sacarose	36,08 mM
KH ₂ PO ₄	0,44 mM
Na ₂ HPO ₄	0,34 mM
MgCl ₂	0,49 mM
MgSO ₄	0,44 mM
HEPES	25 mM

Ao final deste tempo, a placa foi retirada da câmara de anóxia, o meio POG rapidamente removido e as membranas lavadas duas vezes com HBSS, previamente esterilizado. A seguir, as membranas retornaram aos seus poços de origem na placa de seis poços, juntamente com as culturas Controles, que

permaneceram na incubadora durante o período correspondente à depleção dos estoques de glicose e durante o período correspondente à indução da privação de oxigênio e glicose (POG). O meio de cultivo foi trocado por um novo, da mesma forma e, paralelamente, com as amostras submetidas à POG.

Finalmente, a placa de seis poços contendo as membranas correspondentes a cultura exposta à POG e as membranas Controle retornou para a incubadora, onde permaneceu por 24 horas, correspondentes ao período de recuperação. Na vigésima segunda hora após à POG, foi adicionado ao meio de cultivo o corante Iodeto de Propídeo (IP) na concentração final de 4,5 μ M, ficando em contato com o tecido durante as últimas 2 horas do período de recuperação. Ao final, as fatias foram observadas ao microscópio de fluorescência com luz ultra-violeta e fotografadas, conforme descrito adiante (item 3.2.6).

3.2.3. Preparo das Fatias Hipocampais

Para este bloco de experimentos foram usados ratos wistar machos entre 2 – 3 meses de idade, mantidos sob condições padronizadas (12h luz/12h escuro) em sala climatizada a 22 ± 2 °C com água e comida *ad libidum*. Os animais foram mortos por decapitação, os hipocampos retirados e dissecados e secções transversais de 400 μ m foram preparadas utilizando-se um fatiador de tecidos McIlwain. As fatias foram colocadas duas por poço em uma placa de 24 poços, sempre foram preparadas, duas placas em paralelo: controle e POG, e pré incubadas por 15 minutos em solução krebs-Henseleit modificada denominada meio de pré-incubação (tabela 4), pH 7,4, em estufa a 37°C com uma atmosfera de 5% em CO₂. (MORO *et al.*, 1998). A seguir as fatias a serem lesionadas foram expostas à POG.

Tabela 4. solução krebs-Henseleit modificada - meio de pré-incubação.

COMPOSTO	CONC.
NaCl	120 mM
KCl	2 mM
CaCl ₂	0,5 mM
MgSO ₄	10 mM
NaHCO ₃	26 mM
KH ₂ PO ₄	1,18 mM
Glicose	11 mM

3.2.4. Indução de Dano Celular por Privação de Oxigênio e Glicose (POG) nas Fatias Hipocampais

As fatias controle foram incubadas por 60 minutos a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, em 1 ml de solução de Krebs-Henseleit modificada denominada Meio Controle (Tabela 5). Após este período o meio foi trocado por meio controle novo (solução krebs-Henseleit modificada – tabela 5) e as fatias foram incubadas por três horas nestas condições, período denominado de recuperação.

Em paralelo, as fatias a serem lesionadas foram lavadas com a mesma solução de Krebs-Henseleit modificada (Tabela 5), sem glicose (meio POG) e incubada por 60 minutos em câmara de anóxia a 37°C. Após os 60 minutos de POG as fatias foram lavadas com Meio Controle e incubadas por 3 horas a 37°C em atmosfera com 5% em CO₂.

Após 3 horas as fatias foram retiradas, sendo uma destinada à medida de viabilidade mitocondrial e a outra para imunodeteccção de iNOS, como descrito a seguir.

Tabela 5. solução krebs-Henseleit modificada – Meio Controle

COMPOSTO	CONC.
NaCl	120 mM
KCl	2 mM
CaCl ₂	2 mM
MgSO ₄	1,19 mM
NaHCO ₃	26 mM
KH ₂ PO ₄	1,18 mM
Glicose	11 mM

3.2.5. Obtenção do Extrato de Kava e Adição da Droga às Fatias

O extrato de Kava foi obtido através de extração com solvente orgânico do medicamento LAITAN[®], Extrato WS 1490 de *Piper methysticum* (kava-kava), o qual contém extrato padronizado a 70% em kava-lactonas, segundo o seguinte procedimento: o conteúdo total de uma cápsula foi dissolvido em um copo de béquer pequeno, contendo aproximadamente 10 ml de diclorometano. A mistura foi agitada por aproximadamente 10 minutos e filtrada em papel filtro, sendo o filtrado recolhido em outro béquer de mesmo tamanho. Ao béquer com o resíduo foram adicionados

mais 2 ml de solvente promovendo a retirada total dos resíduos e filtrado sob o mesmo filtro, e recolhidos para o mesmo recipiente que a porção anterior. O conteúdo total foi novamente filtrado sob papel filtro e recolhido em um copo de béquer previamente tarado. Novamente ao béquer com o resíduo foram adicionados mais 2 ml de solvente, promovendo a retirada total dos resíduos e filtrado sob o mesmo filtro, e recolhido para o mesmo recipiente que a porção anterior. O solvente foi evaporado a 50°C em aquecedor elétrico com temperatura controlada. Uma vez totalmente evaporado o solvente, o resíduo (resina de kava) pesado ficou em torno de 70 mg (a metodologia de extração foi a nós fornecida pela Dra. Stella Rates do Dep. de Farmacognosia da Fac. De Farmácia de UFRGS). O resíduo foi então resolubilizado em 10 ml de DMSO, gerando uma solução 7 mg/ml de uma mistura de kava-lactonas, que foi por nós chamada extrato de kava. Desse extrato foram feitas alíquotas de 50 µL em tubos eppendorf e estocadas em freezer -20°C As alíquotas eram descongeladas para uso minutos antes dos experimentos.

A dose de extrato a ser utilizada foi determinada através de experimento piloto, no qual a dose máxima testada promoveu a morte do tecido.

O extrato foi adicionado às culturas organotípicas durante o período de POG (40 min.) e durante o período de recuperação (24 horas). Nos ensaios utilizando fatias (não culturas) o extrato foi adicionado durante a POG (60 min.) e durante a recuperação (3 horas).

3.2.6. Avaliação da Morte Celular por Análise da Incorporação de Iodeto de Propídeo e Microscopia de Fluorescência

O dano celular nas Culturas Organotípicas foi avaliado usando-se o corante de exclusão Iodeto de Propídeo (IP). O IP é excluído de células saudáveis, porém com a perda da integridade da membrana este entra rapidamente nas células, liga-se ao DNA exposto, adquirindo a coloração vermelho brilhante fluorescente. A entrada de IP na célula é indicativo de injúria significativa a nível da membrana (MACKLIS & MADISON, 1990) e tem sido correlacionada com a liberação de lactato desidrogenase, e com a alteração histológica em culturas de fatias (VORNOV *et al.*, 1991).

As culturas foram analisadas 24 horas pós-lesão, com objetiva de 4 x, quanto a emissão de fluorescência do IP usando-se um microscópio de fluorescência invertido (Nikon Eclipse TE 300). Os comprimentos de onda de excitação e emissão do IP são, respectivamente, 545 e 610 nm. Para isto foi utilizado filtro G-2A, que permite a passagem de comprimentos de onda entre 510-560 nm, para excitação, e bloqueia comprimentos de onda abaixo de 590 nm, para emissão.

As imagens fluorescentes, foram captadas com câmara digital Sound Vision Inc. Wayland. MA. acoplada ao microscópio.

3.2.7. Quantificação da Incorporação de Iodeto de Propídeo

As imagens foram analisadas em computador com o programa de análise de imagens **Scion Image**. A intensidade dos pixels foi medida em uma área do hipocampo correspondente ao CA1, selecionada usando-se a ferramenta de contorno livre e outros opcionais do programa. O resultado era dado pela densidade integrada, o que corresponde a pixels/mm².

A morte celular foi expressa como percentagem do dano (BREDEK *et al.*, 2000), o qual foi obtido circulando-se a área total da região CA1, e mensurando-se a densidade integrada da área, a qual quantifica somente os níveis de fluorescência acima do fundo (*background*). Considerava-se a medida da área total como 100% de CA1 e a área fluorescente (densidade integrada) como área de CA1 afetada pelo dano.

Os valores da morte celular, obtidos a partir de experimentos independentes, são apresentados como média \pm o erro padrão. O n foi de 5 experimentos. Análise de variância de uma via, seguida do teste Duncan, foi o teste estatístico utilizado para comparar o dano celular de culturas organotípicas tratadas com extrato de kava 7 μ g/ml, contra o dano celular de culturas organotípicas contendo apenas o veículo do extrato (DMSO), considerando valores de *p* menores que 0,01 como estatisticamente significativos.

3.2.8. Marcação das Fosfoproteínas com Fosfato Radioativo

Logo após a obtenção das fotos, as culturas foram lavadas três vezes com solução Krebs Ringer, tamponada com HEPES (pH 7,4) (Tabela 6), visando a retirada do excesso de IP não incorporado.

Na seqüência, as fatias foram retiradas das membranas uma a uma, sendo dessas retiradas micro-fatias específicas da região CA1 (0,4 mm de diâmetro) e transferidas duas micro-fatias por tubos cônicos contendo 100 μ L da solução Krebs Ringer. Nesse meio as fatias permaneceram por 30 minutos, a 30°C, sob agitação suave e constante, sendo uma pré-incubação. A pré-incubação teve a finalidade de recuperar o tecido do estresse da retirada das fatias das membranas e de depletar os estoques internos de fosfato.

Finalizado o tempo de pré-incubação, procedeu-se a marcação das fosfoproteínas, conforme descrito por Salbego e Rodnight (1996) e adaptado por Tavares *et al.* em 2001. O meio de pré-incubação foi aspirado com uma pipeta Pasteur, descartado e substituído por 50 μ L do mesmo meio contendo 40 μ Ci de fosfato radioativo. A seguir, as fatias foram incubadas durante 60 minutos, a 30°C, sob agitação suave e constante (banho metabólico).

A reação foi interrompida adicionando-se 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% os tubos foram mantidos em gelo por 10 minutos. O excesso de fosfato radioativo não incorporado foi removido através de uma lavagem com TCA 4% e duas lavagens com água destilada, o que também serviu para retirar o excesso de ácido.

Subseqüentemente, as fatias foram solubilizadas em 80 μ L de solução de lise (Tabelas 7 e 8). Foram retiradas duas alíquotas de 10 μ L para posterior dosagem de proteínas, sendo, a seguir, adicionado β -mercaptoetanol na concentração final de 2%.

A dosagem de proteínas foi feita pelo método de Peterson, o qual utiliza a base do método de Lowry com algumas alterações para permitir a presença de SDS, melhorando assim, a solubilização das proteínas (PETERSON, 1977).

As amostras marcadas foram congeladas e estocadas a -20°C, para análises subseqüentes.

Tabela 6. Meio de Krebs Ringer

COMPOSTO	CONC.
NaCl	124 mM
KCl	4 mM
MgSO ₄	1,2 mM
Na-HEPES (pH 7,4)	25 mM
Glicose	12 mM
CaCl ₂	1 mM

Tabela 7. Solução de Lise para Eletroforese Unidimensional (Solução A)

COMPOSTO	CONC.
SDS	4%
EDTA	2,1 mM
Tris	50 mM

3.2.9. Eletroforese Unidimensional

O método de eletroforese unidimensional foi realizado de acordo com Gower e Rodnight (1982). Os géis para eletroforese unidimensional eram confeccionados no laboratório numa concentração de 12% em acrilamida. O volume de amostra aplicado em cada poço variava de acordo com a dosagem de proteínas, sendo que a quantidade aplicada sempre continha 25 µg de proteína. A corrida eletroforética realizava-se a 4°C, fixando-se a voltagem a 230 V com duração aproximada de 4 horas (Gower et al., 1986). Após o término da corrida, procedia-se a transferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose, seguido de auto-radiografia e posterior imunodeteccção das proteínas HSP-27 e iNOS, conforme descrito a seguir no ítem 3.2.10.2.

Tabela 8. Solução de Lise para Eletroforese Unidimensional (Solução B).

COMPOSTO	CONC.
Glicerol	40%
Tris	50 mM
Água (Milli-Q)	q.s.
Azul de bromofenol	q.s.

3.2.10. Eletrotransferência para Membrana de Nitrocelulose e Imunodeteccção

O procedimento de imunodeteção envolveu a transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose e posterior reação com os anticorpos, seguida do método da peroxidase-estreptoavidina-biotina e luminol (OGATA *et al.*, 1988; BALDO, 1994). Essa metodologia permitiu a identificação e quantificação das proteínas de interesse.

3.2.10.1. Eletrotransferência

As proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose através do sistema semi-seco (*semidry electroblotter*, Trans-blot RD®, Bio Rad). Para isso, após a corrida eletroforética, o gel foi montado sobre o ânodo do aparelho da seguinte forma: duas folhas de papel filtro Watman Nº 3, a membrana de nitrocelulose, o gel contendo as proteínas de interesse e, novamente, duas folhas de papel filtro. As folhas de papel e a nitrocelulose apresentavam a mesma dimensão do gel a ser transferido e todos foram previamente embebidos em tampão Bjerrum (Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20%). A membrana de nitrocelulose permaneceu 15 minutos neste tampão, para hidratar, e o gel foi apenas brevemente mergulhado. Bolhas de ar entre os papéis e entre o gel e a membrana foram evitadas com o auxílio de um tubo de ensaio molhado em tampão. Sobre este “sanduíche” foi colocado o cátodo.

As condições de transferência foram as seguintes: 15 V de voltagem, 1,5 mA /cm² de corrente e 60 minutos.

3.2.10.1.1. Detecção de Fosfoproteínas Transferidas

Os experimentos para deteção da fosfoproteína HSP27 foram realizados apenas com as culturas organotípicas. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi lavada com uma solução fixadora, contendo metanol 40% e ácido acético 10%, por 5 minutos, sendo, em seguida, lavada 5 vezes com água destilada para eliminar o excesso de ácido. A seguir, a nitrocelulose foi seca, com o auxílio de lâmpadas de infra-vermelho, e exposta a um filme de raio-X por 4 horas a -70°C, para confirmar a transferência das fosfoproteínas e para fazer o estudo relativo entre

a incorporação de ^{32}P e o imunoconteúdo da HSP27. Os filmes de raio-X com as impressões, resultados das emissão de radiação pelas proteínas marcadas, foram escaneados e quantificados utilizando-se o programa OptQuant[®] Packard. O valor obtido fornece a quantidade relativa da proteína fosforilada.

3.2.10.1.2. Tratamento das Membranas de Nitrocelulose Provenientes dos Experimentos Realizados com Fatias Hipocampais

Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi lavada com uma solução fixadora, contendo metanol 40% e ácido acético 10%, por 5 minutos, sendo, em seguida, lavada 5 vezes com água destilada, para eliminar o excesso de ácido, a seguir procedeu-se a imunodeteção para iNOS (ver abaixo).

3.2.10.2. Imuno-reação

Após a obtenção da autoradiografia a membrana de nitrocelulose era incubada com 10 mL de solução de M-TBS (*milk*-TBS), que consiste de 5% de leite em pó desnatado (Molico) em TBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM; pH 7,5), por aproximadamente 12 horas . Esta etapa serve para bloquear os poros da nitrocelulose, impedindo a ligação inespecífica de anticorpos. Após o bloqueio, as membranas de nitrocelulose foram lavadas três vezes com 10 mL de T-TBS (TBS adicionado de 0,05% de Tween-20), tendo cada lavagem a duração aproximada de 5 minutos. A seguir, as membranas de nitrocelulose foram incubadas com o primeiro anticorpo, anti-HSP-27 para as membranas provenientes das culturas ou anti-iNOS para as provenientes dos experimentos em fatias hipocampais, por 18-20 horas, sob agitação suave. Os anticorpos foram diluídos em M-TBS na proporção de 1:200. Após a incubação com o primeiro anticorpo, as membranas de nitrocelulose foram novamente lavadas três vezes, por 5 minutos cada lavagem, com 10 mL de T-TBS.

Em seguida, realizou-se a incubação com o anticorpo, anti-imunoglobulina biotinizada de cabra, para a membrana anteriormente incubada com anti-HSP27, por aproximadamente 12 horas, sob agitação suave. A diluição deste anticorpo foi de 1:400, em M-TBS e ao final desta etapa, foi repetido o protocolo de lavagens já

descrito, seguindo-se a incubação da membrana de nitrocelulose com peroxidase conjugada à estreptoavidina, durante 1 hora, sob agitação suave. A diluição da peroxidase foi de 1:1000 em M-TBS. Para a membrana incubada com anti-iNOS procedeu-se a incubação com anticorpo secundário anti-IGG de coelho acoplado a peroxidase (1:1000) por 2 horas, seguido do mesmo protocolo de lavagens. Logo após, as membranas foram lavadas três vezes com T-TBS e duas vezes com TBS, cada lavagem com duração de 5 minutos.

Na seqüência procedeu-se a reação com luminol. O método do luminol utilizado serve para a identificação da reação: a peroxidase reage com o reagente de luminol e emite luz, a qual pode ser medida pela impressão do filme de raio-X, quantificado posteriormente. Os filmes de raio-X com as impressões, resultados das imuno-reações, foram escaneados e quantificados utilizando-se o programa OptQuant[®] Packard. O valor obtido fornece a quantidade relativa da proteína imunodetectada.

Destacamos que amostras de fatias Controle e Lesionadas sempre foram analisadas em uma mesma membrana de nitrocelulose, permitindo que seus valores pudessem ser comparados.

3.2.11. MTT – Medida da Viabilidade Mitocondrial

Esta metodologia foi utilizada apenas nos experimentos com fatias hipocâmpais. A viabilidade celular ou atividade Mitocondrial foi determinada usando o sal de tetrazolium MTT (*3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide*). Após as três horas de recuperação, as fatias de hipocampo de ambas as placas, lesionada e controle, foram incubadas a 37°C por 45 minutos com 45 µg/ml de MTT, sob abrigo da luz. Desidrogenases mitocondriais ativas de células vivas causam a clivagem e redução do MTT amarelo e solúvel para o formazam púrpura, insolúvel (MOSMANN, 1983). O formazam produzido foi extraído das células, adicionando-se 1 ml de DMSO a cada poço das placas sob agitação por aproximadamente 30 min. Após a densidade óptica foi medida em espectrofotômetro a 560 e a 630 nm (Beckman DU 640), onde a diferença Abs 560 – Abs 630 fornecia o índice de viabilidade celular. Os dados foram comparados com

os controles (fatias hipocampais não submetidas à POG) aos quais atribuiu-se 100% de viabilidade.

4. Resultados

4.1. Escolha da Dose e Avaliação do Modelo

Foi realizado um ensaio piloto utilizando-se as doses de 7 $\mu\text{g/ml}$ e 70 $\mu\text{g/ml}$ de extrato de kava, utilizando a literatura como base de escolha. Estas doses foram adicionadas às culturas organotípicas controle e expostas à POG por 40 minutos. Paralelamente, para validar nosso modelo, adicionamos um antagonista NMDA, o MK-801, na dose de 30 μM , já referido na literatura como droga neuroprotetora (CIMAROSTI *et al.*, 2001; MULHOLLAND & PRENDERGAST, 2002). Os resultados são apresentados em porcentagem do dano na região CA1 e podem ser vistos na figura 5.

Como pode ser visto, o controle apresentou uma incorporação baixa do corante; já a cultura não tratada, exposta à POG apresentou uma incorporação bastante alta, o que representa um dano na ordem de 80%. A cultura exposta à POG tratada com uma dose de 7 $\mu\text{g/ml}$ de kava apresentou uma redução do dano na região CA1 em torno de 49%. Esta será a dose utilizada nos experimentos seguintes.

A cultura exposta a POG e tratada com MK-801 apresentou uma grande redução no dano, algo em torno de 65%, mostrando que o modelo estava passível de ser neuroprotegido.

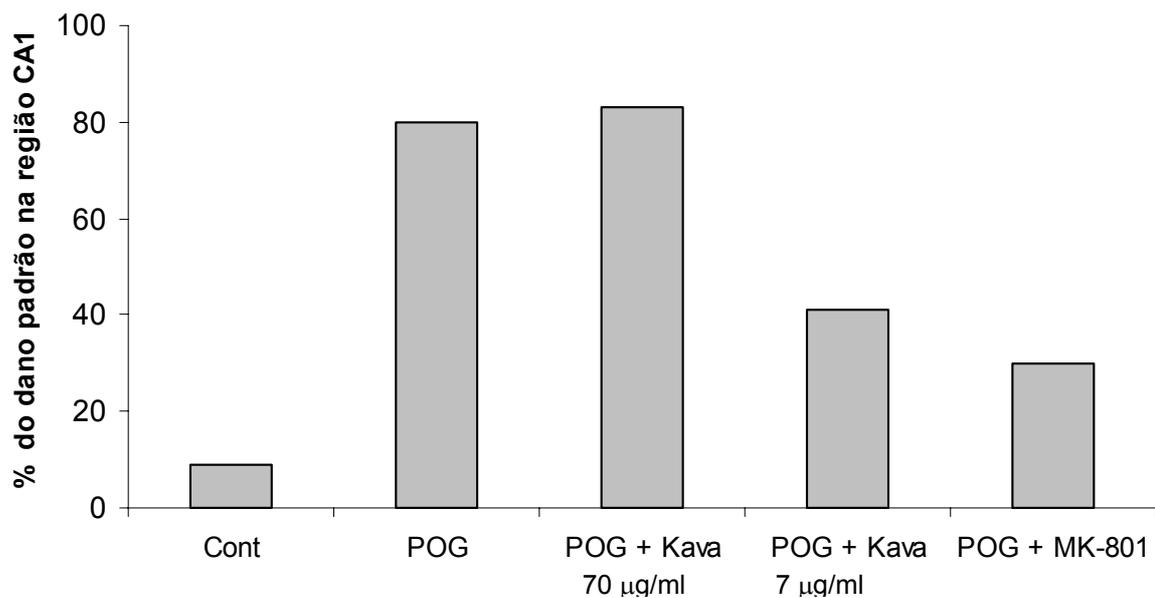


Figura 5. Efeito de diferentes doses de kava e MK-801 sobre a lesão induzida por POG de 40 minutos em Culturas Organotípicas de hipocampo de ratos.

Os resultados são expressos como porcentagem do dano na região CA1 (n=1, uma placa de cultivo contendo fatias de três animais diferentes).

Cont - Cultura não exposta à POG sem tratamento

POG - Cultura exposta à POG sem tratamento

POG+kava 70 µg/ml - Cultura exposta à POG tratada com kava 70 µg/ml

POG+kava 7 µg/ml - Cultura exposta à POG tratada com kava 7 µg/ml

MK-801 - Cultura exposta à POG tratada com MK-801

4.2. Avaliação do Efeito Neuroprotetor do Extrato de Kava em Culturas Organotípicas Submetidas à POG

Para avaliar o potencial neuroprotetor do extrato de kava nas Culturas Organotípicas de hipocampo de ratos, essas foram produzidas e submetidas à POG por 40 minutos em presença e ausência de kava e de DMSO, solvente utilizado na resolubilização do extrato, como pode ser visto na seção de materiais e métodos.

Esses experimentos tiveram o objetivo de avaliar o efeito neuroprotetor da dose de 7 µg/ml de extrato de kava. Os resultados estão expressos em porcentagem do dano na região CA1 do hipocampo e podem ser vistos na figura 6. Os controles não expostos à POG e não tratados, não apresentaram diferença significativa dos controles não expostos à POG tratados com kava ou com o veículo, demonstrando assim a ausência de toxicidade da kava e do DMSO às culturas nesse modelo nas dose testadas. Assim sendo, optamos por representar no gráfico somente os controles tratados. Quando as culturas foram expostas à POG em presença de kava na dose de 7 µg/ml, foi observado um dano celular de 22% do CA1, representando uma redução de 70% em relação ao POG e de 58% em relação ao POG + DMSO. As culturas expostas a POG e tratadas com DMSO 0,1%, apresentaram uma tendência de redução do dano, mas não apresentaram diferença significativa ($p < 0,01$) do POG.

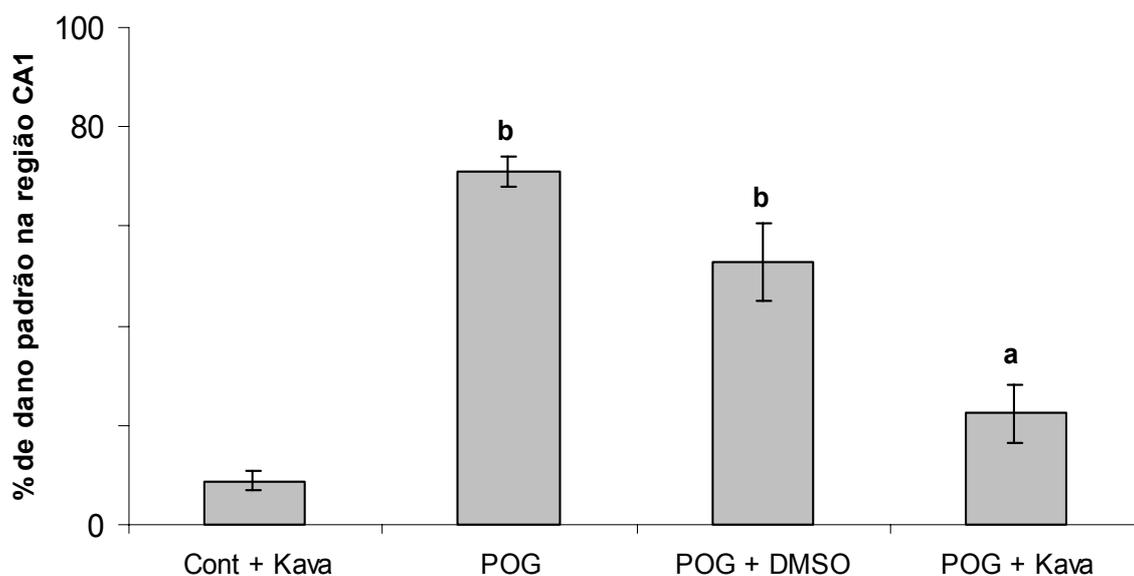


Figura 6. Quantificação da morte celular em resposta à POG por 40 minutos na região CA1 em Culturas Organotípicas na presença de DMSO ou kava 7 $\mu\text{g}/\text{m}$.

Os resultados são expressos como porcentagem do dano na região CA1 e estão apresentando como média \pm o erro padrão, (n=5). O teste estatístico aplicado foi a análise de variância de uma via seguida do teste de Duncan.

a = diferente de POG+DMSO para $p < 0,01$

b = diferente de POG+kava e Cont+kava para $p < 0,01$

Cont+kava – Cultura não exposta à POG tratada com 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de extrato de kava

POG – Cultura exposta à POG sem tratamento

POG+DMSO – Cultura exposta à POG tratada com DMSO 0,1%

POG+kava – Cultura exposta à POG tratada com kava 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$

4.3. Efeito do Extrato De Kava Sobre o Imunoconteúdo e Fosforilação da Proteína HSP27 em Culturas Organotípicas Submetidas à POG

Para avaliarmos se a proteção observada para o extrato de kava envolvia alterações no estado de fosforilação e/ou no imunoconteúdo da proteína HSP27, foram realizados experimentos de marcação das fosfoproteínas presentes no hipocampo, seguidos pela técnica de Western Blotting para HSP27 (descrito na seção materiais e métodos). Os resultados podem ser vistos na figura 7a e 7b.

O valor obtido pelo programa OptQuant[®] PACKARD para impressão correspondente a HSP27 imunodetectada no filme de raio-X correspondente a cultura controle (não exposta a POG) tratada com extrato de kava 7 µg/ml foi considerada como 100%. Para o gráfico que mostra a Razão fosforilação / imunoconteúdo foi considerado como 100% o próprio imunoconteúdo total da proteína.

Podemos observar que nas amostras expostas a 40 minutos de POG em presença de kava ocorre um aumento do imunoconteúdo da proteína HSP27 e este aumento é acompanhado pela fosforilação, uma vez que a percentagem da proteína fosforilada não difere significativamente das demais condições (POG, POG+DMSO).

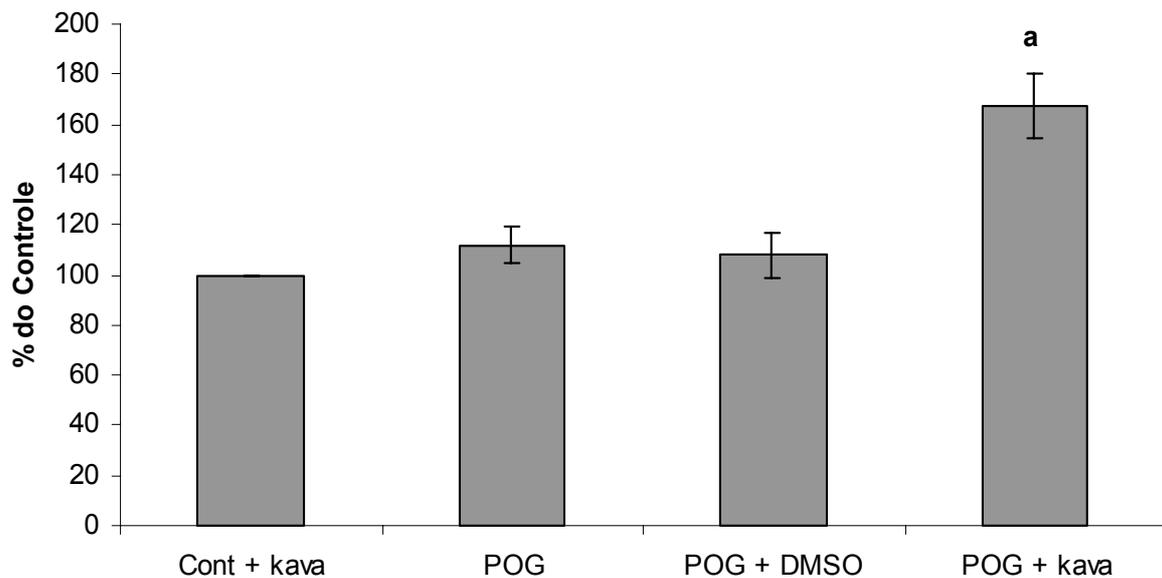


Figura 7a. Alterações no imunoconteúdo da HSP27 em resposta à POG por 40 min. na região CA1 em culturas organotípicas.

O resultado é apresentado como porcentagem do controle, apresentando como média \pm o erro padrão, (n=5).

O teste estatístico aplicado foi a análise de variância de uma via seguida do teste de Duncan,

a = significativamente diferente dos demais para $p < 0,05$

Cont+kava – Cultura não exposta à POG tratada com 7 $\mu\text{g/ml}$ de extrato de kava

POG – Cultura exposta à POG sem tratamento

POG+DMSO – Cultura exposta à POG tratada com DMSO 0,1%

POG+kava – Cultura exposta à POG tratada com kava 7 $\mu\text{g/ml}$

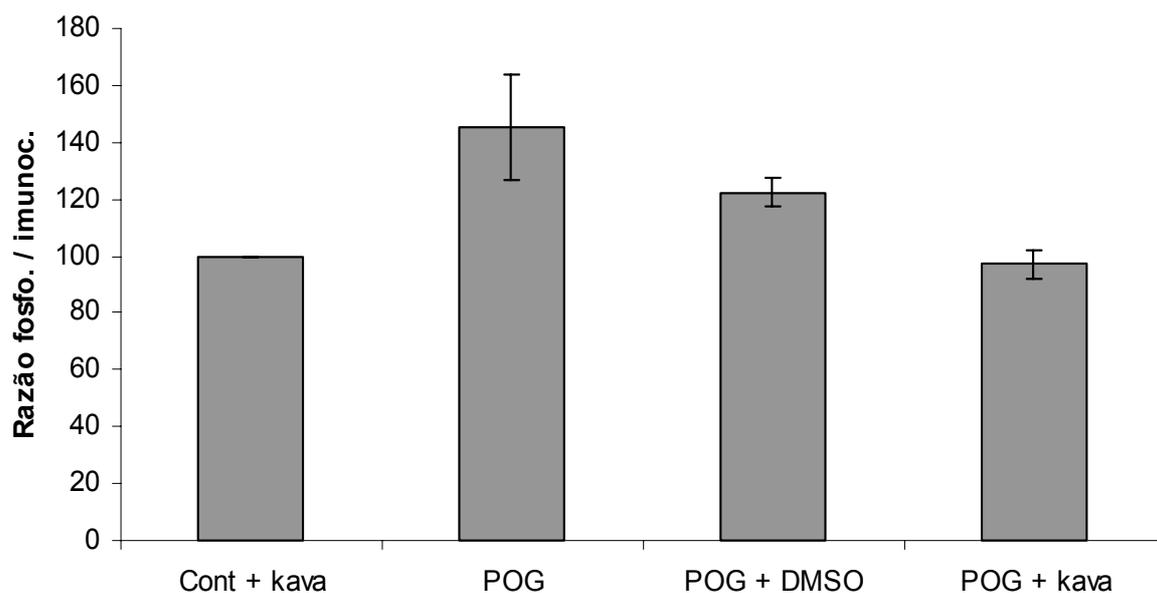


Figura 7b. Alterações na porcentagem da proteína fosforilada (HSP27) em resposta à POG por 40 min. na região CA1 em culturas organotípicas.

O resultado é apresentado como razão fosforilação / imunocnteúdo, apresentando como média \pm o erro padrão, (n=5).

O teste estatístico aplicado foi a análise de variância de uma via seguida do teste de Duncan.

Cont+kava – Cultura não exposta à POG tratada com 7 μ g/ml de extrato de kava

POG – Cultura exposta à POG sem tratamento

POG+DMSO – Cultura exposta à POG tratada com DMSO 0,1%

POG+kava – Cultura exposta à POG tratada com kava 7 μ g/ml

4.4. Avaliação do Efeito Neuroprotetor do Extrato de Kava em Fatias Hipocâmpais Submetidas a POG

Esses experimentos tiveram o objetivo de verificar a atividade neuroprotetora do extrato de kava em um segundo modelo que também mimetiza isquemia. Nesses experimentos a avaliação é realizada através da viabilidade celular ou atividade mitocondrial, que foi determinada usando o sal de tetrazolium MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide). A POG diminuiu a viabilidade em torno de 40%, já a POG quando realizada em presença de DMSO 0,1%, apresentou uma diminuição da viabilidade em torno de 50%. A fatia tratada com o extrato de kava apresentou um aumento na viabilidade celular ou atividade mitocondrial em torno de 15% em relação submetida a POG tratada apenas com o veículo (DMSO).

Os resultados são apresentados como porcentagem do controle e podem ser vistos na figura 8.

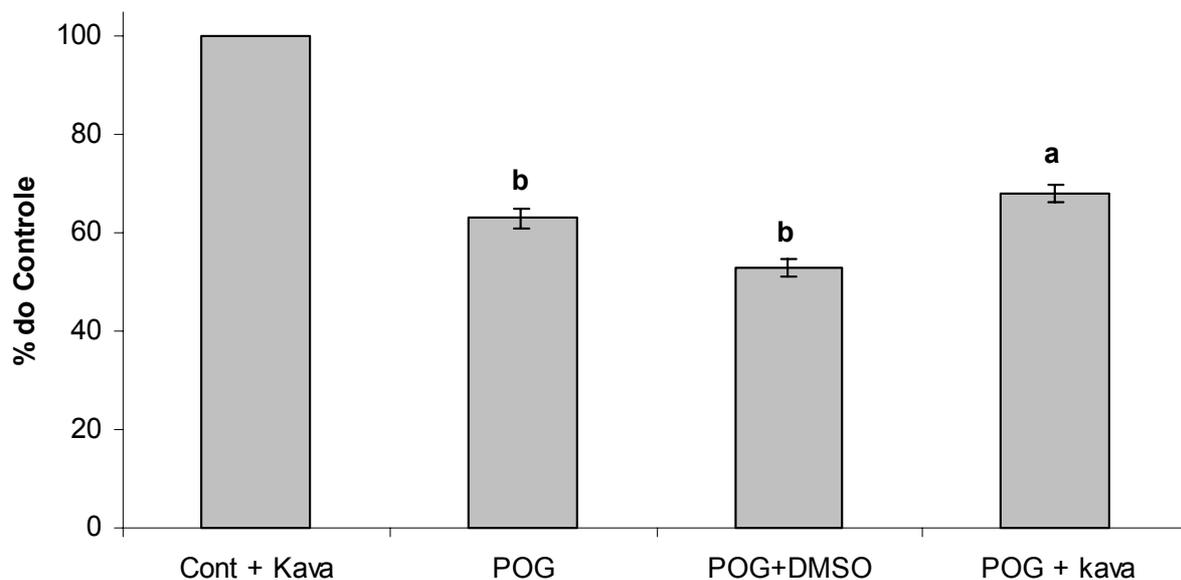


Figura 8. Verificação da viabilidade celular através do método de MTT, em fatias de hipocampo de rato submetidas à POG por 60 minutos em presença ou ausência de extrato de kava 7 $\mu\text{g/ml}$ e DMSO 0,1%.

Os resultados são expressos como porcentagem do controle, usando o controle não exposto à POG, tratado com kava 7 $\mu\text{g/ml}$ como 100%, apresentando como média \pm o erro padrão, (n=8).

O teste estatístico aplicado foi a análise de variância de uma via seguida do teste de Duncan.

a = diferente de POG+DMSO e Cont+kava para $p < 0,05$

b = diferente de Cont+kava e POG+kava para $p < 0,05$

Cont+kava – Cultura não exposta à POG tratada com 7 $\mu\text{g/ml}$ de extrato de kava

POG – Cultura exposta à POG sem tratamento

POG+DMSO – Cultura exposta à POG tratada com DMSO 0,1%

POG+kava – Cultura exposta à POG tratada com kava 7 $\mu\text{g/ml}$

4.5. Efeito do extrato de kava sobre o imunocontéudo da proteína iNOS em fatias hipocampais submetidas a POG.

Utilizando as fatias hipocampais submetidas à POG de 60 minutos como modelo, foi quantificado o imunocontéudo da proteína iNOS. Para tanto, após o período de recuperação (3 horas) o tecido foi solubilizado e submetido à separação eletroforética e eletrotransferência para membrana de nitrocelulose. A membrana foi submetida a imunodeteção para iNOS conforme descrito na seção materiais e métodos. Os resultados podem ser vistos na figura 9.

O tratamento das fatias com extrato de kava (7 µg/m) durante a POG e durante o período de recuperação diminuiu em 35% o imunocontéudo da iNOS.

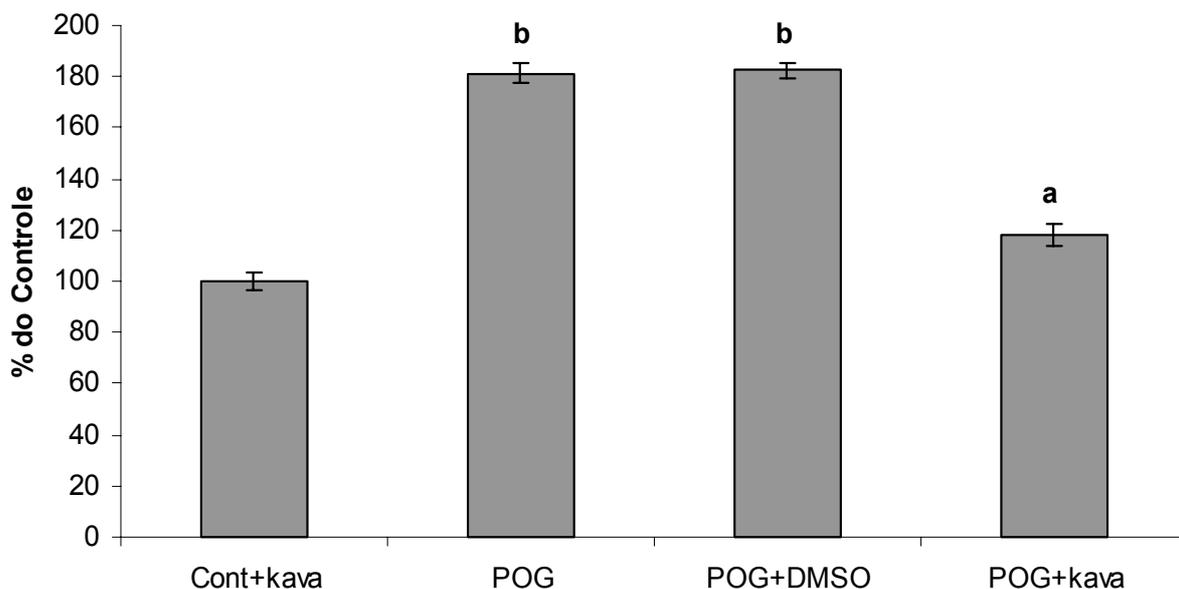


Figura 9. Verificação do imunoconteúdo da proteína iNOS em amostras controle e em resposta a POG de 60 min. em fatias hipocâmpais tratadas e não tratadas com kava e DMSO.

Os resultados são expressos como porcentagem do controle, usando o controle não exposto à POG, tratado com kava 7 $\mu\text{g/ml}$ como 100%, apresentando como média \pm o erro padrão, (n=8).

O teste estatístico aplicado foi a análise de variância de uma via seguida do teste de Duncan.

a = significativamente diferente de POG e POG+DMSO para $p < 0,05$

b = diferente de Cont+kava para $p < 0,05$

Cont+kava – Cultura não exposta à POG tratada com 7 $\mu\text{g/ml}$ de extrato de kava

POG – Cultura exposta à POG sem tratamento

POG+DMSO – Cultura exposta à POG tratada com DMSO 0,1%

POG+kava – Cultura exposta à POG tratada com kava 7 $\mu\text{g/ml}$

5. Discussão

Inicialmente, para a determinação da dose do extrato de kava a ser utilizada, foram realizados experimentos piloto usando doses baseadas na literatura, bem como utilizou-se paralelamente o antagonista NMDA, MK-801, para avaliar o desempenho do modelo. Tanto o extrato de kava como o MK-801 ficaram em contato com as culturas durante os 40 minutos de POG e durante as 24 horas de reoxigenação. Esses resultados podem ser vistos na figura 5.

O MK-801 mostrou reduzir o dano induzido pela POG, nos certificando que o modelo experimental estava respondendo de forma adequada a drogas neuroprotetoras. Com relação ao extrato de kava, a dose de 7 $\mu\text{g/ml}$ apresentou uma redução no dano celular em torno de 49%; e uma dose 10 vezes maior, 70 $\mu\text{g/ml}$, já não apresentava mais proteção. Em 2002 Patrick J. Mulholland & Mark A. Prendergast demonstraram que altas concentrações de (\pm) kavaina (um dos constituintes majoritários do extrato) produzem marcada neurotoxicidade na camada molecular lacunosa do hipocampo, sendo esse dano semelhante ao apresentado quando se injeta o extrato bruto em uma dose de 120 mg/kg após o insulto isquêmico, e que baixas concentrações não são neurotóxicas às fatias (MULHOLLAND & PRENDERGAST, 2002). A dose escolhida como dose de trabalho foi a dose de 7 $\mu\text{g/ml}$ de extrato de kava WS 1490 (segundo metodologia de extração especificada na seção materiais e métodos), uma dose baixa que nesse experimento piloto mostrou o melhor índice de proteção. A literatura fornece um arsenal de doses em diferentes concentrações para estudos *in vitro* e *in vivo*, utilizando desde extrato até constituintes da kava solados. As doses podem variar entre 300 a 600 μM de (\pm) kavaina para estudos *in vitro* com atividade anticonvulsivante e relações com sistema glutamatérgico (GLEITZ *et al.*, 1996; MULHOLLAND & PRENDERGAST, 2002), de 10 a 400 μM de Metisticina, (\pm) kavaina para testes de inibição da captação de monoaminas (SEITZ *et al.*, 1997) até 10 a 150 mg/kg de resina de kava ou constituintes isolados para estudos com interações com o sistema gabaérgico e neuroproteção *in vivo*. (BACKHAUß & KRIEGLSTEIN, 1992; DAVIES *et al.*, 1992, MULHOLLAND & PRENDERGAST, 2002).

Como objetivo geral deste trabalho tínhamos a verificação do efeito neuroprotetor da kava, uma vez determinada a dose, essa foi testada em dois modelos distintos.

Nas Culturas Organotípicas os controles não tratados com kava e os tratados com o veículo (DMSO), não apresentaram diferença significativa dos tratados com kava, segundo o teste estatístico aplicado, assim optamos por apresentar somente os controles tratados com kava. O DMSO está presente no extrato de kava na concentração de 0,1%, a não toxicidade dessa concentração de DMSO nesse tipo de modelo já havia sido relatada na literatura (MULHOLLAND & PRENDERGAST, 2002). Esses resultados podem ser vistos na figura 6. As culturas submetidas à POG apresentaram um dano na ordem de 70%, ou seja, 70% da região CA1 foi atingida pelo dano. Quando o DMSO está presente no meio durante a POG, ocorre uma tendência na diminuição do dano celular em 25%, embora não tenha sido estatisticamente significativo (figura 6). DMSO é amplamente usado para dissolver uma variedade de drogas, o efeito neuroprotetor desse solvente já é descrito na literatura (HÜLSMANN, *et al.*, 1999). Existem estudos mostrando que o DMSO é capaz de reduzir o aumento na concentração de glutamato liberado, induzido pela isquemia (NAKAYAMA, *et al.*, 2002), e aumentar a tolerância de fatias hipocâmpais à hipóxia na dose de 0,4% (GREINER, *et al.* 2000; HÜLSMANN, *et al.*, 1999), o que ressalta a importância de se utilizar culturas tratadas com DMSO (0,1%), expostas à POG, como padrão de lesão na hora de avaliar o efeito neuroprotetor de drogas que usem esse solvente como veículo, para que o resultado se deva somente ao efeito da atividade neuroprotetora da droga e não essa acrescida da atividade neuroprotetora do DMSO.

As culturas lesionadas tratadas com extrato de kava apresentaram diminuição significativa no dano celular de 58% em relação ao dano apresentado pelas culturas tratadas com DMSO, apresentando somente 22% da área total de CA1 lesionada, mostrando que o extrato de kava realmente foi capaz de reduzir o dano celular induzido por POG. Em 1992, utilizando um modelo *in vivo* de isquemia cerebral BACKHAUß e KRIEGLSTEIN relataram o efeito protetor do extrato de kava. Nesse estudo os autores testaram o extrato e diversos constituintes isolados da resina de kava, sendo que a ineficiência de alguns compostos como por exemplo a kavaína e

a diidrokaína, foi atribuída a propriedades farmacocinética das drogas. Nos modelos *in vitro* como os utilizados no presente trabalho, eliminam-se os possíveis problemas com farmacocinética, uma vez que a droga é adicionada no meio de incubação (ou cultivo) podendo-se precisar a dose e o momento da exposição à droga.

Os experimentos realizados com modelo de fatias tiveram o objetivo de verificar se o efeito neuroprotetor da kava se mantinha em outro modelo de POG, que utilizasse outro método de avaliação da morte celular. O extrato de kava foi então testado em um modelo de POG em fatias hipocámpais, esse modelo vem sendo utilizado tanto para o estudo dos mecanismos fisiológicos associados ao dano celular, como para o estudo de verificação da atividade neuroprotetora de drogas em nosso laboratório. Para melhor comparação e avaliação dos resultados os tratamentos foram os mesmos utilizados no estudo com culturas. O tempo de POG utilizado neste modelo é de 60 minutos. Nesse tipo de modelo fica inviável a verificação da morte pela incorporação de iodeto de propídeo, pois a morte celular pelo próprio corte das fatias é muito recente, gerando uma marcação tão forte que seria inviável verificar a diferença entre fatias lesionadas e fatias controles. O método de verificação escolhido, então, foi a viabilidade mitocondrial usando o MTT. Esse sal tem sido muito utilizado no desenvolvimento de ensaios colorimétricos para sobrevivência em células de mamíferos (MOSMANN, 1983). Esse ensaio detecta células vivas e não células mortas e, ainda, sinais gerados pelo grau de ativação dessas células (MOSMANN, 1983). Esse método pode ainda ser usado para medir toxicidade, proliferação e ativação celular (MOSMANN, 1983).

Quando essas fatias foram expostas à POG sem tratamento, apresentaram uma diminuição na viabilidade mitocondrial em torno de 37% (figura 8), além disso quando as fatias foram submetidas à POG e tratadas com DMSO essa viabilidade diminuiu para 53%, indicando que nesse modelo o DMSO colabora com o dano, por outro lado, quando as fatias foram expostas à POG e tratadas com kava, a viabilidade aumentou para 68%, um aumento de viabilidade celular significativo de 15% em relação ao POG+DMSO. Como já citado este modelo consiste em fatias de hipocampo não cultivadas, ou seja, logo após os traumas de retirada do encéfalo, dissecação e fatiamento do hipocampo algumas dessas fatias ainda são

imediatamente submetidas à POG, enquanto nas culturas o tecido tem tempo de se recuperar desses traumas iniciais, para então serem submetidas à POG. Além disso no modelo utilizando culturas organotípicas, a morte celular é avaliada por corante de exclusão e no modelo de fatias, verifica-se a viabilidade mitocondrial. Talvez, essas diferenças justifiquem o fato de que no modelo de culturas, a proteção seja em torno de 58% e no modelo de fatias o aumento de viabilidade celular seja de 15%, pois se está medindo fenômenos distintos em modelos diferentes.

A exposição de Culturas Organotípicas à POG e sua posterior marcação com iodeto de propídeo, bem como a exposição do tecido recém isolado à POG e verificação de sua viabilidade, permite se avaliar a morte celular e qual a sua extensão. Porém estes modelos não fornecem pistas sobre os mecanismos que induzem a morte celular ou sobre os mecanismos que a impedem ou se a mesma está ocorrendo durante ou pós-insulto (morte celular tardia). Embora se constituam em importantes ferramentas para o estudo dos mecanismos fisiológicos de injúria celular, deixam uma lacuna na busca por repostas.

O extrato de kava e seus constituintes isolados apresentam uma grande diversidade de atividades biológicas já relatadas na literatura, podendo atuar de forma bastante complexa. Devido a sua forte característica lipofílica pode permanecer na membrana lipídica causando distorções em uma variedade de domínios de receptores, enquanto interage especificamente com sítios de ligações (DAVIES *et al.*, 1992). Existem também evidências de ação antagonista de canais de sódio e canais de cálcio, relacionados com as ações anticonvulsivantes e estabilizantes do humor (GLEITZ *et al.*, 1996; SCHIRRMACHER *et al.*, 1999; GRUNZE, *et al.*, 2001). Ainda foram observadas ações sobre os sistemas serotoninérgicos e dopaminérgicos nos circuitos neuronais límbicos (BAUM *et al.*, 1998; BOONEN & HAEBERLEIN, 1998), atividade inibitória sobre a captação de monoaminas (SEITZ *et al.*, 1997), ação antitrombótica em preparações plaquetárias humanas (GLEITZ *et al.*, 1997), sobre a liberação de glutamato induzida por veratadina e KCl (GLEITZ *et al.*, 1995), e sobre a alta atividade glutamatérgica em modelo de doença de Parkinson MPTP em camundongos (SCHIMIDT & FERGER, 2001) e ainda alta afinidade sobre receptores GABA_A, dopaminérgicos D₂, opioides

(mu e delta), e histamínicos (H1 e H2)(JUSSOFIE, *et al.*, 1994; BOONEN & HABERLEIN, 1998; DINH, *et al.*, 2001).

Muitas dessas ações relatadas podem de maneira efetiva estar mediando a atividade neuroprotetora encontrada nos modelos deste trabalho, e muito dessa variedade de efeitos pode ser decorrente da variedade de compostos contidos no extrato. Como citado na introdução, múltiplos e independentes mecanismos (danos por radicais-livres, perda da competência de tradução, ativação de proteólise, indução de apoptose, entre outros) estão envolvidos na morte neuronal pós-isquêmica e a intervenção de uma única droga será ineficaz (WHITE *et al.*, 2000). No entanto, mostrar a atividade desse extrato não significa que tenha uso terapêutico. Modelos *in vitro* livres de efeitos farmacocinéticos e de biotransformação, como o usado aqui, são um indicador de efeito e de que o extrato de kava e seus constituintes isolados merecem atenção.

Com a finalidade de investigar algum mecanismo envolvido na atividade neuroprotetora da kava, nesse estudo observou-se alterações no imunoconteúdo e fosforilação da proteína de choque térmico HSP27 no modelo de culturas organotípicas submetidas à POG. Os experimentos envolvendo essa verificação ocorreram logo após o registro fotográfico da marcação com iodeto de propídeo. Isso foi possível pois a marcação com tal corante não interfere com o sistema fosforilante de células intactas (TAVARES *et al.*, 2001). As funções e envolvimento na isquemia e POG, referentes a essa proteína foram revisados na introdução.

As culturas expostas à POG tratadas com kava apresentaram um aumento significativo no imunoconteúdo da HSP27 (figura 7a). Esse aumento é acompanhado de um aumento da fosforilação, uma vez que a percentagem de proteína fosforilada se mantém igual (figura 7b). A kava mostrou modificar o comportamento da proteína assim como o DMSO.

Os resultados nos mostraram que temos um aumento global tanto no “pool” de HSP27 desfosforilada quanto no “pool” de HSP27 fosforilada, representado pelo aumento do imunoconteúdo e manutenção da percentagem de proteína fosforilada. Quando fosforilada a HSP27 pode estabilizar os filamentos de actina, acelerando a reorganização dos filamentos depois do estresse (SCHNEIDER *et al.*, 1998).

A desfosforilação da HSP27 leva à formação de oligômeros que podem estar atuando como chaperona, protegendo outras proteínas da desnaturação. Esses oligômeros podem também atuar bloqueando a ativação de caspases pelo citocromo *c* (BRUEY *et al.*, 2000). Essa é uma característica da HSP27 a ser considerada: sua capacidade de bloquear a apoptose. A expressão aumentada de HSP27 protege as células neurais da falta de fatores tróficos (WAGSTAFF *et al.*, 1999), inibe a ativação de caspases (GARRIDO *et al.*, 1999; BRUEY *et al.*, 2000; PANDEY *et al.*, 2000) e quando fosforilada, a HSP27 pode bloquear a apoptose induzida pelo receptor Fas (CHARETTE & LANDRY, 2000; CHARETTE *et al.*, 2000). Sabe-se que a apoptose é um dos processos que leva a morte neuronal na região CA1 em consequência da privação de oxigênio e glicose, portanto, os resultados deste trabalho podem sugerir que a HSP27 esteja de alguma forma inibindo a apoptose, auxiliando na sobrevivência celular (RAY *et al.*, 2000).

Observou-se também alterações na Oxido Nítrico Sintase induzível (iNOS ou NOS2). Em muitos casos tanto um papel deletério quanto um papel protetor têm sido descrito para a produção de óxido nítrico (ON) pela iNOS (HENECA & FEINSTEIN, 2001). O ON pode promover apoptose (pró-apoptótico) em determinados tipos celulares, e pode inibir a apoptose (antiapoptótico) em outros (CHUNG, *et al.* 2001). Esta complexidade é consequência da razão de produção e interação do ON com moléculas biológicas tais como tióis, proteínas, ferro e espécies reativas de oxigênio (CHUNG, *et al.* 2001). A contínua e duradoura produção de ON representa uma modulação pró-apoptótica por ativar caspases através da liberação mitocondrial de citocromo *c* no citosol, super regulação da expressão da proteína p53, ativação de JNK/SAPK, e alteração na expressão de proteínas associadas a a apoptose incluindo a família da proteína Bcl-2 (CHUNG, *et al.*, 2001). Concentrações baixas ou fisiológicas de ON previnem as células da apoptose induzida por privação de fatores tróficos, Fas, TNF α e lipopolisacarídeos. Os mecanismos apoptóticos podem ser entendidos via expressão de genes de proteção como proteínas de choque térmico (HSPs), e uma fonte de inibição direta da família das caspases por S-nitrosilação de uma cisteína tiólica (CHUNG, *et al.*, 2001). Uma superprodução de ON derivada da excessiva estimulação da iNOS neuronal está bem demonstrado estar ligado a ação de aminoácidos excitatórios e subsequente morte celular

(DAWSON *et al.*, 1991) Dados em camundongos com deficiência de iNOS demonstraram que esses são mais resistentes ao dano isquêmico (HUANG, *et al.*,1994) O aumento nos níveis de ON são bem demonstrados após isquemia e reperfusão (MALINSKI *et al.*, 1993). O ON também é sintetizado pela isoforma induzida pela alta produção de sinais da NOS (iNOS ou NOS tipo 2). Esta isoforma é dependente de cálcio e calmodulina e é expressa após exposição a citocinas e/ou lipopolissacarídeos (LPS) (KNOWLES & MONCADA, 1994). Este tipo de isoenzima media a citotoxicidade em muitos sistemas celulares (MONCADA, *et al.*,1991; GROSS & WOLIN, 1995). O desarranjo metabólico ocorre durante a isquemia e subsequente reperfusão, resultando na expressão e liberação de diversas citocinas como fator de necrose tumoral-CL e citocinas pró-inflamatórias (ROTHWELL & RELTON, 1993), importantes mediadores da ativação da expressão da iNOS em diferentes tipos celulares, incluindo as do SNC (GALEA *et al.*,1992; SIMMONS & MURPHY, 1992; SIMMONS & MURPHY, 1993). Portanto, é possível que a expressão da iNOS após a isquemia contribua para o dano celular associado a essa condição; tanto as células gliais como os neurônios expressam iNOS após a POG (MORO *et al.*,1998).

O tratamento com kava levou à diminuição do imunoconteúdo da iNOS tanto nas fatias controles quanto nas fatias lesionadas; as fatias lesionadas tratadas com kava apresentaram uma diminuição significativa no imunoconteúdo da iNOS na ordem de 35,5 % em relação às fatias lesionadas tratadas com DMSO (figura 9). Estes dados podem sugerir que um dos mecanismos da neuroproteção observada para o extrato de kava possa envolver a proteína iNOS.

6. Conclusões

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

1. As culturas organotípicas de hipocampo de ratos expostas à POG por 40 minutos, tratadas com extrato de kava 7 μ g/ml, apresentaram uma diminuição do dano celular na região CA1 (vulnerável) em torno de 58% em relação às culturas tratadas apenas com DMSO expostas à POG.
2. As fatias hipocampais expostas à POG de 60 minutos, tratadas com extrato de kava 7 μ g/ml, apresentaram um aumento na viabilidade mitocondrial em torno de 15% em relação às fatias tratadas apenas com DMSO expostas à POG.
3. As culturas expostas à POG tratadas com kava apresentaram um aumento significativo no imunoconteúdo da proteína HSP27, sendo esse aumento acompanhado de um aumento da fosforilação, uma vez que a percentagem de proteína fosforilada se mantém igual.
4. O tratamento com kava diminui o imunoconteúdo da iNOS nas fatias lesionadas. As fatias lesionadas tratadas com kava apresentaram uma diminuição significativa no imunoconteúdo da iNOS na ordem de 35,5 % em relação às fatias lesionadas tratadas com DMSO, sugerindo que a iNOS possa estar envolvida no mecanismo de neuroproteção observado pelo extrato de kava.

7. Perspectivas

Com os resultados obtidos no presente trabalho, vamos continuar investigando os mecanismos moleculares envolvidos na atividade neuroprotetora do extrato de kava. Já estão programados experimentos para analisar a via de sinalização celular que envolve a proteína AKT, sendo essa uma via envolvida na apoptose, bem como investigar possíveis propriedades antioxidantes do extrato.

8. Referências Bibliográficas

- ABDEL-HAMID, K.M. & TYMIANSKI, M. Mechanisms and effects of intracellular calcium buffering on neuronal survival in organotypic hippocampal cultures exposed to anoxia/aglicemia or to excitotoxins. **J. Neurosci.** v. 17, p. 3538-3553, 1997.
- ALLINGER, N.L.; CAVA, M.P.; DE JONGH, D.C.; JHONSON, C.R.; LEBEL, N.A.; STEVENS, C.L. **Química Orgânica**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1978.
- BACKHAUß, C.; KRIEGLSTEIN, J. Extract of kava (*Piper methysticum*) and its methysticin constituents protect brain tissue against ischemic damage in rodents. **Eur. J. of Pharmacol.** v. 215, p. 265-269, 1992.
- BALDO, B.A. Protein blotting: research, applications and its place in protein separation methodology. **Adv.s in Electrop.** ed. by Chranbach, A., Dunn, M. J. and Radola, B. J., v. 7, p. 407-478, VCH, 1994.
- BAUM, S.S.; HILL, R.; ROMMELSPACHER, H. Effect of kava extract and individual kavapyrones on neurotransmitter levels in the nucleus accumbens of rats. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.** v. 22, p. 1105-1120, 1998.
- BENVENISTE, H.; DREJER, J.; SCHOUSBOE, A.; DIEMER, N.H. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. **J. Neurosch.** v. 43, p. 1369, 1984.
- BERNAUDIN, M.; NOUVELOT, A.; MACKENZIE, E.T; PETIT, E. Selective neuronal vulnerability and specific glial reactions in hippocampal and neocortical organotypic cultures submitted to ischemia. **Exp. Neurol.** v. 150, p. 30-39, 1998.
- BLONQVIST, P. & WIELOCH, T. Ischemic brain damage in rats following cardiac arrest using a long-term recovery model. **J. Cereb. Blood Flow Metabolism.** v. 5, p. 420-431, 1985.
- BODE-GREUEL, K.M.; KLISCH, J.; HORVATH, E.; GLASER, T.; TRABER, J. Serotonin (5HT)1A receptor antagonists as neuroprotective agents in cerebral ischemia. **Pharmacol. Cereb. Ischem.** eds. J. Krieglstein and H. Oberpichler (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart), p. 485, 1990.
- BOONEN, G. & HABERLEIN, H. Influence of genuine kavapyrone enantiomers on the GABA_A binding site. **Planta Méd.** v. 64. p. 504-506, 1998.
- BRAR, B.K.; STEPHANOU, A.; WAGSTAFF, M.J.D.; COFFIN, R.S.; MARBER, M.S., ENGELMANN, G. & LATCHMAN, D. S. Heat shock proteins delivered with a virus vector can protect cardiac cells against apoptosis as well as against thermal or hypoxic stress. **J. Mol. Cell. Cardiol.** v. 31, p. 135-146, 1999.

- BREDER, J.; SABELHAUS, C.; OPITZ, T.; REYMAN, K.; SCHRÖDER, U. Inhibition of different pathways influencing Na⁺ homeostasis protects organotypic hippocampal slice cultures from hypoxic/hypoglycemic injury. **Neuropharmacol.** v. 39, p. 1779-1787, 2000.
- BRUCE, A.J.; SAKHI, S.; SCHREIBER, S.S.; BAUDRY, M. Development of kainic acid and N-methyl-D-aspartic acid toxicity in organotypic hippocampal cultures. **Exp Neurol.** v.132, p. 209-219, 1995.
- BRUEY, J.M.; DUCASSE, C.; BONNIAUD, P.; RAVAGNAN, L., SUSIN, S.A., DIAZ-LATOUD, C.; GURBUXANI, S.; ARRIGO, A.P; KROEMER, G., SOLARY, E.; GARRIDO, C. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. **Nat. Cell Biol.** v. 2, p. 645-652, 2000.
- BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia.** Zaragoza: Acribia, 1991.
- BUCHS, P. A.; STOPPINI, L.; MULLER, D. Structural modifications associated with synaptic development in area CA1 of rat hippocampal organotypic cultures. **Dev. Brain. Res.** v. 71, n.1, p. 81-91, 1993.
- CÁRDENAS, A.; MORO, M.A.; HURTADO, O.; LEZA, J.C.; LORENZO, P.; CASTRILLO, A.; BODELÓN, O.G.; BOSCA, O.G.; LIZASOAIN, I. Implication of glutamate in the expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. **J. Neurochem.** v. 74, p. 2041-2048, 2000.
- CHAN, P.H. Role of oxidants in ischemic brain damage. **Strok.** v. 27, n.6, p. 1124-1129, 1996.
- CHARETTE, S. & LANDRY, J. The interaction of HSP27 with Daxx identifies a potential regulatory role of HSP27 in Fas-induced apoptosis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 926, p. 126-131, 2000.
- CHARETTE, S.J.; LAVOIE, J.; LAMBERT H.; LANDRY J. Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. **Mol. Cell. Biol.** v. 20, p. 7602-7612, 2000.
- CHAUFOUR, S.; MEHLEN, P.; ARRIGO, A.P. Transient accumulation, phosphorylation and changes in the oligomerization of Hsp27 during retinoic acid-induced differentiation of HL-60 cells: possible role in the control of cellular growth and differentiation. **Cell. Stress Chap.** v. 1, p. 225-235, 1996.
- CHOI, D.; ROTHMAN, S.M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. **Ann. Rev. Neurosci.** v.13, p. 171-182, 1990

- CHOI, D.W. Calcium: still center-stage in hypoxic/ischemic neuronal death. **TINS**. v. 18, P. 58-60, 1995.
- CHUNG, T.; PAE, H.; CHOI, B.; BILLAR, T.R.; KIM, Y. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. **Bioch. Biophys. Res. Comunic.** v. 282, p. 1075-1079, 2001.
- CIMAROSTI, H.; RODNIGHT, R.; TAVARES, A.; PAIVA, R.; VALENTIM, L.; ROCHA, E.; SALBEGO C. G. An investigation of the neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. **Neurosci. Lett.** v. 23, p. 33-36, 2001.
- COOPER, L.F.; UOSHIMA, K.; GUO, Z. Transcriptional regulation involving the intronic heat shock element of the rat hsp27 gene. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1490, p. 348-354, 2000.
- DAVIES, L.P.; DREW, C.A.; DUFFIELD, P.; JOHNSTON, G.A.R.; JAMIESON, D.D. Kava pyrones and resin: studies on GABA_A, GABA_B and benzodiazepine binding sites in rodent brain. **Pharmacol. & Toxicol.** v. 71, p. 120-126, 1992.
- DAVIS, J. & ANTONAWICH, F. Role of apoptotic proteins in ischemic hippocampal damage. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 10. p.309-320, 1991.
- DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M.; LONDON, E.D.; BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 88, p. 6368-6371, 1991.
- DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Nitric oxide neurotoxicity. **J. Chem. Neuroanat.** v. 10(3-4), p. 179-190, 1996.
- DE ALBA, J.; CÁRDENAS, A.; MORO, M.A.; LEZA, J.C.; LORENZO, P.; LIZASOAIN, I. Use of brain slices in the study of pathogenic role of inducible nitric oxide synthase in cerebral ischemia-reperfusion. **Gen. Pharmacol.** v. 32. p. 577-581, 1998.
- DIEMER, N. H.; SIEMKOWICZ, E. Regional neurone damage after cerebral ischemia in the normo- and hipoglycaemic rat. **Neuropathol. Apli. Neurobiol.** v. 7, p. 217-227, 1981.
- DINH, L.D.; SIMMEN, U.; BUETER, K.B.; LUNDSTROM, K.; SCHAFFNER, W. Interaction of various *Piper methysticum* cultivars with CNS receptors in vitro. **Planta Méd.** v. 67, p. 306-311, 2001.
- DUKE, J.A. **Handbook of Phytochemical Constituents of Gras Herbs and other Economic Plants.** Boca Raton: CRC press, 1992.

- EHRNSPERGER, M.; GRABER, S.; GAESTEL, M.; BUCHNER J. Binding of non-native protein to HSP25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. **EMBO J.** v. 16, p. 221-229, 1997.
- FAROOQUI, A.A.; HAUN, S.E.; HORROCKS, L.A. Ischemia and hypoxia. **Basic Neurochemistry.** 5.ed. New York: Raven Press, 1994.
- FERRER, I.; SORIANO, M.A.; VIDAL, A.; PLANAS, A. M. Survival of parvalbumin-immunoreactive neurons in the gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia does not depend on HSP-70 protein induction. **Brain Res.** v. 692, p. 41-46, 1995.
- FETROW, C.W.; AVILA, J.R. **The Complete Guide to Herbal Medicines.** Springhouse: Springhouse, PA., 1999.
- FOSBERG, F.R.; SACCHET, M.H. Flora of Micronesia, 2: casuarinacea, Piperaceae and myriaceae. **Smith. Con. Botan.** v. 24, p. 1-28, 1975.
- GÄHWILER, B.H.; CAPOGNA, M.; DEBANNE, D.; MCKINNEY, R.A.; THOMPSON S.M. Organotypic slice cultures: a technique has come of age. **TINS.** v. 20, p. 471-477, 1997.
- GÄHWILER, B.H. Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. **J. Neurosci. Methods.** v.4, p.329-42. 1981.
- GALEA, E.; FEINSTEIN, D.L.; REIS, D.J. Induction of calcium independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 89, p. 10945-10949, 1992.
- GARRIDO, C.; BRUEY, J.-M.; FROMENTIN, A.; HAMMANN, A., ARRIGO, A. P.; SOLARY, E. HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. **FASEB J.** v. 13, p. 2061-2070, 1999.
- GARRIDO, C.; OTTAVI, P.; FROMENTIN, A.; HAMMANN, A.; ARRIGO, A. P.; CHAUFFERT, B.; MEHLEN, P. HSP-27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs. **Cancer Res.** v. 57, p. 2661-2667, 1997.
- GLEITZ, J.; BEILE, A.; PETERS, T. (\pm) - kavain inhibits the Veratadine- and KCl-induced increase intracellular Ca^{+2} and glutamate-release of rat cerebrocortical synaptosomes. **Neuropharmacol.** v. 35, n^o. 2, p. 179-186, 1995.
- GLEITZ, J.; BEILE, A.; WILKENS, P.; AMERI, A.; PETERS, T. Antithrombotic action of the kava pyrone (+) – kavain prepared from *Piper methysticum* on human platelets. **Planta Méd.** v. 63, p. 27-30, 1997.

- GLEITZ, J.; FRIESE, J.; BEILE, A.; AMERI, A.; PETERS, T. Anticonvulsive action of (\pm) kavain estimated from properties on stimulated synaptosomes and Na⁺ channel receptor sites. **Eur.J. Pharm.** v. 315, p. 89-97, 1996.
- GOLDBERG, M.P.; VISESKUL, V.; CHOI, D.W. Phencyclidine receptor ligands attenuate cortical neuronal injury after N-methyl-D-aspartate exposure or hipoxia. **J. Farmacol. Exp. Therapy.** v. 245, p. 1081,1988.
- GOWER, H. & RODNIGHT, R. Intrinsic protein phosphorylation in synaptic plasma membrane fragments from the rat. General characteristics and migration behaviour on polyacrilamide gels of the main phosphate acceptors. **Bioch. Biophys. Acta.** v. 716, p. 45-52, 1982.
- GOWER, H.; RODNIGHT, R.; BRAMMER, M.J. Ca²⁺ sensitivity of Ca²⁺-dependent protein kinase activities toward intrinsic proteins in synaptosomal membrane fragments from rat cerebral tissue. **J. Neurochem.** v. 46 (2), p. 440-447, 1986.
- GREINER, C.; SCHMIDINGER, A.; HÜLSMANN, S.; MOSKOPP, D.; WOLFER, J.; KOHLING, R.; SPECKMANN, E.; WASSMANN, H. Acute protective effect of nimodipine and dimethyl sulfoxide against hypoxic and ischemic damage in brain slices. **Brain Res.** v. 887, p. 316–322, 2000.
- GROS, E.G.; POMILIO, A.B.; SELDES, A.M.; BURTON, G. **Introduccion al Estudios de Los Productos Naturales.** Washington: Secretaria General de la Organizacion de los Estados Americanos, 1985.
- GROSS, S.S. & WOLIN, M.S. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. **Annu. Rev. Physiol.** v. 57, p. 737-769, 1995.
- GRUNZE, H.; LANGOSCH, J.; SCHIRRMACHER, K.; BINGMANN, D.; VON WEGERER, J.; WALDEN, J. Kava pirones exert effects on neuronal transmission and transmembrane cation currents similar to established mood stabilizers – a review. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.** n. 25, v. 8, p. 1555-1570, 2001.
- GUO Z. & COOPER F. L. An N-terminal 33-amino-acid-deletion variant of HSP25 retains oligomerization and functional properties. **Bioch. Biophys. Res. Comm.** v. 270, p. 183-189, 2000.
- HAYES, B.A. & BALSTER, R.L. Anticonvulsant proprieties of phencyclidine-like drugs in mice. **Eur. J.Farmacology.** v. 117, p. 121, 1985.
- HE, X.; LIN, L.; LIAN, L. Electrospray high performance liquid chromatography- mass spectrometry in phytochemical analysis of kava (*Piper methysticum*) extract. **Planta Méd.** v. 63, p. 70-74, 1997.

- HENECA, M.T. & FEINSTEIN, D.L. Expression and function of inducible nitric oxide synthase in neurons. **J. Neuroimmunol.** v. 114, p. 8-18, 2001.
- HOLZHUTTER, H.G.; WIESNER, R.; RATHMANN, J.; STOSSER, R.; KUHN, H. A kinetic model for the interaction of nitric oxide with a mammalian lipoxygenase. **Eur. J. Biochem.** v. 1, n.º 245(3), p. 608-16, 1997.
- HSU, S.S.F.; MENO, J.R.; GRONKA, R.; KUSHMERICK, M.; WINN, H. R. Moderate hyperglycemia affects ischemic brain ATP levels but not intracellular pH. **Am. J. Physiol.** v. 266 (Heart Circ. Physiol. 35), p. H258-H262, 1994.
- HUANG, Z.; HUANG, H.L., PANAHIAN, N.; DALKARA, T.; FISHMAN, M.C.; MOSKOWITZ, M.A. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. **Sci.** v. 265, p. 1883-1885, 1994.
- HÜLSMANN, S.; GREINER, C.; KOHLING, R.; WOLFER, J.; MOSKOPP, D.; RIEMANN, B.; LUCKE, A.; WASSMANN, H.; SPECKMANN, E. Dimethyl sulfoxide increases latency of anoxic terminal negativity in hippocampal slices of guinea pig in vitro. **Neurosci. Lett.** v. 261, p. 1-4, 1999.
- HUSSEIN, D.A.; LEVESQUE, J. Selection of kavalactones by complexation of kava extracts with cyclodextrins. **Drug Devel. Indust. Pharmacy**, v. 23, n. 12, p. 1223-1226, 1997.
- IADECOLA, C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. **TINS.** v. 20, p. 132-139, 1997.
- JAKOB, U.; GAESTEL, M.; ENGEL, K.; BUCHNER J. Small heat shock proteins are molecular chaperones. **J. Biol. Chem.** v. 268, p. 1517-1520, 1993.
- JAMIESON, D.D.; DUFFIELD, P.H.; CHENG, D.; DUFFIELD, A.M. Comparison of the Central Nervous System activity of the aqueous and lipid extract of kava (*Piper methysticum*). **Arch.s Int.l Pharmacodynamic.** v. 301, p. 66-68, 1989.
- JUSSOFIE, A.; SCHMIIZ, A.; HIEMKE, C. Kavapyrone enriched extract from *Piper methysticum* as modulator of the GABA binding site in different regions of rat brain. **Psichopharmacol.** v. 116, p. 469-474, 1994.
- KATO, K.; ITO, H.; IWAMOTO, I.; IIDA, K.; INAGUMA, Y. Protein kinase inhibitors can suppress stress-induced dissociation of Hsp27. **Cell Stress Chap.** v. 6, p. 16-20, 2001.
- KIRINO, T. & SANO, K. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. **Acta Neuropathol.** v.62, p. 201-208, 1984.
- KIRINO, T.; TAMURA, A.; SANO, K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia-reversible and irreversible types of ischemic cell damage. **Prog. Brain Res.** v. 63, p. 39-58, 1985.

- KNOWLES, R.G. & MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem. J.** v. 298, p. 249-258, 1994.
- KORNHUBER, J.; BORMANN, J.; RETZ, W.; HÜBERS, M.; RIEDERER, R. Memantine displaces [³H] MK-801 at therapeutic concentrations in postmortem human frontal cortex. **Eur. J. Pharmacol.** v. 166, p. 589, 1989.
- KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J.H.** Química Farmacêutica. **Rio de Janeiro: Guanabara, 1988.**
- LAAKE, J.H.; HAUG, F.M.; WIELOCH, T.; OTTERSEN, O.P. A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence. **Brain Res. Prot.** v. 4, p. 173-184, 1999.
- LAMBERT, H.; CHARETTE, S.J.; BERNIER, A.F.; GUIMOND A.; LANDRY, J. HSP27 Multimerization Mediated by Phosphorylation-sensitive Intermolecular Interactions at the Amino Terminus. **J. Biol. Chem.** v. 274, p. 9378-9385, 1999.
- LANDRY, J.; CHRÉTIEN, P.; LAMBERT, L.; HICKEY, E.; WEBER, L. A. Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. **J. Cell. Biol.** v. 109, p. 7-15, 1989.
- LARSEN, J.K.; YAMBOLIEV, I.A.; WEBER, L.A.; GERTHOFFER, W.T. Phosphorylation of the 27-kDa heat shock protein via p38 MAP kinase and MAPKAP kinase in smooth muscle. **Am. J. Physiol.** v. 273, p. L930-L940, 1997.
- LAVOIE, J. N.; GINGRAS-BRETON, G.; TANGUAY, R. M.; LANDRY, J. Induction of chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock: HSP27 stabilization of microfilament organization. **J. Biol. Chem.** v. 268, p. 3420-3429, 1993.
- LAVOIE, J.N.; LAMBERT, H.; HICKEY, E.; WEBER, L.A.; LANDRY, J. Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein27. **Mol. Cell. Biol.** v. 15, p. 505-516, 1995.
- LEE, G.J.; ROSEMAN, AM., SAIBIL, H.R.; VIÉRLING, E. A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding competent state. **EMBO J.** v. 16, p. 659-671, 1997.
- LEMAY, D.R.; GEHUA, L.; ZELENOCK, G.B.; D'ALECY, L.G. Insulin administration protects neurologic function in cerebral ischemia in rats. **Stroke.** v. 19, p. 1411-1419, 1988.
- LEROUX, M.R.; MELKI, R.; GORDON, B.; BATELIER, G.; CANDIDO, P.M. Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and

- interaction with unfolded polypeptides. **J. Biol. Chem.** v. 272, p. 24646-24656, 1997.
- LJUNGGREN, B.; RATCHESON, R.A.; SIESJO, B.K. **Cerebral metabolic state following complete compression ischemia.** 1974.
- LOKTIONOVA, S.A. & KABAKOV, A.E. Protein phosphatase inhibitors and heat preconditioning prevent Hsp27 dephosphorylation, F-actin disruption and deterioration of morphology in ATP-depleted endothelial cells. **FEBS Lett.** v. 433, p. 294-300, 1998.
- LOKTIONOVA, S.A.; ILYINSKAYA, O.P.; KABAKOV, A.E. Early and delayed tolerance to simulated ischemia in heat-preconditioned endothelial cells: a role for HSP27. **Am. J. Physiol.** v. 275, p. 2147-2158, 1998.
- LOUZADA, C.S. **A química medicinal aplicada ao estudo da kava-kava.** Trabalho de Conclusão de Curso da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.
- MACKLIS, J. D. & MADISON, R. D. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: A fluorescence scale of membrane integrity. **J. Neurosci. Methods.** v. 31, p. 43-46, 1990.
- MAIESE, K.; BONIECE, I.R.; SKURA, T.K.; WAGNER, J.A.; Protein kinases modulate the sensitivity of hippocampal neurons to nitric oxide toxicity and anoxia. **J. Neurosci. Res.** v. 1, n.º 36(1), p. 77-87, 1993.
- MALINSKI, T.; BAILEY, F.; ZHANG, Z.G.; CHOPP, M. Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** v. 13, p. 355-8, 1993.
- MEHLEN, P.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; ARRIGO, A. P. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis heat shock protein 27 blocks Fas/Apo-1- and staurosporine-induced cell death. **J. Biol. Chem.** v. 271, n. 28, p.16510-16514, 1996.
- MELDRUM, B.S. Excitatory amino acids antagonists as anticonvulsants. **Clinical Neuropharmacol.** v. 9, p. S503, 1986.
- MELDRUM, B.S.; EVANS, M.; GRIFFITHS, T.; SIMON, R. Ischemic brain damage: the role of excitatory activity and of calcium entry. **British J. Anaesth.** v. 57, p.44, 1985.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. **Pharmacol. Rev.** v. 43, p. 109-142, 1991.

- MORO, M.A; DE ALBA, J; LEZA, J.C; LORENZO, P; FERNANDEZ, A.P; BENTURA, M.L; BOSCA, L; RODRIGO, J; LIZASOAIN, I. Neuronal expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. **Eur. J. Neurosci.** v. 10, p. 445-456, 1998.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunolog. Methods.** v. 65, p.55-63, 1983.
- MULHOLLAND, P.J. & PRENDERGAST, M.A. Post-insult exposure to (\pm) kavain potentiates *N*-methyl-D-aspartate toxicity in the developing hippocampus. **Brain Res.** n.26, v. 945(1), p.106-13, 2002.
- NAKAYAMA, R.; YANO, T.; USHIJIMA, K.; ABE, E.; TERASAKI, H. Effects of dantrolene on extracellular glutamate concentration and neuronal death in the rat hippocampal ca1 region subjected to transient ischemia. **Anesth.** v. 96, n.3, p. 705-710, 2002.
- NEW, L.; JIANG, Y.; ZHAO, M.; LIU, K.; ZHU, W.; FLOOD, L. J.; KATO, Y.; PARRY, G. C.N.; HAN, J. PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38MAP kinase. **EMBO J.** v. 17, p. 3372-3384, 1998.
- NEWELL, D.W.; BARTH, A.; MALOUF A.T. Glycine site NMDA receptor antagonists provide protection against ischemic-induced neuronal damage in hippocampal slice cultures. **Brain Res.** v. 675, p. 38-44, 1995.
- NORABERG, J.; KRISTENSEN, B.W.; ZIMMER, J. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. **Brain Res. Prot.** v. 3, p. 278-290, 1999.
- OGATA, K. Immunovisualization with peroxidase labeled anti-antibodies, the peroxidase anti-peroxidase, and biotin-streptavidin methods. **Handbook of immunoblotting of proteins.** ed. by Bjerrum, O. J. and Heegard, N. H., v. 1, p. 167-176, CRC, Boca Raton, Florida, 1988.
- PANDEY, P.; FARBER, R.; NAKAZAWA, A.; KUMAR, S.; BHART, I A.; NALIN, C.; WEICHSELBAUM, R.; KUFEL, D.; KHARBANDA, S. HSP27 functions as negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. **Oncogen.** v. 19, p. 1975-1981, 2000.
- PETERSON, G.L. Simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analyt. Biochem.** v. 83, p. 346-356, 1977.
- PHILLIS, J. W.; O'REGAN, M. H.; ESTEVEZ, A. Y.; SONG, D.; VANDERHEIDE, S. J. Cerebral energy metabolism during severe ischemia of varying duration and following reperfusion. **J. Neuroch.** v. 67, p. 1525-1531, 1996.

- PLUMIER, J.C.L.; ARMSTRONG, J.N.; LANDRY, J.; BABITY, J.M.; ROBERTSON, H.A.; CURRIE, R.W. Expression of the 27,000 mol. wt heat shock protein following kainic acid-induced status epilepticus in the rat. **Neurosc.** v. 75, p. 849-856, 1996.
- PLUMIER, J.C.; DAVID, J.C.; ROBERTSON, H.A.; CURRIE, R.W. Cortical application of potassium chloride induces the low molecular weight heat shock protein (HSP27) in astrocytes. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** v. 17, n. 7, p. 781-790, 1997.
- PRICE, D. New order from neurological disordersn. **Nat.** v. 399: A3-A5, 1999.
- PRINGLE, A.K.; IANNOTTI, F.; WILDE, G.J.C.; CHAD, J.E.; SEELEY, P.J.; SUNDSTROM, L.E. Neuroprotection by both NMDA and non-NMDA receptor antagonists in in vitro ischemia. **Brain Res.** v. 755, p. 36-46, 1997.
- PULSINELLI, W.; BRIERLEY, J. B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanestheized rat. **Strok.** v. 10, p. 267-272, 1979.
- RATES, S.M.K.; SANTOS, L. *Piper methysticum* Forst (Piperaceae): Um novo ansiolítico? **Rev. Bras. Farm.** v. 78, n. 2, p. 44-48, 1997.
- RAY, A.M.; OWEN, D.E.; EVANS, M.L.; DAVIS, J.B.; BENHAM, C.D. Caspase inhibitors are functionally neuroprotective against oxygen glucose deprivation induced CA1 death in rat organotypic hippocampal slices. **Brain Res.** v. 867, p. 62-69, 2000.
- ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology.** 9. ed. Baltimore: William & Wilkins, 1996.
- ROGALLA, T.; EHRNSPERGER, M.; PREVILLE, X.; KOTLYAROV, A.; LUTSCH, G.; DUCASSE, C.; PAUL, C.; WIESKE, M.; ARRIGO, A.-P.; BUCHNER, J.; GAESTEL, M. Regulation of hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor a by phosphorylation. **J. Biol. Chem.** v. 274, n. 27, p. 18947-18956, 1999.
- ROTHWELL, N.J. & RELTON, J.K. Involvement of cytokines in acute neurodegeneration in the CNS. **Neurosci. Biobehavioral Rev.** v. 17, p. 217-227, 1993.
- SALBEGO, C. & RODNIGHT, R. A developmental study of protein phosphorylating systems stimulated by phorbol dibutyrate in micro-slices of rat brain. **Neuroch. Int.** v. 28, p. 431-438, 1996.
- SCHELOSKY, L.; RAFFAUF, C.; JENDROSKA, K.; POEWE, W. Kava and dopamine antagonism. **J. Neurol. Neurosburg Psychiat.** v. 58, n. 5, p. 639-640, 1995.
- SCHIRRMACHER, K.; BUSSELBERG, D.; LANGOSCH, J.M.; WALDEM, J.; WINTER, U.; BINGMANN, D. Effects of (\pm) - kavain on voltage-activade inward currents of

- dorsal root ganglion cells from neonatal rats. **Eur. Neuropsychopharmacol.** p. 171-176, 1999.
- SCHMIDT, N & FERGER, B. Neuroprotective effects of (\pm) – kavain in the MPTP mouse model of Parkinson`s disease. **Synap.** v. 40, n^o. 1, p. 47-54, 2001.
- SCHNEIDER, G. B.; HAMANO, H.; COOPER, L. F. In vivo evaluation of HSP27 as an inhibitor of actin polymerization: HSP27 limits actin stress fibers and focal adhesion formation after heat shock. **J. Cell. Physiol.** v. 177, p. 575-584, 1998.
- SCHREIBER, S. & BAUDRY, M. Selective neuronal vulnerability in the hippocampus – A role for gene expression? **TINS.** v.18, p.446-451, 1995.
- SEITZ, U.; SCHULE, A.; GLEITZ, J. [³H] - Monoamine uptake inhibition properties of kava pyrones. **Planta méd.** v. 63, p. 548-549, 1997.
- SIMMONS, M.L. & MURPHY, S. Induction of nitric oxide synthase in glial cells. **J. Neurochem.** v. 59, p. 897-905, 1992.
- SIMMONS, M.L. & MURPHY, S. Cytokines regulate L arginine dependent cyclic GMP production in rat glial cells. **Eur. J. Neurosci.** v. 5, p. 825-831, 1993.
- SIMÕES, CM.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 2. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. Da UFSC, 2000.
- SINGH, Y.N. Kava: an overview. **J. Ethnopharmacol.** v. 37, n. 1, p. 13-45, 1992.
- SMITH, M.; BENDEK, G.; DAHLGREN, N.; ROSÉN, I.; WIELOCH, T.; SIESJO, B.K. Models for studying long term recovery following forebrain ischemia in the rat. A 2-vessel occlusion model. **Acta Neurol. Scandinavia.** v. 69, p. 385-401, 1984.
- STOKOE, D.; ENGEL, K.; CAMPBELL, D.G.; COHEN, P.; GAESTEL, M. Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. **FEBS lett.** v. 131, n. 3, p. 307-313, 1992.
- STOPPINI, L.; BUCHS, P.-A.; MULLER, D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. **J. Neurosc. Methods.** v. 37: p. 173-182, 1991.
- STRASSER U.; FISCHER G. Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. **J. Neurosci. Methods.** v. 57, p. 177-186, 1995.
- SUZUKI, R.; YAMAGUCHI, T L.; CHOH-LUH, L.; KLATZO, I. The effect of 5-minute ischemia in the mongoliam gerbis. II. Changes of spontaneous neuronal acvity in cerebral cortex ans CA1-sector of hippocampus. **Acta Neurophatol.** v. 60, p. 217, 1983)

SWEENEY, M.; YAGER, J.Y.; WALZ, W.; JUURLINK, B.H.J. Cellular mechanisms involved in brain ischemia. **Canadian J. Physiol. Pharmacol.** v. 73, p. 1525-1535, 1995.

SWIERKOSZ, T.A.; MITCHELL, J.A.; WARNER, T.D.; BOTTING, R.M.; VANE, J.R. Co-induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase: interactions between nitric oxide and prostanoids. **J. Pharmacol.** v. 114, n.º 7, p. 1335-42, 1995.

TASKER, R.C.; COYLE, J.T.; VORNOV, J.J. The regional vulnerability to hypoglycemia-induced neurotoxicity in organotypic hippocampal culture: protection by early tetrodotoxin or delayed MK-801. **J. Neurosci.** v. 12, p. 4298-4308, 1992.

TAVARES, A.; CIMAROSTI, H.; VALENTIM, L.; SALBEGO, C. Profile of phosphoprotein labelling in organotypic slice cultures of rat hippocampus. **Neurorep.** v. 12, p. 2705-2709, 2001.

TAYLOR, D.; OBRENOVITCH, T. P.; SYMON, L. Changes in extracellular acid-base homeostasis in cerebral ischemia. **Neuroch. Res.** v. 21, n. 9, p. 1013-1021, 1996.

TER HORT, G.J.; KORF, J. Clinical Pharmacology of Cerebral Ischemia, Totowa, New Jersey: Human Press, 1997.

VORNOV, J.; TASKER, R.; COYLE, J. Direct observation of the agonist-specific regional vulnerability to glutamate, NMDA, and Kainate neurotoxicity in organotypic hippocampal cultures. **Exp. Neurol.** v. 114, p. 11-22, 1991.

WAGSTAFF, M.J.D.; COLLAÇO-MORAES, Y.C.; SMITH, J.; BELLEROCHE, J.S.; COFFIN, R.S.; LATCHMAN, D.S. Protection of Neuronal Cells from Apoptosis by Hsp27 Delivered with a Herpes Simplex Virus-based Vector. **J. Biol. Chem.** v. 274, p. 5061-5069, 1999.

WAGSTAFF, M.J.D.; COLLAÇO-MORAES, Y.; ASPEY, B.S.; VOHN, R.S.; HARRISON, M.J.G.; LATCHMAN, D.S.; BELLEROCHE, J.S. Focal cerebral ischemia increases the levels of several classes of heat shock proteins and their corresponding mRNAs. **Mol. Brain Res.** v. 42, p. 236-244, 1996.

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

WONG, E.H.; KEMP, J.A.; PRIESTLY, T.; KNIGHT, A.R.; WOODRUFF, G.N.; IVERSEN, L.L. The anti convulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** v.83. p. 7104, 1986.