



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JÉSSICA RABELO BEZERRA

**LICOPENO PROTEGE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA
CEREBRAL FOCAL PERMANENTE DO DANO NEURONAL E DÉFICIT DE
MEMÓRIA**

FORTALEZA

2017

JÉSSICA RABELO BEZERRA

LICOPENO PROTEGE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA CEREBRAL
FOCAL PERMANENTE DO DANO NEURONAL E DEFICIT DE MEMÓRIA

Monografia submetida à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Ceará, como requisito para
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Geanne Matos de
Andrade.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B4691 Bezerra, Jéssica Rabelo.

Licopeno protege camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente do dano neuronal e déficit de memória / Jéssica Rabelo Bezerra. – 2017.
68 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade.

1. Isquemia Cerebral. 2. Licopeno. 3. Atividade Locomotora. 4. Memória. 5. Neuroproteção. I. Título.
CDD 570

JÉSSICA RABELO BEZERRA

LICOPENO PROTEGE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA CEREBRAL
FOCAL PERMANENTE DO DANO NEURONAL E DÉFICIT DE MEMÓRIA

Monografia submetida à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal do Ceará, como requisito para
obtenção do título de biólogo Bacharel em
Ciências Biológicas.

Aprovada em __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Geanne Matos de Andrade
Departamento de Medicina/FM/UFC

Prof^a. Dr^a. Ana Carla Lima Nunes
Departamento de Fisioterapia/FM/UFC

Msa. Ana Paula Fontenele Menezes Mendonça

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre me deram apoio e incentivaram meus estudos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por estarem sempre presentes na minha vida, sendo um exemplo de ética, determinação e humildade. Agradeço pelo tempo, amor, compreensão e esforços dedicados a minha formação pessoal e profissional.

À minhas irmãs, por todo amor, carinho e amizade.

Aos meus amigos, pelos bons e maus momentos compartilhados, por trazerem leveza para minha vida.

À minha orientadora professora Geanne Matos de Andrade, por quem possuo profunda admiração, por ter contribuído para a minha formação científica, por me orientar neste trabalho, pela confiança, ensinamentos, apoio e dedicação.

À professora Ana Carla e a Ana Paula, por aceitarem compor a banca examinadora desta monografia e pela contribuição na melhora deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Neurociências e Comportamento, em especial: Analu, Juliana Catharina, Carol, Thaís, Mara, Juliana Pereira, Ana Paula, Emerson, Arnaldo e Priscila, por toda a paciência, atenção, ajuda e ensinamentos.

Meu agradecimento em especial aos camundongos utilizados para a execução deste estudo, e que contribuíram com suas vidas para a realização deste trabalho. Sem eles este trabalho não seria possível de ser realizado.

Às agências financiadoras CAPES, CNPq por terem colaborado financeiramente para a realização dessa pesquisa.

Agradeço à todos aqueles que contribuíram de alguma forma para o engrandecimento deste trabalho.

À todos, minha humilde e sincera gratidão.

“A imaginação é mais importante que o conhecimento. Conhecimento auxilia por fora, mas só o amor socorre por dentro. Conhecimento vem, mas a sabedoria tarda.”

Albert Einstein

RESUMO

O acidente vascular cerebral (AVC) representa a segunda principal causa de morte e a primeira causa de invalidez no mundo. No AVC, a causa de dano neuronal se deve a uma cascata de eventos, dos quais fazem parte a excitotoxicidade, inflamação e estresse oxidativo. O licopeno é um carotenoide lipossolúvel, encontrado principalmente em vegetais da família *Solanaceae*, como o tomate, e em outras frutas como mamão, pitanga e goiaba apresentando propriedade antioxidante. O presente trabalho teve como objetivo estudar os efeitos do licopeno sobre o dano neuronal, alteração motora e déficits de memória em camundongos submetidos à isquemia cerebral por oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO). Foram utilizados camundongos *Swiss* machos (25-30g) divididos em 6 grupos: falso-operados (FO) tratados com veículo ou com licopeno (20 mg/kg) (v.o.), isquemiados (pMCAO), e isquemiados tratados com licopeno nas doses de 2, 10 e 20 mg/kg (v.o.). Os animais foram tratados 1 hora após a cirurgia e diariamente até os testes de comportamento. Após 24 horas da cirurgia, foi realizada a avaliação neurológica e a coloração com Cloreto de 2,3-trifeniltetrazol (TTC). Os testes comportamentais de avaliação da atividade locomotora, avaliação das memórias de trabalho e aversiva foram realizados 72 horas (3 dias) após a cirurgia. Para a análise estatística, foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os animais isquemiados apresentaram percentagens de áreas isquêmicas e déficit neurológico significativamente maior. Os animais tratados com o licopeno apresentaram uma percentagem de área isquêmica significativamente menor do que os isquemiados, bem como menor déficit neurológico. O licopeno também foi capaz de diminuir significativamente os déficits de atividade locomotora e de memória aversiva. Os resultados obtidos demonstram que o licopeno possui atividade neuroprotetora contra os efeitos da isquemia cerebral, provavelmente devido a sua atividade antiinflamatória e antioxidante. Porém mais estudos são necessários para elucidar os possíveis mecanismos envolvidos nesta neuroproteção.

Palavras-chave: Isquemia Cerebral. Licopeno. Atividade Locomotora. Memória. Neuroproteção.

ABSTRACT

Stroke is the second cause of death and the first cause of disability worldwide. Stroke, is characterized for a cascade of events, such as excitotoxicity, inflammation and oxidative stress causing neuronal damage. Lycopene is a liposoluble carotenoid present mainly in the family Solanaceae, tomatoes, and other fruits like papaya, cherry and guava and has antioxidant properties. The aim of the present work was to evaluate the lycopene effect on neuronal damage, motor impairment and memory deficits in mice subjected to cerebral ischemia by permanent occlusion of the middle cerebral artery (pMCAO). *Swiss* male mice (25-30g) were divided into 6 groups: false-operated (FO) treated with vehicle or lycopene (20 mg/kg) (v. o.), ischemic (pMCAO), and ischemic treated with lycopene (2, 10 and 20 mg/kg v.o.). Animals were treated 1 hour after surgery and daily until behavioral testing. 24 hours after ischemic onset neurological evaluation and TTC staining was performed. Animals were subjected to behavioral tests: evaluation of locomotor activity, of working memory and aversive memory, 72 h (3 days) after stroke. Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used for statistical analysis. The ischemic animals present percentages of ischemic areas and significantly greater neurological deficit. This animals treated with lycopene had a significantly lower percentage of ischemic area than the ischemia, as well as a lower neurological deficit. Lycopene was also able to significantly decrease deficits in locomotor activity and aversive memory. Therefore, the results obtained demonstrate that lycopene has a neuroprotective activity against the effects of cerebral ischemia, due to its anti-inflammatory and antioxidant activity. However, further studies are needed to elucidate the possible mechanisms involved in neuroprotection.

Keywords: Cerebral Ischemia. Lycopene. Locomotor activity. Memory. Neuroprotection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do Polígono de Willis. Fonte: WIKIMIDIA COMMONS (2008).

Figura 2 - Vias de sinalizações envolvidas na cascata isquêmica. Fonte: Adaptado de HOSSMANN (2009).

Figura 3 - Imagem representativa da área do *core* isquêmico e penumbra. Fonte: Adaptado de DIRNAGL (1999).

Figura 4 - Taxonomia dos sistemas de memória de longa duração. Fonte: Adaptado de Squire e Knowlton (1995).

Figura 5 - Estrutura molecular do licopeno.

Figura 6 - Protocolo Experimental

Figura 7 - Ilustração da Cirurgia de indução isquêmica focal pelo método da Oclusão permanente da Artéria Cerebral Média (pMCAO): momento da aproximação do bisturi elétrico para coagulação da artéria cerebral média. Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 8 - Matriz para cortes, 2 mm. Fonte: FONTELES, 2013.

Figura 9 - Arena do Campo Aberto. Fonte: Laboratório de Neurociências e Comportamento (LNC).

Figura 10 - Labirinto em Y. Fonte: FONTELES, 2013.

Figura 11 - Aparelho de Esquiva Passiva. Fonte: Insight LT.

Figura 12 - Efeito neuroprotetor do licopeno sobre déficits neurológicos induzidos por pMCAO em camundongos.

Figura 13 - Fatias cerebrais de camundongos submetidos à pMCAO, coradas com TTC, representando o dano cerebral isquêmico, na região do córtex frontal, córtex temporal e corpo estriado.

Figura 14 - Efeito neuroprotetor do licopeno sobre dano neuronal induzida por pMCAO em camundongos.

Figura 15 - Efeito neuroprotetor do licopeno sobre déficits na atividade locomotora (número de cruzamentos) induzida por pMCAO em camundongos.

Figura 16 - Efeito neuroprotetor do licopeno sobre déficits na atividade locomotora (número de *rearings*) induzida por pMCAO em camundongos.

Figura 17 - Efeito neuroprotetor do licopeno sobre déficits de memória de trabalho induzida por pMCAO em camundongos.

Figura 18 - Efeito neuroprotetor do licopeno sobre déficits de memória de aversiva induzida por pMCAO em camundongos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela de representação dos grupos utilizados no estudo.

Tabela 2 - Escala utilizada para a avaliação neurológica, (Adaptado de GARCIA *et al.*, 1995).

LISTA DE ABREVIACOES

ATP	Adenina Trifosfato
AVC	Acidente Vascular Cerebral
AVCi	Acidente Vascular Cerebral Isquêmico
Bcl-2	Célula-B de Linfoma 2
CEPA	Comissão de tica em Pesquisa Animal
DAG	Diacilglicerol
DNA	cido Desoxirribonucleico
EROs	Espécies Reativas de Oxignio
FO	Falso Operado
GSHPX	Glutathiona Peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrognio
HIF-1 α	Fator Indutor de Hipóxia
HO ₂ ⁻	Radical Peroxila
i.p.	Intraperitoneal
ICAM-1	Moléculas de Adesão Intracelular
IL-1 β	Interleucina 1
IP ₃	Inositol trifosfato
kg	quilograma
MCA	Artéria Cerebral Média
MCAO	Oclusão da Artéria Cerebral Média
MS	Ministério da Saúde
mA	Miliampre
mg	Miligramas
NF κ B	Fator Nuclear Kappa B
NO	xido Ntrico
O ₂	Molécula de oxigênio
O ₂ ⁻	nion Superóxido
OH ⁻	Radical Hidroxil

ONOO ⁻	Peroxinitrito
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAF	Fator de Ativação Plaquetário
PLC	Fosfolipase C
pMCAO	Oclusão Permanente da Artéria Cerebral Média
r-tPA	Atividade do Plasminogênio Tecidual Recombinante
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
TC	Tomografia Computadorizada
tMCAO	Oclusão Transitória da Artéria Cerebral Média
TNF α	Fator de Necrose Tumoral
TTC	Cloreto de 2,3-trifeniltetrazol
v.o.	Via Oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1. 1 Acidente Vascular Cerebral.....	12
1. 1. 1 Definição.....	12
1. 1. 2 Classificação.....	13
1. 2 Diagnóstico e Tratamento do AVCi.....	13
1. 3 Isquemia cerebral focal: modelos experimentais <i>in vivo</i>	14
1. 4 Fisiopatologia do AVCi.....	16
1. 4. 1 Conceito de Núcleo e Penumbra.....	17
1. 4. 2 Cálcio (Ca^{2+}) e Glutamato.....	18
1. 4. 3 Inflamação.....	20
1. 4. 4 Estresse oxidativo.....	21
1. 4. 5 Necrose e apoptose.....	22
1. 5 AVC e Memória.....	24
1. 6 Carotenóides e neuroproteção.....	26
1. 6. 1 Licopeno.....	27
2 JUSTIFICATIVA.....	30
3 OBJETIVOS.....	31
3. 1 Objetivo Geral.....	31
3. 2 Objetivos Específicos.....	31
4 MATERIAL E METÓDOS.....	32
4. 1 Animais.....	32
4. 2 Drogas.....	32
4. 3 Protocolo Experimental.....	32
4. 4 Isquemia cerebral focal por oclusão permanente da artéria cerebral média (TAMURA <i>et al.</i> , 1981).....	34

4. 5 Avaliação Neurológica (GARCIA <i>et al.</i> , 1995).....	34
4. 6 Quantificação do dano isquêmico através da coloração pelo Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol (TTC) (BEDERSON, <i>et al.</i> , 1986).	37
4.7. Avaliação da Atividade Locomotora - Teste do Campo Aberto (BROADHURST, 1957).38	
4. 8 Avaliação Sobre a Memória	39
4. 8. 1 Avaliação da Memória de Trabalho - Teste do Labirinto em Y (SARTER <i>et al.</i> , 1988).39	
4. 8. 2 Avaliação da Memória Aversiva – Teste da Esquiva Passiva (GOLD, 1986).	40
4. 9 Análise estatística.....	41
5 RESULTADOS	42
5. 1 Efeito do licopeno (2, 10 e 20 mg/kg) sobre a avaliação neurologia de camundongos submetidos à pMCAO.	42
5. 2 Efeito do Licopeno (2, 10 e 20 mg/kg) sobre a extensão do dano neuronal de camundongos submetidos à pMCAO.	43
5. 3 Efeito do licopeno (20 mg/kg) sobre a atividade locomotora de camundongos submetidos à pMCAO.	44
5. 4 Efeito do licopeno (20 mg/kg) sobre a memória de trabalho de camundongos submetidos à pMCAO.	45
5. 5 Efeito do licopeno (20 mg/kg) sobre a memória aversiva de camundongos submetidos à pMCAO.	47
6 DISCUSSÃO	48
7 CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUÇÃO

1.1 Acidente Vascular Cerebral

1.1.1 Definição

O Acidente Vascular Cerebral (AVC) resulta da interrupção aguda do fluxo sanguíneo arterial levando a um quadro clínico de déficit neurológico podendo perdurar ou exceder às primeiras vinte e quatro horas do evento, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2016).

O AVC pode surgir por uma obstrução do vaso provocada por um êmbolo ou trombo (coágulo), pela formação de placas ateroscleróticas, pela ruptura da parede da artéria ou pela diminuição da perfusão sanguínea com depleção de oxigênio e glicose ao cérebro (BROUGHTON *et al.*, 2009; HOFFMANN *et al.*, 2010).

Ainda segundo a OMS, o AVC pode se apresentar com o desenvolvimento rápido de sinais clínicos de distúrbios focais ou globais da função cerebral, com sintomas que perduram por um período superior a 24 horas ou conduzem à morte, sem outra causa aparente que a de origem vascular (WHO, 2006).

O AVC representa a terceira principal causa de morte no mundo (ZHAO *et al.*, 2014) atingindo aproximadamente 16 milhões de pessoas por ano, e destas, 6 milhões chegam a óbito. No Brasil, foi a causa de 172.298 internações em 2011 e em 2010 causou a morte de 99.159 indivíduos (GARCIA, 2012; WHO, 2013). Com base em um levantamento de dados do Ministério da Saúde (MS), no Brasil, todo ano 15 mil pessoas entre 15 e 39 anos de idade sofrem um acidente vascular cerebral, representando 10% do total de casos (MS, 2016).

Os principais fatores de risco para o AVC são dislipidemia, hipertensão arterial, diabetes mellitus, sedentarismo, obesidade e tabagismo (ZHENG, 2014). O estudo dos mecanismos e de estratégias terapêuticas envolvidos no AVC é importante principalmente pelo impacto socio-econômico que pode causar ao afetar a população economicamente ativa (ZETOLA *et al.*, 2001). E apesar dos esforços das autoridades no controle da pressão arterial, combate ao tabagismo e controle dos níveis de colesterol e da diabetes, o Brasil ainda possui altas taxas de mortalidade devido ao AVC (GARRITANO *et al.*, 2012).

1. 1. 2 Classificação

O AVC é dividido em duas categorias: isquêmico e hemorrágico. O AVC isquêmico (AVCi) se dá pela interrupção de um vaso sanguíneo ascendente ao encéfalo, resultando na insuficiência de suprimento sanguíneo cerebral, que pode ser transitório (episódio isquêmico transitório) ou permanente, e se apresenta em maior prevalência, com um percentual de 85% a 90% de todos os casos (CHEN *et al.*, 2014). O AVC hemorrágico resulta do rompimento do vaso sanguíneo e extravasamento do sangue para o parênquima cerebral ou para o espaço subaracnóideo (GILGUN-SHERKI *et al.*, 2002).

1. 2 Diagnóstico e Tratamento do AVCi

O diagnóstico do AVC se fundamenta em avaliação neurológica, onde há a observação da presença de sinais clínicos característicos, como déficits motores, alterações na marcha e na fala. Entretanto, a tomografia computadorizada (TC) do crânio é o exame primordial para o desfecho do diagnóstico. A agilidade no atendimento a partir do tempo de entrada do acometido ao hospital e a realização da TC permite um prognóstico diferencial na reabilitação do paciente. Antitrombóticos, anticoagulantes e antiplaquetários são os principais medicamentos de ataque (PERSSON *et al.*, 2014).

As estratégias terapêuticas atuais visam limitar a progressão da lesão, promover neuroproteção e prevenir a recorrência do AVCi. Recentes evidências experimentais e clínicas sugerem que a persistência da isquemia cerebral por mais de 4 a 6 horas produz lesões neurológicas permanentes. Uma terapia bastante aplicada tem como base a administração do fator ativador de plasminogênio tecidual recombinante (r-tPA) que atua como trombolítico (NESBIT *et al.*, 2004). No entanto, o r-tPA tem uma janela terapêutica estreita e sua eficácia está relacionada com sua utilização nas primeiras 3 a 4,5 horas, após o aparecimento dos primeiros sintomas (HACKE *et al.*, 2004; DEL ZOPPO *et al.*, 2009; ARDLAW *et al.*, 2012). A utilização do r-tPA, após as 4,5 horas do início do ataque isquêmico, pode distorcer o efeito terapêutico esperado, sensibilizando o aumento de risco hemorrágico ao paciente. Assim, apenas cerca de 2% a 8% dos pacientes com AVC pode se beneficiar do tratamento r-tPA (KLEINDORFER *et al.*, 2008).

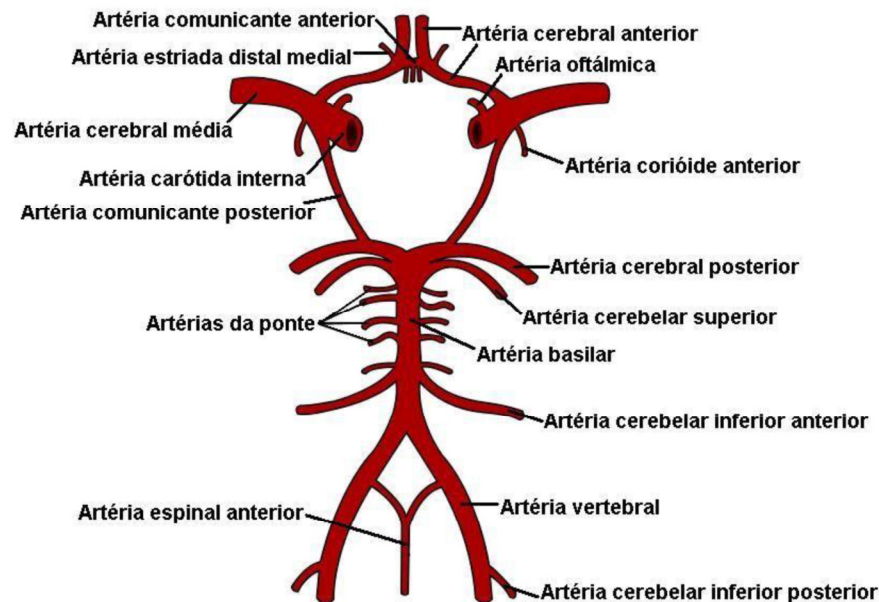
O tratamento com medicamentos antiplaquetários é utilizado em pacientes para prevenir novos episódios de AVCi. O tratamento com anticoagulantes pode ser utilizado, porém com cautela a fim de evitar a formação de hemorragia, migrando do AVCi para o hemorrágico (BRAGA, 2010). Estudos de novas terapias para o AVC sugerem que a

revascularização de vasos cerebrais durante a fase aguda do AVC isquêmico tem sido o único método provado para melhorar resultados clínicos em humanos (SMITH, 2004).

1.3 Isquemia cerebral focal: modelos experimentais *in vivo*.

O aporte sanguíneo chega ao cérebro através das artérias carótidas internas e das artérias vertebrais, que se comunicam através do polígono de Willis (Figura 1), este é uma anastomose arterial que fornece o suprimento sanguíneo para os hemisférios cerebrais, sendo formados pelas artérias cerebrais anteriores e posteriores, artérias comunicantes anteriores e posteriores e pela carótida interna. Estas artérias possuem paredes muito finas, o que as torna mais vulneráveis a hemorragias (TRAYSTMAN, 2003).

Figura 1 - Representação esquemática do Polígono de Willis



Fonte: WIKIMIDIA COMMONS (2008).

A artéria cerebral mais comumente acometida no AVCi é a artéria cerebral média (MCA), que irriga a região lateral do hemisfério e estruturas subcorticais. A oclusão da MCA resulta em redução do fluxo sanguíneo cerebral tanto no núcleo estriado quanto no córtex, mas o grau de distribuição do fluxo depende da duração e do sítio de oclusão ao longo da MCA, assim como da quantidade de fluxo sanguíneo colateral na região de oclusão (TRAYSTMAN, 2003).

A isquemia cerebral pode ser classificada quanto ao tipo de região de infarto, sendo conhecido dois tipos de modelos isquêmicos: global e focal. A isquemia global ocorre quando há falência circulatória e a isquemia focal ocorre quando o fluxo sanguíneo cerebral é

limitado em uma região específica, geralmente resultado da oclusão de uma artéria cerebral, como a artéria cerebral média (BRAEUNINGER, 2009). A isquemia cerebral focal tem sido produzida por uma variedade de métodos, e as variações na indução do infarto são atribuídas à diversidade de espécies e às técnicas empregadas (TAKAMATSU, 2002).

Nos modelos animais de isquemia cerebral ocorre a diminuição do aporte de glicose e oxigênio para o tecido. Este evento mimetiza a ocorrência de diversos mecanismos fisiopatológicos que dependem da severidade, duração e localização da lesão isquêmica. Os modelos de isquemia cerebral são desenhados para lidar com fatores de risco específicos, determinar processos de reparação neural e para testar novas estratégias neuroprotetoras. Existem modelos desenvolvidos nas mais diversas espécies de animais, desde primatas até porcos, cachorros, ovelhas, gatos, esquilos da Mongólia, coelhos, ratos e camundongos (TRAYSTMAN, 2003; BACIGALUPPI, COMI, HERMANN, 2010).

Atualmente, os modelos mais utilizados de isquemia focal cerebral são modelos de oclusão da MCA (MCAO). Os modelos de oclusão da MCA podem ser permanentes (pMCAO) ou transitórios (tMCAO). A oclusão pode ser realizada através do uso de um fio intraluminal ou através de técnicas cirúrgicas como eletrocauterização, clampeamento e ligadura da artéria. A eletrocauterização leva a interrupção permanente do fluxo sanguíneo, sendo um modelo pMCAO, enquanto que a ligadura e o clampeamento permitem a reperfusão, sendo portanto modelos de tMCAO (FISHER, 2009; DURUKAN, 2007). Existe ainda o modelo de fototrombose, onde uma lesão cortical do cérebro é induzida por injeção sistêmica de um corante fotossensível, como Rosa de Bengala, e posterior irradiação focal do crânio (BRAEUNINGER, 2009).

Neste trabalho, utilizou-se o modelo pMCAO através de eletrocauterização, onde há a interrupção permanente do fluxo sanguíneo cerebral. Este modelo foi descrito pela primeira vez por Tamura e colaboradores (1981) e tem sido amplamente utilizado, pois permite o acesso a regiões mais proximais da ACM em comparação com técnicas anteriores. (LIPTON, 1999; TRAYSTMAN, 2003; DURUKAN, TATLISUMAK, 2007). Os tamanhos das lesões máximas são comparáveis nos modelos de pMCAO e tMCAO, e a progressão do dano, em termos de números de neurônios lesados e extensão do dano, avaliada de 6 a 72 horas após a cirurgia, é extraordinariamente similar (ZHANG *et al*, 1994).

1.4 Fisiopatologia do AVCi

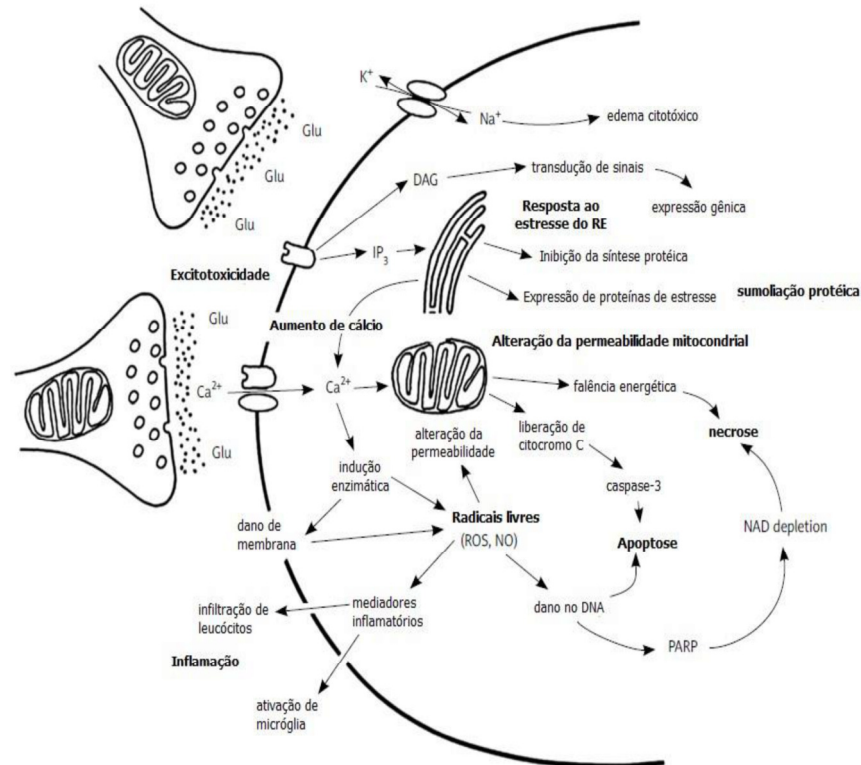
O cérebro necessita de um contínuo suporte de glicose e oxigênio para manter suas funções normais e sua viabilidade. Quando este processo é interrompido, uma cascata de eventos acontece, sendo todos desencadeados pelo esgotamento de fontes de energia na forma de ATP (adenosina trifosfato) (MORO *et al.*, 2005).

As sequelas do AVCi dependem da localização e tamanho da área cerebral atingida, além do tempo que o paciente levou para ser atendido, sendo as mais comuns hemiparesias, alterações visuais, da fala e da memória (CRAMER *et al.*, 2000).

Uma complexa cadeia de eventos fisiopatológicos envolvendo diversos mecanismos de dano neuronal inicia-se após a isquemia. A série de processos neuroquímicos transitórios ou permanentes desencadeados pela isquemia cerebral focal é denominada de cascata isquêmica. Os principais mecanismos envolvidos na cascata isquêmica são falência bioenergética celular, devido à hipóxia, seguido de excitotoxicidade, inflamação, estresse oxidativo, disfunção da barreira hemato-encefálica, injúria microvascular, ativação hemostática, inflamação pós-isquêmica, culminando em morte celular dos neurônios, glia e células endoteliais (Figura 2) (DIRNAGL, IADECOLA, MOSKOWITZ, 1999; BROUNS, DEYNN, 2009).

Os eventos da cascata isquêmica podem perdurar por horas e até mesmo dias, mesmo sendo realizada a restauração do fluxo sanguíneo. A gravidade e o tamanho do dano isquêmico irão depender de dois fatores principais: o tempo de persistência da cascata isquêmica e do grau de bloqueio do fluxo sanguíneo (BROUNS e DEYNN, 2009; DURUKAN e TATLISUMAK, 2007).

Figura 2 - Vias de sinalizações envolvidas na cascata isquêmica.



Fonte: Adaptado de HOSSMANN (2009).

1. 4. 1 Conceito de Núcleo e Penumbra

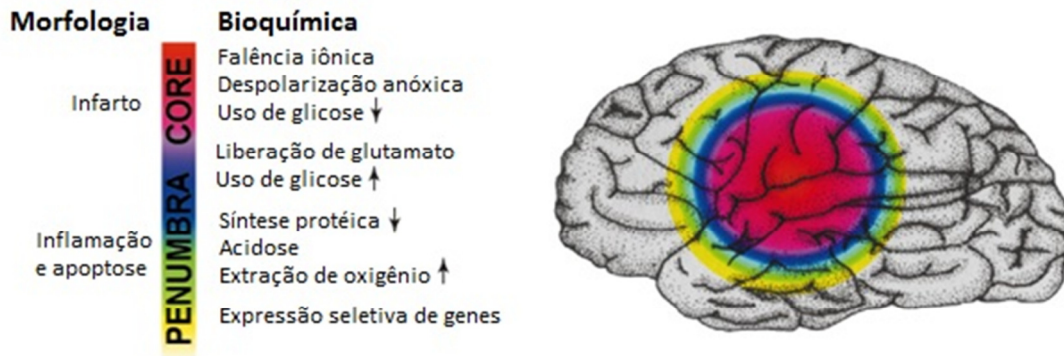
Em modelos animais, a diminuição do fluxo sanguíneo devido à lesão isquêmica ocorre de forma mais severa na região central da lesão o núcleo (ou *core*), região que é irrigada principalmente pelo vaso que foi ocluído. A região que circunda o núcleo é denominada de penumbra. A diminuição da interrupção do fluxo sanguíneo ocorre de forma gradual do core à penumbra (Figura 3) (DURUKAN, 2007).

Na região do núcleo isquêmico, o fluxo sanguíneo pode se reduzir a 15% do normal, na região de penumbra, para 20% a 40% do normal e na região extrapenumbra o fluxo sanguíneo é mantido aproximadamente a 40% do normal (LIPTON, 1999). Alguns trabalhos mostram que a região de penumbra pode se integrar a de núcleo quando o fluxo sanguíneo não é restaurado em algumas horas (GREEN *et al.*, 2003). As células do núcleo morrem rapidamente através da lipólise, proteólise, desagregação dos microtúbulos, falência bioenergética e quebra da homeostase (BROUNS, 2009).

A perfusão sanguínea é reduzida de forma abrupta no núcleo e de forma progressiva na penumbra, onde há perda funcional dos neurônios. Porém, os neurônios permanecem estruturalmente intactos na penumbra, devido à existência da circulação

colateral, sendo uma lesão reversível e, com isso, uma região alvo de inúmeras pesquisas (LIPTON, 1999; DURUKAN e TATLISUMAK, 2007; HOSSMANN, 2009).

Figura 3 - Imagem representativa da área do *core* isquêmico e penumbra.



Fonte: Adaptado de DIRNAGL (1999).

1. 4. 2 Cálcio (Ca^{2+}) e Glutamato

O cérebro exige uma perfusão sanguínea que garanta o suprimento de glicose à célula. Assim como a glicose, o oxigênio (O_2) é outro principal nutriente fornecedor de Adenosina Trifosfato (ATP), sendo eles responsáveis pelo funcionamento da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria (MACHADO, 2002). Na fase isquêmica, com o bloqueio do fluxo sanguíneo, é desencadeado o processo de hipóxia e redução de glicose. No processo de hipóxia ocorre inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial, e conseqüentemente, a redução da produção de ATP, fazendo com que a função celular seja alterada ligeiramente. Como uma tentativa de manter os níveis de ATP, as reservas de glicose abastecem as regiões isquemiadas do cérebro, por cerca de 90 minutos, porém esse metabolismo da glicose passa de oxidativo para glicolítico (glicólise anaeróbica), resultando em acidose secundária pela formação de lactato, o que agrava a lesão hipóxica na célula (VEBER, 1999).

A diminuição da produção de ATP altera o gradiente iônico das células, causando falência da bomba sódio-potássio (Na^+/K^+) (KANEKAR *et al.*, 2012). Acontece acúmulo de sódio (Na^+) intracelular e evasão de potássio (K^+) para o espaço extracelular. O Na^+ carrega moléculas de água (H_2O) e o seu influxo descontrolado promove edema (degeneração hidrotópica) das células e de suas organelas, assim como recorrentes despolarizações anóxicas (KANEKAR *et al.*, 2012). A ineficiência da bomba Na^+/K^+ promove o aumento na produção do radical superóxido (O_2^-) e outros radicais, como o peróxido de oxigênio (H_2O_2) e hidroxila (OH^-) pelo metabolismo da xantina. Ao mesmo tempo, as sinapses glutamatérgicas

liberam glutamato, promovendo excitotoxicidade por glutamato, com aumento do Ca^{++} intracelular. A integridade da barreira hematoencefálica é perdida. Vários mediadores inflamatórios são produzidos, dando curso à inflamação (MIGUEL *et al.*, 2012; ALLEN e BAYRAKTUTAN, 2009).

A falta de energia e falência dos principais transportadores de íons leva à perda do potencial de membrana, e em consequência, os neurônios e as células da glia se despolarizam (DIRNAGL *et al.*, 1999). Uma das consequências da despolarização é a ativação dos canais de cálcio voltagem-dependente que levam a liberação de aminoácidos excitatórios, principalmente de glutamato, sendo esse processo chamado de excitotoxicidade (DIRNAGL *et al.*, 1999; BROUNS, 2009). A depleção de ATP após um processo isquêmico causa a falência da bomba de Ca^{++} ATPase, promovendo o aumento exacerbado da concentração de Ca^{2+} citosólico através do seu influxo a partir da membrana plasmática, mitocôndrias e retículo endoplasmático, culminando com a uma série de eventos, dentre os quais a ativação de proteases, lipases e DNAses dependentes de cálcio, causando a degradação de membranas, degradação nuclear formação de radicais livres, resultado em morte celular (EDVINSSON, 2002; DOYLE *et al.*, 2008;).

As recorrentes despolarizações devida à falência da bomba de Ca^{++} ATPase promove a abertura dos canais de Ca^{++} voltagem-dependente e leva a acúmulo ainda maior desses íons para o interior da célula, contribuindo ainda mais para morte neuronal. Por essa razão, os bloqueadores de canal de cálcio são vistos como pontos estratégicos para a neuroproteção (LUKIC-PANIN, 2007).

No processo isquêmico, a falência energética propicia uma contínua e crescente perda do potencial de membrana, predispondo os neurônios a recorrentes despolarizações, com consequente liberação de glutamato para a fenda sináptica, tanto por exocitose dependente de Ca^{++} (DURUKAN e TATLISUMAK, 2007), quanto pela via independente (GINSBERG, 1995). O glutamato, uma vez liberado, ativa seus receptores pós-sinápticos levando a uma sobrecarga de Ca^{2+} e Na^{+} intracelular e posteriormente ativação da fosfolipase C que produz Inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). Como resultado da super ativação por glutamato, o Na^{+} e Cl^{-} entram nos neurônios através de canais de íons monovalentes e, deste modo, o intenso influxo de Na^{+} e pequeno efluxo de K^{+} leva ao acúmulo de água, gerando edema (DIRNAGL *et al.*, 1999). Uma importante consequência da excitotoxicidade é a perda lenta da homeostase do cálcio com seu acúmulo, levando a morte celular (BROUNS, 2009; STARKOV, 2004).

A despolarização destes neurônios causa maior influxo de Ca^{2+} e mais liberação de glutamato para o espaço extracelular. Estes eventos culminam com a ativação de enzimas de degradação e da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (BORUNS, 2009). Além da disfunção da mitocôndria, onde o Ca^{2+} pode causar a ativação de enzimas de degradação, como as calpainas, proteases e fosfolipases e a ativação de poros de permeabilidade transitória da membrana mitocondrial, devido a abertura de um poro não-seletivo na membrana interna da mitocôndria, resultando em disfunção da fosforilação oxidativa, edema, liberação de metabólitos da matriz mitocondrial e até ruptura física da membrana externa (STARKOV, 2004).

1. 4. 3 Inflamação

Algumas horas após a interrupção do fluxo sanguíneo pela pMCAO, inicia-se uma reação inflamatória, mecanismo secundário de lesão à cascata isquêmica (KIM *et al.*, 2014), uma resposta comum do parênquima cerebral à diversas formas de insulto e que pode persistir por vários dias após a isquemia, sendo um importante fator envolvido na morte neuronal (BARONE e FEUERSTEIN, 1999).

A inflamação é caracterizada pelo acúmulo de células inflamatórias e mediadores no cérebro isquemiado e ocorre no cérebro necrótico após a ruptura da barreira hematoencefálica e infiltração de células do sistema imunológico (HUANG, UPADHYAY, TAMARGO, 2006). Evidências mostram que os astrócitos também podem atuar como células inflamatórias em resposta a isquemia (WANG, TANG, YENARI, 2007), os astrócitos atuam, assim, como células gliais que garantem a integridade da comunicação entre as células neurais, impedindo a propagação desordenada das sinapses. Os seus prolongamentos contêm a proteína ácida fibrilar glial (GFAP de *Glial Fibrillary Acidic Protein*) (HOL e PEKNEY, 2015).

Tanto as células da micróglia, quanto os astrócitos secretam mediadores próinflamatórios, tais como matriz metaloproteinase, quimiocinas, citocinas e óxido nítrico induzível (iNOS) (CHE *et al.*, 2001). Esses mediadores estimulam a expressão de mais moléculas de adesão endotelial, que levam à aderência de leucócitos circulantes, causando oclusão microvascular e infiltração de células imunes para o parênquima cerebral (LONDON *et al.*, 2013). A adesão leucocitária ao endotélio vascular é mediada por três grupos principais de moléculas de adesão. São elas: (1) selectinas, especialmente as selectinas E e P, cuja funções são regular e favorecer o rolamento e recrutamento dos leucócitos nos primeiros estágios do insulto isquêmico; (2) integrinas, que estimulam a adesão celular ao endotélio e

modificação conformacional de leucócitos facilitando da diapedese, (HARING *et al.*, 1996) e (3) as imunoglobulinas (CAM's), como as ICAM-1 e -2 e VCAM-1. Elas facilitam as interações dos leucócitos com o endotélio e promovem a diapedese (EHRENSPERGER *et al.*, 2005).

Com a ativação dessas células inflamatórias, há a translocação nuclear do fator nuclear kappa B (NF- κ B), que induz a expressão de vários mediadores pró-inflamatórios (LAN *et al.*, 2013). Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produzem citocinas como, interferon- γ (IFN- γ), interleucina-6 (IL-6), interleucina-17 (IL-17), e Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) (GELDERBLOM *et al.*, 2012). Em adição, a ativação de macrófagos infiltrados e a atuação da micróglia residente, estimula o aumento da sinalização inflamatória, levando a produção de mais interleucinas (IL-1, IL-6, IL-18, TNF- α) com concomitante lançamento de mais radicais livres. O resultado dessa cascata é a morte de células neuronais (neurônios) e de células não neuronais (astrócitos) (BROUGHTON *et al.*, 2013).

1. 4. 4 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo está envolvido no envelhecimento celular e na fisiopatologia de diversas doenças como aterosclerose, câncer, doenças neurodegenerativas e AVC (ALLEN e BAYRAKTUTAN, 2009; BROUNS, DE DEYN, 2009; PRADEEP *et al.*, 2012). O estresse oxidativo desempenha um papel importante na fisiopatologia da isquemia cerebral, devido à alta taxa de metabolismo de O₂, onde o cérebro consome cerca de 20% do total de oxigênio corporal, além de possuir menores quantidades dos sistemas antioxidantes, também por possuir grandes quantidades de lipídeos peroxidáveis e grandes quantidades de ferro, este último age como pró-oxidante em condições patológicas (TARDINI e YOSHIDA, 2003; ALLEN e BAYRAKTUTAN, 2009). Dessa forma, modificações farmacológicas que exerçam controle do estresse oxidativo podem ser úteis ao tratamento do AVC.

Os radicais livres têm papel importante na sobrevivência das células uma vez que participam de reações redox e servem como defesa contra microorganismos invasores. No entanto, quando produzidos em excesso, chegando a níveis que os sistemas antioxidantes sejam incapazes de controlar, podem ser danosos para as células devido à sua capacidade de alterar a expressão de genes e proteínas, alterando o fenótipo celular e sua função, e oxidar componentes celulares importantes induzindo a morte celular (PRADEEP *et al.*, 2012).

O primeiro radical livre formado na isquemia cerebral é o ânion superóxido (O₂⁻) produzido pela enzima xantina oxidase e liberado da mitocôndria a partir do complexo III da cadeia de transportadora de elétrons. O O₂⁻ está envolvido em processos deletérios para a

célula através da formação de outros radicais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical peroxila (HO_2^-) e o radical hidroxil (OH^-) que é extremamente reativo e pode atacar o DNA causando alterações genéticas como mutações ou morte celular por apoptose (VALKO *et al.*, 2006, LU *et al.*, 2011). O O_2^- pode ainda reagir com o NO originando o peroxinitrito ($ONOO^-$) (LU *et al.*, 2011).

A produção constante de radicais livres de oxigênio é diminuída pela ação dos antioxidantes como as enzimas superóxido dismutase (SOD), que está presente no citosol, na mitocôndria e no meio extracelular e produz H_2O_2 através de uma reação de dismutação a partir do O_2^- ; a glutathione peroxidase (GSHPX) que converte rapidamente o H_2O_2 em H_2O ; e a catalase, que tem como principal função eliminar peróxido formado no peroxissoma, diminuindo o risco da formação de radical hidroxil (MARKLUND, 1990; CHAN, 1996; NORDEBERG; ARNER, 2001).

1. 4. 5 Necrose e apoptose

Quando os eventos fisiopatológicos tornam-se irreversíveis na lesão isquêmica, as células atingidas são induzidas à morte. Os principais processos de morte celular são necrose e apoptose, também presentes após a lesão isquêmica (NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013). O tipo de morte celular irá depender do local da isquemia, da maturidade celular, da quantidade de Ca^{2+} intracelular e do microambiente celular e ambos podem fazer parte de processos neurodegenerativos em fase aguda e/ou crônica (GORMAN, 2008; HEIMFARTH *et al.*, 2013).

A necrose, também conhecida por morte celular não programada, comumente ocorre em situações de baixo nível energético e pode desencadear um processo inflamatório (HONGMEI, 2012; NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013). Se caracteriza pela presença de edema citoplasmático, desintegração de organelas, conseguinte perda da integridade da membrana celular e liberação de conteúdos celulares para o meio extracelular, através de uma forma passiva de energia, “independente de mecanismos de regulação” que comumente estão presentes na apoptose (JOUAN-LANHOUE *et al.*, 2014; ZIEGLER e GROSCURTH, 2004). Ocorre de forma predominante em lesões agudas derivadas de oclusão celular permanente, os neurônios que sofrem necrose liberam mais glutamato e toxinas para o meio extracelular, gerando danos aos neurônios vizinhos (JOUAN-LANHOUE *et al.*, 2014).

No entanto, esse conceito está sendo mudado. Recentemente, foi evidenciado que existem diferentes tipos de necrose envolvendo regulação intracelular, classificadas como necroptoses ou RN (do inglês *Regulated Necrosis*). As vias de sinalização envolvidas nas

necroptoses podem interagir com receptores do tipo CypD (*Cyclophilin D*) (VANDEN *et al.*, 2014) e receptores do tipo RIPK 1 e 3 (*Receptor-Interacting Protein Kinase*) (GALLUZZI *et al.*, 2012). Esses receptores podem ser ativados pelos produtos da cascata isquêmica como ROS e as suas sinalizações resultam na desintegração celular (VANDENABEELE *et al.*, 2010).

A apoptose, conhecida como morte celular programada, é um processo ordenado de fragmentação celular que ocorre com gasto energético, resultando de lesões mais leves principalmente na penumbra (LI *et al.*, 2013). Esse processo preserva a população celular vizinha por não desencadear processo inflamatório. Também se apresenta como um processo fisiológico que pode ocorrer em todos os estágios da vida de um organismo em ordem de manter as populações teciduais em homeostase. Por outro lado, a sinalização apoptótica exacerbada pode provocar injúria tecidual (ELMORE, 2007; HONGMEI, 2012; NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013). Está presente em várias condições fisiológicas e patológicas, como na isquemia, trauma cerebral e doenças neurodegenerativas e também ocorre fisiologicamente nas células para manutenção da homeostase, produz menos danos, ocorre de forma ordenada e demanda energia (FRIEDLANDER, 2003; BROUNS, 2009).

A apoptose é ativada por mecanismos de sinalização celular internos: via intrínseca (nas mitocôndrias) e extrínsecas. Existem receptores de membrana celular que, quando ativados, sinalizam a ação de proteases, denominadas caspases (NAGATA e GOLSTEIN, 1995). O mecanismo central para a apoptose é a ativação das caspases, enzimas que clivam proteínas, ativadas em resposta a sinais pró-apoptóticos, porém pode ocorrer também sem o envolvimento destas (HONGMEI, 2012). São classificadas em caspases iniciadoras e caspases efetoras. Ambas as vias (intrínsecas e extrínsecas) induzem a ativação das caspases. A partir de sinais específicos e indutivos de morte celular, as caspases iniciadoras (8 e 9) ativam as caspases efetoras (3, 6, e 7) (LI *et al.*, 2013).

As alterações celulares peculiares da apoptose, incluem, fragmentação do DNA, condensação da cromatina e desarranjo dos microtúbulos. Esses processos induzem a fragmentação celular, formando o que se conhece por “corpos apoptóticos”. Essas estruturas são envoltas por membrana celular, contendo no seu interior, citoplasma e massas negras de cromatina. Os corpos apoptóticos são removidos do parênquima por fagocitose. No entanto, não estimulam resposta inflamatória. A necrose, por sua vez, estimula a produção de mediadores inflamatórios e consequente quimiotaxia (NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013).

1. 5 AVC e Memória

Memória é a habilidade de se guardar uma informação aprendida previamente dentro de um sistema interno de armazenagem de tal forma que este possa ser acessado e usado posteriormente. Assim, a memória não é uma construção unitária e sim um sistema que reflete inúmeras habilidades cognitivas distintas que podem ser categorizadas ao longo de diferentes dimensões (LUCAS, 2002).

A memória é conceitualmente dividida em dois tipos, memória “declarativa” e “não declarativa”. A memória não declarativa, de procedimento ou implícita – de “como fazer”, refere-se a várias formas de memória que não estão diretamente acessíveis à consciência e também constitui a maioria dos processos de memória em animais não humanos, apresentando-se como tipos “simples” de memória que podemos caracterizar como habituação, hábitos de aprendizagem, sensibilização e condicionamento clássico assim como “*priming*” ou pré-ativação que pode ser definido como a habilidade de detectar ou identificar um estímulo como um resultado de uma exposição prévia (WELKOWITZ *et al.*, 1987; IZQUIERDO *et al.*, 1992; ERIKSSON, 2002).

A memória implícita refere-se a situações inconscientes, não intencionais que são independentes do lobo temporal medial. O cerebelo, estriado e a amígdala são regiões do cérebro relacionadas à memória de procedimento ou implícita, que está envolvida com a percepção, habilidade motora e outras formas de memória não declarativa (KANDEL, 2009).

A memória declarativa refere-se à memória explícita e está relacionada com reconhecimento de cenas e de objetos familiares. É uma memória para fatos e eventos que requer a ação do lobo temporal medial em conexão com córtex. Estudos demonstram que é característico da memória explícita a codificação da informação, o armazenamento de modo que se torne memória e evocação quando necessário. Podendo ser dividida em episódica e semântica (Figura 4) (SQUIRE, 2003; KANDEL, 2009).

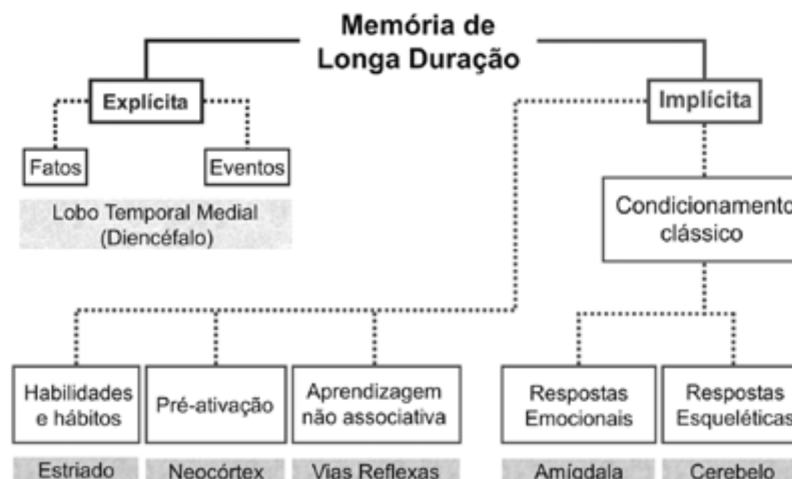
A memória declarativa episódica se refere a informações que estão relacionadas a um lugar e tempo específico, e a semântica, que se refere a um conhecimento geral não ligado a contexto espacial ou temporal em particular, está relacionada com a cultura e envolve conhecimentos gerais de um povo. A memória explícita é dependente do lobo temporal medial (DEW e CABEZA, 2011). O lobo temporal medial engloba o hipocampo e regiões anatomicamente próximas como o córtex entorrinal, peririnal e córtex parahipocampal. (SQUIRE e ZOLA-MORGAN, 1996). Estas categorias de memória não são excludentes,

quando um organismo aprende alguma coisa importante, vários destes sistemas de memória podem ser empregados.

A memória declarativa pode ser classificada em relação ao tempo como memória recente, ou de curto prazo, quando está relacionada a eventos que ocorrem horas ou dias antes; e em memória de longo prazo, ou remota, que se refere a eventos do passado distante (SQUIRE e ZOLA-MORGAN, 1996). A memória declarativa de curto prazo representa o armazenamento temporário de informação utilizado para planejar uma ação futura e é processada principalmente no córtex pré-frontal, podendo também ser chamada de memória de trabalho (RUCHKIN *et al.*, 2003). A memória de curta duração pode ser esquecida ou transformada em longa duração (GOLDMAN-RAKIC, 1992).

O septo medial e o hipocampo processam a memória de trabalho e a memória espacial. O hipocampo também processa a informação temporal, contextual e a memória que leva a recordação consciente em humanos (BRIONI, 1993; IZQUIERDO *et al.*, 1992).

Figura 4 - Taxonomia dos sistemas de memória de longa duração.



Fonte: Adaptado de Squire e Knowlton (1995).

A perda de memória ocorre devido à degeneração de neurônios no cérebro provocados por diversos tipos de agressões, como estresse oxidativo, inflamação, excitotoxicidade, entre outros. Todos esses processos estão envolvidos em patologias como doenças neurodegenerativas e AVC. Existe uma alta incidência de disfunção cognitiva em pacientes com AVC. A estimativa é que aproximadamente 1/3 das vítimas de AVC sofram com problemas de memória e dificuldades na execução das tarefas diárias (HATTORI, 2000; MAUD, 2006).

Vários autores têm detectado distúrbios na aquisição da memória após a pMCAO em animais usando testes como esQUIVA passiva e labirintos. A isquemia ocasiona déficits na

memória operacional, acessada através de tarefas de reconhecimentos de objetos e lugares (MUMBY *et al.*, 1996; PLAMONDON *et al.*, 2006) e na memória espacial (SANDSTROM e ROWAN, 2007). Em humanos, pacientes com doença cerebrovascular ocasionalmente exibem distúrbios cognitivos, como amnésia e desorientação topográfica (CAPLAN *et al.*, 1990).

1. 6 Carotenóides e neuroproteção

Os carotenóides são corantes naturais presentes nas frutas e vegetais (cenouras, tomates, espinafre, laranjas, pêssegos, entre outros) (ERDMAN, 2015) sendo sua estrutura química composta por ligações duplas conjugadas, responsáveis por sua cor e por algumas de suas funções biológicas (STAHL e SIES, 1999; SILVA, *et al.*, 2001). Todos os carotenóides contêm uma estrutura poliisoprenóide, uma longa cadeia conjugada de uma simetria quase bilateral em torno da ligação dupla central (SAINI *et al.*, 2015). Juntamente com as vitaminas, são as substâncias mais investigadas como agentes quimiopreventivos, funcionando como antioxidantes em sistemas biológicos (POOL-ZOBEL *et al.*, 1997).

Existem, aproximadamente, 600 carotenóides encontrados na natureza, os quais são constituídos por dois grandes grupos, denominados: (1) carotenos, que consistem em hidrocarbonetos puros; e (2) xantofilas, hidrocarbonetos que possuem grupos funcionais oxigenados (HAEGELE, *et al.*, 2000; JOMOVA e VALKO, 2013, RUTZ *et al.*, 2016). Desses, 40 podem ser encontrados nos alimentos e, como resultado de uma absorção seletiva do trato gastrointestinal, apenas 14 carotenóides são biodisponíveis, biodisponibilidade que se apresenta de forma quase ilimitada (KHACHIK, *et al.*, 1991; PARKER, *et al.*, 1999). Entre esses, se encontram o beta-caroteno, o alfa-caroteno, a luteína, a zeaxantina e o licopeno, a beta-criptoxantina, a fucoxantina, a astaxantina, a crocetina, a capsantina e o fitoeno (GOMES, 2007).

Estudos mostram a relação entre o aumento no consumo de alimentos ricos em carotenóides e a diminuição no risco de várias doenças, dentre suas ações, os carotenóides sequestram o oxigênio *singlete*, uma forma mais reativa do oxigênio, removem os radicais peróxidos, modulam o metabolismo carcinogênico, inibem a proliferação celular, estimulam a comunicação entre células (junções *gap*), e elevam a resposta imune (OLSON, 1999). Testes *in vitro* e *in vivo* sugerem que os carotenóides são excelentes antioxidantes, sequestrando e inativando os radicais livres (ERDMAN, 1999). Os carotenóides podem desempenhar um papel importante na doença neuroinflamatória incluindo na Doença de Alzheimer, muito provavelmente através das suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e

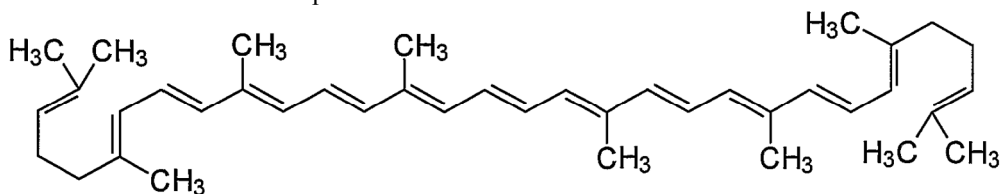
neuroprotetoras (SODHI e SINGH, 2014). Eles podem suprimir a atividade de NFκB, regular as moléculas pró-inflamatórias, proteger múltiplas membranas celulares contra danos oxidativos e promover a atividade de enzimas antioxidantes (LU, 2015).

Os carotenóides reagem com os radicais livres, notavelmente com os radicais peróxidos e com o oxigênio molecular, sendo a base de sua ação antioxidante. Carotenóides como o beta-caroteno, licopeno, zeaxantina e luteína, exercem funções antioxidantes em fases lipídicas, bloqueando os radicais livres que danificam as membranas lipoprotéicas (SIES e STAHL, 1995). Além disso, os carotenoides proporcionam proteção contra lesões cerebrais induzidas por isquemia cerebral / reperfusão em roedores, induzindo um aumento na atividade da SOD e inibindo a apoptose (FUJITA *et al.*, 2013).

1. 6. 1 Licopeno

O licopeno é um carotenóide sem a atividade pró-vitamina A, lipossolúvel, composto por onze ligações conjugadas e duas ligações duplas não conjugadas (NASIR *et al.*, 2015) (Figura 5). O licopeno é um carotenóide que possui a maior capacidade seqüestrante do oxigênio *singlete*, tendo forte propriedade antioxidante, possivelmente devido à presença das duas ligações duplas não conjugadas, o que lhe oferece maior reatividade para neutralizar os radicais livres de espécies reativas de oxigênio, oxigênio molecular *singlete* e radicais peroxil (DI MASCIO, *et al.*, 1989; KRINSKY, 2001; ATESSAHIN, *et al.*, 2005; RAFI *et al.*, 2007).

Figura 5 - Estrutura molecular do licopeno.



O licopeno está presente, atualmente, como um dos mais potentes antioxidantes entre os carotenóides, com capacidade sequestrante de oxigênio (O₂) 100 x maior que a da vitamina E, sendo sugerido para a atenuação do estresse oxidativo, na prevenção da carcinogênese, nefrotoxicidade e aterogênese por proteger moléculas como lipídios, lipoproteínas de baixa densidade (LDL), proteínas e DNA (AGARWAL e RAO, 2000; LIU *et al.*, 2005; COHEN, 2002; ATESSAHIN *et al.*, 2007; AYDIN *et al.*, 2013). Devido à sua elevada lipossolubilidade, o licopeno pode passar através da barreira hematoencefálica (KHACHIK, *et al.*, 2002).

É o carotenoide predominante no plasma e nos tecidos humanos, sendo encontrado em um número limitado de alimentos de cor vermelha, como tomates e seus produtos, goiaba, melancia, mamão e pitanga (ARAB e STECK, 2000). Tomates e derivados aparecem como as maiores fontes de licopeno (DJURIC e POWELL, 2001; TAKEOKA, *et al.*, 2001). O tomate cru apresenta, em média, 30 mg de licopeno/kg do fruto; o suco de tomate cerca de 150 mg de licopeno/litro; e o *catchup* contém em média 100 mg/kg (STAHL e SIES, 1999).

Em relação à biodisponibilidade, verificou-se que o consumo de molho de tomate aumenta as concentrações séricas de licopeno em taxas maiores do que o consumo de tomates crus ou suco de tomate fresco. A ingestão de molho de tomate cozido em óleo resultou em um aumento de 2 a 3 vezes da concentração sérica de licopeno um dia após sua ingestão, mas nenhuma alteração ocorreu quando se administrou suco de tomate fresco (GARTNER e STAHL, 1997).

Essa diferença de biodisponibilidade está relacionada com as formas isoméricas apresentadas pelo licopeno (CLINTON *et al.*, 1996) demonstraram que 79% a 91% do licopeno presente nos tomates e seus produtos encontram-se sob a forma do isômero *trans* (*trans*-licopeno), em contraste com os níveis de licopeno sérico e tissulares, que se encontram em mais de 50% na forma de isômero *cis* (*cis*-licopeno). O licopeno ingerido, na sua forma natural (*trans*-licopeno), é pouco absorvido, mas estudos demonstram que o processamento térmico dos tomates e seus produtos melhoram a sua biodisponibilidade. O processamento térmico rompe a parede celular e permite a extração do licopeno dos cromoplastos ocorre uma reversão na isomerização passando os isômeros *cis*, menos estáveis, à sua forma mais estável, ou seja, *trans* (SHI *et al.*, 2000; WILLCOX *et al.*, 2003).

Foi realizado um estudo de toxicidade subcrônica sobre o licopeno por administração oral a concentrações dietéticas de 0,25, 0,50 e 1,0% em ratos durante um período de 90 dias. Os resultados deste estudo não mostram qualquer evidência de toxicidade do licopeno em níveis de dieta até 1,0% como demonstrado pelos achados de observações clínicas, observações neurocomportamentais, avaliação de atividade motora, peso corporal e medidas de consumo de alimento, exames oftalmoscópicos, hematologia, clínica Química, exame de urina, pesos de órgãos, patologia macroscópica ou histopatologia (JONKER *et al.*, 2003). Outro estudo também demonstrou que a ingestão de licopeno (75 mg/dia) não causou quaisquer eventos adversos em humanos (SHAO & HATHCOCK, 2006). Um ensaio clínico de fase I realizado em indivíduos adultos saudáveis não demonstrou toxicidade hepática ou

renal significativa atribuível a doses de licopeno variando de 10 a 120 mg, embora tenha sido observada toxicidade gastrointestinal mínima (GUSTIN *et al.*, 2004).

Estudos epidemiológicos retrospectivos e prospectivos têm apontado uma associação do consumo de tomate e seus produtos (GIOVANNUCCI, 1999; RAO e AGARWAL, 1999) ingestão de licopeno (KRISTAL e COHEN, 2000; MICHAUD, *et al.*, 2000), e níveis de licopeno sérico (CASSO, *et al.*, 2000; FREEMAN, *et al.*, 2000) com a redução do risco de câncer, principalmente de próstata e pulmão (PORRINI *et al.*, 2005) demonstraram, recentemente, que a ingestão de carotenóides do tomate melhora o sistema de defesa antioxidante dos linfócitos, reduzindo a lesão ao DNA.

A melhora das funções cognitivas por compostos naturais em pacientes com AVC são comprovadas em diversos trabalhos. Estudos epidemiológicos demonstraram que o consumo elevado de tomate e os produtos derivados do tomate, ricos em licopeno, tem sido associado a um risco diminuído de aterosclerose, doenças cardiovasculares e desordens neurológicas (FRIEDMAN, 2013). Recentemente, o papel do licopeno na neuroproteção está surgindo. Estudos indicam que o licopeno possui efeito neuroprotetor e é capaz de prevenir a doença do sistema nervoso causados por destruição e degeneração dos neurónios, incluindo doenças de Alzheimer e Parkinson (KHAKSAR e JAHROMI, 2015).

2 JUSTIFICATIVA

O AVC é a terceira principal causa de morte humana. O dano inflamatório desempenha um papel importante na patogênese da isquemia cerebral e constitui um alvo para a prevenção e tratamento (ZHAO *et al.*, 2014).

O estudo dos mecanismos e de estratégias terapêuticas envolvidos no AVC é importante principalmente pelo impacto socio-econômico que pode causar ao afetar a população economicamente ativa (ZETOLA *et al.*, 2001). E apesar dos esforços das autoridades no controle da pressão arterial, combate ao tabagismo e controle dos níveis de colesterol e da diabetes, o Brasil ainda possui altas taxas de mortalidade devido ao AVC (GARRITANO *et al.*, 2012).

Apesar de muitos estudos buscarem drogas neuroprotetoras para a isquemia cerebral (AHMED, NASMAN, WAHLGREN, 2000; HALEY, 1998), poucos se mostraram realmente efetivos (TAZAKI, SAKAI, OTOMO, 1988). Atualmente, a única terapia preconizada pela ANVISA para isquemia cerebral é o fator ativador de plasminogênio tecidual recombinante (r-tPA), tornando-se evidente a necessidade de estudos que visem novas terapias e a busca por substâncias que possam atuar na neuroproteção e capazes de diminuir as sequelas relacionadas com o AVC e, assim, melhorar a qualidade de vida desses pacientes.

O presente estudo visa avaliar o efeito do licopeno, por suas ações anti-inflamatórias e antioxidantes, sobre o dano neuronal, comportamento e memória de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos do Licopeno sobre o dano neuronal, alteração motora e memória de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente.

3.2 Objetivos Específicos

- Produzir déficits de memória e alterações comportamentais usando modelo de isquemia cerebral focal permanente por oclusão da artéria cerebral média em camundongos;
- Avaliar o dano neuronal nos animais isquemiados, pelo tratamento com Licopeno;
- Avaliar as alterações motoras e os déficits de memória nos animais isquemiados, pelo tratamento com licopeno;

4 MATERIAL E METÓDOS

4.1 Animais

Foram utilizados 80 camundongos albinos machos da linhagem *Swiss*, pesando entre 25 e 30 g, provenientes do Biotério Central do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC) e transferidos para o Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina - UFC. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas apropriadas, forradas com maravalha, mantidos à temperatura de 25° C com ciclo de claro/escuro de 12 horas, e livre acesso à água e comida. No que se refere aos cuidados com os animais, este estudo seguiu os princípios éticos da experimentação animal, estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFC sob o número de registro 29/2016.

4.2 Drogas

Licopeno, na sua forma *trans* (SIGMA-USA). Ketamina (SIGMA-USA), na dose de 90 mg/kg via intra-peritoneal (i.p.), Xilazina (SIGMA-USA), na dose 10 mg/kg, via i.p., Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol (TTC) (SIGMA-USA).

4.3 Protocolo Experimental

Foram utilizados 80 animais divididos em 6 grupos de acordo com o esquema de tratamento: Falso Operado (FO) tratados com veículo; FO tratados com Licopeno 20 mg/kg; isquemiados (pMCAO) tratados com veículo e isquemiados (pMCAO) tratados com licopeno nas doses de 2, 10 e 20 mg/kg por via oral (v.o.) (Tabela 1). Para o preparo do veículo, o licopeno foi dissolvido em *Tween* 80 a 20% com solução salina normal. O Licopeno foi administrado 1 hora depois da indução da pMCAO e nos dias seguintes que seguiram a cirurgia, administrado uma vez ao dia (Figura 6).

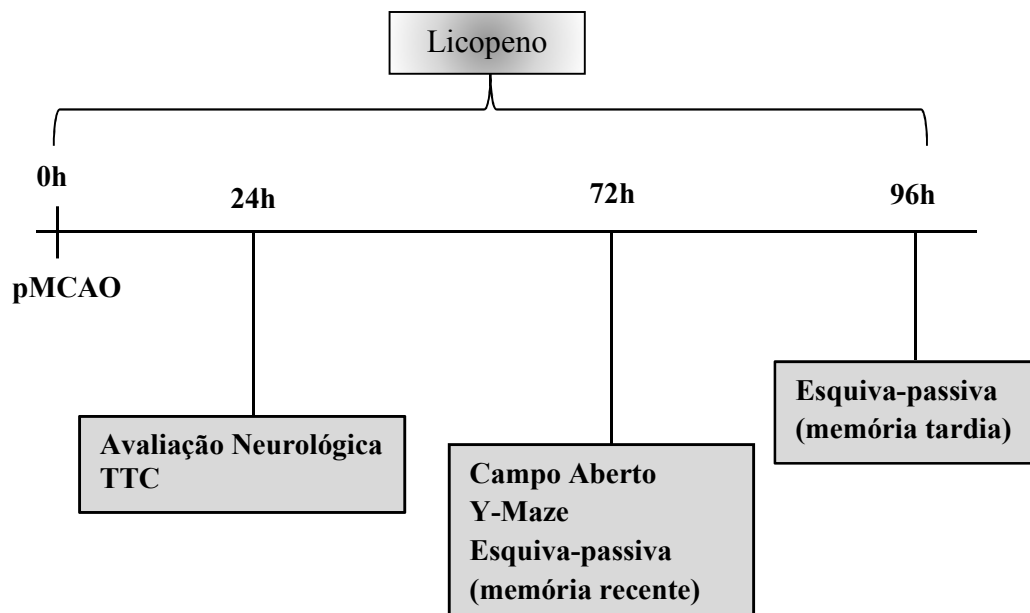
A dose de Licopeno selecionada para a realização dos testes de comportamento foi a capaz de apresentar uma melhora significativa no déficit neurológico induzido e um dano neuronal isquêmico significativamente menor em relação aos animais isquemiados não tratados.

- 48 (oito animais por grupo) foram utilizados para avaliação neurológica e coloração com TTC;
- 32 (oito animais por grupo) foram utilizados para os testes de comportamento e memória.

Tabela 1 - Tabela de representação dos grupos utilizados no estudo

Grupos	Tratamento
FO + V	Animais falso-operados e tratados com veículo (Salina + Tween) v.o.
FO + Licopeno 20 mg/kg	Animais falso-operados e tratados com Licopeno na dose de 20 mg/kg v.o.
pMCAO + V	Animais submetidos à pMCAO tratados com veículo v.o.
pMCAO + Licopeno 2 mg/kg	Animais submetidos à pMCAO tratados com Licopeno na dose de 2 mg/kg v.o.
pMCAO + Licopeno 10 mg/kg	Animais submetidos à pMCAO tratados com Licopeno na dose de 10 mg/kg v.o.
pMCAO + Licopeno 20 mg/kg	Animais submetidos à pMCAO tratados com Licopeno na dose de 20 mg/kg v.o.

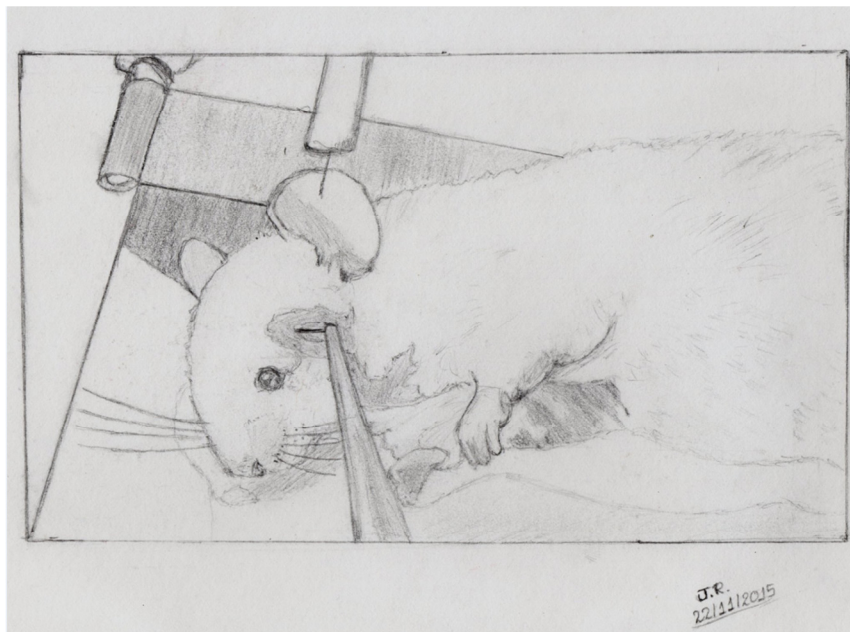
Figura 6 - Protocolo Experimental



4. 4 Isquemia cerebral focal por oclusão permanente da artéria cerebral média (TAMURA *et al.*, 1981).

Os animais foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg) e ketamina (90 mg/kg) administrados por via i.p. para o procedimento cirúrgico. A temperatura foi mantida entre 36,5 e 37° C com o auxílio de uma lâmpada. Inicialmente, foi realizada uma incisão na linha entre o olho esquerdo e a orelha, o músculo temporal foi rebatido e, posteriormente, realizada uma craniectomia com uma broca de 1 (mm), seguido da exposição e cauterização da artéria cerebral média. Em seguida, a incisão foi suturada com fio de seda agulhado 4.0, e os animais foram colocados em gaiolas para recuperação da cirurgia com livre acesso a água e comida. Os animais FO foram submetidos aos procedimentos descritos para isquemia, exceto a cauterização da artéria cerebral média (Figura 7).

Figura 7 – Ilustração da Cirurgia de indução isquêmica focal pelo método da Oclusão permanente da Artéria Cerebral Média (pMCAO): momento da aproximação do bisturi elétrico para coagulação da artéria cerebral média.



Fonte: Arquivo pessoal.

4.5 Avaliação Neurológica (GARCIA *et al.*, 1995).

O dano neuronal causado pela pMCAO comumente acomete apenas um hemisfério cerebral, permitindo a avaliação dos déficits sensório-motores por assimetria corporal. Para a avaliação sensório-motora foi realizada a avaliação neurológica 24 horas após a indução isquêmica. Os achados neurológicos foram pontuados utilizando uma escala previamente descrita por Garcia e colaboradores (1995) (Tabela 2).

Tabela 2 - Escala utilizada para a avaliação neurológica.

Testes	Escores			
	0	1	2	3
Atividade Espontânea	Animal sem movimento	Animal não se ergue e raramente se movimenta	Animal se movimenta, mas não se aproxima de três lados da caixa	Animal se movimenta e se aproxima de três lados da caixa
Simetria do movimento das quatro patas	Contralateral: sem movimento	Contralateral: raros movimentos	Contralateral: movimentos lentos	Ambos os lados: movem simetricamente
Estiramento das patas dianteiras	Contralateral: sem movimento	Contralateral: raros movimentos	Contralateral: movimentos lentos	Ambos os lados: movem simetricamente
Escalada/ Prensão	...	Animal fálhou em escalar e exibiu movimentos circulares	Contralateral com dificuldade de subir e agarrar a grade	Animal escalou normalmente e agarra a grade
Propiocepção Corpórea	...	Contralateral: sem resposta	Contralateral < Ipsilateral	Resposta Simétrica
Resposta ao toque da Vibrissa	...	Contralateral: sem resposta	Contralateral < Ipsilateral	Resposta Simétrica

Fonte: Adaptado de (GARCIA *et al.*, 1995).

Os parâmetros avaliados foram:

1. Atividade espontânea, que analisa a habilidade do animal de se aproximar das paredes de uma arena circular de polipropileno (30 cm de diâmetro), explorando o ambiente;
2. Simetria do movimento das quatro patas, que analisa se o animal ao ser segurado pela cauda e suspenso no ar possui simetria dos quatro membros;
3. Estiramento das patas dianteiras, que avalia se o animal caminha sobre as patas dianteiras sobre uma superfície plana;
4. Escalada e preensão, que analisa a capacidade do animal de subir e agarrar firmemente uma grade de ferro ou de fazer movimentos circulares;
5. Propriocepção corpórea, na qual o animal é tocado com uma pinça em ambos os lados do corpo e sua reação é observada, que avalia a resposta sensorial;
6. Resposta ao toque da vibrissa, no qual a pinça toca as vibrissas em ambos os lados do animal, que analisa a resposta sensorial.

A cada parâmetro é atribuído um escore denominado escores neurológicos, de 0 a 3 para os parâmetros 1, 2 e 3, sendo 0 o mínimo de movimento ou de reação do animal, atribuído a animais com grave lesão e 3, o máximo de movimento ou reação do animal, sendo atribuído a animais com o mínimo de lesão. Para os parâmetros 4, 5 e 6 foram atribuídos escores de 1 a 3, sendo 1 o mínimo de movimento ou de reação do animal, atribuído a animais com grave lesão e 3, o máximo de movimento ou reação do animal, sendo atribuído a animais com o mínimo de lesão.

O somatório dos escores de todos os parâmetros representa o escore final da avaliação neurológica do animal, sendo 3 o menor valor que pode ser atribuído e 18 o maior valor.

4. 6 Quantificação do dano isquêmico através da coloração pelo Cloreto de 2, 3, 5-Trifeniltetrazol (TTC) (BEDERSON, *et al.*, 1986).

A coloração com o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazol (TTC) foi primeiramente descrita por Jestaedt e Sandritter (1959) para quantificação da área de infarto do miocárdio. Neste trabalho, a coloração foi utilizada para identificar e quantificar as regiões de infarto decorrentes da isquemia cerebral focal.

O TTC é um sal que recebe um próton da succinato desidrogenase na membrana interna da mitocôndria, o que o reduz para uma forma insolúvel, o formazam, fornecendo uma coloração avermelhada ao tecido composto por células viáveis. As células da região de infarto não possuem mitocôndrias viáveis, não havendo o processo de redução e, dessa forma, sem a formação da coloração avermelhada, o que permite que a área de infarto seja detectada por uma região pálida (correspondendo à área de edema).

Vinte e quatro horas após a indução isquêmica, os animais foram eutanasiados e seus cérebros foram removidos, sendo conservados em salina gelada até o momento dos cortes. Os cérebros foram fatiados na espessura de 2 mm, utilizando uma matriz de corte (Figura 8), e imersos em solução de 1% de TTC à 37°C por 30 minutos. Em seguida, as fatias foram digitalizadas em alta resolução. As imagens das áreas de edema foram analisadas a partir das áreas de infarto e das áreas totais das fatias, empregando-se cálculos das respectivas porcentagens. As extensões das áreas foram mensuradas utilizando o software Osiris TM e *Image J* (University of Geneva, Switzerland).

Após a quantificação do dano isquêmico pela coloração com TTC, a dose de Licopeno selecionada para a realização dos testes de comportamento foi a capaz de apresentar uma melhora significativa no déficit neurológico induzido e um dano neuronal isquêmico significativamente menor em relação aos animais isquemiados não tratados.

Figura 8 - Matriz para cortes, 2 mm.



Fonte: FONTELES, 2013.

4.7 Avaliação da Atividade Locomotora - Teste do Campo Aberto (BROADHURST, 1957).

O teste do campo aberto foi originalmente descrito por Hall (1934), para analisar o estado emocional em ratos. O teste utilizado nesse trabalho foi baseado no modelo de Broadhurst (1957) e foi utilizado com o intuito de aferir a capacidade locomotora dos animais. O campo aberto consiste de uma arena quadrada (30 x 30 x 15 cm) de acrílico preto com o piso dividido em nove quadrantes iguais (Figura 9). No teste o animal foi colocado na arena e deixado para explorar o ambiente por 5 minutos, durante este período foi registrado o número de quadrantes atravessados pelo animal, número de cruzamentos, (*crossing*), e o número de vezes que o animal se levantou para explorar o ambiente, mantendo-se suspenso apenas pelas patas traseiras, caracterizando o comportamento exploratório do tipo *rearing*. A arena foi limpa com álcool a 20% após cada animal ser retirado, para evitar interferência do cheiro de urina e fezes no teste.

Figura 9 - Arena do Campo Aberto



Fonte: Laboratório de Neurociências e Comportamento (LNC).

4. 8 Avaliação Sobre a Memória

4. 8. 1 Avaliação da Memória de Trabalho - Teste do Labirinto em Y (SARTER *et al.*, 1988).

A memória operacional ou de trabalho foi avaliada através do teste do labirinto em Y. Nesse teste o animal é colocado em um labirinto em forma de Y com os três braços iguais (SARTER *et al.*, 1988). Os animais apresentam forte tendência de alternar a entrada nos diferentes ambientes.

O labirinto em Y é composto por 3 braços de madeira com 16 cm de altura, 5 cm de largura e 40 cm de comprimento (Figura 10).

Figura 10 - Labirinto em Y



Fonte: FONTELES, 2013.

Para a avaliação da memória os braços foram numerados. O animal foi colocado no aparelho, no braço 1, e durante 8 minutos o número de cada braço que o animal entrou foi anotado. Foi considerado acerto cada vez que o animal entrou em 3 diferentes braços sem repetição. O resultado foi expresso em porcentagem e obtido através da seguinte fórmula matemática:

$$\text{Alternações espontâneas (\%)} = \frac{\text{Número de acertos}}{\text{Número total de entradas} - 2} \times 100$$

O sucesso do teste é indicado pela alta taxa de alternância nos grupos controle, indicando que os animais podem se lembrar em qual braço eles entraram por último (STONE *et al.*, 1991). Entre cada sessão, o labirinto foi higienizado com uma solução de álcool a 20% e secado com toalhas de papel. É importante salientar que os animais que apresentaram um total de entradas menor que o número de 12 foram desqualificados para a realização do teste, sendo considerado que apresentaram um elevado dano na atividade motora, comprometendo a alternâncias espontâneas no teste do Labirinto em Y.

4. 8. 2 Avaliação da Memória Aversiva – Teste da Esquiva Passiva (GOLD, 1986).

O teste de esquiva passiva envolve a tendência natural do animal de explorar além da plataforma e envolve o aprendizado de evitar o choque, um componente aversivo que constitui uma resposta condicionada. Tendo por objetivo avaliar as memórias de curto e longo prazo do animal.

O aparelho consiste de uma caixa de acrílico (48 x 22 x 22), com o piso constituído por uma plataforma e uma grade eletrificada (Figura 11). O animal foi colocado na plataforma e deixado para ambientação no aparelho durante um 1 minuto, e depois retirado. O período de ambientação tem grande importância na realização deste teste, pois permitirá avaliar se o animal está apto para a realização do mesmo, sendo assim, os animais tem 1 minuto para descer da plataforma e explorar o ambiente da caixa de esquiva. Os animais que não descenderem da plataforma durante a ambientação serão não serão considerados aptos para a realização do teste. Após 30 segundos, o animal foi colocado novamente na plataforma. O animal ao descer da plataforma recebeu um choque de 0,5 mA, durante 1 segundo, com o tempo de latência para entrar sendo registrado, até um máximo de 5 minutos (treino). Retirou-se o animal e após 15 minutos este foi colocado novamente na plataforma e registrou-se a latência de descida (avaliação da memória recente). A retenção do aprendizado (avaliação da memória tardia) foi testada após 24 h, quando o animal foi colocado na plataforma e o tempo de latência para a descida da plataforma foi registrada, nessa etapa o animal não recebeu o choque.

Figura 11 - Aparelho de Esquiva Passiva



Fonte: Insight LT.

4. 9 Análise estatística

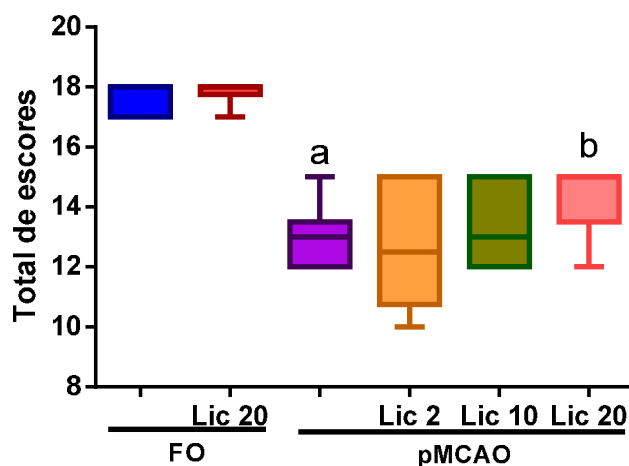
Antes da avaliação dos testes estatísticos foi realizado o teste de normalidade para todos os dados. Para análise estatística dos testes comportamentais, foram realizados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, não paramétricos, sendo os resultados expressos em mediana. O teste de Bonferroni foi realizado para análise dentro do grupo na avaliação da memória aversiva. Para avaliação dos escores neurológicos foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney e os valores expressos em mediana (mínimo e máximo). O critério de significância adotado foi de $p < 0,05$. O programa de computador usado foi o *Graph Pad Prism 5.0*®.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do licopeno (2, 10 e 20 mg/kg) sobre a avaliação neurológica de camundongos submetidos à pMCAO.

Os animais submetidos à pMCAO apresentaram déficits neurológicos significativos 24 horas após a isquemia (FO: 18 (17-18); FO + Lic 20: 18 (17-18); pMCAO: 13 (12-15)) (Figura 11). Os déficits neurológicos, sensório-motores, observados foram: diminuição da habilidade motora e redução da capacidade de responder a estímulos no lado contralateral à lesão. Os animais isquemiados tratados com o licopeno na dose de 20 mg/kg apresentaram melhora significativa no déficit neurológico induzido por pMCAO em relação aos animais isquemiados (pMCAO + Lic 2: 12,5 (10-15); pMCAO + Lic 10: 13 (12-15); pMCAO + Lic 20: 15 (12-15)) (Figura 12).

Figura 12 - Efeito neuroprotetor do licopeno sobre déficits neurológicos induzidos por pMCAO em camundongos.



Os valores representam a mediana (mínimo e máximo). ^avs FO, ^bvs pMCAO, $p < 0.05$. Teste de Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney, (n = 8/grupo).

5. 2 Efeito do Licopeno (2, 10 e 20 mg/kg) sobre a extensão do dano neuronal de camundongos submetidos à pMCAO.

Os animais submetidos à pMCAO por oclusão da ACM apresentaram um dano cerebral isquêmico analisado 24 horas após a isquemia (FO: $0,8 \pm 0,2$ %; FO + Lic 20: $1,0 \pm 0,0$ %; pMCAO: $10,9 \pm 1,7$ %). Os animais submetidos à pMCAO tratados com licopeno nas doses de 10 e 20 mg/kg apresentaram um dano neuronal isquêmico significativamente menor nas regiões do estriado e córtex temporal do que os animais isquemiados não tratados (pMCAO + Lic 10: $5,5 \pm 0,33$ %; pMCAO + Lic 20: $6,0 \pm 0,54$ %) (Figura 13 e 14).

Figura 13 - Fatias cerebrais de camundongos submetidos à pMCAO, coradas com TTC, representando o dano cerebral isquêmico, na região do córtex frontal, córtex temporal e corpo estriado.

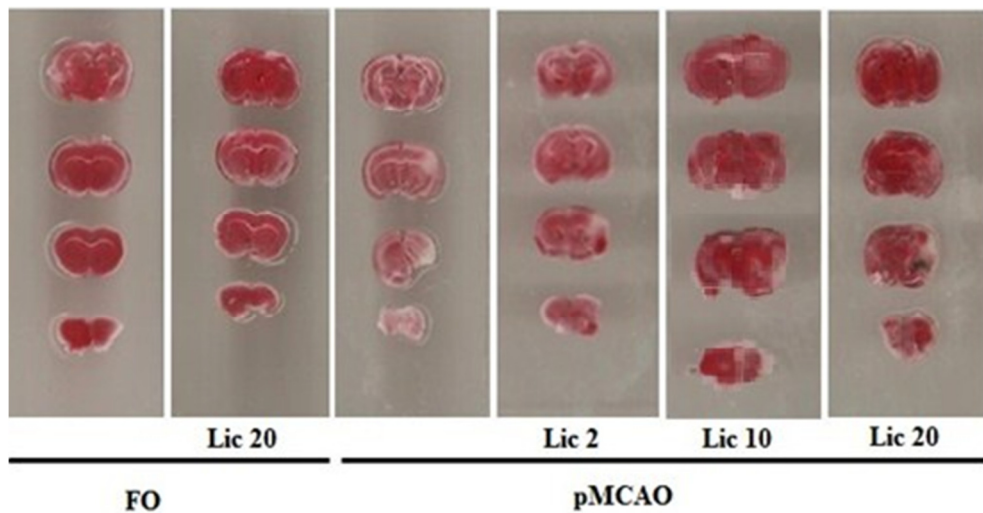
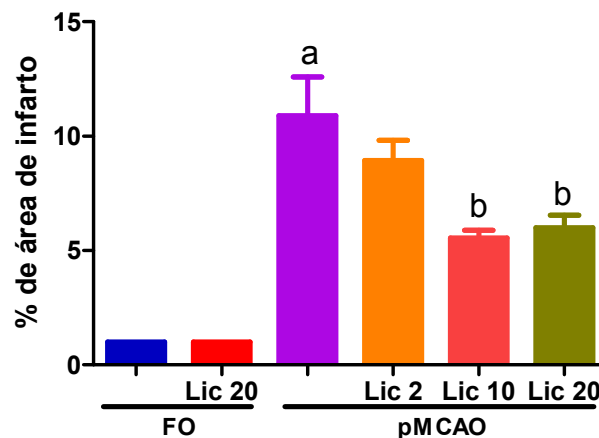


Figura 14 - Efeito neuroprotetor do licopeno sobre dano neuronal induzida por pMCAO em camundongos.

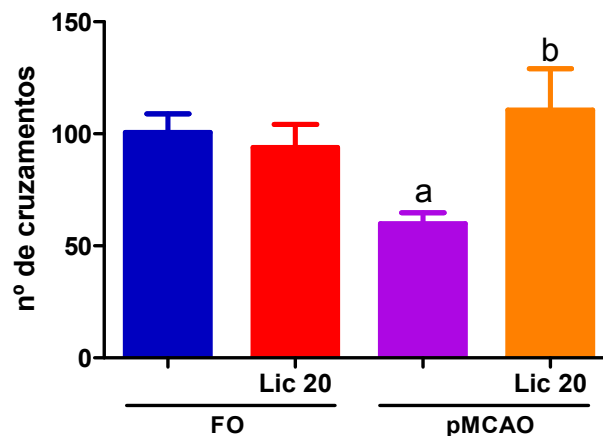


Os valores representam a média \pm EPM. ^avs FO, ^bvs pMCAO, $p < 0,05$. Teste de Kruskal-Wallis e teste Mann-Whitney, (n=8/grupo).

5.3 Efeito do licopeno (20 mg/kg) sobre a atividade locomotora de camundongos submetidos à pMCAO.

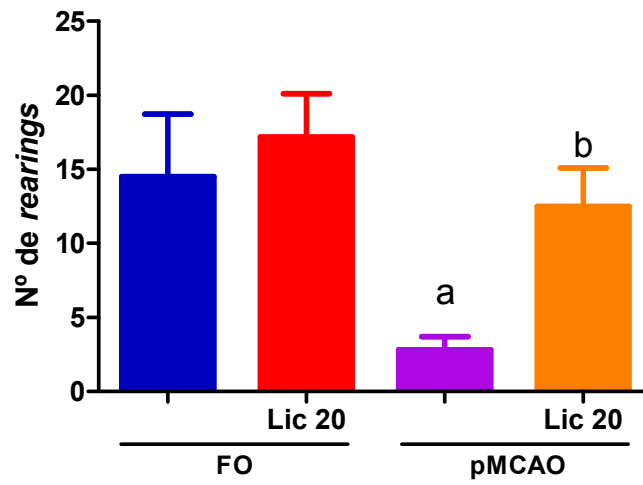
Na avaliação da atividade locomotora 72 horas após a isquemia, foram observadas diminuição significativa na atividade locomotora em relação aos animais FO's tanto na exploração horizontal (número de cruzamentos – *crossings*), como na exploração vertical (número levantamentos - *rearings*), porém, apesar de a diminuição na atividade locomotora ser significativa, não afetou o desempenho dos animais nos testes de avaliação de memória realizados posteriormente (Número de cruzamentos: FO: $100,0 \pm 8,3$; FO + Lic 20: $93,8 \pm 10,4$; pMCAO: $59,8 \pm 4,8$; Número de levantamentos: FO: $14,5 \pm 4,2$; FO + Lic 20: $17,2 \pm 2,9$; pMCAO: $2,8 \pm 0,9$). O tratamento com o licopeno na dose de 20 mg/kg foi capaz proteger do déficit motor (Número de cruzamentos: pMCAO + Lic 20: $110,5 \pm 18,4$; Número de levantamentos: pMCAO + Lic 20: $12,5 \pm 2,6$). (Figuras 15 e 16).

Figura 15 - Efeito neuroprotetor do licopeno sobre déficits na atividade locomotora (número de cruzamentos) induzida por pMCAO em camundongos.



Os valores representam a mediana (mínimo e máximo). ^avs FO, ^bvs pMCAO, $p < 0,05$. Teste de Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney, ($n = 8/\text{grupo}$).

Figura 16 - Efeito neuroprotetor do licopeno sobre déficits na atividade locomotora (número de *rearings*) induzida por pMCAO em camundongos.

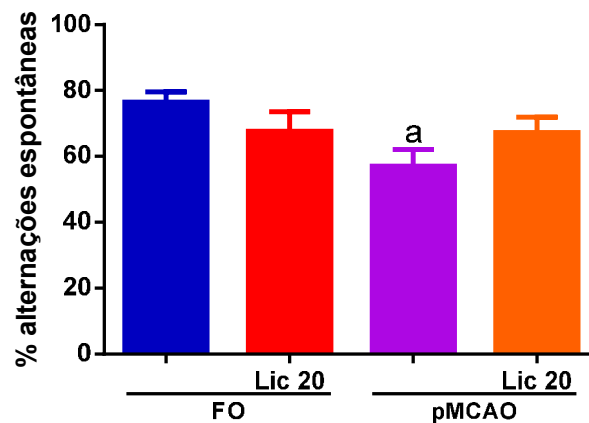


Os valores representam a mediana (mínimo e máximo). ^avs FO, ^bvs pMCAO, $p < 0.05$. Teste de Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney, ($n = 8/\text{grupo}$).

5. 4 Efeito do licopeno (20 mg/kg) sobre a memória de trabalho de camundongos submetidos à pMCAO.

Na avaliação da memória de trabalho 72 horas após a isquemia, os animais submetidos à pMCAO apresentaram um desempenho em torno de 57% de alternâncias espontâneas em relação ao controle, apresentando, assim, déficit na memória de trabalho (FO: $76,5 \pm 3,1$ %; FO + Lic 20: $67,6 \pm 5,9$ %; pMCAO: $57,0 \pm 5,1$ %). O tratamento com o licopeno na dose de 20 mg/kg foi capaz de aumentar a percentagem de alterações espontâneas, diminuindo o déficit de memória de trabalho, porém essa diminuição não se deu de maneira significativa (pMCAO + Lic 20: $67,3 \pm 4,7$ %) (Figura 17).

Figura 17 - Efeito neuroprotetor do licopeno sobre déficits de memória de trabalho induzida por pMCAO em camundongos.

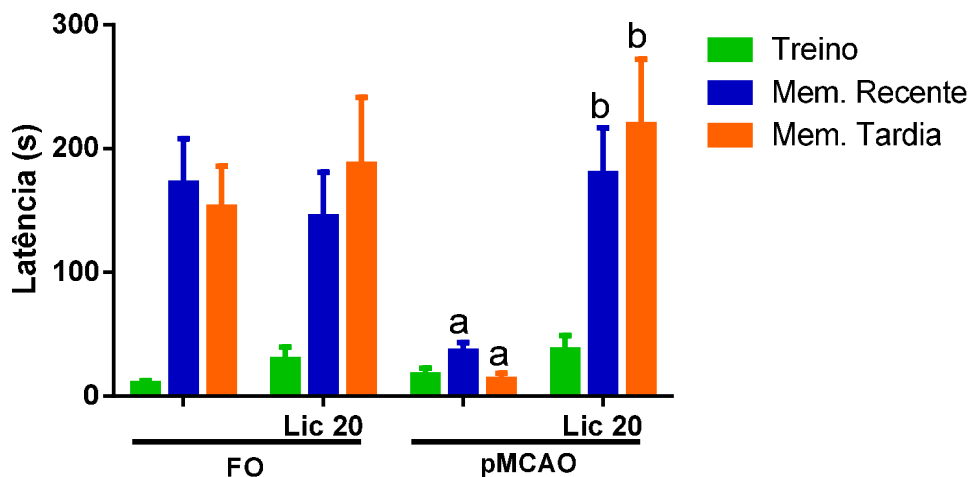


Os valores representam a média \pm EPM. ^avs FO, ^bvs pMCAO, $p < 0,05$, testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, (n = 8/grupo).

5.5 Efeito do licopeno (20 mg/kg) sobre a memória aversiva de camundongos submetidos à pMCAO.

Na avaliação da memória aversiva através do teste de esquiva passiva, os animais submetidos à pMCAO apresentaram déficits significativos de memória aversiva recente (MR) e memória tardia (MT), respectivamente 72 e 96 horas após a indução da isquemia, quando comparados com o controle (Treino: FO: $10,2 \pm 2,6$ s; FO + Lic 20: $29,6 \pm 10,08$ s; pMCAO: $17,2 \pm 5,3$ s; Mem. Recente: FO: $172,2 \pm 35,8$ s; FO + Lic 20: $144,8 \pm 35,9$ s; pMCAO: $36,3 \pm 7,2$ s; Mem. Tardia: FO: $152,5 \pm 33,5$ s; FO + Lic 20: $187,4 \pm 53,9$ s; pMCAO: $13,7,3 \pm 4,6$ s). Os animais isquemiados tratados com licopeno na dose de 20 mg/kg apresentaram uma melhora significativa no desempenho, tendo um aumento significativo no tempo de latência, tanto na memória aversiva recente (MR) quanto na memória aversiva tardia (MT), quando comparados com os animais isquemiados não tratados, mostrando, assim, que o tratamento com o licopeno foi capaz de diminuir o déficit de memória aversiva (Treino: pMCAO + Lic 20: $37,4 \pm 11,5$ s; Mem. Recente: pMCAO + Lic 20: $179,80 \pm 37,1$ s; Mem. Tardia: pMCAO + Lic 20: $219,30 \pm 52,7$ s) (Figura 18).

Figura 18 - Efeito neuroprotetor do licopeno sobre déficits de memória de aversiva induzida por pMCAO em camundongos.



Os valores representam a média ± EPM. ^avs FO, ^bvs pMCAO, $p < 0,05$, testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, (n = 8/grupo).

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou o efeito neuroprotetor do licopeno sobre a extensão da lesão neuronal, disfunções neurológicas e déficits sensório-motores, bem como nas alterações de memória induzidas pela pMCAO. Este é um modelo robusto, padronizado e os resultados como as alterações histológicas, neuroquímicas, comportamentais já estão comprovados (ASSHAFQA *et al.*, 2011) o que faz com que seja amplamente utilizado para reproduzir eventos que ocorrem no AVC em humanos.

Primeiramente, avaliou-se as alterações neurológicas 24 horas após a pMCAO através da escala anteriormente descrita por Garcia e colaboradores (1995). Os déficits sensório-motores analisados nesta escala estão relacionados ao comprometimento de regiões cerebrais específicas, como os núcleos da base, como o corpo estriado e córtex temporal (GARCIA *et al.*, 1995). Os resultados demonstraram que os animais isquemiados apresentaram déficits neurológicos significativos 24 horas após a pMCAO em relação aos animais FO's. Esses resultados são consistentes com os achados de Huang e colaboradores (2014) e Fernandes (2015) que, utilizando a mesma escala, mostraram déficits neurológicos em camundongos 24 horas após pMCAO. O tratamento com licopeno na dose de 20 mg/kg promoveu uma melhora significativa nos déficits neurológicos induzidos por pMCAO em relação aos animais isquemiados não tratados. Estes resultados corroboram com os estudos de WEI e colaboradores (2010), os quais mostraram que o licopeno (5 e 20 mg/kg v.o.) pode prevenir a resposta inflamatória ao AVC agudo e pode, assim, atuar reduzindo o domínio da área danificada no cérebro.

Em seguida, foi avaliada a extensão da área isquêmica através da coloração com TTC, que se baseia na deposição de um complexo vermelho insolúvel resultante da metabolização do TTC pela mitocôndria, ficando as regiões isquêmicas sem coloração. (GOLDLUST, 1996; TUREYEN, 2004). Bederson e colaboradores (1986) desenharam o protocolo de utilização da técnica de coloração com TTC como uma técnica eficaz para detecção e quantificação da extensão da área de infarto 24 h após isquemia cerebral em roedores.

O modelo de isquemia focal permanente leva a danos nas células neuronais culminando com a morte neuronal. Entre diversos mecanismos de dano neuronal, está a disfunção da mitocôndria, que ocorre devido à falência do metabolismo de energia e do aumento de Ca^{2+} intracelular (DURUKAN, 2007; STARKOV, 2004). Além disso, as mitocôndrias são particularmente vulneráveis ao estresse oxidativo, porque a produção

excessiva de espécies reativas de oxigênio ocorre constantemente durante a fosforilação oxidativa (BURCHELL *et al.*, 2010a, 2010b). É amplamente reconhecido que a área de infarto chega ao seu tamanho máximo, incluindo core e penumbra, de 6 a 24 horas após o início da isquemia cerebral focal permanente (CARMICHAEL, 2005; LIU *et al.*, 2011).

Os dados obtidos demonstram que os animais isquemiados apresentaram extensa área de infarto isquêmico, mostrando a correlação direta entre o tamanho da área de infarto isquêmico na região do estriado e córtex temporal e o déficit neurológico, corroborando com os resultados de outros autores, que também observaram grande extensão da área de infarto e déficits neurológicos nos animais 24 h após a pMCAO (MELANI *et al.*, 2006; CARMO *et al.*, 2014). O tratamento com licopeno foi capaz de diminuir de forma significativa a extensão da área de infarto isquêmico nas doses de 10 e 20 mg/kg v.o. quando administrado 1 hora após a indução da pMCAO, demonstrando, portanto, efeito neuroprotetor. Corroborando com estes resultados, outros trabalhos demonstraram que o licopeno (4 mg/kg i.p.) foi capaz de diminuir a área de infarto na lesão em modelo de isquemia/reperfusão em ratos através da inibição da inflamação e do estresse oxidativo induzido pela isquemia, eliminando a atividade de radicais livres, bem como atuando na inibição de NO, bem como danos às enzimas respiratórias mitocondriais (HSIAO *et al.*, 2004; WEI *et al.*, 2010). Estudos de Fujita e colaboradores (2013) também mostraram que o tratamento com licopeno (5 mg em 100 g de alimento v.o.) em ratos atua protegendo contra lesões cerebrais induzidas por isquemia/reperfusão, aumentando a atividade de superóxido dismutase (SOD) do hipocampo e inibindo a apoptose.

Apesar de já existirem trabalhos na literatura que mostrem o efeito do licopeno na diminuição da lesão isquêmica e em modelos de doenças neurodegenerativas como modelos de doença de Parkinson e doença de Alzheimer, nenhum trabalho demonstrou o efeito neuroprotetor do licopeno sobre os déficits locomotores e de memória induzidos pela isquemia cerebral. O presente estudo mostra pela primeira vez a atividade neuroprotetora do licopeno frente à disfunção locomotora e de memória aversiva induzidas pela pMCAO.

Neste estudo, a atividade locomotora foi avaliada através do teste do campo aberto, observando-se a capacidade de realização da exploração horizontal (*crossings*) e da exploração vertical (*rearigns*) dos camundongos submetidos à pMCAO, parâmetros que estão alterados quando há comprometimento da função mesocorticoestriatal (KALIVAS *et al.*, 1988). A lesão isquêmica focal apresenta-se principalmente no córtex e no corpo estriado, danos a essas áreas podem levar, assim, a uma redução da função motora (SHENG, 2010). Os resultados mostraram que os animais isquemiados apresentaram comprometimento motor

significativo na atividade locomotora horizontal e vertical, e que o licopeno na dose de 20 mg/kg foi capaz de proteger os animais dessas alterações motoras induzidas pela pMCAO.

Outros trabalhos demonstraram o efeito protetor do licopeno (5, 10 e 20 mg/kg/dia v.o.) sobre alterações motoras induzidas pelo MPTP, modelo de Doença de Parkinson em camundongos, avaliado pelos testes de caminhada com feixe (equilíbrio e coordenação motora), teste de campo aberto (para medir a locomoção e a atividade) e o teste de bloqueio (para acessar a força neuromuscular e a coordenação) (PREMA *et al.*, 2015), corroborando com os nossos resultados em relação a atividade locomotora. Apesar do modelo ser diferente, dados de Lin e colaboradores (2014) demonstraram o efeito antineuroinflamatório e protetor do licopeno (5 e 10 mg/kg i.p.) sobre alterações motoras induzido por modelo de LPS em ratos, avaliado pela análise imunohistoquímica da ativação micrógliã e o teste de *rotarod* acelerado.

O modelo de memória operacional utilizado é baseado na tendência dos animais de explorar novos ambientes e nesse teste influências como componente emocional ou motivação são minimizadas, também há uma dissociação entre aprendizagem e memória visto que não é necessário aprender nenhuma regra (DELLU *et al.*, 1992; 1994). O hipocampo e o córtex pré-frontal estão envolvidos neste tipo de memória. O córtex pré-frontal anatomicamente está conectado ao hipocampo ventral e indiretamente ao hipocampo dorsal através do tálamo (YOO *et al.*, 2008). A exploração de um novo ambiente nos animais depende da integridade de sistemas límbicos e não límbicos como prosencéfalo basal, o hipocampo, o tálamo, o córtex pré-frontal, o corpo estriado dorsal, além do sistema vestibular e cerebelo (LALOND, 2002).

Estudos mostram que a isquemia cerebral pode levar a déficits na memória de trabalho (CORBETT & NURSE, 1997). Kim e colaboradores (2011) observaram que a isquemia global em gerblis induzia déficits na memória de trabalho avaliada pelo teste do labirinto em Y. Lu e colaboradores (2007) e Fernandes (2014) observaram déficit na memória de trabalho 24 h após a indução pMCAO. No presente trabalho, a memória de trabalho foi avaliada 72 h após a isquemia cerebral através do labirinto em Y e demonstrou-se que os animais isquemiados apresentavam déficits neste tipo de memória. O tratamento com o licopeno na dose de 20 mg/kg v.o. promoveu melhoras no déficit de memória de trabalho induzidos pela pMCAO, no entanto, esta não se deu de forma significativa. Contudo, trabalhos recentes demonstraram o efeito neuroprotetor do licopeno (4 mg/kg v.o.) frente a déficits de memória de trabalho avaliada pelo reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris em ratos submetidos à modelo de demência induzida por dieta hipercalórica

(WANG *et al.*, 2016). Outros trabalhos mostraram os efeitos neuroprotetores de outros carotenóides, como a crocina (30 mg/kg i.p.), um carotenóide solúvel em água, que foi capaz de prevenir o déficit de memória de trabalho no labirinto em Y em ratos submetidos a modelo de Doença de Alzheimer esporádico induzido pela estreptozotocina (KHALILI, HAMZEH, 2010).

A esQUIVA passiva é uma das formas mais comuns de medir a função cognitiva em modelos experimentais (DEVRIES *et al.*, 2001). A esQUIVA passiva do tipo “descer um degrau”, ou do inglês “*step-down*”, é baseado no comportamento natural que os roedores têm de explorar além da plataforma, mas também de se esquivar da situação aversiva gerada pelo choque na parte gradeada do aparato. Por essa razão, esse modelo pode ser empregado para se estudar a memória aversiva (IZQUIERDO, MEDINA, 1997). Animais submetidos à MCAO apresentam déficits nas memórias recente e tardia avaliadas no teste de esQUIVA passiva (WAHL *et al.*, 1992).

No presente trabalho, observou-se que os animais submetidos à pMCAO apresentaram déficit na memória aversiva recente e tardia e que o tratamento com o licopeno na dose de 20 mg/kg foi capaz de proteger de forma significativa esses déficits. Este resultado corrobora com os achados de Khalili & Hamzeh (2010), que demonstraram que a crocina, um carotenóide solúvel em água, que foi capaz de prevenir o déficit de memória aversiva em ratos submetidos a modelo de Doença de Alzheimer esporádico induzido pela estreptozotocina. O licopeno (2,5 e 5 mg/kg v.o.) também foi capaz de prevenir déficits de memória espacial avaliada através do teste de labirinto aquático de Morris induzidos pela colchicina, um potente agente citotóxico que induz neurotoxicidade e morte de neurônios do hipocampo através do aumento do estresse oxidativo (PRAKASH, KUMAR, 2013).

Além disso, outros trabalhos demonstraram o efeito neuroprotetor do licopeno em modelos de doenças neurodegenerativas. PREMA e colaboradores (2015) demonstraram o efeito neuroprotetor do licopeno em camundongos submetidos a modelo de Doença de Parkinson induzido pela neurotoxina MPTP através da diminuição do estresse oxidativo e da apoptose. Sachdeva e Chopra (2015) demonstraram efeito neuroprotetor do licopeno (1, 2 e 4 mg/kg) melhorando a função cognitiva de ratos submetidos a modelo de Doença de Alzheimer induzida pela injeção i.c.v. de A β -amiloide avaliado através do teste de labirinto aquático de Morris, através da inibição da ativação do NF-kB e da diminuição de citocinas pro-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β . Os mecanismos pelos quais o licopeno exerce seu efeito neuroprotetor ainda não estão totalmente estabelecidos, porém evidências sugerem que as ações antioxidante, antiinflamatória e anti-apoptóticas estejam envolvidas.

Estudos de Kumar e colaboradores (2009), mostraram que o licopeno (2,5 , 5 e 10 mg/kg v.o.) associado com epigallocatequina-3-galato (EGCG) (10, 20 e 40 mg/kg v.o.) são capazes de reverter o comprometimento da memória, avaliado através do teste de labirinto aquático de Morris, e modificações no sistema de glutathione provocados pelo tratamento com 3-Nitropropionic ácido (3-NP), em modelo de doença de Huntington em ratos. Prakash e Kumar (2014) também mostraram o efeito neuroprotetor do licopeno (2,5 e 5 mg/kg), avaliado pelo teste de labirinto aquático de Morris, sobre a atividade locomotora e o comprometimento cognitivo em ratos submetidos a modelo de Doença de Alzheimer induzido por β -amilóide (β -A1-42). Outros estudos de ZENG e colaboradores (2009) mostraram que o licopeno (44 mg/kg v.o.) pode efetivamente reduzir o nível lipídico sérico em ratos hiperlipidêmicos experimentais, induzidos por proteína precursora amiloide (APP), *bax* e *bcl-2* na região CA1 do hipocampo. O estudo indica que o licopeno pode manter a normalidade morfológica dos neurônios do hipocampo de ratos hiperlipidêmicos e, possivelmente inibir a expressão excessiva de APP do hipocampo, promovendo um aumento da regulação e expressão do gene *bcl-2*, inibidor da apoptose, e uma diminuição da regulação e expressão do gene *bax*, que promove a apoptose, mantendo a constância da razão *bcl-2/bax*, protegendo, assim, os neurônios hipocampais.

Evidências recentes sugerem uma ligação íntima entre uma geração excessiva de EROs e o desenvolvimento de morte neuronal no hipocampo (HAYASHI *et al.*, 2003). O licopeno, com onze ligações conjugadas e duas ligações duplas não conjugadas, é o inibidor mais eficiente de oxigênio *singlete* entre todos os carotenóides naturais. Postula-se que o aumento do número de ligações duplas conjugadas são responsáveis pela atividade antioxidante na molécula carotenóide (KOBAYASHI e SAKAMOTO, 1999). Durante a extinção de O₂, a energia é transferida da molécula de O₂ para a molécula de licopeno, convertendo-a para o estado *triplete* rico em energia. Assim, o licopeno pode proteger *in vivo* contra a oxidação de lipídios, proteínas e DNA (YI *et al.*, 2013). Com isso, o licopeno pode afetar a função de defesa oxidativa, possivelmente devido à sua capacidade para modular ambiente redox celular protegendo as enzimas antioxidantes. Além disso, uma sub-regulação da produção de citocinas por licopeno extraído e produtos derivados do tomate foram avaliados em culturas de células, bem como em seres humanos (PRAKASH e KUMAR, 2014). Mecanismos alternativos do licopeno na proteção contra danos oxidativos incluem β -caroteno como um antioxidante de rompimento de cadeia para terminar a oxidação lipídica e diminuir a liberação celular de lactato desidrogenase para proteger as células da peroxidação lipídica e danos à membrana (SEO *et al.*, 2009).

Um estudo realizado por LEBDA e colaboradores (2011), indicou que o licopeno possibilita a proteção contra neurotoxinas ambientais e contra níveis excessivos de certos elementos tóxicos, como o manganês, através do emprego de suas propriedades antioxidantes extremamente potentes. Além disso, outros estudos têm evidenciado que a administração crônica de licopeno como tratamento é capaz de atenuar significativamente o dano oxidativo, demonstrando seu efeito como antioxidante. Indicando, assim, que o licopeno, o antioxidante mais eficaz entre os carotenóides, é altamente eficiente na eliminação de O_2 (AYDIN *et al.*, 2013). Relatórios de estudos publicados recentemente reforçam o fato de que o licopeno atua restaurando enzimas do complexo mitocondrial (PRAKASH e KUMAR, 2013).

Diante do exposto, evidenciamos que o licopeno possui atividade neuroprotetora, sendo capaz de reverter os déficits neurológicos e de memória aversiva induzidos pela isquemia cerebral, exercendo um efeito benéfico sobre a memória de processamento e esta ação pode estar atribuída, pelo menos em parte, a sua atividade anti-inflamatória e antioxidante, apesar de outros mecanismos não poderem ser descartados. Sugerimos também que sua ação antioxidante e anti-inflamatória sejam cruciais para seu desempenho como molécula neuroprotetora. No entanto, uma investigação mais aprofundada é necessária para elucidar as expressões moleculares e genes envolvidos no efeito neuroprotetor do licopeno.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo foi discutido o efeito do licopeno em camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente e foi mostrado que o licopeno foi capaz de diminuir os déficits neurológicos, aumentando o desempenho sensório-motor, diminuir a extensão da área de infarto isquêmico; diminuir os déficits motores na memória aversiva induzida pela pMCAO. Esses resultados demonstraram que o licopeno possui ação neuroprotetora pelo menos, em parte, devido à sua atividade antiinflamatória e antioxidante, sendo necessária uma investigação mais aprofundada para elucidar os mecanismos envolvidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, S.; RAO, A. V. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. **Canad Med Assoc J**; 163(6): 739-44, 2000.
- AHMED, N.; NASMAN, P.; WAHLGREN, N. G. Effect of intravenous nimodipine on blood pressure and outcome after acute stroke. **Stroke**, v. 31, p. 1250–1255, 2000.
- ALLEN, C. L.; BAYRAKTUTAN, U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. **International Journal of Stroke**, v. 4, p. 461–470, 2009.
- ARAB, L.; STECK, S. Lycopene and cardiovascular disease. **Am J Clin Nutr**; 71(6):1691-5, 2000.
- ATESSAHIN, A.; CERIBASI, A.O.; YILMAZ, S. Lycopene, a carotenoid, attenuates cyclosporine-induced renal dysfunction and oxidative stress in rats. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.** 100, 372–376, 2007.
- ATESSAHIN, A.; YILMAZ, S.; KARAHAN, I.; CERIBASI, A. O.; KARAOGLU, A.. Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. **Toxicology** 212, 116–123, 2005.
- AYDIN, S.; TOKAC, M.; TANER, G.; ARIKOK, A.T.; DUNDAR, H.Z.; OZKARDES, A. B.; TASLIPINAR, M. Y.; KILIC, M.; BASARAN, A. A.; BASARAN, N. Antioxidant and antigenotoxic effects of lycopene in obstructive jaundice. **J. Surg. Res.** 182, 285–295, 2013.
- BARONE, F. C.; FEUERSTEIN, G. Z. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. **J. Cereb. Blood Flow Metab**, v. 9, p. 819–834, 1999.
- BEDERSON, J. B.; PITTS, L. H.; GERMANO, S. M.; NISHIMURA, M. C.; DAVIS, R. L.; BARTKOWSKI, H. Evaluation of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. **Stroke**, v. 17, p. 1304–1308, 1986.
- BRAIT, V.H.; JACKMAN, K.A.; WALDUCK, A.K.; SELEMIDIS, S.; DIEP, H.; MAST, A.E.; GUIDA, E.; BROUGHTON, B.R.; DRUMMOND, G.R.; SOBEY, C.G. Mechanisms contributing to cerebral infarct size after stroke: gender, reperfusion, T lymphocytes, and Nox2-derived superoxide. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** v.30, p.1306–1317, 2010.
- BRIONI, J. D. Role of GABA during the multiple consolidation of memory. **Drug Development Research**, v. 28, p. 3–27, 1993.
- BROADHURST, P. L. Determinants of emotionality in the rat: I situational factors. **Brit J Psychol**, v. 48, p. 1-12, 1957.
- BROUGHTON, B.R.; LIM, R.; ARUMUGAM, T.V.; DRUMMOND, G.R.; WALLACE, E.M.; SOBEY, C.G. Post-stroke inflammation and the potential efficacy of novel stem cell therapies: focus on amnion epithelial cells. **Front Cell Neurosci.** v. 6, p. 66, 2013.

- BROUGHTON, B.R.; REUTENS, D.C.; SOBEY, C.G. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. **Stroke**, v. 40, p. 331–339, 2009.
- BROUNS, R.; DE DEYNA, P. P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 111, p. 483–495, 2009.
- BURCHELL, V. S.; GANDHI, S.; DEAS, E.; WOOD, N. W.; ABRAMOV, A. Y.; PLUNFAVREAU, H. Targeting mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disease: part I. **Expert Opin. Ther. Targets** 14, 369–385, 2010a.
- CAPLAN, L. R.; SCHMAHMANN, J. D.; KASE, C. S.; FELDMAN, E.; BASQUIS, G.; GREENBERG, J. P.; GORELICK, P. B.; HELGASON, C.; HIER, D. B. Caudate infarcts. **Arch Neurol**, Vol. 47, p. 133-143, 1990.
- CASSO, D.; WHITE, E; PATTERSON, R. E.; AGURS-COLLINS, T.; KOOPERBERG, C.; HAINES, P. S. Correlates of serum lycopene in older women. **Nutr Cancer**, 36(2):163-9, 2000.
- CHAN, P. H. Role of oxidants in ischemic brain damage. **Stroke**, v. 27, p. 1124-1129, 1996..
- CLINTON, S. K.; EMENHISER, C.; SCHWARTZ, S. J.; BOSTWICK, D. G.; WILLIAMS, A. W.; ERDMAN, J. W. Cis-trans lycopene isomers, carotenoids and retinol in the human prostate. **Cancer Epidemiol**; 5:823-33, 1996.
- COHEN, L. A. A review of animal model studies of tomato carotenoids, lycopene, and cancer chemoprevention. **Exp. Biol. Med.** (Maywood) 227, 864– 868, 2002.
- CRAMER, S. C. *et al.* A pilot study of somatotopic mapping after cortical infarct. **Stroke**, v. 31, p. 668-671, 2000.
- DEW, I. T. Z.; CABEZA, R. The porous boundaries between explicit and implicit memory: behavioral and neural evidence. **Ann NY Acad Sci**, v.1224, p. 174-190, 2011.
- DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, S. Lycopene as the most efficiente biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch Biochem Biophys**; 274(2):532-8, 1989.
- DING, S. Dynamic reactive astrocytes after focal ischemia. **Neural Regen Res.** v. 9, p. 20482052, 2014.
- DIRNAGL, U.; ISADECOLA, C.; MOSKOWITZ M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends Neurosci**, v. 22, p. 391–397, 1999.
- DJURIC, Z.; POWELL, L. C. Antioxidant capacity of lycopene-containing foods. **Int J Food Sci Nutr**; 52:143-9, 2001.
- DOYLE, K. P.; SIMON, R. P.; STENZELPOORE, M. P. Mechanisms of ischemic brain damage. **Neuropharmacology**, v. 55, p. 310 – 318, 2008.
- DURUKAN, A.; TATLISUMAK, T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 87, p. 179–197, 2007.

EDVINSSON, L.; KRAUSE, D. N. Cerebral Blood Flow and Metabolism. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2002.

EHRENSPERGER, E.; MINUK, J.; DURCAN, L.; MACKEY, A.; WOLFSON, C.; FONTAINE, A. M.; CÔTÉ, R. Predictive value of soluble intercellular adhesion molecule-1 for risk of ischemic events in individuals with cerebrovascular disease. **Cerebrovasc Dis.** v. 20, p. 456–462, 2005.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol. Pathol.** 35, 495–516, 2007.

ERDMAN, J. R. Variable bioavailability of carotenoids from vegetables. **Am J Clin Nutr;** 70(2):179-80, 1999.

ERDMAN, J. W. JR.; SMITH, J. W.; KUCHAN, M. J.; MOHN, E. S.; JOHNSON, E. J.; RUBAKHIN, S. S., *et al.* Lutein and brain function. **Foods** 4,547–564, 2015.

FERNANDES, F. D. P. Efeito neuroprotetor do ácido cafeico em camundongos submetidos á isquemia cerebral focal permanente. 2014. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2014.

FERNANDES, M. Y. S. D. Efeito neuroprotetor do α -bisabolol em camundongos submetidos á isquemia cerebral focal permanente. 2015. 111 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

FREEMAN, V. L.; MEYDANI, M.; YONG, S.; PYLE, J.; WAN, Y.; ARVIZU-DURAZO R., *et al.* Prostatic levels of tocopherols, carotenoids and retinol in relation to plasma levels and self-reported usual dietary intake. **Am J Epidemiol.** 151(2):109-18, 2000.

FRIEDLANDER, R. M. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. **N Engl J Med.** v. 348, p. 1365–1375, 2003.

FRIEDMAN, M. Anticarcinogenic, cardioprotective, and other health benefits of tomato compounds lycopene, alpha-tomatine, and tomatidine in pure form and in fresh and processed tomatoes. **J. Agric. Food Chem.** 61, 9534–9550, 2013.

FUJITA, K.; YOSHIMOTO, N.; KATO, T.; IMADA, H.; MATSUMOTO, G.; INAKUMA, T.; ... MIYACHI, E. Lycopene inhibits ischemia/reperfusion-induced neuronal apoptosis in gerbil hippocampal tissue. **Neurochemical Research,** Res 38:461–469, 2013.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J.M.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H.; BLAGOSKLONNY, M.V.; DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L.; EL-DEIRY, W.S.; FULDA, GARCIA, J. G. Neurological Deficit and Extent of Neuronal Necrosis Attributable to Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. **Stroke,** v. 26, p. 627-635, 1995.

GARRITANO, C. R.; LUZ, P. M.; PIRES, M. L. E.; BARBOSA, M. T. S.; BATISTA, K. M. Análise da tendência da mortalidade por Acidente Vascular Cerebral no Brasil no século XXI. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia,** 2012.

GARTNER, C.; STAHL, W.; SIES, H. Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. **Am J Clin Nutr;** 66(1):116-22, 1997.

GELDERBLOM, M.; WEYMAR, A.; BERNREUTHER, C.; VELDEN, J.; ARUNACHALAM, P.; STEINBACH, K.; ORTHEY, E.; ARUMUGAM, T.V.; LEYPOLDT, F.; SIMOVA, O.; THOM, V.; FRIESE, M.A.; PRINZ, I.; HÖLSCHER, C.; GLATZEL, M.; KORN, T.; GERLOFF, C.; TOLOSA, E.; MAGNUS, T. Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke. **Blood**, v. 120, p. 3793-802 2012.

GILGUN-SHERKI, Y.; ROSENBAUM, Z.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. **Pharmacol Rev.**, vol. 54, p. 271-284, 2002.

GINSBERG, M. D. Neuroprotection for ischemic stroke: Past, present and future. **Neuropharmacology**, v. 55, p. 363-389, 2008.

GINSBERG, M. D. Neuroprotection in brain ischemia: an update Parts I and II. **Neuroscientist**, v. 1, p. 95175, 1995.

GIOVANNUCCI, E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. **J Natl Cancer Inst.**; 91(4):317-31, 1999.

GOLD, P. E. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. **Behav. Neural Biol.** v. 46, p. 87-98, 1986.

GOLDLUST, E. J.; PACZYNSKI, R. P.; HE, Y. Y.; HSU, C. Y.; GOLDBERG, M. P. Automated measurement of infarct size with scanned images of triphenyltetrazolium chloridestained rat brains. **Stroke**, v. 27, p. 1657-1662, 1996.

GOLDMAN-RAKIC, P. S. Working memory and the mind. **Sci Am.**, v. 267, p. 110 -117, 1992.

GOMES, Fabio da Silva. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 20, n. 5, p. 537-548, Oct. 2007.

GORMAN, A. M. Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: recurring themes around protein handling. **J. Cell. Mol. Med.** 12, 2263-2280, 2008.

HAEGELE, A. D.; GILLETTE, C.; O'NEILL, C.; WOLFE, P.; HEIMENDINGER, J.; SEDLACEK, S, *et al.* Plasma xanthophyll carotenoids correlate inversely with indices of oxidative DNA damage and lipid peroxidation. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 9(4):421-5, 2000.

HARING, H. P.; BERG, E. L.; TSURUSHITA, N.; TAGAYA, M.; DEL ZOPPO, G. J. E-HATTORI, K.; LEE, H.; HURN, P. D.; CRAIN, B. J.; TRAYSTMAN, R. J.; DEVRIES, A. C. Cognitive deficits after focal cerebral ischemia in mice. **Stroke**, v. 31, p. 1939-1944, 2000.

HAYASHI, T.; SAITO, A.; OKUNO, S.; FERRAND-DRAKE, M.; DODD, R. L.; NISHI, T.; MAIER, C. M.; KINOCHI, H.; CHAN, P. H.. Oxidative damage to the endoplasmic reticulum is implicated in ischemic neuronal cell death. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** 23, 1117-1128, 2003

HEIMFARTH, L.; LOUREIRO, S. O.; DUTRA, M. F.; PETENUZZO, L.; DE LIMA, B. O.; FERNANDES, C. G.; DA ROCHA, J. B. T.; PESSOA-PUREUR, R. Disrupted cytoskeletal homeostasis, astrogliosis and apoptotic cell death in the cerebellum of preweaning rats injected with diphenyl ditelluride, 2013.

HOFFMANN, M.; CASES, L. B.; HOFFMANN, B.; CHEN, R. The impact of stroke on emotional intelligence. **BMC Neurology**, v. 10, p. 103, 2010.

HOL, E. M.; PEKNY, M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 32, p. 121–130, 2015.

HOL, Z. Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review, in: **Apoptosis and Medicine**, 2012.

HOSSMANN, K. A. Pathophysiological basis of translational stroke research. **Folia Neuropathol**, v. 47(3), p. 213-227, 2009.

HSIAO, G.; FONG, T.H.; TZU, N. H.; LIN, K. H.; CHOU, D. S.; SHEU, J. R. A potent antioxidant, lycopene, affords neuroprotection against microglia activation and focal cerebral ischemia in rats. **In Vivo**, 18 (3), 351e356, 2004.

HUANG, J.; UPADHYAY, U. M.; TAMARGO, R. J. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. **Surg Neurol**. v. 66, p. 232-245, 2006.

HUANG, W.; LV, B.; ZENG, H.; SHI, D.; LIU, Y.; CHEN, F.; LI, F.; LIU, X.; ZHU, R.; YU, L.; JIANG, X. Paracrine factors secreted by mscs promote astrocyte survival associated with gfap downregulation after ischemic stroke via p38 MAPK and JNK. **J Cell Physiol**. 2015.

IZQUIERDO, I.; DA CUNHA, C.; ROSAT, R.; JERUSALINSKY, D.; FERREIRA, M. B. C.; MEDINA, J. H. Neurotransmitter receptors involved in memory processing by the amygdala, medial septum and hippocampus of rats. **Behavioral and Neural Biology**, v. 58, p. 16–25, 1992.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. **Eur J Med Chem** 70: 102–110, 2013.

JONKER, D.; KUPER, C. F.; FRAILE, N.; ESTRELLA, A.; RODRIGUEZ, O. C. Ninety-day oral toxicity study of lycopene from *Blakeslea trispora* in rats. **Regul Toxicol Pharmacol**, 37(3):396-406, 2003.

JOUAN-LANHOUE, S.; RIQUET, F.; DUPREZ, L.; VANDEN B. T.; TAKAHASHI, N.; VANDENABEELE, P. Necroptosis, *in vivo* detection in experimental disease models, **Seminars in Cell & Developmental Biology**. v. 35, p. 2–13, 2014.

KHACHIK, F.; BEECHER, G. R.; GOLI, M. B. Separation, identification, and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography. **Pure Appl Chem**, 63(1):71-80, 1991.

KHACHIK, F.; CARVALHO, L.; BERNSTEIN, P. S.; MUIR, G. J.; ZHAO, D. Y.; KATZ, N. B. Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. **Exp. Biol. Med.** (Maywood) 227, 845 e 85, 2002.

KHAKSAR, Z.; JAHROMI, H. K. The Effect of Lycopene on Cerebellum Histomorphometric Alteration of Rat Pups Born to Alcohol Consuming Mother Rats. **Biomedical & Pharmacology Journal**, Vol. 8(2), 1001-1005, 2015.

KHALILI, M., & HAMZEH, F. Effects of active constituents of crocus sativus L, crocin on streptozocin-induced model of sporadic Alzheimer's disease in male rats. **Iranian Biomedical Journal**, 14(1-2), 59-65, 2010.

KIM, J.Y.; KAWABORI, M.; YENARI, M.A. Innate inflammatory responses in stroke: mechanisms and potential therapeutic targets. **Curr Med Chem.** v.21, p. 2076-2097. 2014.

KLEINDORFER, D.; LINDSELL, C.J.; BRASS, L.; KOROSHETZ, W.; BRODERICK, J.P. National US estimates of recombinant tissue plasminogen activator use: ICD-9 codes substantially underestimate. **Stroke.** v. 39, p. 924-928, 2008.

KOBAYASHI, M.; SAKAMOTO, Y. Singlet oxygen quenching ability of astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis*. **J. Biotechnol. Lett.** 21, 265-269, 1999.

KRINSKY, N. I. Carotenoids as antioxidants. **Nutrition**; 17:815-7, 2001.

KRISTAL, A. R.; COHEN, J. H. Invited commentary: Tomatoes, lycopene, and prostate cancer. How strong is the evidence? **Am J Epidemiol.** 151(2):124-7, 2000.

KUMAR, P. e KUMAR, A. Effect of lycopene and epigallocatechin-3-gallate against 3 nitropropionic acid induced cognitive dysfunction and glutathione depletion in rat: a novel nitric oxide mechanism. **Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, 47(10), 2522-30, 2009.

LAN L.; TAO, J.; CHEN, A.; XIE, G.; HUANG, J.; LIN, J.; PENG, J.; CHEN, L. Electroacupuncture exerts anti-inflammatory effects in cerebral ischemia-reperfusion injured rats via suppression of the TLR4/NF- κ B pathway. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 31, p. 75-80, 2013.

LEBDA, M. A.; EL-NEWESHY, M. S.; EL-SAYED, Y. S. Neurohepatic toxicity of subacute manganese chloride exposure and potential chemoprotective effects of lycopene. **Neurotoxicology.** ; 33(1):98-104, 2012.

LI, C.Y.; LI, X.; LIU, S.F.; QU, W.S.; WANG, W.; TIAN, D.S. Inhibition of mTOR pathway restrains astrocyte proliferation, migration and production of inflammatory mediators after oxygen-glucose deprivation and reoxygenation. **Neurochemistry International.** v. 83, p. 918, 2015.

LI, X.; FANG, P.; MAI, J.; CHOI, E.T.; WANG, H.; YANG, X.F. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. **J. Hematol. Oncol.** v. 6, p.19. 2013.

- LIN, H.-Y.; HUANG, B.-R.; YEH, W.-L.; LEE, C.-H.; HUANG, S.-S.; LAI, C.-H.; ... LU, D. Y. Antineuroinflammatory effects of lycopene via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase- α 1/heme oxygenase-1 pathways. **Neurobiology of Aging**, 35(1), 191–202, 2014.
- LIPTON, P. Ischemic Cell Death in Brain Neurons. **Physiol Rev**, v. 79, p. 1431-1568, 1999.
- LIU, Y.; TANG, G.; LI, Y.; WANG, Y.; CHEN, X.; GU, X.; ZHANG, Z.; WANG, Y.; YANG, G.Y. Metformin attenuates blood-brain barrier disruption in mice following middle cerebral artery occlusion. **J. Neuroinflammation**. v.11, p.177, 2014.
- LONDON, A.; COHEN, M.; SCHWARTZ, M. Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. **Front Cell Neurosci**. v.7, p. 34. 2013.
- LU, C.-C.; YEN, G.-C. Antioxidative and anti-inflammatory activity of functional foods. **Current Opinion in Food Science** 2:1–8, 2015.
- LU, N. et al. Effect of hypoxic preconditioning on the learning and memory ability and expressions of surviving and HSP-70 proteins in rats with focal cerebral ischemia/reperfusion injury. **J. South Med. Univ.**, v. 27, n.12, 2007.
- LUCAS, J. A. Encyclopedias of the Human Brain. **Memory, Overview**, v. 1, p. 817 – 833, 2002.
- LUKIC-PANIN, V.; KAMIYA, T.; ZHANG, H.Z.; HAYASHI, T.; TSUCHIYA, A.; SEHARA, Y.; DEGUCHI, K.; YAMASHITA, T.; ABE, K. Prevention of neuronal damage by calcium channel blockers with antioxidative effects after transient focal ischemia in rats. **Brain Res.**, v. 1176, p. 143150, 2007.
- MACHADO, A. Vascularização do sistema nervoso central e barreiras encefálicas. Neuroanatomia funcional. São Paulo: **Atheneu**; p. 87-99, 2002.
- MAUD, A. Memory loss after stroke. **Ameri Academy of Neurol.**, v.24, p. 67, 2006.
- MELDRUM, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J. Nutr.**, p130, 2000.
- MICHAUD, D. S.; FESKANICH, D.; RIMM, E. B.; COLDITZ, G. A.; SPEIZER, F. E.; WILLETT, W. C.; *et al.* Intake of carotenoids and risk of lung cancer in 2 prospective US cohorts. **Am J Clin Nutr**. 72(4):990-7, 2000.
- MIGUEL, M. P.; MENEZES, L. B. D.; ARAÚJO, E. G. D. Fisiopatologia do estresse oxidativo após isquemia e reperfusão cerebral e potencial neuroprotetor do pequi (Cariocar brasileiro). **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, p. 1976, 2012.
- MORI, T.; TAN, J.; ARENDASH, G.W.; KOYAMA, N.; NOJIMA, Y.; TOWN, T. Overexpression of human S100B exacerbates brain damage and periinfarct gliosis after permanent focal ischemia. **Stroke**. v. 39, p. 2114–2121, 2008.

- MORO, M. A.; ALMEIDA, A.; BOLANOS, J. P.; LIZASOAIN, I. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. **Free Radical Biology & Medicine** 39. Julho, 2005.
- MUMBY, D. G.; WOOD, E. R.; DUVA, C. A.; KORNECOOK, T. J.; PINEL, J. P.; PHILLIPS, A. G. Ischemia-induced object recognition deficits in rats are attenuated by hippocampal ablation before or soon after ischemia. **Behav Neurosci.**, v. 110, p. 266-281, 1996.
- NAGATA, S.; GOLSTEIN, P. The Fas death factor. **Science.** v. 247, p. 1449-1456, 1995.
- NASIR, M. U.; HUSSAIN, S.; JABBAR, S. Tomato processing, lycopene and health benefits: a review. **Sci Lett** 3(1): 1–5, 2015.
- NIKOLETOPOULOU, V.; MARKAKI, M.; PALIKARAS, K.; TAVERNARAKIS, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochim. Biophys. Acta** 1833, 3448–3459, 2013.
- OLSON, J. A. Carotenoids and human health. **Arch Latinoam Nutr**, 49(3 Suppl 1):7-11, 1999.
- PARKER, R. S.; SWANSON, J. E.; YOU, C. S.; EDWARDS, A. J.; HUANG, T. Bioavailability of carotenoids in human subjects. **Proc Nutr Soc.** 58(1):155-62, 1999.
- PERSSON, M.; FHAGER, A.; TREFNÁ, H.D.; YU, Y.; MCKELVEY, T.; PEGENIUS, G.; KARLSSON, J.E.; ELAM, M. Microwave-based stroke diagnosis making global prehospital thrombolytic treatment possible. **IEEE Trans Biomed Eng.** v. 61, p. 2806-2817, 2014.
- PLAMONDON, H.; MORIN, A.; CHARRON, C. Chronic 17-beta-estradiol pretreatment and ischemia-induced hippocampal degeneration and memory impairments: A 6-month survival study. **Horm Behav**, v.30, p.30, 2006.
- POOL-ZOBEL, B. L.; BUB, A.; MÜLLER, H.; WOLLOWSKI, I.; RECHKEMMER, G. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. **Carcinogenesis.** 18(9):1847-50, 1997.
- PORRINI, M.; RISO, P.; BRUSAMOLINO, A.; BERTI, C.; GUARNIERI, S.; VISIOLI, F. Daily intake of a formulated tomato drink affects carotenoid plasma and lymphocyte concentrations and improves cellular antioxidant protection. **Br J Nutr.**; 93(1):93-9, 2005.
- PRADEEP, H.; DIYA, J. B.; SHASHIKUMAR, S.; RAJANIKANT, G. K. Oxidative stress – assassin behind the ischemic stroke. **Folia Neuropathol.**, v. 50(3), p. 219-230, 2012.
- PRAKASH, A.; KUMAR, A. Implicating the role of lycopene in restoration of mitochondrial enzymes and BDNF levels in β -amyloid induced Alzheimer's disease. **European Journal of Pharmacology**, 74:104–111, 2014.
- PRAKASH, A.; KUMAR, A. Lycopene protects against memory impairment and mitochondrial oxidative damage induced by colchicine in rats: an evidence of nitric oxide signaling. **Eur. J. Pharmacol.** 721, 373–381, 2013.

- PREMA, A.; JANAKIRAMAN, U.; MANIVASAGAM, T. e JUSTIN THENMOZHI, A. Neuroprotective effect of lycopene against MPTP induced experimental Parkinson's disease in mice. **Neuroscience Letters**, 599, 12–19, 2015.
- RAFI, M. M.; YADAV, P. N.; REYES, M. Lycopene inhibits LPS-induced proinflammatory mediator inducible nitric oxide synthase in mouse macrophage cells. **J. Food Sci.** 72, S069–S074, 2007.
- RAO, A.V.; AGARWAL, S. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review. **Nutr Res.** 19(2):305-23, 1999.
- RUTZ, J. K.; BORGES, C. D.; ZAMBIAZI, R. C.; DA ROSA, C. G.; DA SILVA, M. M. Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for applications in food. **Food Chem** 202: 324–333, 2016.
- GOTTLIEB, E.; GREEN, D.R.; HENGARTNER, M.O.; KEPP, O.; KNIGHT, R.A.; KUMAR, S.; LIPTON, S.A.; LU, X.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MEHLEN, P.; NUÑEZ, G.; PETER, M.E.; PIACENTINI, M.; RUBINSZTEIN, D.C.; SHI, Y.; SIMON, H.U.; VANDENABEELE, P.; WHITE, E.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death Differ.** v. 19, p. 107–20, 2012.
- SAINI, R. K.; NILE, S. H.; PARK, W. Carotenoids from fruits and vegetables: chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. **Food Res Int** 76: 735–750, 2015.
- SANDSTROM, J.; ROWAN, J. M. Acute pretreatment with estradiol protects against CA1 cell loss and spatial learning impairments resulting from transient global ischemia. **Horm Behav**, v. 51(3), p. 335–345, 2007.
- SARTER, M.; BODEWITZ, G.; STEPHENS, D.N. Attenuation of scopolamine induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. **Psychopharm.** v. 94, p. 491-495, 1988.
- HARING, H. P.; BERG, E. L.; TSURUSHITA, N.; TAGAYA, M.; DEL ZOPPO, G. J. E selectin appears in nonischemic tissue during experimental focal cerebral ischemia. **Stroke.** v. 27,p. 1386–1391, 1996.
- SEO, J. Y.; MASAMUNE, A.; SHIMOSEGAWA, T.; KIM, H. Protective effect of lycopene on oxidative stress-induced cell death of pancreatic acinar cells. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 1171, 570–575, 2009.
- SHAO, A.; HATHCOCK, J. N. Risk assessment for the carotenoids: lutein and lycopene. **Regul Toxicol Pharmacol**, 45(3):289-298, 2006.
- SHI, J.; MAGUER, M. L. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affect by food processing. **Crit Rev Biotech**, 20(4):293-334, 2000.
- SHI, S. S.; YANG, W.Z.; CHEN, Y.; CHEN, J.P.; TU, X.K. Propofol reduces inflammatory reaction and ischemic brain damage in cerebral ischemia in rats. **Neurochem. Res.** v. 39, p. 793-799, 2014.

SQUIRE, L. R.; KANDEL, E. R. *Memória: da mente às moléculas*, Porto Alegre: **Artmed**, 2003.

SQUIRE, L. R.; ZOLA, S. M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 93, n 24, p. 13515-22, 1996.

STAHL, W.; SIES, H. Carotenoids: occurrence, biochemical activities, and bioavailability. In: Packer L, Hiramatsu M, Yoshikawa T. Antioxidant food supplements in human health. San Diego: **Academic Press**; p.183-98. 1999.

STARKOV, A. A.; CHINOPOULOS, C.; FISKUM, G. Mitochondrial calcium and oxidative stress as mediators of ischemic brain injury. **Cell Calcium**, v. 36, p. 257– 264, 2004.

TAKEOKA, G. R.; DAO, L.; FLESSA, S.; GILLESPIE, D. M.; JEWELL, W. T.; HUEBNER, B.; *et al.* Processing effects on lycopene content and antioxidant activity of tomatoes. **J Agric Food Chem**; 49(8): 3713-7, 2001.

TAMURA, A.; GRAHAM, D. I.; MCCULLOCH, J.; TEASDALE, G. M. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 1, p. 53-60, 1981.

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

TAZAKI, Y, SAKAI, F, OTOMO, E, *et al.* Treatment of acute cerebral infarction with a choline precursor in a multicenter double-blind placebo-controlled study. **Stroke**; v.19, p. 211–216, 1988.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, p. 44-84, 2006.

VANDEN, B. T.; LINKERMANN, A.; JOUAN-LANHOUE, S.; WALCZAK, H.; VANDENABEELE, P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** v. 15, p. 135–47, 2014.

VANDENABEELE, P.; GALLUZZI, L.; VANDEN, B.T.; KROEMER, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** v. 11, p. 700– 14, 2010.

VEBER, G. *Cerebrovascular disease in children*. Neurology Principles and Practice. St Louis: Mosby; p. 1099-1124, 1999.

WANG, Q.; TANG, X. N.; YENARI, M. A. The inflammatory response in stroke. **J Neuroimmunol.**, v. 184(1-2), p. 53–68, 2007.

WANG, R.; TU, J.; ZHANG, Q.; ZHANG, X.; ZHU, Y.; MA, W.; CHENG, C.; BRANN, D.W.; YANG, F. Genistein attenuates ischemic oxidative damage and behavioral deficits via eNOS/Nrf2/HO-1 signaling. **Hippocampus.** v. 23, p. 634-647, 2013.

- WANG, W.; TANG, L.; LI, Y.; WANG, Y. Biochanin A protects against focal cerebral ischemia/reperfusion in rats via inhibition of p38-mediated inflammatory responses. **J Neurol Sci.** v. 15, p. 121-125, 2015.
- WANG, Z.; FAN, J.; WANG, J.; LI, Y.; XIAO, L.; DUAN, D. e WANG, Q. Protective effect of lycopene on high-fat diet-induced cognitive impairment in rats. **Neuroscience Letters**, 627, 185–191, 2016.
- WEI, Y.; SHEN, X. N.; MAI, J. Y.; SHEN, H.; Wang RZ, Wu M. The effects of lycopene on reactive oxygen species and anoxic damage in ischemia reperfusion injury in rats. **Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.** 44(1):34-8, 2010.
- WILLCOX, J. K.; CATIGNANI, G. L.; LAZARUS, S. Tomatoes and cardiovascular health. **Crit Rev Food Sci Nutr**; 43(1):1-18, 2003.
- YI, J. *et al.* Role of transcription factors in mediating post-ischemic cerebral inflammation and brain damage. **Neurochem Int**, v. 50, n. 7-8, p. 1014–1027, 2007.
- YI, F.; HE, X.; WANG, D. Lycopene protects against MPP(b)-induced cytotoxicity by maintaining mitochondrial function in SH-SY5Y cells. **Neurochem. Res.** 38, 1747–1757, 2013.
- ZENG, Y.; HU, M.; QU, S. e ZENG, L. Studies on biological effect of lycopene on Hippocampus of hyperlipemia rats. **Health**, (June), 8–16, 2009.
- ZHAO, J.; ZHANG, X.; DONG, L.; WEN, Y.; CUI, L. The many roles of statins in ischemic stroke. **Curr Neuropharmacol.** v.12, p. 564-574, 2014.
- ZHENG, G.; CHEN, B; FANG, Q.; YI, H.; LIN, Q.; CHEN, L.; TAO, J.; LI, J.; ZHENG, X.; LI, M.; LAN X. Primary prevention for risk factors of ischemic stroke with Baduanjin exercise intervention in the community elder population: study protocol for a randomized controlled trial. **Trials.** v. 15, p. 113, 2014.
- ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol Sci**, v. 19, p. 124-128, 2004.