

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIRURGIA**

**MARCIO WILKER SOARES CAMPELO**

**PRÉ-CONDICIONAMENTO COM NITROSIL RUTÊNIO PROMOVE  
NEUROPROTEÇÃO CEREBRAL ENVOLVENDO PROTEÍNA  
QUINASE EM RATOS *IN VIVO***

**FORTALEZA**

**2015**

**MARCIO WILKER SOARES CAMPELO**

**PRÉ-CONDICIONAMENTO COM NITROSIL RUTÊNIO PROMOVE  
NEUROPROTEÇÃO CEREBRAL ENVOLVENDO PROTEÍNA  
QUINASE EM RATOS *IN VIVO***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em ciências médico-cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em ciências médico-cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

Co-orientador: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá.

**FORTALEZA**

**2015**

**MARCIO WILKER SOARES CAMPELO**

**PRÉ-CONDICIONAMENTO COM NITROSIL RUTÊNIO PROMOVE  
NEUROPROTEÇÃO CEREBRAL ENVOLVENDO PROTEÍNA  
QUINASE EM RATOS *IN VIVO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Aprovada em: 03/06/2015

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos (orientador)**  
**Universidade Federal do Ceará (UFC)**

---

**Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues**  
**Universidade Federal do Ceará (UFC)**

---

**Prof. Dr. Reinaldo Barreto Ória**  
**Universidade Federal do Ceará (UFC)**

---

**Profa. Dra. Lydíia Masako Ferreira (avaliadora externa)**  
**Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)**

---

**Prof. Dr. Paulo Ferdinando de Melo Oliveira (avaliador externo)**  
**Universidade Estadual do Ceará (UECE)**

C196e Campelo, Marcio Wilker Soares  
PRÉ-CONDICIONAMENTO COM NITROSIL RUTÊNIO PROMOVE  
NEUROPROTEÇÃO CEREBRAL ENVOLVENDO PROTEÍNA QUINASE  
EM RATOS *IN VIVO* / Marcio Wilker Soares Campelo. – Fortaleza, 2015.

66 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

Co-orientador: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgica, Fortaleza-Ce, 2015

1. Isquemia Encefálica 2. Óxido Nítrico 3. Compostos de Rutênio 4. Proteína quinase. I. Vasconcelos, Paulo Roberto Leitão de (orient.) II. Título

CDD: 616.81

*Ao Grande Arquiteto do Universo, pelas  
oportunidades que tem surgido nesta vida.*

*A minha esposa, Ana Paula Bomfim Soares Campelo, pela paciência, companheirismo, apoio e acima de tudo pelo seu amor, carinho, ajuda na execução dos experimentos desta tese, por respeitar meus ideais e permanecer ao meu lado enquanto busco conquistar cada um deles. Ao meu filho Márcio Victor Wilker Soares Campelo, pela paciência em esperar o fim deste trabalho para podermos brincar juntos.*

## AGRADECIMENTOS

Ao PROFESSOR DOUTOR PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS, doutor em medicina pela Universidade Oxford (Inglaterra), prof. Titular do departamento de cirurgia da Universidade Federal do Ceará, pesquisador CNPq 2C, coordenador do módulo de nutrologia (UFC), vice coordenador do programa de pós-graduação em ciências Medico-Cirurgica, a quem, além da orientação do presente trabalho, agradeço pelas muitas oportunidades oferecidas, confiança, disponibilidade, atenção, compartilhar seu conhecimento e sempre disposto a ouvir, ponderar e concordar ou não com meu ponto de vista tirando qualquer dúvida, a quem tenho imenso agradecimento.

Ao PROFESSOR DOUTOR REINALDO BARRETO ÓRIA, doutor em farmacologia/sanduiche/Univeriade de Virginia (EUA), professor associado do departamento de morfologia da Universidade Federal do Ceará, Vice coordenador do programa de pós graduação em ciências morfofuncionais e membro do programa de pós-graduação em ciências Médicas, pela co-orientação, muitas oportunidades oferecidas de parceria entre os laboratório Nutrigenômica e LABICONTE, por ter acreditado e incentivado buscar novas respostas ao estudo proposto a quem tenho grande agradecimento.

À PROFESSORA GERLY ANNE DE CASTRO BRITO, doutora em Farmacologia (UFC), prof. Titular do departamento de morfologia da Universidade Federal do Ceará, coordenadora do programa de pós graduação em ciências morfofuncionais, que no início do minha vida acadêmica na UFC sempre me deixou com livre acesso as técnicas histológicas do Lab. de Morfologia (UFC), tirando dúvidas e participando dos trabalhos.

Ao PROFESSOR DOUTOR LUIZ GONZAGA DE FRANÇA LOPES, Coordenador do programa de pós-graduação em química orgânica e inorgânica da Universidade Federal do Ceará, pelas muitas oportunidades, por ter acreditado e confiado na minha capacidade e por tornar possível a síntese do complexo de nitrosil rutênio usado neste trabalho.

À PROFESSORA DOUTORA LYDIA MASAKO FERREIRA, doutora em cirurgia plástica (Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP), professora titular de cirurgia plástica (UNIFESP), pesquisadora CNPq 1-B, coordenadora da medicina III CAPES, que gentilmente aceitou o convite para participar da banca examinadora desta tese.

AO PROFESSOR DOUTOR LUSMAR VERAS RODRIGUES, doutor em medicina pela UNIFESP, livre docente departamento de cirurgia da UFC, prof. titular do departamento de cirurgia da UFC, Coordenador do programa de pós-graduação em ciências Médico-cirúrgicas (UFC), que gentilmente aceitou o convite para participar da banca examinadora desta tese, que durante o curso sempre disposto a ouvir, ponderar e concordar ou não com meu ponto de vista.

Ao PROFESSOR DOUTOR PAULO FERDINANDO DE MELO OLIVEIRA, doutor em farmacologia, professor convidado da Universidade Estadual do Ceará, professor titular da FIC, que gentilmente aceitou o convite para participar da banca examinadora desta tese.

Ao PROFESSOR DOUTOR ARMENIO AGUIAR DOS SANTOS, doutor em fisiologia (USP), prof. Titular do departamento de fisiologia humana da Universidade Federal do Ceará, pela dedicação ao laboratório Luiz Capelo (UFC), colaboração e assistência dada em toda a fase de monitorização experimental.

A aluna de Doutorado ANA PAULA BOMFIM SOARES CAMPELO, pela ajuda na parte experimental, correções ortográficas da tese e da aula, a quem tenho muito a agradecer a Deus por ter colocado em minha vida.

Ao examinador da banca de qualificação DR. PAULO ROBERTO CAVALCANTE DE VASCONCELOS pela contribuição na análise desta dissertação.



Ao DR. MOISÉS TOLENTINO BENTO-SILVA, pela ajuda nos primeiros passos da monitorização dos animais no Laboratório Escola Luiz Capelo.

A todos os professores da pós-graduação em cirurgia que contribuíram para minha formação nesse curso, especialmente ao Professor Doutor Francisco Vagnaldo Fechinni Jamacaru por sua presteza em ajudar.

Aos(as) alunos(as) da graduação em que algum momento ajudaram.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Sra. MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA e Sra. MAGDA GOMES FONTENELE, pela boa vontade e dedicação.

Ao Sr. BENTO FRANCISCO DE OLIVEIRA, assistente técnico do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina, pelo agilidade com que atendeu às nossas solicitações.

Ao Sr. ANTÔNIO HAROLDO PINHEIRO FERREIRA, técnico do Laboratório Escola Luiz Capelo, pela preciosa ajuda na diluição das drogas, preparo da banca experimental e adequado cuidado com os animais.

A CNPq pela bolsa de estudos (nível doutorado) consentida nos dois primeiros anos deste trabalho.

À FUNCAP e a CNPq pelo suporte financeiro do projeto de pesquisa.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Nada é tão oculto que não possa ser conhecido,  
ou tão secreto que não possa vir à luz.  
O que vos digo nas escuras que seja dito na luz.  
E o que ouvirdes em um sussurro,  
proclamai do alto do edifício.”

*(Yehoshua Ben Joseph, conhecido como Jesus Cristo)*

## RESUMO

**PRÉ-CONDICIONAMENTO COM NITROSIL RUTÊNIO PROMOVE NEUROPROTEÇÃO CEREBRAL ENVOLVENDO PROTEÍNA QUINASE EM RATOS *IN VIVO*. MARCIO WILKER SOARES CAMPELO.** Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará (Grau de Doutor em Ciências Medico-Cirúrgicas). Junho, 2015. Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

**Introdução e objetivo:** Doadores de NO (óxido nítrico) podem diminuir a lesão neuronal durante a isquemia/reperfusão (I/R) cerebral experimental por aumento do fluxo sanguíneo cerebral. O objetivo deste estudo foi avaliar se um novo doador de NO complexo nitrosil rutênio (Ru-bpy) apresenta algum efeito durante I/R e se envolve proteínas quinases.

**Método:** Foram utilizados 180 ratos machos, da linhagem Wistar, com peso médio de 290.27 g, distribuídos em 6 grupos: Sham 1h, solução salina + isquemia/reperfusão 1h, Ru-bpy + isquemia/reperfusão 1h, Sham 24h, solução salina + isquemia/reperfusão 24h, Ru-bpy + isquemia/reperfusão 24h. Utilizado o modelo de isquemia cerebral global incompleta, com oclusão da artéria carótida comum bilateral e administração do SF ou Rut-bpy em seus respectivos grupos via intraperitoneal 30 minutos antes do início do pinçamento das carótidas comuns. Após 30 minutos de isquemia. No final do experimento os animais foram decapitados e o cérebro retirado para ser avaliado à área de lesão por histologia com H&E, imunohistoquímica, quantificação de edema cerebral, nitrito, imunoensaio para quinases. Durante o experimento (fase de isquemia e primeira hora de reperfusão) a pressão arterial média (PAM) dos animais foi monitorizada.

**Resultados:** Diminuição do número de neurônios eosinofílicos e do edema no tecido cerebral nos animais pré-condicionados com nitrosil rutênio. A variação da PAM foi menor nos animais tratados com Ru-bpy ao final da isquemia e início da reperfusão. Inibição do NF- $\kappa$ B. Ativação das proteínas quinase AKT, P70S6, ERK 1/2 e CREB, com inibição da proteína JNK.

**Conclusão:** O Rut-bpy tem efeito protetor neuronal durante evento de I/R sustentado por 24h mantendo a PAM mais estável durante o início da reperfusão. Envolvendo a via das proteínas quinases.

**Descritores:** Isquemia Encefálica. Óxido Nítrico. Compostos de Rutênio. Proteína quinase.

## ABSTRACT

**PRECONDITIONING WITH NITROSYL RUTHENIUM PROMOTES NEUROPROTECTION INVOLVING PROTEIN KINASE IN RAT BRAIN IN VIVO.** Department of Surgery, Medicine School, Federal University of Ceará (Doctor Degree of *Medical-Surgical Science*). May, 2015. Advisor: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

**Background and purpose** - The NO donors can decrease neuronal injury during cerebral ischemia and reperfusion (I/R) by increasing the blood flow to the brain. The objective of this study is to study whether a new nitrosyl ruthenium complex makes some effect during I/R and if involves protein kinases.

**Methods** - Used 180 male rats, *Wistar* rats, with an average weight of 290.27 g, distributed 6 groups: Sham 1h, saline + ischemia/reperfusion 1h, Ru-bpy ischemia/reperfusion 1h, Sham 24h, saline + ischemia/reperfusion 24h, Ru-bpy ischemia/reperfusion 24h. Used global cerebral ischemia model incomplete, with occlusion of bilateral common carotid artery and administration of SF or Rut-bpy in their respective groups by intraperitoneal way. At the end of the experiment, the animals were decapitated and the brain removed to be evaluated to the area of injury by histology with H&E, immunohistochemistry, quantification of brain swelling, nitrite, immunoassay for kinases. During the experiment (phase of ischemia and first hour of reperfusion) PAM of animals was monitored.

**Results:** Decreased number of neurons reds and edema in brain tissue in animals preconditioned with nitrosyl ruthenium. PAM variation was lower in animals treated with Ru-bpy the end of ischemia and early reperfusion. Inhibition of NF- $\kappa$ B. Activates the kinase protein Akt, Erk 1/2, p70S6 and CREB, with inhibition of JNK protein.

**Conclusion:** The Rut-bpy has protective effect during neuronal event of I/R supported by 24h and keeping PAM more stable during the beginning of reperfusion. Involving the protein kinase.

**Keywords:** Brain ischemic. Nitric oxide. Ruthenium Complex

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 01</b>	Fórmula estrutural do complexo de rutênio	25
<b>Figura 02</b>	Desenho esquemático da ligação entre as principais quinases	28
<b>Figura 03</b>	Esquema simplificado da cascata de ativação das MAPK	29
<b>Figura 04</b>	Campo cirúrgico da dissecação e canulação da artéria femoral	46
<b>Figura 05</b>	Dissecação Artéria carótida comum bilateral	47
<b>Figura 06</b>	Campo cirúrgico evidenciando as artérias carótidas comuns pinçadas	48
<b>Figura 07</b>	Osteotomia craniana	48
<b>Figura 08</b>	Fotografia do cérebro alocado dentro da matrix cerebral	49
<b>Figura 09</b>	Fotografia dos cortes de tecido cerebral	50
<b>Figura 10</b>	Imagem representativa dos neurônio eosinófilos	51
<b>Figura 11</b>	Porcentagem de neurônios eosinofílicos	60
<b>Figura 12</b>	Avaliação do edema cerebral	61
<b>Figura 13</b>	Variação da pressão arterial	62
<b>Figura 14</b>	Concentração de nitrito	63
<b>Figura 15</b>	Imagem representativa da reação imunohistoquímica	64
<b>Figura 16</b>	Quantificação de NF-kB	65
<b>Figura 17</b>	Expressão da proteína AKT	67
<b>Figura 18</b>	Expressão da proteína JNK	68
<b>Figura 19</b>	Expressão da proteína P70S6	69
<b>Figura 20</b>	Expressão da proteína ERK 1/2	71
<b>Figura 21</b>	Expressão da proteína CREB	72
<b>Figura 22</b>	Expressão da proteína STAT 3	73
<b>Figura 23</b>	Expressão da proteína STAT 5	74
<b>Tabela 1</b>	Porcentagem de neurônios eosinofílicos	59
<b>Tabela 2</b>	Avaliação do edema cerebral	60
<b>Tabela 3</b>	Concentração de nitrito	63
<b>Tabela 4</b>	Valores da densitometria para NF-kB	65
<b>Tabela 5</b>	Expressão da proteína AKT	66
<b>Tabela 6</b>	Expressão da proteína JNK	68
<b>Tabela 7</b>	Expressão da proteína P70S6	69
<b>Tabela 8</b>	Expressão da proteína ERK 1/2	70
<b>Tabela 9</b>	Expressão da proteína CREB	72
<b>Tabela 10</b>	Expressão da proteína STAT 3	73
<b>Tabela 11</b>	Expressão da proteína STAT 5	74

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	15
2	<b>OBJETIVO</b>	41
3	<b>MÉTODO</b>	42
3.1	<b>ASPECTOS ÉTICOS</b>	42
3.2	<b>ANIMAIS</b>	43
3.3	<b>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</b>	43
3.3.1	<i>Divisão dos grupos</i>	43
3.3.2	<i>Técnica Anestésica e pré-condicionamento com Ru-bpy</i>	45
3.3.3	<i>Procedimentos cirúrgicos</i>	46
3.3.3.1	<i>Indução da isquemia/reperfusão cerebral</i>	48
3.3.3.2	<i>Morte dos animais e extração do cérebro</i>	49
3.4	<b>AVALIAÇÃO DO DA LESÃO DE ISQUEMIA/REPERFUSÃO</b>	50
3.4.1	<i>Preparação dos tecidos para exame histológico e imunohistoquímico</i>	50
3.4.2	<i>Análise histopatológica do hipocampo</i>	51
3.4.3	<i>Análise imunohistoquímica</i>	52
3.3.4	<i>Quantificação do edema cerebral</i>	53
3.5	<b>QUANTIFICAÇÃO DO NITRITO</b>	54
3.6	<b>WESTERN BLOTTING PARA NF-kB</b>	54
3.7	<b>ESTUDO DA SINALIZAÇÃO INTRACELULAR</b>	55
3.8	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	58
4	<b>RESULTADOS</b>	59
5	<b>DISCUSSÃO</b>	75
6	<b>CONCLUSÃO</b>	101
	<b>REFERÊNCIAS</b>	
	<b>ANEXO 1 e 2 Declarações do comitê de ética (62/08 e 01/10)</b>	

## 1 INTRODUÇÃO

A isquemia cerebral, considerada uma das principais causas de morbidade e mortalidade humana, caracteriza-se pela deficiência transitória ou permanente do fluxo sanguíneo cerebral (FSC) com intensidade suficiente para iniciar alterações metabólicas e lesões encefálicas, reversíveis ou irreversíveis, com mudanças na integridade estrutural neuronal.

O acidente vascular cerebral (AVC), que pode ser resultado da lesão de isquemia e reperfusão cerebral, é a segunda causa de morte no mundo e a primeira causa de morte nos países desenvolvidos com 6,7 milhões de pessoas mortas por ano (NAGHAVI et al., 2015). Conforme a Organização Mundial de Saúde, no Brasil são registradas cerca de 68 mil mortes por AVC anualmente. A doença representa a terceira causa de morte e incapacidade no país, o que gera grande impacto econômico e social, levando a maiores gastos ao sistema público de saúde com altas taxas de mortalidade e morbidade (NAGHAVI et al., 2015).

Em 1856, Savory descreveu a oclusão da artéria carótida extracraniana em uma mulher com hemiplegia e disartria – a primeira descrição do elo entre AVC e lesão da artéria carótida extracraniana.

## **1.1 FISIOPATOLOGIA DA ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL**

### **1.1.1 Fase de isquemia**

A isquemia cerebral pode ser resultante de várias doenças que acometem o leito vascular cerebral - a maioria envolvendo as artérias carótidas e ou as artérias do polígono de Willis, por meio da obstrução (GAGLIARDI, 2006) ou decorrente de procedimento cirúrgico ou trauma onde possa ocorrer a diminuição do fluxo sanguíneo da região acometida, comprometendo o acesso de nutrientes, assim como de oxigênio, e que pode ou não ser agravado durante a reperfusão (retorno do fluxo sanguíneo normal), dependendo do tempo de isquemia (CRONENWETT e JOHNSTON, 2010).

A expressão genérica “acidente vascular cerebral” refere-se ao súbito comprometimento da função cerebral, provocado por uma variedade de alterações histopatológicas, envolvendo um (focal) ou vários (multifocal) vasos sanguíneos intra ou extracranianos, levando a redução do suprimento sanguíneo, resultando no decréscimo da tensão de oxigênio (hipóxia) e metabólitos de alta energia em tecido cerebral (ATP e glicose principalmente).

Quando o fluxo sanguíneo para o cérebro é reduzido, a sobrevivência do tecido em risco depende de vários fatores modificadores: da disponibilidade de circulação colateral, da duração da isquemia e da magnitude e rapidez da



redução do fluxo (MIYASAKA *et al.*, 2000; SCHALLER e GRAF, 2004). Tais fatores determinam, por sua vez, o local anatômico e o tamanho da lesão (DAHR e DIRNGER, 2015).

As repercussões da isquemia estão associadas às alterações morfológicas e funcionais resultantes da necrose tecidual. Às alterações provocadas pela falta de aporte sanguíneo desencadeiam processos metabólicos celulares como: acidose celular, alteração no potencial de membrana, alteração na distribuição de ions, edema celular, diminuição da ATP, da fosfocreatina e da glutatona que induzem a célula a autodestruição (BLAISDELL, 2002; ELTZSCHING e COLLARD, 2004; BAYRAK *et al.*, 2014; OROBEI e KULIKOV, 2014).

Quatro componentes estruturais e funcionais são particularmente sensíveis à hipóxia decorrente da isquemia: a membrana celular - principal responsável pelo equilíbrio iônico e osmótico; a respiração aeróbica; a síntese de proteínas estruturais e enzimáticas; e a síntese do aparelho de reparo do código genético (COTRAN; KUMAR; ROBBIN, 2010).

Durante a fase de isquemia, devido à diminuição da concentração de oxigênio para o tecido cerebral, ocorre inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial e a queda da produção de adenosina trifosfato (ATP) (BERNARDI, 1996; MUNIZ *et al.*, 2004).

O metabolismo anaeróbico supre, na situação acima, o ATP por curto período de tempo, levando a acidose tecidual. No entanto, o consumo do estoque de ATP continuará ocorrendo, até ser degradado todo o estoque em

adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP) (YOSHIDA *et al.*, 2002; MONSIENKO *et al.*, 2015).

Essa falta de energia celular causa a falência da bomba de sódio-potássio ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) e, devido à falência da bomba, passa haver maior acúmulo de  $\text{Na}^+$  intracelular, perda de potássio ( $\text{K}^+$ ), perda da permeabilidade seletiva das membranas celulares, edema da célula e das organelas. Simultaneamente, ocorre aumento do influxo de cálcio ( $\text{Ca}^+$ ) e de cloreto para o meio intracelular (BRALET *et al.*, TRYSTMAN *et al.*, 1991; 1987; LIPTON, 1999; SONG *et al.*, 2014; HERTZ *et al.*, 2015).

A perda da permeabilidade seletiva da membrana celular e o desequilíbrio iônico podem afetar a mitocôndria, que é alvo importante durante a isquemia e reperfusão.

A mitocôndria pode ser danificada por elevação do cálcio citosólico, pelo estresse oxidativo e pela degradação de fosfolipídios, pela via da fosfolipase A2 e outros. A lesão é comumente expressa pela formação de um canal de alta condutância, conhecido como transição da permeabilidade mitocondrial, na membrana mitocondrial interna (BERNARDI, 1996; SANDERSON *et al.*, 2013; TANO e GOLLASCH, 2014, CHEN *et al.*, 2015).

### **1.1.2 Fase de Reperfusão**

Caracteriza pelo retorno do fluxo de sangue oxigenado aos tecidos previamente desprovidos de oxigênio (denominado reperfusão) é fundamental

para o reinício do metabolismo aeróbico (HALLIWELL, 1992). Entretanto, em certas circunstâncias, quando o fluxo sanguíneo é restaurado para as células isquêmicas, mas que ainda estavam viáveis, com frequência, a lesão pode se tornar paradoxalmente maior, e prosseguir em velocidade acelerada. Isso é chamado de lesão de isquemia/reperfusão, que varia de acordo com a intensidade e com a duração do tempo de isquemia (MIYASAKA *et al.*, 2000; TANO e GOLLASCH, 2014).

Essa restauração caótica do fluxo tissular é conhecida como fenômeno do “não refluxo”, no qual interagem múltiplos fatores, tais como um ciclo vicioso de disfunção endotelial vascular, redução da perfusão local e acentuação do edema (EVORA *et al.*, 1996).

Durante a reperfusão, ocorre reoxigenação dos tecidos que pode gerar um aumento de radicais livres nas células neuronais, endoteliais e da glia (LEFER; LEFFER, 1993; THIAGARAJAN; WINN; HARLAN, 1997; SONG *et al.*, 2014).

Os radicais livres ou espécies reativas (RLs) são espécies independentes que contêm um ou mais elétrons não emparelhados no átomo ou molécula, aumentando assim a reatividade química, conferindo-lhes grande instabilidade. O mais simples é representado por um átomo de hidrogênio com um próton e um único elétron. Além destes, são também RLs, o superóxido, os radicais hidroxila, os formados pela via do óxido nítrico.

Em torno de 95% do oxigênio consumido durante o metabolismo aeróbico é utilizado pelas mitocôndrias para produção de energia. O restante, que não é

completamente oxidado em água, é utilizado para a produção de RLs tóxicos (GRIMBLE, 2001, POPA-WAGNER *et al.*, 2013). Entretanto as células criam múltiplos mecanismos para remover os radicais livres e, desse modo, diminuir a lesão (ZIMMERMANN *et al.*, 2004; PISOSCHI *et al.*, 2015). A atividade enzimática antioxidante do tecido afetado pela isquemia/reperfusão é particularmente importante como defesa endógena primária contra as espécies pró-oxidantes que induzem a injúria (HOMI *et al.*, 2002; PISOSCHI *et al.*, 2015). Assim, a capacidade antioxidante plasmática pode ser importante fator que fornece proteção contra o dano neurológico causado pelas RLs associado ao evento vascular isquêmico (LEINONEN *et al.*, 2000; RADAK *et al.*, 2014).

Porém, quando há um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade de defesa do organismo contra essas espécies, a célula entra em estado de estresse oxidativo (TARDINI *et al.*, 2003; LEHOTSKY *et al.*, 2004).

A oclusão experimental de vasos cerebrais causa aumento da formação de RL oxigenado e/ou nitrogenado afetando determinadas regiões cerebrais, como a região do estriado e hipocampo (ALEXANDROVA; BOCHEV, 2005; Ji *et al.*, 2014).

O papel do estresse oxidativo é muito mais evidente onde o fluxo cerebral é restaurado (OLIVER, 1990; DIRNAGLS; LADECOLA; MOSKOWITZ, 1999) por que o refluxo da área cerebral, previamente isquêmica, resulta em aumento do nível de oxigênio. Entretanto o período de reperfusão é necessário para salvar o tecido comprometido pela isquemia (LEHOTSKY *et al.*, 2004).

Dentre os efeitos lesivos das RLs, têm maior importância as lesões do DNA que ocorrem a partir de reações com a timina no DNA nuclear e mitocondrial, a modificação oxidativa das proteínas, que acentua a degradação multicatalítica causando dano em toda a célula; e a peroxidação lipídica dentro das membranas plasmáticas e organelares, que é desencadeada quando as ligações duplas entre os ácidos graxos insaturados dos lipídios das membranas são atacados por radicais livres derivados principalmente do oxigênio, particularmente pelo radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) (FABER,1990), acentuando assim a perda da permeabilidade seletiva das membranas celulares e com isso gerando desordem na homeostase celular.

Durante a isquemia e reperfusão em cérebro de ratos, observa-se a presença de fatores com propriedades neurotrópicas, neuroprotetoras, ou mediadores neuroinflamatórios (WAINWRIGHT *et al.*, 2007). Sabe-se, ainda, que os astrócitos podem atuar de forma protetora ao desequilíbrio homeostático causada pela isquemia e reperfusão, removendo o excesso de neurotransmissores excitatórios que podem ativar receptores NMDA, levando a um aumento de influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  (BRALET *et al.*, 1987; BUISSON; PLOTIKINE; TRAYSTRAM; KIRSCH; KOEHLER, 1991; BOULU, 1992; LIPTON,1999; MÖDERSCHEIM *et al.*, 2007).

Por sua vez, o cálcio elevado ativa uma série de enzimas, com efeitos celulares potencialmente deletérios. Entre as enzimas conhecidas, incluem-se as fosfolipases, proteases, ATPases e endonucleases (LI *et al.*, 2007; KRISTIÁN e SIEJO, 2009).

O aumento do cálcio citosólico leva também à ativação de isoformas da NO síntase, via calmodulina, produzindo NO que interage com ROS, culminando com a produção de radicais livres nitrogenados (p. ex. peroxinitritos) e aumentando, assim, a área de lesão (BUISSON; PLOTIKINE; BOULU, 1992; GOTO *et al.*, 2002; MÖDERSCHEIM *et al.*, 2007; OLMEZ *et al.*, 2012).

### **1.1.3 – A Influência do NO na lesão de isquemia e reperfusão**

O óxido nítrico (NO) - um mediador pleotrófico da inflamação - foi descoberto primeiro como um fator liberado de células endoteliais que causava vasodilatação, ao relaxar o músculo liso vascular (IGNARRO *et al.*, 1987; PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987). O NO é um gás solúvel produzido não apenas por células endoteliais, mas também por macrófagos e neurônios nitrérgicos no cérebro (DAWSON; DAWSON, 1995; DALKARA e MOSLOWITZ, 1997; SAMDANI; DAWSON; DAWSON, 1997; GAMBARYAN e TSIKAS, 2015).

A síntese de NO dá-se a partir da L-arginina, oxigênio molecular, nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NADPH) e outros cofatores incluindo heme, dinucleotídeo de flavina-adenina (FAD), mononucleotídeo de flavina (FMN) e calmodulina, pela atividade da enzima óxido nítrico sintetase (ALDERTON; COOPER. KNOWLES, 2001).

Existem três isoformas de (óxido nítrico sintetase) NOS a saber: NOS endotelial (NOS<sub>e</sub>), NOS neuronal ou cerebral (NOS<sub>n</sub>) e NOS induzida ou

imunológica (NOS<sub>i</sub>) (DALKARA e MOSLOWITZ, 1997; SAMDANI; DAWSON; DAWSON, 1997).

Os efeitos do NO na isquemia cerebral são complexos variando desde uma potente vasodilatação e preservação do fluxo sanguíneo cerebral induzida pelo NO produzido pela NOS<sub>e</sub> (DAWSON; DAWSON, 1995; WILLMOT *et al.*, 2005; JIANG *et al.*, 2015) a efeitos citotóxicos diretos e/ou indiretos devido ao NO produzido pela NOS<sub>n</sub> e NOS<sub>i</sub> (GOTO *et al.*, 2002; ARRICK *et al.*, 2014).

Tendo o NO papel complexo nas lesões mediadas por radicais livres durante a reperfusão (WILLMOT *et al.*, 2005) e com alguns artigos divergentes entre efeitos benéficos e outros neurotóxicos por induzir a formação de peroxidonitrito causando peroxidação lipídica e dano no DNA (ZHANG *et al.*, 2001). Após isquemia e reperfusão há um aumento significativo de RLs que podem ser mensurados, indiretamente, por causar peroxidação lipídica, cujas lesões podem ser prevenidas tanto pela inibição da NOS seletiva da NOS<sub>n</sub> e NOS<sub>i</sub>, como pela administração de doadores da NO (WAINWRIGHT *et al.*, 2007). Isso foi confirmado em outros trabalhos em modelos animais de isquemia cerebral (PLUTA *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2001) e faz-se necessário observar que a atividade da NO sintetase endotelial é essencial para manter o fluxo sanguíneo cerebral durante as fases de isquemia e reperfusão cerebral, com efeitos benéficos induzindo a expressão do VEGF promovendo angiogênese (HARUKUNI e BHARDWAJ, 2006; JIANG *et al.*, 2015).

O NO sintetizado a nível intracelular é capaz de ativar várias moléculas como os radicais livres (SANG *et al.* 2006), canais de potássio ATP dependentes

(XIONG *et al.* 2003) e proteína quinase (LI *et al.* 2008; ZHANG *et al.* 2011; DAVIES AND TOURNIER 2012; YASUDA *et al.* 2014; CHEN *et al.* 2015) que estão envolvidos na fisiopatologia da isquemia/reperfusão, assim como nos mecanismo de neuroproteção em modelos que utilizam pré-condicionamento (CODACCIONI *et al.* 2009; BEDIRLI *et al.* 2012).

## 1.2 O USO DO DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO

Wainwright *et al.* (2007) mostraram que a administração de doador de NO (DETNONONOate-(Z)-1-[N-2aminoethyl)-N-(2-ammonio-ethyl)amino]diazem-1-ium-1,2-diolate) reduz lesão neurológica, isquemia e reperfusão e que esta proteção é, em última análise, devido ao aumento e a preservação do fluxo sanguíneo cerebral. Outros pesquisadores também recentemente demonstraram os benefícios da utilização de outros doadores de NO na isquemia/reperfusão cerebral (MUNOZ *et al.*, 2012; GODÍNEZ-RUBÍ *et al.*, 2013; QI *et al.*, 2014; ARANDARCIKAITE *et al.*, 2015).

Doadores de NO, quando aplicados em sistemas biológicos liberam NO e são capazes de mimetizar a resposta endógena de liberação de NO ou substituir uma deficiência endógena de NO (IGNARRO *et al.*, 1999; IGNARRO; NAPOLI; LOSCALZO, 2002).

Recentemente, vários compostos metálicos foram estudados como doadores de NO ou como “varredores” de NO, incluindo compostos do complexo nitrosil rutênio (LUNARDI; SILVA; BENDHACK, 2009).



As características do complexo nitrosil rutênio têm sido bastante estudadas nos últimos anos, devido ao importante papel no processo biológico de liberação de NO envolvendo metal de transição, tendo também a possibilidade de produção termicamente estável (FORD; WINK; STANBURDY, 1993; WINK et al., 1993; WINK et. al., 1996) e ser capaz de liberar NO sob estímulo externo, além da vantagem do NO ser liberado em sistema biológico alvo (LUNARDI; SILVA; BENDHACK, 2009).

Grupos de doadores de NO, que têm como metal o rutênio, e que são solúveis em água e liberam NO principalmente sob a ação de agente redutores, foram utilizados para avaliar o potencial de relaxamento na musculatura lisa vascular (PEI *et. al*, 2008; GAITANI *et al.*, 2009). Estudos indicam que o complexo nitrosil rutênio mostrou-se capaz de causar relaxamento de anéis da artéria aorta *in vitro* com os mesmos efeitos induzidos pelo nitroprussiato de sódio (BONAVENTURA *et al.* , 2007; CERQUEIRA *et al.*,2008).

Estudos iniciais realizados em hipocampo de ratos, por Weiraszkoa *et al.* (2001), avaliaram a geração de potenciais de ação provocados por doadores de NO do complexo nitrosil rutênio. Os autores demonstraram que a ação dessas substâncias depende da liberação de óxido nítrico pela ação de um agente redutor, e que a incubação do tecido com oxi-hemoglobina, um removedor de NO, elimina os efeitos neurofisiológicos.

Isso chama a atenção para a necessidade de se explorar novos doadores de NO, através de metalofármacos em sistemas biológicos sob estresse

induzido pela isquemia e reperfusão, que tenham menor toxicidade do que o nitroprussiato de sódio.

Novas substâncias do complexo nitrosil rutênio, sintetizadas no laboratório do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, da Universidade Federal do Ceará ( $\text{Cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{NO})]\text{PF}_6$ , Ru-Bpy) (Figura 1), conforme técnica descrita por Lopes, Wieraszko, El-Sherif e Clark (2001), são solúveis em água, e permanecem estáveis quando expostas ao meio-ambiente. Esse metalofármaco é capaz de liberar NO *in vitro* (WEIRASZKOA *et al.*, 2001; CERQUEIRA *et al.*, 2008).

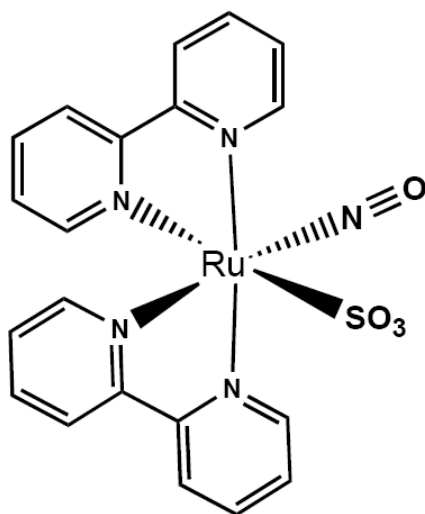


Figura 1: Fórmula estrutural do complexo de nitrosil rutênio ( $\text{Cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{NO})]\text{PF}_6$ ).

Abreviatura: bpy = 2,2'-bipiridina.

### 1.3 SINALIZADORES INTRACELULARES (PROTEÍNAS QUINASES)

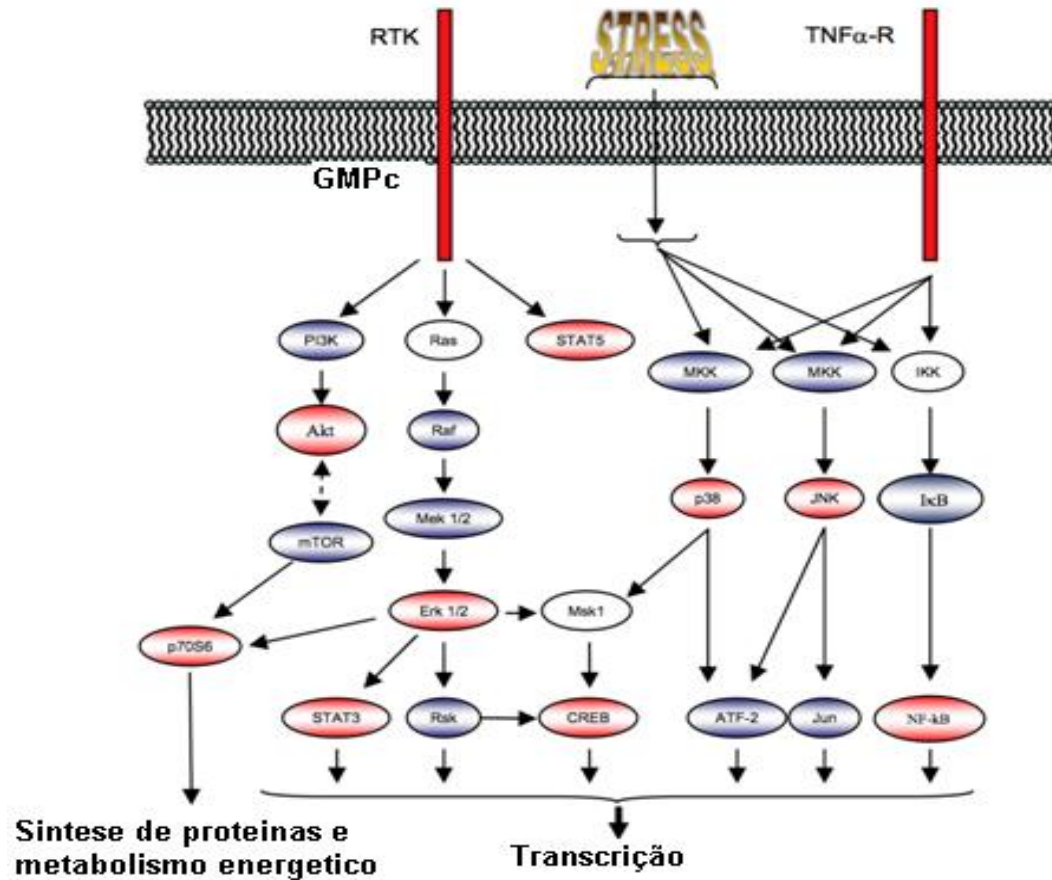
A adaptação celular à lesão de isquemia e reperfusão é determinada não somente pelos tipos proteicos presentes *in situ*, mas também pela concentração, forma e distribuição dessas proteínas. Sua síntese, movimentação e biotransformação dependendo principalmente da atividade das proteínas quinases, que catalisam reações de fosforilação ou desfosforilação de várias proteínas podendo, portanto, ativá-las ou desativá-las.

Tais reações podem ser reguladas por sistemas de segundo mensageiros ou por ligantes extracelulares, além de poderem ser potencializadas depois de determinados estímulos (por exemplo, lesão de isquemia ou mesmo uma associação de isquemia e reperfusão). Acredita-se que os processos de fosforilação/desfosforilação possibilitam o aparecimento de uma “memória” molecular dentro da célula e que por sua vez, participaria ativamente nos processos de sobrevivência e plasticidade neuronal (ZIGMOND MS 1999; WWINBERG et al., 2015; ENGSTROM et al., 2015).

A atividade das quinases pode ser reguladas tanto pelo sistema de segundo mensageiro como também por estímulo extracelular. Em geral, as quinases reguladas por segundo mensageiro adicionam o radical fosfato em resíduos de serina (Ser) e/ou treonina (Thr) enquanto que as quinases ligadas a receptores atuam através da fosforilação de resíduos de tirosina (Tyr) (NESTLER AND GREENGARD, 1989; VOET AND VOET, 1995; SCHULMAN AND HYMAN, 1999; SIEGELBAUM, SCHWATZ AND KANDEL, 2000; JABS et al., 2015; NGUYEN et al., 2015).

O papel das proteína tirosina quinases (PTKs) na transdução de sinal é central, pois elas atuam como um ponto de apoio na rede de moléculas sinalizadores (cascata de transdução de sinal transmitida da membrana celular para o citoplasma e muitas vezes para o núcleo) cuja função é a regulação da expressão gênica. As PTKs estão relacionadas a diversos processos fundamentais, como a proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte celular (RADHA *et al.* 1996; HUBBARD *et al.* 1998).

As PTKs podem ser divididas em duas famílias: as proteínas quinases receptoras (RTKs), como por exemplo o receptor de fator de crescimento (GFR) e as proteínas quinases não-receptoras (NRTK), como as proteínas da superfamília das MAPKs (JNK, p38, ERK) ( YANG *et al.* 2003; ROUX AND BLENIS 2004; SHEN *et al.* 2004; MELANI *et al.* 2006; PIGNATARO *et al.* 2009; AVILA E ROMERO, 2010; LEE *et al.* 2010; LU *et al.* 2011). As proteínas da via AKT, as STAT e as envolvidas no metabolismo energético P70S6 podem ser ativadas por diversos mecanismos, porém podem apresentar interações entre elas (Figura 2).

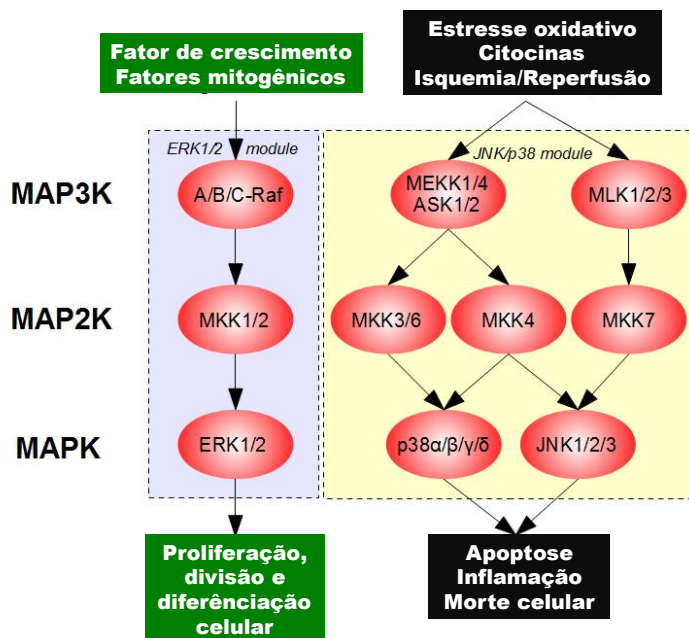


**Figura 2.** Desenho esquemático da ligação entre as principais proteínas quinases. A proteína quinase AKT ativa a mTOR, com aumento de mTOR esta realiza *feedback* negativo com a AKT. A mTOR ativa a P70S6 que também pode ser ativada pela ERK 1/2. A ERK 1/2 pode ativar a STAT 3 e a Msk1 que ativa a CREB.

### 1.3.1 Família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK)

A família das MAPK é constituída por três famílias de proteínas quinases: as ERKs (proteínas quinases reguladas por sinais extracelulares); as JNKs (quinases de c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal) e a família de quinases p38/MAPK (COWAN AND STOREY 2003; KOVALSKA *et al.* 2012).

A MAPK, uma serina/treonina (Ser/Thr) quinase, é ativada por uma MAPK quinase (MAPKK ou MEK), que é uma quinase que fosforila sítios Ser/Thr e tirosina (Tyr). MAPKK é ativada por uma MAPKK quinase (MAPKKK) que recebe sinais de receptores de superfície ativados ou proteínas ligadas a guanosina trifosfato (GTP) e/ou outras quinases. No final dessa cascata de sinalização, a MAPK irá fosforilar, na maioria, proteínas nucleares como fatores de transcrição regulando, portanto, a expressão de uma série de genes (COBB AND GOLDSMITH 1995; IRVING *et al.* 2000; ROUX AND BLENIS 2004; SHEN *et al.* 2004; LEE *et al.* 2010; LU *et al.* 2011) (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema simplificado da cascata de ativação das MAPK (ERK, p38 e JNK) e seus efeitos.

### **1.3.1.1 Proteína quinase reguladora de sinal extracelular (ERK)**

A família ERK é uma cadeia de proteínas no interior da célula que envia um sinal a partir de um receptor na superfície da membrana celular para o DNA no núcleo celular e responde, primariamente, a fatores mitogênicos.

Atualmente sabe-se que regula múltiplas funções celulares incluindo crescimento, proliferação, diferenciação e apoptose (SUZUKI *et al.* 1995; SHEN *et al.* 2004; MELANI *et al.* 2006; LEE *et al.* 2010). Essa via é ativada por fator de crescimento, estresse oxidativo, aumento do cálcio intracelular, estimulação de receptores de glutamato e por fatores desconhecidos ativados pela isquemia e reperfusão (CARLETTI *et al.* 1995; ROUX AND BLENIS 2004). O RNAm para ERK 1/2 pode ser detectado no cérebro de ratos, especialmente no hipocampo e núcleo acumbens em altas concentrações após isquemia e reperfusão cerebral (IRVING *et al.* 2000; MELANI *et al.* 2006; LEE *et al.* 2010).

ERK1 e ERK2 são ativadas por MEK1 e MEK2 que fosforilam sítios Thr-Glu-Tyr nas ERKs. As MEKs não podem ser ativadas por c-Raf, uma MAPKKK, que por sua vez é regulada pela proteína Ras ativada por fatores de crescimento e receptores tirosina quinase. Após translocação para o núcleo, as ERKs são responsáveis pela fosforilação de ativadores de transcrição como p90<sup>rsk</sup>, fatores de transcrição como Elk-1 e Ets-1, proteínas adaptadoras como Sos e receptores de fatores de crescimento (DENHARDT, 1996).

Em células de mamíferos, ERK 1/2 pode ser ativada por vários estímulos, sendo a ERK ativada capaz de fosforilar vários substratos como c-Raf-1, MEK, ELK-1, e c-Fos (SATOH *et al.* 2000). Esses substratos regulam vários outros genes e proteínas envolvidas na apoptose neuronal, por exemplo Bcl-2 e caspase 3, que podem regular a sobrevivência ou morte neuronal, respectivamente (IRVING *et al.* 2000; SATOH *et al.* 2000; JIN *et al.* 2002; CHU *et al.* 2004; BEDIRLI *et al.* 2012; ZHAO *et al.* 2014).

### **1.3.1.2 Proteína quinase c-Jun N-terminal (JNK)**

A família JNK, também referida como via de sinalização induzida pelo estresse), é uma MAPK mais envolvida na resposta celular às citocinas pró-inflamatórias, genotoxicidade e estresse ambiental. Entretanto a JNK ativada é também associada com a regulação da proliferação, sobrevivência e diferenciação celular (DAVIS 2000).

A JNK é constituída de três tipos de proteínas JNK1 e JNK2, amplamente expressas em vários tecidos e JNK3, específica do tecido cerebral, coração e testículos (GUPTA *et al.* 1996; DAVIES AND TOURNIER 2012). Essas proteínas respondem a vários estímulos de estresse como choque de temperatura, osmótico, isquemia e ainda às citocinas (BENDINELLI *et al.* 1996; CHAN *et al.* 1997; DAVIS 2000; LI AND JACKSON 2002; LI *et al.* 2012).

As JNKs são ativadas por fosforilação dupla do sítio Thr-Pro-Tyr pelas JNKK1 e JNKK2, conhecidas como MAPK quinase 4 e 7 (MKK4/7). As MKK 4/7



são fosforiladas por KK1-4, ASK e MLK que por sua vez são ativadas por proteína G da família Rho (Rac, Rho e Cdc42). Dímeros de JNKs ativas passam pelo envoltório nuclear e são as responsáveis por fosforilar a proteína c-Jun, levando ao aumento da atividade do fator de transcrição AP-1, além da ativação de outros fatores de transcrição como ATF-2, Elk-1, Myc, Smad3 e o supressor de tumor p53. A ativação prolongada da cascata de JNK parece regular o processo de apoptose (LIN *et al.* 2013), no entanto sob certas condições, com ativação transiente, podem promover a sobrevivência celular (DOUGHERTY *et al.*, 2002; DAVIES AND TOURNIER 2012).

### **1.3.1.3 Proteína quinase ativada por mitógeno (p38/MAPK)**

As proteínas p38/MAPK são fosforiladas nos sítios com motivos Thr-Gly-Tyr e são ativadas por estresse ambiental, radiação ionizantes, citocinas e fator de necrose tumoral (TNF). São as MKKs 3 e 6 que fosforilam diferentes isoformas de p38/MAPK (p38alfa, p38 beta, p38 gama, p38 ipsilon, p38-2), que por sua vez, são ativadas por MEKK, MLK e ASK1, GTPases que incluem a família Rho. Cada isoforma de p38/MAPK ativa um substrato específico, por exemplo, alfa e beta ativam proteínas de choque térmico (HSP) enquanto gama e ipsilon ativam ATF-2. Outros fatores de transcrição como STAT 1, complexo Max/Myc, Elk-1 e CREB também são afetados pela família das p38/MAPK e podem estar envolvidas nos fenômenos de motilidade celular, transcrição e remodelagem de cromatina (COWAN AND STOREY 2003; Walker *et al.*, 2013).

A fosforilação da p38/MAPK durante o período de isquemia tem sido observada em tecidos de ratos, cachorros e porcos (HEIDBREder *et al.* 2008; PIGNATARO *et al.* 2009). Estudos mostram que a inibição da p38 pode diminuir o déficit neurológico e a expressão de citocinas inflamatórias em modelos de isquemia focal (IRVING *et al.* 2000; BARONE *et al.* 2001; MELANI *et al.* 2006; PIAO *et al.* 2003), estando portanto envolvidas na neuroinflamação (GURGIS *et al.* 2014).

### **1.3.2 Proteína de ligação ao elemento de resposta AMPc (CREB)**

Desde a década de 90, o fator de transcrição nuclear CREB fosforilada (proteína ligante ao elemento de resposta ao AMPc) tem sido extensamente estudada em vários modelos de isquemia (HU *et al.* 1999; TANAKA *et al.* 1999), estando envolvida no desenvolvimento neuronal, plasticidade neural, memória, regeneração e sobrevivência neuronal em resposta a vários estímulos incluindo a isquemia (FINKBEINER 2000; WALTON AND DRAGUNOW 2000; MAYR *et al.* 2001).

A CREB tem como alvo a expressão de várias proteínas neuroprotetoras incluindo proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) capaz de promover a sobrevivência neuronal após isquemia (MARTINOU *et al.* 1994; HAN *et al.* 2000; CLARKSON *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2015; OKAYAMA *et al.*, 2015).

A fosforilação da CREB e ativação de ambas as vias MAPK e PI3K/AKT pode ocorrer por exposição dos neurônios ao BDNF. Entretanto a CREB é capaz de regular a transcrição do gene BDNF diretamente, sugerindo que este *feedback* positivo possa ser neuroprotetor (ALMEIDA *et al.* 2005; HUANG *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2015).

### **1.3.3 Proteína quinase B (AKT)**

A AKT é uma serina/treonina quinase ou proteína quinase B, essencial efetora da via PI3K (fosfoinositol-3-quinase), com papel principal na via reguladora de morte/sobrevivência celular (DUDEK *et al.* 1997; YANO *et al.* 2001). Quando as células são submetidas à isquemia, a fosforilação do AKT tem papel na neuroproteção (NOSHITA *et al.* 2001; YANO *et al.* 2001; LIU *et al.* 2012) regulando o equilíbrio entre apoptose e sobrevivência celular (FRANKE *et al.* 2003).

A AKT ativada pode fosforilar várias moléculas regulando a proliferação e sobrevivência celular, incluindo a Bcl-2, caspase-9, óxido nítrico sintase endotelial (NOS<sub>e</sub>) e CREB (DU AND MONTMINY 1998; FRANKE *et al.* 2003; HANADA *et al.* 2004; LIU *et al.* 2012; PEN *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2014). Outras proteínas sinalizadoras podem ser ativadas após estimulação da fosforilação da AKT.

AKT pode ser ativada por PI3K, por fosforilação no sítio Thr-308 e Ser-473, após estímulos com insulina e vários fatores de crescimento como FGF2 e

PDGF (MAIRA *et al.* 2001; CHEN *et al.* 2015). Os fatores de sobrevivência podem suprimir a apoptose de uma maneira independente de transcrição ativando AKT, que então, fosforila e inativa componentes da maquinaria apoptótica incluindo Bas, fatores de transcrição Forkhead e Caspase-9 (BRUNET *et al.* 1999). O desacoplamento entre sobrevivência e mitogênese pode ser explicado pelas diferentes habilidades dos agentes mitogênicos em induzir eficientemente as vias de sinalização PI3K/PKB/AKT (BURGERING AND COFFER 1995; ANDJELKOVIC *et al.* 1997; KENNEDY *et al.* 1997; CARLONI *et al.* 2009) .

A via PI3K/PKB/AKT também é capaz de ativar a via mTOR (*mammalian target of rapamycin*), no qual fosforila a quinase P70S6 em resposta a fatores de crescimento, que por sua vez induz a fosforilação da proteína 40S no sítio ribossomal S6 (S6) (PROUD 1992; PULLEN AND THOMAS 1997; GINGRAS *et al.* 2001; VOGT 2001; KOH 2010). A fosforilação da S6 tem papel na regulação da translação do RNAm e envolve a progressão do ciclo celular e síntese proteica (PULLEN AND THOMAS 1997; DUFNER AND THOMAS 1999; GINGRAS *et al.* 2001; Kis *et al.* 2003).

#### **1.3.4 Proteína quinase P70S6**

A mTOR/p70S6 quinase/S6 é um fator importante envolvido na síntese proteica. Koh *et al.* (2008) e Koh (2010) administrando ácido ferulico e EGB 761 (substância extraída do *Gingko biloba*), repectivamente, comprovaram que reduzia o número de neurônios TUNEL-positivos no córtex cerebral de ratos após a lesão de isquemia/reperfusão por oclusão da artéria cerebral média, com

aumento da expressão da quinase P70S6 e fosforilação da S6, sendo este aumento, tendo efeito neuroprotetor.

Outros pesquisadores, também, demonstraram que a ativação da P70S6 quinase é essencial para o pré-condicionamento neuronal para conferir proteção durante a isquemia (HAUSENLOY *et al.* 2005; HU *et al.* 2010).

A ativação da P70S6 inicia-se com a ativação da mTOR pela via AKT fosforilada nos sítios serina/treonina (DATTA *et al.* 1999; GINGRAS *et al.* 2001; VOGT 2001). A mTOR ativada fosforila a P70S6, que está envolvida no crescimento celular, progressão do ciclo celular e sobrevivência celular (FRANKE *et al.* 1997; PULLEN AND THOMAS 1997; DUFNER AND THOMAS 1999; GINGRAS *et al.* 2001; HAJDUCH *et al.* 2001; VIVANCO AND SAWYERS 2002; KOH 2013).

A diminuição da expressão do P70S6 quinase, que ocorre durante a isquemia cerebral, inibe os passos iniciais da síntese proteica e crescimento celular resultando em morte neuronal (JANELIDZE *et al.* 2001; MENGESDORF *et al.* 2002). A proteína ribossomal S6, que é o maior alvo da P70S6, é um regulador crítico para a síntese proteica (BERVEN AND CROUCH 2000) com importante papel na regulação do crescimento celular via modulação da biosíntese de proteínas ribossomal (PROUD 1992; PULLEN AND THOMAS 1997).

### **1.3.5 Transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT)**

Na última década, a família da proteínas quinase transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT), primeira descrita como mediadora chave da

sinalização para transdução de interferon, é hoje reconhecida como transdutora de sinais intracelulares ativados por citocina, fatores de crescimento e ativação de receptores de tirosina quinase (DARNELL 1997; LEVY AND DARNELL 2002; MEIER e LARNER, 2014), têm sido estudadas em diverso modelo experimental.

Atualmente, identificaram sete proteínas STAT (STAT 1, 2, 3, 4, 5 A, 5 B e 6) com funções biológicas incluindo a regulação de crescimento, sobrevivência, diferenciação, motilidade, metabolismo mitocondrial e outras (BROMBERG et al., 2000; LIN et al., 2011; FANG *et al.* 2013; MEIER e LARNER, 2014).

Até onde se sabe, a STAT3 e STAT5 apresentam-se envolvidas na comunicação intracelular neuronal até presente data (DZIENNIS *et al.* 2007; BYTS *et al.* 2008; DZIENNIS AND ALKAYED 2008; SHYU *et al.* 2008; AGGARWAL *et al.* 2009; YOU *et al.* 2011; MICHAUD-LEVESQUE *et al.* 2012; ZHENG et al., 2014). Sendo essas STAT envolvidas diretamente na função mitocondrial, organela essa, muita importante para metabolismo energético e apoptose celular (MEIER e LARNER, 2014).

A STAT 3 apresenta papel neuroprotetor em vários eventos de estresse neuronal incluindo a isquemia, estimulando a produção de secretoneurina, estradiol, interleucina-6 para promover neuroproteção (DZIENNIS *et al.* 2007; BYTS *et al.* 2008; DZIENNIS AND ALKAYED 2008; SHYU *et al.* 2008; MICHAUD-LEVESQUE *et al.* 2012; FANG *et al.* 2013), regulando a respiração celular-permeabilidade mitocondrial (HEUSCH et al., 2011) e proteção contra isquemia/reperfusão (SZCZEPANEK et al., 2011). FANG et al. (2013)

demonstraram que a ativação do STAT3 tem efeito neuroprotetor por diminuir a ativação da caspase-3 em modelos de isquemia/reperfusão cerebral global.

A STAT5 medeia a sinalização de citocinas atuando como um sinal transdutor de genes específicos. Ela está relacionada a uma ampla variedade de processos biológicos atuando desde a regulação da apoptose até a proliferação celular, diferenciação e sobrevivência celular (GRIMLEY *et al.* 1999; BYTS *et al.* 2008; STANKIEWICZ *et al.*, 2012).

No cérebro, nos neurônios do hipocampo, STAT 5 não é requerida para promover neuroproteção pela ação da eritropoietina (EPO), mas em conjunto com Akt é essencial para a atividade neurotrófica da EPO. Tanto STAT5 e Akt são necessárias para a sinalização neuroprotetora e neurotrófica promovida pela GH sobre aos neurônios (BYTS *et al.* 2008).

#### **1.4 ISQUEMIA/REPERFUSÃO CEREBRAL EXPERIMENTAL**

Diferentes modelos animais são utilizados para estudar a susceptibilidade de populações neuronais aos insultos isquêmicos e aos mecanismos que envolvem a degeneração celular (CHOI *et al.* 1987).

Entre os modelos animais de isquemia e reperfusão cerebral destacam-se os que simulam os dois principais tipos de lesão isquêmica aguda reconhecidos abaixo:

- a) Isquemia cerebral focal: redução ou cessação do fluxo sanguíneo para uma área localizada do cérebro.
- b) Isquemia cerebral global: redução generalizada da perfusão cerebral.

O modelo experimental de isquemia cerebral global pode, ainda, ser dividido em dois tipos (TARDINI AND YOSHIDA 2003):.

- a) Modelo de isquemia completa, quando se promove a ligadura de todos os ramos da base aórtica ou a aplicação de torniquete de pressão ao redor do pescoço do animal;

- b) Modelo de isquemia incompleta, quando há algum fluxo sanguíneo chegando ao cérebro.

Diversos animais têm sido usados em estudos experimentais, mas a preferência recai sobre o rato. O pequeno tamanho do animal e a maior disponibilidade propiciam maior utilização do roedor como animal experimental.

Em 1960, Levine criou o primeiro modelo de hipóxia-isquemia, que consistia na ligadura unilateral da artéria carótida comum (ACC) em ratos Wistar, seguido de vinte e quatro horas de exposição gradual a ambiente anóxico, por até 45 minutos, sem monitorização fisiológica.

Esse modelo foi subseqüentemente refinado, com melhor cuidados pré e pós-operatório, realização da monitorização fisiológica e uso de controles mais adequados, caracterização dos metabólitos cerebrais e da histopatologia (BROWN; BRIERLY, 1968).



Posteriormente, a isquemia por oclusão de dois vasos (artéria carótida direita e esquerda) foi desenvolvida e proposta para estudar o fluxo sanguíneo cerebral, o estado metabólico e as alterações ácido-básico dos encéfalos de ratos pós-isquêmicos. Esse modelo proporciona alto grau de isquemia reversível, o que é conseguida à custa da oclusão da artéria carótida comum bilateralmente, combinada com hipotensão arterial sistêmica suficiente para reduzir, de forma acentuada, o fluxo sanguíneo cerebral (COLLI; SILVA; CARLONI, 1998).

Sabe-se que os ratos apresentam polígono de Willis bem desenvolvido. Por esse motivo, quando submetidos à isquemia de dois vasos, há diminuição do aporte sanguíneo cerebral em cerca de 50% (LIPTON 1999).

Posteriormente (PULSINELLI E BUCHAN 1988) desenvolveram a isquemia de dois vasos associados com a cauterização das artérias vertebrais. Outros autores confirmaram a redução fluxo sanguíneo cerebral entre 90% a 95% nesse modelo (ABRAHAM E LAZAR 2000). O estudo angiográfico cerebral complementar tem mostrado, apesar do rigor técnico, que a cauterização das artérias vertebrais pode estar sujeita a ocorrência de falhas; e que, mesmo com oclusão completa de todos os vasos cerebrais extracranianos, o tecido cerebral pode receber suprimento sanguíneo através de circulação colateral (TARDINI E YOSHIDA 2003).

A oclusão bilateral das artérias carótidas comuns produz isquemia global transitória parcial, comprovada pela redução de ATP no tecido cerebral, com repercussão sistêmica (MUNIZ *et al.*, 2004).

As alterações metabólicas mais significativas são verificadas nos primeiros minutos de reperfusão, caracterizadas pela mobilização e consumo de substratos energéticos sistêmicos e consequente superprodução de ATP, tipificando a “lesão de reperfusão” (MUNIZ *et al.*, 2004).

Neste mesmo modelo, Nogueira (2009), por método histoquímico, evidenciou lesão cerebral após a isquemia e reperfusão, sendo este modelo aplicado também para quantificar a área isquêmica em outros trabalhos com estudo tanto na fase de isquemia como na de reperfusão.

## **2 OBJETIVO**

Estudar os efeitos da utilização de um novo metalofármaco, do complexo nitrosil rutênio, doador de NO, em modelo experimental de isquemia/reperfusão global parcial no cérebro de ratos wistar.

## **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar o efeito do complexo de nitrosil rutênio na fase de reperfusão inicial e após 24h da isquemia.

Investigar se o complexo nitrosil rutênio é capaz de promover neuroproteção e modificar a concentração de NO na isquemia/reperfusão cerebral.

Avaliar o efeito do complexo de nitrosil rutênio sobre o edema cerebral pós-isquemia.

Avaliar se o complexo de nitrosil rutênio influencia a expressão do fator de transcrição nuclear NF-kB.

Analisar se o pré-condicionamento com complexo de nitrosil rutênio é capaz de modificar a expressão das proteínas quinases (AKT, ERK, JNK, P70S6, STAT3, STAT5A/B e CREB) e seu envolvimento na neuroproteção em modelo experimental de isquemia/reperfusão cerebral.

### 3 MÉTODO

#### 3.1 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi de caráter experimental, com o uso de animais vivos e controle intra-indivíduo, realizado de acordo com as Normas Internacionais para a Pesquisa Biomédica em Animais (1990) e de acordo com a Lei Federal nº. 6.638, de 08 de maio de 1979. Foi realizado em animais de laboratório (ratos Wistar), do biotério do Departamento de Cirurgia, Divisão de Cirurgia Experimental, sendo processadas as amostras no laboratório de nutrigenômica (Departamento de Cirurgia) e Laboratório da Biologia da Cicatrização, Ontogenia e Nutrição de Tecidos, ambos da Faculdade de Medicina, pertencente à Universidade Federal do Ceará.

O bem estar geral dos animais foi baseado nos princípios dos 3Rs (*Replacement, Reduction, Refinement*).

O modelo do estudo, assim como a revisão científica, foi avaliado pelo comitê de ética em investigação animal competente da Universidade Federal do Ceará, tendo sido aprovado sob protocolos números 62/08 de 27 de agosto de 2008 e 01/10 de 20 de abril de 2010 (anexo 1 e 2).

Os animais foram manipulados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de experimentação Animal (CONCEA). Todos os esforços foram realizados no sentido de reduzir o número de animais utilizados.

## 3.2 ANIMAIS

Foram utilizados 180 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) procedentes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos no Laboratório de Cirurgia Experimental – LABCEX.

O peso médio dos animais foi de 290.27g (mínimo de 280g e máximo de 300g).

Todos receberam ração padrão e água *ad libitum*, foram mantidos nas mesmas condições ambientais em gaiolas individuais com ciclos de dia (12 horas) e noite (12 horas).

## 3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

### 3.3.1 Divisão dos grupos

Os animais foram distribuídos de forma aleatória em seis grupos, sendo doze animais em cada grupo de uma hora de reperfusão e dezoito animais em cada grupo de vinte e quatro hora de reperfusão conforme abaixo:

#### **a) Sham 1h (Solução salina com falsa isquemia/reperfusão 1h):**

Injetado solução salina intraperitoneal, decorridos trinta minutos, foi

realizada cervicotomia. Decorridos mais noventa minutos, os animais foram sacrificados para coleta das amostras.

**b) Sham 24h (Solução salina com falsa isquemia/reperfusão 24h):**

injetado solução salina intraperitoneal, decorridos trinta minutos, foi realizada cervicotomia. Após decorrido mais trinta minutos foi realizada a síntese da pele. Os animais foram sacrificados após vinte e quatro horas do início da reperfusão.

**c) SS+I/R 1h (Solução salina seguida de isquemia/reperfusão 1h):**

Injetada solução salina intraperitoneal, decorridos trinta minutos, foi realizada cervicotomia e foram ocluídas as duas artérias carótidas simultaneamente. Após decorridos trinta minutos, foram retirados as pinças das artérias carótidas simultaneamente (iniciada a reperfusão) e realizada a síntese da pele. Os animais foram sacrificados após uma hora do início da reperfusão.

**d) SS+I/R 24h (Solução salina seguida de isquemia/reperfusão**

**24h):** Injetada solução salina intraperitoneal, decorridos trinta minutos, foi realizada cervicotomia e foram ocluídas as duas artérias carótidas simultaneamente. Após decorridos trinta minutos foram retiradas as pinças das artérias carótidas simultaneamente (iniciada a reperfusão) e realizada a síntese da pele. Os animais foram sacrificados após vinte e quatro horas do início da reperfusão.

**e) Ru+I/R 1h (Ru-bpy seguido de isquemia/reperfusão 1h):**

Injetada solução contendo Ru-bpy intraperitoneal, na concentração de 100 mg/Kg de massa corpórea do animal), decorridos trinta minutos, foi realizada cervicotomia, ocluídas as duas artérias carótidas simultaneamente. Após decorridos trinta minutos foram retiradas as pinças das artérias carótidas (iniciado a reperfusão) simultaneamente e realizada a síntese da pele. Os animais foram sacrificados após uma hora do início da reperfusão.

**f) Ru+I/R 24h (Ru-bpy seguido de isquemia/reperfusão 24h):**

Injetada solução contendo Ru-bpy intraperitoneal, na concentração de 100 mg/Kg de massa corpórea do animal, decorridos trinta minutos, foi realizada cervicotomia e ocluídas as duas artérias carótidas simultaneamente. Após decorridos trinta minutos foram retiradas as pinças das artérias carótidas (iniciada a reperfusão) simultaneamente e realizado a síntese da pele. Os animais foram sacrificados após vinte e quatro horas do início da reperfusão.

**3.3.2 Técnica Anestésica e pré-condicionamento com Ru-bpy**

Os animais foram anestesiados com associação de cloridrato de quetamina a 10%, na dose de 90mg/kg, e cloridrato de xilazina a 2%, na dose de 10mg/kg, administrados simultaneamente, por via intramuscular, na parte posterior da coxa direita. Os animais foram considerados anestesiados quando

ocorreu a perda dos reflexos córneo-palpebrais, e retirada da pata ao estímulo doloroso por preensão.

Foi realizado controle rigoroso dos tempos e da temperatura (por meio de termômetro retal) dos animais, mantendo-os entre 36 e 37 graus Celsius, utilizando meios físicos (uso de lâmpada incandescente para aquecer, quando necessário) durante todo o procedimento cirúrgico. Também foi verificado se os animais apresentavam cianose de extremidade ou mucosas durante todo o experimento.

A administração da droga-teste (Ru-bpy) só ocorreu após a certificação de que os animais apresentavam temperatura retal normal, sem cianose e com ritmo respiratório constante no mínimo por 10 minutos.

O complexo de Ru-bpy, sintetizado no laboratório de química orgânica e inorgânica da Universidade Federal do Ceará, foi diluído em solução salina na concentração de 30 mg do complexo Ru-bpy/ml de solução salina, sendo injetada a dose de 100 mg/Kg de massa corpórea do animal via intraperitoneal.

Nos animais do grupo sham, foi administrada intraperitonealmente a solução salina (veículo) na dose de 1 ml da solução salina para cada 300 g de massa corpórea do animal.

### ***3.3.3 Procedimentos cirúrgicos***



Os animais foram acomodados em bancada cirúrgica durante todo o procedimento. As disseções foram realizadas com instrumental microcirúrgico adequado.

Após a certificação de que os animais estavam anestesiados, foi realizada incisão na pele da região inguinal esquerda e realizada disseção atraumática da artéria femoral e colocada uma cânula de polietileno cuja extremidade distal ficou dentro da artéria aorta, preenchendo-se o lúmen da cânula com solução salina para verificação da pressão arterial média (PAM) (Figura 4).

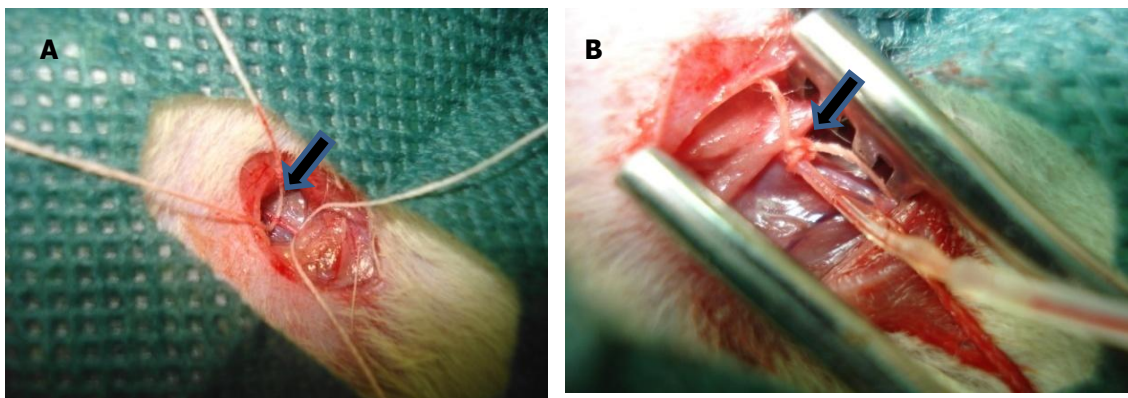


Figura 4: Campo cirúrgico da disseção e implante da cânula de polietileno na artéria femoral comum do membro posterior do rato. A) Artéria femoral comum dissecada e isolada (seta); B) Cânula de polietileno (PE50) introduzida na artéria femoral (seta).

A extremidade distal da cânula de polietileno foi conectada a um sistema de cabos e transdutores de pressão arterial (Mikro – TIP, ADInstruments, Nova Zelândia); e estes, ao amplificador de sinal (Brigde amp, ADInstruments, Nova Zelândia), que enviou sinais que foram registrados, lidos, codificados e analisados, continuamente, durante todo o experimento, por meio de um

microcomputador com o software Labchart Pro versão 6.0 (ADInstruments, Nova Zelândia).

Em seguida foi realizada cervicotomia mediana longitudinal anterior com individualização e isolamento bilateral das artérias carótidas comuns direita e esquerda (ACCs) a 0,5cm da bifurcação em artérias carótidas externa e interna, conforme descrito por Muniz (2004) (Figura 5).

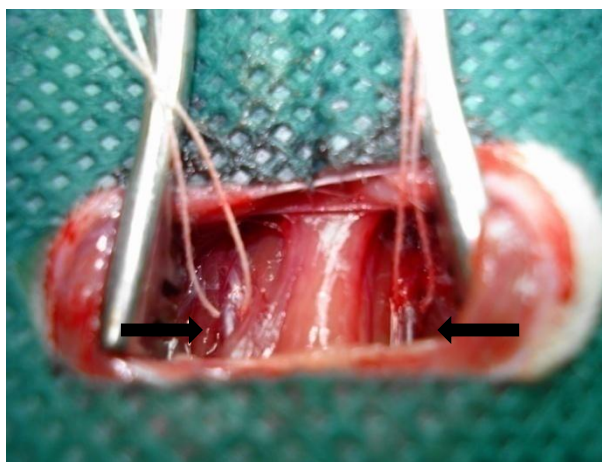


Figura 5: Dissecção da artéria carótida comum bilateral de rato e isoladas com fio de algodão para colocação das pinças (setas).

### ***3.3.3.1 Indução da isquemia/reperfusão cerebral***

De acordo com as manobras cirúrgicas previstas para cada grupo, realizou-se pinçamento bilateral e concomitante das ACCs (artérias carótidas comuns) a 0,5 cm de sua bifurcação com pinças vasculares usadas em microcirurgia atraumática removível (Figura 6). Observa-se que o segmento do vaso que está inferior ao ponto de oclusão encontra-se preenchido por sangue e

que o segmento do vaso que está superior ao ponto de oclusão encontra-se vazio.

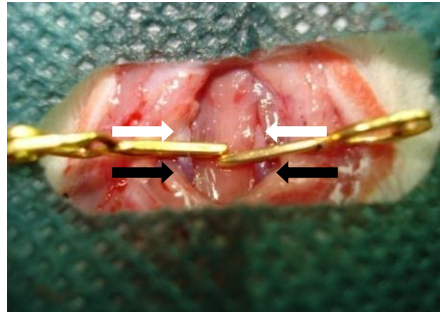


Figura 6: Campo cirúrgico evidenciando as artérias carótidas comuns pinçadas com pinças vasculares. Observar ausência de fluxo no segmento distal (setas brancas) e a artéria preenchida por sangue antes do ponto de pinçamento (setas pretas).

Após 30 minutos, foram retiradas as pinças das carótidas dos animais simultaneamente, observado o retorno do fluxo sanguíneo pela carótida e verificado a pulsabilidade do vaso visualmente. Sendo em seguida realizada a síntese da pele e distribuídos os animais em cada grupo em questão.

Durante todo o experimento a região cervical foi irrigada com solução salina estéril para prevenir a desidratação tecidual, verificada a temperatura retal, observado se apresentavam cianose nas mucosas e verificada a PAM até a primeira hora depois da isquemia.

### **3.3.3.2 Morte dos animais e extração do cérebro**

Após a realização de todas as manobras cirúrgicas, ainda sob efeito anestésico, os animais foram decapitados e imediatamente realizada uma

craniectomia utilizando-se micromotor elétrico de 20.000 rpm para osteotomia (Micromotor Elétrico LB 100 – Beltec ®) acoplado a disco de corte dupla-face, procedendo-se posterior abertura da dura-máter para acesso e extração dos hemisférios cerebrais (Figura 7).

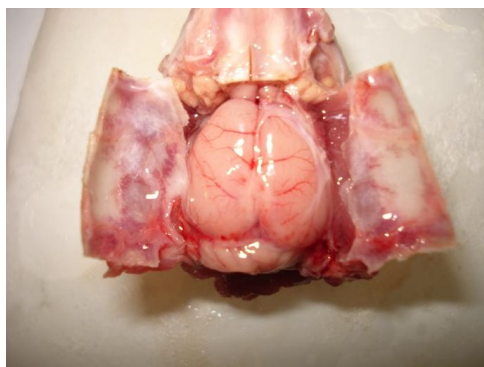


Figura 7: Osteotomia craniana e exposição do tecido cerebral do animal experimental (rato wistar). Fonte: arquivo do autor.

### **3.4 AVALIAÇÃO DA LESÃO DE ISQUEMIA/REPERFUSÃO**

#### ***3.4.1 Preparação dos tecidos para exame histológico e imunohistoquímico***

Os cérebros foram rapidamente removidos da caixa craniana, colocados com a sua região ventral voltada, para cima, e a região dorsal para baixo, dentro da matriz cerebral para ratos (Brain Matrix; Zivic Instruments ®) sob plataforma de gelo (figura 8).

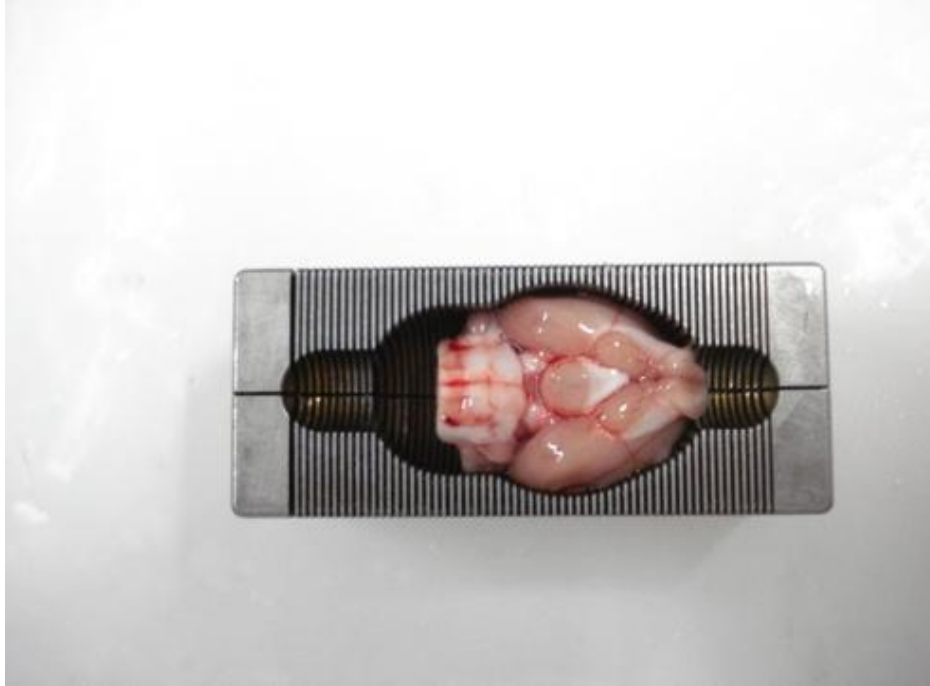


Figura 8: Fotografia do cérebro alocado dentro da matriz para cortes milimetrados do cérebro do animal experimental (rato), sob superfície de gelo.

Foram introduzidas lâminas de platina, adquiridas em conjunto com o *Brain matrix - Zivic Instruments®*, cortantes (umedecidas com soro fisiológico) cuidadosamente em cada espaço, obedecendo a distância de 2 mm entre as lâminas a partir do pólo anterior (denominado como ponto zero) até o fim do cérebro, sem incluir a região do cerebelo e tronco encefálico.

Foram removidas todas as lâminas em bloco da matriz, e retirada cada fatia de tecido cerebral, individualmente, da superfície da lâmina (Figura 9) e colocados os tecidos em solução de formolína a 10% tamponada com solução para cada análise dos tecidos: histopatologia do hipocampo e imunohistoquímica para NFkB.



Figura 9: Fotografia dos cortes do cérebro de rato realizado na matriz com lâminas de platina com intervalo de dois milímetros entre os cortes.

Em seguida sofreram imersão e fixação em formalina por 24 horas antes de serem transferidas para um solução de etanol a 70%, quando foram processadas, embebidas em parafina, e cortadas para gerar fatias de 5  $\mu\text{m}$ , e montadas em lâminas histológicas.

### ***3.4.2 Análise histopatológica do hipocampo***

As lâminas coradas com hematoxilina e eosina foram utilizadas para avaliar a extensão da lesão no hipocampo, usando um microscópio (Olympus, X400). O número de neurônios eosinofílicos na região CA1 foram contados, como descrito por Kaku et al. (1993). O dano neuronal na região CA1 do hipocampo foi expresso como percentual de células eosinofílicas em um total de células encontradas em um campo de microscópio com aumento de 400 vezes nessa região do hipocampo.

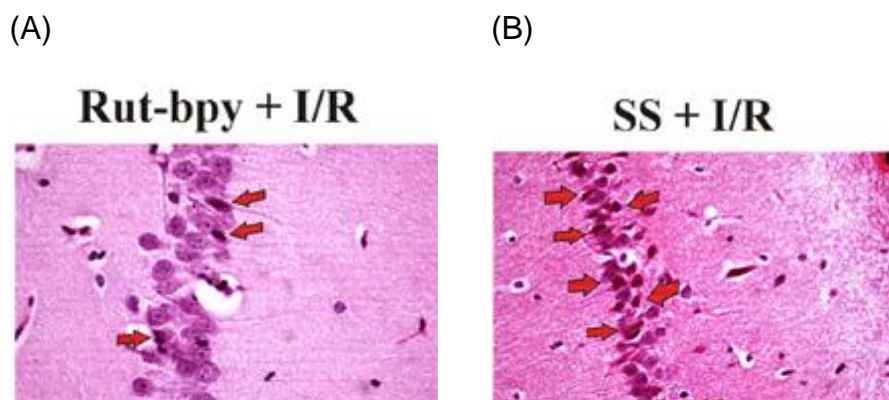


Figura 10. Imagem representativa dos neurônios eosinófilos (seta vermelha) na região hipocampo do animal controle (A) e do animal com isquemia e reperfusão (B).

### **3.4.3 Análise imunohistoquímica**

A imunohistoquímica para NF-kB p50 (NLS) foi realizada utilizando método de estreptavidina-biotina-peroxidase. As fatias de tecido cerebral, dos animais que foram decapitados com uma hora de reperfusão, foram fixados em formol 10% por 24 h para inclusão em parafina e posteriormente confecção das lâminas histológicas. Os cortes foram desparafinizados, hidratados em xilol e álcool e imersos em tampão citrato 0,1 M (pH 6,0), sob aquecimento em forno de microondas, por 10 minutos para a recuperação antigênica. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), intercaladas com o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% (10 minutos). Depois lavados com PBS

(10 minutos). Os cortes (cinco de cada grupo) foram incubados “overnight” (4°C) com anticorpo primário de coelho anti-NF-κB diluído 1:200 em PBS com albumina sérica bovina 5% (PBS-BSA). No dia seguinte, foi feita a incubação com o anticorpo secundário (de detecção) biotilado anti-IgG de coelho, diluído 1:400 em PBS-BSA, por 30 minutos. Após lavagem com PBS, os cortes foram incubados com o complexo estrepto-avidina peroxidase conjugada (complexo ABC Vectastain®) por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, seguiu-se coloração com o cromógeno 3,3`diaminobenzidine-peróxido (DAB). Por fim, realizou-se a desidratação das amostras e montagem das lâminas. Controles negativos foram processados simultaneamente como descrito acima, sendo que o anticorpo primário (anti-NF-κB) foi substituído por PBS-BSA 5%.

#### **3.4.4 Quantificação do edema cerebral**

A determinação do conteúdo de água (indicador de edema) no tecido cerebral (n= 6 de cada grupo) foi realizada pelo método de secagem (VAKILI et al, 2007). Imediatamente após decapitação, o tecido cerebral foi pesado (peso antes da secagem) em seguida colocado em uma estufa a temperatura de 110 graus Celsius durante 24 horas (secagem). No final deste período, o tecido cerebral foi novamente pesado (peso depois da secagem). O valor da porcentagem de água no tecido (edema) foi determinado pela fórmula:

$$\text{Indicador de edema} = 100 \times \frac{(\text{Peso antes da secagem} - \text{peso depois da secagem})}{\text{Peso antes da secagem}}$$

#### **3.5 QUANTIFICAÇÃO DO NITRITO**



Imediatamente após 1h de reperfusão, todo o tecido hipocampal foi cuidadosamente removido sendo rapidamente congelado em nitrogênio líquido e estocado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a análise. Antes da análise, rapidamente o tecido hipocampal foi triturado e homogeneizado em solução de sacarose sem que o mesmo ficasse descongelado. O homogeneizado foi centrifugado a  $1.000\times g$  por 10 min. O sobrenadante foi incubado em uma microplaca (com múltiplos poços) com nitrato redutase (0.016U/poço) por 12 h para conversão de  $\text{NO}_3$  para  $\text{NO}_2$ . O acúmulo de  $\text{NO}_2$  no sobrenadante, um indicador da presença de NO nos tecidos, foi determinado com ensaio colorimétrico utilizando o reagente de Greiss (0.1% N-(1naphthyl) ethilenediamina dihidroclorido, 1% sulfanilamida e 2,5% ácido fosfórico) como descrito por Grenn et al. (1982). Quantidade de igual volume do sobrenadante e de reagente de Greiss foram misturados; essa mistura incubada por 10 min a temperatura ambiente protegido da luz (câmara escura). A curva de calibração foi feita com nitrito de sódio (5-50 M) diluído em água destilada. A absorbância foi mensurada em uma placa de ELISA e realizada a leitura a 540 nm por um espectrofotômetro. Os resultados foram expressos como micromoles de nitrito, usando a curva interna padrão.

### **3.6 WESTEN BLOTTING PARA NF-kB**

Imediatamente após 1h de reperfusão todo o tecido hipocampal foi cuidadosamente removido e rapidamente congelado em nitrogênio líquido e estocado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram descongeladas, trituradas com um homogeneizador elétrico (ultra-Turrax homogenizer, Sigma, St. Louis, MO,

USA), contendo solução de lise e então transferidas para os tubos testes com coquetel de inibidor de protease e centrifugada a 14.000 rpm. O sobrenadante foi analisado usando o método ácido bicinconínico, kit de ensaio proteico BCA (Pierce, Rockford, IL, USA) para padronizar 50 µg de proteína em cada amostra. A amostra foi colocada em mini gel de poliacrilamida desnaturada a 15% (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). O gel foi transferido para membrana de nitrocelulose e bloqueado *overnight* com leite desnatado. As membranas foram então incubadas com anticorpo de coelho anti-NF-κB na diluição de 1:300 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) por 2h e então lavados 3 vezes em solução tampão, em seguida incubados com anticorpo secundário e lavados como descrito acima. Cada membrana foi lavada e exposta ao filme Kodak X-AR (Kodak, Rochester, NY, USA). A densitometria foi normalizada com β-actina, como um controle interno.

### **3.7 ESTUDO DA SINALIZAÇÃO INTRACELULAR (VIA PROTEÍNA QUINASE)**

Imediatamente após o tempo de reperfusão (1h e 24h), todo o hipocampo foi cuidadosamente removido e rapidamente congelado em nitrogênio líquido sendo em seguida transferidos para criotubo e armazenado em freezer a -80 graus Celsius. As amostras descongeladas foram pulverizadas com homogeneizador elétrico (ultra-Turrax homogenizer, Sigma, St. Louis, MO, USA), contendo uma solução tampão de lise e então transferidos para tubos de ensaio com solução inibidora de protease e centrifugadas a 14.000 rpm. Os

sobrenadantes foram submetidos ao ensaio pelo método ácido bicinônico, com aparato adequado de ensaio proteico BCA (Pierce, Rockford, IL, USA) para padronizar 50 µg de proteína em cada amostra.

O ensaio utilizado foi o kit *MILLIPLEX Rat 9 – Plex Multi-detector* que é um método rápido, constituindo uma conveniente alternativa ao Western Blotting (*Pathway Magnetic Bead Kit*). Este kit foi utilizado para detectar mudanças nas quinases fosforiladas: ERK/MAP 1/2 (Thr185/Tyr187), AKT (Ser473), STAT3 (Ser727), JNK (Thr183/Tyr185), P70S6 (Thr412) e CREB (Ser133) em lisados do hipocampo utilizando um sistema Luminex (MAGPIX<sup>®</sup> com xPONENT<sup>®</sup> software). Os procedimentos de imunoprecipitação foram realizados de acordo com os manuais do fabricante.

### **3.7.1 Preparo dos beads magnéticos multi-vias de sinalização**

Os *beads* magnéticos, presentes em solução estoque concentrada 20X (disponível no kit *MILLIPLEX MAP MULTI-PATHWAY*) e protegidos da luz, foram sonicados por 15 s e agitados por 30 segundos. Pipetado 0.150 ml desta solução e adicionados 2,85 ml de *MILLIPLEX MAP ASSAY BUFFER 2*, ficando a solução de beads concentrada 1X, sendo agitada por 15 s antes da utilização.

### **3.7.2 Preparação do detector de anticorpos Biotin e streptavidin-PE**

A solução de detecção de anticorpos *MILLIPLEX MAP* é concentrada em solução estoque a 20X (Biotinilado detector de anticorpo e Streptavidin-PE 1:25

(SAPE) no kit. As soluções estoques foram agitada por 10 segundos. Pipetado 0.150 ml da solução estoque biotinilado (detector de anticorpo) e em seguida, acrescentado 2,85 ml de MILLIPLEX MAP ASSAY BUFFER 2. Em seguida, pipetado 0,120 mL da solução SAPE e acrescentados 2,88 ml do *MILLIPLEX MAP Cell Singnaling ASSAY Buffer 2*.

### **3.7.3 Protocolo do imunoensaio simultâneo das quinases**

Foram adicionados 50 uL de solução tampão do próprio kit em cada poço da placa de ELISA, sendo agitada por 10 min em temperatura ambiente. Em seguida 25 uL da solução tampão foram adicionadas nos poços controle “branco”, adicionados 25 uL de amostras controle de reação (disponível no kit) e de amostras lisadas em seus respectivos poços. A placa foi incubada overnight por 20h a 4 graus Celsius sendo agitada em câmara escura. Os poços foram lavados 2 vezes com 100 uL de solução tampão e em seguida adicionadas 25 uL da solução de detecção de anticorpos. Posteriormente, a placa foi incubada por 1h a temperatura ambiente sendo agitada em câmara escura.

A placa foi colocada no bloco separador magnético sendo removido o excesso do detector de anticorpo e adicionado 25 uL da solução SAPE.

A Placa, em seguida, foi incubada por 15 min a temperatura ambiente sendo agitada em câmara escura. Em seguida, 25 uL de tampão amplificador foram adicionado a placa e incubado por 15 min temperatura ambiente sendo agitada em câmara escura. O SAPE/tampão amplificador foi removido e os beads foram ressuspendido em 150 uL de solução tampão.

Foi realizada a leitura da placa no MAGPIX<sup>®</sup> com xPONENT<sup>®</sup> software.

Os resultados foram expressos com valores da intensidade de fluorescência (MFI).

### **3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram, inicialmente, analisados com o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a distribuição normal. Os dados com distribuição normal foram submetidos à análise de variância simples (ANOVA) e, em seguida, ao teste de comparações múltiplas de Tukey ou de Bonferroni, e os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Dados com duas variáveis (tempo e droga teste) foram analisados com *two way ANOVA* e, em seguida, submetidos ao teste de comparações múltiplas de Bonferroni ou de Tukey. Dados não paramétricos foram expressos como medianas e percentil (25-75), sendo analisados pelo teste de Mann Whitney. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

## 4 RESULTADOS

### ***4.1 Quantificação dos neurônios eosinofílicos da região CA1 do hipocampo***

O exame histológico (H & E) da região CA1 do hipocampo evidenciou um aumento significativo ( $*p < 0.05$ ) de neurônios eosinofílicos no grupo SS+I/R quando comparado com o grupo SS, tanto na primeira hora de reperfusão (1h) como na vigésima quarta hora de reperfusão (24h) (Tabela 1 e Figura 11)

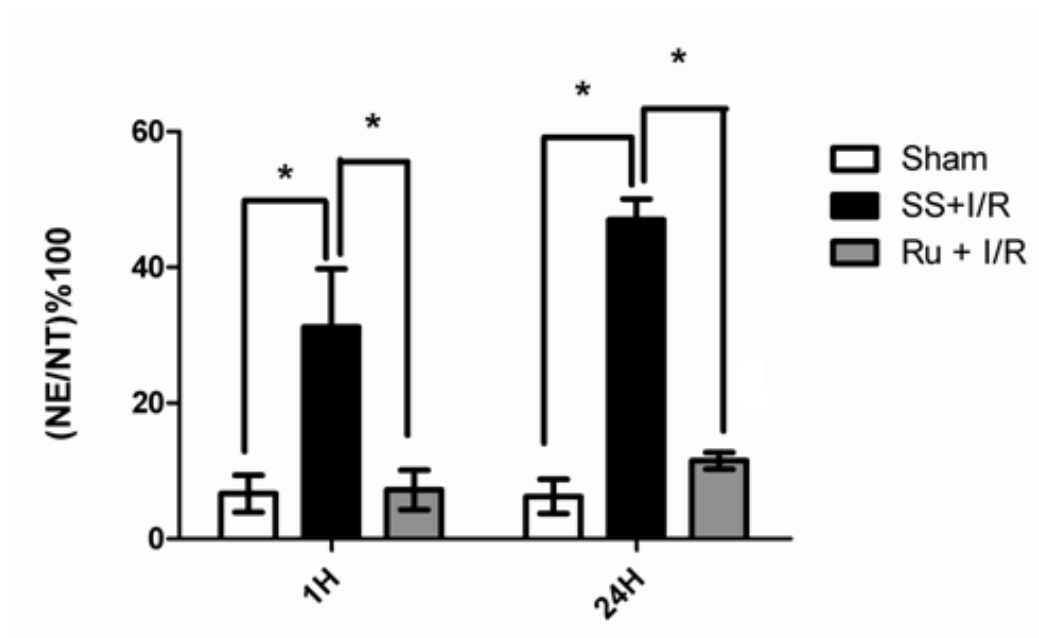
Ao comparar os grupos SS+I/R com os grupos Ru+I/R, há uma diminuição significativa ( $*p < 0.05$ ) da porcentagem de neurônios eosinofílicos nos grupos Ru+I/R, isso ocorre tanto na primeira hora de reperfusão como na vigésima quarta hora de reperfusão (Tabela 1 e Figura 11).

Não houve diferença estatística quando comparados os grupos sham com os grupos Ru+I/R ( $*p > 0.05$ ) na primeira hora de reperfusão, porém há aumento da porcentagem de neurônios eosinofílicos no grupo Ru+I/R em comparação ao Sham ( $^{\#}p < 0.05$ ) na vigésima quarta hora de reperfusão (Tabela 1 e Figura 11).

**Tabela 1.** Porcentagem de neurônios eosinofílicos (relação entre número de neurônios eosinofílicos e o número de neurônios totais, resultado multiplicado por 100).

	SHAM		SS + I/R		Ru + I/R	
	1h	24h	1h	24h	1h	24h
Média	6,655	6,232	31,23	47,01	7,201	11,507
Desv. Padrão	2,734	2,528	17,12	6,154	2,938	1,23

\* resultado expresso em média e desvio padrão da média. Abreviaturas: Sham = grupo controle; SS+I/R = grupo pré-condicionado com solução fisiológica. Ru+I/R = grupo pré-condicionado com Ru-bpy.



**Figura 11.** Porcentagem de neurônios eosinofílicos (relação entre número de neurônios eosinofílicos e o número de neurônios totais sendo resultado multiplicado por 100). Resultado foi expresso em média  $\pm$  desvio padrão da média. \* $p < 0.001$ . Teste estatístico: ANOVA 2-way, seguido do teste de Bonferroni. Abreviaturas: NE = neurônios eosinofílicos; NT=neurônios totais; Sham = grupo controle; SS+I/R = grupo pré-condicionado com solução fisiológica. Ru+I/R = grupo pré-condicionado Ru-bpy.

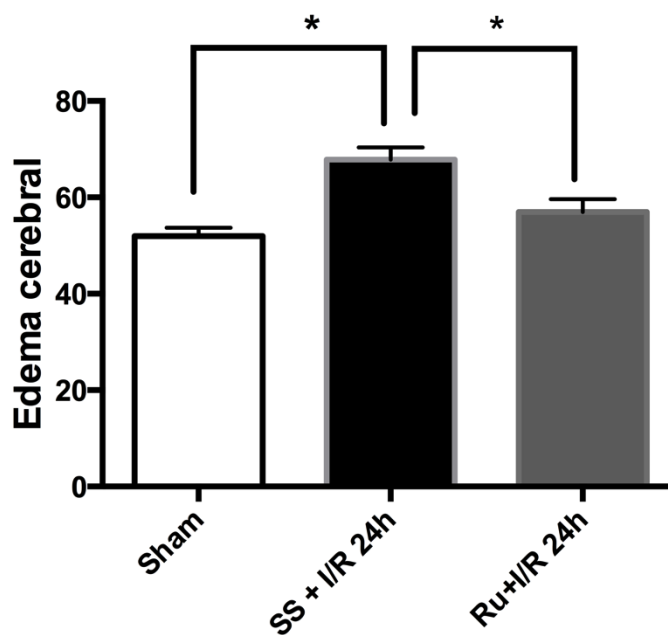
#### 4.2 Análise do Edema Cerebral

Houve um aumento significativo ( $p < 0.05$ ) do edema cerebral no grupo SS+I/R 24h quando comparado com os grupos Sham e Ru+I/R (Tabela 2 e Figura 12).

**Tabela 2:** Avaliação do edema cerebral

	SHAM	SS+I/R	Ru+I/R
Média	51,95	67,81	56,95
Desv. Padrão	1,756	2,532	6,497

Nota: resultado expresso em média  $\pm$  desvio padrão da média. Abreviaturas: Sham = grupo controle; SS+I/R = grupo pré-condicionado com solução fisiológica. Ru+I/R = grupo pré-condicionado com Ru-bpy.



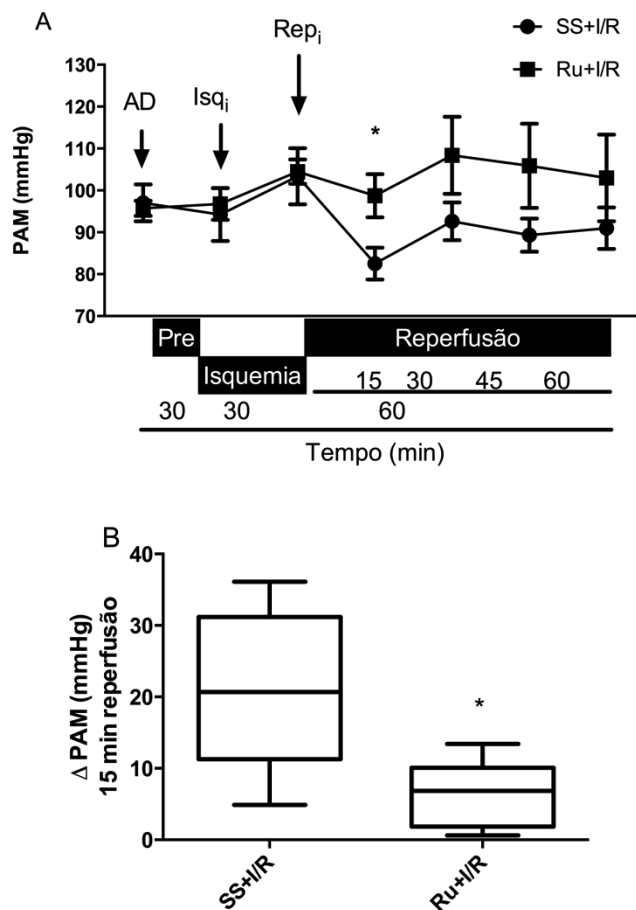
**Figura 12:** Avaliação do edema cerebral nos grupos experimentais. Resultado foi expresso em média  $\pm$  desvio padrão da média. \* $p < 0,05$ . Teste de ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Abreviaturas: Sham = grupo controle; SS+I/R = grupo pré-condicionado com solução fisiológica. Ru+I/R = grupo pré-condicionado com Ru-bpy.

### 4.3 Análise da pressão arterial média (PAM)

Durante os primeiros 15 minutos da reperfusão, a variação da PAM foi significativamente menor no grupo Ru+I/R do que no grupo SS+I/R ( $p < 0,05$ ) (Figura 13).



Não houve diferença significativa durante a fase de isquemia entre os grupos ( $p>0.05$ ) (Figura 13).



**Figura 13.** Variação da pressão arterial. A) Pressão arterial média durante as fases de isquemia e reperfusão. B) Variação da pressão arterial média nos 15 minutos iniciais da reperfusão. \* $p<0.05$ . Teste de ANOVA seguido do teste de Tukey. Abreviaturas: Rep<sub>i</sub>= início da reperfusão; Isq<sub>i</sub> = início da isquemia; AD = pré-condicionamento com solução salina ou Ru-bpy em seus respectivos grupos.

#### 4.4 Concentração do metabólito do NO (nitrito)

A concentração do nitrito foi menor no grupo SS+I/R quando comparado com SS ( $p < 0.05$ ) (Tabela 3 e Figura 14).

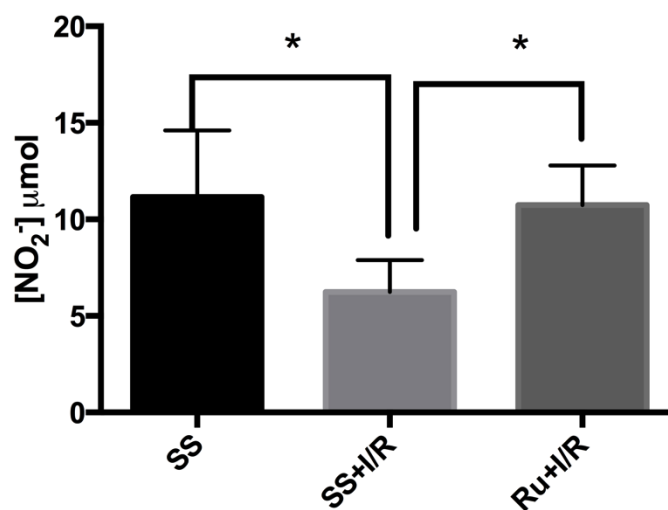
O grupo Ru+I/R apresentou maior concentração de nitrito do que o grupo SS+I/R, estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) (Tabela 3 e Figura 14).

Entre o grupo SS e o grupo Ru+I/R não houve diferença estatística em relação a concentração de nitrito no tecido hipocampal (Tabela 3 e Figura 14).

**Tabela 3.** Efeito do pré-condicionamento do Ru-bpy na concentração de  $\text{NO}_2^-$ .

	SHAM	SS+I/R	Ru+I/R
Média	11,16	6,243	10,75
Desv. Padrão	3,447	1,646	2,044

Nota: Representados pela média  $\pm$  desvio padrão da média



**Figura 14.** Concentração de nitrito. Efeito do pré-condicionamento do Ru-bpy na concentração de  $\text{NO}_2^-$  no hipocampo após uma hora de reperfusão. Resultados foram expresso como média  $\pm$  desvio padrão da média. \* $p < 0.05$ . Teste de ANOVA seguido do teste de Tukey

#### ***4.5 Imunohistoquímica para NFk-B (NLS)***

A imunorreação para NFk-B (NLS) foi menor no hipocampo dos animais do grupo Ru+I/R em comparação com o grupo SS+I/R em regiões do hipocampo CA1, CA2 e CA3 (Figura 15).

***RESERVADO PARA PAGINA COLORIDA DE IMUNO***

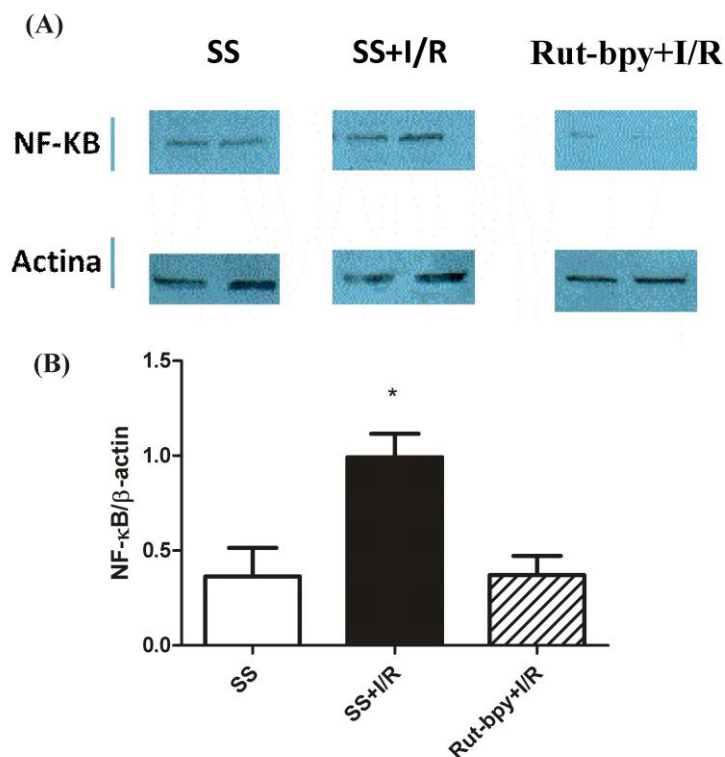
#### 4.6 – Western blotting para NF-kB (NLS)

A densitometria para NF-kB (NLS) revelou maior expressão ( $p < 0.05$ ) do NF-kB no grupo SS+I/R quando comparado com o grupo Ru+I/R. Os animais do grupo Ru+I/R não apresentaram diferença estatística quando comparado com o grupo controle (Tabela 4 e Figura 16).

**Tabela 4.** Valores da densitometria para NF-kB (NLS) normalizados com  $\beta$ -actina.

	SHAM	SS+I/R	Ru+I/R
Média	0,3633	0,9915	0,3712
Desv. Padrão	0,3014	0,2492	0,201

\* Os valores são expressos em média e desvio padrão da média.



**Figura 16.** Quantificação do NF-κB. A) Imagem representativa das bandas do Western blotting. B) Análise quantitativa da expressão do NFκ-B. Os resultados foram normalizados com β-actina. Os valores são expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. \* $p < 0.05$  quando comparado SS+I/R com SS ou Ru-bpy+I/R. Teste ANOVA, seguido de teste de Tukey.

## 4.6 IMUNO ENSAIO PARA SINALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS QUINASES AKT, JNK, P70S6, ERK 1/2, CREB, STAT 3 E STAT 5.

### 4.6.1 - Proteína quinase B (AKT)

Após 24h da lesão de isquemia/reperfusão (grupo SS+I/R) houve uma menor intensidade de fluorescência da proteína quinase B (AKT) no hipocampo quando comparada ao grupo Sham estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) (Tabela 5, Figura 17).

O pré-condicionamento com Ru-bpy elevou significativamente a

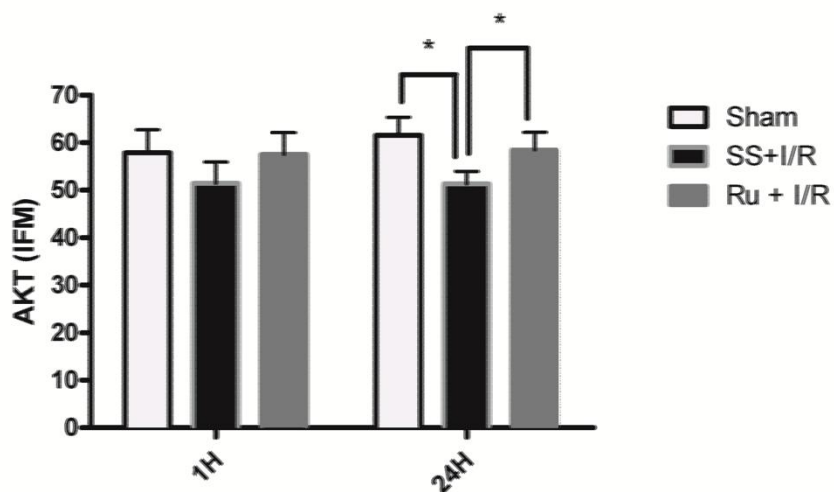
intensidade de fluorescência da proteína AKT quando comparado com o grupo SS+I/R após 24h da lesão de isquemia/reperfusão ( $p>0,05$ ) (Tabela 5 e Figura 17), neste mesmo período de lesão não houve diferença estatística entre o grupo sham e o grupo Ru+I/R.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Sham, SS+I/R e Ru+I/R quando comparados na primeira hora de reperfusão ( $p>0,05$ ).

**Tabela 5.** Expressão da proteína AKT.

	SHAM		SS + I/R		Ru + I/R	
	1h	24h	1h	24h	1h	24h
Média	57,83	61,5	51,42	51,33	57,5	58,42
Desv. Padrão	4,875	3,782	4,499	2,582	4,593	3,72

Nota: Resultado expresso como intensidade de fluorescência média.



**Figura 17.** Expressão da proteína AKT nos grupos Sham, solução salina (SS+I/R) e Ru-bpy (Ru+I/R) submetidos à isquemia / reperfusão cerebral, após 1 e 24h de reperfusão. Teste

ANOVA seguido de pós teste Tukey. \* $p < 0.05$ .

#### 4.6.3 – Proteína N-terminal C-Jun (JNK)

Após 24h da lesão de isquemia/reperfusão (grupo SS+I/R), foi maior a intensidade de fluorescência da proteína quinase JNK no hipocampo quando comparada ao grupo Sham significativamente ( $p < 0,05$ ) (Tabela 6, figura 18).

O pré-condicionamento com Ru-bpy diminuiu significativamente a intensidade de fluorescência da proteína quinase JNK quando comparado com o grupo SS+I/R após 24h da lesão de isquemia/reperfusão ( $p < 0,05$ ) (Tabela 6 e Figura 18), neste mesmo período de lesão não houve diferença estatística entre o grupo sham e o grupo Ru+I/R.

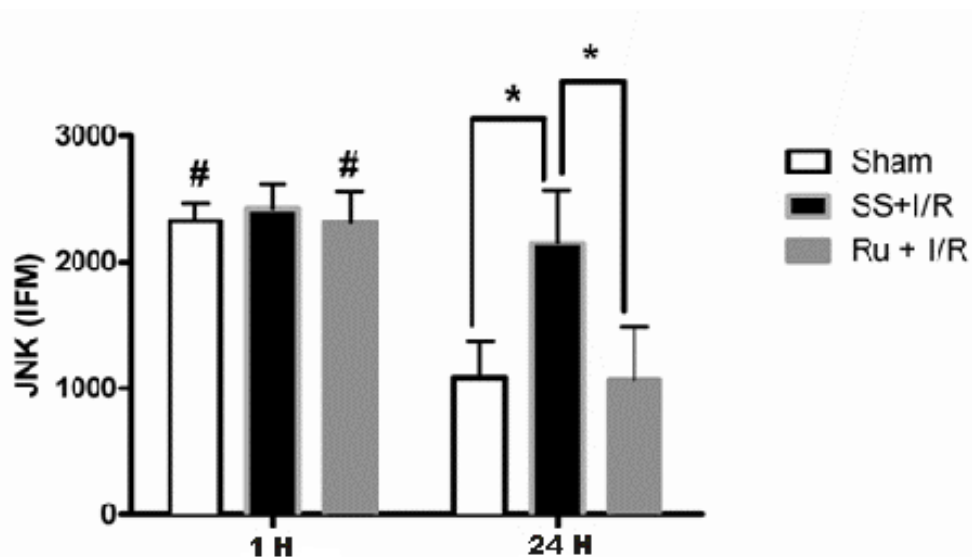
Após 24h de reperfusão ocorreu diminuição da intensidade de fluorescência da proteína JNK quando comparado os grupos Ru+I/R e o grupo Sham com seus respectivos grupos com 1h de reperfusão ( $p < 0,05$ ).

Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos Sham, SS+I/R e Ru+I/R quando comparados na primeira hora de reperfusão ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 6.** Expressão da proteína JNK.

	SHAM		SS + I/R		Ru + I/R	
	1h	24h	1h	24h	1h	24h
Média	2327	1085	2424	2151	2309	1069
Desv. Padrão	135,2	282,1	191,5	420	254,6	416,1

Nota: Resultado expresso com intensidade de fluorescência média



**Figura 18.** Expressão da proteína JNK nos grupos Sham, solução salina (SS+I/R) e Ru-bpy (Ru+I/R) submetidos à isquemia / reperfusão cerebral, após 1 e 24h de reperfusão. Teste ANOVA seguido do teste Tukey. \* $p < 0.05$  comparação intragrupos 24 h de reperfusão e # $p < 0.05$  comparação intergrupos 1 h e 24 h de reperfusão (sham 1 h vs. Sham 24h e Ru+I/R 1h vs. Ru+I/R 24 h).

#### 4.6.4 Proteína quinase da proteína ribossomal (P70S6)

Após 24h da lesão de isquemia/reperfusão apresentou menor intensidade de fluorescência da proteína quinase ribossomal (P70S6) no hipocampo, significativa ( $p < 0,05$ ), quando comparada ao grupo Sham (Tabela 7, Figura 19).

O pré-condicionamento com Ru-bpy elevou significativamente a intensidade de fluorescência da proteína P70S6 quando comparado com o grupo SS+I/R após 24h da lesão de isquemia/reperfusão ( $p < 0,05$ ) (Tabela 7 e



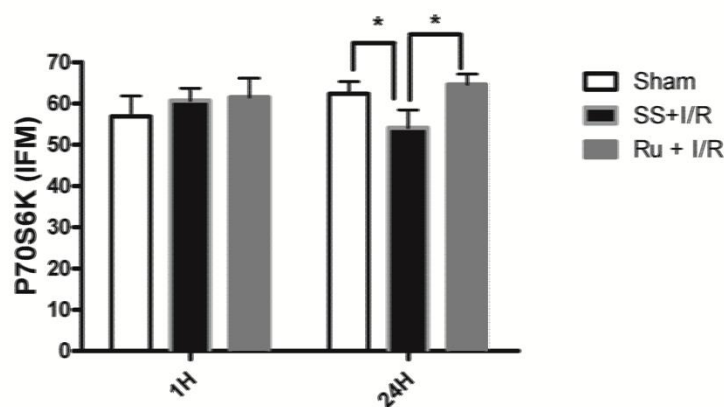
Figura 19), neste mesmo período de lesão não houve diferença estatística entre o grupo sham e o grupo Ru+I/R.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Sham, SS+I/R e Ru+I/R quando comparados na primeira hora de reperfusão ( $p>0,05$ ).

**Tabela 7.** Expressão da proteína P70S6.

	SHAM		SS + I/R		Ru + I/R	
	1h	24h	1h	24h	1h	24h
Média	56,83	62,33	60,67	54,08	61,5	64,58
Desv. Padrão	4,956	5,279	2,994	4,318	4,593	2,538

Nota: Resultado expresso com intensidade de fluorescência média



**Figura 19.** Expressão da proteína S6P70 nos grupos Sham, solução salina (SS+I/R) e Ru-bpy (Ru+I/R) submetidos à isquemia / reperfusão cerebral, após 1 e 24h de reperfusão. Teste ANOVA seguido do teste Tukey.  $*p<0.05$  comparação intragrupos 24 h de reperfusão.

#### 4.6.5 Proteína quinase da proteína ERK 1/2

Após 1h da lesão de isquemia/reperfusão houve uma diminuição significativa ( $p<0,05$ ) da intensidade de fluorescência da proteína quinase ERK

1/2 no hipocampo quando comparada ao grupo Sham (Tabela 8, Figura 20).

O pré-condicionamento com Ru-bpy elevou significativamente a intensidade de fluorescência da proteína quinase ERK 1/2 quando comparado com o grupo SS+I/R após 1h da lesão de isquemia/reperfusão ( $p < 0,05$ ) (Tabela 8 e Figura 20), neste mesmo período de lesão não houve diferença estatística entre o grupo sham e o grupo Ru+I/R ( $p > 0,5$ ).

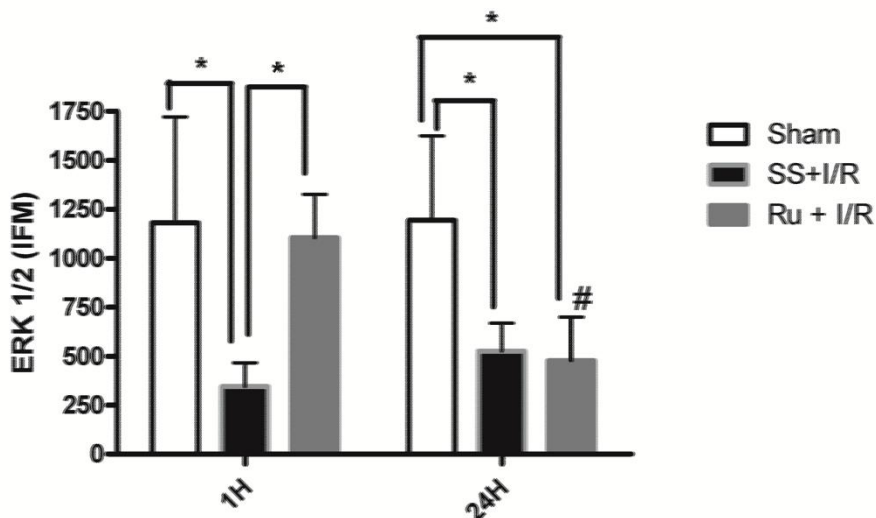
Após 24 h da lesão de isquemia/reperfusão ocorreu diminuição da expressão da proteínas ERK 1/2 no grupo SS+I/R como também no grupo Ru+I/R quando comparados com o grupo Sham ( $p < 0.05$ ) (Tabela 8, Figura 20).

Na comparação entre grupo Ru+I/R 1h vs. Ru+I/R 24 há diminuição da expressão da proteína ERK 1/2 no grupo Ru+I/R estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) (Tabela 8 e Figura 20).

**Tabela 8.** Expressão da proteína ERK 1/2

	SHAM		SS + I/R		Ru + I/R	
	1h	24h	1h	24h	1h	24h
Média	1181	1194	344,3	525,5	1105	578,3
Desv. Padrão	540,7	431,8	121,9	143,4	269,7	220,7

Nota: Resultado expresso com intensidade de fluorescência média



**Figura 20.** Expressão da proteína ERK 1/2 nos grupos Sham, solução salina (SS+I/R) e Ru-bpy (Ru+I/R) submetidos à isquemia/reperfusão cerebral, após 1 e 24h de reperfusão. Teste ANOVA seguido do teste Tukey. \* $p < 0.05$  comparação intergrupos, # $p < 0.05$  comparação Ru+I/R (1h) vs Ru+I/R (24h).

#### 4.6.6 Proteína quinase da proteína CREB

Após 1h da lesão de isquemia/reperfusão houve uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da intensidade de fluorescência da proteína quinase CREB no hipocampo quando comparada ao grupo Sham (Tabela 9, Figura 21).

O pré-condicionamento com Ru-bpy não ocasionou diferença na intensidade de fluorescência significativa da proteína quinase ERK 1/2 quando comparado com o grupo SS+I/R após 1h da lesão de isquemia/reperfusão ( $p > 0,05$ ) e nem com o grupo Sham (Tabela 9 e figura 21), neste mesmo período de lesão.

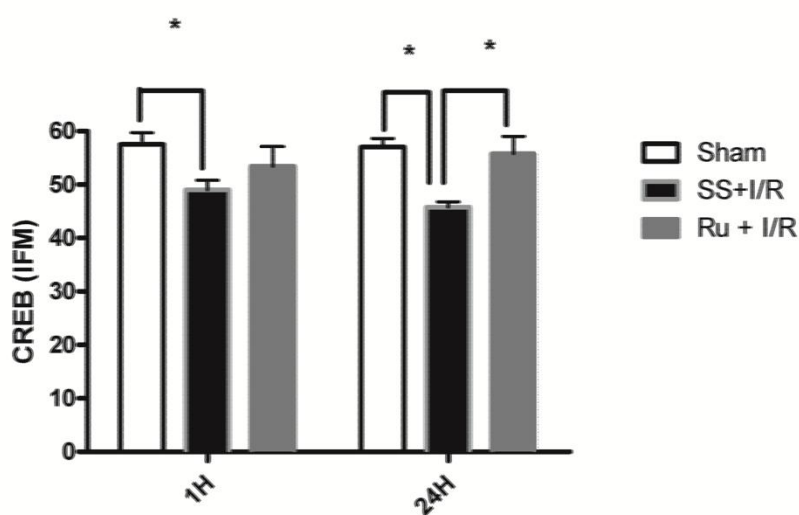
Após 24h da lesão de isquemia/reperfusão houve uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da intensidade de fluorescência da proteína quinase CREB no hipocampo quando comparada ao grupo Sham (Tabela 9, Figura 21).

O pré-condicionamento com Ru-bpy elevou significativamente a intensidade de fluorescência da proteína quinase CREB quando comparada com o grupo SS+I/R após 24h da lesão de isquemia/reperfusão ( $p < 0,05$ ) (Tabela 9 e Figura 21), neste mesmo período de lesão não houve diferença estatística entre o grupo sham e o grupo Ru+I/R ( $p > 0,5$ ).

**Tabela 9.** Expressão da proteína CREB

	SHAM		SS + I/R		Ru + I/R	
	1h	24h	1h	24h	1h	24h
Média	57,5	57	49	45,75	53,42	55,75
Desv. Padrão	5,505	3,95	4,517	2,525	3,693	3,283

Nota: Resultado expresso com intensidade de fluorescência média



**Figura 21.** Expressão da proteína CREB nos grupos Sham, solução salina (SS+I/R) e Ru-bpy

(Ru+I/R) submetidos à isquemia / reperfusão cerebral, após 1 e 24h de reperfusão. Teste ANOVA seguido do teste de Tukey. \* $p < 0.05$

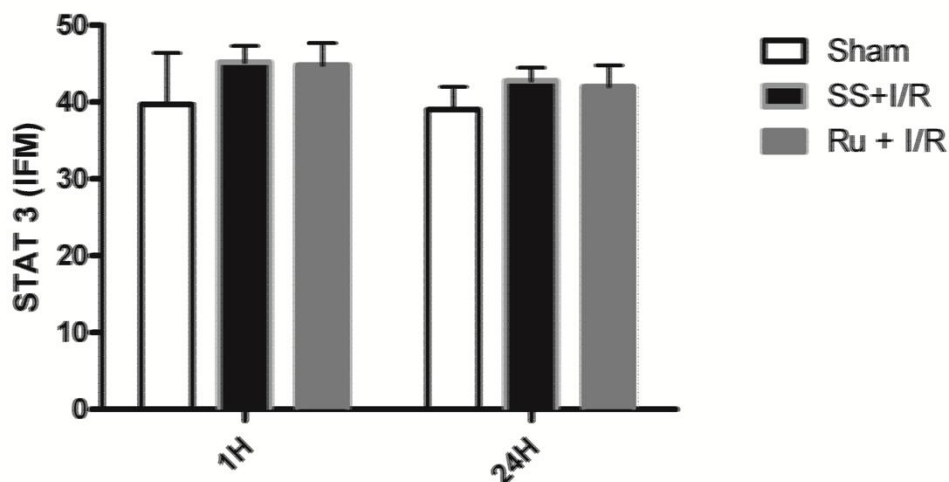
#### 4.6.7 Proteína quinase da proteína STAT3

Não houve diferença estatística na comparação intragrupos e intergrupos ( $p > 0.05$ ) (tabela 10 e figura 22).

**Tabela 10.** Expressão da proteína STAT 3

	SHAM		SS + I/R		Ru + I/R	
	1h	24h	1h	24h	1h	24h
Média	39,67	39	45,17	42,75	44,83	42
Desv. Padrão	6,713	2,966	2,137	1,725	2,858	2,757

Nota: Resultado expresso com intensidade de fluorescência média



**Figura 22.**

Expressão da proteína STAT 3 nos grupos Sham, solução salina (SS+I/R) e Ru-bpy (Ru+I/R) submetidos à isquemia / reperfusão cerebral, após 1 e 24h de reperfusão. Teste ANOVA seguido do teste de Tukey.

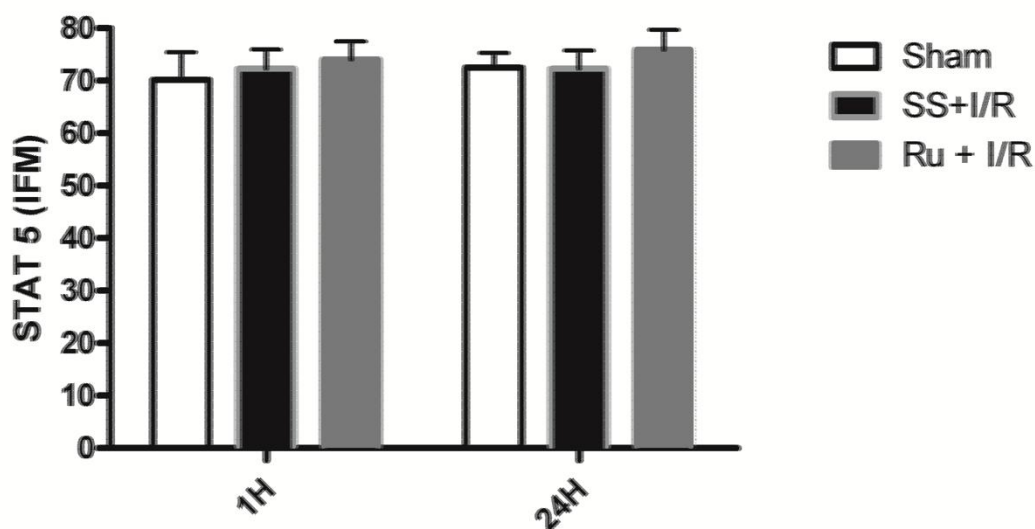
#### 4.6.8 Proteína quinase da proteína STAT5

Não houve diferença estatística na comparação intragrupos e intergrupos ( $p>0.05$ ) (tabela 11 e figura 23).

**Tabela 11.** Expressão da proteína STAT 5

	SHAM		SS + I/R		Ru + I/R	
	1h	24h	1h	24h	1h	24h
Média	70,17	72,5	72,33	72,33	74	75,92
Desv. Padrão	5,269	2,811	3,615	3,43	3,521	3,774

Nota: Resultado expresso com intensidade de fluorescência média



**Figura 23.** Expressão da proteína STAT 5 nos grupos Sham, solução salina (SS+I/R) e Ru-bpy (Ru+I/R) submetidos à isquemia / reperfusão cerebral, após 1 e 24h de reperfusão. Teste ANOVA seguido do teste de Tukey.

## 5 DISCUSSÃO

O complexo nitrosil rutênio (Ru-bpy) é capaz de liberar óxido nítrico em sistemas biológicos de forma superior a outros doadores de NO (SILVA *et al* 2006; SILVA *et al*, 2010). No presente estudo a concentração de nitrito (metabólito do NO) dos animais que foram pré-condicionados com Ru-bpy foi igual ao grupo controle durante o período de isquemia/reperfusão, sendo que durante a isquemia/reperfusão, os animais que receberam solução salina apresentaram redução na concentração de nitrito após 1h do início da reperfusão e maior dano neuronal tanto 1h como 24h após o início da reperfusão.

O processo fisiopatológico da lesão neuronal induzido pela I/R cerebral é complexo e envolve a síntese do óxido nítrico (IGNARRO *et al.*, 1987; DAWSON E DAWSON, 1995; 1998; WILLMOT *et al.*, 2005; OTTAVIANO *et al.*, 2008; OLMEZ e OZYURT, 2012). Na última década, houve um avanço no conhecimento da fisiopatologia da isquemia/reperfusão cerebral (DIRNAGL *et al.*, 1999; LO *et al.*, 2005; PRIETO-ARRIBAS *et al.*, 2011) e o envolvimento do

óxido nítrico, com potencial terapêutico, incluindo o papel dos doadores de NO (ZHANG et al., 1999; PLUTA et al., 2001; ZHANG et al., 2001; KHAN et al., 2006; WAINWRIGHT et al., 2007), assim como também dos inibidores da óxido nítrico sintetase (NOS) (BUISSON, PLOTKINE E BOULU, 1992; WILLMOT et al., 2005; WAINWRIGHT et al., 2007; GAUR AND KUMAR, 2010).

Doadores de NO são substâncias farmacologicamente ativas que liberam NO em sistemas biológicos espontaneamente ou por indução, desencadeando uma resposta semelhante ao NO endógeno ou compensando sua deficiência endógena (IGNARRO et al., 1999; IGNARRO et al., 2002). A administração de doadores de NO é uma estratégia terapêutica para proteção neuronal, melhorando a vasodilatação e a perfusão sanguínea para o tecido cerebral (ZHANG et al., 2001; SILVA et al., 2006; KHAN et al., 2006), especialmente quando o fluxo sanguíneo e o sistema vascular endotelial estão comprometidos.

O único metalofármaco doador de NO usado clinicamente hoje é o nitroprussiato de sódio que tem a desvantagem de ser fotossensível e liberar cianeto, sendo citotóxico. Por outro lado, o complexo de rutênio recém sintetizado nitrosil rutênio (Cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)]PF<sub>6</sub>) não tem estas desvantagens, além de ser solúvel em água (SILVA et al., 2006).

Nos últimos anos, muita atenção tem sido dada aos complexos de nitrosil rutênio e seus potenciais usos farmacológicos, especialmente devido a rápida liberação de NO (FRICKER et al., 1997), bem como seu baixo nível de toxicidade (HUTCHINGS et al., 2005; CERQUEIRA et al., 2008; SILVA et al., 2010). Vários compostos de rutênio têm sido sintetizados e purificados, mas até



o presente momento este estudo é o primeiro a utilizar o Ru-bpy em um modelo experimental de isquemia e reperfusão cerebral em ratos.

O Ru-bpy pode liberar óxido nítrico através de reações químicas, elétricas e fotoquímicas (WINWRIGHT et al., 2007). Nos sistemas biológicos, este complexo pode liberar NO ativado em meio com agentes redutores (SILVA et al., 2011).

Esse complexo de rutênio (Ru-bpy) é um potente vasodilatador capaz de liberar NO intracelular e ativar a guanilato ciclase (GMPc) (BONAVENTURA et al., 2007; SANTANA et al., 2015). Além de produzir maior relaxamento máximo em anéis da aorta de nitroprussiato de sódio em base molar semelhante, Ru-bpy está associada com níveis mais elevados de liberação NO sem ser fotossensível ou liberando cianeto (BONAVENTURA et al., 2007).

O presente estudo é o primeiro a demonstrar que Ru-bpy, em dose menor do que a dose letal (DL50) usada em outro trabalho (SILVA et al., 2010), marcadamente pode reduzir, de forma significativa, a lesão neuronal hipocampal causada pela isquemia/reperfusão, com relativamente pequenas mudanças na pressão arterial durante a transição da isquemia e reperfusão, envolvendo vias de sinalização celular.

O animal de experimentação utilizado foi o rato Wistar, mamífero de baixo custo de aquisição e manutenção, fácil manuseio, elevada resistência a infecção a ao trauma cirúrgico, com admirável sistema de homeostasia, além de ser semelhante à espécie humana, sob o ponto de vista da anatomia e fisiologia cerebrovasculares (TORRES et al., 2003). A massa corporal inicial dos animais

oscilou entre 280-300 gramas. Com isso, foi minimizado o risco de uma maior taxa de mortalidade entre os ratos durante o experimento, como observado por Fujishima e demais autores (1976), que encontraram uma associação proporcional entre massa corpórea superior a 300g e mortalidade durante a isquemia-reperfusão cerebral global.

Outra característica do modelo experimental em estudo foi a associação de xilazina e quetamina, cujo o sinergismo entre essas drogas anestésicas utilizadas promove a diminuição dos efeitos colaterais, como salivação excessiva, bem como potencializa a sedação e a analgesia, além de garantir o relaxamento muscular, o que permite procedimentos cirúrgicos sem sofrimento ao animal (SILVA *et al.*, 2002). A dose utilizada tem por característica um efeito hipotensor (CAMPELO *et. al.*, 2011) e é capaz de reduzir o fluxo sanguíneo cerebral e a pressão parcial do oxigênio no tecido cerebral (LEI *et al.*, 2001) e em relação a temperatura do corpo, Stein *et al.* (2007) não encontraram nenhuma diferença nos valores de temperatura corporal quando comparado com o grupo de controle em seus estudos em ratos sob anestesia com xilazina e quetamina. Este modelo, foi utilizado anteriormente por diversos investigadores (LEVINE S, 1960; LIPTON P, 1999; IBAYASHI *et al.*, 2000; PAXINO E WATSON, 2004; MUNIZ *et al.*, 2004; PRIETO-ARRIBAS *et al.*, 2011).

No estudo atual, no entanto, as duas artérias carótidas foram ocluídas simultaneamente para induzir isquemia e após 30 minutos retiradas as pinças para restaurar o fluxo sanguíneo. O modelo é fácil de usar, efetivamente prejudica o fornecimento de sangue para o cérebro (HE *et al.*, 1997; LIPTON,

1999; TRAYSTMAN, 2003; GULATI e SINGH, 2014) e reduz a formação de ATP (fosforilação oxidativa) (MUNIZ et al., 2004). Além disso, ele simula as consequências de perioperatório isquemia/reperfusão quando o sangue que flui na artéria carótida precisa ser interrompido, como durante a cirurgia para tumores, aneurisma e trauma pós correção das carótidas, assim como também endarterectomia de carótidas e *bypass* cardiopulmonar.

Têm-se utilizado diversos modelos experimentais para estudar as alterações provocadas pela isquemia e isquemia-reperfusão cerebral. A oclusão temporária de ambas as artérias carótidas comuns, realizada neste experimento, interfere na irrigação da maior parte das regiões ântero-mediais do cérebro (SCHALLER; GRAF, 2004). KUNIMATSU et al. (2001) evidenciaram que a oclusão bilateral das artérias carótidas comuns acarreta uma redução de aproximadamente 60% no fluxo cerebral local medido através de *Doppler*.

Dentre os modelos de isquemia cerebral global com oclusão bilateral das artérias carótidas comuns seguida de reperfusão em ratos, a revisão da literatura revelou tempo de isquemia variando de 1 minuto (KUNIMATSU et al., 2001), até 2 horas (IWASAKI *et al.*, 1989), e tempo de reperfusão variando de 5 minutos (MUNIZ; FARIA; VASCONCELOS, 2004; FARIA; MUNIZ; VASCONCELOS, 2007;), até 10 dias (HEIM; SIEKLUCKA; SONTAG, 1994), com dezenas de combinações diferentes entre os tempos de isquemia e reperfusão.

Neste trabalho, foi elaborado um modelo experimental utilizando tempo de isquemia com 30 minutos de duração e tempo de reperfusão com 1 hora e 24 hora de duração.

A oclusão experimental de vasos cerebrais tem evidenciado o aumento da formação de RLs em determinadas áreas do cérebro, reconhecidamente mais suscetíveis ao estresse oxidativo, como o hipocampo (PÉREZ-PINZÓN *et al.*, 1996; HOMI *et al.*, 2002; LEHOTSKÝ *et al.*, 2004; KIRAY *et al.*, 2008).

O hipocampo tem sido descrito como uma região especialmente sujeita a lesões isquêmicas, inclusive em humanos (PETITO *et al.*, 1987). A consequência da isquemia-reperfusão cerebral é a perda seletiva de neurônios vulneráveis em regiões específicas, como o hipocampo, particularmente a área CA1, motivo pelo qual esta última tem sido escolhida para análise em vários trabalhos (KIRINO; TAMURA; SANO, 1984; NITATORI *et al.*, 1995; PÉREZ-PINZÓN *et al.*, 1997; KIRAY *et al.*, 2008; LEHOTSKÝ *et al.*, 2009; NANDAGOPAL; MURALIDHARAN; THIRUMURUGAN, 2011;). Enquanto os neurônios de CA1 são altamente vulneráveis à isquemia, a área hipocampal CA3 mostra-se mais resistente (PULSINELLI, 1985; ZOLA-MORGAN *et al.*, 1992), já tendo sido objeto de estudos específicos (CONGAR *et al.*, 2000). Além do mais, modelo experimental de isquemia cerebral global leva a extensiva lesão neuronal em CA1 hipocampal e resulta em déficit de aprendizagem espacial e memória em ratos (WANG *et al.* 2008).

Populações distintas de neurônios apresentam diferentes vulnerabilidades à isquemia. Por exemplo, 5 minutos de isquemia global acarreta morte neuronal

na área hipocampal CA1, mas sem efeitos em outras populações, enquanto que um período de 20 minutos de isquemia global causa a morte de neurônios até da área CA3 (LIPTON, 1999). Sabe-se que os neurônios em CA1 do hipocampo são os mais susceptíveis à isquemia em modelos experimentais de isquemia cerebral global com oclusão bilateral das artérias carótidas comuns, podendo haver lesão também nos neurônios da camada hipocampal CA3 após 20 minutos de oclusão. Entretanto, os mecanismos moleculares responsáveis pela diferente vulnerabilidade neuronal à lesão isquêmica ainda não estão bem esclarecidos (ALI *et al.*, 2004).

A isquemia cerebral induz uma grande variedade de alterações estruturais nos neurônios afetados, que incluem: retração e condensação (“neurônios escuros”), picnose nuclear, eosinofilia citoplasmática (“neurônios vermelhos”), precipitação de pigmento formaldeído (incrustação), dentre outras (GARCIA, 1984). A lesão neuronal, que pode ser identificada nos estágios iniciais pela retração e pelo edema celular, torna-se mais evidente à microscopia óptica quando ocorre sua evolução para morte e necrose, pela visualização de “neurônios vermelhos” (GARCIA *et al.*, 1993; GARCIA *et al.*, 1997). Neste trabalho, foi realizada a contagem dos neurônios eosinofílicos na área CA1 do hipocampo, para quantificar a morte neuronal. A contagem de neurônios eosinofílicos tem sido utilizada como medida de morte neuronal, independente da etiologia, em mamíferos (RISSI *et al.*, 2006; SANT’ANA *et al.*, 2009; SANT’ANA; BARROS, 2010).

Verificou-se que o modelo experimental utilizado neste trabalho foi adequado e consistente, visto que nos grupos sham, a contagem de neurônios eosinofílicos foi maior nos ratos submetidos à isquemia-reperfusão cerebral tanto no grupo SS+I/R 1h como 24h, com aumento na perfusão 24h tipificando a lesão de isquemia/reperfusão, quando comparados com os animais do grupo Sham.

À análise histológica do hipocampo (área CA1) evidenciou um efeito protetor do Ru-bpy quando administrado antes da isquemia/reperfusão. Ela também sugere que a diminuição da expressão do NF-kB desempenhou um papel na neuroproteção hipocampal relacionado ao Ru-bpy. Assim como também diminuição do edema cerebral com o pré-condicionamento com Ru-bpy observado com 24h de perfusão. Resultados semelhantes foram relatados com outros NO doadores como o DETANONOate, em modelos de isquemia global incompleta (oclusão apenas da artéria carótida comum), que aumentou o fluxo sanguíneo cerebral, e o uso do NOC18 – (Z)-1-[2(2-aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazene-1,1,2-diolate – que foi capaz de proteger a perda da seletividade da membrana mitocondrial diminuindo a morte neuronal durante a isquemia (COERT et al., 1999; ZHANG et al., 2001; PLUTA et al., 2001; WAINWRIGHT et al., 2007; ARANDARCIKAITE et al., 2015).

Outros trabalhos evidenciam que o mecanismo de proteção neurovascular dos doadores de NO, é mais eficiente quando liberado em uma quantidade adequada no momento certo no meio celular (WILLMOT et al., 2003; KHAN et al., 2006). No estudo atual fica claro que a concentração de

metabólitos de NO é mantida durante a isquemia e reperfusão pela administração de Ru-bpy.

Há muitas evidências indicando que a isquemia/reperfusão cerebral pode levar à disfunção no endotélio vascular, possivelmente devido a um aumento da produção de vasoconstritores e/ou reduzida disponibilidade de vasodilatadores, como NO (SANCHES et al., 2006).

O doador de NO, Ru-bpy, induz vasodilatação através do cGMP (CERQUEIRA et al., 2008) e apresenta, também, benefício em amplificar o potencial evocado no hipocampo in-vitro, efeito esse diretamente relacionado com a liberação de NO (WIERASZKO et al., 2001).

No presente trabalho, como esperado, houve aumento de metabólitos do NO no hipocampo dos animais pré-condicionados com Ru-bpy, confirmando a liberação e metabolização do NO proveniente do Ru-bpy.

Devido ao bem desenvolvido polígono de Willis, ratos têm seu suprimento sanguíneo reduzido em apenas 50% quando submetidos à isquemia através do pinçamento de ambas as carótidas (LIPTON, 1999). Assim, a presença de um vasodilatador, como NO, favorece o fluxo sanguíneo em qualquer vaso não ocluído do polígono de Willis (por exemplo as artérias vertebrais). Além disso, estudos da angiografia cerebral têm mostrado que, mesmo com uma completamente cauterização das artérias vertebrais, pode existir vasos não ocluídos e o tecido cerebral pode receber sangue da circulação colateral, mesmo quando todos os vasos cerebrais extracranianos foram ocluídos (TARDINI et al., 2003), justificando assim o uso do NO para aumentar o fluxo

sanguíneo cerebral.

Durante o evento de hipoxemia celular há supressão da síntese de NO pelas NOS, pois essas enzimas requerem meios com o oxigênio. Em contrapartida, a utilização de doadores de NO liberam NO independente da presença de oxigênio. Isso tem sido mostrado na melhora funcional da condução e plasticidade sináptica de neurônios do hipocampo, de cultura de neurônios hipocampal de ratos após isquemia com administração de doadores de NO (WEIRASZKO et al., 2001; COSTA et al., 2011).

De La Torre e Aliev (2005) relataram que os animais experimentais, em modelo de isquemia/reperfusão cerebral, tratados com inibidores seletivos da NO sintase endotelial (eNOS) apresentam aumento do edema cerebral durante a reperfusão cerebral, sugerindo que o NO derivado da eNOS desempenha um papel crítico na manutenção do fluxo sanguíneo cerebral, justificando a administração de doadores de NO. Além disso o NO gerado pela eNOS é crucial para função vascular e homeostase celular com um importante efeito protetor no pré-condicionamento isquêmico (LIU et al, 2006; SCORZIELLO et al 2007; CHEN et al., 2010; CHEN et al., 2010). Neste trabalho, a administração de Ru-bpy (doador de NO exógeno) diminuiu o edema cerebral, sendo este resultado concordante com a literatura (ZHANG et al., 2014; ZHANG et al., 2013).

Curiosamente, em um estudo realizado por Greco et al. (2011), pré-tratamento com o inibidor seletivo da eNOS, L-N-(1-iminoethyl)-ornitina, em doses altas o suficiente para induzir uma lesão cerebral isquêmica causou uma



redução significativa da expressão I $\kappa$ B-alfa no córtex isquêmico, sugerindo que NO proveniente da eNOS pode evitar danos isquêmicos inibindo o NF- $\kappa$ B (LI et al., 1997).

A ativação do NF- $\kappa$ B desempenha papéis duplos na morte de células e de sobrevivência, dependendo do tipo de célula, estágio de desenvolvimento e estímulos apoptóticos (KALTSCHMIDT et al., 2002). Em células normais, NF- $\kappa$ B é associado com proteínas inibitórias I $\kappa$ B que inibem a localização nuclear e ligação ao DNA do NF- $\kappa$ B.

Em resposta aos estímulos, incluindo os radicais livres, que têm sido implicados na patogênese da isquemia cerebral, I $\kappa$ Bs são fosforiladas pela I $\kappa$ B quinases e subsequentemente degradadas, liberando o NF- $\kappa$ B para translocar para o núcleo onde se liga a sítios específicos do DNA para I $\kappa$ B e regula a transcrição dos genes alvo, incluindo a NO sintase induzida (iNOS), que é conhecida por ser ativada em situações de isquemia cerebral, sendo capaz de mediar efeitos deletérios (WANG et al., 2007; MEDLING et al., 2010;). Além disso, NF- $\kappa$ B é ativado na fase precoce da reperfusão e que a inibição precoce do NF- $\kappa$ B em modelo experimental de isquemia focal transitória tem um efeito benéfico (DESAI et al., 2010).

Neste estudo, quando um doador de NO (Rut-bpy) é administrado antes da isquemia/reperfusão, a expressão de NF- $\kappa$ B registrada foi reduzida nas regiões hipocâmpais CA1, CA2 e CA3, comprovada por dois métodos (imunohistoquímica e *western blotting*), sugerindo que o Ru-bpy inibe o NF- $\kappa$ B, provavelmente pela liberação de NO do complexo nitrosil rutênio.

Paradoxalmente quando o fluxo sanguíneo é restaurado após a isquemia, as células cerebrais viáveis são reoxigenadas e os radicais livres tendem a aumentar no tecido neuronal e na glia (LEFER E LEFER, 1993; THIAGARAJAN et al., 1997) levando a um dano celular mais rápido e mais prolongado, produzindo a lesão denominada de isquemia/reperfusão, fato este que não ocorreu nos animais pré-condicionados com Ru-bpy.

Alguns radicais livres são derivados de NO produzidos pela NOS neuronal ou imunológica (nNOS ou iNOS, respectivamente), que formam o peroxinitrito altamente reativo, responsável pela peroxidação lipídica da membrana celular (GOTO et al., 2002), incluindo as membranas mitocondriais. Digno de nota é que, a administração do doador de NO, Ru-bpy, parece não causar uma peroxidação lipídica significativa, já que o aumento no nível NO, relatado em vários estudos, não aumentou a produção de radicais livres (PLUTA et al., 2001; WAINWRIGHT et al., 2007), e porque os mecanismos de proteção neuronal durante os eventos de isquemia/reperfusão envolvem necessariamente a produção de NO e inibição de NOS. Neste trabalho a concentração de metabólito do NO foi semelhante ao grupo controle, mantendo assim o nível basal de NO no tecido cerebral que é reduzido durante a isquemia/reperfusão.

Além disso, os animais que receberam Ru-bpy, apresentaram pressão arterial média (PAM) mais estável durante a transição da isquemia para reperfusão.

BONAVENTURA *et al.* (2007) comprovaram que o complexo de rutênio (trans-[RuCl([<sup>15</sup>aneN<sub>4</sub>)NO]<sub>2</sub><sup>+</sup>) é capaz de dilatar anéis de aorta *in vitro*. Assim como também Cerqueira *et al.* em 2008 identificaram que o Ru-bpy relaxa anéis de aorta com os mesmos efeitos induzidos pelo nitroprussiato de sódio, e que o complexo de Ru-bpy pode liberar NO dentro da célula. Sendo assim, *in vivo* seria esperado que o NO causasse hipotensão arterial, o que não ocorreu neste trabalho.

Os resultados deste trabalho foram de conformidade com o trabalho de Gaitani *et al.* (2009), em que a administração de complexo de rutênio em ratos normotensos não reduz pressão arterial, enquanto que, em ratos com hipertensão arterial reno-vascular, outros complexos são capazes de reduzir a pressão arterial.

Em contrapartida, o uso de Ru-bpy foi capaz de reduzir a diferença entre a PAM no final da fase de isquemia e os primeiros quinze minutos da reperfusão - momento em que se espera, habitualmente, uma queda da pressão arterial, mantendo o animal com níveis pressóricos mais estáveis do que os animais do grupo sham. Este último foi o grupo de animais que apresentou maior diferença (maior variação da PAM durante a reperfusão em relação à fase de isquemia).

A maior estabilidade da pressão arterial ocorreu no grupo que recebeu Ru-bpy, realçando o efeito do Ru-bpy. São necessários mais estudos para testar a possível associação entre a estabilidade da pressão arterial e o dano cerebral em modelos experimentais com Ru-bpy.

FRICKER *et al.* (1997) comprovaram que o uso de complexo de rutênio foi capaz de reverter o efeito hipotensor, devido ao choque séptico associado à injeção de lipopolissacarídeo bacteriano, o que demonstra que os complexos de rutênio podem manter a pressão arterial em situações de estresse, colaborando com os resultados apresentados neste trabalho, em que o Ru-bpy não diminuiu a PAM, mas em contrapartida, evitou que ocorresse uma queda maior da PAM durante os quinze primeiros minutos de reperfusão.

Novos trabalhos devem ser realizados no intuito de esclarecer, ainda mais, os efeitos e os mecanismos envolvidos durante situações de estresse tanto pré como pós-condicionamento com o nitrosil rutênio, visto que em várias situações diferentes os mesmos foram capazes de modificar as respostas biológicas do sistema cardiovascular, por exemplo, levando a hipotensão em ratos hipertensos (GAITANI *et al.*, 2009) como também evitando que os animais tenham hipotensão mais grave – estabilizando a PAM – como visto neste trabalho.

Outros efeitos biológicos dos complexos de rutênio também foram evidentes em estudos comportamentais melhorando a memória em ratos (VALVASSORI *et al.*, 2006), assim como também seu efeito benéfico no choque séptico induzido por LPS bacteriano (FRICKE *et al.*, 1997) ou inibindo a ação do *Trypanosoma cruzi* (causador da doença de chagas) tanto *in vitro* como *in vivo* (SILVA *et al.*, 2010).

Devido o NO ser uma molécula que quando liberada do complexo de rutênio (Ru-bpy) tem efeito em frações de segundos, possivelmente o complexo

de rutênio, mesmo após liberação inicial do NO, tem alguma ação na ativação de vias de sinalização celular com potencial neuroprotetor após isquemia/reperfusão. Dessa forma, esse estudo também avaliou proteínas quinases com relação direta ou indireta com NO, incluindo as quinases receptoras e as não receptoras via segundo mensageiro.

A lesão de isquemia/reperfusão cerebral, no modelo utilizado, pode ter sido induzida pelos danos oxidativos, inflamação, neurotoxicidade do glutamato e edema cerebral como evidencia estudo de diversos autores (GURSOY-OZDEMIR et al, 2004; HUANG et al., 2006 WONG AND CRACK, 2008; ELTZSCHIG AND ECKELE, 2011), entretanto, o pré-condicionamento com Ru-bpy diminuiu a lesão neuronal provavelmente pela liberação do NO.

Nos neurônios, o NO tem sido uma molécula que pode mediar a sinalização celular para sobrevivência (TROY et al. 2000; CONTESTABILE AND CIANI, 2004; CULMSEE et al.,2005; GULATI et al., 2014). A ação fisiológica do NO é primariamente mediada pela direta estimulação da guanilato ciclase solúvel (sGC), resultando no acúmulo de GMPc e subsequente ativação de proteínas quinases (SCHLOSSMAN et al 2003).

Essas mudanças no ambiente neuronal fazem com que as células ativem a capacidade de comunicação entre elas e modifiquem o meio ambiente neuronal para aumentar a chance de sobrevivência devido a lesão de isquemia e reperfusão.

As informações recebidas na superfície celular são transmitidas para dentro da célula até o seu núcleo, via complexos de proteínas sinalizadoras

promovendo a ativação ou inibição de proteínas quinases (HAN et al., 2000; RIEDENANN E WARD, 2003; BRYWE et al., 2005a; BRYWE et al., 2005b; URBAN et al., 2009; LEHOTSKY et al., 2009; ABE et al., 2010; SZYDLOWSKA E TYMIANSKI, 2010; BHUIYAN et al., 2011; PAVLIKOVA et al., 2011).

Sabe-se que a sinalização do GMPc, induzido pelo NO, pode prevenir a apoptose via ativação da fosfoinositídeo-3-kinase (PI3K)/proteína quinase B/via AKT (HA et al, 2003) ou pela estimulação de outros fatores de transcrição como CREB (CIANI et al, 2002) e MAPKs (KIM et al, 2003).

Além do NO ativar as proteínas quinases via GMPc, doadores de NO, como por exemplo Me-DPN (4-O-metil-etil-3,4-difosfato), SNAP e NOC 18, são capazes de fosforilar receptores de tirosina quinase (CULMSEE et al., 2005). Estes receptores quando ativados podem ativar várias quinases.

A fosforilação desses receptores por doadores de NO também pode ativar várias moléculas anti-apoptóticas em neurônios do hipocampo como publicado por Culmsee et al (2002), Gerling et al (2004) e Culmsee et al (2005).

As estratégias de neuroproteção, como pré-condicionamento nutricional (VASCONCELOS et al., 2015) e farmacológico, promovem a proteção neuronal pela ativação da proteína quinase AKT na isquemia cerebral (HAN et al., 2000; BRYWE et al., 2005; BRYWE et al., 2005b; CULMSEE et al., 2005; KOH et al., 2008; ABE et al., 2010; KOH, 2010; BHUIYAN et al., 2011; ZHANG et al., 2013; CHEN et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2015).

Durante a isquemia cerebral global ocorre aumento da concentração da proteína moduladora carboxy-terminal (CTMP), um novo ligante da proteína AKT, inibindo a fosforilação do sítio serina 473 e treonina 308, inativando a quinase AKT (MAIRA et al, 2001; MIYAWAKI et al., 2009).

Neste trabalho não foi observado alteração na expressão da AKT na primeira hora de reperfusão, entretanto, após 24h de reperfusão os animais que não foram pré-condicionados com Ru-bpy apresentaram menor expressão dessa proteína. Esse estudo confirmou que Ru-bpy previne a diminuição da expressão da AKT, sugerindo que a manutenção da expressão dessa proteína tem um papel neuroprotetor nas primeiras 24h pós-lesão isquêmica. Esse achado está de acordo com estudos prévios utilizando o pré-condicionamento com estradiol (WON et al., 2005; WON et al., 2006; KOH; WON; CHO et al., 2006; KOH, 2007; KOH et al., 2008), outros doadores de NO (CULMSEE et al., 2005) e cardioproteção na lesão de I/R como o envolvimento da via AKT (ZHOU et al, 2014). Porém, não foi investigado se o complexo de rutênio poderia estar inibindo a CTMP, sendo necessários novos estudos para confirmar esse mecanismo.

A fosforilação da mTOR pela AKT parece ser um mediador chave na indução da cardioproteção por este vasodilatador na lesão de isquemia/reperfusão (ZHOU et al, 2014). Estudo com indução de I/R global cerebral indicou que a combinação do complexo AKT desempenha um papel crítico na mediação da morte cerebral em consequência da lesão de isquemia/reperfusão (WEI et al, 2014).

Sabe-se que há um *feedback* positivo da AKT com a mTOR e um *feedback* negativo no sentido contrário (GINGRAS et al, 2001; VOGT, 2001) e que isto tem um papel importante na regulação da síntese proteica, crescimento e diferenciação celulares.

A mTOR fosforila a quinase p70S6 que por sua vez tem ação de regular a translação do RNAm e mediar a progressão do ciclo celular e síntese de proteínas, protegendo as células da lesão isquêmica (PROUD, 1992; PULLEN AND THOMAS, 1997; GINGRAS et al., 2001; KOH, 2010).

Vários trabalhos têm evidenciado que essa via de sinalização das quinases Akt/mTOR/p70S6 tem papel crítico contra a lesão de isquemia miocárdica (KIS et al., 2003). Estudos prévios demonstraram que há diminuição do nível da fosforilação das quinases mTOR e p70S6 no córtex de animais em modelo experimental de doença de Alzheimer (LAFAY-CHEBASSIER et al., 2005) como também, a isquemia cerebral transitória causa diminuição significativa nos níveis de fosforilação das quinases AKT e P70S6, suprimindo os passos iniciais da translação gênica (JANELIDZE et al., 2001; MEUGESDORF et al., 2002).

Nesse estudo, observa-se um aumento da expressão da P70S6 nos animais após 24h da isquemia/reperfusão que foram pré-condicionados com Ru-bpy em relação ao grupo pré-condicionado com solução salina. Contudo, essa diferença na expressão da P70S6 não foi observada na primeira hora de reperfusão. Esta resposta temporal (nas 24h) da fosforilação da P70S6 ocorre



no mesmo momento em que há um aumento da AKT neste estudo, em concordância com outros trabalhos com isquemia e reperfusão cerebral (JANELIDZE *et al.*, 2001; MENGESDORF *et al.*, 2002; KOLTERMANN *et al.*, 2007; KOH *et al.*, 2008; CHO, 2009; KOH, 2010). Isto sugere que o Ru-bpy preveniu a lesão de reperfusão, pelo possível envolvimento conjunto da via AKT/mTOR/P70S6.

A proteína quinase P70S6 também pode ser influenciada pela proteína quinase ERK 1/2 (quinase reguladora do sinal extracelular) com feedback positivo durante o estresse oxidativo celular e por fatores desconhecidos ativados pela isquemia e reperfusão (CARLETTI *et al.* 1995; ROUX AND BLENIS 2004). Sendo possível o RNAm para ERK 1/2 ser detectado no cérebro de ratos, especialmente no hipocampo e núcleo accumbens, em altas concentrações, após isquemia e reperfusão cerebral (IRVING *et al.* 2000; MELANI *et al.* 2006; LEE *et al.* 2010).

Vários estudos evidenciam a redução dos níveis da quinase ERK 1/2 nos primeiros 15 minutos da reperfusão e que começa a elevar após a primeira hora, sendo a maior elevação após 24h do evento isquêmico em cérebro de ratos (CARLETTI *et al.* 1995; CHEN *et al.*, 1998; IRVING *et al.* 2000; WANG *et al.*, 2003; SHEN *et al.* 2004; MELANI *et al.* 2006; YAN *et al.*, 2007;) e que a mesma é capaz de diminuir a apoptose induzida pela isquemia, regulando diretamente a expressão da Bax/Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub> (LI *et al.*, 2006).

A utilização de doadores de NO (Me-DPN, DPN, SNAP) é capaz de ativar receptores tirosino quinase resultando na fosforilação de ERK 1/2, AKT em

cultura de neurônios hipocampais, mediando a neuroproteção por privação de oxigênio (DAVIS et al, 2001; CULMSEE et al., 2005).

Em estudos com modelo experimental com isquemia cerebral global observou-se que a proteína quinase ERK 1/2 diminuiu nas primeiras horas e 24h após a isquemia (KOVALSKA et al., 2012), podendo haver diminuição da expressão da ERK 1/2 até 72h em modelo de isquemia e reperfusão cerebral focal (ZHANG et al., 2014) . Os animais que receberam Ru-bpy, na primeira hora de reperfusão, mantiveram a expressão da ERK 1/2 sem diferença com o controle, concordando com um dos períodos de neuroproteção do Ru-bpy. Entretanto apesar de o Ru-bpy apresentar ação neuroprotetora sustentada, após 24h de reperfusão, ocorreu uma diminuição da expressão da ERK 1/2. Esses resultados demonstraram que a ERK 1/2 pode ser ativada em estágio inicial da reperfusão na isquemia cerebral global.

Em alguns estudos a máxima ativação da ERK 1/2 foi registrada entre 30 min e 2h de reperfusão, embora a sinalização pode ser detectada após 6h ou mais (IRVING et al., 2000; CULMSEE et al. 2005). Essa ativação, em estágios iniciais, está de acordo com o experimento apresentado, sugerindo um efeito neuroprotetor de curto prazo pela ERK 1/2, que também foi observado em outros trabalhos (GU et al., 2001; ZHANG et al., 2009; LIEBELT et al., 2010; KOVALSKA et al., 2012).

Apesar de que, o doador de óxido nítrico (S)ZJM-289 foi capaz de elevar a expressão de ERK 1/2 após 72h de reperfusão em ratos submetidos à isquemia e reperfusão induzida por oclusão da artéria cerebral média (ZHANG et

al., 2014), o presente estudo mostrou que na isquemia global incompleta com 24h ocorre uma diminuição da ERK 1/2, sendo o Ru-bpy incapaz de manter a expressão da proteína quinase ERK 1/2 após 24h de reperfusão no modelo estudado.

Recentemente vários mecanismos têm sido propostos para explicar a relação entre reparo de DNA e a ativação das vias de sinalização da proteína quinase (LI et al, 2012). Alguns estudos sugerem que as proteínas mitogênicas podem reduzir a mutação gênica e manter a estabilidade do genoma *in vivo* (HAYAKAWA et al 2003), incluindo a ERK 1/2 (YAN et al, 2008; MARAMPON et al, 2011) que diminui a expressão da Bax, uma molécula pró-apoptótica da família da Bcl-2, promovendo uma diminuição da morte neuronal via menor liberação de fatores apoptóticos como o citocromo c (ZHAO, et al 2014).

Além disso, a ERK está envolvida na fosforilação do fator de transcrição CREB, na qual regula a expressão de enzimas-chaves para neuroplasticidade (FLAVELL AND GREENDBER, 2008). A CREB também pode ser regulada, de maneira independente, via ativação de cofatores de transdução reguladores da atividade de CREB (TORC) e Elk1, que é requerido para plasticidade tardia (CONKRIGHT et al, 2003; ZHOU et al., 2006; SASAKI et al 2011). Apesar do NO aparentemente não estar envolvido no processo de fosforilação da CREB, ele contribui para o acúmulo intranuclear do cofator ativador da CREB-TORC 1 e para elevar a ativação da Elk1 (BITTINGER et al, 2004; BUCHWALTER et al 2004; RICCIO et al 2006)

Em modelos experimentais a neuroproteção após isquemia/reperfusão também tem ocorrido concomitante a maior expressão da proteína CREB (DU AND MONTMINY, 1998; HU et al, 1999; TANAKA et al, 1999, KITAGAWA, 2007, ZHANG 2013; FU et al, 2013; LI et al., 2013), sendo essa proteína capaz de regular positivamente a transcrição do fator nuclear derivado do cérebro (BNDF), capaz de aumentar a resistência do tecido cerebral a lesão isquêmica (BECK et al, 1994; TSUKAHARA et al, 1994; ALMEIDA et al, 2005; GARDINER et al 2009; LIU et al 2010; CAO et al, 2011).

Além disso, a proteína CREB está envolvida no desenvolvimento neuronal, plasticidade neural, memória, regeneração e sobrevivência neuronal em resposta a vários estímulos incluindo a isquemia em vários trabalhos (FINKBEINER 2000; WALTON E DRAGUNOW 2000; MAYR *et al.* 2001), apresentando como alvo a expressão de várias proteínas neuroprotetoras incluindo proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2), promovendo a sobrevivência neuronal após isquemia (MARTINOU *et al.* 1994; LINNIK et al, 1995; RICCIO et al, 1999, HAN E HOLTZMAN, 2000; HAN *et al.* 2000; YASUDA et al, 2014).

Análise qualitativa imunohistoquímica com anticorpo anti-CREB e anti-Bcl-2 demonstra que em torno de 80% do neurônios há uma co-expressão para CREB ativada e Bcl-2 na área de isquemia (TANAKA, 2001).

O nitrosil rutênio, utilizado neste estudo, é capaz de manter a expressão da CREB em nível basal após uma hora de reperfusão, como também não diminui sua expressão após 24h de reperfusão, o que pode sugerir ser um dos mecanismos de proteção neuronal neste estudo.

Irving et al. (2000) e Nakajima et al. (2002) demonstraram uma clara relação entre o número de neurônios viáveis e a elevação da expressão da proteína CREB na região de penumbra. Em outro estudo, Du e Montminy (1998) demonstraram que AKT/PKB culmina com a fosforilação da proteína CREB no sítio serina 133, resultando na promoção da sobrevivência celular dependente da ativação da CREB. Eles também mostraram que a AKT participa na transcrição gênica da CREB.

Consideráveis evidências demonstram que a relação entre a via AKT/CREB está envolvida na proteção do código genético e sobrevivência neuronal após isquemia cerebral (CARLONI et al, 2009; ZHANG et al, 2012a, 2012b). Por exemplo, neuroprotetores como estrogênio e cilostazol estão associados com o aumento da fosforilação da via AKT/CREB e aumento da expressão da proteína Bcl-2 na isquemia cerebral (CHOI et al, 2004; HONG et al, 2006; LIU AND ZHAO, 2013).

Zhang et al., (2012a) utilizando uma substância denominada EGB761 identificaram um papel neuroprotetor na isquemia cerebral via aumento da expressão da AKT/CREB/BDNF.

Outra proteína mitogênica, que tem sido alvo terapêutico, é a proteína quinase JNK que pode regular a redução na produção de moléculas pró-inflamatórias, especialmente pelo papel da microglia/macrófago com envolvimento da ativação da via MAPK depois da lesão isquêmica (BARONE et al., 2001; PIAO et al., 2003).

Durante a fase de isquemia/reperfusão a proteína quinase JNK (c-Jun) encontra-se elevada em vários modelos experimentais de isquemia cerebral (BARONE et al., 2001; PIAO et al., 2003). Contudo, o pré-condicionamento com fitoterápico (*Panconiflorin*) diminui a lesão cerebral (após 90 min de isquemia) por inibição da ativação da JNK (GUO et al., 2012).

Em 1995, Xia et al (1995) demonstraram que a sinalização realizada pela JNK tem um importante papel na apoptose neuronal. Isto foi comprovado pela remoção de fatores neurotróficos de culturas de células neuronais com um grande aumento da JNK ativada, acompanhando o aumento da apoptose.

O efeito da apoptose do JNK é mediado diretamente pela regulação das famílias de proteínas Bcl-2 e citocromo c liberada da mitocôndria e ativação do fator de transcrição AP-1 (Ativador da proteína-1) (BEHRENS et al., 1999).

Em cérebro de ratos adultos, JNK é necessária para induzir apoptose nos neurônios hipocâmpais quando expostos ao glutamato (YANG et al., 1997) e para a morte neuronal durante a lesão de isquemia (KUAN et al., 2003), ficando evidente a estrita relação entre JNK-apoptose-lesão neuronal (DAVIES E TURNIER, 2012).

Tanto as vias da apoptose quanto do metabolismo energético estão envolvidas durante a lesão de isquemia/reperfusão e incluem o sinal de transdução da proteína quinase c-JUN terminal (GAO et al, 2005). Huang et al (2012) estudaram os efeitos neuroprotetores do extrato de *astragalus*, utilizando um modelo de pinçamento bilateral da artéria carótida interna em camundongos para induzir I/R cerebral. Estes autores demonstraram que o extrato de

*astragalus* elevou significativamente a sobrevivência dos neurócitos e reduziu tanto a taxa de apoptose quanto a redução da expressão da quinase JNK.

Interessante observar que no presente estudo após 24h de reperfusão houve um aumento da expressão da JNK nos animais que receberam solução salina e uma diminuição significativa nos animais que receberam Ru-bpy, fato este que ocorre justamente no momento em que de um lado o grupo SS+I/R apresenta a maior lesão histológica e do outro o grupo Ru+I/R apresentando com menor lesão e com menor expressão da JNK. O complexo, Ru-bpy, pode ter exercido seu efeito neuroprotetor por inibição da JNK, com possível redução da apoptose no hipocampo, estando estes achados de acordo com os encontrados por outros pesquisadores (YANG et al., 1997; KUAN et al., 2003; DAVIES DE TOURNIER, 2012; LI et al., 2012; KILIC et al., 2013). Entretanto na primeira hora após a reperfusão não houve diferença na expressão da JNK durante a primeira hora de reperfusão em todos os grupos, incluindo o sham.

Recentes estudos revelam que a via JNK/c-Jun tem uma importante função regulando o processo inflamatório no tecido cerebral. Evidências recentes sugerem que a inibição da JNK previne a morte neuronal durante a lesão de isquemia/reperfusão (SHIN et al, 2006; WEN et al, 2006; XU et al., 2014; ZHAO et al., 2015; WU et al., 2015). Ao mesmo tempo, a elevação do NF- $\kappa$ B pode contribuir para induzir a lesão neuronal durante a isquemia/reperfusão (NURMI et al, 2004; SIRONI et al, 2006).

Li et al (2012) demonstraram que o celastrol, um extrato da planta *Tripterygium wilfordii*, ter efeito neuroprotetor em ratos submetidos à isquemia

cerebral por 24h, com redução simultânea do JNK e NF-kB. No presente estudo este fato também ocorreu, entretanto a redução de JNK foi observada apenas após 24h de reperfusão e a expressão NF-kB foi avaliada apenas com 1h de reperfusão.

Diversos sinalizadores de transdução e ativação de transcrição (STAT) têm sido sugeridos como alvos terapêuticos para neuroproteção, em especial o STAT 3 e 5 que mais apresentam estarem envolvidos na neuroproteção durante a lesão de isquemia/reperfusão. Digno de nota, é o achado que durante a isquemia/reperfusão miocárdica há diminuição da apoptose via Janus quinase e STAT 3 (JAK-STAT 3) (YOU et al., 2011).

A forma fosforilada da STAT 3 é necessária à sua translocação para o núcleo celular, ligando a alvos promotores de genes específicos (BROMBERG et al., 2000) e induzindo a expressão de diversos fatores neuroprotetores, como por exemplo a secretoneurina (SHYU et al., 2008), estradiol (DZIENNIS et al., 2007) e interleucina-6 (MICHAUD-LEVESQUE et al., 2012). Além da ação direta do STAT 3, a administração exógena de determinadas substâncias, como por exemplo, a substância BRL52537, reduz a lesão neuronal durante a isquemia/reperfusão cerebral global devido ao aumento da produção da forma ativa da STAT-3 no hipocampo (FANG et al., 2013).

Em ratos submetidos à isquemia cerebral focal por 2h e reperfusão por 24h apresentaram aumento da expressão dos genes STATs no hipocampo analisados por microarranjos e confirmados com PCR, sendo que a expressão gênica das duas formas do STAT 5 A/B estavam elevadas pela lesão de



isquemia/reperfusão, provavelmente devido a uma resposta compensatória, a qual pode exercer um papel protetor no tecido cerebral lesado (SUN et al., 2007).

Entretanto no presente estudo não houve diferença estatística na intensidade de fluorescência da STAT 3 e nem da STAT 5 entre os grupos em estudo, sugerindo que o modelo experimental de isquemia global incompleta apresentado não altera o nível de intensidade desta quinase.

Isto posto, o pré-condicionamento com Ru-bpy é uma possível estratégia terapêutica para neuroproteção durante a isquemia/reperfusão cerebral, capaz de limitar o dano cerebral, cujo mecanismo envolve as proteínas quinases ativadas sinalizando vias de sobrevivência celular. Apesar de não terem sido utilizados inibidores farmacológicos para cada proteína quinase em estudo, para deixar claro qual proteína é realmente responsável pelo efeito neuroprotetor observado. Com base na literatura recente, podemos indicar que as proteínas quinases analisadas nesse trabalho apresentaram seus efeitos de forma integrada em uma rede complexa de sinalização, sendo necessários mais estudos.

Sendo assim, no futuro, novos experimentos poderão ser realizados utilizando inibidores farmacológico para alvos do NO, como por exemplo os receptores da tirosina quinase e as proteínas do sistema de receptores GMPc, de forma independente para sabermos por qual receptor o NO doado pelo Ru-bpy está ativando as proteínas quinases ou se há um outro receptor que deva ser investigado. Além disso, seria interessante realizar por técnicas de

imunoensaio (ELISA, WB, imunohistoquímica) ou PCR a quantificação das proteínas envolvidas diretamente na apoptose celular, visto que as quinases ativadas e inibidas pelo complexo de rutênio parecem estar envolvidas na ativação da apoptose de neurônios hipocâmpais.

Vale ressaltar, que experimentos (não finalizados, utilizando técnica de HPLC no Laboratório de química orgânica e inorgânica (UFC)) apresentam uma tendência de grande quantidade do Ru-bpy ser depurado pelos rins, ficando o estudo de segurança para utilização deste metalofármaco para trabalhos futuros.

Dessa forma, o estudo atual apresentado apresenta apontar um papel neuroprotetor do nitrosil rutênio no modelo de isquemia/reperfusão cerebral global incompleta em ratos, com envolvimento de proteínas quinases conhecidas pelo efeito favorável na viabilidade celular. Novos estudos são necessários para estudar esses mecanismos de forma mais detalhada e o envolvimento das NO sintases nesse processo.

## 6. Conclusão

1. O pré-condicionamento com nitrosil rutênio tem efeito neuroprotetor no hipocampo de ratos, indicado pela contagem de neurônios eosinofílicos e pela diminuição do edema cerebral durante a isquemia-reperfusão;
2. O nitrosil rutênio libera NO no tecido hipocampal durante a lesão de isquemia/reperfusão;
3. O pré-condicionamento com nitrosil rutênio inibe a ativação de NF-kB hipocampal na primeira hora pós isquemia (uma hora de reperfusão);
4. O pré-condicionamento com nitrosil rutênio ativa as proteínas quinase AKT, P70S6, ERK 1/2 , CREB e inibe a proteína quinase JNK em tecido hipocampal, evidenciando a participação dessas quinases na neuroproteção.

## REFERÊNCIAS

ABE, E.; FUJIKI, M.; NAGAI, Y.; SHIQI, K.; KUBO, T.; ISHII, K.; ABE, T.; KOBAYASHI, H. The phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway mediates geranylgeranylacetone-induced neuroprotection against cerebral infarction in rats. **Brain Res.** 2010 May; 12;1330:151-7. doi: 10.1016/j.brainres.2010.02.074.

AGGARWAL, B. B.; A. B. KUNNUMAKKARA, K. B.; HARIKUMAR, S. R.; GUPTA, S. T.; THARAKAN ET AL. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? **Ann N Y Acad Sci.** 2009; 1171: 59-76.

ÁBRAHAM H, LAZAR G. Early microglial reaction following mild forebrain ischemia induced by common carotid artery occlusion in rats. **Brain Res.** 2000; 862: 63-73.

ALEXANDROVA, M.L.; BOCHEV, P.G. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. *Free Radic. Biol. Med.* 2005; v. 39, n. 3, p. 297-316.

ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure,function and inhibition. **Biochem** .2001; 357:593–615.

ALI, H.; NAKANO, T.; SAINO-SAITO, S.; HOZUMI, Y.; KATAGIRI.; KAMII, H.; SATO, S.; KAYAMA, T.; KONDO, H.; GOTO,K. Selective translocation of diacylglycerol kinase zeta in hippocampal neurons under transient forebrain ischemia. **Neurosci. Lett.** 2004, v. 372, n. 3, p. 190-195.

ALMEIDA, R.D; MANADAS, B.J.; MELO, C.V.; GOMES, J.R.; MENDES, C.S.; GRÃOS, M.M.; CARVALHO, R.F.; CARVALHO, A.P.; DUARTE, C.B. Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. **Cell Death Differ.** 2005 Oct; 12(10):1329-43.

ANDJELKOVIC, M.D.R.; ALESSI, R.; MEIER, A.; FERNANDEZ, N. J.; LAMB et al. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. **J Biol Chem.** 1997; 272: 31515-31524.

ARANDARCIKAITE, O.; JOKUBKA, R.; BORUTAITE, V. Neuroprotective effects of nitric oxide donor NOC-18 against brain ischemia-induced mitochondrial damages: role of PKG and PKC. **Neurosci Lett.** 2015 Jan; 23;586:65-70. doi: 10.1016/j.neulet.2014.09.012.

ARRICK, D.M.; YANG, S.; LI, C.; CANANZI, S.; MAYHAN, W.G. Vigorous exercise training improves reactivity of cerebral arterioles and reduces brain injury following transient focal ischemia. **Microcirculation.** 2014 Aug;21(6):516-23. doi: 10.1111/micc.12127.

BARONE, F.C.; IRVING, E.A.; RAY, A.M.; LEE, J.C.; KASSIS, S.; KUMAR, S.; BADGER, A.M.; LEGOS, J.J.; ERHARDT, J.A.; OHLSTEIN, E.H.; HUNTER, A.J.; HARRISON, D.C.; PHILPOTT, K.; SMITH, B.R.; ADAMS, J.L.; PARSONS, A.A. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase provides neuroprotection in cerebral focal ischemia. **Med Res Rev.** 2001 Mar; 21(2):129-45.

BAYRAK, S.; PEHLIVANOĞLU, B.; SEVGILI, A.M.; BALKANCI, Z.D.; ÖZYÜREK, H.; ATILLA, P.; ÇAKAR, A.N.; ANLAR, F.B. Evaluation of apoptotic cell death following transient maternal hypotension in fetal rat brain: temporal pattern within the first 24 h after procedure. **Turk J Med Sci.** 2014;44(6):928-34. PMID: 25552143

BECK, T.; LINDHOLM, D.; CASTRÉN, E.; WREE, A. Brain-derived neurotrophic factor protects against ischemic cell damage in rat hippocampus. **J Cereb Blood Flow Metab.** 1994 Jul; 14(4):689-92. PMID: 8014217.

BEDERSEM, J. D.; PITTS, L. H.; GERMANO, S. M.; NISHIMURA, M. C.; DAVIS, R. L.; BARTKOWSKI, H. M. Evaluation of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. **Stroke.** 1986; v. 17, p. 1304-1308.

BEDIRLI, N.E.U.; BAGRIACIK, H.; EMMER, G.; YILMAZ, Y.; UNAL et al. Sevoflurane and isoflurane preconditioning provides neuroprotection by inhibition of apoptosis-related mRNA expression in a rat model of focal cerebral ischemia. **J Neurosurg Anesthesiol.** 2012 ; 24: 336-344.

- BENDINELLI, P.R.; PICCOLETTI, P.; MARONI A.; BERNELLI-ZAZZERA. The MAP kinase cascades are activated during post-ischemic liver reperfusion. **FEBS Lett.** 1996; 398: 193-197.
- BEHRENS, A; SIBILIA, M.; WAGNER, E.F. Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. **Nat Genet.** 1999 Mar; 21(3):326-9.
- BERNARDI, P. The permeability transition pore. Control point of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. **Biochim Biophys Acta.** 1996; 1275:5.
- BHUIYAN, M.I.; JUNG, S.Y.; KIM, H.J.; LEE, Y.S.; JIN, C. Major role of the PI3K/Akt pathway in ischemic tolerance induced by sublethal oxygen-glucose deprivation in cortical neurons in vitro. **Arch Pharm Res.** 2011 Jun; 34(6):1023-34. doi: 10.1007/s12272-011-0620-3.
- BITTINGER, M.A.; MCWHINNIE, E.; MELTZER, J.; IOURGENKO, V.; LATARIO, B.; LIU, X.; CHEN, C.H.; SONG, C.; GARZA, D.; LABOW, M. Activation of cAMP response element-mediated gene expression by regulated nuclear transport of TORC proteins. **Curr Biol.** 2004 Dec; 14;14(23):2156-61.
- BERVEN, L. A.; AND CROUCH, M. F. Cellular function of p70S6K: a role in regulating cell motility. **Immunol Cell Biol.** 2000; 78: 447-451.
- BONAVENTURA, D.; DE LIMA, R.G.; VERCESI, J.A.; DA SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vascul Pharmacol.** 2007; 46:215–222.
- BORSELLO, T.; CLARKE, P.G.; HIRT, L.; VERCELLI, A.; REPICI, M.; SCHORDERET, D.F.; BOGOUSSLAVSKY, J.; BONNY, C. A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. **Nat Med.** 2003 Sep; 9(9):1180-6.
- BRALET, J.; BELEY, P.; JEMAA, R.; BRALET, A.M.; BELEY, A. Lipid metabolism, cerebral metabolic rate, and some related enzyme activities after brain infection in rat. **Stroke.** 1987; 18:418-25.
- BROMBERG, J.; DARNELL, J.E.JR. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. **Oncogene.** 2000 May; 15;19(21):2468-73.
- BROWN, A. W.; BRIERLY, Y. J. B. The nature, distribution and earliest stages of anoxic ischemic nerve cell damage in the rat brain as defined by optical microscope. **Br. J. Exp. Pathol.** 1968; v. 49, p. 78-106.
- BRUNET, A. A.; BONNI, M. J.; ZIGMOND, M.Z.; LIN, P.; JUO et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. **Cell** 96. 1999; 857-868.

BURGERING, B.M.; AND COFFER, P.J. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. **Nature**. 1995; 376: 599-602.

BYTS, N.A.; SAMOYLENKO,T.; FASSHAUER, M.; IVANISEVIC, L.; HENNIGHAUSEN et al. Essential role for Stat5 in the neurotrophic but not in the neuroprotective effect of erythropoietin. **Cell Death Differ**. 2008; 15: 783-792.

BRYWE KG, MALLARD C, GUSTAVSSON M, HEDTJÄRN M, LEVERIN AL, WANG X, BLOMGREN K, ISGAARD J, HAGBERG H. IGF-I neuroprotection in the immature brain after hypoxia-ischemia, involvement of Akt and GSK3beta? **Eur J Neurosci**. 2005 Mar; 21(6):1489-502.

BRYWE, K.G.; LEVERIN, A.L.; GUSTAVSSON, M.; MALLARD, C.; GRANATA, R.; DESTEFANIS, S.; VOLANTE, M.; HAGBERG, H.; GHIGO, E.; ISGAARD, J. Growth hormone-releasing peptide hexarelin reduces neonatal brain injury and alters Akt/glycogen synthase kinase-3beta phosphorylation. **Endocrinology**. 2005 Nov; 146(11):4665-72.

BUCHWALTER, G.; GROSS, C.; WASYLYK, B. Ets ternary complex transcription factors. **Gene**. 2004 Jan 7;324:1-14.

BUISSON, A.; PLOTKINE, M.; BOULU, R.G. The neuroprotective effect of a nitric oxide inhibitor in a rat model of focal cerebral ischaemia. **Br J Pharmacol**. 1992; 106:766–767.

CAMPELO, M.W.S; CAMPELO, A.P.B.S.; LOPES, L.G.; SANTOS, A.A.; GUIMARAES, S.B. et al. Effects of Rut-bpy (Cis-[Ru(bpy)2(SO3)(NO)]PF 6), a novel nitric oxide donor, in L-NAME-induced hypertension in rats. **Acta Cir Bras** 26. 2011; Supl 1: 57-59.

CARLETTI, R.; TACCONI, S.; BETTINI, E.; FERRAGUTI, F. Stress activated protein kinases, a novel family of mitogen-activated protein kinases, are heterogeneously expressed in the adult rat brain and differentially distributed from extracellular-signal-regulated protein kinases. **Neuroscience**. 1995; 69: 1103-1110.

CAO, Y.; MAO, X.; SUN, C.; ZHENG, P.; GAO, J.; WANG X, MIN D, SUN H, XIE N, CAI J. Baicalin attenuates global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils via anti-oxidative and anti-apoptotic pathways. **Brain Res Bull**. 2011 Jul 15;85(6):396-402. doi: 10.1016/j.brainresbull.2011.05.002.

CARLONI S, GIRELLI S, BUONOCORE , LONGINI M, BALDUINI WG. Simvastatin acutely reduces ischemic brain damage in the immature rat via Akt and CREB activation. **Exp Neurol**. 2009 Nov; 220(1):82-9. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.07.026.

CERQUEIRA JB, SILVA LF, LOPES LG, MORAES ME, NASCIMENTO NR.

Relaxation of rabbit corpus cavernosum smooth muscle and aortic vascular endothelium induced by new nitric oxide donor substances of the nitrosyl-ruthenium complex. **Int Braz J Urol.** 2008; 34:638–646.

CHAN, E. D., B. W. WINSTON, M. B. JARPE, M. W. WYNES AND D. W. RICHES. Preferential activation of the p46 isoform of JNK/SAPK in mouse macrophages by TNF alpha. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1997; 94: 13169-13174.

CHEN CA, WANG TY, VARADHARAJ S, REYES LA, HEMANN C, TALUKDER MA, CHEN YR, DRUHAN LJ, ZWEIER JL. S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function. **Nature.** 2010 Dec 23;468(7327):1115-8. doi: 10.1038/nature09599.

CHEN JH, KUO HC, LEE KF, TSAI TH. Magnolol protects neurons against ischemia injury via the downregulation of p38/MAPK, CHOP and nitrotyrosine. **Toxicol Appl Pharmacol.** 2014 Sep 15;279(3):294-302. doi: 10.1016/j.taap.2014.07.005. PMID: 25038313

CHEN Y, NIE H, TIAN L, TONG L, DENG J, ZHANG Y, DONG H3, XIONG L. Sevoflurane preconditioning-induced neuroprotection is associated with Akt activation via carboxy-terminal modulator protein inhibition. **Br J Anaesth.** 2015 Feb; 114(2):327-35. doi: 10.1093/bja/aeu271.

CHEN LL, ZHU TB, YIN H, HUANG J, WANG LS, CAO KJ, YANG ZJ. Inhibition of MAPK signaling by eNOS gene transfer improves ventricular remodeling after myocardial infarction through reduction of inflammation. **Mol Biol Rep.** 2010 Oct; 37(7):3067-72. doi: 10.1007/s11033-009-9879-6.

CHEN KD, CHEN LY, HUANG HL, LIEU CH, CHANG YN, CHANG MD, LAI YK. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the rapid induction of the 78-kDa glucose-regulated protein in 9L rat brain tumor cells. **J Biol Chem.** 1998 Jan 9;273(2):749-55.

CHO JH, SUNG JH, CHO EH, WON CK, LEE HJ, KIM MO, KOH PO. Ginkgo biloba Extract (EGb 761) prevents ischemic brain injury by activation of the Akt signaling pathway. **Am J Chin Med.** 2009; 37(3):547-55.

CHOI YC, LEE JH, HONG KW, LEE KS. 17 Beta-estradiol prevents focal cerebral ischemic damages via activation of Akt and CREB in association with reduced PTEN phosphorylation in rats. **Fundam Clin Pharmacol.** 2004 Oct; 18(5):547-57.

CHOI, D. W., M. MAULUCCI-GEDDE AND A. R. KRIEGSTEIN. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. **J Neurosci.** 1987; 7: 357-368.

CHU, C. T., D. J. LEVINTHAL, S. M. KULICH, E. M. CHALOVICH AND D. B. DEFRANCO. Oxidative neuronal injury. The dark side of ERK1/2. **Eur J Biochem.** 2004; 271: 2060-2066.



CLARKSON AN, PARKER K, NILSSON M, WALKER FR, GOWING EK. Combined ampakine and BDNF treatments enhance poststroke functional recovery in aged mice via AKT-CREB signaling. **J Cereb Blood Flow Metab.** 2015 Mar 11. doi: 10.1038/jcbfm.2015.33. PMID: 25757752

COBB, M. H., AND E. J. GOLDSMITH. How MAP kinases are regulated. **J Biol Chem.** 1995; 270: 14843-14846.

CODACCIONI, J. L., L. J. VELLY, C. MOUBARIK, N. J. BRUDER, P. S. PISANO et al. Sevoflurane preconditioning against focal cerebral ischemia: inhibition of apoptosis in the face of transient improvement of neurological outcome. **Anesthesiology.** 2009; 110: 1271-1278.

COERT BA, ANDERSON RE, MEYER FB. A comparative study of the effects of two nitric oxide synthase inhibitors and two nitric oxide donors on temporary focal cerebral ischemia in the Wistar rat. **J Neurosurg.** 1999 Feb;90(2):332-8. PMID: 9950505

CONKRIGHT MD, CANETTIERI G, SCREATON R, GUZMAN E, MIRAGLIA L, HOGENESCH JB, MONTMINY M. TORCs: transducers of regulated CREB activity. **Mol Cell.** 2003 Aug; 12(2):413-23.

CIANI E, GUIDI S, DELLA VALLE G, PERINI G, BARTESAGHI R, CONTESTABILE A. Nitric oxide protects neuroblastoma cells from apoptosis induced by serum deprivation through cAMP-response element-binding protein (CREB) activation. **J Biol Chem.** 2002 Dec 20;277(51):49896-902.

CONGAR, P.; GAIARSA, J.L.; POPOVICI, T.; BEM-ARI, Y.; CRÉPEL, V. Permanent reduction of seizure threshold in post-ischemic CA3 pyramidal neurons. **J. Neurophysiol.** 2000; v. 83, n. 4, p. 2040-2046.

CONTESTABILE A, CIANI E. Role of nitric oxide in the regulation of neuronal proliferation, survival and differentiation. **Neurochem Int.** 2004 Nov; 45(6):903-14.

COSTA C, TOZZI A, SILIQUINI S, GALLETTI F, CARDAIOLI G, TANTUCCI M, PISANI F, CALABRESI P. A critical role of NO/cGMP/PKG dependent pathway in hippocampal post-ischemic LTP: modulation by zonisamide. **Neurobiol Dis.** 2011 Nov; 44(2):185-91. doi: 10.1016/j.nbd.2011.06.011.

COLLI, B. O.; SILVA, N; M.; CARLONI, C. G. Ischemia cerebral experimental. In: SILVA, O. C.; ZUCOLOTO, S.; BEER, A. Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia. São Paulo: Editora Probel. 1998; cap. 65, p. 644-645.

COTRAN, R.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. Robbins' Patologia estrutural e funcional. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 105-173.

- COWAN, K. J., AND K. B. STOREY. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. **J Exp Biol.** 2003; 206: 1107-1115.
- CULMSEE C1, GERLING N, LANDSHAMER S, RICKERTS B, DUCHSTEIN HJ, UMEZAWA K, KLUMPP S, KRIEGLSTEIN J. Nitric oxide donors induce neurotrophin-like survival signaling and protect neurons against apoptosis. **Mol Pharmacol.** 2005 Oct; 68(4):1006-17.
- CULMSEE C, GERLING N, LEHMANN M, NIKOLOVA-KARAKASHIAN M, PREHN JH, MATTSON MP, KRIEGLSTEIN J. Nerve growth factor survival signaling in cultured hippocampal neurons is mediated through TrkA and requires the common neurotrophin receptor P75. **Neuroscience.** 2002; 115(4):1089-108.
- DHAR, R.; DIRINGER, M.N. Relationship between angiographic vasospasm, cerebral blood flow, and cerebral infarction after subarachnoid hemorrhage. **Acta Neurochir .** Suppl 2015;120:161-5. doi: 10.1007/978-3-319-04981-6\_27.
- DALKARA T, MOSLOWITZ MA. THE ROLE OF NITRIC OXIDE IN CEREBRAL ISCHEMIA. IN: WELCH KMA, CAPLAN LR, REIS et al. editors. Premier on cerebrovascular disease. Philadelphia: Academic Press. 1997, 207-208.
- DARNELL, J. E., JR. STATs and gene regulation. *Science* 277: 1630-1635.
- DATTA, S. R.; BRUNET, A.; GREENBERG, M. E., 1999 Cellular survival: a play in three Akts. **Genes Dev** .1997; 13: 2905-2927.
- DAVIS, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. 2000; *Cell* 103: 239-252.
- DAVIES, C.; TOURNIER, C. Exploring the function of the JNK (c-Jun N-terminal kinase) signalling pathway in physiological and pathological processes to design novel therapeutic strategies. **Biochem Soc Trans.** 2012 Feb;40(1):85-9. doi: 10.1042/BST20110641.
- DAVIS KL, MARTIN E, TURKO IV, MURAD F. Novel effects of nitric oxide. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** 2001; 41:203-36.
- DAWSON VL, DAWSON TM. Nitric oxide in neurodegeneration. **Prog Brain Res** 1998; 118:215–229.
- DAWSON VL, DAWSON TM. Physiological and toxicological actions of nitric oxide in the central nervous system. **Adv Pharmacol** .1995; 34:323–342.
- DE LA TORRE JC, ALIEV G. Inhibition of vascular nitric oxide after rat chronic brain hypoperfusion: spatial memory and immunocytochemical changes. **J Cereb Blood Flow Metab.** 2005; 25: 663–672
- DENHARDT DT. Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. **Biochem J.** 1996 Sep 15; 318(Pt 3):729-47.

- DESAI A, SINGH N, RAGHUBIR R. Neuroprotective potential of the NF- $\kappa$ B inhibitor peptide IKK-NBD in cerebral ischemia– reperfusion injury. **Neurochem Int.** 2010; 57:876–883.
- DIRNAGL U, IADECOLA C, MOSKOWITZ MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends Neurosci.** 1999; 22: 391–397.
- DOUGHERTY CJ, KUBASIAK LA, PRENTICE H, ANDREKA P, BISHOPRIC NH, WEBSTER KA. Activation of c-Jun N-terminal kinase promotes survival of cardiac myocytes after oxidative stress. **Biochem J.** 2002 Mar 15;362(Pt 3):561-71.
- DU K, MONTMINY M. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. **J Biol Chem.** 1998 Dec 4;273(49):32377-9.
- DUDEK, H., S. R. DATTA, T. F. FRANKE, M. J. BIRNBAUM, R. YAO et al. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. **Science.** 1997; 275: 661-665.
- DUFNER, A., AND G. THOMAS. Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. **Exp Cell Res.** 1999; 253: 100-109.
- DZIENNIS, S., AND N. J. ALKAYED. Role of signal transducer and activator of transcription 3 in neuronal survival and regeneration. **Rev Neurosci.** 2008; 19: 341-361.
- DZIENNIS, S., T. JIA, O. K. RONNEKLEIV, P. D. HURN AND N. J. ALKAYED. Role of signal transducer and activator of transcription-3 in estradiol-mediated neuroprotection. **J Neurosci.** 2007; 27: 7268-7274
- ENGSTROM A, WANG H, XIA Z. Lead decreases cell survival, proliferation, and neuronal differentiation of primary cultured adult neural precursor cells through activation of the JNK and p38 MAP kinases. **Toxicol In Vitro.** 2015 May 9. pii: S0887-2333(15)00093-4. doi: 10.1016/j.tiv.2015.05.001.
- ELTZSCHIG HK, ECKLE T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. **Nat Med.** 2011 Nov 7;17(11):1391-401. doi: 10.1038/nm.2507. Review.
- ÉVORA, P.; PEARSON, P.; SECCOMBE, J.; SCHAFF, H. Lesão de isquemia-reperfusão. Aspectos fisiopatológicos e importância da função endotelial. **Arq. Bras. Cardiol.** 1996; v. 66, p. 239-245.
- FABER J.L. The mechanisms of cell injury by activated oxygen species. **Lab Invest.** 1990; 62:670.
- FANG S, XU H, LU J, ZHU Y, JIANG H. Neuroprotection by the kappa-opioid receptor agonist, BRL52537, is mediated via up-regulating phosphorylated signal transducer and activator of transcription-3 in cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. **Neurochem Res.** 2013 Nov; 38(11):2305-12. doi: 10.1007/s11064-013-

1139-4.

FARIA, M.H.G.; MUNIZ, L.R.F.; VASCONCELOS, P.R.L. Ketone bodies metabolism during ischemic and reperfusion brain injuries following bilateral occlusion of common carotid arteries in rats. **Acta Cir. Bras.** 2007; v. 22, n. 2, p. 125-129.

FINKBEINER, S. CREB couples neurotrophin signals to survival messages. **Neuron.** 2000; 25: 11-14.

FLAVELL SW1, GREENBERG ME. Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. **Annu Rev Neurosci.** 2008; 31:563-90. doi: 10.1146/annurev.neuro.31.060407.125631.

FORD PC, WINK DA, STANBURY DM. Autoxidation kinetics of aqueous nitric oxide. **FEBS Lett.** 1993; 326: 1-3.

FRANKE, T. F., C. P. HORNIK, L. SEGEV, G. A. SHOSTAK AND C. SUGIMOTO. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. **Oncogene.** 2003; 22: 8983-8998.

FRANKE, T. F.; KAPLAN, D.R.; CANTLEY, L.C. 1997 PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 88: 435-437.

FRICKER SP, SLADE E, POWELL NA, VAUGHAN OJ, HENDERSON GR, MURRER BA, MEGSON IL, BISLAND SK, FLITNEY FW. Ruthenium complexes as nitric oxide scavengers: a potential therapeutic approach to nitric oxide-mediated diseases. **Br J Pharmacol.** 1997;122(7):1441-9.

FU J, XUE R, GU J, XIAO Y, ZHONG H, PAN X, RAN R. Neuroprotective effect of calcitriol on ischemic/reperfusion injury through the NR3A/CREB pathways in the rat hippocampus. **Mol Med Rep.** 2013 Dec; 8(6):1708-14. doi: 10.3892/mmr.2013.1734.

FUJISHIMA, M.; OGATA, J.; SUGI, T.; OMAE, T. Mortality and cerebral metabolism after bilateral carotid artery ligation in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **J. Neurol. Neurosurg.** 1976; v. 39, n. 3, p. 212-217.

GAO YH, YUAN ZZ, NIU FL, CUI W, ZHU LQ, WANG SR. The protective effect of cholic acid on an in vitro injury model of ischemia-reperfusion in cerebral microvascular endothelial cells]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2005 Jun; 30(12):930-2.

GARCIA, J.H. Experimental ischemic stroke: a review. **Stroke.** 1984; v. 15, n. 1, p. 5-14,.

Gagliardi JR. *Acidente Vascular Cerebral.* São Paulo: EPM; 2006.

HARUKUNI I, BHARDWAJ A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. **Neurol Clin.** 2006; 24: 1-21.

GAITANI CM, MELO CC, LUNARDI NC, OLIVEIRA FS, SILVA RS, BENDHACK LM. Hypotensive effect of the nitrosyl ruthenium complex nitric oxide donor in renal hypertensive rats. **Nitric Oxide.** 2009; (20):195–199.

GRIMBLE R.F.. Nutritional antioxidants and the modulation of inflammation: theory and practice. **New Horizons.** 1994; 2(2): 175-185.

GRIMBLE R.F.. Antioxidantes e radicais livres. In: Waitzberg D (Ed). *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica.* 3 ed. São Paulo: Atheneu. 2001; p 1481-1494.

GARCIA, J.H.; YOSHIDA, Y.; CHEN, H.; LI, Y.; ZHANG, Z.G.; LIAN, J.; CHEN, S.; CHOPP, M. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. **Am. J. Pathol.** 1993; v. 142, n. 2, p.623-635.

GARCIA, J.H.; WAGNER, S.; LIU, K.F.; HU, X.J. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. **Stroke.** 1995; v. 26, n.4, p. 627-634.

GARCIA, J.H.; LIU, K.F.; YE, Z.R.; GUTIERREZ, J.A. Incomplete infarct and delayed neuronal death after transient middle cerebral artery occlusion in rats. **Stroke.** 1997; v. 28, n. 11, p. 2303-2309.

GARCIA, B.; CAMARGO FILHO, J.; PASTRE, C.; CAMARGO, R.; SOUZA, T.; HAIDAMUS, L.; OLIVEIRA, A. Efeitos da dieta suplementada com  $\omega$ -3 no músculo sóleo de ratos submetidos à natação: análise histológica e morfométrica. **Rev. Bras. Med. Esporte.** 2010; v. 16, p. 363-367.

GARCÍA-BONILLA,L.; ROSELL, A.; TORREGROSA, G.; SALOM, J.B.; ALBORCH,E.; GUTIÉRREZ, M.; DÍEZ-JEJEDOR, E.; MARTÍNEZ-MURILLO, R.; AGULLA,J.; RAMOS- CABRER, P.; CASTILLO, J.; GASULL, T.; MONTANER, J. Guía de recomendaciones en la aplicación de modelos animales para el estudio del ictus. **Neurología.** 2011; v. 26, n. 2, p. 105-110.

GARDINER J, BARTON D, OVERALL R, MARC J. Neurotrophic support and oxidative stress: converging effects in the normal and diseased nervous system. **Neuroscientist.** 2009 Feb; 15(1):47-61. doi: 10.1177/1073858408325269.

GAUR V, KUMAR A. Protective effect of desipramine, venlafaxine and trazodone against experimental animal model of transient global ischemia: possible involvement of NO-cGMP pathway. **Brain Res.** 2010; 1353:204–212.

GERLING N, CULMSEE C, KLUMPP S, KRIEGLSTEIN J. The tyrosine phosphatase inhibitor orthovanadate mimics NGF-induced neuroprotective signaling in rat hippocampal neurons. **Neurochem Int.** 2004 Jun;44(7):505-20.

GINGRAS AC, RAUGHT B, SONENBERG N. Control of translation by the target

of rapamycin proteins. **Prog Mol Subcell Biol.** 2001; 27:143-74.

GODÍNEZ-RUBÍ M, ROJAS-MAYORQUÍN AE, Ortuño-Sahagún D. Nitric oxide donors as neuroprotective agents after an ischemic stroke-related inflammatory reaction. **Oxid Med Cell Longev.** 2013;2013:297357. doi: 10.1155/2013/297357. PMID: 23691263

GOTO S, XUE R, SUGO N, SAWADA M, BLIZZARD KK, POITRAS MF, JOHNS DC, DAWSON TM, DAWSON VL, CRAIN BJ, TRAYSTMAN RJ, MORI S, HURN PD . Poly(ADP-ribose) polymerase impairs early and long-term experimental stroke recovery. **Stroke.** 2002; 33: 1101–1106.

GRECO R, MANGIONE AS, AMANTEA D, BAGETTA G, NAPPI G, TASSORELLI C. IkappaB-alpha expression following transient focal cerebral ischemia is modulated by nitric oxide. **Brain Res.** 2011;1372:145–151.

GREEN LC, WAGNER DA, GLOGOWSKI J. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal Biochem** .1982; 126:131–138.

GU Z1, JIANG Q, ZHANG G. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in hippocampus after cerebral ischemia may not interfere with postischemic cell death. **Brain Res.** 2001 May; 18; 901(1-2):79-84.

GRIMBLE R.F. Nutritional antioxidants and the modulation of inflammation: theory and practice. **New Horizons.** 1994; 2(2): 175-185.

GRIMLEY, P. M., F. DONG AND H. RUI. Stat5a and Stat5b: fraternal twins of signal transduction and transcriptional activation. **Cytokine Growth Factor Rev.** 1999; 10: 131-157.

GULATI P, SINGH N. Neuroprotective mechanism of ischemic postconditioning in mice: a possible relationship between protein kinase C and nitric oxide pathways. **J Surg Res.** 2014 Jun 1;189 (1):174-83. doi: 10.1016/j.jss.2014.02.019.

GUO RB, WANG GF, ZHAO AP, GU J, SUN XL, HU G. Paeoniflorin protects against ischemia-induced brain damages in rats via inhibiting MAPKs/NF-κB-mediated inflammatory responses. **PLoS One.** 2012; 7(11):e49701. doi: 10.1371/journal.pone.0049701.

GUPTA, S., T. BARRETT, A. J. WHITMARSH, J. CAVANAGH, H. K. SLUSS et al. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. **EMBO J.** 1996; 15: 2760-2770.

GURGIS, F. M., W. ZIAZIARIS AND L. MUNOZ. Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in neuroinflammation, heat shock protein 27 phosphorylation, and cell cycle: role and targeting. **Mol Pharmacol.** 2014; 85: 345-356.

GÜRSOY-OZDEMIR Y1, CAN A, DALKARA T. Reperfusion-induced

oxidative/nitrative injury to neurovascular unit after focal cerebral ischemia. **Stroke**. 2004 Jun;35(6):1449-53.

HA KS, KIM KM, KWON YG, BAI SK, NAM WD, YOO YM, KIM PK, CHUNG HT, BILLIAR TR, KIM YM. Nitric oxide prevents 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells through cGMP-dependent PI3 kinase/Akt activation. **FASEB J**. 2003 Jun;17(9):1036-47.

HAJDUCH, E., G. J. LITHELAND AND H. S. HUNDAL. Protein kinase B (PKB/Akt)--a key regulator of glucose transport? **FEBS Lett**. 2001; 492: 199-203.

HAN BH, HOLTZMAN DM. BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. **J Neurosci**. 2000 Aug 1;20(15):5775-81.

HAN, B. H., A. D'COSTA, S. A. BACK, M. PARSADANIAN, S. PATEL et al. BDNF blocks caspase-3 activation in neonatal hypoxia-ischemia. **Neurobiol Dis**. 2000; 7: 38-53.

HANADA, M., J. FENG AND B. A. HEMMINGS. Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. **Biochim Biophys Acta**. 2004; 1697: 3-16.

HARUKUNI I, BHARDWAJ A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. **Neurol. Clin**. 2006 FEB;24(1):1-21.

HEUSCH G, MUSIOLIK J, GEDIK N, SKYSCHALLY A. Mitochondrial STAT3 activation and cardioprotection by ischemic postconditioning in pigs with regional myocardial ischemia/reperfusion. **Circ Res**. 2011 Nov 11;109(11):1302-8. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.255604.

HUANG W, CAO J, LIU X, MENG F, LI M, CHEN B, ZHANG J. AMPK Plays a Dual Role in Regulation of CREB/BDNF Pathway in Mouse Primary Hippocampal Cells. **J Mol Neurosci**. 2015 Feb 3. [Epub ahead of print]

HAUSENLOY, D. J., A. TSANG, M. M. MOCANU AND D. M. YELLON. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2005; 288: H971-976.

HAYAKAWA J1, DEPATIE C, OHMICHII M, MERCOLA D. The activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) by DNA-damaging agents serves to promote drug resistance via activating transcription factor 2 (ATF2)-dependent enhanced DNA repair. **J Biol Chem**. 2003 Jun 6; 278(23):20582-92.

HE Z, IBAYASHI S, SUGIMORI H, FUJII K, SADOSHIMA S, FUJISHIMA M. Age-related ischemia in the brain following bilateral carotid artery occlusion—collateral blood flow and brain metabolism. **Neurochem Res**. 1997; 22:37–42.

- HEIDBREder, M., A. NAUMANN, K. TEMPEL, P. DOMINIak AND A. DENDORFER. Remote vs. ischaemic preconditioning: the differential role of mitogen-activated protein kinase pathways. **Cardiovasc Res.** 2008; 78: 108-115.
- HEIM, C.; SIEKLUCKA, M.; SONTAG, K.H. Levemopamil injection after cerebral oligemia reduces spatial memory deficits in rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 1994; v. 48, n. 3, p. 613-619.
- HERTZ, L.; SONG, D.; XU, J.; PENG, L.; GIBBS, M.E. Role of the Astrocytic Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase in K<sup>+</sup> Homeostasis in Brain: K<sup>+</sup> Uptake, Signaling Pathways and Substrate Utilization. **Neurochem Res.** 2015 Jan 3. PMID: 25555706
- HOMI, H.M.; FREITAS, J. J. S.; CURI, R.; VELASCO, I. T.; JUNIOR, B. A. S. Changes in superoxide dismutase and catalase activities of rat brain regions during early global transient ischemia/reperfusion. **Neuroscience Letters.** 2002; v. 333, p. 37-40.
- HU, H., S. YAMASHITA, Y. HUA, R. F. KEEP, W. LIU et al. Thrombin-induced neuronal protection: role of the mitogen activated protein kinase/ribosomal protein S6 kinase pathway. **Brain Res.** 2010; 1361: 93-101.
- HU BR, FUX CM, MARTONE ME, ZIVIN JA, ELLISMAN MH. Persistent phosphorylation of cyclic AMP responsive element-binding protein and activating transcription factor-2 transcription factors following transient cerebral ischemia in rat brain. **Neuroscience.** 1999 Mar; 89(2):437-52.
- HUANG XP, TAN H, CHEN BY, DENG CQ. Astragalus extract alleviates nerve injury after cerebral ischemia by improving energy metabolism and inhibiting apoptosis. **Biol Pharm Bull.** 2012; 35(4):449-54.
- HUANG J, UPADHYAY UM, TAMARGO RJ. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. **Surg Neurol.** 2006 Sep;66(3):232-45.
- HUANG H, ZHONG R, XIA Z, SONG J, FENG L. Neuroprotective effects of rhynchophylline against ischemic brain injury via regulation of the Akt/mTOR and TLRs signaling pathways. **Molecules.** 2014 Jul 30;19(8):11196-210. doi: 10.3390/molecules190811196. PMID: 25079660
- HUBBARD, S. R., M. MOHAMMADI AND J. SCHLESSINGER. Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases. **J Biol Chem.** 1998; 273: 11987-11990.
- HUTCHINGS SR, SONG D, FRICKER SP, PANG CC. The ruthenium-based nitric oxide scavenger, AMD6221, augments cardiovascular responsiveness to noradrenaline in rats with streptozotocin-induced diabetes. **Eur J Pharmacol.** 2005; 528:132-136.
- IBAYASHI S, NAGAO T, KITAZONO T, OOBOSHI H, KITAYAMA J, SADOSHIMA S, FUJISHIMA M. Calcium antagonist isradipine reduces metabolic alterations in acute cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats.



**Neurochem Res.** 2000; 25:349–355.

IGNARRO LJ, BUGA GM, WOOD KS, BYRNS RE, CHAUDHURI G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1987; 84:9265–9269.

IGNARRO LJ, CIRINO G, CASINI A, NAPOLI C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. **J Cardiovasc Pharmacol.** 1999; 34:879–886.

IGNARRO LJ, NAPOLI C, LOSCALZO J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview. **Circ Res.** 2002; 90:21–28.

IRVING EA, BARONE FC, REITH AD, HADINGHAM SJ, PARSONS AA. Differential activation of MAPK/ERK and p38/SAPK in neurones and glia following focal cerebral ischaemia in the rat. **Brain Res Mol Brain Res.** 2000 Apr 14;77(1):65-75.

IWASAKI, Y.; ITO, S.; SUZUKI, M.; NAGAHORI, T.; YAMAMOTO, T.; KONNO, H. Forebrain ischemia induced by temporary bilateral common carotid occlusion in normotensive rats. **J. Neurol. Sci.** 1989; v. 90, n. 2, p. 155-165.

JABS A, OELZE M, MIKHED Y, STAMM P, KRÖLLER-SCHÖN S, WELSCHOF P, JANSEN T, HAUSDING M, KOPP M, STEVEN S, SCHULZ E, STASCH JP, MÜNDEL T, DAIBER A. Effect of soluble guanylyl cyclase activator and stimulator therapy on nitroglycerin-induced nitrate tolerance in rats. **Vascul Pharmacol.** 2015 Apr 11. pii: S1537-1891(15)00045-2. doi: 10.1016/j.vph.2015.03.007. PMID: 25869522

JANELIDZE S, HU BR, SIESJÖ P, SIESJÖ BK. Alterations of Akt1 (PKB $\alpha$ ) and p70(S6K) in transient focal ischemia. **Neurobiol Dis.** 2001 Feb;8(1):147-54.

JI X, ZHANG L, LIU R, LIU Y, SONG J, DONG H, JIA Y, ZHOU Z. Potential targets for protecting against hippocampal cell apoptosis after transient cerebral ischemia-reperfusion injury in aged rats. **Neural Regen Res.** 2014 Jun 1;9(11):1122-8. doi: 10.4103/1673-5374.135314.

JIANG T, YU JT, ZHU XC, ZHANG QQ, TAN MS, CAO L, WANG HF, LU J, GAO Q, ZHANG YD, TAN L. Angiotensin-(1-7) induces cerebral ischaemic tolerance by promoting brain angiogenesis in a Mas/eNOS-dependent pathway. **Br J Pharmacol.** 2014 Sep;171(18):4222-32. doi: 10.1111/bph.12770.

JIN, K., X. O. MAO, Y. ZHU AND D. A. GREENBERG. MEK and ERK protect hypoxic cortical neurons via phosphorylation of Bad. **J Neurochem.** 2002; 80: 119-125.

KAKU Y, YONEKAWA Y, TSUKAHARA T, OGATA N, KIMURA T, TANIGUCHI T. Alterations of a 200 kDa Neurofilament in the Rat Hippocampus after

Forebrain Ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab.** 1993; 13:402–408.

KALTSCHMIDT B, HEINRICH M, KALTSCHMIDT C. Stimulus- dependent activation of NF-kappaB specifies apoptosis or neuroprotection in cerebellar granule cells. **Neuromolecular Med.** 2002; 2:299–309.

KENNEDY, S. G., A. J. WAGNER, S. D. CONZEN, J. JORDAN, A. BELLACOSA et al. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. **Genes Dev.** 1997; 11: 701-713.

KILIC U, YILMAZ B, REITER RJ, YÜKSEL A, KILIC E. Effects of memantine and melatonin on signal transduction pathways vascular leakage and brain injury after focal cerebral ischemia in mice. **Neuroscience.** 2013 May; 1;237:268-76. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.01.059.

KIS A, YELLON DM, BAXTER GF. Second window of protection following myocardial preconditioning: an essential role for PI3 kinase and p70S6 kinase. **J Mol Cell Cardiol.** 2003 Sep; 35(9):1063-71.

KITAGAWA K. CREB and CAMP response element-mediated gene expression in the ischemic brain. **FEBS J.** 2007 Jul; 274(13):3210-7.

KHAN M, JATANA M, ELANGO C, PAINTLIA AS, SINGH AK, SINGH I. Cerebrovascular protection by various nitric oxide donors in rats after experimental stroke. **Nitric Oxide.** 2006; 15:114–124.

KOLTERMANN A, HARTKORN A, KOCH E, FÜRST R, VOLLMAR AM, ZÄHLER S. Ginkgo biloba extract EGb 761 increases endothelial nitric oxide production in vitro and in vivo. **Cell Mol Life Sci.** 2007 Jul; 64(13):1715-22.

KOH, P. O. Ferulic acid attenuates focal cerebral ischemia-induced decreases in p70S6 kinase and S6 phosphorylation. **Neurosci Lett.** 2013; 555: 7-11.

KOH PO. Ginkgo biloba extract (EGb 761) prevents cerebral ischemia-induced p70S6 kinase and S6 phosphorylation. **Am J Chin Med.** 2010; 38(4):727-34.

KOH PO, CHO JH, WON CK, LEE HJ, SUNG JH, KIM MO. Estradiol attenuates the focal cerebral ischemic injury through mTOR/p70S6 kinase signaling pathway. **Neurosci Lett.** 2008 May 2;436(1):62-6. doi: 10.1016/j.neulet.2008.02.061.

KOH PO, WON CK, CHO JH. Estradiol prevents the injury-induced decrease of Akt/glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation. **Neurosci Lett.** 2006 Sep 1;404(3):303-8.

KOH PO, CHO JH, WON CK, LEE HJ, SUNG JH, KIM MO. Estradiol attenuates the focal cerebral ischemic injury through mTOR/p70S6 kinase signaling pathway. **Neurosci Lett.** 2008 May 2;436(1):62-6. doi: 10.1016/j.neulet.2008.02.061.

KOH PO. Estradiol prevents the injury-induced decrease of 90 ribosomal S6 kinase (p90RSK) and Bad phosphorylation. **Neurosci Lett.** 2007 Jan 22;412(1):68-72.

KIM TW, LEE CH, CHOI CY, KWON NS, BAEK KJ, KIM YG, YUN HY. Nitric oxide mediates membrane depolarization-promoted survival of rat neuronal PC12 cells. **Neurosci Lett.** 2003 Jul 3;344(3):209-11.

KIRAY, M.; BAGRIYANIK, H.A.; PEK CETIN, C.; ERGUR, B.U.; UYSAL, N. Protective effects of deprenyl in transient cerebral ischemia in rats. **Chin. J. Physiol.** 2008; v. 51, n. 5, p.275- 281.

ZOLA-MORGAN, S.; SQUIRE, L.R.; REMPEL, N.L.; CLOWER, R.P.; AMARAL, D.G. Enduring memory impairment in monkeys after ischemic damage to the hippocampus. **J. Neurosci.** 1992; v. 12, n. 7, p. 2582-2596.

KIRINO, T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. **Brain Res.** 1982; v. 239, n. 1, p. 57-69,

KIRINO, T.; TAMURA, A.; SANO, K. Delayed neuronal death in rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol.* 1984; v. 64, n. 2, p. 139-147.

KOVALSKA M, KOVALSKA L, PAVLIKOVA M, JANICKOVA M, MIKUSKOVA K, ADAMKOV M, KAPLAN P, TATARKOVA Z, LEHOTSKY J. Intracellular signaling MAPK pathway after cerebral ischemia-reperfusion injury. **Neurochem Res.** 2012 Jul;37(7):1568-77. doi: 10.1007/s11064-012-0752-y.

KRISTIÁN T., SIEJO B.K. Calcium in ischemic cell death. **Stroke.** 2009; 13:706-718.

KUAN CY, WHITMARSH AJ, YANG DD, LIAO G, SCHLOEMER AJ, DONG C, BAO J, BANASIAK KJ, HADDAD GG, FLAVELL RA, DAVIS RJ, RAKIC P. A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2003 Dec 9;100(25):15184-9.

KUNIMATSU, T.; ASAI, S.; KANEMATSU, K.; KOHNO, T.; MISAKI, T.; ISHIKAWA, K. Effects of glutamate receptor agonist on extracellular glutamate dynamics during moderate cerebral ischemia. **Brain Res.** 2001; v.923, n. 1-2, p. 178-186.

LAFAY-CHEBASSIER C, PACCALIN M, PAGE G, BARC-PAIN S, PERAULT-POCHAT MC, GIL R, PRADIER L, HUGON J. mTOR/p70S6k signalling alteration by Abeta exposure as well as in APP-PS1 transgenic models and in patients with Alzheimer's disease. **J Neurochem.** 2005 Jul; 94(1):215-25.

LEE, C. H., K. Y. YOO, O. K. PARK, J. H. CHOI, I. J. KANG et al. Phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 immunoreactivity and its

protein levels in the gerbil hippocampus during normal aging. **Mol Cells**. 2010; 29: 373-378.

LEFER, A.M.; LEFER, D.J. Pharmacology of the endothelium in ischemia-reperfusion and circulatory shock. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 1993; v. 33, p. 71-90,.

LEHOTSKÝ, J.; MURÍN, R.; STRAPKOVÁ, A.; URÍKOVÁ, A.; TATARKOVÁ, Z.; KAPLÁN, P. Time course of ischemia/reperfusion-induced oxidative modification of neural proteins in rat forebrain. **Gen. Physiol. Biophys.** 2004; v. 23, n. 4, p. 401-415.

LEHOTSKÝ, J.; BURDA, J.; DANIELISOVÁ, V.; GOTTLIEB, M.; KAPLÁN, P.; SANIOVÁ, B. Ischemic tolerance: the mechanisms of neuroprotective strategy. **Anat. Rec.** 2009; v. 292, n. 12, p. 2002-2012.

LEHOTSKÝ J, URBAN P, PAVLÍKOVÁ M, TATARKOVÁ Z, KAMINSKA B, KAPLÁN P. Molecular mechanisms leading to neuroprotection/ischemic tolerance: effect of preconditioning on the stress reaction of endoplasmic reticulum. **Cell Mol Neurobiol**. 2009 Sep; 29(6-7):917-25. doi: 10.1007/s10571-009-9376-4.

LEI H, GRINBERG O, NWAIGWE CI, HOU HG, WILLIAMS H, SWARTZ HM, DUNN JF (The 41. Lei H, Grinberg O, Nwaigwe CI, Hou HG, Williams H, Swartz HM, Dunn JF. The effects of ketamine–xylazine anesthesia on cerebral blood flow and oxygenation observed using nuclear magnetic resonance perfusion imaging and electron paramagnetic resonance oximetry. **Brain Res**. 2001; 913:174–179

LEFER AM, LEFER DJ. Pharmacology of the endothelium in ischemia-reperfusion and circulatory shock. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. 1993; 33:71–90

LEVINE S. Anoxic–ischemic encephalopathy in rats. **Am J Pathol**. 1960; 36:1–17.

LEINONEN, J. S.; AHONEN, J. P.; LONNROT, K.; LEHKONEN, M.; DASTIDAR, P.; MOLNAR, G.; ALHO, H. Low plasma antioxidant activity is associated with high lesion volume and neurological impairment in stroke. **Stroke**. 2000; v. 31, p. 33-39.

LEVY, D. E., AND J. E. DARNELL, JR. Stats: transcriptional control and biological impact. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 20023; 651-662.

LI XM, YANG JM, HU DH, HOU FQ, et al. Contribution of Downregulation of L-type calcium currents to delayed neuronal death in rat hippocampus after global cerebral ischemia and reperfusion. **J. Neuroscience**. 2007; 27(19):5249-5259.

LI DY, TAO L, LIU H, CHRISTOPHER TA, LOPEZ BL, MA XL. Role of ERK1/2 in

the anti-apoptotic and cardioprotective effects of nitric oxide after myocardial ischemia and reperfusion. **Apoptosis**. 2006 Jun; 11(6):923-3.

LI, Q. F., Y. S. ZHU AND H. JIANG. Isoflurane preconditioning activates HIF-1 $\alpha$ , iNOS and Erk1/2 and protects against oxygen-glucose deprivation neuronal injury. **Brain Res**. 2008; 1245: 26-35.

LI Y, DAI C, LI J, WANG W, SONG G. Bid-overexpression regulates proliferation and phosphorylation of Akt and MAPKs in response to etoposide-induced DNA damage in hepatocellular carcinoma cells. **Onco Targets Ther**. 2012; 5:279-86. doi: 10.2147/OTT.S36087.

LI F, IRIE K, ANWER MS, FISHER M. Delayed triphenyltetrazolium chloride staining remains useful for evaluating cerebral infarct volume in a rat stroke model. **J Cereb Blood Flow Metab**. 1997; 17:1132–1135

LI Z, WANG Y, XIE Y, YANG Z, ZHANG T. Protective effects of exogenous hydrogen sulfide on neurons of hippocampus in a rat model of brain ischemia. **Neurochem Res**. 2011; 36:1840–1849.

LI Y, HE D, ZHANG X, LIU Z, ZHANG X, DONG L, XING Y, WANG C, QIAO H, ZHU C, CHEN Y. Protective effect of celastrol in rat cerebral ischemia model: down-regulating p-JNK, p-c-Jun and NF- $\kappa$ B. **Brain Res**. 2012 Jun 29;1464:8-13. doi: 10.1016/j.brainres.2012.04.054.

LI, C., AND R. M. JACKSON. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. **Am J Physiol Cell Physiol**. 2002; 282: C227-241.

LI, Q. F., Y. S. ZHU AND H. JIANG. Isoflurane preconditioning activates HIF-1 $\alpha$ , iNOS and Erk1/2 and protects against oxygen-glucose deprivation neuronal injury. **Brain Res**. 2008; 1245: 26-35.

LIEBELT B, PAPAPETROU P, ALI A, GUO M, JI X, PENG C, ROGERS R, CURRY A, JIMENEZ D, DING Y. Exercise preconditioning reduces neuronal apoptosis in stroke by up-regulating heat shock protein-70 (heat shock protein-72) and extracellular-signal-regulated-kinase 1/2. **Neuroscience**. 2010 Apr 14;166(4):1091-100. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.12.067.

LIN HW, THOMPSON JW, MORRIS KC AND PEREZ-PINZON MA. Signal Transducers and Activators of Transcription: STATs-Mediated Mitochondrial Neuroprotection. **Antioxid Redox Signal**. 2011 May 15; 14(10): 1853–1861. doi: 10.1089/ars.2010.3467 PMID: PMC3078497

LIN Y, ZHANG JC, FU J, CHEN F, WANG J, WU ZL, YUAN SY. Hyperforin attenuates brain damage induced by transient middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats via inhibition of TRPC6 channels degradation. **J Cereb Blood Flow Metab**. 2013 Feb;33(2):253-62. doi: 10.1038/jcbfm.2012.164. Epub 2012

Nov 14.

LINNIK MD, ZAHOS P, GESCHWIND MD, FEDEROFF HJ. Expression of bcl-2 from a defective herpes simplex virus-1 vector limits neuronal death in focal cerebral ischemia. **Stroke**. 1995 Sep;26(9):1670-4; discussion 1675.

LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiol. Rev.** 1999; V. 79, n. 4, p.1431-1568,.

LIU, H., X. LIU, X. WEI, L. CHEN, Y. XIANG et al. Losartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury via PI3K/Akt-mediated eNOS phosphorylation. **Brain Res Bull.** 2012; 89: 65-70.

LIU HQ, LI WB, LI QJ, ZHANG M, SUN XC, FENG RF, XIAN XH, LI SQ, QI J, ZHAO HG. Nitric oxide participates in the induction of brain ischemic tolerance via activating ERK1/2 signaling pathways. **Neurochem Res.** 2006 Jul; 31(7):967-74.

LIU L, ZHANG X, WANG L, YANG R, CUI L, LI M, DU W, WANG S. The neuroprotective effects of Tanshinone IIA are associated with induced nuclear translocation of TORC1 and upregulated expression of TORC1, pCREB and BDNF in the acute stage of ischemic stroke. **Brain Res Bull.** 2010 May 31;82(3-4):228-33. doi: 10.1016/j.brainresbull.2010.04.005.

LIU SB, ZHAO MG. Neuroprotective effect of estrogen: role of nonsynaptic NR2B-containing NMDA receptors. **Brain Res Bull.** 2013 Apr;93:27-31. doi: 10.1016/j.brainresbull.2012.10.004.

LO EH, MOSKOWITZ MA, JACOBS TP. Exciting, radical, suicidal: how brain cells die after stroke. **Stroke**. 2005; 36:189–192 36.

LOPES, LUIZ G.F., WIERASZKO, A., EL-SEHRIF, Y., CLARKE, M.J. the trans-labilization of nitric oxide in Ru complexes by C-bound imidazole. **Inorg chim arct.** 2001; 312;; 15-22.

LU, Q., T. F. RAU, V. HARRIS, M. JOHNSON, D. J. POULSEN et al. Increased p38 mitogen-activated protein kinase signaling is involved in the oxidative stress associated with oxygen and glucose deprivation in neonatal hippocampal slice cultures. **Eur J Neurosci.** 2011; 34: 1093-1101.

LUNARDI C.N; DA SILVA., R.S.; BENDHACK L.M. New nitric oxide donors based on ruthenium complexes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** 2009; 42: 87-93..

LUO C, LI Q, GAO Y, SHEN X, MA L, WU Q, WANG Z, ZHANG M, ZHAO Z, CHEN X, TAO L. Poloxamer 188 Attenuates Cerebral Hypoxia/Ischemia Injury in Parallel with Preventing Mitochondrial Membrane Permeabilization and Autophagic Activation. **J Mol Neurosci.** 2015 May 13. PMID: 25966641

MAIRA SM, GALETIC I, BRAZIL DP, KAECH S, INGLEEY E, THELEN M, HEMMING BA. Carboxyl-terminal modulator protein (CTMP), a negative regulator of PKB/Akt and v-Akt at the plasma membrane. **Science**. 2001 Oct 12; 294(5541):374-80.

MARAMPON F, GRAVINA GL, DI ROCCO A, BONFILI P, DI STASO M, FARDELLA C, POLIDORO L, CICCARELLI C, FESTUCCIA C, POPOV VM, PESTELL RG, TOMBOLINI V, ZANI BM. MEK/ERK inhibitor U0126 increases the radiosensitivity of rhabdomyosarcoma cells in vitro and in vivo by downregulating growth and DNA repair signals. **Mol Cancer Ther**. 2011 Jan; 10(1):159-68. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0631.

MARTINO, J. C., M. DUBOIS-DAUPHIN, J. K. STAPLE, I. RODRIGUEZ, H. FRANKOWSKI et al. Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. **Neuron**. 1994; 13: 1017-1030.

MAYR, B. M., G. CANETTIERI AND M. R. MONTMINY. Distinct effects of cAMP and mitogenic signals on CREB-binding protein recruitment impart specificity to target gene activation via CREB. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2001; 98: 10936-10941.

MEDLING BD, BUENO R, CHAMBERS C, NEUMEISTER MW. The effect of vitamin E succinate on ischemia reperfusion injury. **Hand**. 2010. 5:60–64.

Meier JA, Lerner AC. Toward a new STATE: the role of STATs in mitochondrial function. **Semin Immunol**. 2014 Feb;26(1):20-8. doi:10.1016/j.smim.2013.12.005. Epub 2014 Jan 14. PMID: 24434063

MENGESDORF T, PROUD CG, MIES G, PASCHEN W. Mechanisms underlying suppression of protein synthesis induced by transient focal cerebral ischemia in mouse brain. **Exp Neurol**. 2002 Oct; 177(2):538-46.

MELANI, A., M. GIANFRIDDO, M. G. VANNUCCHI, S. CIPRIANI, P. G. BARALDI et al., The selective A2A receptor antagonist SCH 58261 protects from neurological deficit, brain damage and activation of p38 MAPK in rat focal cerebral ischemia. **Brain Res**. 2006; 1073-1074: 470-480.

MICHAUD-LEVESQUE, J., N. BOUSQUET-GAGNON AND R. BELIVEAU. Quercetin abrogates IL-6/STAT3 signaling and inhibits glioblastoma cell line growth and migration. **Exp Cell Res**. 2012; 318: 925-935.

MIYAWAKI T, OFENGEIM D, NOH KM, LATUSZEK-BARRANTES A, HEMMING BA, FOLLENZI A, ZUKIN RS. The endogenous inhibitor of Akt, CTMP, is critical to ischemia-induced neuronal death. **Nat Neurosci**. 2009 May; 12(5):618-26. doi: 10.1038/nn.2299.

MIYASAKA N., NAGAOKA T, KUROIWA T, AKIMOTO H, HAKU T, KUBOTA T, ASO T. Histopathologic correlates of temporal diffusion changes in a rat model of cerebral hypoxia/ischemia. *AJNR AM. J.Neuroradiol.* 2000; 21:60-66.

MÖDERSCHEIM TA, GORBA T, PATHIPATI P, KOKAY IC, GRATTAN DR, WILLIAMS CE, SCHEEPENS A. Prolactin is involved in glial responses following a focal injury to the juvenile rat brain. *Neuroscience.* 2007; 30;145(3):963-73.

MUÑOZ M, BERMEJO-BESCÓS P, ROMERO C, BENEDÍ J, MARTÍN-ARAGÓN S. SNP-mediated neuroprotection under glucose deprivation is enhanced by *Hypericum perforatum*. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2012 Mar;11(2):162-73. PMID: 22483284

MOSIENKO, V.; TESCHEMACHER, A.G.; KASPAROV, S. Is L-lactate a novel signaling molecule in the brain? *J Cereb Blood Flow Metab.* 2015 Apr 29. doi: 10.1038/jcbfm.2015.77.

MUNIZ LRF, FARIA MHG, VASCONCELOS PRL. Metabolic evaluation of ischemic and reperfusion brain injury following bilateral occlusion of common carotid arteries: an experimental study in rats. *Acta Cir Bras.* 2004; 19:529–534.

NAGHAVI et al .Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease. *Lancet* 2015; 385: 117–71. PIMD: 25530442.

NAKAJIMA T, IWABUCHI S, MIYAZAKI H, OKUMA Y, INANAMI O, KUWABARA M, NOMURA Y, KAWAHARA K. Relationship between the activation of cyclic AMP responsive element binding protein and ischemic tolerance in the penumbra region of rat cerebral cortex. *Neurosci Lett.* 2002 Oct 4;331(1):13-6.

NANDAGOPAL, M.; MURALIDHARAN, P.; THIRUMURUGAN, G. Cerebroprotective effect of root extract of *Asparagus racemosus* Willd. in global cerebral ischemia in rats. *J. Pharmacol. Toxicol.* 2011; v. 6, n. 1, p. 49-61.

NESTLER EJ, GREENGARD P. Protein phosphorylation and the regulation of neuronal function. Em: *Basic Neurochemistry* 4 th edition, Siegel G, Agranoff B, Albers RW e Molinoff P (eds.). 1989; págs. 373-398.

NGUYEN T, LIN S, PANTHO AF, KOHL-THOMAS BM, BEERAM MR, ZAWIEJA DC, KUEHL TJ, UDDIN MN. Hyperglycemia down-regulates cGMP-dependent protein kinase I expression in first trimester cytotrophoblast cells. *Mol Cell Biochem.* 2015 Apr 12

NITATORI, T.; SATO, N.; WAGURI, S.; KARASAWA, Y.; ARAKI, H.; SHIBANAI, K.; KOMINAMI, E.; UCHIYAMA, Y. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal



cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. **J. Neurosci.** 1995; v. 15, n. 2, p. 1001-1011.

NOGUEIRA. Efeitos da L-alanil-glutamina na isquemia e reperfusão em cérebro de ratos wistar. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. Ceará. 2009.

NOSHITA, N., A. LEWEN, T. SUGAWARA AND P. H. CHAN. Evidence of phosphorylation of Akt and neuronal survival after transient focal cerebral ischemia in mice. **J Cereb Blood Flow Metab.** 2001;21: 1442-1450.

NURMI A1, VARTIAINEN N, PIHLAJA R, GOLDSTEINS G, YRJÄNHEIKKI J, KOISTINAHO J. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits translocation of nuclear factor kappa-B in neurons and protects against brain ischaemia with a wide therapeutic time window. **J Neurochem.** 2004 Nov; 91(3):755-65.

OLIVER C. N., STARKE-REED P. E., STADTMAN E. R., et al. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 1990; Vol. 87:5144-5147.

OLMEZ I, OZYURT H. Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease. **Neurochem Int.** 2012 Jan;60(2):208-12. doi: 10.1016/j.neuint.2011.11.009.

OKUYAMA S, MORITA M, SAWAMOTO A, TERUGO T, NAKAJIMA M, FURUKAWA Y. Edaravone enhances brain-derived neurotrophic factor production in the ischemic mouse brain. **Pharmaceuticals (Basel).** 2015 Apr 2;8(2):176-85. doi: 10.3390/ph8020176. PMID: 25850013

OROBEI MV, KULIKOV VP. Cerebral blood flow and damage markers during ischemia/reperfusion of brain against a background of modulation of the kinin system's activity. **Patol Fiziol Eksp Ter.** 2014 Apr-Jun;(2):8-12.

OTTAVIANO FG, HANDY DE, LOSCALZO J. Redox regulation in the extracellular environment. **Circ J.** 2008 Jan;72(1):1-16. PMID: 18159092

PALMER RM, FERRIGE AG, MONCADA S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature.** 1987; 327:524–526..

PAVLIKOVA M1, KOVALSKA M, TATARKOVA Z, SIVONOVA-KMETOVA M, KAPLAN P, LEHOTSKY J. Response of secretory pathways Ca(2+) ATPase gene expression to hyperhomocysteinemia and/or ischemic preconditioning in rat cerebral cortex and hippocampus. **Gen Physiol Biophys.** 2011; 30 Spec No:S61-9. doi: 10.4149/gpb\_2011\_S11\_61.

PAXINOS G, WATSON C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 5th edn. Elsevier Academic Press, Burlington. 2004

PEI DS, SONG YJ, YU HM, HU WW, DU Y, ZHANG GY. Exogenous nitric oxide negatively regulates c-jun N-terminal kinase activation via inhibiting endogenous NO-Induced s-nitrosylation during cerebral ischemia and reperfusion in rat hippocampus. **Journal of neurochemistry**. 2008; (106): 1952–1963.

PENG B, GUO QL, HE ZJ, YE Z, YUAN YJ, WANG N, ZHOU J. Remote ischemic postconditioning protects the brain from global cerebral ischemia/reperfusion injury by up-regulating endothelial nitric oxide synthase through the PI3K/Akt pathway. **Brain Res**. 2012 Mar 22;1445:92-102. doi: 10.1016/j.brainres.2012.01.033.

PÉREZ-PINZÓN, M. Mechanisms of neuroprotection during ischemic preconditioning: lesions from anoxic tolerance. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 2007; v. 147, n. 2, p.291-299,.

PÉREZ-PINZÓN, M.A.; MUMFORD, P.L.; ROSENTHAL, M.; SICK, T. Anoxic preconditioning in hippocampal slices: role of adenosine. **Neurosci**. 1996; v. 75, n. 3, p. 687-694,.

PÉREZ-PINZÓN, M.A.; XU, G.P.; DIETRICH, W.D.; ROSENTHAL, M.; SICK, T.J. Rapid ischemic preconditioning protects rats against neuronal damage after 3 but not 7 days of reperfusion following global ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 1997; v. 17, n. 2, p. 175-182.

PETITO, C.K.; FELDMANN, E.; PULSINELLI, W.A.; PLUM, F. Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. **Neurology**. 1987; v. 37, n. 8, p. 1281-1286.

PHILLIS, J.W.; ESTEVEZ, A.Y.; O'REGAN, M.H. Protective effects of the free radical scavengers, dimethyl sulfoxide and ethanol, in cerebral ischemia in gerbils. **Neurosci**. 1998 Mar; Lett., ano 2, n.244, p.109-111.

PIAO CS1, KIM JB, HAN PL, LEE JK. Administration of the p38 MAPK inhibitor SB203580 affords brain protection with a wide therapeutic window against focal ischemic insult. **J Neurosci Res**. 2003 Aug 15;73(4):537-44.

PIGNATARO, G., A. SCORZIELLO, G. DI RENZO AND L. ANNUNZIATO. Post-ischemic brain damage: effect of ischemic preconditioning and postconditioning and identification of potential candidates for stroke therapy. **FEBS J**. 2009; 276: 46-57.

PISOSCHI AM, POP A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **Eur J Med Chem**. 2015 Apr 22;97:55-74. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040. [Epub ahead of print] Review. PMID: 25942353.

PLUTA RM, RAK R, WINK DA, WOODWARD JJ, KHALDI A, OLDFIELD EH, WATSON JC. Effects of nitric oxide on reactive oxygen species production and infarction size after brain reperfusion injury. **Neurosurgery**. 2001; 48:884–892.

Portal <http://www.brasil.gov.br/saude/2012/04/acidente-vascular-cerebral-avc>

PRIETO-ARRIBAS R, PASCUAL-GARVI JM, GONZÁLEZ-LLANOS F, RODA JM. How to repair an ischemic brain injury? Value of experimental models in search of answers. **Neurologia**. 2011; 26:65–73

PROUD CG. Protein phosphorylation in translational control. **Curr Top Cell Regul**. 1992; 32:243-369.

PULLEN N1, THOMAS G. The modular phosphorylation and activation of p70s6k. **FEBS Lett**. 1997 Jun 23;410(1):78-82.

PULSINELLI, W.A. Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. **Prog. Brain Res**. 1985; v. 63, p. 29-37.

PULSINELLI, W. A.; BUCHAN, A. M. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. **Stroke**. 1988; v. 19, p.913-914.

QI SH, HAO LY, YUE J, ZONG YY, ZHANG GY. Exogenous nitric oxide negatively regulates the S-nitrosylation p38 mitogen-activated protein kinase activation during cerebral ischaemia and reperfusion. **Neuropathol Appl Neurobiol**. 2013 Apr;39(3):284-97. doi: 10.1111/j.1365-2990.2012.01284.x.

RADAK D, RESANOVIC I, ISENOVIC ER. Link between oxidative stress and acute brain ischemia. **Angiology**. 2014 Sep;65(8):667-76. doi: 10.1177/0003319713506516.

RAHDLE, P .J.; GARLAND, P. B.; NEWSHOLME, E. A.; DENTOR, R. M.; POGSON, C. I. Protein hormones. Interactions of metabolism and the physiological role of insulin. **Rev. Prog. Horm. Res**. 1996; v. 22, p. 1-48.

RIEDEMANN NC, WARD PA. Complement in ischemia reperfusion injury. **Am J Pathol**. 2003 Feb; 162(2):363-7. Review. No abstract available.

RICCIO A, ALVANIA RS, LONZE BE, RAMANAN N, KIM T, HUANG Y, DAWSON TM, SNYDER SH, GINTY DD. A nitric oxide signaling pathway controls CREB-mediated gene expression in neurons. **Mol Cell**. 2006 Jan 20;21(2):283-94.

RICCIO A, AHN S, DAVENPORT CM, BLENDY JA, GINTY DD. Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. **Science**. 1999 Dec 17;286(5448):2358-61.

RISSI, D.; OLIVEIRA, I.; RECH, R.; PIEREZAN, F.; LEMOS, R.; BARROS, C. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpes vírus bovino-5. **Pesq. Vet. Bras**. 2006; v. 26, n. 2, p. 123-132.

ROUX, P. P., AND J. BLENIS. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. **Microbiol Mol Biol Rev.** 2004; 68: 320-344.

SAMDANI A.F., DAWSON T.M., DAWSON V.L. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. **Stroke.** 1997; 28:1283-8.

SANCHEZ A, FERNANDEZ N, MONGE L, SALCEDO A, CLIMENT B, LUIS GARCIA-VILLALON A, DIE´QUEZ G. Goat cerebrovascular reactivity to ADP after ischemia–reperfusion. Role of nitric oxide, prostanoids and reactive oxygen species. **Brain Res.** 2006; 1120: 114–123

SANG, H., L. CAO, P. QIU, L. XIONG, R. WANG et al. Isoflurane produces delayed preconditioning against spinal cord ischemic injury via release of free radicals in rabbits. **Anesthesiology.** 2006; 105: 953-960.

SANDERSON TH, REYNOLDS CA, KUMAR R, PRZYKLENK K, HÜTTEMANN M. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation. **Mol Neurobiol.** 2013 Feb;47(1):9-23. doi: 10.1007/s12035-012-8344-z. Epub 2012 Sep 26.

SANTANA AP, TAVARES BM, LUCETTI LT, GOUVEIA FS JR, RIBEIRO RA, SOARES PM, SOUSA EH, LOPES LG, MEDEIROS JV, SOUZA MH. The nitric oxide donor cis-[Ru(bpy)2(SO3)NO](PF6) increases gastric mucosa protection in mice - Involvement of the soluble guanylate cyclase/KATP pathway. **Nitric Oxide.** 2015 Feb 15;45:35-42. doi: 10.1016/j.niox.2015.02.002.

SANT’ANA, F.; BARROS, C. Polioencephalomalacia in ruminants in Brazil. *Braz. J. Vet. Pathol.* 2010; v. 3, n. 1, p. 70-79.

SANT’ANA, F.; NOGUEIRA, A.; SOUZA, R.; CARDINAL, S.; LEMOS, R.; BARROS, C. Polioencefalomácia experimental induzida por amprólio em ovinos. **Pesq. Vet. Bras.** 2009; v. 29, p. 747-752.

SASAKI T1, TAKEMORI H, YAGITA Y, TERASAKI Y, UEBI T, HORIKE N, TAKAGI H, SUSUMU T, TERAOKA H, KUSANO K, HATANO O, OYAMA N, SUGIYAMA Y, SAKODA S, KITAGAWA K. SIK2 is a key regulator for neuronal survival after ischemia via TORC1-CREB. **Neuron.** 2011 Jan 13;69(1):106-19. doi: 10.1016/j.neuron.2010.12.004.

SATOH, T., D. NAKATSUKA, Y. WATANABE, I. NAGATA, H. KIKUCHI et al. Neuroprotection by MAPK/ERK kinase inhibition with U0126 against oxidative stress in a mouse neuronal cell line and rat primary cultured cortical neurons. **Neurosci Lett.** 2000; 288: 163-166.

SAVORY, W.S. Case of a Young woman in whom the main arteries of both upper extremities and of the left side of neck were throughout completely obliterated. *Med. Chir. Tr. Lond.* 1856; 39:205.

SCHALLER, B.; GRAF, R. Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2004; v. 24, n. 4, p. 351-371.

SCHLOSSMANN J1, FEIL R, HOFMANN F. Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Ann Med.* 2003; 35(1):21-7.

SCHULMAN H, HYMAN SE. Intracellular signaling. Em: *Fundamental Neuroscience*, Zigmond MS, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL e Squire LR (eds.). 1999; p. 286-3001,

SCORZIELLO A1, SANTILLO M, ADORNETTO A, DELL'AVERSANO C, SIRABELLA R, DAMIANO S, CANZONIERO LM, RENZO GF, ANNUNZIATO L. NO-induced neuroprotection in ischemic preconditioning stimulates mitochondrial Mn-SOD activity and expression via Ras/ERK1/2 pathway. *J Neurochem.* 2007 Nov; 103(4):1472-80.

SHEN, C. P., Y. TSIMBERG, C. SALVADORE AND E. MELLER. Activation of Erk and JNK MAPK pathways by acute swim stress in rat brain regions. *BMC Neurosci.* 2004; 5: 36.

SHIN WH, PARK SJ, KIM EJ. Protective effect of anthocyanins in middle cerebral artery occlusion and reperfusion model of cerebral ischemia in rats. *Life Sci.* 2006 Jun 6;79(2):130-7.

SHYU WC, LIN SZ, CHIANG MF, CHEN DC, SU CY, WANG HJ, LIU RS, TSAI CH, LI H. Secretoneurin promotes neuroprotection and neuronal plasticity via the Jak2/Stat3 pathway in murine models of stroke. *J Clin Invest.* 2008 Jan;118(1):133-48.

SIEGELBAUM AS, SCHWARTZ JH, KANDEL ER. Modulation of synaptic transmission: second messengers. Em: *Principles of Neural Science*, Kandel ER, Schwartz JH e Jessell TM (eds.). 2000; págs. 229-252.

SILVA JUNIOR, O.; CENTURION, S.; PACHECO, E.; BRISOTTI, J.; OLIVEIRA, A.; SASSO, K. Basic aspects of the ischemia reperfusion injury and of the ischemic preconditioning. *Acta Cir. Bras.* 2002; v. 17, p. 96-100.

SILVA JJN, GUEDES PMM, ZOTTIS A, BALLIANO TL, SILVA FON, LOPES LGF, ELLENA J, OLIVA G, ANDRICOPULO AD, FRANCO DW, SILVA JS. Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease: enzyme inhibition and in vitro/in vivo try-panocidal activity. *Br J Pharmacol.* 2010; 160:260–269

SILVA FO, CÂNDIDO MC, HOLANDA AK, DIÓGENES IC, SOUSA EH, LOPES LG. Mechanism and biological implications of the NO release of cis-

[Ru(bpy)<sub>2</sub>L(NO)]<sup>n?</sup> complexes: a key role of physiological thiols. **J Inorg Biochem.** 2011; 105:624–629.

SILVA JJN, GUEDES PMM, ZOTTIS A, BALLIANO TL, SILVA FON, LOPES LGF, ELLENA J, OLIVA G, ANDRICOPULO AD, FRANCO DW, SILVA JS. Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease: enzyme inhibition and in vitro/in vivo trypanocidal activity. **Br J Pharmacol.** 2010; 160:260–269

SILVA FON, ARAUJO SXB, HOLANDA AKM, MEYER E, SALES FAM, DIOGENES ICN, CARVALHO IMM, MOREIRA IS, LOPES LGF. Synthesis, Characterization, and NO Release Study of the cis- and trans-[Ru(Bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)]<sup>n?</sup> complexes *Eur J Inorg Chem.* 2006; 2020–2026

SIRONI L, BANFI C, BRIOSCHI M, GELOSA P, GUERRINI U, NOBILI E, GIANELLA A, PAOLETTI R, TREMOLI E, CIMINO M. Activation of NF-κB and ERK1/2 after permanent focal ischemia is abolished by simvastatin treatment. **Neurobiol Dis.** 2006 May; 22(2):445-51.

SONG D, XU J, DU T, YAN E, HERTZ L, WALZ W, PENG L. Inhibition of brain swelling after ischemia-reperfusion by β-adrenergic antagonists: correlation with increased K<sup>+</sup> and decreased Ca<sup>2+</sup> concentrations in extracellular fluid. **Biomed Res Int.** 2014;2014:873590. doi: 10.1155/2014/873590. PMID: 25478577

STANKIEWICZ TR, LOUCKS FA, SCHROEDER EK, NEVALAINEN MT, TYLER KL, AKTORIES K, BOUCHARD RJ, LINSEMAN DA. Signal transducer and activator of transcription-5 mediates neuronal apoptosis induced by inhibition of Rac GTPase activity. **J Biol Chem.** 2012 May 11;287(20):16835-48. doi: 10.1074/jbc.M111.302166.

STEIN AB, TIWARI S, THOMAS P, HUNT G, LEVENT C, STODDARD MF, TANG XL, BOLLI R, DAWN B. Effects of anesthesia on echocardiographic assessment of left ventricular structure and function in rats. **Basic Res Cardiol.** 2007; 102:28–41.

SUN SL, LI TJ, YANG PY, QIU Y, RUI YC. Modulation of signal transducers and activators of transcription (STAT) factor pathways during focal cerebral ischaemia: a gene expression array study in rat hippocampus after middle cerebral artery occlusion. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 2007 Nov; 34(11):1097-101.

SUZUKI, T., K. OKUMURA-NOJI AND E. NISHIDA. ERK2-type mitogen-activated protein kinase (MAPK) and its substrates in postsynaptic density fractions from the rat brain. **Neurosci Res.** 1995; 22: 277-285.

Szczepanek K, Chen Q, Derecka M, Salloum FN, Zhang Q, Szelag M, Cichy J, Kukreja RC, Dulak J, Lesnefsky EJ, Larner AC. Mitochondrial-targeted Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protects against ischemia-

induced changes in the electron transport chain and the generation of reactive oxygen species. **J Biol Chem.** 2011 Aug 26;286(34):29610-20. doi: 10.1074/jbc.M111.226209.

SZYDLOWSKA K, TYMIANSKI M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. **Cell Calcium.** 2010 Feb;47(2):122-9. doi: 10.1016/j.ceca.2010.01.003.

TAJES M, ILL-RAGA G, PALOMER E, RAMOS-FERNÁNDEZ E, GUIX FX, BOSCH-MORATÓ M, GUIVERNAU B, JIMÉNEZ-CONDE J, OIS A, PÉREZ-ASENSIO F, REYES-NAVARRO M, CABALLO C, GALÁN AM, ALAMEDA F, ESCOLAR G, OPAZO C, PLANAS A, ROQUER J, VALVERDE MA, MUÑOZ FJ. Nitro-oxidative stress after neuronal ischemia induces protein nitrotyrosination and cell death. **Oxid Med Cell Longev.** 2013;2013:826143. doi: 10.1155/2013/826143.

TANAKA K. Alteration of second messengers during acute cerebral ischemia - adenylyl cyclase, cyclic AMP-dependent protein kinase, and cyclic AMP response element binding protein. **Prog Neurobiol.** 2001 Oct; 65(2):173-207.

TANAKA K, NAGATA E, SUZUKI S, DEMBO T, NOGAWA S, FUKUUCHI Y. Immunohistochemical analysis of cyclic AMP response element binding protein phosphorylation in focal cerebral ischemia in rats. **Brain Res.** 1999 Feb 13;818(2):520-6.

TANO JY, GOLLASCH M. Calcium-activated potassium channels in ischemia reperfusion: a brief update. **Front Physiol.** 2014 Oct 6;5:381. doi: 10.3389/fphys.2014.00381. PMID: 25339909

TARDINI DMS, WINSTON BY, NOVELLI ELB, SEQUEIRA JL. Evaluation of two brain ischemia and reperfusion experimental models in rats with carotid temporary occlusion associated or not to vertebral occlusion. **Acta Cir Bras.** 2003; 18:514–517 .

TARDINI, D. M., AND W. B. YOSHIDA. Brain injury due ischemia and reperfusion in carotid endarterectomy surgery. **Rev Port Cir Cardiorac Vasc.** 2003;10: 133-140.

THIAGARAJAN RR, WINN RK, HARLAN JM. The role of leu- kocyte and endothelial adhesion molecules in ischemia–reperfu- sion injury. **Thromb Haemost.** 1997; 78:310–314.

TOLDY, A., M. ATALAY, et al. The beneficial effects of nettle supplementation and exercise on brain lesion and memory in rat. **J Nutr Biochem.** 2008 Dec 12.

TORRES, J.; GUIMARÃES, S.; VASCONCELOS, P.; MARTINS, M.; CHAVES, C.; VASCONCELOS, P. Efeitos metabólicos da L-alanil-glutamina em ratos submetidos à isquemia da pata traseira esquerda seguida de reperfusão. **Acta Cir. Bras.** 2003; v. 18, p. 39-44.

TRAYSTMAN R.J. ANIMAL MODELS OF FOCAL AND GLOBAL CEREBRAL ISCHEMIA. **ILAR J.** 2003;44(2):85-95. PMID: 12652003

TRYSTMAN R.J., KIRSCH J.R., KOEHLER R.C. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. **J. Appl. Physiol.** 1991; 71:1185-95.

TROY CM1, RABACCHI SA, FRIEDMAN WJ, FRAPPIER TF, BROWN K, SHELANSKI ML. Caspase-2 mediates neuronal cell death induced by beta-amyloid. **J Neurosci.** 2000 Feb 15;20(4):1386-92.

TSUKAHARA T, YONEKAWA Y, TANAKA K, OHARA O, WANTANABE S, KIMURA T, NISHIJIMA T, TANIGUCHI T. The role of brain-derived neurotrophic factor in transient forebrain ischemia in the rat brain. **Neurosurgery.** 1994 Feb; 34(2):323-31; discussion 331. PMID: 8177394

URBAN P, PAVLÍKOVÁ M, SIVONOVÁ M, KAPLÁN P, TATARKOVÁ Z, KAMINSKA B, LEHOTSKÝ J. Molecular analysis of endoplasmic reticulum stress response after global forebrain ischemia/reperfusion in rats: effect of neuroprotectant simvastatin. **Cell Mol Neurobiol.** 2009 Mar; 29(2):181-92. doi: 10.1007/s10571-008-9309-7.

VAKILI A1, HOSSEINZADEH F, SADOGH T. Effect of aminoguanidine on post-ischemic brain edema in transient model of focal cerebral ischemia. **Brain Res.** 2007 Sep 19;1170:97-102.

VASCONCELOS PR, GUIMARÃES AB, CAMPELO MW, VASCONCELOS PR, GUIMARAES SB. Preconditioning with L-alanyl-glutamine upon cerebral edema and hippocampus red neurons counting in rats subjected to brain ischemia /reperfusion injury. **Acta Cir Bras.** 2015 Mar; 30(3):199-203. doi: 10.1590/S0102-865020150030000006.

VALVASSORI SS, CRISTIANO MP, CARDOSO DC, SANTOS GD, MARTINS MR, QUEVEDO J, DA SILVA PAULA MM. Pharmacological activity of ruthenium complexes trans-[RuCl<sub>2</sub>(L)<sub>4</sub>] (L = nicotinic or i-nicotinic acid) on anxiety and memory in rats. **Neurochem Res.** 2006 Dec; 31(12):1457-62.

VIVANCO, I., AND C. L. SAWYERS. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. **Nat Rev Cancer.** 2002; 2: 489-501.

VOGT PK. PI 3-kinase, mTOR, protein synthesis and cancer. **Trends Mol Med.** 2001 Nov; 7(11):482-4.

VOET D, VOET J. Molecular Physiology, Biochemical communications: hormones and neurotransmission. Em: Biochemistry. Voet D & Voet J (eds.). 1995; págs. 1261 – 1301.

WAINWRIGHT MS, GRUNDHOEFER D, SHARMA S, BLACK SM. A nitric oxide donor reduces brain injury and enhances recovery of cerebral blood flow after



- hypoxia-ischemia in the newborn rat. **Neurosci Lett.** 2007; 415:124–129.
- WALTON, M. R., AND I. DRAGUNOW. Is CREB a key to neuronal survival? **Trends Neurosci.** 2000 ; 23: 48-53.
- WALKER CL, LIU NK, XU XM. PTEN/PI3K and MAPK signaling in protection and pathology following CNS injuries. **Front Biol (Beijing).** 2013 Aug 1;8(4). doi: 10.1007/s11515-013-1255-1. PMID: 24348522
- WANG JY, SHEN J, GAO Q, YE ZG, YANG SY, LIANG HW, BRUCE IC, LUO BY, XIA Q. Ischemic postconditioning protects against global cerebral ischemia/reperfusion-induced injury in rats. **Stroke.** 2008 Mar;39(3):983-90. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.499079.
- WANG Q, TANG XN, YENARI MA. The inflammatory response in stroke. **J Neuroimmunol.** 2007; 184:53–68.
- WANG Z1, CHEN X, ZHOU L, WU D, CHE X, YANG G. Effects of extracellular signal-regulated kinase (ERK) on focal cerebral ischemia. **Chin Med J (Engl).** 2003 Oct; 116(10):1497-503.
- WEN J, WATANABE K, MA M, YAMAGUCHI K, TACHIKAWA H, KODAMA M, AIZAWA Y. Edaravone inhibits JNK-c-Jun pathway and restores anti-oxidative defense after ischemia-reperfusion injury in aged rats. **Biol Pharm Bull.** 2006 Apr; 29(4):713-8.
- WEI XE,ZHANG FY,WANG K,ZHANG QX,RONG LQ. Assembly of the FKBP51-PHLPP2-AKT signaling complex in cerebral ischemia/reperfusion injury in rats *Brain Res.* 2014 May 30;1566:60-8. doi: 10.1016/j.brainres.2014.04.009.
- WEINBERG SH. Membrane capacitive memory alters spiking in neurons described by the fractional-order hodgkin-huxley model. **PLoS One.** 2015 May 13;10(5):e0126629. doi: 10.1371/journal.pone.0126629.
- WIERASZKOA A, CLARKEB MJ, LANGB DR, LOPES LGF, FRANCO DW. The influence of NO-containing ruthenium complexes on mouse hippocampal evoked potentials in vitro. *Life Sci.* 2001; 68:1535–1544.
- WILLMOT MR, BATH PM. The potential of nitric oxide therapeutics in stroke. **Expert Opin Investig Drugs.** 2003; 12:455–470.
- WILLMOT M, GIBSON C, GRAY L, MURPHY S, BATH P. Nitric oxide synthase inhibitors in experimental ischemic stroke and their effects on infarct size and cerebral blood flow: a systematic review. **Free Radic Biol Med.** 2005; 39:412–425.
- WINK DA, DARBYSHIRE JF, NIMS RW, SAAVEDRA JE, FORD PC. Reactions of the bioregulatory agent nitric oxide in oxygenated aqueous media:

determination of the kinetics for oxidation and nitrosation by intermediates generated in the NO/O<sub>2</sub> reaction. **Chem Res Toxicol.** 1993; 6: 23-27.

WINK DA, GRISHAM MB, MITCHELL JB, FORD PC. Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology. **Methods Enzymol.** 1996; 268: 12-31.

WON CK, HA SJ, NOH HS, KANG SS, CHO GJ, CHOI WS, KOH PO. Estradiol prevents the injury-induced decrease of Akt activation and Bad phosphorylation. **Neurosci Lett.** 2005 Oct 21; 387(2):115-9.

WON CK, JI HH, KOH PO. Estradiol prevents the focal cerebral ischemic injury-induced decrease of forkhead transcription factors phosphorylation. **Neurosci Lett.** 2006 May 1;398(1-2):39-43.

WONG CH, CRACK PJ. Modulation of neuro-inflammation and vascular response by oxidative stress following cerebral ischemia-reperfusion injury. **Curr Med Chem.** 2008; 15(1):1-14.

WU X, LI L, ZHANG L, WU J, ZHOU Y, ZHOU Y, ZHAO Y, ZHAO J. Inhibition of thioredoxin-1 with siRNA exacerbates apoptosis by activating the ASK1-JNK/p38 pathway in brain of a stroke model rats. **Brain Res.** 2015 Mar 2;1599:20-31. doi: 10.1016/j.brainres.2014.12.033.PMID: 25541364

XIA Z, DICKENS M, RAINGEAUD J, DAVIS RJ, GREENBERG ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. **Science.** 1995 Nov 24; 270(5240):1326-31.

XIE, Y.; CHEN, WU, S. Y.; MURPHY, T. H. Prolonged Deficits in Parvalbumin Neuron Stimulation-Evoked Network Activity Despite Recovery of Dendritic Structure and Excitability in the Somatosensory Cortex following Global Ischemia in Mice. **The Journal of Neuroscience**, 5 November 2014, 34(45):14890-14900; doi: 10.1523/JNEUROSCI.1775-14.2014.

XIONG, L., Y. ZHENG, M. WU, L. HOU, Z. ZHU et al. Preconditioning with isoflurane produces dose-dependent neuroprotection via activation of adenosine triphosphate-regulated potassium channels after focal cerebral ischemia in rats. **Anesth Analg.** 2003; 96: 233-237, table of contents.

XU L, LI Y, FU Q, MA S. Perillaldehyde attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury-triggered overexpression of inflammatory cytokines via modulating Akt/JNK pathway in the rat brain cortex. **Biochem Biophys Res Commun.** 2014 Nov 7;454(1):65-70. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.10.025. PMID: 25445600

ZHAO Y, LI J, TANG Q, ZHANG P, JING L, CHEN C, LI S. influences hippocampal neuronal survival in a rat model of diabetic cerebral ischemia. **Neural Regen Res.** 2014 Apr 1;9(7):749-56. doi: 10.4103/1673-5374.131581.

ZHAO L, CHEN X, DAI Q, ZHANG L, YU P, GAO Y, WU L, DUAN M, XU J. Role

of FOXO3a in process of hydrogen-rich saline attenuating global cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**. 2015 Feb 10;95(6):457-61. PMID: 25916785

ZHANG C, ZHANG Z, ZHAO Q, WANG X, JI H, ZHANG Y. (S)-ZJM-289 preconditioning induces a late phase protection against nervous injury induced by transient cerebral ischemia and oxygen-glucose deprivation. **Neurotox Res**. 2014 Jul;26(1):16-31. doi: 10.1007/s12640-013-9444-x.

ZHANG D, DHILLON HS, MATTSON MP, YUREK DM, PRASAD RM. Immunohistochemical detection of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal after experimental brain injury in the rat. **Neurosci Lett**. 1999; 272:57-61.

ZHANG L, ZHAO H, ZHANG X, CHEN L, ZHAO X, BAI X, ZHANG J. Nobiletin protects against cerebral ischemia via activating the p-Akt, p-CREB, BDNF and Bcl-2 pathway and ameliorating BBB permeability in rat. **Brain Res Bull**. 2013 Jul; 96:45-53. doi: 10.1016/j.brainresbull.2013.04.009.

ZHANG QG1, WANG RM, HAN D, YANG LC, LI J, BRANN DW. Preconditioning neuroprotection in global cerebral ischemia involves NMDA receptor-mediated ERK-JNK3 crosstalk. **Neurosci Res**. 2009 Mar; 63(3):205-12.

ZHANG R, ZHANG L, ZHANG Z, WANG Y, LU M, LAPOINTE M, CHOPP M. A nitric oxide donor induces neurogenesis and reduces functional deficits after stroke in rats. **Ann Neurol**. 2001; 50:602-611.

ZHANG X, ZHANG X, WANG C, LI Y, DONG L, CUI L, WANG L, LIU Z, QIAO H, ZHU C, XING Y, CAO X, JI Y, ZHAO K. Neuroprotection of early and short-time applying berberine in the acute phase of cerebral ischemia: up-regulated pAkt, pGSK and pCREB, down-regulated NF- $\kappa$ B expression, ameliorated BBB permeability. **Brain Res**. 2012 Jun 12; 1459:61-70. doi: 10.1016/j.brainres.2012.03.065.

ZHANG Z, PENG D, ZHU H, WANG X. Experimental evidence of Ginkgo biloba extract EGB as a neuroprotective agent in ischemia stroke rats. **Brain Res Bull**. 2012 Feb 10;87(2-3):193-8. doi: 10.1016/j.brainresbull.2011.11.002.

ZHENG WX, WANG F, CAO XL, PAN HY, LIU XY, HU XM, SUN YY. Baicalin protects PC-12 cells from oxidative stress induced by hydrogen peroxide via anti-apoptotic effects. **Brain Inj**. 2014;28(2):227-34. doi: 10.3109/02699052.2013.860469.

ZHOU Y, WANG D, GAO X, LEW K, RICHARDS AM, WANG P. mTORC2 phosphorylation of Akt1: a possible mechanism for hydrogen sulfide-induced cardioprotection. **PLoS One**. 2014 Jun 20;9(6):e99665. doi: 10.1371/journal.pone.0099665. eCollection 2014.

ZHAO Y, XIAO M, HE W, CAI Z. Minocycline upregulates cyclic AMP response element binding protein and brain-derived neurotrophic factor in the hippocampus of cerebral ischemia rats and improves behavioral deficits. **Neuropsychiatr Dis Treat.** 2015 Feb 26;11:507-16. doi: 10.2147/NDT.S73836. eCollection 2015. PMID: 25750531

ZHAO H, WANG R, TAO Z, GAO L, YAN F, GAO Z, LIU X, JI X, LUO Y. Ischemic postconditioning relieves cerebral ischemia and reperfusion injury through activating T-LAK cell-originated protein kinase/protein kinase B pathway in rats. **Stroke.** 2014 Aug;45(8):2417-24. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.006135. PMID: 25013016

ZHOU Y1, WU H, LI S, CHEN Q, CHENG XW, ZHENG J, TAKEMORI H, XIONG ZQ. Requirement of TORC1 for late-phase long-term potentiation in the hippocampus. **PLoS One.** 2006 Dec 20;1:e16.

ZIGMOND MS, B. F., LANDIS SC, ROBERTS JL AND SQUIRE LR (Editor). Intracellular signaling. San Diego: Academic Press. 1999.

ZIMMERMANN, C.; WINNEFELD, K.; STRECK, S.; ROSKOS, M.; HABERL, R. L. Antioxidant status in Acute Stroke Patients and Patients at stroke Risk. **European Neurology**2004; v. 51, p. 157-61.

ZOLA-MORGAN, S.; SQUIRE, L.R.; REMPEL, N.L.; CLOWER, R.P.; AMARAL, D.G. Enduring memory impairment in monkeys after ischemic damage to the hippocampus. **J. Neurosci.** 1992; v. 12, n. 7, p. 2582-2596.

YAN XB, HOU HL, WU LM, LIU J, ZHOU JN. Lithium regulates hippocampal neurogenesis by ERK pathway and facilitates recovery of spatial learning and memory in rats after transient global cerebral ischemia. **Neuropharmacology.** 2007 Sep; 53(4):487-95.

YAN Y1, BLACK CP, CAO PT, HAFERBIER JL, KOLB RH, SPIEKER RS, RISTOW AM, COWAN KH. Gamma-irradiation-induced DNA damage checkpoint activation involves feedback regulation between extracellular signal-regulated kinase 1/2 and BRCA1. **Cancer Res.** 2008 Jul 1; 68(13):5113-21. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5818.

YANG, J., Y. YU AND P. J. DUERKSEN-HUGHES. Protein kinases and their involvement in the cellular responses to genotoxic stress. **Mutat Res.** 2003; 543: 31-58.

YANO, S., M. MORIOKA, K. FUKUNAGA, T. KAWANO, T. HARA et al. Activation of Akt/protein kinase B contributes to induction of ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus. **J Cereb Blood Flow Metab.** 2001; 21: 351-360.

YANG DD, KUAN CY, WHITMARSH AJ, RINCÓN M, ZHENG TS, DAVIS RJ,

RAKIC P, FLAVELL RA. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene *Nature*. 1997 Oct 23;389(6653):865-70.

YASUDA N, ISHII T, OYAMA D, FUKUTA T, AGATO Y, SATO A, SHIMIZU K, ASAI T, ASAKAWA T, KAN T, YAMADA S, OHIZUMI Y, OKU N. Neuroprotective effect of nobiletin on cerebral ischemia-reperfusion injury in transient middle cerebral artery-occluded rats. **Brain Res**. 2014 Apr 22;1559:46-54. doi: 10.1016/j.brainres.2014.02.007.

YOSHIDA, S.; ABE, K.; BUSTO, R.; WATSON, D. B.; KOGURE, B. D.; GINSBERG, M. D. Influence of transient ischemic in lipid soluble antioxidants, free fatty acids and energy metabolites in rat brain. **Brain Res**. 1982; v. 245, p. 307-426,.

YOSHIDA WB. Fisiopatologia da isquemia e reperfusão. In: MAFFEI FHA. Doenças vasculares periféricas. Rio de Janeiro: MEDSI. 2002; p.243-8.

YOU, L., L. LI, Q. XU, J. REN AND F. ZHANG. Postconditioning reduces infarct size and cardiac myocyte apoptosis via the opioid receptor and JAK-STAT signaling pathway. **Mol Biol Rep**. 2011; 38: 437-443.