

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Efeito neuroprotetor do resveratrol pela via da PI3-k em um modelo animal  
de isquemia cerebral global**

Aline Matté

Porto Alegre, 29 de novembro de 2010.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Efeito neuroprotetor do resveratrol pela via da PI3-k em um modelo animal  
de isquemia cerebral global**

**Aline Matté**

Trabalho de Conclusão da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

Orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Christianne Gazzana Salbego

Co-orientador MsC. Fabrício Simão

Porto Alegre, 29 de novembro de 2010.

**“Aprender é a única coisa  
de que a mente  
nunca se cansa,  
nunca tem medo e  
nunca se arrepende”**

**Leonardo da Vinci**

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Chris Salbego pela oportunidade da orientação, dedicação, amizade, paciência e pelo exemplo de ética e competência.

À professora Vera M. T. Trindade pelo incentivo.

À família do laboratório 23: Daniéli, Rudimar, Juliana, Ana Paula, Mariana, Thaline, André, Gabriela, Patrícia, Elisa, Juliana S. e Graziela pela ajuda, risadas e conversas que tornaram meus dias muito mais agradáveis.

Em especial ao “meu doutorando” Fabrício, com quem iniciei na pesquisa científica, por todos os ensinamentos, dicas, ajuda, amizade, “puxões de orelha” e risadas.

A todos os colegas, professores e funcionários do Departamento de Bioquímica, especialmente aos funcionários da área administrativa, portaria e do ratário e ao Sr. Valdemar.

A todos meus amigos, de perto ou de longe, pela compreensão e apoio.

A minha família e ao Henrique por todo apoio, força e incentivo.

A minha querida irmã Cris, pela atenção, carinho, paciência e ajuda.

À UFRGS, pelo ensino público e de qualidade, e a FAPERGS pela bolsa concedida.

## **APRESENTAÇÃO**

Os resultados obtidos com este trabalho, ainda que parciais, estão apresentados sob a forma de artigo científico. Este contém os seguintes tópicos: Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências e será submetido à Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, quando da finalização experimental, estando de acordo com suas normas (anexadas no final do trabalho). Os experimentos foram realizados no laboratório de Neuroproteção e Sinalização Celular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## ÍNDICE

1. ARTIGO CIENTÍFICO.....	VIII
2. ANEXO.....	29

## **1. ARTIGO CIENTÍFICO**

### **Efeito neuroprotetor do resveratrol pela via da PI3-k em um modelo animal de isquemia cerebral global**

Artigo a ser submetido para publicação na Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.

**Efeito neuroprotetor do resveratrol pela via da PI3-k em um modelo animal  
de isquemia cerebral global**

Aline Matté<sup>1,a</sup>, Fabrício Simão<sup>1,b</sup>, Carlos Alexandre Netto<sup>1,c</sup> e Christianne Gazzana  
Salbego<sup>1,d\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS,  
Rua Ramiro Barcelos 2600, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>a</sup> Acadêmica da Faculdade de Farmácia – UFRGS.

<sup>b</sup> Aluno de Doutorado no PPGCB – Bioquímica – UFRGS.

<sup>c</sup> Professor Associado do Departamento de Bioquímica – UFRGS.

<sup>d</sup> Professora Associada do Departamento de Bioquímica – UFRGS.

---

\* Autor Correspondente:

Christianne Gazzana Salbego (salbego@terra.com.br)

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
UFRGS, Rua Ramiro Barcelos 2600 – Anexo I, 90035-003, Porto Alegre,  
RS, Brasil.

Fone: +55 (51) 3308.5547

Fax: +55 (51) 3308.5535

## RESUMO

A isquemia cerebral resulta de uma diminuição ou bloqueio do fluxo sanguíneo para o cérebro levando a alterações patofisiológicas, que incluem a morte celular em regiões específicas do cérebro. O resveratrol é um polifenol derivado de plantas, que possui propriedades antioxidante, anti-inflamatória, cardio e neuroprotetora. Demonstramos anteriormente que o resveratrol apresenta efeito neuroprotetor sobre o dano isquêmico induzido em culturas organotípicas de hipocampo de ratos, atuando através da ativação da via de sinalização da PI3-k. Neste trabalho avaliamos o efeito do resveratrol sobre o dano induzido pela isquemia cerebral global em hipocampo de ratos adultos. Também foi investigado o envolvimento da via de sobrevivência celular da PI3-k neste efeito. Nossos resultados mostram que o resveratrol previne a morte neuronal tardia, promovida pela isquemia/reperfusão, através de um mecanismo associado à via da PI3-k, aumentando a fosforilação/ativação da Akt e do CREB.

Palavras-Chave: Neuroproteção, Isquemia cerebral, Resveratrol, PI3-k, Akt, CREB.

# **Neuroprotective effect of resveratrol by PI3-k pathway in an animal model of global cerebral ischemia**

## **ABSTRACT**

Cerebral ischemia results from a reduction or blockage of blood flow to the brain leading to pathophysiologic changes, including cell death in specific brain regions. Resveratrol is a polyphenol derived from plants that has antioxidant properties, anti-inflammatory, cardio and neuroprotective roles. Previously we show that resveratrol has a neuroprotective effect on damage ischemic-induced in organotypic cultures of rat hippocampus, acting through the activation of the PI3-k signaling pathway. In this study, we evaluated the effect of resveratrol on the damage induced by global cerebral ischemia in the hippocampus of adult rats. We also investigated the involvement of PI3-k pathway on resveratrol effect. Our results showed that resveratrol prevents delayed neuronal death, caused by ischemia/reperfusion through a mechanism associated with PI3-k pathway, increasing the phosphorylation/activation of Akt and CREB in hippocampus of rats.

**Keywords:** Neuroprotection, Cerebral ischemia, Resveratrol, PI3-k, Akt, CREB.

## INTRODUÇÃO

A isquemia cerebral é conhecida clinicamente como acidente vascular encefálico (AVE) e popularmente como derrame, sendo a segunda causa de morte e importante causa de morbidade em todo o mundo. Estatísticas dos EUA mostram que cerca de 795 mil norte-americanos sofrem um AVC por ano, destes mais de 137 mil vão a óbito (Donnan et al., 2008; American Stroke Association, 2010). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, as doenças cerebrovasculares foram a principal causa de morte em 2005, com mais de 90 mil óbitos registrados (Ministério da Saúde, 2008). Apesar da gravidade desta patologia, não há tratamento aprovado atualmente que possa reduzir a incidência e/ou as sequelas neurológicas resultantes da isquemia (Parnham e Sies, 2000).

A isquemia cerebral resulta de uma diminuição ou bloqueio do fluxo sanguíneo para o cérebro levando a alterações patofisiológicas (Dirnagl et al., 1999; Lipton, 1999). No sistema nervoso central (SNC), algumas áreas são seletivamente atingidas, mesmo após um breve período de isquemia cerebral global (ICG). Este fenômeno é conhecido como vulnerabilidade seletiva, sendo que as regiões mais vulneráveis são o córtex e a região CA1 do hipocampo. Outra característica da lesão isquêmica é a morte neuronal tardia, em que a morte celular é observada apenas depois de 3-7 dias do episódio isquêmico (Pulsinelli et al., 1982; Hsu et al., 1994; Bartus et al., 1998; Kirino, 2000).

O resveratrol (RSV; 3,5,4'- triidroxiestilbeno) é um polifenol encontrado em muitas espécies de plantas, tais como uvas, amendoins e frutas vermelhas (Baur e Sinclair, 2006). Encontram-se na natureza os isômeros *cis* e *trans*-resveratrol, sendo a forma *trans* a principal responsável pela atividade biológica (Fremont,

2000; Soleas et al., 1997; Dore, 2005). Uma das propriedades mais conhecidas do RSV é sua capacidade antioxidante (Belguendouz et al., 1997; Tadolini et al., 2000; Jang e Surh, 2001; De Salvia et al., 2002; Losa, 2003; Li et al., 2010) atuando também via redução da lipoperoxidação (Frankel et al., 1993). Além disso, estudos da literatura têm demonstrado seu papel anti-inflamatório, cardioprotetor, neuroprotetor e antitumoral (Soleas et al., 1997; Sinha et al., 2002; Das et al., 2005a; Baur e Sinclair, 2006). Estudo prévio do nosso grupo de pesquisa mostrou que o RSV tem efeito neuroprotetor tanto em modelo *in vitro* de privação de oxigênio e glicose (Zamin et al., 2006) quanto no modelo *in vivo* de ICG, sendo que neste último demonstramos o efeito desse polifenol prevenindo o estresse oxidativo e as alterações na atividade da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase induzido pela lesão isquêmica (Simão et al., In press).

Um número crescente de estudos sugere que o RSV possa exercer um papel regulatório em funções importantes do SNC, especialmente sob condições patológicas (Dore, 2005). O efeito neuroprotetor tem sido descrito em diversos modelos experimentais, tanto *in vitro* (Zamin et al., 2006; Gong et al., 2007; Zhang et al., 2008) como *in vivo* de isquemia cerebral focal (Huang et al., 2001; Tsai et al., 2007) ou global (Sinha et al., 2002; Della-Morte et al., 2009). Wang e colaboradores (2002) mostraram que o RSV diminuiu a morte neuronal tardia, reduzindo a astrogliose reativa e a ativação da microglia em gerbilos. Além disso, o RSV protegeu do dano isquêmico diversos tecidos, tais como coração, intestino, fígado e medula espinhal (Hung et al., 2000; Kiziltepe et al., 2004; Gedik et al., 2008; Hassan-Khabbar et al., 2009; Ozkan et al., 2009).

A via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-k) parece estar envolvida no mecanismo de sinalização responsável pela promoção da sobrevivência celular

mediada pelo RSV (Das et al., 2005a). A PI3-k está relacionada com o tráfego intracelular, a proliferação, sobrevivência e motilidade celular. Evidências indicam o envolvimento da via da PI3-k como sinal antiapoptótico em neurônios. A proteína quinase B (PKB) ou Akt faz parte da cascata de sinalização mediada pela PI3-k, sendo ativada por esta, e é conhecida por sua função na sobrevivência celular (Ahmed et al., 1997; Dudek et al., 1997; Kauffmann-Zeh et al., 1997; Songyang et al., 1997; Yuan e Yankner, 2000). A ativação da Akt é promovida pela fosforilação dos resíduos treonina308 e serina473 (Coffer et al., 1998; Datta et al., 1999). A Akt atua sobre diversas proteínas, incluindo reguladores apoptóticos e fatores de transcrição. Um dos alvos caracterizados dessa quinase é o elemento de resposta de ligação ao AMPc (CREB), que parece estar envolvido no estímulo de vias de sobrevivência celular (Datta et al., 1997; Dudek et al., 1997; Yuan e Yankner, 2000). A fosforilação do CREB pela Akt e seu envolvimento na morte celular não está elucidada, embora evidências indiquem que o CREB regule a expressão de genes críticos para a sobrevivência, tais como o gene que codifica o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (Shieh et al., 1998; Tao et al., 1998). Além destas ações, o CREB possui papel central em diversas funções bioquímicas, incluindo desenvolvimento e regeneração neuronal, plasticidade sináptica e memória (Ahn et al., 1999; Impey et al., 1999; Sato-Bigbee et al., 1999; Schulz et al., 1999).

No presente estudo analisamos o efeito do tratamento com RSV sobre o dano celular induzido pela isquemia cerebral em ratos. Para isto utilizamos o modelo de ICG, e também investigamos o mecanismo de neuroproteção exercido pelo RSV, analisando a ativação da via da PI3-k e consequente fosforilação da Akt e do CREB.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **1. Animais**

Utilizamos ratos Wistar machos adultos, pesando entre 290 e 330g, provindos do biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Durante o período de realização do estudo os animais permaneceram em sala experimental desse biotério, submetidos a um ciclo de 12 horas claro/escuro, temperatura constante ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e receberam água e ração *ad libitum*. Todos os animais foram tratados de acordo com as orientações da Federação das Sociedades Brasileiras de Biologia Experimental e o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS.

### **2. Protocolos experimentais de administração de resveratrol e LY294002**

Os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos: a) Sham + veículo: animais operados sem oclusão das carótidas tratados durante 7 dias com veículo (etanol 50%); b) Sham + RSV: animais operados sem oclusão das carótidas tratados durante 7 dias com RSV; c) ICG + veículo: animais operados com oclusão das carótidas tratados durante 7 dias com veículo (etanol 50%); d) ICG + LY: animais operados com oclusão das carótidas que foram submetidos a administração de LY intracerebroventricular (icv) 20 minutos antes do procedimento isquêmico; e) ICG + RSV: animais operados com oclusão das carótidas tratados durante 7 dias com RSV; f) ICG + RSV + LY: animais operados

com oclusão das carótidas tratados durante 7 dias com RSV e 20 minutos antes do procedimento isquêmico com LY icv.

O RSV (cortesia da Pharmascience, Montreal, Canadá) foi preparado no momento do uso (Sinha et al., 2002). Foi administrada a dose de 30 mg/Kg, via intraperitoneal (ip.), diariamente durante 7 dias antes da isquemia, sendo que o volume não excedeu 0,1 mL/100 g de peso corporal. Os ratos tratados com veículo receberam 0,1 mL de etanol 50% v/v 100 g por 7 dias e foram submetidos a isquemia cerebral global.

LY294002 (10  $\mu$ M dissolvido em DMSO, Cell Signaling Technology), um inibidor específico da via PI3-k foi injetado nos dois ventrículos (a partir do bregma: ântero-posterior, 0,8 mm; lateral, 1,5 mm e profundidade de 3,5 mm) de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1998) 20 minutos antes da isquemia.

### **3. Isquemia cerebral global**

Os ratos foram submetidos à isquemia cerebral global transitória induzida pelo método de oclusão dos quatro - vasos descrito por Pulsinelli e colaboradores (1982) com algumas modificações (Netto et al., 1993). Resumidamente, os ratos foram anestesiados com 1,5% de halotano (Cristália, São Paulo) em 70% de óxido nitroso e 30% de oxigênio através de máscara facial, durante o procedimento cirúrgico. As artérias vertebrais foram permanentemente eletrocauterizadas através do forame alar da primeira vértebra cervical e as artérias carótidas comuns foram expostas, cuidadosamente separadas do nervo vago, e isoladas. Após vinte e quatro horas, realizou-se a isquemia cerebral global transitória através da oclusão bilateral das artérias carótidas comuns utilizando clips para aneurisma por 10 min. A reperfusão começou quando os clips foram

removidos e então as artérias foram inspecionadas visualmente para assegurar o adequado refluxo. A temperatura retal foi monitorada e mantida a  $37 \pm 0,5$  ° C, e controlada com almofada de aquecimento. Os animais que não perderam o reflexo, que não apresentaram a dilatação da pupila ou que convulsionaram durante o episódio isquêmico não foram utilizados nos experimentos. O grupo Sham foi submetido ao mesmo procedimento, exceto que as artérias carótidas não foram ocluídas.

#### **4. Histologia**

A perda neuronal foi avaliada através da análise histológica de secções do hipocampo dorsal após 7 dias da isquemia/reperfusão. Os animais foram anestesiados com pentobarbital (50 mg/Kg, ip.) e perfundidos intracardiacamente com solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4). Após a perfusão, os encéfalos foram removidos da caixa craniana, imersos em fixador (paraformaldeído 4% a 4 °C durante 18 horas) e a seguir em solução de sacarose 30% (4 °C durante 48 h). As secções coronais de 20 µm foram cortadas ao nível do hipocampo dorsal (3,3 – 4,0 mm posterior ao bregma) em criostato (Leica Microsystems, Alemanha), os cortes foram colocados em lâminas e corados com violeta de cresila. O número de neurônios sobreviventes da camada piramidal de CA1 foi contado em ambos os hemisférios em 250 µm de comprimento, em quatro fatias por animal. Foi utilizado microscópio óptico com ampliação de 400x. A contagem de células dos hemisférios esquerdo e direito em cada uma das quatro secções foi calculada para fornecer um único valor (número de neurônios por 250 µm de comprimento) para cada animal.

## 5. Frações celulares e Western Blotting

Os ratos foram sacrificados 1, 4 e 24 h após a isquemia/reperfusão (I/R), os hipocampus foram retirados e homogeneizados em tampão (10 mM HEPES, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0,5 mM DDT, 17 µg/ml PMSF, inibidor de protease (5 µl coquetel de inibidores de proteases/1 ml tampão de lise). Ao homogeneizado foi adicionado 0,5 % IGEPAL, foi então agitado vigorosamente e centrifugado a 4 °C e 13.000 x g por 5 min. O sobrenadante corresponde a fração citosólica e o sedimento foi utilizado para separar a fração nuclear. O sedimento foi então ressuspenso em tampão de lise (20 mM HEPES, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 mM NaCl, 0,25 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 25% Glicerol, inibidor de protease (5 µl coquetel de inibidores de proteases/1 ml tampão de lise), incubado por 20 min. no gelo sob agitação e centrifugado a 4 °C e 13.000 x g por 20 min. O sobrenadante corresponde a fração nuclear e o sedimento foi descartado. Uma alíquota de cada amostra das frações citosólicas e nuclear foram utilizadas para dosagem de proteínas (Peterson, 1979). Após a retirada da alíquota adicionou-se solução B (Glicerol 100%, TRIS 500 mM e azul de bromofenol) com 5% de β-mercaptoetanol, agitou-se e as amostras foram congeladas. As proteínas foram separadas por eletroforese SDS-PAGE 12%. Após a eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando um aparelho de transferência semisseco (Bio-Rad, Trans-Blot SD, Hercules, CA, USA). As membranas foram incubadas por 60 min a 4°C com solução de bloqueio (Tampão Tris contendo 5% de leite em pó desnatado e 0,1% de Tween-20, pH 7,4) seguido pela incubação durante 18 horas a 4°C com os anticorpos primários para as proteínas de interesse (anti-phospho Akt (p-Akt Ser473), 1:1000; anti-Akt total 1:1000; anti-phospho CREB (p-CREB Ser133) 1:1000 e CREB total 1:1000;

Cell signaling Technology), preparados em solução de bloqueio. Após a incubação com os anticorpos primários as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários antirabbit conjugados à peroxidase (1:1000, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) durante 2h a 4°C. A quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) foi detectada utilizando filmes de raio-X (Kodak Medical X – Ray Film). Os filmes foram escaneados e a intensidade das bandas analisada pelo programa Optiquant (Packard Instrument). Para cada experimento o grupo teste foi comparado com o grupo Sham o qual foi considerado como 100% para assegurar a mesma intensidade de sinal para todos os grupos. Os resultados foram expressos com percentagem de proteína fosforilada obtida através da relação entre o imunoconteúdo da proteína fosforilada versus imunoconteúdo da proteína total.

## **6. Análise estatística**

Os dados obtidos nestes experimentos foram analisados estatisticamente pela Análise da Variância de uma via (ANOVA), seguidos pelo Teste de Tukey. Os dados foram expressos como média±desvio padrão. A diferença entre as médias foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

**1. O resveratrol protege os neurônios da região CA1 do hipocampo contra a lesão isquêmica induzida pela isquemia cerebral global em ratos: mecanismo envolvendo a via da PI3-k**

A figura 1 mostra o efeito da ICG e do RSV sobre o número e aspecto morfológico de neurônios na região CA1 de hipocampo de ratos. Para determinar se o RSV protege os neurônios de CA1 contra a lesão induzida pela isquemia através da via da PI3-k, foram realizados experimentos utilizando LY294002, um inibidor específico desta via (Vlahos et al., 1994). As microfotografias da região CA1 do hipocampo coradas com violeta de cresila para cada grupo são mostradas na figura 1A e a análise quantitativa do número de neurônios sobreviventes está representada na figura 1B. A avaliação histológica demonstra que os neurônios piramidais da região de CA1 do hipocampo dos ratos Sham tratados com veículo são claros, de tamanho médio e com estrutura normal (Fig. 1A). As amostras provenientes de ratos isquêmicos tratados com veículo ou que receberam o inibidor da PI3-k, LY294002, apresentaram neurônios piramidais com retração, coloração escura bem como perda significativa de neurônios (Figs. 1A e 1B). Essas alterações celulares estão diminuídas em animais tratados com RSV, onde se observa menor perda neuronal e alterações morfológicas moderadas (Figs. 1A e 1B). Nas seções histológicas provenientes de ratos tratados com resveratrol e que receberam o inibidor da PI3-k, LY294002, houve uma diminuição da neuroproteção induzida pelo RSV (Figs. 1A e 1B).

## **2. A via de sinalização da Akt está envolvida na neuroproteção mediada pelo resveratrol**

Considerando que a utilização do inibidor da PI3-k, o LY294002, diminuiu a neuroproteção induzida pelo RSV, investigamos se esse estilbeno teve efeito sobre fosforilação da Akt, a qual pode ser mediada pela PI3-k. Analisamos a fosforilação da Akt nos tempos 1, 4 e 24 h após a I/R em hipocampo de ratos.

Como está mostrado nas figuras 2A e 2B, 1 h após a isquemia houve um aumento da fosforilação da Akt em ratos tratados com veículo. Esse efeito foi potencializado pelo RSV 1 e 4 horas após a indução da ICG. Vinte e quatro horas pós a I/R a fosforilação da Akt retornou ao nível basal. Nenhuma alteração no nível total de Akt foi observada (Western Blotting representativo na Fig. 2A). O LY294002 reduziu significativamente a fosforilação da Akt no hipocampo 1 h após a I/R e nos ratos tratados com RSV e submetidos a ICG (Fig. 2C e 2D). Esses resultados sugerem que a Akt pode estar envolvida na neuroproteção mediada pelo RSV em ratos submetidos à ICG.

### **3. O resveratrol aumenta a fosforilação do CREB após a isquemia/reperfusão**

A ativação da via da PI3-k/Akt e a consequente fosforilação do CREB podem inibir a morte celular (Yuan e Yankner, 2000). Para investigar o envolvimento do CREB na neuroproteção mediada pelo RSV, examinamos o nível de fosforilação do CREB em hipocampo de ratos, nos tempos de 1, 4 e 24 h após a I/R. Como pode ser visto nas figuras 3A e 3B, observamos que 1 h após a isquemia houve um aumento da fosforilação do CREB em ratos tratados apenas com veículo. Nos animais tratados com RSV este aumento pode ser observado 1 e 4 h após a isquemia. Após 24 h da I/R, a fosforilação da CREB foi semelhante a observada no grupo Sham. Nenhuma alteração no nível total da CREB foi observada (Western Blotting representativo na Fig. 3A). Para verificar se o mecanismo de fosforilação do CREB na isquemia é semelhante ao da Akt, também utilizamos o LY294002. Como mostrado nas figuras 3C e 3D, o inibidor reduziu significativamente o aumento da fosforilação do CREB observada no

hipocampo após 1h da I/R, tanto no grupo que recebeu RSV quanto no que foi submetido à ICG. Esses resultados reforçam o fato de que a via da PI3-k é necessária para o efeito neuroprotetor do RSV, sugerindo que a fosforilação de Akt e CREB é mediada pela via da PI3-k.

## **DISCUSSÃO**

O metabolismo energético normal no cérebro tem algumas características especiais, que incluem uma taxa metabólica alta, estoques de energia limitados e uma alta dependência do metabolismo aeróbico de glicose. Por essa razão, ele é mais vulnerável a uma diminuição nas concentrações de oxigênio e glicose do que os outros tecidos. Além disso, o cérebro possui uma capacidade limitada de reparo a determinados danos, fazendo com que mudanças mínimas na disponibilização de oxigênio e de glicose a ele possam provocar danos irreversíveis (Lipton, 1999). O insulto isquêmico leva a morte neuronal tardia nesse local, que ocorre entre 3 e 7 dias do início da I/R (Pulsinelli et al., 1982; Schreiber e Baudry, 1995).

A vulnerabilidade seletiva e o atraso no início da degeneração das células da região CA1 sugerem a presença de alguns neurônios ainda viáveis que podem estar isquemicamente comprometidos, mas ainda deixam uma janela de oportunidade para intervenção farmacológica alguns dias depois da isquemia (Pulsinelli et al., 1982; Kirino, 2000).

Neste trabalho, nossa hipótese foi que o RSV protege o cérebro da morte induzida pela ICG através da ativação da via da PI3-k, a qual está envolvida com a sobrevivência neuronal (Pettmann e Henderson, 1998). Estudos indicam que

um dos processos de morte ativados pela I/R é a apoptose (MacManus et al., 1993; Nitatori et al., 1995). Os resultados obtidos mostraram alterações nos neurônios piramidais de CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 10 min. de ICG. O pré-tratamento com RSV preveniu parcialmente a morte neuronal observada 7 dias após a I/R. Nos animais que receberam RSV e LY294002 evidenciamos uma grande morte dos neurônios na região de CA1, mostrando desta forma que o efeito neuroprotetor do RSV foi bloqueado por esse inibidor da via da PI3-k, sugerindo que essa via está envolvida na morte neuronal induzida pela ICG e na neuroproteção mediada pelo RSV.

Nossos resultados corroboram os demonstrados por Wang e colaboradores (2002) que mostraram que o RSV diminuiu a morte neuronal tardia na região de CA1 hipocampal após a ICG em gerbilos, e os descritos por Huang e colaboradores (2001) que sugerem que esse estilbeno atua como potente neuroprotetor em isquemia focal em ratos. Por outro lado, Das e colaboradores (2005a), demonstraram a cardioproteção do RSV em ratos submetidos à isquemia cardíaca, inferindo que esse estilbeno diminuiu o número de cardiomiócitos apoptóticos e aumentou a fosforilação da Akt, e o uso do LY294002 bloqueou o efeito cardioprotetor do RSV.

Nós propomos que o RSV pode exercer o efeito neuroprotetor através da ativação da via PI3-k, uma vez que nos animais que receberam LY294002 houve menor efeito neuroprotetor. Para comprovar esta hipótese, analisamos o efeito desse polifenol sobre a fosforilação da Akt, principal efetora da via PI3-k (Franke et al., 1997). Nossos resultados mostraram que após 1 e 4 h da I/R houve aumento da fosforilação/ativação da Akt nos animais tratados com RSV voltando aos níveis do grupo Sham após 24 h. A administração de LY294002 promoveu

uma diminuição significativa desta fosforilação. Nossos dados estão de acordo com outros trabalhos encontrados na literatura, os quais mostram que após um dano isquêmico há ativação da Akt, o que pode estar associado à ativação da via da PI3-k para promover a sobrevivência celular ( Namura et al., 2000; Friguls et al., 2001; Kawano et al., 2002).

Zamin e colaboradores (2006) demonstraram que o RSV aumentou a fosforilação da Akt, e o uso de LY294002 preveniu este aumento em um modelo de isquemia em cultura organotípica. Janelidze e colaboradores (2001) mostraram que a isquemia focal em ratos aumentou a fosforilação da Akt 1 e 4 h após a isquemia seguida de uma diminuição significativa após 24 h. A maioria dos trabalhos que investigaram o envolvimento da proteína Akt na lesão isquêmica observaram alteração na fosforilação da Akt em diferentes tempos após a lesão. O que parece ser consenso é que essa fosforilação volta aos níveis basais após 24 horas de reperfusão (Horn et al., 2005).

A ativação da PI3-k desencadeia uma cascata de sinalização na qual é ativada a Akt. A Akt atua sobre várias proteínas, incluindo reguladores apoptóticos e fatores de transcrição, promovendo a sobrevivência celular. A fosforilação da proteína CREB e a ativação do fator de transcrição nuclear- $\kappa$ B, promovidas pela Akt, podem estimular vias de sobrevivência celular (Datta et al., 1997; Dudek et al., 1997; Du e Montminy, 1998; Yuan e Yankner, 2000). Nossos resultados mostraram que após 1 e 4 h da I/R houve aumento da fosforilação/ativação do CREB nos ratos tratados com RSV e a fosforilação dessa proteína voltou aos níveis de controle após 24 h. A administração de LY294002, previamente à ICG, bloqueia a fosforilação de CREB em ratos pré-tratados com RSV, sugerindo que o mecanismo de fosforilação da proteína CREB e Akt sejam dependentes da via da

PI3-k. Nesse contexto, Walton e colaboradores (1999) relataram que o estresse hipóxico-isquêmico transitório aumentou a fosforilação do CREB em neurônios da região de CA1 e sugeriram que a fosforilação do CREB é importante no processo de neuroproteção contra a lesão cerebral hipóxico-isquêmica. Em concordância, diversos estudos mostraram o aumento da fosforilação da CREB após a isquemia cerebral (Hu et al., 1999; Tanaka et al., 1999a; Tanaka et al., 1999b; Zhang et al., 2009). Das e colaboradores (2005b) mostraram que o RSV induziu a fosforilação do CREB e da Akt, e que o LY-294002 bloqueou parcialmente a capacidade cardioprotetora do RSV. É possível identificar que nossos resultados estão de acordo com os descritos na literatura.

Em conclusão, nossos dados mostram que o insulto isquêmico induziu morte celular em hipocampo de ratos. O RSV preveniu parcialmente a morte celular, enquanto a associação com o inibidor da via da PI3-k diminuiu esse efeito. Também mostramos que a ICG promove o aumento na fosforilação da Akt e do CREB, efeito que é potencializado pelo pré-tratamento com RSV, o que possivelmente está correlacionado com a prevenção da morte celular induzida pelo RSV. A administração do inibidor da via da PI3-k diminuiu a fosforilação dessas proteínas, sugerindo que o RSV atue através dessa via de sinalização. Nossos resultados permitem sugerir que o RSV induz neuroproteção no modelo de ICG através da ativação da via da PI3-k, que possui papel antiapoptótico, promovendo a sobrevivência neuronal observada em hipocampo de ratos.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, N.N., GRIMES, H.L., BELLACOSA, A., CHAN, T.O., TSICHLIS, P.N. Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.94, n.8 p.3627-32, 1997.
- AHN, S., GINTY, D.D., LINDEN, D.J. A late phase of cerebellar long-term depression requires activation of CaMKIV and CREB. *Neuron*, v.23, n.3 p.559-68, 1999.
- American Stroke Association. **Impact of stroke**. Disponível em: [http://www.strokeassociation.org/STROKEORG/AboutStroke/Impact-of-Stroke\\_UCM\\_310728\\_Article.jsp](http://www.strokeassociation.org/STROKEORG/AboutStroke/Impact-of-Stroke_UCM_310728_Article.jsp). Acesso em: 09 de novembro de 2010.
- BARTUS, R.T., DEAN, R.L., MENNERICK, S., EVELETH, D., LYNCH, G. Temporal ordering of pathogenic events following transient global ischemia. *Brain Res*, v.790, n.1-2 p.1-13, 1998.
- BAUR, J.A., SINCLAIR, D.A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov*, v.5, n.6 p.493-506, 2006.
- BELGUENDOZ, L., FREMONT, L., LINARD, A. Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. *Biochem Pharmacol*, v.53, n.9 p.1347-55, 1997.
- COFFER, P.J., JIN, J., WOODGETT, J.R. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J*, v.335 ( Pt 1), p.1-13, 1998.
- DAS, S., CORDIS, G.A., MAULIK, N., DAS, D.K. Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of CREB-dependent Bcl-2 signaling via adenosine A3 receptor activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v.288, n.1 p.H328-35, 2005a.
- DAS, S., TOSAKI, A., BAGCHI, D., MAULIK, N., DAS, D.K. Resveratrol-mediated activation of cAMP response element-binding protein through adenosine A3 receptor by Akt-dependent and -independent pathways. *J Pharmacol Exp Ther*, v.314, n.2 p.762-9, 2005b.
- DATTA, S.R., BRUNET, A., GREENBERG, M.E. Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev*, v.13, n.22 p.2905-27, 1999.
- DATTA, S.R., DUDEK, H., TAO, X., MASTERS, S., FU, H., GOTOH, Y., GREENBERG, M.E. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, v.91, n.2 p.231-41, 1997.
- DE SALVIA, R., FESTA, F., RICORDY, R., PERTICONE, P., COZZI, R. Resveratrol affects in a different way primary versus fixed DNA damage induced by H(2)O(2) in mammalian cells in vitro. *Toxicol Lett*, v.135, n.1-2 p.1-9, 2002.
- DELLA-MORTE, D., DAVE, K.R., DEFAZIO, R.A., BAO, Y.C., RAVAL, A.P., PEREZ-PINZON, M.A. Resveratrol pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via a sirtuin 1-uncoupling protein 2 pathway. *Neuroscience*, v.159, n.3 p.993-1002, 2009.
- DIRNAGL, U., IADECOLA, C., MOSKOWITZ, M.A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, v.22, n.9 p.391-7, 1999.
- DONNAN, G.A., FISHER, M., MACLEOD, M., DAVIS, S.M. Stroke. *Lancet*, v.371, n.9624 p.1612-23, 2008.

- DORE, S. Unique properties of polyphenol stilbenes in the brain: more than direct antioxidant actions; gene/protein regulatory activity. *Neurosignals*, v.14, n.1-2 p.61-70, 2005.
- DU, K., MONTMINY, M. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem*, v.273, n.49 p.32377-9, 1998.
- DUDEK, H., DATTA, S.R., FRANKE, T.F., BIRNBAUM, M.J., YAO, R., COOPER, G.M., SEGAL, R.A., KAPLAN, D.R., GREENBERG, M.E. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*, v.275, n.5300 p.661-5, 1997.
- FRANKE, T.F., KAPLAN, D.R., CANTLEY, L.C. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*, v.88, n.4 p.435-7, 1997.
- FRANKEL, E.N., WATERHOUSE, A.L., KINSELLA, J.E. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet*, v.341, n.8852 p.1103-4, 1993.
- FREMONT, L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci*, v.66, n.8 p.663-73, 2000.
- FRIGULS, B., JUSTICIA, C., PALLAS, M., PLANAS, A.M. Focal cerebral ischemia causes two temporal waves of Akt activation. *Neuroreport*, v.12, n.15 p.3381-4, 2001.
- GEDIK, E., GIRGIN, S., OZTURK, H., OBAY, B.D., BUYUKBAYRAM, H. Resveratrol attenuates oxidative stress and histological alterations induced by liver ischemia/reperfusion in rats. *World J Gastroenterol*, v.14, n.46 p.7101-6, 2008.
- GONG, Q.H., WANG, Q., SHI, J.S., HUANG, X.N., LIU, Q., MA, H. Inhibition of caspases and intracellular free Ca<sup>2+</sup> concentrations are involved in resveratrol protection against apoptosis in rat primary neuron cultures. *Acta Pharmacol Sin*, v.28, n.11 p.1724-30, 2007.
- HASSAN-KHABBAR, S., VAMY, M., COTTART, C.H., WENDUM, D., VIBERT, F., SAVOURET, J.F., THEROND, P., CLOT, J.P., WALIGORA, A.J., NIVET-ANTOINE, V. Protective effect of post-ischemic treatment with trans-resveratrol on cytokine production and neutrophil recruitment by rat liver. *Biochimie*, v.92, n.4 p.405-10, 2009.
- HORN, A.P., GERHARDT, D., GEYER, A.B., VALENTIM, L., CIMAROSTI, H., TAVARES, A., HORN, F., LENZ, G., SALBEGO, C. Cellular death in hippocampus in response to PI3K pathway inhibition and oxygen and glucose deprivation. *Neurochem Res*, v.30, n.3 p.355-61, 2005.
- HSU, M., SIK, A., GALLYAS, F., HORVATH, Z., BUZSAKI, G. Short-term and long-term changes in the postischemic hippocampus. *Ann N Y Acad Sci*, v.743, p.121-39; discussion 139-40, 1994.
- HU, B.R., FUX, C.M., MARTONE, M.E., ZIVIN, J.A., ELLISMAN, M.H. Persistent phosphorylation of cyclic AMP responsive element-binding protein and activating transcription factor-2 transcription factors following transient cerebral ischemia in rat brain. *Neuroscience*, v.89, n.2 p.437-52, 1999.
- HUANG, S.S., TSAI, M.C., CHIH, C.L., HUNG, L.M., TSAI, S.K. Resveratrol reduction of infarct size in Long-Evans rats subjected to focal cerebral ischemia. *Life Sci*, v.69, n.9 p.1057-65, 2001.
- HUNG, L.M., CHEN, J.K., HUANG, S.S., LEE, R.S., SU, M.J. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovasc Res*, v.47, n.3 p.549-55, 2000.
- IMPEY, S., OBRIETAN, K., STORM, D.R. Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. *Neuron*, v.23, n.1 p.11-4, 1999.

- JANELIDZE, S., HU, B.R., SIESJO, P., SIESJO, B.K. Alterations of Akt1 (PKB $\alpha$ ) and p70(S6K) in transient focal ischemia. *Neurobiol Dis*, v.8, n.1 p.147-54, 2001.
- JANG, J.H., SURH, Y.J. Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Mutat Res*, v.496, n.1-2 p.181-90, 2001.
- KAUFFMANN-ZEH, A., RODRIGUEZ-VICIANA, P., ULRICH, E., GILBERT, C., COFFER, P., DOWNWARD, J., EVAN, G. Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature*, v.385, n.6616 p.544-8, 1997.
- KAWANO, T., MORIOKA, M., YANO, S., HAMADA, J., USHIO, Y., MIYAMOTO, E., FUKUNAGA, K. Decreased akt activity is associated with activation of forkhead transcription factor after transient forebrain ischemia in gerbil hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab*, v.22, n.8 p.926-34, 2002.
- KIRINO, T. Delayed neuronal death. *Neuropathology*, v.20 Suppl, p.S95-7, 2000.
- KIZILTEPE, U., TURAN, N.N., HAN, U., ULUS, A.T., AKAR, F. Resveratrol, a red wine polyphenol, protects spinal cord from ischemia-reperfusion injury. *J Vasc Surg*, v.40, n.1 p.138-45, 2004.
- LI, H., YAN, Z., ZHU, J., YANG, J., HE, J. Neuroprotective effects of resveratrol on ischemic injury mediated by improving brain energy metabolism and alleviating oxidative stress in rats. *Neuropharmacology*, 2010.
- LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*, v.79, n.4 p.1431-568, 1999.
- LOSA, G.A. Resveratrol modulates apoptosis and oxidation in human blood mononuclear cells. *Eur J Clin Invest*, v.33, n.9 p.818-23, 2003.
- MACMANUS, J.P., BUCHAN, A.M., HILL, I.E., RASQUINHA, I., PRESTON, E. Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain. *Neurosci Lett*, v.164, n.1-2 p.89-92, 1993.
- Ministério da Saúde Brasil (2008). **Saúde Brasil 2007 - Uma análise da situação da Saúde: Perfil da Mortalidade do Brasileiro**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/coletiva.saude.061008.pdf>. Acesso em: 09 de novembro de 2010.
- NAMURA, S., NAGATA, I., KIKUCHI, H., ANDREUCCI, M., ALESSANDRINI, A. Serine-threonine protein kinase Akt does not mediate ischemic tolerance after global ischemia in the gerbil. *J Cereb Blood Flow Metab*, v.20, n.9 p.1301-5, 2000.
- NETTO, C.A., HODGES, H., SINDEN, J.D., LEPEILLET, E., KERSHAW, T., SOWINSKI, P., MELDRUM, B.S., GRAY, J.A. Foetal grafts from hippocampal regio superior alleviate ischaemic-induced behavioural deficits. *Behav Brain Res*, v.58, n.1-2 p.107-12, 1993.
- 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*, v.15, n.2 p.1001-11, 1995.
- OZKAN, O.V., YUZBASIOGLU, M.F., CIRALIK, H., KURUTAS, E.B., YONDEN, Z., AYDIN, M., BULBULOGLU, E., SEMERCI, E., GOKSU, M., ATLI, Y. and others. Resveratrol, a natural antioxidant, attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Tohoku J Exp Med*, v.218, n.3 p.251-8, 2009.

- PARNHAM, M., SIES, H. Ebselen: prospective therapy for cerebral ischaemia. *Expert Opin Investig Drugs*, v.9, n.3 p.607-19, 2000.
- PAXINOS, G., WATSON, C. 1998. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego: Academic Press.
- PETERSON, G.L. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem*, v.100, n.2 p.201-20, 1979.
- PETTMANN, B., HENDERSON, C.E. Neuronal cell death. *Neuron*, v.20, n.4 p.633-47, 1998.
- PULSINELLI, W.A., BRIERLEY, J.B., PLUM, F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol*, v.11, n.5 p.491-8, 1982.
- SATO-BIGBEE, C., PAL, S., CHU, A.K. Different neuroligands and signal transduction pathways stimulate CREB phosphorylation at specific developmental stages along oligodendrocyte differentiation. *J Neurochem*, v.72, n.1 p.139-47, 1999.
- SCHMIDT-KASTNER, R., FREUND, T.F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience*, v.40, n.3 p.599-636, 1991.
- SCHREIBER, S.S., BAUDRY, M. Selective neuronal vulnerability in the hippocampus--a role for gene expression? *Trends Neurosci*, v.18, n.10 p.446-51, 1995.
- SCHULZ, S., SIEMER, H., KRUG, M., HOLLT, V. Direct evidence for biphasic cAMP responsive element-binding protein phosphorylation during long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vivo. *J Neurosci*, v.19, n.13 p.5683-92, 1999.
- SHIEH, P.B., HU, S.C., BOBB, K., TIMMUSK, T., GHOSH, A. Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron*, v.20, n.4 p.727-40, 1998.
- SIMÃO, F., MATTÉ, A., MATTÉ, C., SOARES, F.M.S., WYSE, A.T.S., NETTO, C.A., SALBEGO, C.G. Resveratrol prevents oxidative stress and inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in induced by transient global cerebral ischemia in rats. *J Nutr Biochem*, In press.
- SINHA, K., CHAUDHARY, G., GUPTA, Y.K. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life Sci*, v.71, n.6 p.655-65, 2002.
- SOLEAS, G.J., DIAMANDIS, E.P., GOLDBERG, D.M. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal*, v.11, n.5 p.287-313, 1997.
- SONGYANG, Z., BALTIMORE, D., CANTLEY, L.C., KAPLAN, D.R., FRANKE, T.F. Interleukin 3-dependent survival by the Akt protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.94, n.21 p.11345-50, 1997.
- TADOLINI, B., JULIANO, C., PIU, L., FRANCONI, F., CABRINI, L. Resveratrol inhibition of lipid peroxidation. *Free Radic Res*, v.33, n.1 p.105-14, 2000.
- 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*, v.818, n.2 p.520-6, 1999a.
- TANAKA, K., NOGAWA, S., NAGATA, E., SUZUKI, S., DEMBO, T., KOSAKAI, A., FUKUUCHI, Y. Temporal profile of CREB phosphorylation after focal ischemia in rat brain. *Neuroreport*, v.10, n.11 p.2245-50, 1999b.

- TAO, X., FINKBEINER, S., ARNOLD, D.B., SHAYWITZ, A.J., GREENBERG, M.E. Ca<sup>2+</sup> influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron*, v.20, n.4 p.709-26, 1998.
- TSAI, S.K., HUNG, L.M., FU, Y.T., CHENG, H., NIEN, M.W., LIU, H.Y., ZHANG, F.B., HUANG, S.S. Resveratrol neuroprotective effects during focal cerebral ischemia injury via nitric oxide mechanism in rats. *J Vasc Surg*, v.46, n.2 p.346-53, 2007.
- VLAHOS, C.J., MATTER, W.F., HUI, K.Y., BROWN, R.F. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem*, v.269, n.7 p.5241-8, 1994.
- WALTON, M., CONNOR, B., LAWLOR, P., YOUNG, D., SIRIMANNE, E., GLUCKMAN, P., COLE, G., DRAGUNOW, M. Neuronal death and survival in two models of hypoxic-ischemic brain damage. *Brain Res Brain Res Rev*, v.29, n.2-3 p.137-68, 1999.
- WANG, Q., XU, J., ROTTINGHAUS, G.E., SIMONYI, A., LUBAHN, D., SUN, G.Y., SUN, A.Y. Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. *Brain Res*, v.958, n.2 p.439-47, 2002.
- YUAN, J., YANKNER, B.A. Apoptosis in the nervous system. *Nature*, v.407, n.6805 p.802-9, 2000.
- ZAMIN, L.L., DILLENBURG-PILLA, P., ARGENTA-COMIRAN, R., HORN, A.P., SIMAO, F., NASSIF, M., GERHARDT, D., FROZZA, R.L., SALBEGO, C. Protective effect of resveratrol against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: Involvement of PI3-K pathway. *Neurobiol Dis*, v.24, n.1 p.170-82, 2006.
- ZHANG, H., SCHOOLS, G.P., LEI, T., WANG, W., KIMELBERG, H.K., ZHOU, M. Resveratrol attenuates early pyramidal neuron excitability impairment and death in acute rat hippocampal slices caused by oxygen-glucose deprivation. *Exp Neurol*, v.212, n.1 p.44-52, 2008.
- ZHANG, Z.H., XI, G.M., LI, W.C., LING, H.Y., QU, P., FANG, X.B. Cyclic-AMP response element binding protein and tau are involved in the neuroprotective mechanisms of nerve growth factor during focal cerebral ischemia/reperfusion in rats. *J Clin Neurosci*, v.17, n.3 p.353-6, 2009.

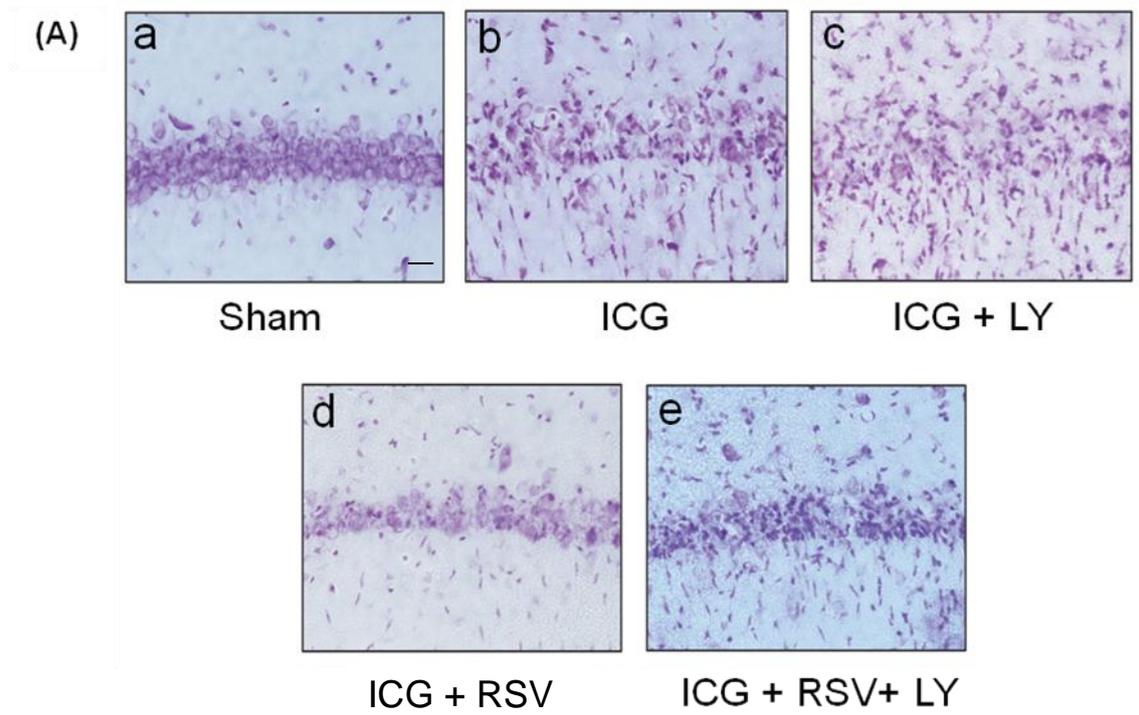
## LEGENDAS

**Fig. 1.** Efeito do RSV sobre o aspecto morfológico e o número de neurônios na região CA1 do hipocampo após 7 dias da ICG em ratos. (A) Fotos representativas de células coradas com violeta de cresila na região de CA1 hipocampal. (a) Sham tratado com veículo. (b) Isquêmico tratado com veículo. (c) Isquêmico tratado com LY294002. (d) Isquêmico tratado com RSV. (e) Isquêmico tratado com RSV e LY294002. (B) Sobrevivência neuronal na região de CA1 hipocampal. Os resultados estão representados como média  $\pm$  DP (n=6 cada). O teste estatístico utilizado foi ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. \*\*p<0,01 comparado com o grupo sham tratado com veículo. \*p<0,05 comparado com o grupo ICG tratado com veículo. #p<0,05 comparado com o grupo ICG tratado com RSV. Aumento = 400X, escala da barra 50  $\mu$ m.

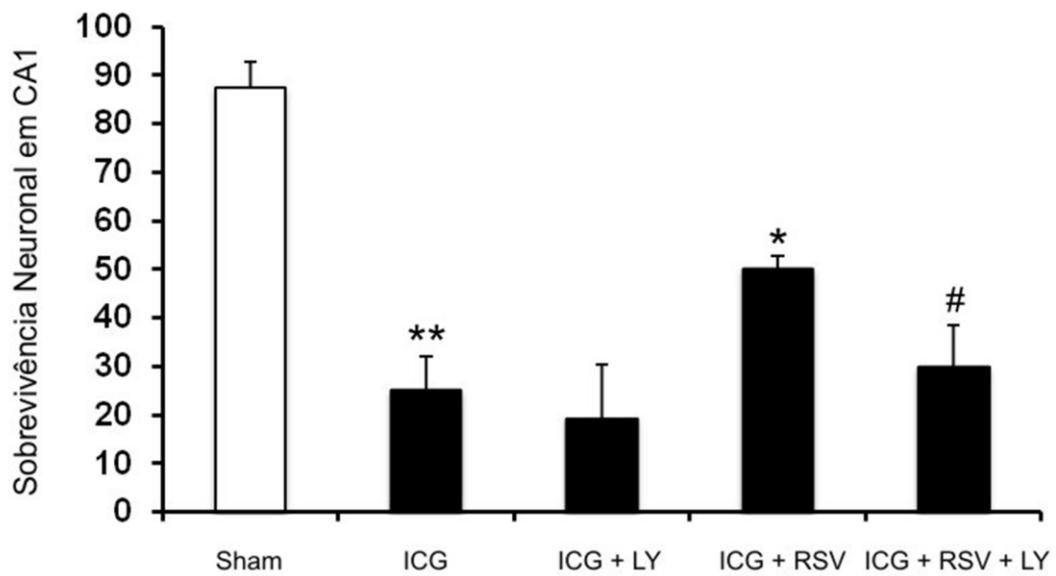
**Fig. 2.** Efeito do tratamento com RSV e LY294002 na porcentagem de fosforilação da Akt em hipocampo de ratos submetidos à ICG. (A) Western Blottings representativos da p-Akt e Akt 1, 4 e 24 h após a ICG. (B) Análise da relação p-Akt e Akt 1, 4 e 24 h após a ICG. Os resultados estão representados como média  $\pm$  DP (n=5 cada). O teste estatístico utilizado foi ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. \*p<0,05 comparado com o grupo ICG tratado com veículo correspondente ao mesmo tempo. #p<0,05 comparado com o grupo Sham tratado com veículo. (C) Western Blottings representativos da p-Akt e Akt 1 h após a ICG. (D) Análise da relação p-Akt e Akt 1 h após a ICG. Os resultados estão representados como média  $\pm$  DP (n=5 cada). O teste estatístico utilizado foi ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. \*p<0,05 comparado com o grupo ICG tratado com veículo. #p<0,05 comparado com o grupo ICG tratado com RSV. \*\*p<0,01 comparado com o grupo sham tratado com veículo.

**Fig. 3.** Efeito do tratamento com RSV e LY294002 na porcentagem de fosforilação da CREB em hipocampo de ratos submetidos à ICG. (A) Western Blottings representativos da p-CREB e CREB 1, 4 e 24 h após a ICG. (B) Análise da relação p-CREB e CREB 1, 4 e 24 h após a ICG. Os resultados estão representados como média  $\pm$  DP (n=5 cada). O teste estatístico utilizado foi ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. \*p<0,05 comparado com o grupo ICG tratado com veículo correspondente ao mesmo tempo. #p<0,05 comparado com o grupo Sham tratado com veículo. (C) Western Blottings representativos da p-CREB e CREB 1 h após a ICG. (D) Análise da relação p-CREB e CREB 1 h após a ICG. Os resultados estão representados como média  $\pm$  DP (n=5 cada). O teste estatístico utilizado foi ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. \*p<0,05 comparado com o grupo ICG tratado com veículo. #p<0,05 comparado com o grupo ICG tratado com RSV. \*\*p<0,01 comparado com o grupo sham tratado com veículo.

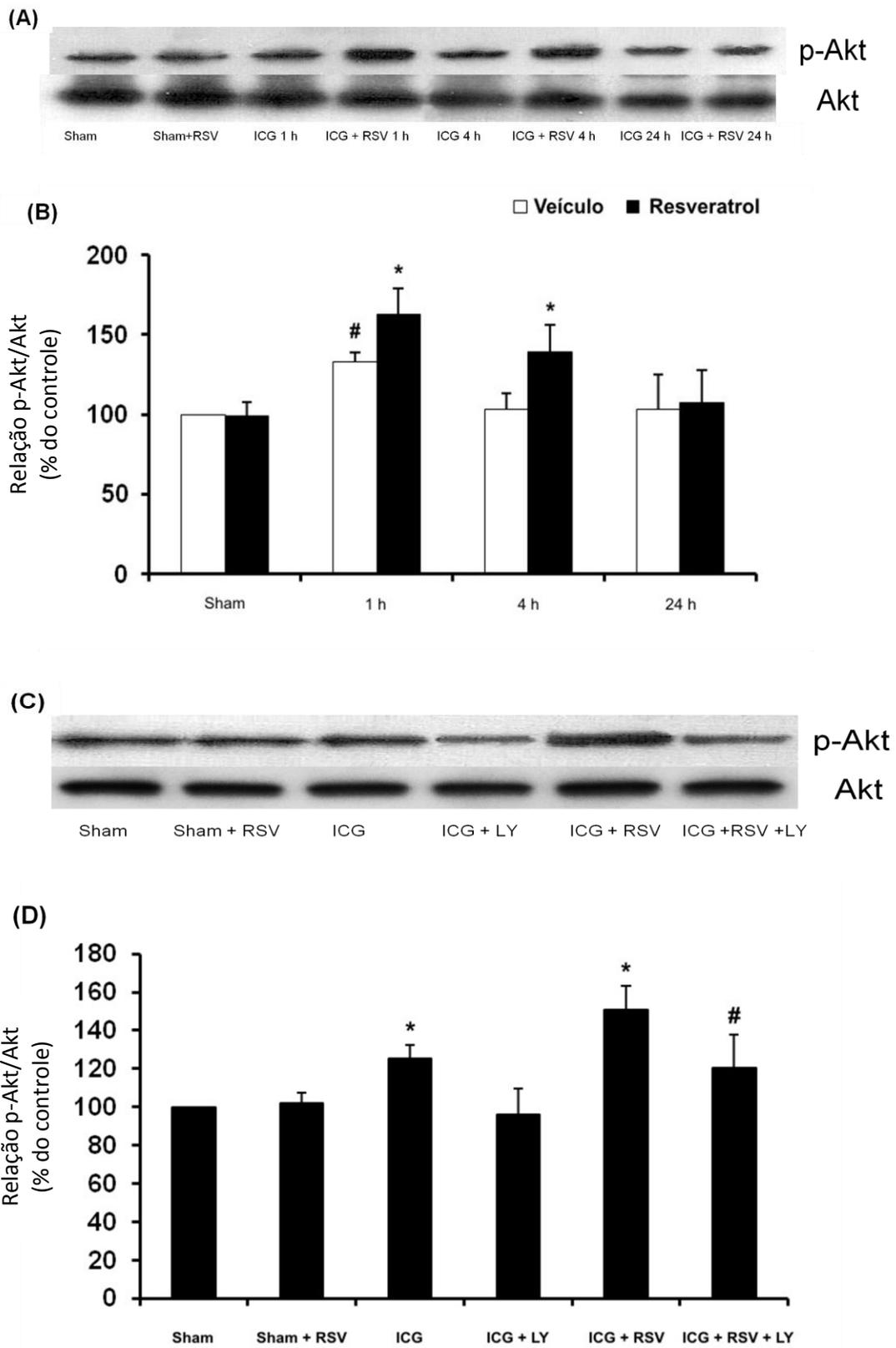
**FIGURA 1**



(B)

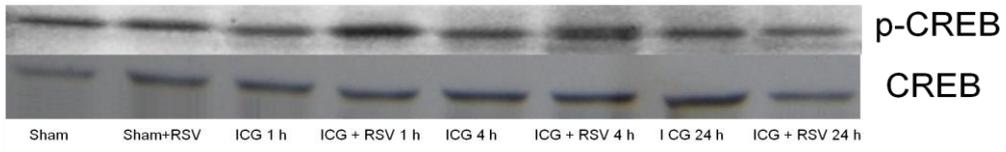


**FIGURA 2**

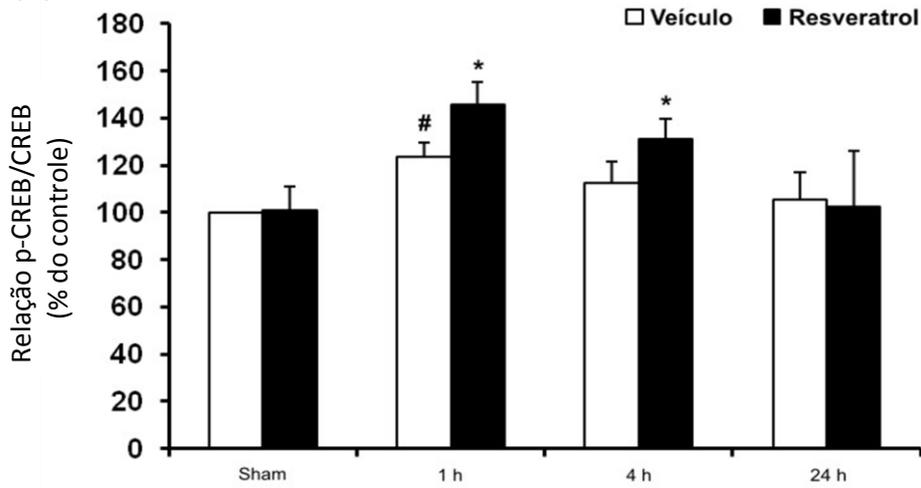


**FIGURA 3**

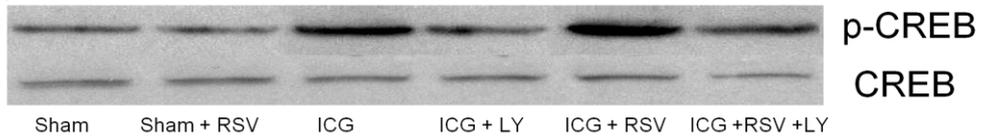
**(A)**



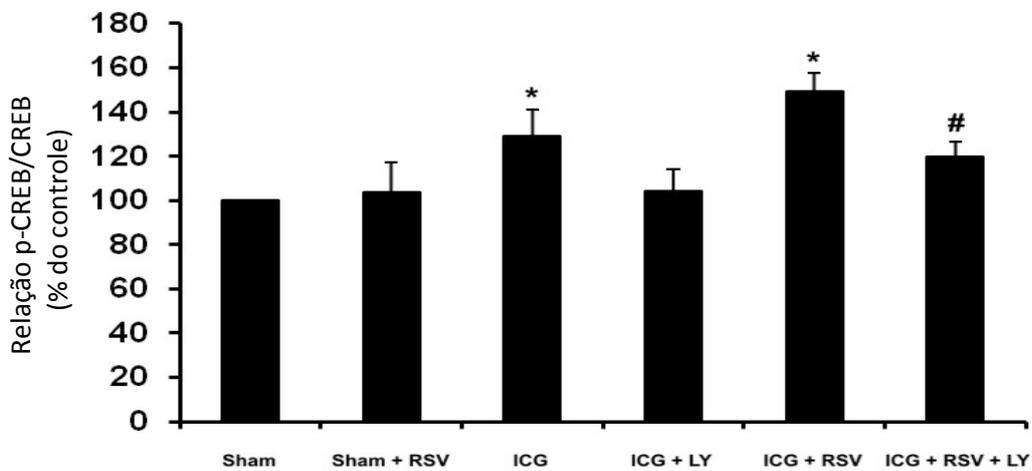
**(B)**



**(C)**



**(D)**



## 2. ANEXO

Regras para publicação na Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.

### ***Política Editorial***

A REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS/*Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* tem por finalidade publicar os seguintes tipos de publicação: **Artigos originais** relacionados com as áreas de conhecimento das Ciências Farmacêuticas; **Trabalhos de atualização ou de revisão**, que serão incluídos quando solicitados a especialistas pela Comissão de Publicações ou quando submetidos em forma de *Abstract* para avaliação quanto ao interesse. Ressalta-se a necessidade de se incluir visão crítica dos autores, inserindo os seus trabalhos no tema e avaliando-os em relação ao estado de arte no País; **Notas Prévias** relativas a novas metodologias e resultados parciais, cuja originalidade justifique a publicação rápida. Nesse caso, o limite é de 2.000 palavras, excluindo-se, tabelas, figuras e referências. Pode-se incluir, no máximo, uma figura, uma tabela e 10 referências podem ser incluídas; **Resenhas** elaboradas por especialistas segundo sugestão da Comissão de Publicações. **Suplementos temáticos** e aqueles relativos a eventos científicos podem ser publicados mediante aprovação prévia da Comissão de Publicações. Os trabalhos elaborados por especialistas nacionais e estrangeiros podem ser apresentados em língua portuguesa, inglesa ou espanhola. Devem ser originais e inéditos e destinar-se exclusivamente à REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS/ *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Os manuscritos submetidos à Revista que atenderem as “Instruções aos autores” são encaminhados ao Editor Científico, que indicará dois revisores especialistas no

tema abordado. Após a revisão, cujo caráter anônimo é mantido durante todo o processo, os manuscritos são enviados à Comissão de Publicação, que decidirá sobre a publicação e manuscritos recusados, passíveis de reformulação, poderão ser re-submetidos após reestruturação, como novo trabalho, iniciando outro processo de avaliação. Manuscritos condicionados à reestruturação serão reavaliados pelos revisores. Manuscritos enviados aos autores para revisão devem retornar à Editoria dentro de, no máximo, dois meses, caso contrário terão o processo encerrado. Todas as revisões dos manuscritos deverão ser acompanhadas de carta especificando as alterações efetuadas no documento original. Essas mudanças devem também ser indicadas diretamente no manuscrito. Manuscritos aceitos e publicados são de propriedade da Revista, ficando os direitos autorais a ela reservados. A declaração de responsabilidade e transferência dos direitos autorais será encaminhada juntamente com a prova final do artigo, devendo retornar no prazo estipulado.

## **PREPARAÇÃO DOS ORIGINAIS**

### **ESTRUTURA**

**Cabeçalho:** constituído por: *Título do trabalho*, que deve ser breve e indicativo da exata finalidade do trabalho; *Autor(es) por extenso*, indicando a(s) instituição(ões) a(s) qual(is) pertence(m) mediante números. O autor para correspondência deve ser identificado com asterisco, fornecendo o endereço completo, incluindo o eletrônico. Estas informações devem constar em notas de rodapé.

**Resumo** (em português): deve apresentar a condensação do conteúdo, expondo metodologia, resultados e conclusões, não excedendo 200 palavras.

Os membros da Comissão poderão auxiliar autores que não são fluentes em português.

**Unitermos:** devem representar o conteúdo do artigo, evitando-se os de natureza genérica. Observar o limite máximo de 6(seis) unitermos.

**Introdução:** deve estabelecer com clareza o objetivo do trabalho e sua relação com outros trabalhos no mesmo campo. Extensas revisões de literatura devem ser substituídas por referências aos trabalhos bibliográficos mais recentes, nos quais tais revisões tenham sido apresentadas.

**Material e Métodos:** a descrição dos métodos usados deve ser breve, porém suficientemente clara para possibilitar a perfeita compreensão e repetição do trabalho. Processos e Técnicas já publicados, a menos que tenham sido extensamente modificados, devem ser apenas referidos por citação. Estudos em humanos e em animais devem fazer referência à aprovação do Comitê de Ética correspondente.

**Resultados e Discussão:** deverão ser apresentados de forma concisa e em ordem lógica. Tabelas ou figuras, quando possível, devem substituir o texto, na apresentação dos dados. Sempre que pertinente, forneça as faixas, desvios padrão e indique as significâncias das diferenças entre os valores numéricos obtidos. A discussão deve se restringir ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados, procurando, sempre que possível, relacionar sua significância em relação a trabalhos anteriores da área. Especulações que não encontram justificativa para os dados obtidos devem ser evitadas. É facultativa a apresentação desses itens em separado.

**Conclusões:** Quando pertinentes, devem ser fundamentadas no texto.

**Resumo em inglês (ABSTRACT):** deve ser antecedido do título do artigo em inglês e acompanhar o conteúdo do resumo em português.

**Unitermos em inglês:** devem acompanhar os unitermos em português

**Agradecimentos:** devem constar de parágrafo à parte, antecedendo as referências bibliográficas, e ser compatíveis com as exigências de cortesia e divulgação.

**Referências bibliográficas:** devem ser organizadas de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT NBR-6023, ordenadas alfabeticamente no fim do artigo incluindo os nomes de todos os autores. **A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores.**

**Para consulta e exemplos, consultar o site [www.bcq.usp.br](http://www.bcq.usp.br)**

## **APRESENTAÇÃO DOS ORIGINAIS**

Os trabalhos devem ser apresentados em lauda padrão (de 30 a 36 linhas com espaço duplo) em três vias e disquete 3<sup>1/2</sup>" alta densidade, utilizando o programa Word for Windows, ou, preferencialmente, *on line*, na página <http://www.rbcf.br>. Os trabalhos devem ser acompanhados de ofício assinado pelos autores. A versão definitiva do trabalho aceito deverá ser enviada por via eletrônica (<http://www.rbcf.br>). Cópias impressas também serão aceitas.

## **INFORMAÇÕES ADICIONAIS**

**Citação bibliográfica:** As citações bibliográficas devem ser apresentadas no texto pelo(s) nome(s) do(s) autor(es), em letras maiúsculas, seguidas do ano de publicação. No caso de haver mais de três autores, citar o primeiro e

acrescentar a expressão *et al.* Caso haja mais de uma citação com mesmos autores e mesmo ano de publicação, diferencia-las com letras minúsculas junto ao ano.

**Ilustrações:** As ilustrações (gráficos, tabelas, fórmulas químicas, equações, mapas, figuras, fotografias, etc) devem ser incluídas no texto, o mais próximo possível das respectivas citações. Mapas, figuras e fotografias devem ser, também, apresentados em arquivos separados e *escaneadas* em alta resolução(800 dpi/bitmap para traços) com extensão tif. e/ou bmp. No caso de não ser possível a entrega do arquivo eletrônico das figuras, os originais devem ser enviados em papel vegetal ou impressora a laser. **Ilustrações coloridas somente serão publicadas mediante pagamento pelos autores.** As tabelas devem ser numeradas consecutivamente em algarismos romanos e as figuras em algarismos arábicos, seguidos do título. As palavras TABELA e FIGURA devem aparecer em maiúsculas apenas no título ou na legenda, respectivamente. Legendas e títulos devem acompanhá-las nos arquivos separados, assim como no texto.

**Nomenclatura:** pesos, medidas, nomes de plantas, animais e substâncias químicas devem estar de acordo com as regras internacionais de nomenclatura. A grafia dos nomes de fármacos deve seguir, no caso de artigos nacionais, as Denominações Comuns Brasileiras (DCB) em vigor, podendo ser mencionados uma vez (entre parênteses, com inicial maiúscula) os registrados.