

Expressão de ERK1/2 em cérebros de ratos submetidos à isquemia e reperfusão e tratados com extrato etanólico da casca de pequi (*Caryocar brasiliense*)

Ana Carolina Brigolin Parize, Marina Pacheco Miguel, Lílíana Borges de Menezes, Danilo Rezende e Silva, Eugênio Gonçalves de Araújo
Universidade Federal de Goiás, 74000-000, Brasil
karolparize@hotmail.com, earaujo@vet.ufg.br

PALAVRAS-CHAVE: imunistoquímica, MAPK, neuroproteção.

1 INTRODUÇÃO

As doenças vasculares cerebrais representam importante causa de mortalidade no Brasil, em média 49 óbitos em 100.000 habitantes, sendo ainda responsáveis por consideráveis índices de morbidade (BRASIL, 2005). Dentre estas, 85 a 90% ocorrem por mecanismo isquêmico, o que pode provocar graus variados de lesões no Sistema Nervoso Central (DIAS et al., 2000; MUNIZ et al., 2004).

Isquemia é a redução ou falta do suprimento sanguíneo arterial em determinado órgão ou estrutura, em que há comprometimento da oferta de substratos metabólicos e do funcionamento normal das células. A interrupção do fluxo sanguíneo, dependendo do tempo e da intensidade, ou ainda da natureza do órgão e da temperatura a que o tecido está submetido, poderá determinar os mais variados graus de lesão celular. Estas lesões são

¹ Orientado PIBIC – Escola de Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal de Goiás – Goiânia – Goiás – Brasil

² Professor Assistente I – Departamento de Biomedicina - Universidade Federal de Goiás – Jataí – Goiás - Brasil

³ Professor Adjunto I – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - Universidade Federal de Goiás – Goiânia – Goiás – Brasil

⁴ Orientado AT - Escola de Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal de Goiás – Goiânia – Goiás – Brasil

⁵ Orientador Professor Associado - Escola de Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal de Goiás – Goiânia – Goiás – Brasil

Revisado pelo orientador

decorrentes da depleção das reservas energéticas de ATP e glicose levando à acidose e ativação de proteases intracelulares (LIMA, 2008). Reperfusão é o restabelecimento do fluxo sanguíneo após o período de isquemia (PEREIRA, 2009). Embora o retorno do fluxo sanguíneo a um tecido isquêmico seja essencial para a prevenção de danos celulares irreversíveis, podem também surgir lesões decorrentes da própria reperfusão.

A isquemia e reperfusão cerebral desencadeiam a ativação de diferentes vias intracelulares, dentre elas a das proteínas quinase ativadas por mitógeno (*mitogen activated protein* – MAPK). Os três maiores subgrupos de MAPKs são: proteína quinases reguladas por sinal extracelular (ERK), quinase c-Jun-NH₂-terminal (JNK) e p-38 (LENNMYR et al., 2002). A ERK é ativada por fosforilação em resposta a fatores de crescimento, estresse oxidativo e influxo de cálcio intracelular (OTANI et al., 2002). A ativação desta proteína está relacionada à sobrevivência, proliferação e diferenciação de várias células (LENNMYR et al., 2002). No sistema nervoso central, há evidências que a ERK participa da sinalização de vias de sobrevivência (SUGAWARA et al., 2004).

O número de casos e a importância clínica dos acidentes cerebrais isquêmicos incentivaram a realização de pesquisas para descobertas de métodos preventivos e terapêuticos eficazes para redução da morbi-mortalidade desse quadro. Estudos realizados tanto em animais quanto em seres humanos demonstraram que agentes antioxidantes, como a vitamina E, possuem importante efeito neuroprotetor (BIANCHI & ANTUNES, 1999; TAGAMI et al., 1998; ZHANG et al., 2004). Nos últimos anos, foi comprovado que o pequi (*Caryocar brasiliense*), fruto do cerrado que possui grande importância na culinária regional, possui alta concentração de fenóis (KHOURI et al., 2007; ROESLER et al., 2007), antioxidantes vegetais que possuem propriedades benéficas por inibirem a lipoperoxidação, atuando contra a ação de radicais livres (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

Na literatura não existem informações sobre a ação neuroprotetora do extrato de diferentes partes de *Caryocar brasiliense* em lesões de isquemia e reperfusão. Assim, objetivou-se descrever a ação neuroprotetora do extrato etanólico da casca de pequi em cérebros de ratos submetidos à isquemia transitória global e reperfusão por meio da avaliação da expressão de fosfo-ERK1/2. O presente estudo demonstrou que a ação antioxidante dessas substâncias pode alterar a expressão de MAPKs em cérebros de ratos submetidos à isquemia e reperfusão.

2 OBJETIVOS

Verificar a expressão de ERK1/2 em cérebros de ratos submetidos a isquemia e reperusão e tratados com extrato etanólico da casca de pequi (*C. brasiliense*).

3 METODOLOGIA

3.1 Animais e dietas experimentais

Foram utilizados 100 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, fêmeas, com peso corpóreo entre 250-300g, obtidos e mantidos no Biotério Central de Criação da Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás. Os animais foram alojados em gaiolas para ratos em polipropileno (41x34x16cm), forradas com maravalha e aclimatados por período de 15 dias anteriores ao início do experimento. As gaiolas foram mantidas em ambiente com umidade e circulação de ar apropriada, evitando situações de estresse e risco sanitário. Água e ração balanceada apropriada para a espécie foram oferecidas *ad libitum* e a temperatura da sala de experimentação mantida em 22°C.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos de 20 animais, de acordo com o tipo e a dose de antioxidante suplementado, a saber:

- Grupo 1 (G1)(Controle) – Veículo oleoso;
- Grupo 2 (G2) – Suplementação de 100mg/kg/PV de extrato etanólico da casca de pequi (*C. brasiliense*) diluído em veículo oleoso;
- Grupo 3 (G3) – Suplementação de 300mg/kg/PV de extrato etanólico da casca de pequi (*C. brasiliense*) diluído em veículo oleoso;
- Grupo 4 (G4) - Suplementação de 600mg/kg/PV de extrato etanólico da casca de pequi (*C. brasiliense*) diluído em veículo oleoso;
- Grupo 5 (G5) (controle positivo) – Suplementação de 300mg/kg/PV de vitamina E (TAGAMI et al., 1998) diluído em veículo oleoso.

Cada grupo foi subdividido em quatro momentos (subgrupos) de cinco animais, de acordo com os tempos de isquemia de cinco minutos (I⁵), 20 minutos (I²⁰) e 45 minutos (I⁴⁵) e sem isquemia (I⁰). Nesse subgrupo, as artérias foram expostas, mas não ocluídas. Os

animais foram pesados para o cálculo da dose do suplemento. Este foi administrado por gavagem, diariamente, durante 30 dias consecutivos, antes da intervenção cirúrgica.

O extrato da casca de pequi foi obtido de acordo com a técnica descrita por LIMA (2008); PASSOS et al. (2002). As cascas de pequi foram secas em estufa com ventilação forçada (60°C) por 48 horas, trituradas em moinho analítico até atingirem uma baixa granulometria e armazenadas a -20°C. Posteriormente, fez-se percolação a frio em etanol ao abrigo da luz e sob agitação. Filtração do sobrenadante e evaporação do solvente à pressão reduzida conduziu ao extrato bruto etanólico, o qual foi liofilizado e armazenado a -20°C até mistura em veículo oleoso e administração aos animais.

3.2 Indução isquemia cerebral global

Após os 30 dias de tratamento, os animais foram submetidos à oclusão das artérias carótidas comuns, de acordo com MUNIZ et al. (2004). A anestesia foi feita com cetamina e xilazina por via intraperitoneal. O procedimento cirúrgico iniciou-se por cervicotomia mediana longitudinal anterior e reparo bilateral das artérias carótidas comuns. Os animais foram submetidos a tempos de isquemias de 0, 5, 20 e 45 minutos em cada grupo, de acordo com o regime alimentar e o tipo de antioxidante suplementado. Após 2 horas dos tempos de isquemia, foi realizada a eutanásia dos animais e o hemisfério cerebral esquerdo foi retirado e fixado em formol tamponado à 10% por 24 horas e, posteriormente, conservados em etanol 70° para análise histológica.

3.3 Procedimento de análise imunoistoquímica

As amostras foram clivadas em sentido sagital e passaram por desidratação em concentrações crescentes de etanol, diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina e, então, cortes de 5µm de espessura foram aderidos a lâminas sinalizadas para realização de imunoistoquímica.

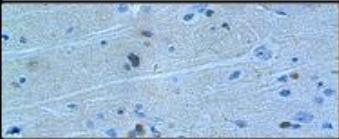
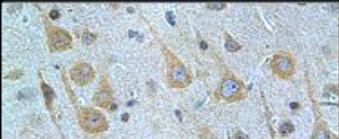
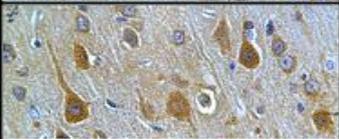
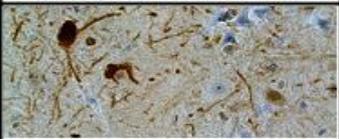
Após desparafinização e desidratação, os cortes foram incubados por 20 minutos com 30ml de peróxido de hidrogênio, 70ml de metanol e 200µl de Triton- X para bloqueio da atividade da peroxidase endógena. Para a recuperação antigênica foi empregada a solução de citrato de sódio (pH 6,0) em panela de pressão durante três minutos. Para o bloqueio de reações inespecíficas, os cortes foram incubados por uma hora e meia à

temperatura ambiente, com soro albumina bovina (BSA) diluído a 3% em solução tampão de fosfatos (PBS). Em seguida, os tecidos foram incubados durante 18 horas (*overnight*), em câmara úmida e a 4°C, com os anticorpo anti-fosfo-ERK 1/2 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) na diluição de 1:200 em BSA 1,5%. Para amplificação das reações, os cortes foram lavados incubados, à temperatura ambiente, em anticorpo secundário e complexo streptoavidina biotina (Universal LSAB™+ kit/HRP, rabbit/mouse/goat, Dako, Califórnia, USA). A reação foi revelada com solução de diaminobenzidina-peroxidase (*Liquid DAB Substrate Chromogen System*®, Dako, Califórnia, USA) por um minuto. Solução tampão de PBS (pH 7,4) foi utilizado para as lavagens entre as etapas. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Mayer, por 30 segundos, e montadas com Entellan (Merck, São Paulo, SP). O controle negativo foi realizado para identificar coloração inespecífica, instilando apenas BSA a 1,5% no momento correspondente ao anticorpo primário.

As lâminas foram analisadas quanto à localização e tonalidade de marcação, por microscopia de luz e a marcação mensurada por avaliação semiquantitativa, atribuindo-se os escores de intensidade de coloração relacionados no Quadro 1, adaptados do estudo de FUJIKAWA et al. (2000). Foram observadas a região do córtex cerebral e hipocampo nas lâminas marcadas com p-ERK 1/2 aumento de 100X, sendo confirmadas em aumento de 400X. A intensidade de marcação foi determinada após avaliação de todas as lâminas tratadas e, posterior definição de tonalidades em escores de gradação de cor.

Para análise estatística, após teste de normalidade, foram aplicados teste de Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney, de acordo com SAMPAIO (2007). Considerou-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A análise estatística foi realizada com o software XLSTAT 2011.

Quadro 1- Escores de intensidade de coloração aplicados à análise da marcação do anticorpo p-ERK1/2 em corpo celular de neurônios

Escore	Neurônios: p-ERK1/2
0 (Ausente)	
1 (Discreta)	
2 (Moderada)	
3 (Acentuada)	

4 RESULTADOS

Poucos neurônios apresentaram expressão de p-ERK, em todos os grupos e tempos de isquemia. A marcação do anticorpo p-ERK 1/2 ocorreu em neurônios corticais, neurônios da região do hipocampo, principalmente, na área do hilo do giro denteado, em vasos sanguíneos e células da glia, nos cinco grupos. O citoplasma de neurônios e núcleo de algumas células foram difusamente marcados, assim como células gliais com evidência de seus prolongamentos citoplasmáticos. Em vasos sanguíneos verificou-se marcação de citoplasma e núcleo das células musculares lisas, todavia, raras células endoteliais isoladas apresentaram-se marcadas, principalmente em I⁴⁵. Os animais submetidos à isquemia apresentaram marcação de células satélites e pericitos, variável entre os grupos.

Houve variação de intensidade na marcação da forma ativa dessa proteína nos diferentes grupos e em todos os subgrupos. A ausência de marcação nos capilares foi observada em 100% das amostras. No tempo I⁰ e I⁵, em todos os grupos, entre 70% a 95% dos animais não apresentaram marcação em neurônios corticais e do hipocampo (Tabela 1). Nesses dois tempos não houve diferença significativa entre os grupos quanto à marcação de neurônios (Figura 2 e 3).

Em I^{20} , G1, G2 e G5 apresentaram marcação variando entre ausente a acentuada, em neurônios corticais, sendo significativamente superior aos grupos G3 e G4, em que a marcação variou de ausente a moderada e 70% a 95% das amostras apresentaram ausência de marcação (Figura 2 e Tabela 1). Nessa região, em I^{45} , a expressão de p-ERK1/2 foi significativamente maior em G1 e G5, quando comparados a G2, G3 e G4, em que marcação ausente foi observada em 90% das amostras (Tabela 1).

No hipocampo, em I^{20} , G1 e G5 apresentaram marcação ausente a moderada (Tabela 1). Em G2, variou de ausente a acentuada, sendo significativamente maior que G1, G3 e G4 (Figura 3). A marcação em G3 e G4 foi de ausente a discreta, sendo que 85% a 95% não expressaram p-ERK1/2. No tempo I^{45} a marcação apresentou-se mais intensa em G1, G2 e G3 (Tabela 1). Neste tempo, G1 foi significativamente diferente de G3, G4 e G5 (Figura 3). Em G5 a marcação variou de ausente a moderada e nos outros grupos de ausente a acentuada (Tabela 1).

Tabela 1 - Frequência da marcação com anticorpo anti-p-ERK1/2 em neurônios corticais (NC) e neurônios do hipocampo (NH) de ratos submetidos a isquemia e reperfusão, Goiânia, 2010.

		Grupo 1 (%)															
Momentos		I^0				I^5				I^{20}				I^{45}			
Escores		0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
NC		90	10	0	0	75	20	5	0	55	25	10	10	10	45	30	15
NH		75	25	0	0	95	5	0	0	80	15	5	0	30	25	10	25
		Grupo 2 (%)															
Escores		0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
NC		90	10	0	0	80	35	5	0	50	30	15	5	90	0	0	10
NH		85	15	0	0	90	10	0	0	50	25	20	5	65	5	10	20
		Grupo 3 (%)															
Escores		0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
NC		85	15	0	0	75	20	5	0	90	10	0	0	90	0	0	10
NH		95	5	0	0	80	20	0	0	95	5	0	0	60	10	10	20
		Grupo 4 (%)															
Escores		0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
NC		95	5	0	0	70	25	5	0	70	10	15	0	90	10	0	0
NH		95	5	0	0	75	15	10	0	85	15	0	0	75	5	10	10
		Grupo 5 (%)															
Escores		0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
NC		70	10	20	0	70	30	0	0	35	30	20	10	45	20	35	0
NH		85	15	0	0	95	5	0	0	65	15	20	0	55	40	5	0

Onde: Escores: 0-ausência de marcação; 1-marcação discreta; 2-marcação moderada e 3-marcação acentuada. Grupos - G1: controle; G2, G3 e G4: ratos tratados com extrato etanólico da casca de pequi a 100mg/kg, 300 mg/kg e 600 mg/kg, respectivamente e G5: vitamina E. Tempos de isquemia - I^0 : sem isquemia, I^5 : cinco minutos; I^{20} : 20 minutos e I^{45} : 45 minutos;

A expressão de ERK1/2 fosforilada sem a ação dos antioxidantes, no córtex cerebral, tem indícios de aumentar de I^0 para I^{45} . Na região do hipocampo, a expressão reduziu em I^5 , elevou-se em I^{20} e, mais intensamente, em I^{45} (Figura 4A e B). Nos grupos tratados, especialmente com extrato da casca de pequi, observou-se diminuição da expressão de p-ERK 1/2, principalmente em I^{45} , em neurônios corticais e hipocampais (Figura 4C e D).

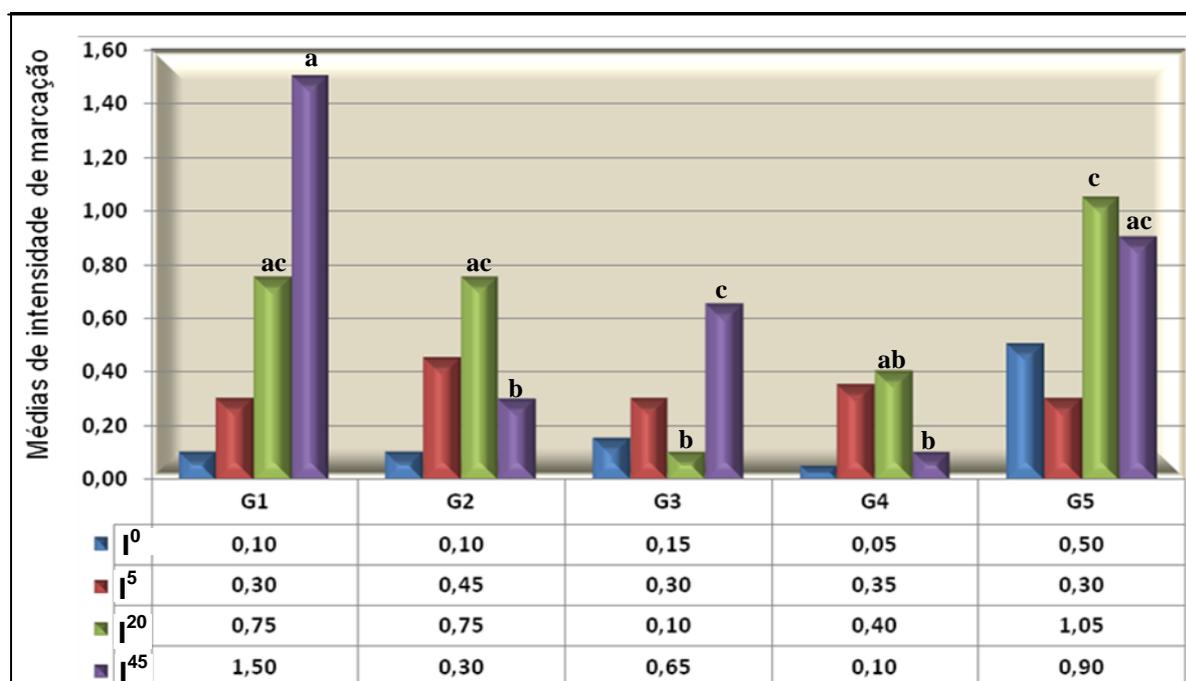


FIGURA 2 – Expressão de p-ERK 1/2 em neurônios do córtex cerebral de ratos submetidos à isquemia e reperfusão após tratamento com extrato etanólico da casca de pequi a 100 (G2), 300 (G3) e 600 (G4) mg/kg, vitamina E (G5) e não tratados (G1). abc- momentos com letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre grupos e momentos sem letras não diferem significativamente ($p > 0,05$).

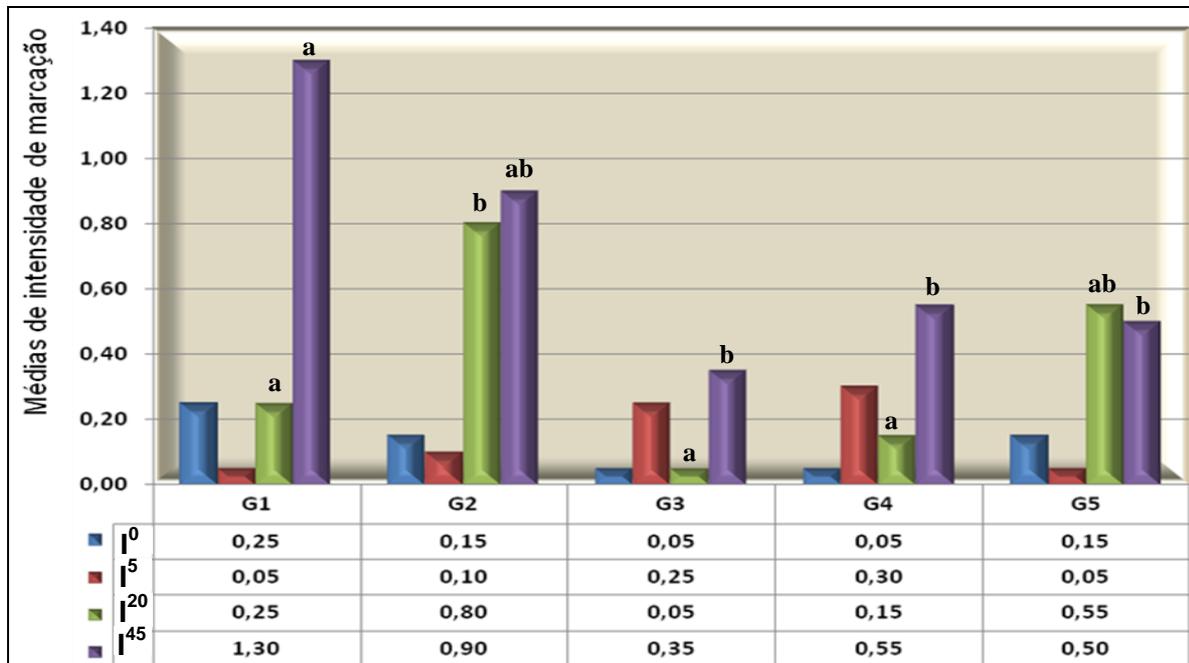


FIGURA 3 – Expressão de p-ERK 1/2 em neurônios do hipocampo de ratos submetidos à isquemia e reperusão após tratamento com extrato etanólico da casca de pequi a 100 (G2), 300 (G3) e 600 (G4)mg/kg, vitamina E (G5) e não tratados (G1). ab- momentos com letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre grupos e momentos sem letras não diferem significativamente ($p > 0,05$).

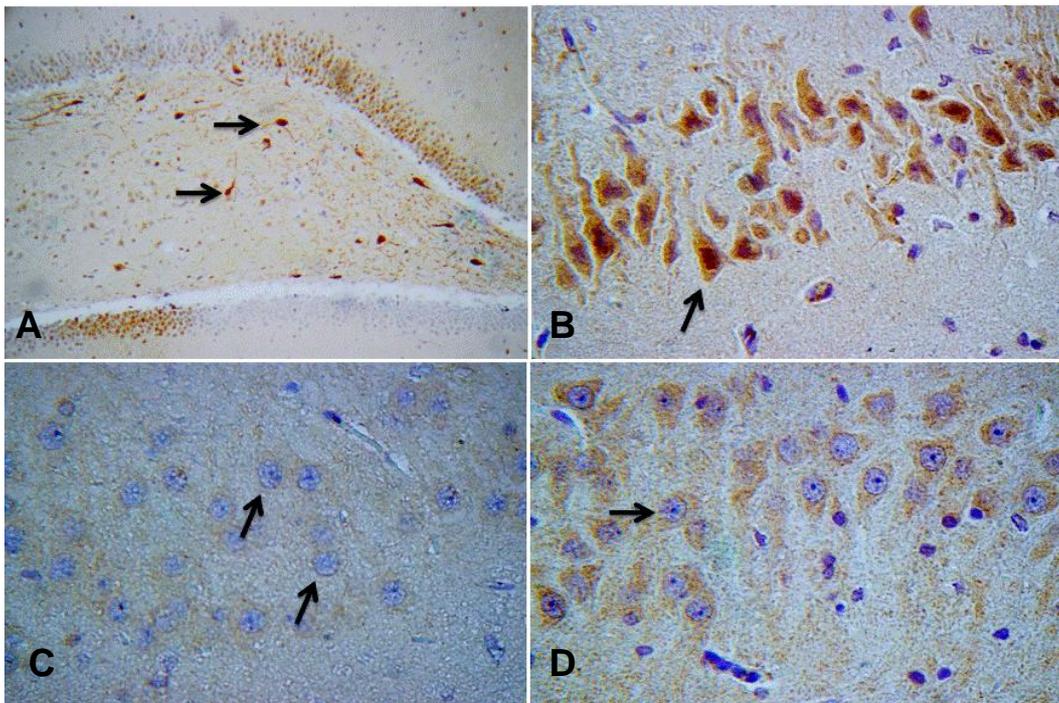


FIGURA 4 – Fotomicrografias do hipocampo de cérebro de ratos submetidos à isquemia e reperusão. Nas imagens evidenciam-se neurônios com o anticorpo anti-p-ERK1/2 (seta). Em A, hilo do giro dentado do Grupo controle (G1) subgrupo 45 minutos de isquemia (I⁴⁵). Em B, região CA1 do Grupo controle (G1) subgrupo 45 minutos de isquemia (I⁴⁵). Em C, região CA1 do Grupo tratado com 600mg/kg de extrato etanólico da casca de pequi (G4) subgrupo 20 minutos de isquemia (I²⁰). Em D, região CA3 do Grupo tratado com 100mg/kg de extrato etanólico da casca de pequi (G2) subgrupo 20 minutos de isquemia (I²⁰). Imunomarcção com anti-phospho-ERK1/2. A: 100X e B, C e D: 400X.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, verificou-se que, no córtex cerebral e hipocampo do grupo controle, a expressão de ERK1/2 fosforilada aumentou à medida que se prolongava os tempos de isquemia, apresentando maior quantidade de amostras com intensidade acentuada, utilizando o tempo de 45 minutos de isquemia após duas horas de reperfusão. Esses achados corroboram o estudo realizado por NAMURA et al. (2001), que observaram após isquemia cerebral global aumento de p-ERK1/2 persistente até uma hora após a reperfusão. Achados semelhantes foram encontrados por FERRER et al. (2003), que observaram aumento da expressão de p-ERK1/2 nas primeiras horas de reperfusão (uma a quatro horas) em neurônios da região acometida por uma hora de isquemia focal.

Os grupos tratados com antioxidantes, apresentaram diminuição da expressão da proteína em comparação ao grupo controle, com variações entre os tempos e de acordo com o suplemento utilizado. Em estudo realizado por GAO et al. (2008) em ratos, foi observado que o pré-condicionamento isquêmico inibe a expressão de p-JNK, sendo que essa encontra-se aumentada de uma a 24 horas após o evento isquêmico sem o tratamento. HICKS et al. (2000) ao avaliar o efeito da hipotermia na ativação de p-ERK após isquemia e reperfusão cerebral global, verificou, no hipocampo, aumento da expressão da proteína durante a reperfusão. Todos estes trabalhos associaram a inibição de p-ERK com a sobrevivência celular. Portanto, diante dos achados do presente estudo, sugere-se que a inibição da atividade de ERK1/2 pode contribuir para um efeito protetor após administração de antioxidantes, já que observamos maior expressão no grupo controle após duas horas de reperfusão em relação aos tratados.

Os grupos tratados com extrato etanólico da casca de pequi, principalmente o grupo que recebeu 600mg/kg, apresentaram menor expressão de p-ERK1/2 quando comparados ao grupo tratado com vitamina E. Dessa forma, pode-se inferir que as ações antioxidante e neuroprotetora do extrato utilizado nesta investigação podem estar envolvidas em inibição precoce da fosforilação de ERK1/2, possivelmente por redução do estresse oxidativo e da ativação dos receptores de glutamato, conforme citado por STANCIU et al. (2000), LI et al. (2008) e SZYDLOWSKA et al. (2010).

A proteína p-ERK1/2 foi expressa em cérebros de ratos após isquemia e reperfusão, sendo que, no grupo controle, a ERK1/2 fosforilada apresentou aumento durante os tempos de isquemia. Esta proteína apresentou menor expressão em neurônios de cérebros de ratos tratados com doses mais altas de extrato etanólico da casca de pequi. Este achado demonstra que o extrato promove redução da expressão de ERK1/2 ativada, podendo ser esse um dos mecanismos moleculares envolvidas na neuroproteção conferida pelo extrato.

6 CONCLUSÃO

O extrato etanólico da casca de pequi pode reduzir a expressão de fosfo-ERK1/2 em neurônios de cérebros de ratos submetidos à isquemia transitória global e reperfusão de duas horas.

7 REFERÊNCIAS

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.12, n.2, p.123- 130, 1999.

BRASIL. **Cadernos de informação de Saúde** [on line]. 2005. Ministério da Saúde, Datasus. Brasília. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/tabdata/cadernos/cadernosmap.htm>> Acesso em: 30 maio 2010.

DIAS, L. A. A.; COLLI, B. O.; NETTO, J. C.; LCHAT, J. J. Avaliação da isquemia cerebral focal induzida pela oclusão da artéria cerebral média e a ação neuroprotetora do cetoprofeno em ratos. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, São Paulo, v.58, n.4, p.1047-1054, 2000.

EVORA, P. R. B.; PEARSON, P. J.; SECCOMBE, J. F.; SCHAFF, H. V. Lesão de isquemia-reperfusão. aspectos fisiopatológicos e a importância da função endotelial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. São Paulo, v.66, n.4, p.239-245, 1996.

FERRER, I; FRIGULS, B.; DALFÓ, E.; PLANAS, M. Early modifications in the expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK), stress-activated kinases SAPK/JNK and p38, and their phosphorylated substrates following focal cerebral ischemia. **Acta Neuropathologica**, New York, v. 105, p. 425-437, 2003.

FUJIKAWA, D. G.; SHINMEI, S. S.; CAI, B. Kainic acid-induced seizures produce necrotic, not apoptotic, neurons with internucleosomal DNA cleavage: implications for programmed cell death mechanisms. **Neuroscience**, Oxford, v. 98, p. 41–53, 2000.

GAO, X.; ZHANG, H.; TAKAHASHI, T.; HSIEH, J.; LIAO, J.; STEINBERG, G. K.; ZHAO, H. The Akt signaling pathway contributes to postconditioning's protection against stroke; the protection is associated with the MAPK and PKC pathways. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 105, p. 943–955, 2008.

HICKS, S. D.; PARMELE, K. T.; DEFRANCO, D. B.; KLANN, E.; CALLAWAY, C. W. Hypothermia differentially increases extracellular signal-regulated kinase and stress-activated protein kinase/c-jun terminal kinase activation in the hippocampus during reperfusion after asphyxial cardiac arrest. **Neuroscience**, Oxford, v. 98, n. 4, p. 677–685, 2000.

KHOURI, J.; RESCK, I. S.; POÇAS-FONSECA, M.; SOUSA, T. M. M.; PEREIRA, L.O.; OLIVEIRA, A. B. B.; GRISOLIA, C. K. Anticlastogenic potential and antioxidant effects of an aqueous extract of pulp from the pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb). **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v.30, n.2, p.442-448, 2007.

LENNMYR, F.; KARLSSON, S.; GERWINS, P.; ATA, K. A.; TERÉNT, A. Activation of mitogen-activated protein kinases in experimental cerebral ischemia. **Acta Neurologica Scandinavica**, Copenhagen, v.106, p. 333–340, 2002.

LI, Y.; XU, W.; MCBURNEY, M. W.; LONGO, V. D. SirT1 Inhibition Reduces IGF-I/IRS-2/Ras/ERK1/2 signaling and protects neurons. **Cell Metabolism**, Cambridge, v. 8, p. 38–48, 2008.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.).** 2008. 182 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Ciência dos Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, USP – São Paulo.

MUNIZ, L. R. F.; FARIA, M. H. G.; VASCONCELOS, P. R. L. Avaliação metabólica das lesões de isquemia e reperfusão cerebrais após oclusão bilateral das artérias carótidas comuns: estudo experimental em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v.19, n.5, p.529-534, 2004.

NAMURA, S.; IHARA, K.; TAKAMI, S.; NAGATA, I.; KIKUCHI, H.; MATSUSHITA, K.; MOSKOWITZ, M. A.; BONVENTRE, J. V.; ALESSANDRINI, A. Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 affords brain protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 20, p. 11569–11574, 2001.

OTANI, N.; NAWASHIRO, H.; FUKUI, S.; NOMURA, N.; YANO, A.; MIYAZAWA, T.; SHIMA, K. Differential activation of mitogen-activated protein kinase pathways after traumatic brain injury in the rat hippocampus. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, Hagerstown, v. 22, p. 327–334, 2002.

PASSOS, X. S.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; FERNANDES, O. F. L.; PAULA, T. F.; GARCIA, A. C. F.; SILVA, M. R. R. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Goiânia, v. 35, n. 6, p. 623-627, 2002.

PEREIRA, F.E.L. Lesões celulares e do interstício. Cicatrização. Regeneração. In: FILHO, B. **Bogliolo Patologia Geral**. Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 4.ed., p. 82- 139, 2009.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L. C; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.1, p.53- 60, 2007.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 3.ed., Belo Horizonte: FEP-MVZ, 2007. 264 p.

STANCIU, M.; WANG, Y.; KENTOR, R.; BURKE, N.; WATKINS, S.; KRESSI, G.; REYNOLDSI, I.; KLANN, E.; ANGIOLIERI, M. R.; JOHNSON, J. W.; DEFRANCO, D. B. Persistent Activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 275, n. 16, p. 12200–12206, 2000.

SUGAWARA, T.; FUJIMURA, M.; NOSHITA, N.; KIM, G. W.; SAITO, A.; HAYASHI, T.; NARASIMHAN, P.; MAIER, C. M.; CHAN, P. H. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. **The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, Maryland, v. 1, p. 17-25, 2004.

SZYDLOWSKA, K.; GOZDZ, A.; DABROWKI, M.; ZAWADZKA, M.; KAMINSKA, B. Prolonged activation of ERK triggers glutamate-induced apoptosis of astrocytes: neuroprotective effect of FK506. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 113, p. 904-918, 2010.

TAGAMI, M.; YAMAGATA, K.; IKEDA, K. NARA, Y.; FUJINO, H.; KUBOTA, A.; NUMANO, F.; YAMORI, Y. Vitamin E prevents apoptosis in cortical neurons during hypoxia and oxygen reperfusion. **Laboratory Investigation**, Hagerstown, v. 78, n. 11, p. 1415-1429, 1998.

TAGAMI, M.; YAMAGATA, K.; IKEDA, K. NARA, Y.; FUJINO, H.; KUBOTA, A.; NUMANO, F.; YAMORI, Y. Vitamin E prevents apoptosis in cortical neurons during

hypoxia and oxygen reperfusion. **Laboratory Investigation**, Hagerstown, v. 78, n. 11, p. 1415-1429, 1998.

TARDINI, D. M. S.; YOSHIDA, W. B. Lesões cerebrais decorrentes de isquemia e reperfusão na cirurgia de endarterectomia de carótida. **Jornal Vascular Brasileiro**. Rio de Janeiro, v.2, n. 2, p. 119-128, 2003.

YOSHIDA, W. B. Fisiopatologia da isquemia e reperfusão. In: MAFFEI, F.H.A. **Doenças Vasculares Periféricas**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2002. p. 253-8.

ZHANG, B.; TANAKA, J.; YANG, L.; SAKANAKA, M.; HATA, R.; MAEDA, N.; MITSUDA, N. Protective effect of vitamin E against focal brain ischemia and neuronal death through induction of target genes of hypoxia-inducible factor-1. **Neuroscience**, Oxford, v.126, n.2, p.433-440, 2004.