



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

BIOQUÍMICA

Efeitos da administração crônica da prolina e lipopolissacarídeo sobre parâmetros
inflamatórios, de estresse oxidativo e de metabolismo energético em córtex
cerebral e cerebelo de ratos *Wistar* jovens

Vivian Strassburger Andrade

Orientador: Prof. Dr. Clovis Milton Duval Wannmacher

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:

Bioquímica como requisito parcial à obtenção de grau de Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre, 2017

CIP - Catalogação na Publicação

Andrade, Vivian Strassburger

Efeitos da administração crônica da prolina e lipopolissacarídeo sobre parâmetros inflamatórios, de estresse oxidativo e de metabolismo energético em córtex cerebral e cerebelo de ratos Wistar jovens / Vivian Strassburger Andrade. -- 2017.

70 f.

Orientador: Clovis Milton Duval Wannmacher.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Prolina. 2. Lipopolissacarídeo. 3. Hiperprolinemia. 4. Doença metabólica. 5. Inflamação. I. Wannmacher, Clovis Milton Duval, orient. II. Título.

**Dedico este trabalho às pessoas que mais amo na vida, meus pais, José e Vera;
meus irmãos, Fernando e Maurício; minhas cunhadas, sogros, familiares e amigos
próximos; ao meu marido, Marcelo e à razão de nossas vidas, nosso filho,
Benjamin.**

**“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de
vencer”**

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer imensamente ao Clovis, meu querido orientador, por toda paciência, apoio, incentivo, puxões de orelha e mais do que tudo, pelo exemplo da generosidade e bondade;

Aos colegas de laboratório, minha gratidão por toda colaboração, ajuda, companheirismo, momentos partilhados dentro e fora do departamento de bioquímica que deixarão muita saudade;

Aos colegas dos demais laboratórios que foram colaboradores maravilhosos, auxiliando no desenvolvimento de todo o processo;

A Capes pela bolsa de Doutorado concedida e a UFRGS pela excelência no ensino;

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, sempre tão atenciosos e prestativos;

Aos amigos queridos, que foram sempre muito pacientes e presentes;

À minha amada família; pais, irmãos, cunhadas, sogros... que nunca mediram esforços para me apoiar, incentivar e ajudar a seguir em frente, mesmo quando o caminho parecia longo e tortuoso demais;

Aos meus dois grandes amores, Marcelo, meu marido dedicado, fiel, companheiro, paciente e muito amoroso e ao nosso bem maior, Benjamin, nosso filho querido, a luz dos nossos dias, nosso “filho da felicidade”.

O meu mais sincero e profundo, muito obrigada a todos!

SUMÁRIO

PARTE I.....	1
RESUMO	2
ABSTRACT.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
I.1 – INTRODUÇÃO	7
I. 1.1 – Aminoácidos	7
I. 1.1.1 - L-prolina.....	7
I. 1.1.2 - Biossíntese e degradação da L-prolina.....	8
I. 1.1.3 - Erros inatos do metabolismo de aminoácidos	11
I. 1.2 – Neuroinflamação.....	13
I. 1.2.1 - Lipopolissacarídeo e resposta imune inata	14
I. 1.2.3 - S100B	18
I. 1.2.4 – Proteína ácida fibrilar Glial (GFAP).....	19
I. 1.3 - Metabolismo energético	20
I. 1.3.1 - Rede fosforiltransferência.....	20
I. 1.3.1.1- Creatina cinase.....	21
I. 1.3.1.2 - Adenilato cinase	22
I. 1.3.1.3 - Hexocinase	23
I. 1.3.2 - Complexos respiratórios e fosforilação oxidativa	24
I. 1.4 - Espécies reativas e estresse oxidativo	25
2. OBJETIVOS	27
I. 2.1 - Objetivo Geral	27
I. 2.2 - Objetivos específicos.....	27
PARTE II	28
ARTIGO.....	28
PARTE III.....	39
III. 1- DISCUSSÃO	40
III. 2 - CONCLUSÕES	53
III. 3 - PERSPECTIVAS.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

PARTE I

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

RESUMO

As hiperprolinemias são doenças causadas por altas concentrações de prolina no plasma e tecidos, que podem apresentar diversas manifestações clínicas em crianças, dentre elas neurológicas. Considerado que essas mesmas crianças estão frequentemente expostas a diversos tipos de infecções, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da administração crônica de prolina sozinha e quando administrada concomitantemente a um lipopolissacarídeo altamente utilizado para induzir inflamação sistêmica e no sistema nervoso central. Para isso analisamos alguns parâmetros de estresse oxidativo, a atividade de algumas enzimas da rede de fosforiltransferência e a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial. Os animais foram divididos em quatro grupos (salina, prolina, lipopolissacarídeo e prolina+lipopolissacarídeo) e a administração consistiu em 2 doses diárias, do 7º ao 21º dia de vida. Todos os animais foram eutanasiados no 22º dia de vida por decapitação sem anestesia e córtex cerebral e cerebelo foram removidos para análise. A administração de prolina sozinha não alterou nenhum dos parâmetros analisados. Enquanto a administração de lipopolissacarídeo foi capaz de aumentar a conteúdo de S100B e da proteína ácida fibrilar glial, os conteúdos das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico e sulfidrilas e a atividade da catalase em ambos os tecidos. Além disso, aumentou a atividade da adenilato cinase e a atividade da creatina cinase mitocondrial, tanto no córtex cerebral quanto no cerebelo. Além disso, a isoforma citosólica da creatina aumentou somente no córtex cerebral. A atividade da hexocinase diminuiu em ambos os tecidos. Em adição a isso, o lipopolissacarídeo diminuiu a atividade dos complexos IV e succinato desidrogenase da cadeia respiratória mitocondrial. Em contrapartida a administração de prolina+lipopolissacarídeo preveniu os efeitos causados pelo lipopolissacarídeo em todos os parâmetros nos dois tecidos. Caso esses efeitos sejam confirmados em humanos a prolina poderia ser utilizada como um agente anti-inflamatório e antioxidante associado a terapias destinadas a doenças neurológicas envolvendo inflamação.

ABSTRACT

Hyperrprolinemias are diseases caused by high concentrations of proline in plasma and tissues that may present several clinical manifestations in children, among them neurological. Whereas these same children are often exposed to various types of infections the objective the present study was to evaluate the effects of chronic proline administration alone, in cerebral cortex and cerebellum, and when administered concomitantly to a lipopolysaccharide highly used to induce systemic and central nervous system inflammation. For this we analyze some parameters of oxidative stress, the activity of some enzymes of the phosphoryltransfer network and the activity of the mitochondrial respiratory chain enzyme complexes. Animals were divided into 4 groups: control, saline proline, lipopolisaccharide and lipopolisaccharide plus proline. Administration consisted of 2 daily doses from 7^o to 21^o day of life. All animals were euthanized at 22 days of age by decapitation without anesthesia and the brain cortex and cerebellum were removed for chemical determinations. The administration of alone proline did not alter any of the analyzed parameters. While the administration of lipopolisaccharide was able to increase content of S100B and the GFAP, content of the thiobarbituric acid reactive substances of and sulfhydryl and activity of catalase in both tissues. Besides that, lipopolisaccharide increased adenilate kinase activity and mitochondrial creatine kinase in cerebral cortex and cerebellum. However, cytosolic isoform of creatine increased only in cerebral cortex. Hexokinase activity decreased in both tissues. In addition to this, lipopolisaccharide administration decreased complexes IV and succinate dehydrogenase activities of mitochondrial respiratory chain. In contrast, administration of proline+lipopolisaccharide prevent effects caused by the lipopolisaccharide in all parameters, in both tissues. If these proline effects were confirmed in humans, it would be a powerful antioxidant and anti-inflammatory agent associated with therapies for neurological disease involving inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS

AK - adenilato cinase

BHE – barreira hemato-encefálica

CAT – catalase

Complexo I – NADH desidrogenase

Complexo II – succinato ubiquinona oxirredutase

Complexo III – complexo citocromo b-c1

Complexo IV – citocromo c oxidase

CKmit – creatina cinase mitocondrial

CKcit – creatina cinase citosólica

CK – creatina

ER – espécies reativas

ERNs – espécies reativas nitrogênio

EROS – espécies reativas de oxigênio

FAD – flavina adenina dinucleotídeo

GFAP – proteína ácida fibrilar glial

HK – hexocinase

LBP- proteína ligadora de LPS

LPS - lipopolissacarídeo

MD-2 - proteína mielóide diferenciadora 2

MyD88 – proteína adaptadora do fator 88 de diferenciação mielóide

NAD⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)

NFκB - fator nuclear kappa beta

Nrf-2 - fator nuclear eritróide derivado-2

O₂^{•-} - radical superóxido

OAT – ornitina – δ – aminotransferase

•OH- radical hidroxila

Pcr - fosfocreatina

P5C – delta - 1 - pirrolina carboxilato

P5CDH - delta - 1 - pirrolina carboxilato desidrogenase

P5CR - delta - 1 - pirrolina carboxilato redutase

P5CS - delta - 1 - pirrolina carboxilato sintetase

Pi – fosfato inorgânico

POX – prolina oxidase

PRODH – prolina desidrogenase

Pro - prolina

SNC - sistema nervoso central

TLRs - receptores “toll-like”

TNF - fator de necrose tumoral

I.1 – INTRODUÇÃO

I. 1.1 – Aminoácidos

A análise de um grande número de proteínas mostrou que elas são compostas de 20 aminoácidos-padrão. Porém não são todas as proteínas que são compostas dos 20 aminoácidos, mas grande número delas contêm a maioria deles (Voet et al 2000). Com a adição de dois novos membros, selenocisteína (Bock et al 1991) e pirrolisina (Hao et al 2002 e Srinivasan et al 2002), existem hoje vinte e dois aminoácidos proteogênicos naturais, codificados geneticamente em organismos vivos.

São classificados como essenciais, que não podem ser produzidos pelo corpo, não-essenciais, que o corpo humano pode sintetizar e condicionalmente essenciais, aqueles que em função de determinados momentos, não podem ser produzidos pelo corpo.

I. 1.1.1 - L-prolina

A L-prolina (Pro) é um desses vinte e dois aminoácidos e é tradicionalmente classificada como um dos aminoácidos não essenciais em mamíferos, porque existe um conjunto específico de enzimas designado para sintetizar a Pro a partir de seus precursores (glutamato e ornitina) em células de mamíferos (Hiramatsu et al 1994 e Young e El-Khoury 1995).

Pro e seu metabólito (hidroxiprolina) são aminoácidos únicos química e bioquimicamente (Hu et al 2008 e Kaul et al 2008). Pro não possui um grupamento amino primário, mas sim um grupo amino secundário (imino). A Pro é classificada como um aminoácido de cadeia lateral apolar, possuindo um grupo pirrolidina cíclico na cadeia lateral (Voet et al 2000).

Em adultos, a concentração normal de Pro no plasma é de 51 a 271 μM , sendo esses valores menores em crianças. A Pro é um aminoácido não essencial em crianças e adultos e condicionalmente essencial em prematuros (Phang 1985).

A Pro não pode ser metabolizada por enzimas de aminoácidos genéricas, isto é, aminotransferases, descarboxilases e racemases (Adams 1970 e Phang 1985). Por isso, uma família especial de enzimas evoluiu com suas próprias localizações subcelulares e mecanismos de regulação. Nos últimos tempos muitos estudos têm demonstrado os efeitos tóxicos causados pelo acúmulo de Pro e seus metabólitos (Delwing et al 2003, Kessler et al 2003). Contudo, recentemente, alguns trabalhos têm sido desenvolvidos para avaliar a Pro como agente antioxidantes e anti-inflamatório. Li e colaboradores em 2016, demonstraram que os metabólitos da glutamina, alanina, citrulina e Pro foram capazes de suprimir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), a liberação do citocromo c e a ativação das caspases 3, 8 e 9 em concentrações fisiológicas. Diante disso, sabe-se que a Pro tem um papel central no metabolismo e está cada vez mais sendo reconhecida como um aminoácido crítico em bioenergética, controle redox celular, apoptose e câncer (Phang 1985, Donald et al 2001, Phang 2001, Rivera e Maxwell 2005 e Pandhare et al 2006).

I. 1.1.2 - Biossíntese e degradação da L-prolina

A Pro pode ser sintetizada a partir de seus precursores ornitina e glutamato (Fig. 1) e tem delta-1-pirrolina-5-carboxilato (P5C) e glutamato- γ -semialdeído, como intermediários comuns (Voet & Voet, 1999). O glutamato- γ -semialdeído participa tanto da biossíntese quanto da degradação da Pro. A conversão de glutamato em P5C, é feita pela enzima delta-1-pirrolina-5 carboxilato sintetase (P5CS), uma enzima bifuncional, dependente de ATP e NADPH que tem alta atividade na mucosa do intestino delgado, cólon, pâncreas, timo e cérebro. Enquanto a conversão de ornitina a P5C, é catalisada pela enzima ornitina- δ -aminotransferase (OAT), com um alfa cetoácido como acceptor amino (Phang et al, 2001; Flyn et al, 1989).

A transformação de P5C em glutamato- γ -semialdeído é espontânea, reversível e diretamente relacionada com o momento funcional da célula. A regulação do metabolismo da Pro é complexa devido à presença de intermediários comuns entre o anabolismo e catabolismo. P5C é um intermediário chave, pois participa tanto da biossíntese como da degradação da Pro. Além disso, P5C pode ser convertido em intermediários obrigatórios no ciclo da uréia (ornitina) e do ácido tricarbóxico (glutamato) e pode desempenhar um papel anaplerótico em ambos os ciclos metabólicos (Adams 1970, Phang 1985).

P5C está presente no plasma e seus níveis variam durante o dia, apresentando picos associados às refeições. Iminoglicinúria neonatal e prolinúria pós-natal são achados frequentes em crianças normais e ocorrem devido à imaturidade do sistema de reabsorção tubular da Pro. Depois de formado, na mitocôndria, o P5C é liberado e convertido a Pro pela delta-1-pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR) citosólica, que utiliza NADH e NADPH como cofatores e é encontrada em todos os tecidos (Phang et al 2001).

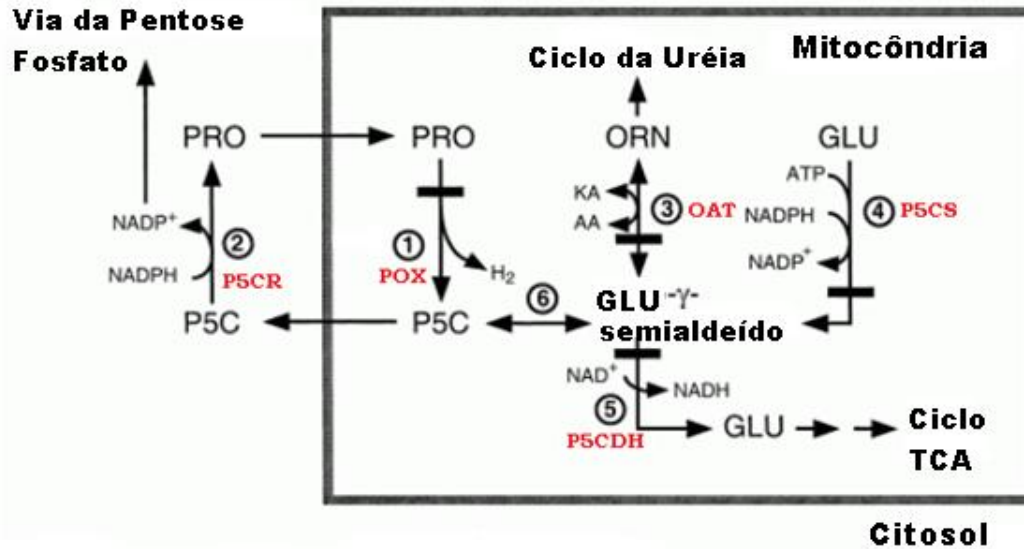


Figura 1 – Vias metabólicas da Pro em mamíferos(Scriver *et al* 2001). Adaptado pelo autor. 1- Prolina Oxidase (POX), 2- Delta-1-pirrolina-carboxilato redutase (P5CR), 3- Ornitina aminotransferase (OAT), 4- Delta-1-pirrolina-carboxilato sintase (P5CS), 5- Delta-1-pirrolina-carboxilato desidrogenase (P5CDH), 6- Reação não-enzimática.

A degradação de Pro tem seu primeiro passo catalisado pela enzima prolina oxidase (POX), também chamada de prolina desidrogenase (PRODH). Aqui, os elétrons são transferidos de Pro para o FAD (flavina-adenina-dinucleotídeo) gerando FADH₂, que transfere seus elétrons para o complexo II da cadeia de transporte de elétrons. Nessa etapa ATP é formado por fosforilação oxidativa através da transferência subsequente de elétrons via citocromo c. Além disso, a POX desempenha papel central na interconversão de Pro em P5C (Ciclo da Prolina), por estar fortemente ligada à membrana interna mitocondrial, contribuindo assim para essa transferência de elétrons tendo o citocromo c comoceptor (Phang 1985, Adams, 1970). P5C pode ser

convertido a glutamato e alfa-cetoglutarato para contribuir anapleroticamente para o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (Phang 1985). Contudo, sua conversão de volta a Pro através da P5CR no citosol forma um ciclo metabólico. O ciclo da Pro forma uma interligação metabólica com a via das pentoses, servindo assim, para converter o potencial redutor da via das pentoses-fosfato em um sistema gerador de ATP nas mitocôndrias (Phang et al 1980, Hagedorn and Phang 1983, Hagedorn and Phang, 1986) (Fig. 1).

A conversão de P5C para o semialdeído- δ -glutâmico é o segundo passo dessa via metabólica. É uma etapa não enzimática, onde esse semialdeído é convertido à ornitina pela reação reversível catalisada pela ornitina aminotransferase (OAT) ou a glutamato pela delta-1-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (P5CDH), que usa NAD^+ gerando NADH que transfere os elétrons na cadeia de respiratória mitocondrial.

Além disso, estudos mostram que a expressão de PRODH em células de mamíferos é ativada pela p53, o que induz a apoptose de diversas linhagens celulares cancerígenas, tendo assim, a Pro um importante papel na redução da carcinogênese (Rivera e Maxwell 2005).

I. 1.1.3 - Erros inatos do metabolismo de aminoácidos

Em 1908, Sir Archibald Garrod mencionou, pela primeira vez, os erros inatos do metabolismo ao verificar que dois irmãos, filhos de pais normais, excretavam grandes quantidades de ácido homogentísico na urina (Scriver et al 2001). Os EIM são doenças hereditárias causadas pela deficiência parcial ou total de uma ou mais enzimas, ocasionando um bloqueio nas rotas metabólicas com o acúmulo de substâncias tóxicas e/ou redução da síntese de substâncias essenciais.

I. 1.1.4 - Hiperprolinemias

Os erros inatos do metabolismo da Pro são conhecidos como: Hiperprolinemias tipos I (HPI) e II (HPII), deficiência de P5CS, deficiência de OAT, hidroxiprolinemia e iminoglicinúria.

A HPI e a HPII são definidas por distintas deficiências bioquímicas e genéticas na via catabólica da Pro.

HPI é associada a níveis menos elevados de Pro e sem excreção urinária de P5C. Os níveis plasmáticos de Pro, na HPI, podem variar de 5 a 10 vezes acima dos valores normais (51 a 271 μM). É causada pela deficiência da enzima POX, responsável pelo primeiro passo na via de degradação da Pro. Contudo, não existe demonstração direta da deficiência da POX, por que esta enzima não apresenta atividade em linfócitos ou em cultura de fibroblastos (Phang et al 2001). Contudo, não existem evidências entre a deficiência desta enzima e manifestações clínicas. O diagnóstico é feito por exclusão, onde casos de hiperprolinemias não atribuídos à deficiência de P5CDH são considerados do tipo I. A HPI é comumente classificada como uma condição benigna, visto que as manifestações clínicas não estão bem caracterizadas e muitos pacientes não apresentam sintomatologia (Phang et al 2001).

A HPII é causada pela ausência ou deficiência de P5CDH, levando ao acúmulo de Pro no plasma e nos tecidos (Phang et al 2001). O diagnóstico é baseado em níveis séricos aumentados de Pro (10 a 15 vezes maiores que os normais) e excreção de P5C plasmático e urinário (Phang et al 2001). Quantitativamente, o principal metabólito que se acumula no tecido de pacientes com HPII é a Pro e não P5C (Fleming et al 1984, Flynn et al 1989, Phang et al 2001).

Apesar de Pavone e colaboradores em 1975, terem relatado pacientes hiperprolinêmicos assintomáticos, a maioria dos pacientes com HPII, até agora detectados, apresentam manifestações neurológicas incluindo convulsões e retardo mental (Di Rosa et al 2008, Phang et al 2001).

I. 1.2 – Neuroinflamação

Visto que as barreiras hemato-encefálica (BHE) e hemato-liquórica (BHL) protegem o sistema nervoso central (SNC) das contínuas alterações nos tecidos periféricos, acreditou-se, durante um grande período de tempo, que o SNC seria um local imunologicamente privilegiado. Contudo, atualmente, sabe-se que apesar da presença dessas barreiras o SNC está sujeito a eventos patogênicos e vigilância imunológica (Ransohoff e Brown 2012).

Citocinas, quimiocinas, sistema do complemento, neurônios, astrócitos e macrófagos especializados (microglia), além de outras vias de sinalização, contribuem para o processo neuroinflamatório (Shastri et al 2013). Estas substâncias proinflamatórias podem ser produzidas no SNC ou recrutadas de tecidos periféricos.

A neuroinflamação tem sido associada a diversas doenças do SNC, tais como, doenças de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, isquemia cerebral (Glass et al 2010).

Quando a atividade neuroinflamatória acontece durante um curto período de tempo, seus efeitos podem ser considerados neuroprotetores, contudo, a inflamação crônica pode trazer efeitos prejudiciais para o SNC (Streit et al 2004).

I. 1.2.1 - Lipopolissacarídeo e resposta imune inata

O LPS é um dos principais componentes da membrana exterior de bactérias Gram-negativas, como por exemplo a bactéria *Escherichia Coli*. É uma molécula que contribui para a integridade estrutural da bactéria, protegendo sua membrana de ataques químicos, sendo, portanto, crítico para a estabilidade da membrana (Moran et al 1996).

Também chamado de endotoxina, o LPS é uma molécula altamente tóxica capaz de produzir resposta inflamatória em sistemas imunológicos de animais saudáveis. Sua liberação ocorre quando a bactéria se multiplica ou quando é fagocitada e degradada pelas células de defesa (Tuin et al 2006).

Assim que o organismo sofre a invasão de diferentes tipos de patógenos, um sistema de defesa efetivo é desencadeado para que haja o controle da infecção até que as células do sistema imune adaptativo sejam capazes de iniciar uma resposta específica contra o antígeno. Esse primeiro mecanismo de defesa do organismo é chamado de imunidade inata. Dentre os componentes envolvidos na resposta imune inata estão receptores “toll-like” (TLRs), receptores de nucleotídeos tais como adenosina trifosfato (ATP) (Davalos et al 2005 e Franke et al 2006), receptores NOD-like (NLRs) (Kawai & Akira 2009), “scavengers receptors” (SRs) como o receptor de produtos terminais de glicação avançada (RAGE) (Fang et al 2010) entre outros. Esses receptores reconhecem tanto lipídeos derivados de bactérias, LPS, como moléculas endógenas chamadas padrão molecular associado ao dano (DAMP), como por exemplo proteínas de choque térmico e alarminas.

Dentre os receptores TLRs o que tem sido identificado como sensor primário de infecções microbianas é o TLR4 (Poltorak et al 1998), que quando ativados por seu ligante dimeriza e sofre uma mudança conformacional que leva à indução de uma

complexa cascata de sinalização intracelular. Além do TLR4, o LPS pode ser reconhecido por outras moléculas como, LBP (proteína ligadora de LPS), a proteína CD14 e ainda a MD-2 (proteína mieloide diferenciadora 2) podendo, as duas últimas, ser encontradas em duas formas diferentes: solúvel na circulação ou ancorada à membrana. Tanto LBP quanto CD14 e MD-2 na forma solúvel, agem como proteínas auxiliares, responsáveis pela transferência do LPS para o receptor TLR4 ou para o complexo considerado a principal forma de reconhecimento do LPS, formado entre TLR4 e MD-2 (Shimazu et al 1999).

Trabalhos recentes evidenciaram a importância dos receptores TLR na resposta imune inata. Considerados moléculas chave do sistema imune, esses receptores desempenham papel fundamental na infecção, mas também em doenças não infecciosas do SNC (Lehnardt 2010). Atualmente, 10 TLRs foram identificados em humanos e 13 em camundongos. Dentro dessa família de receptores TLRs, os receptores TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 representam uma subfamília localizada em compartimentos intracelulares do endossoma e retículo endoplasmático e reconhecem ácido nucleico viral. Em contrapartida TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 estão localizados na superfície celular e reconhecem componentes da parede celular bacteriana ou partículas virais (Kawai & Akira 2008, Mogensen 2009).

Sabe-se que o principal alvo do LPS no organismo são as células de defesa, contudo nos últimos anos vem crescendo o número de trabalhos que demonstram seus efeitos promovendo a regulação da expressão gênica no SNC.

Ao entrar em contato com o LPS as células responsáveis pelas defesas imunitárias do organismo, promovem resposta inflamatória, vasodilatação, secreção de eicosanoides e febre (Abbas 2006). Estudos mostram que a febre surge minutos depois da injeção sistêmica, mesmo quando ainda não é possível detectar citocinas na

circulação (Rivest 2003). Laflamme e Rivest em 2001, demonstraram que algumas áreas cerebrais expressam receptores TLR4 e CD14, como os órgãos circunventriculares e que nessas regiões o LPS atua na transcrição de genes de citocinas como TNF (fator de necrose tumoral), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 (IL-1) e que a liberação dessas citocinas é provavelmente o estímulo mais frequente usado para desencadear vias de sinalização envolvidas na resposta imunológica (Glezer et al 2007). Algumas hipóteses em relação à essa produção de citocinas sugerem que elas possam modular a excitabilidade neuronal e processos de neurodegeneração e neuroproteção (Rivest 2003). Além disso, foi evidenciado que receptores TLR4 e CD14 podem reconhecer substâncias endógenas envolvidas na neuroinflamação da doença de Alzheimer (Walter et al 2007).

Embora muitos estudos utilizem o LPS como modelo de sepse (Takaoka et al 2014, Kaplanski et al 2014 e Mihaylova et al 2014), que é caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica desencadeada por fatores infecciosos (Salomao et al 2012), o LPS tem sido o ativador glial mais extensivamente usado por pesquisadores em modelo de neuroinflamação *in vivo* e *in vitro*. Kipp et al em 2008, mostrou que culturas de astrócitos neonatais, de diferentes regiões cerebrais, exibem diferenças na expressão de fatores pró-inflamatórios sob estímulo com LPS.

I. 1.2.2 - Mecanismos moleculares da neuroinflamação desencadeada pelo LPS

Ao serem ativados, os receptores TLR4 podem desencadear várias vias de sinalização, como MAPK (cinases ativadas por mitógenos), AP-1 (fator de transcrição da proteína 1), STAT (transdutor de sinal e ativador de transcrição), IRF3 (interferon (IFN)-regulador do fator 3), fator de transcrição NFκB (fator de transcrição nuclear)

entre outras. A ativação da NFκB, induz sua translocação para o núcleo, promovendo a transcrição de diversos genes que participam de processos fisiológicos e fisiopatológicos (Raetz et al 2002). O NFκB é um fator de transcrição central da resposta inflamatória em células imunocompetentes tanto as periféricas como macrófagos, quanto no SNC, como as células da glia. Sua ativação por estímulos inflamatórios como a citocina TNF ou LPS culmina na repressão ou transcrição de vários genes, fazendo com que as células alcancem um estado ativado pronto para responder ao dano e também para criar proteínas que na fase antiinflamatória levam à finalização adequada do processo (Meffert et al 2005).

A ativação da maior parte dos receptores TLRs resulta no recrutamento da proteína adaptadora fator 88 de diferenciação mieloide (MyD88), cinase serina-treonina associada IL-1R (IRAK), fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF), proteína adaptadora TRAF6, cinase indutora de NFκB (NIK) e cinase IκB (IKK), portanto levando a translocação nuclear do NFκB. O MyD88 é crítico para a sinalização através de todos os TLRs exceto TLR3. Entretanto, moléculas adaptadores alternativas incluindo proteína associada ao TIR (TIRAP) e a proteína semelhante a MyD88 (MAL) transduzem sinais de TLRs através de uma via independente de MyD88 (Akira et al 2006).

No SNC, astrócitos e microglia são as primeiras células a responder através de receptores TLRs a dano, perturbação e estresse celular, bem como infecções causadas por patógenos, induzindo a produção e liberação de sinais moleculares que iniciam a resposta glial podendo levar a excitotoxicidade, inflamação, neurodegeneração e apoptose (Holm et al 2012). Os astrócitos juntamente com a microglia apresentam um papel crucial no processo neuroinflamatório e são reconhecidos como participantes ativos em várias condições patológicas ou doenças neurodegenerativas crônicas (Liu et al 2011).

I. 1.2.3 - S100B

A S100B é um membro da família de proteínas S100 assim denominadas por serem solúveis em uma solução 100% saturada de sulfato de amônio (Moore 1965).

É uma proteína secretada por astrócitos (Shashoua et al 1984), abundante em células gliais do SNC e periférico (SNP) de mamíferos (Donato 1999). Possui efeitos parácrinos e autócrinos nas células gliais, neurônios e microglia. Pode ser encontrada solúvel no citoplasma, associada à membrana plasmática, a outras membranas intracelulares e ao citoesqueleto, o que sugere seu papel em diversos processos celulares (Sorci et al 1998). É uma proteína que atua regulando a fosforilação de proteínas, a atividade enzimática, a homeostase do cálcio e a dinâmica do citoesqueleto. A S100B reduz a fosforilação de algumas proteínas, como por exemplo, a GFAP (proteína ácida fibrilar glial), o que deve refletir a interação da S100B com resíduos no domínio N-terminal destas proteínas (Bianchi et al 1996). Embora sua função ainda não esteja bem estabelecida, estudos sugerem que a S100B apresente um papel na transdução de sinal, por ligar a elevação do cálcio citosólico ao estado de fosforilação de importantes proteínas alvo. Portanto, a S100B, através da fosforilação proteica, pode ser uma forma de regular passos específicos nas vias de sinalização (Donato 2001).

Por sua capacidade de interagir com a frutose-1,6-bifosfato aldolase e estimular a fosfoglicomutase acredita-se que a S100B desempenhe algum papel no metabolismo energético (Landar et al 1996). Além disso, a S100B regula a proteína cinase nuclear (Ndr) importante na divisão e morfologia celular (Millwar et al 1998).

Os mecanismos pelos quais a secreção de S100B ocorre ainda não estão completamente elucidados, o que se sabe é que o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) poderia promover a liberação através de vesículas. Contudo, isso ainda é um

enigma visto que o gene dessa proteína não possui domínio sinalizando secreção (Nisshi et al 2000).

A S100B é expressa em um número restrito de tipos celulares como: astrócitos, linfócitos, oligodendrócitos maduros, células progenitoras neurais, certas populações neuronais, adipócitos entre outras.

Estudos recentes mostram a S100B como um útil marcador molecular e periférico de ativação astrogliar em desordens cerebrais e que seu conteúdo está associado a várias doenças psiquiátricas e neurológicas (Rothermund et al 2003 e Sem et al 2007) apresentando aumento na sua expressão em vários tumores, no cérebro de idosos, no cérebro de pacientes afetados pela doenças de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia crônica, infecção por HIV entre outras condições (Donato et al 2009). Além disso, estudos mostram que a IL-1 β modula a secreção de S100B em cultura de astrócitos de fatias de hipocampo (de Souza et al 2009) e que existem evidências de que S100B modula e é modulada por citocinas pró-inflamatórias (Kim et al 2004, Bianchi et al 2010 e Ponath et al 2007).

I. 1.2.4 – Proteína ácida fibrilar Glial (GFAP)

A GFAP, constitui o principal componente estrutural de astrócitos de indivíduos adultos (Sofroniew & Vinters 2010), visto que está presente nos filamentos intermediários do citoesqueleto celular, de astrócitos e algumas outras células (Eng & Ghirnikar 1994, Cullen 1997). A fosforilação de sítios específicos da GFAP, regula o equilíbrio dinâmico entre seu estado polimerizado e despolimerizado, desempenhando papel importante na mitose (Rodnight et al 1997). Um estudo *in vitro*, mostrou que a

S100B atua na regulação do sistema fosforilante da GFAP, reduzindo sua fosforilação (Ziegler et al 1997). A fosforilação de proteínas mostra-se de fundamental importância visto que é um processo pelo qual sinais extracelulares, tanto no SNC, quanto nos demais tecidos, produzem seus efeitos biológicos, através da transdução de sinal (Nestler e Greengard 1993).

Estudos realizados com ratos transgênicos mostraram que a expressão de GFAP não é fundamental para a aparência e função normal da maioria dos astrócitos no SNC saudável, mas é importante para o processo de astrogliose reativa, que é caracterizada pela proliferação de astrócitos ou hipertrofia astrocítica, o maior fenômeno de muitas condições patológicas do SNC e pela formação de “cicatriz” glial (Sofroniew & Vinters 2010). Além disso, o aumento no imunoconteúdo de GFAP, independentemente de haver ou não proliferação astrogliosa, é comumente usado como medida de astrogliose (Sofroniew & Vinters 2010).

A astrogliose ocorre em condições extremas envolvendo injúria cerebral (Tramontina et al 2007). Estudos mostram que os astrócitos respondem ao LPS aumentando a expressão de GFAP (Vergara et al 2010, Brahmachari et al 2006)

Middeldorp & Hol em 2011, através de estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a GFAP participa de outros processos como migração celular, funcionamento adequado da BHE, vias de transdução de sinal e interações neurônio-glia.

I. 1.3 - Metabolismo energético

I. 1.3.1 - Rede fosforiltransferência

Para que haja um equilíbrio entre o consumo e a geração de ATP é necessário que os mecanismos intracelulares responsáveis por esse processo estejam perfeitamente alinhados (Dzeja et al 2003).

A função de transferir grupos fosforil é executada por uma rede de enzimas intracelulares, catalisada principalmente pela creatina cinase (CK – E.C. 2.7.3.2), adenilato cinase (AK – E.C. 2.7.4.3) e enzimas glicolíticas, como a hexocinase (HK). A perfeita regulação dessas enzimas permite que o sistema celular bioenergético produza o ATP e o entregue a seus consumidores à taxa correspondente à velocidade de consumo (Dzeja et al 2000).

I. 1.3.1.1- Creatina cinase

O encéfalo contém altos níveis de CK, uma enzima que catalisa uma reação reversível, onde o ATP é regenerado a partir de ADP e fosfocreatina, uma forma de reserva energética (Wallimann & Hemmer 1994). Segundo a reação: Creatina + ATP \leftrightarrow Fosfocreatina (PCr) + (ADP), definida como sistema PCr/CK (Lowe et al 2013). Essa reação desempenha papel fundamental no metabolismo energético celular de tecidos com alta demanda energética, como cérebro e músculos cardíaco e esquelético.

Há diversas isoformas da enzima na célula, contudo, as principais são a citosólica (CKcit), mitocondrial (CKmit), muscular (CK – MM) e a cerebral (CK – BB). As isoenzimas da CKcit são sempre co-expressas em tecidos específicos junto com a isoforma mitocondrial. A interação entre essas duas isoformas é de fundamental importância na homeostasia energética celular (Silva et al, 2003).

As isoformas são exibidas dentro da célula de forma compartimentada, onde a energia liberada é captada (glicólise e mitocôndria) ou utilizada (ATPases e cinases no

citossol) e são unidas, funcional e estruturalmente pelo circuito da fosfocreatina (PCr), formando assim um sistema intracelular de distribuição de energia (Wallimann et al 1992).

O sistema PCr/CK desempenha múltiplas funções integradas nas células do encéfalo, tais como, tampão energético temporário, capacidade metabólica de transferência de energia e controle metabólico (Saks et al 1996).

Além disso, alterações na atividade da CK vêm sendo associadas a condições patológicas do encéfalo relacionadas com déficit de energia. Em condições anóxicas a adição de creatina aumenta os níveis de PCr reduzindo a queda de ATP, a liberação de cálcio (Ca^{2+}) e a morte celular (Carter et al 1995). Alguns estudos têm demonstrado que a atividade da enzima é severamente reduzida em diversas doenças neurodegenerativas (David et al 1998, Aksenov et al 2000). Em doenças onde a disfunção energética é comumente observada, tais como a doença de Huntington, a creatina apresenta um efeito neuroprotetor.

I. 1.3.1.2 - Adenilato cinase

Enzima responsável pela interconversão de ATP, ADP e AMP (Pucar et al 2000). Reação catalisada pela AK:



Catalisando a troca de grupos fosforila entre nucleotídeos e a sinalização de AMP, a AK regula a atividade de enzimas da glicólise e glicogenólise, integrando ambas as rotas e assim uma rápida resposta a flutuações na demanda de energia pelos

tecidos. Portanto, a AK tem um papel fundamental dentro do sistema de regulação metabólica, coordenando componentes de rede bioenergética celular (Dzeja et al 2009).

A enzima potencializa o papel energético do ATP por ter habilidade de regenerar o ATP a partir de dois ADP e também pela regulação dos processos envolvendo os nucleotídeos adenina.

Juntamente com a CK e a piruvato cinase (PK), a AK é responsável pela rede fosforiltransferência, atuando na transferência de grupamento fosforil do ATP da mitocôndria para o citosol, garantindo assim, o fluxo de energia para os locais de demanda energética, uma vez que o ATP parece ser pouco difundido pela célula após ser produzido (Ames 2000). Alguns trabalhos têm demonstrado que quando a atividade de uma delas (CK e AK) é diminuída, a atividade da outra aumenta (Dzeja et al 2002, Dzeja et al 2003).

I. 1.3.1.3 - Hexocinase

Enzima localizada no citosol, que catalisa a primeira reação da via glicolítica (Marks et al 2007). A enzima está presente em quase todas as células do organismo, ainda que sob outras formas, como a glicocinase, no hepatócito. A hexocinase cerebral está ligada associada à membrana mitocondrial externa e o ADP produzido pela enzima controla o potencial de membrana e a geração de espécies reativas (Da Silva et al 2004). Essas isoenzimas são codificadas por genes diferentes, tendo propriedades cinéticas regulatórias variadas (Nelson e Cox 2008).

A enzima utiliza ATP como doador de fosforil ao grupo carbono 6 da glicose, formando a glicose-6-fosfato (Nelson e Cox 2008).

Além disso, a atividade da HK controla a síntese de ATP e a apoptose no cérebro (Da Silva et al 2004).

I. 1.3.2 - Complexos respiratórios e fosforilação oxidativa

A fosforilação oxidativa é o principal processo de produção de ATP nas células que possuem mitocôndrias. Na ausência de hipóxia esse processo é dependente de ATP, ADP e fosfato inorgânico (Pi) e da razão mitocondrial NADH/NAD⁺, que é determinada pela atividade da cadeia de transporte de elétrons e pela transferência de elétrons provenientes de reações catalisadas por enzimas mitocondriais (Erecinska e Silver 1994).

A cadeia de transporte de elétrons é composta por vários complexos enzimáticos e uma coenzima lipossolúvel, a coenzima Q ou ubiquinona. O complexo I transfere os elétrons do NADH para a ubiquinona. O complexo II (succinato: ubiquinona oxirredutase) reduz a ubiquinona com elétrons do FADH₂ provenientes da oxidação do succinato a fumarato no ciclo do ácido cítrico. O complexo III catalisa a redução do citocromo c a partir da ubiquinona reduzida. Por fim o complexo IV (citocromo c oxidase) catalisa a transferência de elétrons de moléculas reduzidas de citocromo c para O₂, formando H₂O. A cadeia transportadora de elétrons, composta pelos quatro complexos citados anteriormente mais o complexo V (ATPase) recebe elétrons das coenzimas NADH e FADH₂ e os transfere através de uma série de reações de oxidação-redução até o oxigênio molecular e simultaneamente acopla essa reação exergônica à translocação de prótons através de membrana mitocondrial interna (Wallace 1999).

O fluxo de elétrons através dos complexos da cadeia respiratória é acompanhado pelo bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana, através dos complexos I, III e IV, gerando um potencial de membrana. Esse gradiente eletroquímico gerado transmembrana leva a formação de ATP a partir de ADP e Pi pelo complexo V (Wallace 1999).

I. 1.4 - Espécies reativas e estresse oxidativo

O termo espécies reativas (ER) é utilizado para denominar, tanto espécies químicas radicais, como, não radicais que são agentes oxidantes e/ou facilmente convertidas em radicais. Como exemplos de EROS e de nitrogênio (ERNs), existe os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila ($\cdot OH$) e óxido nítrico (NO^{\cdot}) e os não radicais que são agentes de oxidação e/ou facilmente convertidos em radicais como o ácido hipocloroso (HOCL), o ácido hipobromoso (HOBr), o ozônio (O_3), o peróxido nitrito ($ONOO^-$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O radical livre é uma espécie química que contém um ou mais elétrons desemparelhados, o que os torna altamente reativos e capazes de reagir com qualquer outro composto situado próximo à sua órbita externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora de elétrons (Valko et al 2007).

Por estarem em constante produção durante os processos metabólicos, as ER atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções importantes no metabolismo. As principais fontes de ER são as organelas citoplasmáticas que metabolizam o oxigênio, nitrogênio e o cloro, gerando grande quantidade de metabólitos (Shami et al 2004).

A produção contínua de ER durante os processos metabólicos culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante. Estes têm o objetivo de limitar

os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes (Shami et al 2004, Ferreira et al 1997). Uma diminuição dos níveis de antioxidantes, em decorrência, por exemplo, de mutações que afetam as atividades das enzimas de defesa antioxidantes tais como, cobre-zinco superóxido dismutase (CuZnSOD), glutathione peroxidase (GPX), ou toxinas que destroem as defesas antioxidantes, pode resultar em estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode causar dano em diferentes tipos de biomoléculas, incluindo o DNA, proteínas e lipídios (Koury et al 2003).

A geração de radicais livres (RL), normalmente acontece nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma e podem ser favorecidos pelos íons ferro e cobre (Green et al 2004). O O_2 sofre redução, na mitocôndria, formando água (H_2O). Contudo, cerca de 2% a 5% do O_2 metabolizado são desviados para outras vias metabólicas e sua redução dá origem a RL (Ferreira et al 1997, Koury et al 2003, Schneider et al 2004). Na mitocôndria, os complexos I (NADH desidrogenase) e III (citocromo b-c1) são os principais locais onde acontece a redução do O_2 e o vazamento de elétrons gerando $O_2^{\cdot-}$, na cadeia de transporte de elétrons (Cadenas et al 1977).

O H_2O_2 pode participar da reação de Fenton, onde reage com ferro (Fe^{2+}) formando Fe^{3+} e $\cdot OH$ e a reação de Haber-Weiss em que H_2O_2 e O_2 também formam $\cdot OH$ (Anderson 1996). O $\cdot OH$ é a espécie mais reativa a todas as biomoléculas reagindo com bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucleicos, além de carboidratos e ácidos graxos poliinsaturados (Halliwell 2000).

2. OBJETIVOS

I. 2.1 - Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da Pro, quando administrada de forma subcutânea crônica isolada e quando coadministrada ao LPS, sobre diversos parâmetros inflamatórios, de estresse oxidativo e de homeostase energética em homogeneizado de córtex cerebral e cerebelo, de animais jovens.

I. 2.2 - Objetivos específicos

1. Verificar o efeito da administração crônica de Pro e LPS isolados e coadministrados sobre a expressão de S100B e GFAP.
2. Verificar o efeito da administração crônica de Pro e LPS isolados e coadministrados sobre parâmetros de estresse oxidativo: TBA-RS, CAT e sulfidrilas.
3. Verificar os efeitos da administração crônica de Pro e LPS isolados e coadministrados sobre algumas enzimas da rede fosforiltransferência: creatina cinase (porção mitocondrial e citosólica), adenilato cinase e hexocinase.
4. Verificar os efeitos da administração crônica de Pro e LPS isolados e coadministrados sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial.

PARTE II

ARTIGO

A Possible Anti-Inflammatory Effect of Proline in the Brain Cortex and Cerebellum of Rats

Vivian Strassburger Andrade¹ · Denise Bertin Rojas¹ ·
Rodrigo Binkowski de Andrade¹ · Tomas Duk Hwa Kim¹ · Adriana Fernanda Vizuete¹ ·
Ângela Zanatta¹ · Moacir Wajner¹ · Carlos-Alberto Saraiva Gonçalves¹ ·
Clovis Milton Duval Wannmacher¹

Received: 30 November 2016 / Accepted: 19 May 2017
© Springer Science+Business Media New York 2017

Abstract Although many studies show the toxic effects of proline, recently it has been reported some anti-inflammatory effect of this amino acid. Our principal objective was to investigate the effects of proline on the alterations caused by LPS (lipopolysaccharide) administration in the cerebral cortex and cerebellum of young Wistar rats. The animals were divided into four groups: control (0.85% saline); proline, (12.8 μmol of proline/g body weight from day 7 to 13; 14.6 μmol of proline/g body weight from day 14 to 17 and 16.4 μmol of proline/g body weight from day 18 to 21); LPS (1 mg/g body weight); LPS plus proline. The animals were killed at 22 days of age, 12 h after the last injection, by decapitation without anesthesia. The brain cortex and cerebellum were separated for chemical determinations. The effects of proline and LPS in the cerebral cortex and cerebellum on the expression of S100B and GFAP, oxidative stress parameters, enzymes of phosphoryl transfer network activity, and mitochondrial respiration chain complexes were investigated. Two-way ANOVA showed that the administration of proline did not alter the analyzed parameter in cerebral cortex and cerebellum. On the other hand, LPS administration caused a change in these parameters. Besides, the co-administration of proline and LPS showed the ability of Pro in preventing the effects of LPS. These results indicated that LPS induces inflammation, oxidative stress, and alters energy parameters in cerebral cortex and cerebellum of the rats. Moreover, co-administration of Pro was able to prevent these harmful effects of LPS.

Keywords Lipopolysaccharide · Oxidative stress · Proline · Phosphoryl transfer network · Hyperprolinemia

Introduction

Proline (Pro) and its metabolite (hydroxyproline) are different amino acids both chemically and biochemically [1, 2]. Because of the pyrrolidine ring, Pro cannot be metabolized by the normal amino acid enzymes aminotransferases, decarboxylases, and racemases [3, 4]. Instead, a special family of enzymes evolved with their subcellular localizations and mechanisms of regulation for metabolizing Pro.

Tissue and fluid concentrations of Pro are primarily related to the balance between the enzymatic activities of the proline-oxidizing enzyme (POX) and Δ -1-pyrroline-5-carboxylate (P5C) reductase. There are now at least six enzymes, three transporters, and seven structural genes are known to be directly involved in the interconversions of Pro and its immediate metabolites [5, 6]. Inborn errors of Pro metabolism can result from a disturbance of P5C-associated enzyme activity.

Many studies show deleterious effects of Pro [2]; some already bring it use as protective against oxidative stress and apoptosis. Li et al., [7] showed that glutamine metabolites, alanine, citrulline, and Pro effectively suppressed reactive oxygen species (ROS) generation, cytochrome c release, and activation of caspase-3, caspase-8, and caspase-9 at the physiological concentrations. Besides, Pro prevented Ca^{2+} influx, calpain activation, DNA damage, the degradation of the cytoskeleton, oxidation of membranes, and increased activity of anti-hydroxyl radical in OH-induced fish erythrocytes.

It is known that the in vivo damage of biomolecules is initiated by ROS in a process known as oxidative stress or via a nonradical pathway, for example, by hydrogen peroxide

✉ Clovis Milton Duval Wannmacher
clovisdw@ufrgs.br

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600, Anexo, Porto Alegre, RS CEP 90.035-003, Brazil

(H₂O₂). Free radicals (FRs) may be generated under normal and pathological conditions. Due to the presence of an unpaired electron, FRs are highly unstable and tend to react with cellular elements. Particularly, the most reactive hydroxyl radical (•OH), when generated in excess, causes cellular damage leading to cell death [8]. In living organisms, there are two major ROS, superoxide radical (O₂^{•-}) and •OH that are being continuously formed in the process of reduction of oxygen to water. Hydroxyl radical is generated via the Fenton reaction from H₂O₂ in the presence of ferrous ions or via the Haber-Weiss reaction from H₂O₂ and O₂⁻ [9]. The requirement of H₂O₂ in the Fenton reaction led to the misleading concept of oxidative stress that ignores the fact that •OH, known to be the most biologically active FR, is formed *in vivo* under hypoxic conditions [10].

Oxidative stress and inflammation may be implicated in the pathophysiology of numerous diseases such as cancer, diabetes, obesity, cardiovascular, and neurological disorders [11, 12]. The bacterial endotoxins, lipopolysaccharides (LPS) a component of the cell wall of gram-negative bacteria, induce inflammatory and oxidative/nitrosative stress *in vitro* and *in vivo* [13, 14]. The bacterial endotoxin, LPS, regulates the inflammatory and toxic responses in tissues [15, 16]. Alterations in this inflammatory response have been reported in different tissues in response to pharmacological interventions [17, 18]. LPS increases the production of cytokines and prostaglandin E₂ (PGE₂) leading to increased inflammatory response. It also induces cytotoxicity through the production of ROS and reactive nitrogen species (RNS) [15, 19]. Raza et al. [20] shown that LPS treatment results in increased oxidative and nitrosative stress suggesting mitochondrial dysfunction, diminishing ATP synthesis.

Considering that Pro may have opposing effects on the intracellular redox environment; the intracellular accumulation of Pro may be an adaptive stress response that affords oxidative stress and apoptosis protection in certain mammalian cells [21]. The aim of this study was to investigate the effects of Pro on the alterations caused by LPS administration on some oxidative stress parameters, the activity of phosphoryl transfer network enzymes, and the activity of respiratory chain complexes in the cerebral cortex and cerebellum of young Wistar rats.

Materials and Methods

Animals and Chemicals

Twenty-four Wistar rats obtained from the Department of Biochemistry, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil were used in the experiments. Rats were kept with dams while receiving the drugs until they were sacrificed. The dams had free access to water and a commercial chow (Supra, Porto

Alegre, RS, Brazil) containing 20.5% protein (predominantly soybean supplemented with methionine), 54% carbohydrate, 4.5% fiber, 4% lipids, 7% ash, and 10% moisture. The animals were maintained at a room acclimatized at constant temperature (22 ± 1 °C), with a 12–12 h light-dark cycle. The “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication 85–23, revised 1996, <http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/>) were followed in all the experiments. This protocol was approved by the Ethics Committee For Animal Investigation of the Federal University of Rio Grande do Sul. All Chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

Chronic Treatment

Pro was administered, daily, subcutaneously, from 7th to the 21st day of life. Pro was dissolved in 0.85% saline and buffered to pH 7.4 with NaOH. Rats were randomly separated into four groups. Volumes of 10 µL per g of body weight were used for each substance administered. Animals received twice a day at a 12-h interval, subcutaneous administration of Pro or saline, intraperitoneal administration of LPS, or subcutaneous and intraperitoneal administration of Pro+ LPS, respectively. The four groups were: control, proline, LPS, and proline+ LPS. Pro, LPS, and saline solutions were buffered to pH 7.4. Dose used of Pro were: 12.8 µmol of Pro/g body weight, during the first 7 days of treatment, from day 14 to 17 they received 14.6 µmol of Pro/g body weight and from day 18 to 21 they received 16.4 µmol of Pro/g body weight. Pharmacokinetic parameters were used for the calculation of Pro doses to achieve plasma levels between 1.2 and 1.5 mM and brain Pro concentrations between 0.2 and 0.5 mM, 60 min after the injection [22]. Dose used of LPS was 1 mg/kg of body weight. The animals were killed at 22 days of age, 12 h after the last injection, by decapitation, without anesthesia. The brain cortex and cerebellum were separated for chemical determinations. These structures were chosen because are altered in the patients.

Preparation of Brain Tissue

After decapitation, the brain was immediately removed and dissected on a glass dish over ice. The cerebral cortex and cerebellum isolated were homogenized with 140 mM KCL buffer (pH 7.4) (1:10 *w/v*) and 20 mM sodium phosphate and centrifuged at 800×g for 10 min at 4 °C for the measurements of the oxidative stress parameters.

For assays of the enzymes of phosphoryl transfer network, the cerebral cortex and cerebellum were homogenized in SET buffer (0.32 M sucrose, 1 mM EGTA, 10 mM Tris-HCL, pH 7.4) (1:10 *w/v*). The homogenate was centrifuged at 800×g for 10 min at 4 °C. Part of the supernatant was used for determination of AK activity; the pellet was discarded, and

the supernatant was centrifuged at $10,000\times g$ for 15 min at 4°C . The supernatant of this second centrifugation, containing cytosol and others cellular components as endoplasmic reticulum, was collected for determination of cytosolic CK activity. The pellet, containing mitochondria, myelin, synaptosomes, and membrane fragments was washed twice with the same SET buffer, resuspended in 100 mM Trizma—15 Mm MgSO_4 —buffer, pH 7.5, for determination of mitochondrial CK activity.

Measurements of Inflammatory Parameters

S100B Measurement

S100B, a calcium-binding protein, is considered an inflammatory cytokine, and a marker of astroglial activation in various brains disturbs. S100B was measured by ELISA, as described [23]. Briefly, 50 μL of sample plus 50 μL of Tris buffer were incubated for 2 h on a microtiter plate coated with monoclonal anti-S100B. Polyclonal anti-S100B was incubated for 30 min, and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for a further 30 min. Color reaction with o-phenylenediamine was measured at 492 nm. Data are expressed as ng/mL.

GFAP Measurement

GFAP is a specific marker of astrocytes, and its elevation is considered a sign of astrogliosis, a consequence of brain damage. ELISA for GFAP was carried out as previously described [24] by coating microtiter plates with 100 μL of samples for 24 h at 4°C . Incubation initiated with a polyclonal anti-GFAP from rabbit for 1 h and was followed by incubation with an antibody conjugated with peroxidase for 1 h, at room temperature. A colorimetric reaction with o-phenylenediamine was measured at 492 nm. Data are expressed as ng/mL.

Measurements of Oxidative Stress Parameters

Thiobarbituric Acid Reactive Substances Measurement (TBA-RS)

TBA-RS levels were measured according to by Ohkawa et al. [55] with slight modifications. TBA-RS measures mainly malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation caused mostly by hydroxyls free radicals. Hydroxyls free radicals are mainly formed from H_2O_2 by the iron-catalyzed Fenton reaction or by the Haber-Weiss reaction [25]. The samples and reagents were added in the following order: 200 μL of tissue supernatant; 50 μL of 8.1% SDS (sodium dodecyl sulfate); 375 μL of 20% acetic acid in aqueous solution (v/v) pH 3.5; 375 μL of 0.8% thiobarbituric acid (TBA). The mixture was mixed, and the reaction was carried out in

boiling water for 5 min and was centrifuged at $750\times g$ for 10 min. TBA-RS were determined spectrophotometrically at 532 nm. A calibration curve was generated using 1,1,3,3-tetra methoxypropane as a standard. TBA-RS were expressed as nmol of TBA-RS per mg of protein.

Total Sulfhydryl Content

The sulfhydryl assay is a method where reduction of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, generating a yellow derivative (TNB) (thionitrobenzoic acid), whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm and was performed according to a previously published method of Aksenov [26]. Alteration of the total sulfhydryl content may correlate to oxidation of nonprotein compounds indicating oxidative damage to proteins. The results were expressed as nmol of TNB per mg of protein.

Catalase (CAT) Activity

CAT activity was assayed according to Aebi [27] by measuring the absorbance decrease at 240 nm of H_2O_2 . The reaction medium contained 20 mM H_2O_2 , 0.1% Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, and 10 μL of supernatants. CAT is responsible for the transformation of H_2O_2 in H_2O . This peroxide can react with thiol and methionyl groups of proteins, and from the high reactive $\bullet\text{OH}$. One CAT unit is defined as 1 μmol of H_2O_2 consumed per min. The specific activity is expressed as CAT units per mg of protein.

Superoxide Dismutase (SOD) Activity

SOD is responsible for the dismutation of O_2^- in HO_2 , a less reactive substance. SOD activity was determined as describe earlier [28]. This assay is based on the autoxidation of pyrogallol in the presence of superoxide radical. SOD inhibits this autoxidation, whose activity can be assayed spectrophotometrically at 420 nm. Purified SOD was used as standard. One unit of SOD corresponds to 50% inhibition of pyrogallol autoxidation. The specific activity was expressed as SOD units per mg of protein.

Measurements of Parameters of Phosphoryl Transfer Network

Hexokinase Activity

Hexokinase activity is one of the enzymes responsible for the uptake of glucose by the cells. The activity of mitochondrial bound hexokinase was determined based on a previously described method with minor modifications [29]. Briefly, the assay medium contained 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 mM Ap5A (inhibitor of adenylate kinase), 1 mM NAD, 5 mM D-

glucose, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, and one unit/mL Glc-6-P dehydrogenase in a final volume of 1 mL. The reaction temperature was 37 °C. ATP generated in the mitochondria was used to measure the mt-hexokinase activity. The standard respiration buffer supplemented with 2 mM succinate and 0.1 mM ADP was then added. The mitochondrial protein was set at 0.1–0.2 mg/mL.

Creatine Kinase

Creatine kinase has two forms, one mitochondrial, and the other cytosolic. The two enzymes act together for the transport of the phosphoryl group formed in the mitochondria to the cytosol. CK activity was assayed in the reaction mixture contained the following final concentrations: 65 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 9 mM MgSO₄, 7 mM phosphocreatine, and 1 µg of protein in a final volume of 0.1 mL. After 10 min of pre-incubation at 37 °C, the reaction was started by the addition of 0.3 µmol of ADP and was stopped with 1 µmol of p-hydroxymercuribenzoic acid. The creatine formed was measured according to Hughes [30]. The results were expressed as µmol of creatine formed per min per mg of protein.

Adenylate Kinase

Adenylate kinase activity is crucial for the interconversion between ATP, ADP, and AMP. AK activity was estimated by a coupled enzyme assay with hexokinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD), according to Dzeja [31]. The reaction contained 100 mM KCl, 20 mM glucose, 20 mM HEPES, 2 mM NADP⁺, 4 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 4.5 U/mL of HK, 2 U/mL of G6PD, and 1 µg of protein homogenate. The reaction was initiated by the addition of 2 mM ADP, and the reduction of NADP⁺ was followed at 340 nm for 3 min in a spectrophotometer. Reagents concentration and assay time (3 min) were chosen to assure the linearity of the reaction. The results were expressed in µmol of ATP formed per min per mg of protein.

Determination of the Respiratory Chain Complex Activities

The respiratory chain complexes are responsible for the mitochondrial synthesis of ATP. The activities of the respiratory chain enzyme complexes succinate-2,6-dichlorophenolindophenol-oxireductase (complex II) and succinate: cytochrome c oxidoreductase (complex II + CoQ + complex III) were determined in brain cortex homogenates according to the method of Fischer [32]. The activity of complex IV (COX) was measured according to Rustin [33]. Succinate/phenazine methosulfate oxidoreductase (succinate dehydrogenase-SDH) activity was

measured according to Sorensen and Mahler [34]. Briefly, the assays for measuring complex activities were as follows: complex I + III—20 mM phosphate buffer, pH 8.0, 200 mM KCN, 1 mM NADH, 2 mM cytochrome c, 1 mM EDTA, 2 mM rotenone, and 5 µL of the homogenate in a final volume of 980 µL. Complex II + III—62.5 mM phosphate buffer, pH 7.4, 2 mM cytochrome c, 100 mM sodium azide, 2 mM rotenone, 250 mM sodium succinate, and 20 µL of the homogenate in a final volume of 602 µL. Complex II and SDH—62.5 mM phosphate buffer, pH 7.4, 100 mM sodium azide, 2 mM rotenone, 250 mM sodium succinate, 0.5 mM DCIP, 24 mM phenazine methosulfate, and 20 µL of homogenate in a final volume of 577 µL for complex II and 602 µL for SDH assay. Complex IV—10 mM phosphate buffer, pH 7, Mol Neurobiol 125 mM dodecyl maltoside, 2 mM cytochrome c, and 1 µL of the homogenate in a final volume of 1021 µL. Assays were carried out at 25 °C. Complex II, and SDH activities were determined by measuring DCIP reduction at 600 nm in a double beam spectrophotometer. Complex II + III activities were determined by measuring cytochrome c reduction at 600 nm and complex IV by measuring cytochrome c oxidation at 600 nm. Results of complex II are expressed as nmol of DCIP reduction per min per mg of protein; the results of complex II–III are expressed as nmol of cytochrome c reduction per min per mg of protein; the results of complex IV activity are expressed as nmol of cytochrome c oxidation per min per mg of protein; the results of succinate dehydrogenase (SDH) activity are expressed as nmol of DCIP reduction per min per mg of protein.

Protein Determination

Protein content was determined by the method of Lowry et al. [56] using bovine serum albumin as the standard.

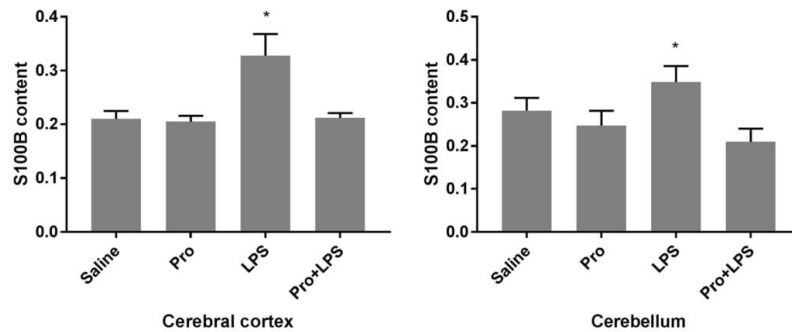
Statistical Analysis

Data were expressed as mean ± SD and were analyzed by two-way ANOVA. When appropriate, the comparison between means was analyzed by the Tukey test when the *F* value was significant. Data were analyzed by using the Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS). Values were considered significant when *p* < 0.05.

Results

The effects of Pro and LPS in the cerebral cortex and cerebellum on the activity of the expression of S100B and GFAP, oxidative stress parameters, enzymes of phosphoryl transfer network, and mitochondrial respiration chain complexes were

Fig. 1 Effects of proline (Pro) and lipopolysaccharide (LPS) administration on the S100B content in cerebral cortex and cerebellum of Wistar rats. Data are mean \pm SEM for seven animals in each group and are expressed as ng/mL. A single asterisk indicates $p < 0.05$ compared to the other groups (two-way ANOVA)

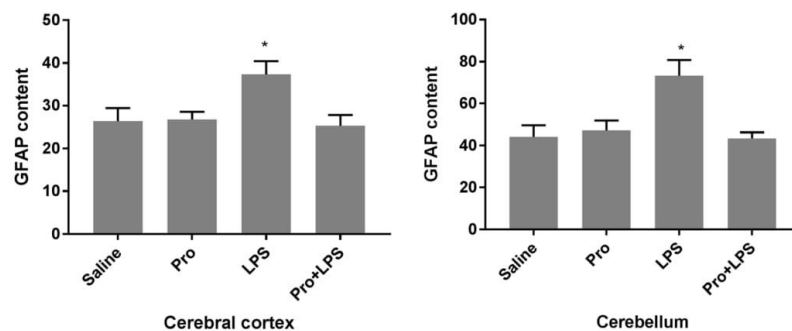


investigated. Two-way ANOVA showed that the administration of Pro did not alter the analyzed parameter in cerebral cortex and cerebellum. On the other hand, LPS administration caused a change in these parameters. Besides, the co-administration of Pro and LPS showed the capacity of Pro in preventing the effects of LPS.

S100B and GFAP Expression

First, we evaluated the secretion of S100B and the expression of GFAP to confirm the inflammation induction. Two-way ANOVA showed that the S100B expression was significantly increased in cerebral cortex and cerebellum (Fig. 1) by the LPS administration. Interaction between Pro and LPS indicated that the co-administration of Pro prevented these effects in the two tissues: cerebral cortex $F(1,21) = 6.11$; $p < 0.05$ and cerebellum $F(1,21) = 5.19$; $p < 0.05$. LPS administration increased GFAP expression in cerebral cortex and cerebellum (Fig. 2) and the significant interaction between Pro and LPS indicated that Pro administration prevented these effects in cerebral cortex $F(1,21) = 5.26$; $p < 0.05$ and cerebellum $F(1,21) = 8.47$; $p < 0.05$. The increase in S100B and GFAP are indicative of inflammation induced by LPS administration.

Fig. 2 Effects of proline (Pro) and lipopolysaccharide (LPS) administration on the GFAP content in cerebral cortex and cerebellum of Wistar rats. Data are mean \pm SEM for seven animals in each group and are expressed as ng/mL. A single asterisk indicates $p < 0.05$ compared to the other groups (two-way ANOVA)



Oxidative Stress Parameters

Two-way ANOVA showed that SOD activity in cerebral cortex $F(1,21) = 0.86$; $p > 0.05$ and cerebellum $F(1,21) = 0.55$; $p > 0.05$ was not affected by LPS or Pro administration. On the other hand, the administration of LPS increased significantly CAT activity in cerebral cortex and cerebellum (Fig. 3). Significant interaction between Pro and LPS indicated that Pro was effective in prevent the effect of the administration of LPS in cerebral cortex $F(1,21) = 6.75$; $p < 0.05$ and cerebellum $F(1,21) = 4.47$; $p < 0.05$. The lipids damage was evaluated by TBA-RS levels. Two-way ANOVA suggested that LPS administration caused an increase in TBA-RS content in cerebral cortex and cerebellum (Fig. 4). Co-administration of Pro prevented these effect in the cerebral cortex $F(1,21) = 8.38$; $p < 0.05$ and cerebellum $F(1,21) = 7.68$; $p < 0.05$. LPS administration increased the total sulfhydryl content in cerebral cortex and cerebellum (Fig. 5), and the co-administration of Pro prevented this effects in cerebral cortex $F(1,21) = 5.05$; $p < 0.05$ and cerebellum $F(1,21) = 8.30$; $p < 0.05$.

Phosphoryl Transfer Network Parameters

LPS administration increased the AK activity in the brain cortex and cerebellum (Fig. 6). The significant interaction

Fig. 3 Effects of proline (Pro) and lipopolysaccharide (LPS) administration on the catalase (CAT) activity in cerebral cortex and cerebellum of Wistar rats. Data are mean \pm SEM for seven animals in each group and are expressed as units per min per mg of protein. A single asterisk indicates $p < 0.05$ compared to the other groups (two-way ANOVA)

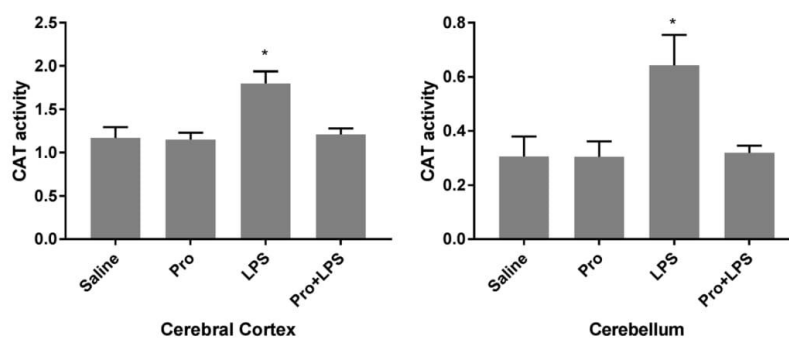
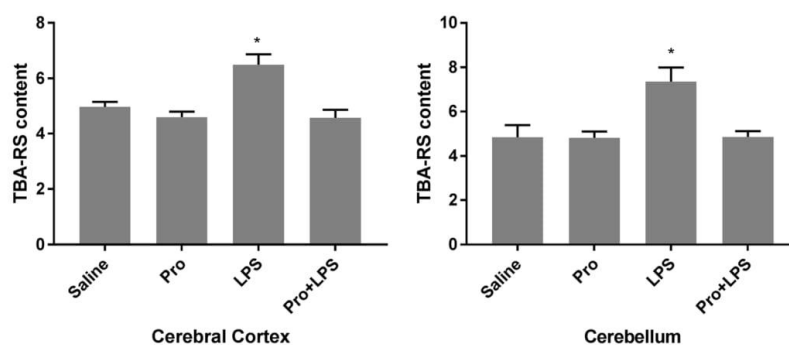


Fig. 4 Effects of proline (Pro) and lipopolysaccharide (LPS) administration on the TBA-RS content in cerebral cortex and cerebellum of Wistar rats. Data are mean \pm SEM for seven animals in each group and are expressed as nmol of TBA (thiobarbituric acid) per mg of protein. A single asterisk indicates $p < 0.05$ compared to the other groups (two-way ANOVA)



between LPS and Pro in the brain cortex $F(1,21) = 8.74$; $p < 0.05$ and cerebellum $F(1,21) = 7.15$; $p < 0.05$ indicated that LPS co-administration prevented the effects of Pro. In respect to CK mit activity, LPS administration increased the enzyme activity in the cerebral cortex and cerebellum (Fig. 7). The significant interaction between LPS and Pro indicated that Pro administration prevented the effect of LPS in the cerebral cortex activity $F(1,21) = 5.03$; $p < 0.05$ and cerebellum $F(1,21) = 8.03$; $p < 0.05$. Cytosolic CK activity was increased by LPS administration in cerebral cortex but not in the cerebellum (Fig. 8). The significant interaction between LPS and

Pro $F(1,21) = 5.57$; $p < 0.05$ indicated that Pro administration prevented LPS effect in brain cortex. LPS administration decreased significantly the HK activity in cerebral cortex and cerebellum (Fig. 9). The co-administration of Pro prevented these effects in cerebral cortex $F(1,21) = 5.75$; $p < 0.05$ and cerebellum $F(1,20) = 8.62$; $p < 0.05$.

Respiratory Chain Complexes

Two-way ANOVA showed that complexes II and III were not affect by the LPS or Pro administration in the brain cortex.

Fig. 5 Effects of proline (Pro) and lipopolysaccharide (LPS) administration on the total sulfhydryl content in cerebral cortex and cerebellum of Wistar rats. Data are mean \pm SEM for seven animals in each group and are expressed as nmol of TNB (thionitrobenzoic acid) per mg of protein. A single asterisk indicates $p < 0.05$ compared to the other groups (two-way ANOVA)

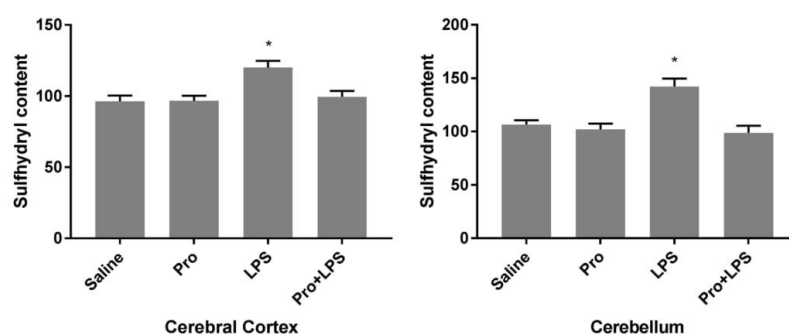


Fig. 6 Effects of proline (Pro) and lipopolysaccharide (LPS) administration on the adenylate kinase activity in cerebral cortex and cerebellum of Wistar rats. Data are mean \pm SEM for seven animals in each group and are expressed as μmol of ATP per min per mg of protein. A single asterisk indicates $p < 0.05$ compared to the other groups (two-way ANOVA)

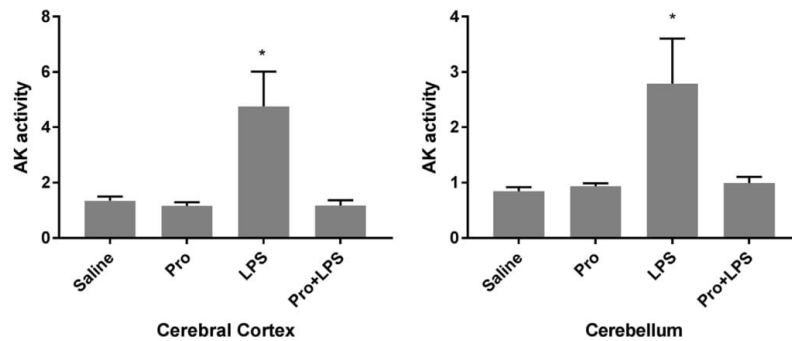
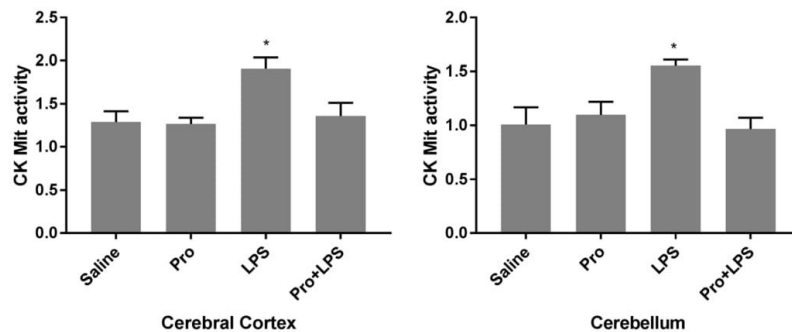


Fig. 7 Effects of proline (Pro) and lipopolysaccharide (LPS) administration on the mitochondrial creatine kinase activity in cerebral cortex and cerebellum of Wistar rats. Data are mean \pm SEM for seven animals in each group and are expressed as μmol of creatine per min per mg of protein. A single asterisk indicates $p < 0.05$ compared to the other groups (two-way ANOVA)



However, LPS administration decreased the activities of complex IV and SDH (Fig. 10). On the other hand, the co-administration of Pro significantly prevented these effects in complex IV $F(1,21) = 8.74; p < 0.05$ and SDH $F(1,21) = 4.98; p < 0.05$.

Discussion

LPS has been widely used experimentally to stimulate inflammatory responses, including in the central nervous system

[35]. The inflammatory response in the brain is primarily mediated by microglia, but growing evidence suggests a crucial importance of astrocytes as well [36]. S100B has properties of a neurotrophic or an inflammatory cytokine. S100B, a calcium-binding protein, has been considered a marker of astroglial activation in several brain disorders. Alterations in its cerebrospinal fluid and/or serum content suggest in various neurological and psychiatric diseases with an inflammatory component in which S100B has often acted as a cytokine [37, 38]. GFAP is a specific marker of astrocytes, and its elevation is considered a sign of astrogliosis, a consequence

Fig. 8 Effects of proline (Pro) and lipopolysaccharide (LPS) administration on the cytosolic creatine kinase activity in cerebral cortex and cerebellum of Wistar rats. Data are mean \pm SEM for seven animals in each group and are expressed as μmol of creatine per min per mg of protein. A single asterisk indicates $p < 0.05$ compared to the other groups (two-way ANOVA)

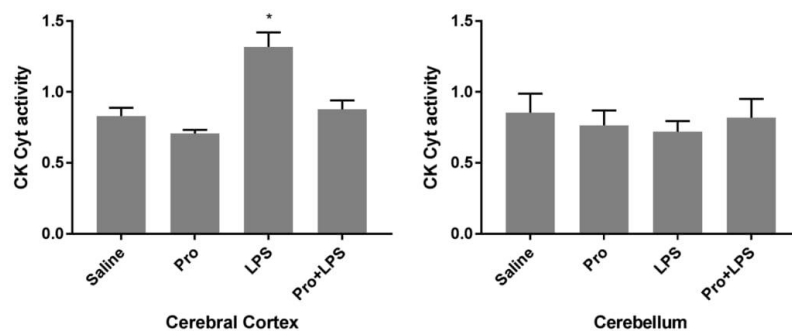
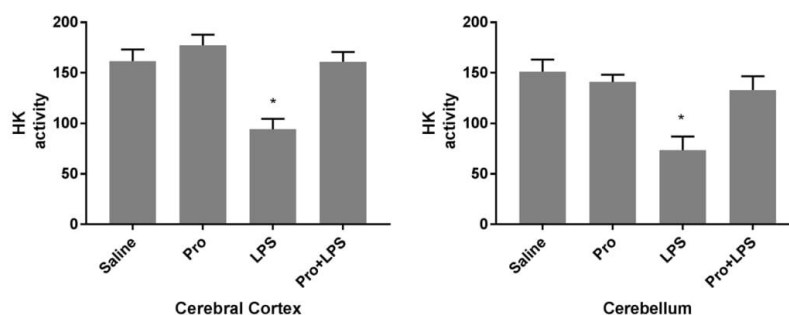


Fig. 9 Effects of proline (Pro) and lipopolysaccharide (LPS) administration on the hexokinase activity in cerebral cortex and cerebellum of Wistar rats. Data are mean \pm SEM for seven animals in each group and are expressed as μ mol of NADH per min per mg of protein. A single asterisk indicates $p < 0.05$ compared to the other groups (two-way ANOVA)



of several conditions involving brain injury [39]. Therefore, the increase in secretion of S100B and expression of GFAP indicates that LPS administration caused inflammation in cerebral cortex and cerebellum. These results agree with previous reports showing that astrocytes respond to LPS administration, increasing expression of proteins, such as GFAP [40, 41] and increase S100B secretion from astrocytes and hippocampal slices [42].

After confirming the inflammatory effects of LPS, we decided to investigate its effects on some stress oxidative parameters. Chronic administration of LPS on lipid and protein oxidation in cerebral cortex and cerebellum of rats was evaluated through of content of TBA-RS and total sulfhydryl. TBA-RS reflects mainly the content of malondialdehyde, the most abundant individual aldehyde resulting from lipid peroxidation [43]. The increase of TBA-RS levels suggests that oxidative damage to lipids has occurred. Lipid peroxidation is a known mechanism that causes alterations in the structure of cell membranes resulting in changes in structure and cell permeability [44]. The sulfhydryl content, an important marker of oxidative protein damage, was increased by LPS administration, in the two tissues. CAT directly catalyzes the decomposition of hydrogen peroxide (H_2O_2) into the water and

molecular oxygen [27]. The activity of SOD, an antioxidant enzyme responsible for metabolizing superoxide anion (O_2^-) to hydrogen peroxide (H_2O_2), was not affected by LPS. Therefore, this study showed that LPS administration was able to increase the activity of CAT, suggesting the accumulation of H_2O_2 . This increase in CAT activity is in agreement with studies showing that this increase can be a consequence of an enzymatic adaptation, since literature describes that antioxidant enzymes can respond to the increase of oxidative stress by increasing its activities, reducing the damage [45]. Moreover, decreasing antioxidant system could cause the accumulation of H_2O_2 or products of its decomposition and O_2^- [46]. Co-administration of proline prevented the effects elicited by LPS administration on oxidative stress, suggesting that this amino acid may act as an antioxidant or anti-inflammatory agent.

Mitochondrial dysfunction and particularly defect of mitochondrial complex-I of the respiratory chain contributes to oxidative stress and neuronal damage [47–49]. LPS did not alter the activity of I–III complexes. On the other hand, we have found that LPS was able to inhibit the succinate dehydrogenase and complex IV activities, suggesting that the mitochondrial respiratory chain was altered in the cerebral cortex

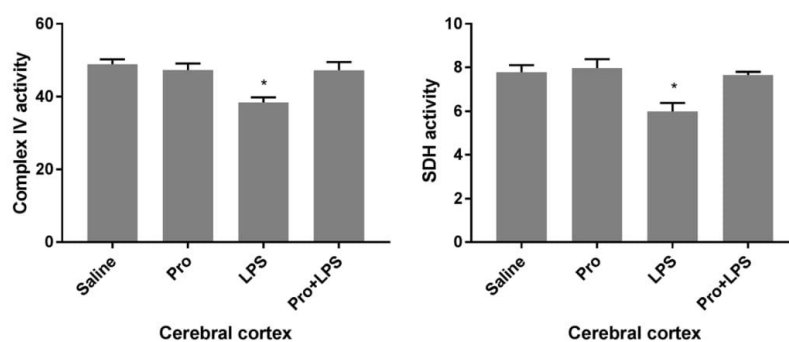


Fig. 10 Effects of proline (Pro) and lipopolysaccharide (LPS) administration on the activities of complex IV and succinate dehydrogenase (SDH) in cerebral cortex and cerebellum of Wistar rats. Data are mean \pm SEM for seven animals in each group and are expressed as

cytochrome c oxidation per min per mg of protein and nmol of dichlorophenolindophenol per min per mg of protein for complex IV and SDH, respectively. A single asterisk indicates $p < 0.05$ compared to the other groups (two-way ANOVA)

of rats. Reduction of the electron transport chain flow (diminution of oxidative phosphorylation) implies lower ATP production to sustain energy needs of the cells. However, we did not analyze these parameters in the cerebellum. Therefore, say that mitochondrial respiration has changed in the cerebellum would be the only speculation based on our results with the cerebral cortex.

Previous studies already demonstrated that kinases are enzymes containing thiol groups in their structure, very sensitive to the action of oxidative stress. Therefore, we evaluated the activity of three kinases important in phosphoryl transfer network: CK, AK, and HK. Our results demonstrated that administration of LPS provokes a diminished hexokinase activity in cerebral cortex and cerebellum. In respect to AK and CK mit, the activities increased in the two tissues, whereas CK cyt activity increased only in the brain cortex. All these findings are very relevant since diminution of one or more activities in the phosphoryl transfer network promotes the increase of the activity of one or more enzymes in an attempt to preserve energetic homeostasis [31, 50, 51]. We also observed that co-administration of proline prevented these effects of LPS in the two tissues. This network contributes to efficient intracellular energetic communication, maintaining the balance between cellular ATP consumption and production preserving cell phenotype and survival under stress [26, 52, 53].

As already shown in our results, proline prevents the effects of LPS administration in cerebral cortex and cerebellum in almost all analyzed parameters. This effect of Pro can be explained based on studies indicating its antioxidant effects [7, 21]. Li et al. [7], proposed that glutamine and its metabolites, including proline, can be used to prevent the formation of $\cdot\text{OH}$. Their results demonstrated that alanine, citrulline, and Pro could protect mammal erythrocytes and nucleated cells against oxidative stress and apoptosis in mammal cells. These results can be explained by the proline cycle. In this cycle, Pro is oxidized to P5C by mitochondrial proline oxidase. P5C is released from mitochondria and is recycled back to proline by P5C reductase with concomitant oxidation of NADPH. This cycle transfer reducing equivalents from NADPH into mitochondria [4]. NADPH-derived reducing equivalents transferred into mitochondria as proline were generated from glucose oxidation, the proline cycle can be linked to the pentose phosphate pathway [4]. Systemic LPS induces oxidative stress, systemic, and brain inflammation. The neuroinflammation is mainly due to glial activation [54]. Alteration of blood-barrier, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress are usually present in the brain. However, the relationship between inflammation and oxidative stress is not fully understood. The results of this work suggest that oxidative stress is the main cause of

the brain inflammation. However, it is not possible to rule out that Pro may have direct effects on the inflammatory process.

In summary, in this study, it was demonstrated that proline was able to prevent several alterations induced by LPS on inflammatory, oxidative stress, and energetic parameters in cerebral cortex and cerebellum of rats. Further experiments may be carried out to confirm these results. If similar findings were achieved in humans, it is feasible to propose that Pro could be used as a potential adjuvant therapy for patients affected by brain diseases involving inflammation.

Acknowledgements This work was supported in part by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS, RS-Brazil).

References

- Hu CA, Khalil S, Zhaorigetu S, Liu Z, Tyler M, Wan G, Valle D (2008) Human Deltal-pyrroline-5-carboxylate synthase: function and regulation. *Amino Acids* 35:665–672
- Kaul S, Sharma SS, Mehta IK (2008) Free radical scavenging potential of L-proline: evidence from in vitro assays. *Amino Acids* 34: 315–320
- Adams E (1970) Metabolism of proline and hydroxyproline. *Int Rev Connect Tissue Res* 5:1–91
- Phang JM (1985) The regulatory functions of proline and pyrroline-5-carboxylic acid. *Curr Top Cell Regul* 25:91–132
- Phang JM, Hu CA, Valle D (2001) Disorders of proline and hydroxyproline metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th edn. McGraw-Hill, New York, pp. 1821–1838
- Mitsubuchi H, Nakamura K, Matsumoto S, Endo F (2008) Inborn errors of proline metabolism. *J Nutr* 138:2016–2020
- Li H, Jiang J, Zhang Y, Wu P, Zhao J, Duan X, Zhou X, Feng L (2016) The metabolites of glutamine prevent hydroxyl radical-induced apoptosis through inhibiting mitochondria and calcium ion involved in fish erythrocytes. *Free Rad Biol Med* 92:96–140
- Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97:1634–1658
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2006) Measurement of reactive species. In: Halliwell B, Gutteridge JMC (eds) *Free radicals in biology and medicine*, 4th edn. Clarendon Press, Oxford, p. 245
- Michiels C (2004) Physiological and pathological responses to hypoxia. *Am J Pathol* 164(6):1875–1882
- Roberts RA, Laskin DL, Smith CV, Robertson FM, Allen EM, Doorn JA et al (2009) Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease. *Toxicol Sci* 112:4–16
- Varga ZV, Giricz Z, Liaudet L, Haskó G, Ferdinandy P, Pacher P (2015) Interplay of oxidative, nitrosative/nitrate stress, inflammation, cell death and autophagy in diabetic cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta* 1852(2):232–242
- Lu Y, Wang X, Cederbaum AI (2005) Lipopolysaccharide-induced liver injury in rats treated with the CYP2E1 inducer pyrazole. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289:G308–G319
- Zhao G, Yu R, Deng J, Zhao Q, Li Y, Joo M et al (2013) Pivotal role of reactive oxygen species in differential regulation of lipopolysaccharide-induced prostaglandins production in macrophages. *Mol Pharmacol* 83:167–178

15. Bykov I, Ylipaasto P, Erola L, Lindros KO (2003) Phagocytosis and LPS-stimulated production of cytokines and prostaglandin E2 is different in Kupffer cells isolated from the periportal or perivenous liver region. *Scand J Gastroenterol* 38:1256–1261
16. Su GL (2002) Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of kupffer cells activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283:G256–G267
17. Cosgrove BD, King BM, Hasan MA, Alexopoulos LG, Farazi PA, Hendriks BS et al (2009) Synergistic drug-cytokine induction of hepatocellular death as an in vitro approach for the study of inflammation-associated idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 237:317–330
18. Lacour S, Antonios D, Gautier J-C, Pallardy M (2009) Acetaminophen and lipopolysaccharide act in synergy for the production of pro-inflammatory cytokines in murine RAW264.7 macrophages. *J Immunotoxicol* 6:84–93
19. Bian K, Murad F (2001) Diversity of endotoxin-induced nitrotyrosine formation in macrophage-endothelium-rich organs. *Free Radic Biol Med* 31:421–429
20. Raza H, John A, Shafarin J (2014) NAC attenuates LPS-induced toxicity in aspirin-sensitized mouse macrophages via suppression of oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *PLoS One* 9: e103379
21. Krishnan N, Dickman MB, Becker DF (2008) Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 44:671–681
22. Moreira JC, Wammacher CM, Costa SM, Wajner M (1989) Effect of proline administration on rat behavior in aversive and nonaversive tasks. *Pharmacol Biochem Behav* 32:885–890
23. Leite MC, Galland F, Brolese G, Guerra MC, Bortolotto JW, Freitas R, Almeida LM, Gottfried C et al (2008) A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods* 169:93–99
24. Tramontina F, Leite MC, Cereser K, de Souza DF, Tramontina AC, Nardin P, Andrezza AC, Gottfried C et al (2007) Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J Neurosci Methods* 162:282–286
25. Kehrer JP (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149:43–50
26. Aksenov MY, Markesbery WR (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302:41–45
27. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126
28. Marklund SL (1985) Pyrogallol autoxidation. In: Greenwald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press Inc, Boca Raton 1985: 243–7
29. Wilson JE (1989) *Prep. Biochem* 19:13–21
30. Hughes BP (1962) A method for the estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Clin Chim Acta* 7:597–603
31. Dzeja PP, Vitkevicius KT, Redfied MM, Burnett JC, Terzic A (1999) Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium: increased contribution in heart failure. *Circ Res* 84: 1137–1143
32. Esterbauer H, Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186:407–421
33. Rustin P, Chretien D, Bourgeon T et al (1994) Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 228:35–51
34. Sorensen RG, Mahler HR (1982) Localization of endogenous ATPases at the nerve terminal. *J Bioenerg Biomembr* 14:527–547
35. Hauss-Wegrzyniak B, Lukovic L, Bigaud M, Stoeckel ME (1998) Brain inflammatory response induced by intracerebroventricular infusion of lipopolysaccharide: an immunohistochemical study. *Brain Res* 794:211–224
36. Farina C, Aloisi F, Meinl E (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 28:138–145
37. Rothermundt M, Peters M, Prehn JH, Arolt V (2003) S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech* 60:614–632
38. Sen J, Belli A (2007) S100B in neuropathologic states: the CRP of the brain? *J Neurosci Res* 85:1373–1380
39. Eng LF, Ghimikar RS, Lee YL (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). *Neurochem Res* 25:1439–1451
40. Vergara D, Martignago R, Bonsegna S, De Nuccio F, Santino A, Nicolardi G, Maffia M (2010) IFN-beta reverses the lipopolysaccharide-induced proteome modifications in treated astrocytes. *J Neuroimmunol* 221:115–120
41. Brahmachari S, Fung YK, Pahan K (2006) Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. *J Neurosci* 26:4930–4939
42. Leite MC, Galland F, de Souza DF, Guerra MC, Bobermin L, Biasibetti R, Gottfried C, Goncalves CA (2009) Gap junction inhibitors modulate S100B secretion in astrocyte cultures and acute hippocampal slices. *J Neurosci Res* 87(11):2439–2446
43. Tappel AL (1973) Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed Proc* 32:1870–1874
44. Travacio M, Llesuy S (1996) Antioxidant enzymes and their modification under oxidative stress conditions. *Free Rad Res Latin Amer* 48:9–13
45. Diplock AT (1994) Antioxidants and free radical scavengers. In: Rice-Evans CA, Burdon RH (eds) *Free radical damage and its control*, 1st edn. Elsevier, Amsterdam, pp. 113–130
46. Moore DJ, West AB, Dawson VL, Dawson TM (2005) Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 28:57–87
47. Papa L, Rockwell P (2008) Persistent mitochondrial dysfunction and oxidative stress hinder neuronal cell recovery from reversible proteasome inhibition. *Apoptosis* 13(4):588–599
48. Takuma K, Baba A, Matsuda T (2004) Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog Neurobiol* 72(2):111–127
49. Andrezza AC, Shao L, Wang JF, Young T (2010) Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry* 67(4):360–368
50. Dzeja PP, Terzic A (2003) Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J Exp Biol* 206:2039–2047
51. Pucar D, Dzeja PP, Bast P, Gumina RJ, Drahl C, Lim L, Juranic N, Macura S et al (2004) Mapping hypoxia-induced bioenergetic rearrangements and metabolic signaling by 18 O-assisted 31 P NMR and 1 H NMR spectroscopy. *Mol Cell Biochem* 256–257(1–2): 281–289
52. Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) Measurement of reactive species. In: Halliwell B, Gutteridge JMC (eds) *Free radicals in biology and medicine*, 4th edn. Oxford University Press, Oxford, pp. 268–340
53. Schulze A (2003) Creatine deficiency syndromes. *Mol Cell Biochem* 244:143–150
54. Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong J, Knapp DJ, Crews FT (2007) Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 55:453–462
55. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351–358
56. Lowry OH, Rosebrough N, Farr AL, Randal RJ (1951) Protein measurement with a Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275

PARTE III

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

III. 1- DISCUSSÃO

No presente trabalho, avaliamos os efeitos de Pro e LPS, em córtex cerebral e cerebelo, quando administrados de forma crônica, isolados e quando co-administrados em ratos wistar do 7º ao 21º dia de vida. Os diferentes períodos de desenvolvimentos em humanos e em ratos, em geral, seguem o mesmo perfil. É estimado que o cérebro dos ratos, no sétimo dia pós natal, seja equivalente ao cérebro de humanos ao nascimento (Andrews e Fitzgerald 1997, Dobbing e Sands, 1979). Em função disso, os modelos químicos utilizando ratos não conseguem reproduzir as doenças humanas em toda sua complexidade, mas são de extrema importância para que substâncias sejam avaliadas de forma isolada, quanto a todos seus efeitos no organismo.

Para o desenvolvimento das análises bioquímicas do presente estudo, parâmetros inflamatórios, de estresse oxidativo, e metabolismo energético de córtex cerebral e cerebelo de ratos jovens foram avaliados visto que se sabe da relação do córtex cerebral e as funções cognitivas, além do envolvimento direto de córtex e cerebelo nos processos de doenças neurodegenerativas envolvendo, dentre outros fatores a inflamação, com a doença de Alzheimer (Baldaçara et al 2008; Wegiel et al 1999). Em adição a isso, estudos prévios realizados por nosso grupo já demonstraram os efeitos da administração de Pro sozinha nessas duas estruturas cerebrais (Kessler 2003).

Níveis baixos de Pro (51 a 271 μM), normalmente, são encontrados no plasma (Phang et al 2001). Sendo níveis elevados associados a defeitos genéticos, onde mutações na POX e P5CDH podem gerar um excesso de Pro ($>500\mu\text{M}$), chamado hiperprolinemia. Essa condição está, frequentemente, associada a retardo mental e epilepsia. Como descrito anteriormente na introdução, as hiperprolinemias podem ser divididas em tipo I e tipo II, caracterizados por deficiências genéticas e bioquímicas

distintas nas vias catabólicas. Na busca da melhor compreensão dos efeitos tóxicos ocasionados pelo acúmulo de Pro e seus metabólitos, diversos estudos foram desenvolvidos, inclusive por nosso grupo, onde Kessler e colaboradores em 2003, mostraram que o tratamento agudo, assim como o efeito *in vitro* da Pro foram capazes de diminuir a atividade de CK em homogeneizado total de córtex, cerebelo e encéfalo médio dos animais. Além disso, mostrou-se que concentrações elevadas de Pro induzem a peroxidação lipídica e reduzem as defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas em cérebro de ratos (Delwing et al 2003).

Na contramão de todos os trabalhos desenvolvido por nosso grupo, os resultados do presente trabalho mostram efeitos bastante distintos dos citados anteriormente. Utilizando o mesmo modelo crônico de Moreira (1989), nossos achados mostram que a Pro, quando administrada isoladamente, não foi capaz de alterar o conteúdo de S100B e GFAP, os conteúdos de sulfidrilas e TBAR-RS e nem a atividade da CAT, também não alterou as atividades das enzimas da rede de fosforiltransferência, AK, CK e HK, nem dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial em nenhum dos dois tecidos avaliados. Ao passo que a administração de LPS foi capaz de aumentar a secreção de S100B e GFAP, a atividade da CAT, os conteúdos de sulfidrilas e TBA-RS, a atividade das enzimas HK, AK e CK, com excessão da CKcit no cerebelo, além de aumentar a atividade dos complexos IV e SDH da cadeia respiratória mitocondrial em ambos os tecidos. Em adição a isso, a Pro quando administrada com o LPS foi capaz de prevenir seus efeitos em todos os parâmetros por ele alterados, contudo os resultados da administração de LPS e Pro+LPS, abordaremos mais adiante na discussão.

Os resultados apresentados pela administração de Pro, podem ser explicados pelo fato de que embora sintomas neurológicos ocorram em diversos pacientes, a neurotoxicidade da Pro ainda é controversa. A HPI, por exemplo, onde os níveis de Pro

podem estar de 5 a 10 vezes mais elevados (700 a 2400 μM) do que o considerado normal não está, necessariamente, associada a manifestações clínicas, podendo ser considerada uma condição benigna em muitos indivíduos (Phang et al 2001). Além disso, apesar de existir uma aparente relação entre o acúmulo de Pro e os sintomas neurológicos em pacientes com HPII e essas disfunções neurológicas serem encontradas em muitos pacientes hiperprolinêmicos, o mecanismo exato pelo qual isso acontece permanece pouco compreendido. Diante disso, poderíamos questionar se efetivamente, o acúmulo de Pro sempre acarrete em efeitos tóxicos ou se esses acontecem quando altos níveis do aminoácido estão associados a mais algum fator predispositório ainda não descrito. Pois, como já falado anteriormente, apesar de alguns fenótipos encontrados em pacientes com HPI, como problemas auditivos, anormalidades oculares, retardo mental e outras alterações neurológicas, muitos outros são assintomáticos (Mitsubuchi et al 2008, Phang et al 2001).

Além dos efeitos tóxicos da Pro não estarem bem estabelecidos alguns grupos vêm desenvolvendo trabalhos que mostram seus efeitos benéficos. Pro serve como um pró-oxidante na sinalização apoptótica via atividade da PRODH o que pode ser um importante mecanismo para reduzir a carcinogênese. Phang e outros pesquisadores mostraram que em células de mamíferos a expressão de PRODH é ativada pela p53 com a oxidação de Pro levando ao aumento de espécies reativas (ER) e indução de morte celular de várias linhagens celulares de câncer (Donald et al 2001, Rivera e Maxwell 2005, Pandhare et al 2006 e Polyak et al 1977) . A Pro tem um papel biológico importante na resposta ao estresse, sendo utilizada por vários organismos para compensar desequilíbrios celulares causados pelo estresse oxidativo, ambiental e nutricional (Rodriguez & Redman 2005; Liang et al 2003).

Além de Pro, o LPS também foi administrado de forma isolada, a fim de induzir a neuroinflamação. Em condições normais o SNC é fortemente anti-inflamatório, estando, principalmente sob a influência da interleucina 10 (IL-10) e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) (Jensen et al 2013). Quando a atividade neuroinflamatória acontece e por um curto período de tempo, seus efeitos podem ser considerados neuroprotetores, contudo, a inflamação crônica pode trazer efeitos prejudiciais para o SNC (Streit et al 2004).

Atualmente tem sido sugerido que a etapa inicial de um processo inflamatório no SNC consiste na migração de células T ativadas através da BHE, levando a uma ampliação da resposta imune através de diferentes mediadores inflamatórios, como citocinas, peptídeos vasoativos e outras neurotoxinas liberadas por células ativadas do sistema imune e por células residentes no SNC, como a microglia (Martino et al 2000, Kornek & Lassmann et al 2003). A neuroinflamação tem sido associada à fisiopatogenia de diversas doenças do SNC, tais como, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, isquemia cerebral e ao mesmo tempo é um evento que ocorre naturalmente com o envelhecimento cerebral (Glass et al 2010, Sparkman & Johnson et al 2013, Jensen et al 2013).

Estudos realizados em modelo animal para esclerose múltipla têm demonstrado que células T podem atravessar a BHE e BHL intactas e alcançar o fluido cerebroespinal, espaço perivascular e subaracnóide (Engelhardt 2010). Além disso, análises realizadas a partir do infiltrado inflamatório observado nas lesões ocasionadas pela Esclerose Múltipla mostram que esse é constituído principalmente por linfócitos T, B e macrófagos (Matute e Pérez-Cedrá 2005).

O sistema imune inato reconhece estruturas moleculares típicas de patógenos microbianos. O LPS é uma dessas estruturas capazes de desencadear os mecanismos da

resposta imune inata ao ser reconhecido por receptores do tipo TLR4 em várias células que participam da resposta imunológica (Hawiger 2001). Em quadros de neuroinflamação experimental induzida por administração sistêmica de LPS, tanto citocinas e quimiocinas, quanto o LPS diretamente, são capazes de alterar o estado de repouso (ou vigilante) da microglia para o estado ativado (Hanisch e Kettenmann 2007) o que faz com que ocorra um padrão de fagocitose associado à liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios (Haüsler, Prinz et al 2002).

Astrócitos e microglia têm papel fundamental no processo inflamatório do SNC, tornando-se ativados em resposta a diversos estímulos, de mudanças sutis no microambiente a dano tecidual intenso. Ambos expressam receptores TLRs e quando ativados liberam uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF- α . A microglia é a principal célula de defesa do SNC e atua como primeira linha de defesa. É composta por macrófagos residentes no cérebro e medula espinhal, com predominante localização na substância cinzenta e em maiores concentrações no hipocampo, gânglios basais e substância nigra (Block et al 2007). Em condições normais a microglia mantém sua morfologia ramificada que está associada à produção de fatores neurotróficos como IGF-1 e BDNF (Streit 2002) além de citocinas anti-inflamatórias para a manutenção da homeostase cerebral (Streit 2002, Block et al 2007).

Contudo, na lesão neurológica, a microglia altera sua morfologia expressando moléculas de superfície como CD14, complexo de histocompatibilidade ou MHC e receptores de quimiocinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α) (Cho et al 2006), desencadeando a resposta inflamatória no SNC. Estes estímulos, externos e internos (exemplo, agregados protéicos) são identificados pela microglia, elevando os fatores inflamatórios.

Ao contrário do que se pensava, alguns estudos demonstraram que os astrócitos não são somente suportes passivos da arquitetura e homeostase neuronal sem papel na

in tegração de sinal, mas sim participantes ativos com neurônios em todas as funções essenciais do encéfalo (Sofroniew e Vinters 2010). Além disso, um dos papéis importantes dos astrócitos no SNC é a vigilância imunológica. Eles agem formando uma glia limitante ao redor dos vasos sanguíneos, restringindo o acesso de células imunes do sangue para o parênquima cerebral, e ao contrário de outras células do SNC, são resistentes à morte por apoptose induzida por receptor, mostrando-se bem equipados para sobreviver a insultos inflamatórios (Farina et al 2007).

Sendo assim, astrócitos e microglia apresentam papel fundamental no processo neuroinflamatório e são reconhecidos como participantes ativos em várias condições patológicas ou doenças neurodegenerativas crônicas (Liu et al 2011).

Semelhante às células microgliais, os astrócitos tornam-se ativados em resposta a vários estímulos, de mudanças sutis no microambiente a dano tecidual intenso. Esse processo é conhecido como astrogliose reativa, o qual é uma resposta não homogênea e finamente graduada que varia de acordo com o tipo, gravidade e duração do insulto (Sofroniew & Vinters 2010). Os astrócitos reativos apresentam, dentre outras alterações, o aumento na expressão de GFAP, sendo essa proteína comumente usada como medida de astrogliose (Sofroniew & Vinters 2010).

Além disso, um importante marcador de ativação astrogliar e ou morte em várias condições de dano cerebral é a proteína S100B que tem sua expressão aumentada em várias doenças como Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia crônica, dentre outras condições patológicas cerebrais (Donato et al 2009). A S100B é secretada em resposta a estímulos com vários agentes, como TNF- α (Edwards & Robinson 2006) e IL1 β , envolvendo a via da MAPK e sinalização via NF κ B (DE Souza et al 2009). A S100B tem sido apontada como útil marcador molecular e periférico de dano cerebral (Gonçalves et al 2008) em várias situações agudas e crônicas. Um dos motivos para isso

é a proteína estar envolvida no ciclo das citocinas, uma teoria proposta na doença de Alzheimer (Griffin 2006).

A indução da resposta inflamatória cerebral, pela administração de LPS, tem sido atribuída, em parte à citocinas e proteínas de fase aguda, as quais podem ter origem sistêmica e central (Chakravarty e Herkenham 2005). Além disso, e sabendo-se que os receptores de LPS são altamente expressos em células da imunidade inata, é postulado que o reconhecimento da endotoxina por células hematopoiéticas circulantes guie a liberação sistêmica de mediadores secundários que, por sua vez, atuam no cérebro (Chakravarty e Herkenham 2005).

Atualmente, diversas evidências mostram que a infecção sistêmica tem um impacto negativo sobre a função do SNC sendo capaz de induzir um quadro de inflamação cerebral como observado em casos de encefalopatia induzida por sepse, que em longo prazo pode conduzir à disfunção cognitiva (Green, Scott et al 2004). Além disso, assim como a inflamação sistêmica, a inflamação do SNC é caracterizada pela presença de mediadores inflamatórios tais como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , MCP-1, MIP-2 e prostaglandina-2 (Teeling, Cunningham et al 2010, Teeling, Felton et al 2007, Zhou, Andonegui et al 2009). Seguindo nessa direção, diversos estudos têm demonstrado que a administração sistêmica de LPS conduz à importante resposta inflamatória cerebral (Masocha 2009, Buttini, Limonta et al 1996, Püntener, Booth et al 2012). Portanto os dados acima corroboram nossos resultados que mostram que a administração crônica intraperitoneal de LPS foi capaz de aumentar a secreção de S100B e GFAP nas duas estruturas cerebrais.

Em adição a isso, Tyagi e colaboradores 2008 verificaram que a administração de LPS em ratos além de estimular a produção de citocinas (TNF e IL-6) em córtex cerebral, também induz dano oxidativo lipídico. Sabe-se que a inflamação e o estresse

oxidativo estão intimamente relacionados, visto que há uma sobreposição das vias de sinalização e que os mesmos fatores de transcrição Nrf2 (Fator Nuclear Eritróide Derivado-2) e NFkB responsáveis pela liberação de mediadores inflamatórios também são reguladores do estado redox (Noworyta-Sokolowska et al 2013).

A administração intraestriado de LPS ativa células gliais aumentando a produção de radicais livres, tais como $\cdot\text{OH}$ (Noworyta-Sokolowska et al 2013). Além disso, estudos prévios mostram que a neuroinflamação causada pelo LPS reduz a atividade dos complexos I e IV da cadeia de transporte de elétrons na medula rostral ventrolateral de ratos (Chuang et al 2002). Esses achados reforçam nossos resultados que mostraram que a administração de LPS diminuiu a atividade dos complexos IV e SDH da cadeia de transporte de elétrons, além de trazerem fortes indícios, através das medidas de sulfidrilas e TBA-RS, de dano oxidativo a proteínas e lipídeos, respectivamente.

Apesar de alguns estudos anteriores demonstrarem que injeções ICV de LPS diminuíram os valores de CK nossos resultados mostraram que tanto CK quanto AK tiveram suas atividades aumentadas, com exceção da CKcit, que não apresentou alteração em sua atividade no cerebelo. Contudo, esse aumento pode ser explicado através de trabalhos prévios que mostram que quando a atividade de uma enzima da rede de fosforiltransferência é diminuída, as outras podem ter suas atividades aumentadas para preservar a homeostase energética (Dzeja et al 2003 e Pucar et al 2004), o que está de acordo com nossos achados, visto que pudemos observar uma diminuição na atividade da HK. Com isso, nossos dados corroboram com os resultados acima descritos que mostram que a infecção sistêmica é capaz de conduzir à resposta inflamatória cerebral.

Além dos resultados obtidos com a administração das duas substâncias isoladas, temos os resultados encontrados com a administração associada de Pro+LPS que

revelam, aparentemente, a Pro como um antioxidante e anti-inflamatório, capaz de prevenir todas as alterações causadas pelo LPS. Nossos resultados mostram que a administração de Pro foi capaz de prevenir a secreção de S100B e GFAP aumentadas pelo LPS.

Como descrito anteriormente, a secreção dessas duas proteínas está diretamente relacionada com o evento da neuroinflamação, tão característico em doenças neurodegenerativas. Visto isso e baseados em estudos como o de Ignatova e Gierasch (2006) que mostraram que a Pro diminui os agregados da região poliQ nas proteínas hungtinton, poderia se sugerir um papel preventivo da Pro nas doenças neurodegenerativas, contribuindo, dentre outras, coisas na contenção da neuroinflamação.

Além disso, se sabe que a deficiência de proteínas e aminoácidos acarreta em danos ao sistema imune. Aminoácidos individuais afetam respostas imunes direta ou indiretamente por meio de seus metabólitos e são necessários para a síntese de uma variedade de proteínas específicas (incluindo citocinas e anticorpos) e para regular vias metabólicas da resposta imune a patógenos infecciosos (Li et al 2007). A suplementação dietética de aminoácidos específicos para animais e seres humanos com desnutrição e doenças infecciosas aumenta o estado imunológico, reduzindo a morbidade e mortalidade (Li et al 2007).

Sabe-se que a POX pode desempenhar papel importante na imunidade, pois a falta de catabolismo de Pro devida a deficiência da enzima prejudica a função imune do intestino (Ha et al 2005). Um dos principais produtos da oxidação da Pro é H_2O_2 e este é um agente citotóxico para bactérias patogênicas (Kim et al 2007). Portanto, como a produção de EROS é um fenômeno comum a diversas situações celulares, a Pro tem assim a capacidade de proteger o organismo contra vários tipos de agressões e não

apenas as de caráter oxidativo (Rodriguez & Redman 2005; Krishnan et al 2008; Natarajan et al 2012). Em adição, a Pro também atua como agente quelante de metais pesados, que agem como catalisadores em reações químicas responsáveis pela produção de EROS (Sharma et al 1998; Liang et al 2013), além de ter a capacidade de estabilizar proteínas e enzimas antioxidantes, aumentando a atividade das mesmas (Natarajan et al 2012; Liang et al 2013).

Em se tratando da administração de Pro+LPS sobre os parâmetros de estresse oxidativo, nossos resultados revelaram efeitos antioxidantes da Pro, capazes de prevenir as alterações ocasionadas pelo LPS. O aumento de TBA-RS e sulfidrilas resultantes da administração de LPS isolado não aconteceu quando as duas substâncias foram administradas concomitantemente, sugerindo um papel antioxidante da Pro. De fato, isso está de acordo com a literatura que mostra que a Pro é capaz de proteger as células contra o estresse oxidativo através de mecanismos moleculares que resultam de suas propriedades químicas e dos seus efeitos nos sistemas redox (Phang et al 2010; Liang et al 2013). Baseados nisso, alguns grupos vêm desenvolvendo trabalhos a fim de demonstrar que a Pro e P5C podem atuar como reguladores metabólicos (Phang et al 1979, Phang et al 1980, Hagedorn et al 1982 e Phang et al 1982). Mais do que uma dupla redox, eles formam um ciclo. O ciclo da Pro, como é chamado, é capaz de transferir um equivalente redutor para dentro da mitocôndria, como Pro, que posteriormente é oxidada a P5C. Este por sua vez deixaria a mitocôndria e seria convertido de volta a Pro em concomitante oxidação do nucleotídeo piridina. Muitos estudos propõem que a regulação do metabolismo da Pro aconteça baseado na relação da dupla redox NADPH/NADP⁺, já que o ciclo é capaz de manter os níveis de NADP⁺ no citosol (Pandhare et al 2009; Phang et al 2010) Ao contrário do NADH/NAD⁺, eles não têm um papel importante na transferência de energia. Seu papel parece ser o de um

mecanismo de defesa contra perturbações redox deletérias ou mediador de eventos celulares (Kosower e Kosower 1978). Contudo, a conversão de Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato redutase depende da regulação da Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase, uma enzima mitocondrial que converte P5C em glutamato. A canalização fisiológica de P5C em Pro pode depender de inibidores específicos (ex.: aminoácidos) da atividade da Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase ou do estado redox mitocondrial (McGiva et al 1977). Apesar de todos os estudos desenvolvidos a fim de elucidar os mecanismos pelos quais o Pro forma esse ciclo com P5C e de que forma ela pode atuar como potente antioxidante a regulação desse sistema ainda não está bem esclarecida, mas acredita-se que a Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase seja um importante sítio regulatório e que a atividade do ciclo seja estreitamente controlada para que ele funcione mesmo sob condições especiais.

Em relação aos resultados que obtivemos com a CAT, podemos dizer que a enzima agiu de modo a compensar o estresse oxidativo gerado pelo efeito pró-oxidante do LPS. O que está de acordo com nossos resultados de TBA-RS e sulfidrilas, que tiveram seus conteúdos aumentados pelo LPS indicando oxidação de lipídeos e proteínas e conseqüente formação de $\cdot\text{OH}$, a partir do H_2O_2 acumulado. Nesse caso, o efeito que a Pro teve sobre a administração do LPS poderia ser explicado por estudos que mostram que a Pro age na proteção contra o estresse oxidativo sequestrando EROS e diminuindo seus efeitos prejudiciais (Rodriguez & Redman 2005; Krishnan et al 2008; Natarajan et al 2012). Chen & Dickman (2005) demonstraram que a Pro diminuiu a concentração de EROS e induziu o aumento da atividade da CAT em um fungo parasita da alfafa, suprimindo assim, a apoptose induzida por EROS. Sabe-se que a produção de EROS, resultantes do metabolismo da Pro pela enzima POX/PRODH, ativa vias de sinalização protetoras que determinam a expressão de enzimas antioxidantes e a indução

de vias de sobrevivência celular, protegendo as células contra o estresse oxidativo provocado por H_2O_2 (Natarajan et al 2012; Liang et al 2013). Além disso, a exposição de várias linhagens celulares a concentrações fisiológicas de H_2O_2 também aumentou a expressão de enzimas de biossíntese de Pro, o que salienta o papel protetor da Pro em resposta ao estresse oxidativo (Krishnan et al 2008). Os dados acima corroboram nossos resultados relacionados à administração de Pro+LPS, onde a Pro agiu prevenindo os efeitos do LPS em relação a CAT.

Ainda analisando os dados obtidos a partir da administração de Pro+LPS temos a atividade das enzimas da rede de fosforiltransferência e a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial. As atividades das enzimas AK e CKmit em ambos os tecidos e CKcit no córtex, como já mencionado anteriormente, apresentaram um aumento pela administração de LPS isolado. Contudo, a administração de Pro+ LPS fez com que esse aumento fosse prevenido. Além disso, a HK, no córtex e cerebelo e os complexos IV e SDH da cadeia respiratória mitocondrial, no córtex, tiveram suas atividades diminuídas pela administração de LPS. Diminuição essa, também prevenida pela associação de Pro+LPS.

Sendo o LPS capaz de causar tantas alterações na rede de fosforiltransferência e na cadeia de transporte de elétrons e com isso um aumento na demanda energética, a Pro pode estar atuando formando uma via anapleirótica, fornecendo intermediários necessários para que as vias possam ser restabelecidas e que com isso, ocorra a produção de ATP normalmente, restabelecendo todos os sistemas. Como já discutimos anteriormente baseados em dados da literatura, o aumento de AK e CK pode ter sido ocasionado pela diminuição da atividade de HK, portanto com a atividade de HK normalizada, as atividades das outras duas enzimas também voltaram à normalidade.

De fato, fica difícil estabelecer qual evento o LPS desencadeia primeiro. Se a inflamação, o estresse oxidativo ou as alterações na rede de fosforiltransferência e cadeia respiratória, visto que todos estão, de certa forma, interligados e uns afetam os outros.

Por fim, torna-se importante que maiores investigações sejam feitas envolvendo a Pro a fim de esclarecer os mecanismos pelos quais ela se acumula no plasma e tecidos e em que casos seu acúmulo acarreta nas hiperprolinemias. Apesar de muitos dados já terem sido relacionados a respeito da importância de Pro em mamíferos, ainda pouco se esclareceu a respeito de sua função para o desenvolvimento e crescimento fetal e do recém-nascido. Além disso, o melhor entendimento dos processos que envolvem a Pro como possível antioxidante e anti-inflamatório também precisam ser melhor elucidados.

Contudo, caso nossos resultados sejam confirmados em experimentos futuros, pode-se concluir que altas concentrações plasmáticas e teciduais de Pro, pelo menos no período de desenvolvimento cerebral, nem sempre levam a algum prejuízo para o organismo e que esta poderia ser utilizada em terapias destinadas a doenças que envolvam neuroinflamação.

II. 2 - CONCLUSÕES

Objetivo 1 – Verificar o efeito da administração crônica de Pro e LPS isolados e co-administrados sobre o conteúdo de S100B e GFAP.

- A administração isolada de Pro não alterou o conteúdo de S100B e GFAP.
- A administração de LPS de forma isolada aumentou significativamente o conteúdo de S100B e GFAP em córtex cerebral e cerebelo.
- Contudo, a coadministração de Pro mais LPS preveniu o aumento significativo que o LPS causou no conteúdo de S100B e GFAP, em ambos os tecidos.

Objetivo 2 - Verificar o efeito da administração crônica de Pro e LPS isolados e coadministrados sobre parâmetros de estresse oxidativo: TBA-RS, CAT e sulfidrilas.

- A administração de Prolina isolada não alterou nenhum dos parâmetros de estresse oxidativo.
- A administração de LPS de forma isolada provocou elevação significativa nos conteúdos de TBA-RS e sulfidrilas e na atividade da CAT nos dois tecidos.
- Já a coadministração de Pro mais LPS preveniu os efeitos causados pelo LPS em córtex cerebral e cerebelo.

Objetivo 3 - Verificar os efeitos da administração crônica de Pro e LPS isolados e coadministrados sobre algumas enzimas da rede fosforiltransferência: creatina cinase (isoforma mitocondrial e citosólica), adenilato cinase e hexocinase.

- A Pro quando administrada de forma isolada não alterou a atividade de nenhuma das enzimas avaliadas.
- O LPS aumentou as atividades de todas as enzimas, com exceção da porção citosólica da creatina cinase no cerebelo.
- A coadministração de Pro mais LPS preveniu o aumento da atividade da AK, HK, CKmit em ambos tecidos e CKcit no córtex cerebral.

Objetivo 4 - Verificar os efeitos da administração crônica de Pro e LPS isolados e coadministrados sobre os complexos da cadeia respiratória mitocondrial.

- Pro não alterou a atividade de nenhum dos complexos avaliados.
- O LPS causou diminuição significativa na atividade do complexo IV e SDH.
- Quando coadministrados o LPS teve seu efeito prevenido pela Pro tanto em córtex cerebral quanto em cerebelo.

Sabendo que o LPS é um potente agente causador de inflamação, que compromete o funcionamento de todo o sistema redox e do metabolismo energético celular e que a Pro, de acordo com nossos achados, foi capaz de prevenir todo dano causado ao SNC pela ação do LPS, pode-se concluir que esse aminoácido de alguma maneira ainda não, completamente, esclarecida atua prevenindo, combatendo ou simplesmente, abolindo os efeitos nocivos do LPS a nível cerebral.

III. 3 - PERSPECTIVAS

Como perspectivas para a continuidade desse trabalho temos:

- Avaliar a atividade da enzima da rede de fosforiltransferência: Piruvato cinase
- Avaliar alguns outros parâmetros de estresse oxidativo: GPx e DCFH
- Analisar os efeitos, *in vitro*, da associação de Pro e LPS sobre homogeneizado total de córtex cerebral e cerebelo.
- Analisar os efeitos da ICV de Pro e LPS.
- Dosar os níveis de Pro no plasma e tecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas A, 2006. Basic Immunology. Elsevier.
- Adams E 1970. Metabolismo f proline and hydroxyproline. *Int Rev Connect Tissue Res* 5, 1-91.
- Aebi H, 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105, 121–126.
- Akira S, Uematsu S and Takeuchi O, 2006 Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
- Aksenov M, Aksenova M, Butterfield DA, Markesbery WR, 2000. Oxidative modification of creatine kinase BB in Alzheimer's disease brain. *J Neurochem* 74(6), 2520-7.
- Aksenov MY, Markesbery WR, 2001. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippo-campus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302,41–145.
- Ames A, 3rd, 2000. CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res Ver* 34(1-2), 42-68.
- Anderson D, 1996. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and othre damage. *Mutation Research Amsterdam* 350, 103-145.
- Andrews K, Fitzgerald M, 1997. Biological barriers to paediatric pain management. *Clin J Pain* 13(2):138-143.
- Babcock GT, Wikstrom M, 1992. Oxgen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* 356, 301-9.
- Baldaçara L, Borgio JGF, Lacerda ALT, Jackowski AP, 2008. Cerebellum and psychiatric disorders. *Rev Bras Psiquiatr* 30(3), 281-9.
- Bianchi R, Garbuglia M, Verzini M, Giambanco VV, Ivenenkov R V W, Dimlich GA, Jamienson Jr, Donato R, 1996. S100B (α and β)-binding peptide (TRTK-12) blocks S100B/GFAP interaction: identification of a putative S100B target epitope within the head domain of GFAP. *Biochim et Biophys Acta* 1313, 258-267.
- Bianchi R, Giambanco I, Donato R, 2010. S100B /RAGE- dependent activation of microglia via NF-kappaB and AP-1 Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1 beta and TNF-alpha. *Neurobiol Aging* 31, 665-677.
- Block ML, Zecca L, Hong JS, 2007. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8, 57-69.

Bock A, Forchhammer K., Heider J, Leinfelder W, Sawers G, Veprek B and Zinoni F, 1991. Selenocysteine: the 21st amino acid. *Mol Microbiol* 5, 515-520.

Brahmachari S, Fung YK, Pahan K, 2006. Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. *J Neurosci* 26,4930-4939.

Buttini M, Limonta S, Boddeke HWGM, 1996. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces activation of microglial cells in rat brain. *Neurochem* 29, 25-35.

Cadenas E, Boveris A, Ragan CL, Stoppani A O, 1977. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 180(2), 248-257.

Carter GT, Wineinger MA, Walsh SA, Horasek SJ, Albresch RT, Fowler WM, 1995. Effect of voluntary wheel-running exercise on muscles of the mdx mouse. *Neuromuscul Disord* 5, 323-332.

Chakravarty S, Herkenham M, 2005. Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia independent of systemic cytokines. *J Neurosci* 25(7),1788-96.

Chen C & Dickman MB, 2005. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 102(9), 3459-3464.

Cho BP, Song DY, Sugama S, Shin DH, Shimizu Y, Kim SS, Kim YS, Joh TH, 2006. Pathological dynamics of activated microglia following medial forebrain bundle transection. *Glia* 53, 92-102.

Chuang YC, Tsai JL, Chang AY, Liou CW, Chang SH, 2002. Dysfunction of the mitochondrial respiratory chain in the rostral ventrolateral medulla during experimental endotoxemia in the rat. *Journal of Biomedical Science* 9, 542-548.

Clancy B, Finlay BL, Darlington RB, Anand KJ, 2007. Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxic* 28(5), 931-7.

Cullen KM, 1997. Antigen retrieval method for glial fibrillary acidic protein immunohistochemistry: implications on neuropathological studies. *Brain Pathol* 7, 1179.

Da Silva WS, Gómez-Puyou A, de Gómez-Puyou MT, Moreno-Sanchez R, De Felice FG, de Meis L, 2004. Mitochondrial Bound Hexokinase Activity as a Preventive Antioxidant Defense. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (38), 39846-39855.

Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML e Gan WB, 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature neuroscience* 8, 752-758.

David SS, Shoemaker M and Haley BE, 1998. Abnormal properties of creatine kinase in Alzheimer's disease brain: correlation of reduced enzyme activity and active site photolabelling with aberrant cytosol-membrane partitioning. *Mol Brain Res* 54, 276-287.

de Souza DF, Leite MC, Quincozes-Santos A, Nardin P, Tortorelli LS, Rogo MM, Gottfried C, Leal RB, Gonçalves CA, 2009. S100B secretion is stimulated by IL-1beta in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. *J Neuroimmunol* 206, 52-57.

Delwing D, Bavaresco CS, Chiarani F, Wannmacher CM, Wajner M, Dutra-Filho CS, de Souza Wyse AT, 2003. In vivo and in vitro effects of proline on some parameters of oxidative stress in rat brain. *Brain Res* 991(1-2)180-6.

Di Rosa G, Pustorino G, Spano M, Campion D, Calabro M, Aguenouz M, Caccamo D, Legallic S, Sgro DL, Bonsignore M, Tortorella G, 2008. Type I hyperprolinemia and proline dehydrogenase (PRODH) mutations in Italian children with epilepsy and mental retardation. *Psychiatr Genet* 18, 40-42.

Diplock AT, 1994. Antioxidants and free radical scavengers. In: Rice-Evans CA, Burdon RH (eds) *Free radical damage and its control*, 1st edn. Elsevier, Amsterdam, pp 113-130.

Dobbing J, Sands J, 1979. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* 3(1):79-83.

Donald SP, Sun XY, Hu CA, Yu J, Mei JM, Valle D and Phang JM 2001 Proline oxidase, encoded by p53-induced gene-6, catalyzes the generation of proline-dependent reactive oxygen species. *Cancer Res* 61. 1810-1815.

Donato R, 2001 S100B: a mutagenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem & Cell Biol* 33, 637-668.

Donato R, 1999 Functional roles of S100B proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim et Biophys Acta* 1450, 191-231.

Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brrozzi F, Tubaro C and Giambanco I, 2009. S100B's Double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochimica et biophysica acta* 1793, 1008-1022.

Dzeja PP, Bortolon R, Perez-Terzic C, Holmuamedov EL, Terzic A, 2002. Energetic communication between mitochondria and nucleus directed by catalyzed phosphotransfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 10156-10161.

Dzeja PP, Redfield MM, Burnett JC, Terzic A, 2000. Failing energetics in failing hearts *Cur Cardiol Rep* 2, 212-217.

Dzeja PP, Terzic A, 2003. Phosphotransfer networks and cellular energetic. *J Exp Biol* 206, 2039-2047.

Dzeja PP, Terzic A, 2009. Adenylate kinase and AMP signalin networks: metabolic monitoring signal communication and body energy sensing. *Int J Mol Sci* 10, 1729-1772.

Eng LF & Ghirnikar RS, 1994. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol* 4, 229-237.

Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL 2000 Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years. *Neurochem Res* 25, 1439-1451.

Engelhardt B, 2010. T cell migration into the central nervous system during health and disease: Different molecular Keys allow Access to different central nervous system compartments. *Clin and Exper Neuroimm* 1, 79-93.

Erecinska M, Silver IA, 1994. Ions and energy in mammalian brain. *Progress in Neurobiology* 43, 37-71.

Esterbauer H, Cheeseman KH, 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186,407-421.

Fang F, Lue LF, Yan S et al, 2010. RAGE-dependent signaling in microglia contibutes to neuroinflammation, Abeta acumulation, and impaired learning/memory in a mouse modelo of Alzheimer's disease. *FASEB journal: oficial publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24, 1043-1055.

Farina C, Aloisi F, Meinl E, 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immuno* 28, 138-145.

Ferreira ALA, Matsubara LS, 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *RAMB* 43(1), 61-8.

Fleming GA, Hagedorn CH, Granger AS, Phang JM, 1984. Pyrroline-5-carboxylate in human plasma. *Metabolism* 33, 739-742.

Flyn MP, Martin MC, Moore PT, Stafford JA, Fleming GA and Phang JM, 1989. Type II hyperprolinemia in a pedigree of Irish Travellers (normands). *Arch Dis Child* 64, 1699-1707.

Franke H, Krugel U and Illes P, 2006. P2 receptors and neuronal injury. *Pflugers Arch* 452, 622-644.

Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC and Gage FH, 2010. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140, 918- 934.

Glezer I, Simard AR, and Rivest S, 2007. Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience* 147, 867-883.

Green K, Brand MD, Murphy MP, 2004. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* 53(Suppl 1), 110-8.

Green R, Scott LK, Minagar A, Conrad S, 2004. Sepsis associated encephalopathy (SAE): a review. *Front Biosci* 9, 1637-41.

Ha EM, Oh CT, Bae YS, Lee WJ, 2005. A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science*, New York 310, 847-850.

Hagedorn CH and Phang JM, 1983. Transfer of reducing equivalents into mitochondria by the interconversions of proline and delta-1-pyrroline-5-carboxylate. *Arch Biochem Biophys* 225, 95-101.

Hagedorn CH and Phang JM, 1986. Catalytic transfer of hydride ions from NADPH to oxygen by the interconversions of proline and delta-1-pyrroline-5-carboxylate. *Arch Biochem Biophys* 248, 166-174.

Hagedorn CH, Yeh GC and Phang JM, 1982. *Biochem J* 302, 31-39.

Halliwell B and Gutteridge JMC, 2007. Measurement of reactive species. In: Halliwell B, Gutteridge JMC (eds) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. Oxford University Press. Oxford pp 268-340.

Halliwell B, 2000. Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *Nutrition Reviews* 75, 1082-1087.

Hanisch UK & Kettenmann H, 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature* 10, 1387-1394.

Hao B, Gong W, Ferguson TK, James CM, Krzycki JA and Chan MK, 2002. A new UAG- encoded residue in the structure of a methanogen methyltransferase. *Science* 296, 1462-1466.

Häusler KG, Prinz M, Nolte C, Weber RJ, Schumann RR, Kettenmann H, Hanisch UK, 2002. Interferon- γ differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharide and pneumococcal cell wall-stimulates mouse microglia and macrophages. *Eur Jour Neurosci* 16, 2113-2122.

Hawiger J, 2001. Innate immunity and inflammation: a transcriptional paradigm. *Immunol Res* 23(2-3) 99-109.

Hiramatsu T, Cortiella J, Marchini JS, Chapman TE and Young VR, 1994. Plasma proline and leucine kinetics: response to 4 wk with proline-free diets in Young adults. *Am J Clin Nutr* 60,207-215.

Holm TH, Draeby D, and Owens T, 2012. Microglia are required for astroglial Toll-like receptor 4 response and for optimal TLR2 and TLR3 response. *Glia* 60, 630-638.

Hu CA, Khalil S, Zhaorigetu S, Liu Z, Tyler M, Wan G, Valle D, 2008. Human Deltal-pyrroline-5-carboxylate synthase: function and regulation. *Amino Acids* 35,665-672.

Ignatova Z, Gierasch LM, 2006. Inhibition of protein aggregation in vitro and in vivo by a natural osmoprotectant. *Proc Natl Acad Sci USA* 103,13357-13366.

Jensen CJ, Massie A, De Keyser J, 2013. Immune players in the CNS: the astrocyte. *J Neuroimmune Pharmacol* 8, 496-505.

Kaplanki J, Nassar A, Sharon-Granit Y, Jabareen A, Kobal SL and Azab NA, 2014. Lithium attenuates lipopolysaccharide-induced hypothermia in rats. *European review for medical and pharmacological sciences* 18, 1829-1837.

Kaul S, Sharma SS, Mehta IK, 2008. Free radical scavenging potential of L-proline: evidence from in vitro assays. *Amino Acids* 34,315-320.

Kawai T and Akira S, 2008. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1143, 1-20.

Kawai T and Akira S, 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International immunology* 21, 317-337.

Kessler A, Costabeber E, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM, 2003. Proline Reduces Creatine Kinase Activity in the Brain Cortex of Rats. *Neurochim Res* 28(8),1175-80.

Kim SH, Smith CJ, Van Eldik L J, 2004. Importance of MAPK pathways for microglial pro-inflammatory cytokine IL-1 beta production. *Neurobiol Aging* 25, 431-439.

Kim SW, Matteo RD, Yin YL, Wu G, 2007. Functional amino acids and fatty acids for enhancing production performance of sows and piglets. *Asian Austr Jour Anim Scien* 20, 295-306.

Kipp M, Norkute A, Johann S et al, 2008. Brain-region-specific astroglial responses in vitro after LPS. *J Mol Neurosci* 35, 235-243.

Kornek B, Lassmann H, 2003. Neuropathology of multiple sclerosis- new concepts. *Brain Res Bulletin* 61, 321-326

Kosower NS and Kosower EM, 1978. The glutathione status of cell. *Int Ver Cytol* 54, 109.

Koury JC, Donangelo CM, 2003. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Rev Nutr* 16(4), 433-41.

Krishnan N, Dickman MB & Becker DF, 2008. Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress. *Free radical biol & medic* 44(4), 671-681.

Laflamme N, Rivest S, 2001. Toll-like receptor 4: The missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB Journal* 15, 155-163.

Landar A, Caddell G, Chessher J, Zimmer DB, 1996. Identification of S100Ba1/S100B target protein: phosphoglucomutase. *Cell Calcium* 20,279-285.

Lehnardt S, 2010. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia* 58, 253-263.

Leite MC, Galland F, Brolese G, Guerra MC, Bortolotto JW, Freitas R, Almeida LM, Gottfried C, Goncalves CA, 2008. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods* 169, 93-99.

Leite MC, Galland F, de Souza DF, Guerra MC, Bobermin L, Biasibetti R, Gottfried C, Goncalves CA, 2009. Gap junction inhibitors modulate S100B secretion in astrocyte cultures and acute hippocampal slices, *J Neurosci Res* 87(11), 2439-46.

Li H, Jiang J, Zhang, Y, Wu, P, Zhao, J, Duan, X, Zhou, X, Feng, L, 2016. The metabolites of Glutamine prevent hydroxyl radical-induced apoptosis through inhibiting mitochondria and calcium ion involved in fish erythrocytes. *Free Rad. Biol. Med* 92, 96-140.

Liu W, Tang Y and Feng J, 2011. Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. *Life Sci* 89, 141-146.

Lowe MTEH, Kim RL, Faul DL Christie and Waldvogel HJ, 2013. Dissociated expression of mitochondrial and cytosol creatine kinases in the human brain: a new

perspective on the role of creatine in brain energy metabolism. *J Cereb Blood Flow Metab* 33(8), 1295-1306.

Lowry OH, Rosebrough N, Farr AL, Randal RJ, 1951. Protein measurement with a Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193,265–275.

Marklund SL, 1985. Pyrogallol autoxidation. In: Greenwald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press Inc., Boca Raton pp 243–247.

Marks AD, Smith C, Lieberman M, 2007. *Bioquímica médica de Marks*, Porto Alegre, Artmed, 2^oed.

Martino G, Furlan R, Brambilia E, Bergami A, Ruffini F, Gironi M, Poliani PL, Grimaldi LME & Comi G, 2000. Cytokines and immunity in multiple sclerosis: the dual signal hypothesis. *Jour of Neuroimm* 109, 3-9.

Masocha W, 2009, Systemic lipopolisaccharide (LPS)-induced microglial activation results in different temporal reduction of CD200 and CD200 receptor gene expression in the brain. *Journ Neuroimmun*, 214 (1-2) 78-82.

Matute C, Pérez-Cedrá F, 2005. Multiple Sclerosis: a novel perspectives on newly forming lesions. *Trends in Neuroscie* 28(4) 173-175.

McGivan JD, Bradford NM and Beavis AD, 1977. *Biochem J* 162, 147-156.

Meffert, MK, Baltimore D, 2005. Physiological Functions for brain NF-KB. *TRENDS in Neurosciences* 28, 27-43.

Middeldorp J and Hol EM, 2011. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol* 93, 421-443.

Mihaylova S, Schweighofer H, Hackstein H and Rosengarten B, 2014. Effects of anti-inflammatory vagus nerve stimulation in endotoxemic rats on blood and spleen lymphocyte subsets. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society...* (et al) 63, 638-690.

Millwar TA, Heizmann C W, Schafer B W, Hemmings B A, 1998. Calcium regulation of Ndr protein kinase mediated by S100B calcium-binding proteins. *EMBO J* 17, 5913-5922.

Mitsubuchi H, Nakamura K, Matsumoto S, Endo F, 2008. Inborn errors of proline metabolism. *J Nutr* 138, 2016s-2020s.

Mogensen TH, 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews* 22, 240-273.

Moore DJ, West AB, Dawson V L, Dawson TM, 2005. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Ver Neurosci* 28, 57–87.

Moran A, Prendergast M, Appelmeik B, 1996. Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharides and its contribution to disease. *FEMS Immunol. Med. Microbiol* 16 (2), 105–115.

Natarajan SK, et al., 2012. Proline dehydrogenase is essential for proline protection against hydrogen peroxide-induced cell death. *Free radical biol & medic* 53(5) 1181-1191.

Nelson DL, Cox MM, 2008. *Lehninger Principles of Biochemistry* 5^a Ed. WH Freeman and Company, New York.

Nestler EJ, Greengard P, 1993. Protein Kinases. In, *Protein phosphorylation in the nervous system*, edited by Eric J Nestler e Paul Greengard, John Wiley & Sons, New York, pp 17-80.

Nisshi M, Kawata M, Azmitia EC, 2000. Trophic interaction between brain-derived neurotrophic factor and S100B on cultured serotonergic neurons. *Brain Res* 868, 113-118.

Noworyta-Sokolowska K, Górska A, Golembiowska K, 2013. LPS-induced oxidate stress and inflammatory reaction in the rat striatum. *Pharmacol Reports* 65, 863-869.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K, 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95, 351–358.

Pandhare J, Cooper SK, and Phang JM, 2006. Proline oxidase, a proapoptotic gene, is induced by troglitazone: evidence for both peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent and independent mechanism. *J Biol Chem* 281, 2044-2052.

Pandhare J, Donald SP, Cooper SK, Phang JM, 2009. Regulation and function of proline oxidase under nutrient stress. *J Cell Biochem* 107, 759-68.

Pavone L, Mollica F, Levy HL, 1975. Asymptomatic type II hyperprolinemia associated with hyperglycinemia in three sibs. *Arch Dis Child* 50, 637-641.

Phang JM, 1985. The regulatory functions of proline and pyrroline 5-carboxylic acid. *Curr Top Cell Regul* 25, 91-132.

Phang JM, Downing SJ and Yeh GC, 1980. Linkage of the HMP pathway to ATP generation by the proline cycle. *Biochem Biophys Res Commun* 93, 462-470.

Phang JM, Downing SJ, Yeh GC, Smith RJ and Williams JA, 1979. *Biochem Biophys Res Commun* 87, 363-370.

Phang JM, Downing SJ, Yeh GC, Smtih RJ, Williams JA and Hagedorn CH, 1982. *J Cell Physiol* 110, 255-261.

Phang JM, Hu CA and Valle D, 2001. Disorders of proline and hydroxyproline metabolism. In Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly, W. S. & Valle, D. (Eds) *Metabolic and molecular basis of inherited disease*. New York, McGraw Hill 1821-1838.

Phang JM, Liu W & Zabornyk O, 2010. Proline metabolism and microenvironmental stress. *Annual review of nutrition* 30, 441-463.

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu M Y, Van Hulle C, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B, 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *tlr4* gene. *Science* 282, 2085-2088.

Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein BA, 1997. A model for p53-induced apoptosis *Nature* 389,300-305.

Ponath G, Schettler C, Kaestner F, Voigt B, Wentker D, Arolt V, Rothermundt M, 2007. Autocrine S100B effects on astrocytes are mediated via RAGE. *J Neuroimmunol* 184,214-222.

Pucar D, Dzeja PP, Bast P, Gumina RJ, Drahl C, Lim L, Juranic N, Macura S, Terzic A, 2004. Mapping hypoxia-induced bioenergetic rearrangements and metabolic signaling by ¹⁸O-assisted ³¹P NMR and ¹H NMR spectroscopy. *Mol Cell Biochem* 256-257 (1-2), 281-9.

Pucar D, Jansen E, Dzeja PP, Juranic N, Macura S, Wieringa B, Terzic A, 2000. Compromised Energetics in the Adenylate Kinase AK1 Gene Knockout Heart under Metabolic Stress. *J Biol Chem* 275, 41424-41429.

Püntener U, Booth SG, Perry VH, Teeling JL, 2012. Long-term of systemic bacterial infection on the cerebral vasculature and microglia. *Jour Neuroinf* 9, 146.

Ransohoff RM and Brown MA, 2012. Innate immunity in the central nervous system. *The Journal of clinical investigation* 122, 1164-1171.

Rice-Evans CA, Burdon RH, 1994. Antioxidants and free radical scavengers. (eds) *Free radical damage and its control*, 1st edn. Elsevier, Amsterdam pp 113–130.

Rivera A. and Maxwell SA, 2005. The p53-induced gene-6 (proline oxidase) mediates apoptosis through a calcineurin-dependent pathway. *J Biol Chem* 280, 29346-29354.

Rivest S, 2003. Molecular insights on the cerebral innate immune system. *Brain, Behavior and Immunity* 17, 13-19.

Rodnight R, Gonçalves CA, Wofchuk ST, Leal R, 1997. Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the

immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. *Brazilian Jour of Medical and Biological Reser* 30, 1-14.

Rodriguex R & Redman R, 2005. Balancing the generation and elimination of reactive oxygen species. *Proceeding of the Natio Acad Of Scien of the USA* 102(9), 3175-3176.

Rothermundt M, Peters M, Prehn JH, Arolt V, 2003. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tec* 60, 614-632.

Saks VA, Ventura-Clapier R, Aliev MK, 1996. Metabolic control and metabolic capacity: two aspects of creatine kinase functioning in the cells. *Biochim Biophys Acta* 1274, 81-88.

Salomao R, Brunialti MK, Rapozo MM, Baggio-Zappia GL, Galanos C and Freudenberg M, 2012. Bacterial sensing, cell signaling and modulation of the immune response during sepsis shock. 38, 227-242.

Schneider CD, Oliveira AR, 2004. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *RBME* 10(10), 308-13.

Scriver CR, Beaudt AL, Sly WS, Valle D, 2001. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8 ed. New York: Mc Graw Hill Inc p 3-45.

Sem J, Belli A, 2007. S100B in neuropathologic states: the CRP of the brain?. *J Neurosci Res* 85, 1373-1380.

Shami NJIE, Moreira EAM, 2004. Licopeno como agente antioxidante. *Rev Nutr* 17(2), 227-36.

Sharma SS, Schat H & Voojjs R, 1998. In vitro alleviation of heavy metal-induced enzyme inhibition by proline. *Phytochem* 49(6)1531-1535.

Shashoua VE, Hesse GE, Moore BW, 1984. Proteins of the brain extracellular fluid: evidence for release of S100B protein. *J Neurochem* 42, 1536-1541.

Shastri A, Bonifati DM and Kishore U, 2013. Innate immunity and neuroinflammation. *Mediators of inflammation* 342931.

Shimazu R, Akash, S, Ogata H, Naga, Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M, 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189, 1777-1782.

Silva CG, Bueno AR, Schuck PF, Leipnitz G, Ribeiro CA, Wannmacher CD, Wyse AS, Wajner M, 2003. D-2-Hydroxyglutaric acid inhibits creatine kinase activity from cardiac and skeletal muscle of Young rats. *Eur J Clin Invest* 33, 840-847.

Sofroniew MV & Vinters HV, 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119, 7-35.

Sorci G, Agneletti AL, Bianchi R, Donato R, 1998. Association of S100B with intermediate filaments and microtubules in glial cells. *Biochim et Biophys Acta* 1448, 227-289.

Sparkman NL, Johnson RW, 2008. Neuroinflammation associated with aging sensitizes the brain to the effects of infection or stress. *Neuroimmunomodulation* 15, 323-330.

Srinivasan G, James CM and Krzycki JA, 2002. Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA. *Science* 296, 1459-1462.

Streit WJ, 2002. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS, *Glia* 40, 133-139.

Streit WJ, Mrak RE, and Griffin WS, 2004. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation* 1, 14.

Takaoka Y, Goto S, Nakano T, Tseng HP, Yang SM, Kawamoto S, Ono K, and Chen CL, 2014. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) prevents lipopolysaccharide (LPS)-induced, sepsis-related severe acute lung injury in mice. *Scientific reports* 4, 5204.

Tappel AL, 1973. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed Proc* 32, 1870-1874.

Teeling JL, Cunnighan C, Newmn TA, Perry VH, 2010. The effects of non-steroidal anti-inflammation agents on behavioural changes and cytokine production following systemic inflammation: implications for a role of COX-1. *Brain Behav Immun*, 24(3-4) 409-419.

Teeling JL, Felton LM, Deacon RMJ, Cunnighan C, Rawlins JNP, Perry VH, 2007. Sub-pyrogenic systemic inflammation impacts on brain and behavior, independent of cytokines. *Brain, Behav and Immun*, 21(6) 836-850.

Tramontina F, Leite MC, Cereser K, de Souza DF, Tramontina AC, Nardin P, Andreatza AC, Gottfried C, Kapczinski F, Goncalves CA, 2007. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J Neurosci Methods* 162, 282-286.

Tuin A, Vlag AHVD, Voenen-Weemaes AMMAV, Meijer, DKF, Poelstra K, 2006. On the role fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290, 377-385.

Tyagi E, Agrawal R, Nath C, Shulka R, 2008. Influences of LPS-induced neuroinflammation on acetylcholinesterase activity in rat brain. *Journal of Neuroimmunology* 205, 51-56.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J, 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 44-84.

Vergara D, Martignago R, Bonsegna S, De Nuccio F, Santino A, Nicolardi G, Maffia M, 2010. IFN-beta reverses the lipopolysaccharide-induced proteome modifications in treated astrocytes. *J Neuroimmunol* 221, 115-120.

Voet D, Voet JG and Pratt CW, 2000. Aminoácidos. In: *Fundamentos de Bioquímica*. Artes Médicas Sul, Porto Alegre, 3 ed.

Voet D, Voet JG, 1999. Amino acid metabolism In: *Biochemistry*, New York, John Wiley & Sons, Inc 3th ed.

Wallace DC, 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283, 1428-8.

Wallimann T, Hemmer W, 1994. Creatine Kinase in non-muscle tissues and cells. *Mol Cel Biochem* 133/134, 193-220.

Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, 1992. Intracellular compartmentation structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the "phosphocreatine circuit" for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 28, 121-140.

Walter S, Letiembre M, Liu Y, Heine H, Penke B, Hao W, Bode B, Manietta N, Walter J, Schulz-Schaffer W, Fabender K, 2007. Role of Toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Cell Physiol Biochem*. 20, 947-956.

Wegiel J, Wisniewski HM, Dziewiatkowski J, Badmajew E, Tarnawski M, Reisberg B, Mlodzik B, De Leon MJ, Miller DC, 1999. Cerebellar atrophy in Alzheimer's disease-clinicopathological correlations. *Brain Res*. 818(1), 41-50.

Young VR and El-Khoury A, 1995. The notion of the nutritional essentiality of amino acids, revisited, with a note on the indispensable amino acid requirements in adults. In L., C. (Eds) *Amino acid metabolism and therapy in the health and nutritional disease*. New York. CRC Press.

Zhou H, Andonegui G, Wong CHY, Kubes P, 2009. Role of Endotelial TLR4 for Neutrophil Recruitment into Central Nervous System Inflammation. *J Immunol*, 183 (8) 5244-5250.

Ziegler D, Innocenti C, Leal R, Rodnight R, Gonçalves CA, 1998. The S100B protein inhibits phosphorylation of GFAP e vimentin in citoesqueletal fraction from immature rat hippocampus. *Neurochem Reserc*, 23 (10) 1259-1263.



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 24191

Título: Avaliação dos efeitos da administração de prolina em ratos Wistar jovens submetidos à modelo de inflamação pela administração de lipopolissacarídeos sobre alguns parâmetros comportamentais, de estress

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

CLOVIS MILTON DUVAL WANNMACHER - coordenador desde 01/03/2013
Denise Bertin Rojas - Aluno de Doutorado desde 01/03/2013
Vivian Strassburger Andrade - Aluno de Doutorado desde 01/03/2013
Rodrigo Binkowski de Andrade - Aluno de Doutorado desde 01/03/2013
Tanise Gemelli - Aluno de Doutorado desde 01/03/2013

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 04/03/2013 - Sala de Reuniões do 2º andar do Prédio da Reitoria - Campus Central., em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 1536 filhotes de ratos Wistar, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Segunda-Feira, 18 de Março de 2013

STELA MARIS KUZE RATES
Coordenador da comissão de ética