



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS MEDICO-CIRÚRGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
CIÊNCIAS MEDICO-CIRÚRGICAS

LEIDELAMAR ROSÁRIO ALVES DE OLIVEIRA

PERFIL IMUNO-HISTOQUÍMICO DA EXPRESSÃO DE
ATIVADORES INTRACELULARES COM E SEM
PRE-CONDICIONAMENTO COM L-ALANIL-GLUTAMINA
EM MODELO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO
EM CÉREBROS DE GERBILS

FORTALEZA

2012

LEIDELAMAR ROSÁRIO ALVES DE OLIVEIRA

**PERFIL IMUNO-HISTOQUÍMICO DA EXPRESSÃO DE
ATIVADORES INTRACELULARES COM E SEM
PRE-CONDICIONAMENTO COM L-ALANIL-GLUTAMINA
EM MODELO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO
EM CÉREBROS DE GERBILS**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Departamento de Ciências Medico-Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Medico-Cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Wilson Vasconcelos

FORTALEZA

2012

LEIDELAMAR ROSÁRIO ALVES DE OLIVEIRA

PERFIL IMUNO-HISTOQUÍMICO DA EXPRESSÃO DE ATIVADORES
INTRACELULARES COM E SEM PRÉ-CONDICIONAMENTO COM
L-ALANIL-GLUTAMINA EM MODELO DE LESÃO DE ISQUEMIA E
REPERFUSÃO EM CÉREBROS DE GERBILS

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em, Ciências Medico-Cirúrgicas, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências Medico-Cirúrgicas, outorgado pela Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Data da aprovação: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Antônio Wilson Vasconcelos (Coorientador)
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Profa. Dra. Vilma Leite de Souza Pires
Faculdade Christus de Fortaleza - CE

*A Deus, por iluminar os meus caminhos e
me dar a coragem necessária para atingir
os meus objetivos.*

À memória dos meus pais, Adalgisa e José
Zacarias e do meu irmão Walter, por tudo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor doutor Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos, Coordenador do Departamento de Ciências Medico-Cirúrgicas, pelos ensinamentos, oportunidade e por sua valiosa contribuição para o meu desenvolvimento científico, propiciando-me a realização deste trabalho.

Ao meu coorientador professor doutor Antônio Wilson Vasconcelos, pela inestimável cooperação, acessibilidade, ensinamentos e apoio na elaboração deste estudo e privilégio de tê-lo compondo a minha banca examinadora.

À professora doutora Vilma Leite de Souza Pires, pelos ensinamentos, amizade e participação na banca examinadora. Sem a sua ajuda generosa não teria sido possível a execução do presente estudo.

À professora doutora Gerly Anne de Castro Brito, pela fundamental participação na produção de todas as lâminas para estudo imunohistoquímico.

À professora doutora Renata Ferreira Leitão, pela disponibilidade, ensinamentos e participação na banca de qualificação.

À professora Cymara Pessoa Kuehner, pela ajuda e apoio na elaboração das análises estatísticas.

Ao professor João Evangelista Bezerra Filho, pela valiosa amizade, disponibilidade, paciência nos ensinamentos transmitidos e oportunas sugestões.

Ao professor doutor Marcelo Alcântara Holanda, pelos ensinamentos, disponibilidade, apoio e incentivo.

À professora doutora Mirizana Alves de Almeida, pela inestimável amizade, competência, ensinamentos e participação na minha banca de qualificação.

Ao Professor Doutor Roberto César Pereira Lima Júnior, pelas sugestões, disponibilidade e atenção.

À Professora Vilena Figueiredo, pelos ensinamentos, disponibilidade e apoio no presente estudo.

Ao colega do Programa de Pós-Graduação, Márcio Wilker Soares Campelo pelas sugestões e contribuições na execução desta dissertação.

Ao colega do programa de Pós-Graduação, Cícero Igor Simões Moura Silva, pela amizade, sugestões e apoio.

Ao colega Ítalo Leite Figueiredo, pelos ensinamentos e participação na banca de qualificação.

À colega, Camila de Albuquerque Almeida, pela criteriosa interpretação das lâminas imunomarcadas para análise desta pesquisa.

À colega Conceição da Silva Martins, do Serviço de Morfologia da Universidade Federal do Ceará, carinhosamente chamada de Josy, pela dedicada participação na etapa de preparação das lâminas para o estudo imunohistoquímico.

À colega do Programa de Pós-Graduação, Maria dos Prazeres Carneiro Cardoso, pela amizade, pela convivência, pelas disciplinas cursadas durante o decorrer deste mestrado.

Às colegas do programa de Pós-graduação, Andréa da Nóbrega Cirino Nogueira, Soraya Maria do Nascimento Rebouças, Maria Josire Vitorino Lima, pelo apoio e amizade.

Ao professor doutor Henrique Cunha Júnior, pelas contribuições, incentivo e perseverança.

A todos os professores da pós-graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas que contribuíram em minha formação neste curso.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Medico-Cirúrgicas, senhora Luciene Vieira de Oliveira, pela amizade incondicional, competência, carinho e dedicação, dispensados a mim durante a realização deste trabalho.

À senhora Magda Maria Gomes Fontenelle, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Medico-Cirúrgicas, pelas gentilezas e apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Medico-Cirúrgicas, pela importante contribuição financeira para a realização do presente estudo.

Ao CNPq, pela bolsa auxílio, importante incentivo para a manutenção das minhas atividades durante o período do mestrado.

Às técnicas de laboratório, Maria do Socorro França e Elilce Frota Costa do Serviço de Morfologia da Universidade Federal do Ceará, pela benevolência na confecção das lâminas.

Aos meus sobrinhos Walter, Willer e a minha cunhada Solange, pela compreensão durante a minha ausência para conclusão deste trabalho.

À amiga Magda Machado Portela (*in memoriam*) pelo alentado estímulo nos momentos em que o cansaço e o desânimo tentavam ser mais fortes.

Aos colegas dos Cursos de Mestrado e Doutorado pelo permanente incentivo e parceria.

A todos que de uma forma geral me ajudaram na consecução deste esforço.

*“Comece fazendo o que é necessário,
depois o que é possível,
e de repente você estará fazendo o impossível”
(São Francisco de Assis)*

RESUMO

PERFIL IMUNO-HISTOQUÍMICO DA EXPRESSÃO DE ATIVADORES INTRACELULARES, COM E SEM PRECONDICIONAMENTO COM L-ALANIL-GLUTAMINA EM MODELO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM CÉREBROS DE GERBILS. LEIDELAMAR RÓSARIO ALVES DE OLIVEIRA. DISSERTAÇÃO (MESTRADO). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas. Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

Foi investigado o efeito da administração prévia de L-alanil-glutamina (L-ALN-GLN) nas lesões de isquemia e reperfusão em cérebros de gerbils através da detecção imunohistoquímica da expressão de mediadores pró-inflamatórios e da defesa anti-oxidante (IL-6, $\text{TNF}\alpha$, NF-kB e HO-1). Trata-se de um estudo experimental, controlado, utilizando 54 gerbils machos, com peso médio de 150g, distribuídos aleatoriamente em 3 grupos: salina sem isquemia e reperfusão (SSI), salina com isquemia e reperfusão (SIR), L-alanil-glutamina com isquemia e reperfusão (GIR), redistribuídos em 3 subgrupos: T0 (tempo máximo de isquemia), T30 (30 min de reperfusão) e T60 (60 min de reperfusão), com 6 animais por subgrupo. Foram pré-tratados com solução salina 2,0 mL 0,9% via endovenosa (e.v.) ou L-ALN-GLN 0,75g/Kg (e.v.), 30 min antes do início dos experimentos. A isquemia cerebral foi induzida pela oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (ACCs), por um período de 15 minutos. Após todos os procedimentos cirúrgicos e ao final dos três tempos 0, 30, 60 minutos, os animais foram sacrificados e tiveram os tecidos cerebrais removidos e fixados em formol a 10% por 24 horas, a fim de serem devidamente processados para inclusão em parafina. Após esse procedimento, foram feitos cortes de 4 μm em micrótomo e colocados em lâminas de L-polilisina, apropriadas para a realização da imunohistoquímica. Foi utilizado o método de estreptavidina-biotina-peroxidase. A avaliação quantitativa foi feita por meio da contagem das células nervosas imunomarcadas, tanto neurônios quanto células da neuroglia, observadas com aumento de 400X em microscópio óptico modelo Olympus BX41. Foram observados dez campos de cada corte, com um total de 4 cortes por subgrupo, procurando-se sempre iniciar pela camada piramidal interna. Nas comparações entre os grupos (SSI) e (SIR) houve um aumento significativo nas células NFkB-positivas no grupo SIR nos tempos T30 ($238,3 \pm 218,4$ versus $1234,8 \pm 144,9$); $p=0,000$ e T60 ($586,5 \pm 141,2$ versus $1286,3 \pm 85,0$); $p=0,000$. Verificou-se também um aumento significativo do $\text{TN}\alpha$ no grupo SIR nos tempos T30 ($214,0 \pm 17,3$ versus $333,0 \pm 395,6$); $p=0,999$ e fortemente, em T60 ($263,8 \pm 42,9$ versus $1015,5 \pm 102,8$); $p=0,00$ e observou-se um aumento significativo da IL-6 no tempo T60 no grupo SIR em comparação ao grupo SSI, ($206,8 \pm 248,3$ versus $316,0 \pm 365,4$); $p=0,999$. Entretanto, as células marcadas pela HO-1, no grupo SIR, comparativamente ao grupo SSI, diminuíram significativamente nos tempos T30 ($25,8 \pm 3,9$ versus $11,3 \pm 13,0$) $p=1,000$ e T60 ($18,5 \pm 7,6$ versus $9,8 \pm 13,7$) $p=1,000$. Para as células expressando marcação para as citocinas IL-6 em T0 ($311,0 \pm 246,5$ versus $14,8 \pm 29,5$); $p=0,817$. T30 ($536,3 \pm 119,8$ versus $9,0,3 \pm 18,0$); $p=0,033$. T60 ($316,0 \pm 365,4$ versus $28,5 \pm 57,0$); $p=0,591$. E $\text{TNF}\alpha$ em T0 ($30,3 \pm 36,0$ versus $3,5 \pm 7,0$); $p=1,000$ e T30 ($333,0 \pm 395,6$ versus $3,5 \pm 7,0$); $p=0,503$, T60 ($1015,5 \pm 102,8$ versus $3,5 \pm 7,0$); $p=0,000$ comparando-se os grupos (SIR) e (GIR), observou-se uma

diminuição significativa, em todos os tempos, no grupo GIR, contrariamente à imunomarcagem da HO-1, que aumentou significativamente no grupo (GIR) tratado pela L-alanil-glutamina em T0 ($32,5 \pm 9,7$ versus $0,0 \pm 0,0$); $p=1,000$. T30 ($11,3 \pm 13,0$ versus $6,8 \pm 13,5$); $p=1,000$ e T60 ($9,8 \pm 13,7$ versus $7,5 \pm 15,0$); $p=1,000$. Nas comparações entre os grupos (SIR) e (GIR), em relação ao NFkB, houve uma diminuição significativa no grupo GIR em T30 ($1234,8 \pm 144,9$ versus $247,5 \pm 495,0$); $p=0,000$ e T60 ($1286,3 \pm 85$ versus $217,8 \pm 435,5$); $p=0,000$. Em conclusão, a administração prévia de L-alanil-glutamina, no presente experimento de isquemia/reperfusão cerebral, em gerbils, revelou efeito protetor da mesma, ao promover redução *in situ* na expressão de citocinas e fator de transcrição de genes pró-inflamatórios: TNF α , IL-6 e NFkB. Concomitantemente, houve indução aumentada da expressão da enzima antioxidante HO-1, corroborando a ação protetora deste nutracêutico na injúria de isquemia/reperfusão, mormente do estresse inflamatório-oxidativo, em gerbils.

Palavras-chave: Isquemia/reperfusão; L-alanil-glutamina; hemeoxigenase; NFkB; citocinas; Gerbils; imunohistoquímica.

ABSTRACT

Immunohistochemical profile expression of intracellular activators with and without L-alanyl-glutamine preconditioning in experiments of brain ischemia/reperfusion on Gerbils

We investigated the protective effects of L-alanyl-Glutamine (L-ALN-GLN) through the immunohistochemical detection of proinflammatory mediators (IL-6, $\text{TNF}\alpha$, NF- κB e HO-1). This was achieved by means of a experimental and controlled study. Fifty-four male gerbils with a mean weight of 150g were used. They were divided randomly and equally into 3 groups: saline with ischemia and reperfusion (SIR), saline without ischemia and reperfusion (SSI) and with L-alanyl-glutamine and with ischemia and reperfusion (GIR). They were then redistributed into three subgroups according to time: T0 (maximum time of ischemia), T30 (30 minutes of reperfusion) and T60 (60 minutes of reperfusion), containing 6 animals each. They were pretreated with saline 2.0mL 0,9% intra-venously (iv) or L-ALN-GLN 0.75% G/KG (iv) 30 min before the start of the experiments. Cerebral ischemia was performed by bilateral occlusion of the common carotid arteries (CCAs) for a period of 15 minutes. After all surgical procedures and at the end of the three time periods the animals were sacrificed and brain tissue samples immediately obtained, which were fixed in 10% formalin solution for 24 hours in order being duly processed prior paraffin embedding. The samples (brain tissue) were collected at the end of each time periods. After this and through using a microtome, tissue sections were made at 4 microns and then placed on glass slides covered with L-polylysine, a proper way for performing immunohistochemistry. The streptavidin-biotin-peroxidase method was used. The quantitative analysis was made by means of counting immunocytochemically-stained cells, both neurons and glial cells, as observed at 400X magnification under an optical microscope Olympus model BX41. Ten fields were observed for each section, with a total of 4 sections per sub-group, always at start, looking for the internal pyramidal layer. Comparing the groups (SSI) and (SIR) a significant increase in NF κB -labeled cells in the subgroup SIR T30 ($238,25\pm218,437$ versus $1234,75\pm144,857$); $p=0,001$ and SIR T60 ($586,50\pm141,210$ versus $1286,25\pm84,968$); $p=0,002$ was observed. There was also a significant increase in the (SIR) subgroup, of the $\text{TNF}\alpha$ immunostaining at T30 and T60 ($263,75\pm42,906$ versus $1015,50\pm102,796$); $p=0,01$ in comparison to the SSI group. Regarding the cells expressing IL-6 positive labeling, comparing the groups (SIR) and (GIR), it was observed a significant decrease at T30 and T60 in the GIR group ($536,25\pm119,837$ versus $9,00\pm18,000$); $p=0,033$. Comparing the groups (SIR) and (GIR), in relation to the NF κB immunolabeling, there was a significant decrease in group T30 in the GIR group ($1234,75\pm144,857$ versus $247,50\pm495$); $p=0,001$ as well as at T60 ($1286,25\pm84,968$ versus $217,75\pm435,500$); $p=0,001$. There was also a significant decrease, comparing the groups (SIR) and (GIR), of the $\text{TNF}\alpha$ expression in (GIR) group at all time periods, chiefly at T60 ($1015,50\pm102,796$ versus $3,50\pm7,000$); $p=0,001$. Regarding the immunostaining of the enzyme HO-1, there has been, comparing the groups (SSI) and (SIR), a significant decrease in the expression of this anti-oxidant protein in the SIR group. In the contrary, comparing the groups SIR

and GIR, a substantial and significant expression of HO-1 was documented in the group treated previously by the L-alanyl-glutamine, at times T30 and T60. In conclusion, the prior administration of L-alanyl-glutamine in experiments of ischemia-reperfusion in Gerbils, disclosed a protective outcome, by promoting an *in situ* reduction in the expression of pro-inflammatory cytokines (TNF α and IL-6) and nuclear transcription factor NFkB. At the same time, there has been an increase in the induction of the expression of the anti-oxidative enzyme HO-1, supporting a protective role of this preconditioning agent, chiefly against the inflammatory-oxidative stress. caused by the ischemia reperfusion brain injury model, in Gerbils.

Key words: Ischemia/reperfusion, L-alanyl-glutamine, hemeoxygenase-1, NFkB, cytokines, gerbils, immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Fórmula estrutural da glutamina (Gln).....	30
Figura 2:	Vias metabólicas da GLM. GLN é um precursor da síntese de ácidos nucleicos, glutatona, aminoácidos e presumivelmente da síntese de novo de proteínas como proteínas do choque térmico (HSP). Embora a Gln seja tradicionalmente classificada como um aminoácido não-essencial por poder ser sintetizada a partir do glutamato, ela é essencial para a homeostase cerebral, intestinal e para saúde em geral	33
Figura 3:	Esquema representativo da transmissão glutamatérgica no SNC.....	36
Figura 4:	Funções do TNF (adaptado por Roitt, 1999).....	41
Figura 5:	Vias da degradação do heme pela HO-1. HO-1 é uma enzima limitadora da velocidade do catabolismo do heme, degradando por clivagem peridativa moléculas heme, gerando a biliverdina, monóxido de carbono e ferro. Subsequentemente, a biliverdina é convertida em bilirrubina através da biliverdina redutase. Existem dois informes de hemooxigenase que são produtos gênicos distintos: HO-1 é a forma induzível e sua indução é importante na resposta dos tecidos ao estresse oxidativo. A HO-2 é a forma constituída encontrada em vários tecidos.....	44
Figura 6:	Distribuição dos animais nos grupos descritos, e os subgrupos com os correspondentes tempos de coleta.....	49
Figura 7:	Delineamento temporal do experimento. Aplicação intravenosa de Solução Salina 0,9% (SS) ou de L-alanil-glutamina (L-ala-Gln) 30 minutos antes da isquemia cerebral. Tempo de isquemia 15 minutos (oclusão), seguida de liberação (reperusão). Coletas: T0 (tempo de isquemia máxima), 30min (T30) e 60min (T60), de reperusão. Este modelo foi aplicado aos grupos SSI, SIR e GIR.....	50
Figura 8:	Esquema de corte coronal mediano do encéfalo e medula espinhal cervical de roedores. As linhas representam os planos cortados transversalmente. A) bulbo olfatório, B) fissura rinal, C) quiasma óptico, D) infundíbulo hipofisário, E) ponte e F) medula espinhal. Os números representam estruturas do encéfalo: 1) Bulbo olfatório, 2) Núcleo olfatório, 3) Córtex cerebral, 4) Corpo caloso, 5) Hipocampo, 6) Terceiro ventrículo, 7) Tálamo, 8) Hipotálamo, 9) Mesencéfalo, 10) Ponte e 11) Cerebelo. FONTE: MACHADO, 1994.....	50
Figura 9:	Representação gráfica das células TNF α positivas por campo nos grupos tratados com salina sem isquemia (SSI) e com isquemia (SIR) nos tempos 0, 30', 60'. Dados expressos (Medias $\pm$ D.P) dos grupos, análise dos dados pelo teste de Tukey para variáveis não emparelhadas: TNF p= 1,000: comparado ao respectivo grupo SSI, p=0,999: comparado ao respectivo grupo SSI. p=0,000: comparado ao respectivo grupo SSI.....	53
Figura 10:	Fotomicrografias de imunohistoquímica para TNF α do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina sem isquemia (SSI) (A) e com isquemia (SIR) (B) nos tempos 0.....	56

Figura 11:	Fotomicrografias de imunohistoquímica para $TNF\alpha$ do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina sem isquemia (SSI) (C) e com isquemia (SIR) (D) nos tempos 30.....	57
Figura 12:	Fotomicrografias de imunohistoquímica para $TNF\alpha$ do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina sem isquemia (SSI) (E) e com isquemia (SIR) (F) nos tempos 60.....	57
Figura 13:	Representação gráfica das células NFkB positivas por campo nos grupos tratados com salina sem isquemia (SSI) e com isquemia (SIR) nos tempos T0, T30', T60'. Dados expressos (Medias±D.P.) dos grupos, análise dos dados pelo teste de Tukey para variáveis não emparelhadas: p=1,000: comparado ao respectivo grupo SSI; p=0,000: comparado ao respectivo grupo SSI; p=0,000: comparado ao respectivo grupo SSI.....	58
Figura 14:	Fotomicrografias de imunohistoquímica para NFkB do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina sem isquemia (SSI) (A) e com isquemia (SIR) (B) nos tempos 0.....	59
Figura 15:	Fotomicrografias de imunohistoquímica para NFkB do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina sem isquemia (SSI) (C) e com isquemia (SIR) (D) nos tempos 30.....	59
Figura 16:	Fotomicrografias de imunohistoquímica para NFkB do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina sem isquemia (SSI) (E) e com isquemia (SIR) (F) nos tempos 60.....	60
Figura 17:	Representação gráfica das células IL-6 positivas por campo nos grupos tratados com salina sem isquemia (SSI) e com isquemia (SIR) nos tempos T0, T30', T60'. Dados expressos (Médias±DP.) dos grupos, análise dos dados pelo teste de Tukey para variáveis não emparelhadas: p=0,523: comparado ao respectivo grupo SSI; p=1,000: comparado ao respectivo grupo SSI; p=0,999: comparado ao respectivo grupo SSI.....	61
Figura 18:	Fotomicrografias de imunohistoquímica para IL-6 do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina sem isquemia (SSI) (A) e com isquemia (SIR) (B) nos tempos 0.....	62
Figura 19:	Fotomicrografias de imunohistoquímica para IL-6 do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina sem isquemia (SSI) (A) e com isquemia (SIR) (B) nos tempos 30.....	62
Figura 20:	Fotomicrografias de imunohistoquímica para IL-6 do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina sem isquemia (SSI) (E) e com isquemia (SIR) (F) nos tempos 60.....	63
Figura 21:	Representação gráfica das células HO-1 positivas por campo nos grupos tratados com salina sem isquemia (SSI) e com isquemia (SIR) nos tempos T0, T30', T60'. Dados expressos (Medias±DP.) dos grupos, análise dos dados pelo teste de Tukey para variáveis não emparelhadas: p=1,000: comparado ao respectivo grupo SIR; p=1,000: comparado ao respectivo grupo SIR; p=1,000: comparado ao respectivo grupo SIR.....	64

Figura 22:	Fotomicrografias de imunohistoquímica para HO-1 do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina sem isquemia (SSI) (A) e com isquemia (SIR) (B) nos tempos 0.....	65
Figura 23:	Fotomicrografias de imunohistoquímica para HO-1 do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina sem isquemia (SSI) (A) e com isquemia (SIR) (B) nos tempos 30.....	65
Figura 24:	Fotomicrografias de imunohistoquímica para HO-1 do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina sem isquemia (SSI) (A) e com isquemia (SIR) (B) nos tempos 60.....	66
Figura 25:	Representação gráfica das células TNF α positivas por campo nos grupos submetidos à isquemia e reperfusão e tratados com salina (SIR) e l-alanil-glutamina (GIR) nos tempos T0, T30, T60. Dados expressos (Medias $\pm$ D.P.) dos grupos, análise dos dados pelo teste de Tukey para variáveis não emparelhadas: p=1,000: comparado ao respectivo grupo SIR; p=0,503: comparado ao respectivo grupo SIR; p=0,000.....	67
Figura 26:	Fotomicrografias de imunohistoquímica para TNF α do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina com isquemia e repercussão (SIR) (A) e glutamina com isquemia e repercussão (GRI) (B) nos tempos 0.....	68
Figura 27:	Fotomicrografias de imunohistoquímica para TNF α do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina com isquemia e repercussão (SIR) (A) e glutamina com isquemia e repercussão (GRI) (B) nos tempos 30.....	68
Figura 28:	Fotomicrografias de imunohistoquímica para TNF α do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina com isquemia e repercussão (SIR) (A) e glutamina com isquemia e repercussão (GRI) (B) nos tempos 60.....	69
Figura 29:	Representação gráfica das células NFkB positivas por campo nos grupos submetidos à isquemia e reperfusão e tratados com salina (SIR) e l-alanil-glutamina (GIR) nos tempos T0, T30', T60'. Dados expressos (Medias $\pm$ D.P.) dos grupos, análise dos dados pelo teste de Tukey para variáveis não emparelhadas: p=1,000 comparado ao respectivo grupo SIR; p=0,000 comparado ao respectivo grupo SIR; p=0,000 comparado ao respectivo grupo SIR.....	70
Figura 30:	Fotomicrografias de imunohistoquímica para NFkB do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina com isquemia e repercussão (SIR) (A) e glutamina com isquemia e repercussão (GRI) (B) nos tempos 0.....	71
Figura 31:	Fotomicrografias de imunohistoquímica para NFkB do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina com isquemia e repercussão (SIR) (A) e glutamina com isquemia e repercussão (GRI) (B) nos tempos 30.....	71
Figura 32:	Fotomicrografias de imunohistoquímica para NFkB do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina com isquemia e repercussão (SIR) (A) e glutamina com isquemia e repercussão (GRI) (B) nos tempos 60.....	72

Figura 33:	Representação gráfica das células IL-6 positivas por campo nos grupos tratados salina com isquemia e reperfusão (SIR) e glutamina com isquemia e reperfusão (GIR) nos tempos T0, T30', T60'. Dados expressos (Medias±D.P.) dos grupos, análise dos dados pelo teste de Tukey para variáveis não emparelhadas: p=0,817 comparado ao respectivo grupo SIR; p=0,033 comparado ao respectivo grupo SIR; p=0,591 comparado ao respectivo grupo SIR.....	73
Figura 34:	Fotomicrografias de imunohistopquímica para IL-6 do córtex cerebral na câmada piramidal interna dos grupos tratados salina com isquemia e repercussão (SIR) (A) e glutamina com isquemia e repercussão (GRI) (B) nos tempos 0.....	73
Figura 35:	Fotomicrografias de imunohistopquímica para IL-6 do córtex cerebral na câmada piramidal interna dos grupos tratados salina com isquemia e repercussão (SIR) (A) e glutamina com isquemia e repercussão (GRI) (B) nos tempos 30.....	74
Figura 36:	Fotomicrografias de imunohistopquímica para IL-6 do córtex cerebral na câmada piramidal interna dos grupos tratados salina com isquemia e repercussão (SIR) (A) e glutamina com isquemia e repercussão (GRI) (B) nos tempos 60.....	74
Figura 37:	Representação gráfica das células HO-1 positivas por campo nos grupos submetidos à isquemia e reperfusão e tratados com salina (SIR) e l-alanil-glutamina (GIR) nos tempos T0, T30', T60'. Dados expressos (Medias±D.P.) dos grupos, análise dos dados pelo teste de Tukey para variáveis não emparelhadas: p=1,000 comparado ao respectivo grupo SIR; p=1,000 comparado ao respectivo grupo SIR; p=1,000 comparado ao respectivo grupo SIR.....	75
Figura 38:	Fotomicrografias de imunohistopquímica para HO-1 do córtex cerebral na câmada piramidal interna dos grupos tratados salina com isquemia e repercussão (SIR) (A) e glutamina com isquemia e repercussão (GRI) (B) nos tempos 0.....	76
Figura 39:	Fotomicrografias de imunohistopquímica para HO-1 do córtex cerebral na câmada piramidal interna dos grupos tratados salina com isquemia e repercussão (SIR) (A) e glutamina com isquemia e repercussão (GRI) (B) nos tempos 30.....	76

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Tabela 1:	Células TNF α positivas por campo, observadas nos grupos tratados com salina sem isquemia (SSI) e com isquemia (SIR), nos tempos 0, 30', 60'. Dados referentes às células marcadas em 10 campos de cada corte histológico, com um total de 4 cortes por grupo.....	56
Tabela 2:	Células NFkB positivas por campo, observadas nos grupos tratados com salina sem isquemia (SSI) e com isquemia (SIR) nos tempos 0, 30, 60. Dados referentes às células marcadas em 10 campos de cada corte histológico, com um total de 4 cortes por grupo.....	58
Tabela 3:	Células IL-6 positivas por campo, observadas nos grupos tratados com salina sem isquemia (SSI) e com isquemia (SIR) nos tempos 0, 30', 60'. Dados referentes às células marcadas em 10 campos de cada corte histológico, com um total de 4 cortes por grupo.....	61
Tabela 4:	Células HO-1 positivas por campo, observadas nos grupos tratados com salina sem isquemia (SSI) e com isquemia (SIR), nos tempos 0, 30', 60'. Dados referentes às células marcadas em 10 campos de cada corte histológico, com um total de 4 cortes por grupo.....	
Tabela 5:	Células TNF α positivas por campo, observadas nos grupos submetidos à isquemia e reperfusão e tratados com salina (SIR) e l-alanil-glutamina (GIR) nos tempos 0, 30, 60. Dados referentes às células marcadas em 10 campos de cada corte histológico, com um total de 4 cortes por grupo.....	64
Tabela 6:	Células NFkB positivas por campo, observadas nos grupos submetidos à isquemia e reperfusão e tratados com salina (SIR) e l-alanil-glutamina (GIR)), nos tempos 0, 30', 60'. Dados referentes às células marcadas em 10 campos de cada corte, com um total de 4 cortes por grupo.....	67
Tabela 7:	Células IL-6 positivas por campo, observadas nos grupos submetidos à isquemia e reperfusão e tratados com salina (SIR) e l-alanil-glutamina (GIR) nos tempos 0, 30', 60'. Dados referentes às células marcadas em 10 campos de cada corte histológico, com um total de 4 cortes por grupo.....	70
Tabela 8:	Células HO-1 positivas por campo, observadas nos grupos submetidos à isquemia e reperfusão e tratados com salina (SIR) e l-alanil-glutamina (GIR), nos tempos 0, 30', 60'. Dados referentes às células marcadas em 10 campos de cada corte histológico, com um total de 4 cortes por grupo.....	75
Quadro 1:	Denominação dos grupos, amostra, tempo pré-tratamento, droga utilizada, procedimentos executados, material coletado, substâncias a serem dosadas e tempo de coletas, em todos os grupos estudados.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C	antes de Cristo
ACCs	Artérias carótidas comuns
Ala-Gln	L-alanil-glutamina
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
BHE	Barreira hematoencefálica
CE	Ceará
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO	Monóxido de Carbono
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DAB	Diaminobenzidine
Dr.	Doutor
E. V.	Endovenosa
Ed.	Edição
EROs	Espécies reativas de Oxigênio
g	Grama
GABA	Ácido gama aminobutírico
GIR	Glutamina com isquemia e reperfusão
H ⁺	Íon hidrogênio
H ₂ O	Fórmula da água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HO-1	Hemeoxigenase 1
I/R	Isquemia/Reperfusão
IC	Isquemia cerebral
IFN-γ	Interferon-γ
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-15	Interleucina-15
IL-6	Interleucina-6
MEC	Matriz extracelular
min	minuto
ml	mililitro

MPO	Mieloperoxidase
NF-kB	Fator de transcrição nuclear NFkappaB
NO	Óxido nítrico
NOSc	Óxido nítrico sintase constitutiva
NOSi	Óxido nítrico sintase induzida
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH	Radical hidroxil
PBS	Tampão fosfato
PCI	Pré-condicionamento isquêmico
SIR	Salina com isquemia e reperfusão
SNC	Sistema nervoso central
Sra.	Senhora
SSI	Salina sem isquemia
T0	Tempo zero
T30	Tempo trinta
T60	Tempo sessenta
TNF-a	Fator de necrose tumoral alfa
TNF-b	Fator de necrose tumoral beta
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFC	Universidade Federal do Ceará
Umol	Micromol
USA	Estados Unidos da América

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Lesão isquêmica	21
1.2	Lesão de reperfusão	25
1.3	Espécies reativas de oxigênio (EROs)	26
1.4	Metabolismo energético cerebral	28
1.5	Glutamina e L-alanil-glutamina	29
1.6	Glutamina e sistema nervoso central	30
1.7	Pré-condicionamento isquêmico	35
1.8	Mediadores pró-inflamatórios	37
1.9	Justificativa	39
2	OBJETIVOS	46
2.1	Objetivo geral	46
2.2	Objetivo específico	46
3	MÉTODO	47
3.1	Amostra	47
3.2	Experimento	51
3.3	Imunohistoquímica para detecção de IL-6; TNFalfa, NF-kB; HO-1	54
3.4	Análise morfológica	55
3.5	Análise estatística	55
4	RESULTADOS	78
5	DISCUSSÃO	85
6	CONCLUSÃO	86
	REFERÊNCIAS	60
	APÊNDICES	80
	ANEXOS	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lesão isquêmica

A isquemia cerebral (IC) é problema médico ainda de difícil solução e que pode ocorrer em diferentes situações clínicas, tanto em doenças cerebrais primárias, como secundariamente às doenças sistêmicas (KIMURA *et al.*, 2000; ALZENMAN *et al.*, 2000).

Podemos classificar (IC) em focal ou global. Naquelas ditas focais somente um território cerebral é acometido e nas globais todo o encéfalo é comprometido (GINSBERG; BUSTO, 1989).

A IC é doença ainda sem tratamento, totalmente satisfatório. Estudos tem procurado o esclarecimento de sua fisiopatologia com o objetivo de encontrar o tratamento eficaz (MENZIES; HOLF; BETZ, 1992).

As doenças cerebrovasculares constituem atualmente a terceira causa de morte, sendo importante motivo de mortalidade e morbidade na população da maioria dos países, desenvolvidos ou não. A incidência do infarto cerebral na população europeia é de 1,35 a 2,2/1000 habitantes por ano, sendo 83% destes casos de etiologia isquêmica (BHUIYAN; KIIM, 2010). Nos Estados Unidos, segundo o *National Institute of Health*, a doença cerebrovascular atinge cerca de 500.000 pessoas por ano, com letalidade de 20 a 30% e com a mesma taxa de incapacitação severa. Apesar desses índices variarem nas regiões do mundo, jamais deixam de ser significativas em sua prevalência (BLATINA *et al.*, 1995).

No Brasil, apesar dos poucos estudos estatísticos disponíveis, existem dados sugerindo que as doenças cerebrovasculares estejam entre as maiores causas de mortalidade (LOTUFO, 2000), porém se somarmos os casos de anóxia neonatal, acidentes vasculares cerebrais de várias etiologias e hipóxia secundária à asfixia por submersão (as síndromes de afogamento e quase afogamento) teremos um assustador número de eventos onde o sistema nervoso central sofrerá lesões,

muitas vezes irreversíveis e com dramáticas repercussões para o indivíduo acometido (TERENT *et al.*, 1994).

De acordo com Lessa (1999), as taxas de mortalidade são elevadas situando-se entre as mais altas do mundo. Um terço dos óbitos anuais por doenças do aparelho circulatório no Brasil, de 1980 a 1995, foi atribuído às doenças cerebrovasculares. A mortalidade é maior nos homens e a letalidade não mostra consistência quanto ao gênero. A tendência das hospitalizações e da letalidade global é crescente, acentuada no triênio 1995-1997 (LESSA, 1999).

A IC é determinada pela ausência ou redução acentuada na oferta de oxigênio e de outros substratos metabólicos ao cérebro por obstáculo circulatório arterial dos vasos cerebrais. Para a realização de estudos acerca deste quadro lesional agudo, é necessário estabelecer parâmetros de lesão cerebral, bem como conhecer seus mecanismos fisiopatológicos precisos. A utilização de estudos experimentais, na vigência de um processo de isquemia, oferece possível padronização que tornaria os resultados mais fidedignos (DUARTE; CAMPOS; COLLI, 2003).

A IC é o tipo mais comum de lesão celular neuronal ocorrente em medicina clínica e tem sido estudado extensamente em humanos, em animais de laboratório, bem como em sistemas de cultura celular (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2010; ENG; MOSKOWITZ; JACOBS, 2005).

Na fase inicial de um evento isquêmico, global ou focal, o fluxo sanguíneo cerebral tende a permanecer constante, mesmo diante de uma ampla variação das pressões arterial e intracraniana. Isto se deve ao refinado mecanismo de autorregulação da resistência vascular cerebral de caráter anti-isquêmico, garantidor, portanto, de uma perfusão sanguínea estável. Este mecanismo protetor, entretanto, fica gravemente comprometido no tecido isquêmico em fase de lesão irreversível ou em áreas adjacentes, ditas de penumbra, bem como em quadros de encefalopatia isquêmica/hipóxica global (DIAS *et al.*, 2000).

A hipóxia, determinada principalmente por uma redução da pressão parcial de oxigênio nos vasos arteriais, pode também ocorrer em uma variedade de contextos clínicos como anemia grave, envenenamentos e outras causas. Ao contrário da isquemia, onde o suprimento de oxigênio e nutrientes é drasticamente reduzido, ou em razão da pressão de perfusão tecidual muito baixa, ou ainda, e mais frequentemente, como consequência de obstrução mecânica intraluminal no sistema arterial, a hipóxia isoladamente tende a ser relativamente menos danosa. A redução da drenagem venosa também é referida como causa de hipóxia cerebral (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2010).

Ao contrário da hipóxia, durante a qual a produção de energia através da glicólise anaeróbica contínua, a isquemia compromete a distribuição de substratos para glicólise. Assim, nos tecidos isquêmicos, não apenas o metabolismo aeróbico é comprometido, mas a geração de energia anaeróbica também cessa depois que os substratos glicolíticos são exauridos ou quando a glicólise é inibida em consequência do acúmulo de metabolitos que normalmente seriam removidos pelo fluxo sanguíneo. Por esta razão, a isquemia tende a causar lesão celular e tecidual mais rápida e intensa que a hipóxia na ausência de isquemia. A sequência de eventos que acompanha a hipóxia ou a isquemia se reflete em muitas das alterações bioquímicas da lesão celular (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2010).

As consequências desta restrição dependem das características metabólicas do tecido atingido, da existência de circulação colateral e da duração de restrição (SCHALLER; GRAF, 2004).

Quando um tecido é exposto ao processo de isquemia, a falta de oxigênio e a depleção de energia levam a várias alterações bioquímicas, incluindo formação de metabólitos citoplasmáticos nocivos, tumefação celular e má função dos sistemas de transporte de membrana com dissipação de gradientes iônicos e de eletrólitos. Esta sequência de reações químicas pode levar à tensão celular grave e à necrose. Sabe-se que os prejuízos causados pela isquemia são diretamente proporcionais ao tempo de duração desta, podendo variar de poucos minutos a horas na dependência das necessidades metabólicas das diferentes células de um organismo vivo (PERROTA; SHINAIDER, 1992; FABRIS, 1991; KERRIGAN; STOLAND, 1993).

Quatro componentes estruturais e funcionais são particularmente sensíveis à hipóxia decorrente da isquemia: a membrana celular, responsável principal pelo equilíbrio iônico e osmótico; a respiração aeróbica mitocondrial, que compreende, entre outros eventos, a fosforilação oxidativa e a produção de ATP (adenosina-trifosfatada); a síntese de proteínas estruturais e enzimáticas e a cromatina responsável pela reprodução celular (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2010).

1.2 Lesão de reperfusão

A reperfusão, embora necessária para reverter o estado isquêmico, piora as lesões já presentes no período de isquemia, pois com a chegada do oxigênio e a produção de radicais livres, associadas à intensa participação de neutrófilos, amplia a reação inflamatória com consequentes alterações morfológicas, com edema intersticial e celular, infiltrado leucocitário, trombose da microcirculação, apoptose ou necrose tecidual (SILVA; BURIHAN, 1999; FIGUEIREDO; CRUZ; MORSCH, 2005). A intensidade dos danos causados pela isquemia dependerá do local da ocorrência de oclusão arterial, da existência de circulação colateral, do grau de demanda de oxigênio dos tecidos envolvidos e do tempo decorrido entre isquemia e reperfusão (POLI *et al.*, 2005).

A reperfusão, após isquemia cerebral, eleva a formação de espécies reativas pró-oxidantes no tecido encefálico, as quais podem contribuir para a injúria neuronal por interagir diretamente com macromoléculas, incluindo proteínas, lipídios e DNA, ou indiretamente, atingindo os caminhos de sinalização celular e a regulação da expressão gênica (MORO *et al.*, 2005).

Vários mecanismos estão envolvidos com as lesões de reperfusão: o aumento do gradiente do glutamato extracelular que ocorre durante a isquemia seria um “precursor”, ou seja, fonte de radicais livres para alterações que viriam a ocorrer durante o período de reperfusão (NISHIZAWA, 2001).

As células da glia também seriam importantes nas lesões de isquemia e reperfusão cerebrais. Supõe-se que essas células, assim como os macrófagos, possuiriam também a óxido nítrico sintase induzida (NOSi), sendo, assim, produtoras de Óxido Nítrico(NO) através de duas vias enzimáticas, uma não dependente de Ca^{++} (iNOS) e outra dependente de Ca^{++} , óxido nítrico sintase constitutiva(NOSc). Essas duas classes de fagócitos, os macrófagos e as células da glia, também seriam responsáveis por atividade citotóxica no cérebro (TARDINI; YOSHIDA, 2003).

Normalmente, em condições fisiológicas, a produção de radicais livres intracelulares é diminuta, uma vez que o sistema de enzimas antioxidantes impede a sua formação ou as remove. Fazem parte deste sistema protetor, as enzimas catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e superóxido dismutase. Portanto, em condições de homeostase, há harmonia na produção das substâncias pró-oxidantes e antioxidantes. Quando ocorre a quebra desse equilíbrio, por aumento da produção de (EROs), ou por déficit na proteção antioxidante, ocorre o estresse oxidativo com consequências patológicas e repercussões morfofuncionais regressivas (DROGE, 2002).

Na lesão de reperfusão, os ácidos graxos livres sofrem metabolização pelas vias da lipoxigenase e cicloxigenase, formando tromboxanos, prostaglandinas, superóxidos e radicais livres, que tem como consequência a peroxidação lipídica (TARDINI *et al.*, 2003).

Acredita-se que a peroxidação lipídica associada ao estresse oxidativo é um dos mecanismos que desempenha papel central no processo fisiopatológico durante o evento isquêmico, pois a degeneração neuronal resultante estaria associada ao aumento da produção de radicais livres oxigenados. Durante a isquemia cerebral, inúmeros eventos predisõem o encéfalo à formação de EROs, como o rápido decréscimo nos níveis de ATP, perda da homeostase do Ca^{++} , acidose láctica pela via glicolítica, excitotoxicidade, metabolismo e liberação do ácido araquidônico, disfunção mitocondrial e edema (ALEXANDROVA; BOCHEV, 2005).

1.3 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

O oxigênio é o elemento prioritário para os organismos aeróbicos, utilizando a produção de energia através da cadeia transportadora de elétrons existente na mitocôndria dos eucariotes e na membrana celular de muitas bactérias, sendo imprescindível em inúmeras vias metabólicas fundamentais. Ao mesmo tempo, seu consumo é capaz de gerar substâncias tóxicas a nível intracelular e extracelular, criando-se então o chamado “paradoxo do oxigênio”, resultante equilíbrio do balanço existente entre suas vantagens e desvantagens. Essas substâncias tóxicas são produzidas durante o transporte de elétrons, reações enzimáticas, reações de auto-oxidação, ou ainda pelo grupo heme de proteínas, e são comumente chamadas de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O termo radical livre acaba sendo utilizado para designar qualquer radical químico capaz de existência independente (por isso o termo livre), que contenha um ou mais elétrons desemparelhados (BAYIR, 2005).

Para lidar com esse paradoxo, a célula possui uma série de defesas capazes de evitar o efeito deletério destas EROs geradas pelo metabolismo aeróbico, organizadas em diferentes níveis. Estas defesas são comumente chamadas de defesas antioxidantes, e podem ser produzidas endogenamente ou adquiridas pela dieta. Estas estratégias de defesa incluem diferentes níveis de proteção, que podem ser resumidos em três formas principais de atuação: evitar a formação de EROs, a neutralização dessas espécies reativas e a reparação de danos ocasionados por elas. Assim, o termo antioxidante pode ser considerado por qualquer substância que, previna, retarde ou remova o dano oxidativo de uma molécula-alvo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A barreira hematoencefálica (BHE) oferece proteção tanto anatômica quanto fisiológica ao sistema nervoso central, pois protege o cérebro das substâncias tóxicas do sangue, fornece nutrientes aos tecidos cerebrais e realiza filtração de compostos que são prejudiciais ao cérebro. Os principais componentes

da BHE são células endoteliais, ocludinas, claudinas, pericito, astrócitos e matriz extracelular (MEC). O transporte através da BHE é regulado por barreiras físicas e metabólicas (enzimas e diferentes sistemas de transporte) (ROJAS; RITTER; PIZZOL, 2011).

O tecido cerebral é particularmente susceptível às lesões por agentes oxidantes, por possuir reservas de ferro e altos níveis de lipídios polinsaturados e por apresentar diminuída defesa antioxidante (WEIGAND *et al.*, 1999; TARDINI *et al.*, 2003).

A atividade enzimática antioxidante do tecido afetado pela isquemia/reperfusão é particularmente importante como defesa endógena primária contra as espécies pró-oxidantes que induzem à lesão (HOMI *et al.*, 2002). Igualmente, a capacidade antioxidante plasmática pode ser fator fundamental em fornecer proteção contra o dano neurológico causado pelo estresse oxidativo, associado ao evento vascular isquêmico (TOPCUOGLU; DEMIRKAYA, 2000).

1.4 Metabolismo energético cerebral

Para manterem-se vivos e desempenharem as diversas funções biológicas, os organismos necessitam continuamente de energia (MARZZOCO; TORRES, 1999).

A maior parte da energia utilizada pelos mamíferos deriva do metabolismo celular aeróbico, o qual por meio da fosforilação oxidativa ocorrida nas mitocôndrias, produz moléculas de Adenosina Trifosfato (ATP). Entretanto, se houver oferta insuficiente de O₂ para que ocorra o estágio oxidativo do metabolismo da glicose, a maior parte do ácido pirúvico será transformada em ácido láctico, a fosforilação oxidativa cessa rapidamente e o ATP passa a ser sintetizado, principalmente por meio da glicólise anaeróbica (JENNINGS; REIMER, 1981).

A glicose é, quantitativamente, o principal substrato oxidável para a maioria dos organismos sendo imprescindível para o sistema nervoso central. O cérebro humano requer um constante suprimento de glicose e de oxigênio fornecidos pela circulação e contribuem com 15% do débito cardíaco em repouso e 20% do consumo corporal total de oxigênio (OLIVEIRA, 2005).

O cérebro humano possui elevado metabolismo aeróbico e consome cerca de 120g de glicose diariamente, o que corresponde à captação de energia de aproximadamente 420 kcal, correspondendo a 60% da utilização de glicose por todo o organismo em estado de repouso (PIRES, 2010).

As células do SNC mais vulneráveis à isquemia são os neurônios; porém, quando a isquemia é suficientemente intensa ou prolongada, as células gliais também morrem, produzindo necrose completa do tecido neural (BRADFORD; WARD, 1987).

O conhecimento científico atual explica o metabolismo oxidativo como uma necessidade de oxigênio do organismo aeróbico para sua sobrevivência. No entanto, sabe-se que quando há concentração de oxigênio acima do limite do encontrado na natureza, quadros de toxicidade podem ocorrer (GALERA, 2008).

1.5 Modelos experimentais de isquemia cerebral

Diferentes modelos animais são utilizados para estudar a suscetibilidade de populações neuronais aos insultos isquêmicos e quais os mecanismos envolvidos na degeneração celular (CHOI; MAULUCCI-GEDDE; KRIEGSTEIN, 1987).

As técnicas experimentais mais comumente empregadas estão relacionadas ao tipo de isquemia (temporal ou permanente), à duração da isquemia e/ou reperfusão, aos leitos arteriais envolvidos, aos animais utilizados nos experimentos e aos testes de associação com drogas antioxidantes, bem como aos parâmetros avaliados (PIRES, 2010).

Para o estudo sistemático da fisiopatologia e tratamento da isquemia cerebral é fundamental a utilização de modelo animal, reprodutível *in vivo*, no qual haja o controle de variáveis fisiológicas. Para esse fim, diversas espécies animais são usadas (GARCIA, 1984).

Dentre os animais disponíveis, a utilização de roedores da espécie *Gerbils* é vantajosa, pois suas características anatômicas permitem intervenções cirúrgicas experimentais de baixo custo, apresentam semelhança com outras espécies filogeneticamente mais evoluídas (inclusive a humana), além de boa aceitação ética (OLIVEIRA, 2005).

O roedor Gerbil da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) é bastante susceptível à isquemia cerebral experimental por oclusão unilateral (permanente) ou bilateral (transitória) da artéria carótida comum (LEVINE; PAYAN, 1996).

Levine e Payan (1996) foram os primeiros a observarem que aproximadamente 20% dos gerbils que sofriam oclusão das artérias carótidas comuns (ACCs) desenvolviam diversas manifestações neurológicas e morriam depois de alguns dias.

Os modelos de oclusão unilateral permanente ou bilateral transitória das ACCs em gerbils apresentam as seguintes vantagens: manutenção de baixo custo, animais da mesma espécie e relativamente homogêneos, grande semelhança do ponto de vista anatomofisiológico e cerebrovascular em relação com outras espécies (ratos), procedimento cirúrgico simples, permitindo que muitos animais sejam estudados, proporcionando desta forma, vários protocolos de estudo para a avaliação da eficácia de agentes cerebroprotetores (PIRES, 2010).

1.6 Glutamina e L-alanil-glutamina

A glutamina, um eficiente precursor de glutathione, é o aminoácido mais abundante no corpo humano, representando 20% dos aminoácidos livres do plasma

e mais de 50% da reserva de aminoácidos no músculo esquelético humano. É composto de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, está presente em muitas proteínas e pode ser sintetizada virtualmente por todos os tecidos do organismo. Não é considerado um aminoácido essencial, mas um aminoácido “condicionalmente essencial”, pois em situações de estresse sua concentração no plasma diminui até 50%, estabelecendo um quadro de deficiência (GALERA, 2008).

A glutamina foi descrita pela primeira vez em 1883 por Schulze e Bosshard, entretanto, somente em 1914, Thierfelder e Sherwin elucidaram a presença e a função da glutamina no organismo humano. Alguns anos mais tarde, Krebs (1935) demonstrou a capacidade dos tecidos animais de sintetizá-la e degradá-la através de hidrólise (THIERFELDER; KREBS apud FURST; STEHLE, s.d.).

A fórmula empírica da glutamina é $C_5H_{10}O_3N_2$, a fórmula molecular é $C_5H_{10}O_3N_2$ com fórmula estrutural.

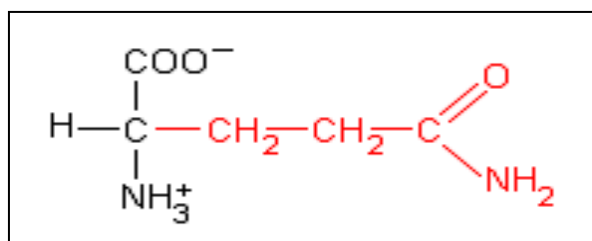


Figura 1 – Fórmula estrutural da glutamina (Gln)

Trata-se, portanto, de um ácido carboxílico biaminado, característica que compartilha com a asparagina e a lisina (Roskoski, 1997), alinhando-se na categoria dos aminoácidos com grupos polares sem carga elétrica (BAYNES, 2000; LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

As primeiras evidências de que a glutamina possui propriedades metabólicas importantes surgiram em 1955, quando Eagle demonstrou que a glutamina é importante para o crescimento e manutenção de células em cultura. Resultados semelhantes foram posteriormente encontrados para diferentes tipos de

tecidos e células, demonstrando ser esse aminoácido precursor de nucleotídeos e de outras moléculas, além de substrato energético para a proliferação celular (CURI, 2000).

Estudos realizados por Wischmeyer (2008), demonstraram que a glutamina aumenta a expressão do mRNA para proteína de choque térmico (HPS), em especial HSP 72 em 27 ratos. As HPS podem prevenir a ativação do fator de transcrição NFkB; e com isso, diminuir a expressão de citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina 1 (IL-1), além da expressão da NOSi.

A glutamina do organismo advém da produção endógena, somada à aquisição pela dieta, apresentando uma boa absorção pelos enterócitos (MASSAMBANI; BAZOTTE, 1998). A sua síntese envolve a adição de um grupamento amina à molécula de glutamato, catalisada endogenamente pela glutamina sintetase. Em condições normais, a produção endógena sozinha responde pelas necessidades de glutamina, por isso, tradicionalmente, a glutamina era considerada um aminoácido não essencial (DARMAUND et al., 1994).

No entanto, seus estoques podem ser depletados na vigência de estados catabólicos, como trauma cirúrgico, infecção, jejum prolongado, exercício extenuante, queimaduras extensas e infecção. Nesses casos, a concentração de glutamina plasmática declina, podendo ficar abaixo da metade dos valores normais, o que reflete sua maior utilização por leucócitos, enterócitos, fibroblastos e outras células, cuja atividade é estimulada nessas situações (PETERSEN, 1996; FURUKAWA, 2000; NEUSHOLME, 2001; BARBOSA, 2003). Faz-se então, necessário a suplementação de glutamina através da dieta, para manutenção de seus níveis plasmáticos fisiológicos. Por isso, a glutamina tem sido caracterizada como um aminoácido condicionalmente essencial (LACEY, 1990; GARCIA DE LORENZO et al., 2003).

Pelas propriedades da glutamina, supõe-se que a diminuição da disponibilidade desse aminoácido pode levar ao comprometimento da função imune por alterações na capacidade de proliferação das células envolvidas. Curi e

colaboradores (1995) evidenciaram que a glutamina age em neutrófilos normais in vitro, aumentando sua atividade bactericida. Também tem-se apontado a importância do metabolismo da glutamina na função de macrófagos, durante reações inflamatórias e imunológicas, provavelmente via liberação de citocinas (COSTA ROSA; SAFI; CURI, 1994).

Dentre as principais funções deste aminoácido estão: precursora de nitrogênio para síntese de nucleotídeos; manutenção do balanço ácido-base durante acidose; transferência de nitrogênio entre órgãos; detoxificação da amônia; crescimento e diferenciação celular; possível regulador direto da síntese e degradação proteica; fornece energia para as células de rápida proliferação, como enterócitos e células do sistema imune; veículo de transporte de cadeia carbônica entre os órgãos; age como precursora da ureoênese e gliconeogênese hepática, e de mediadores, como o Gaba e glutamato; fornece energia aos fibroblastos, aumentando a síntese de colágeno; promove melhora da permeabilidade e integridade intestinal; aumenta a resistência à infecção por aumento da função fagocitária; substrato para a síntese da glutatona e estimula a síntese de citrulina e arginina (NOVELLI et al., 2007).

A biossíntese da glutamina ocorre principalmente no fígado (hepatócitos periportais) (Champe, 1996; Alface, 1997), no músculo esquelético, nos pulmões e no tecido adiposo (Curthoys; Watford, 1995), a partir do ácido alfa-cetoglutarico, valina e isoleucina (RODWELL, 1998).

A glutamina é conhecida por aumentar a resposta imunológica. Tem também a função de otimizar o balanço nitrogenado e manter a síntese de proteína muscular. É um aminoácido neutro, glicogênico, dispensável em condições normais e sintetizado por vários tecidos orgânicos. Este aminoácido estimula a proliferação de linfócitos, promove a produção de interleucinas e a fagocitose dos macrófagos (ROGERO et al., 2002; ALBERTINI; RUIZ, 2001).

O aumento da demanda de glutamina nos tecidos resulta na redução significativa dos seus níveis plasmáticos, mesmo ocorrendo aumento na liberação

de glutamina pelo músculo esquelético (ALBERTINE; RUIZ, 2001; DIESTEL *et al.*, 2005; BARBOSA *et al.*, 2003).

Em situações especiais, como no estresse, injúrias ou sepse, os tecidos necessitam de uma demanda maior de glutamina e a síntese tecidual pode não suprir essa demanda, supondo-se ser benéfico administrar-se doses extras de glutamina (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

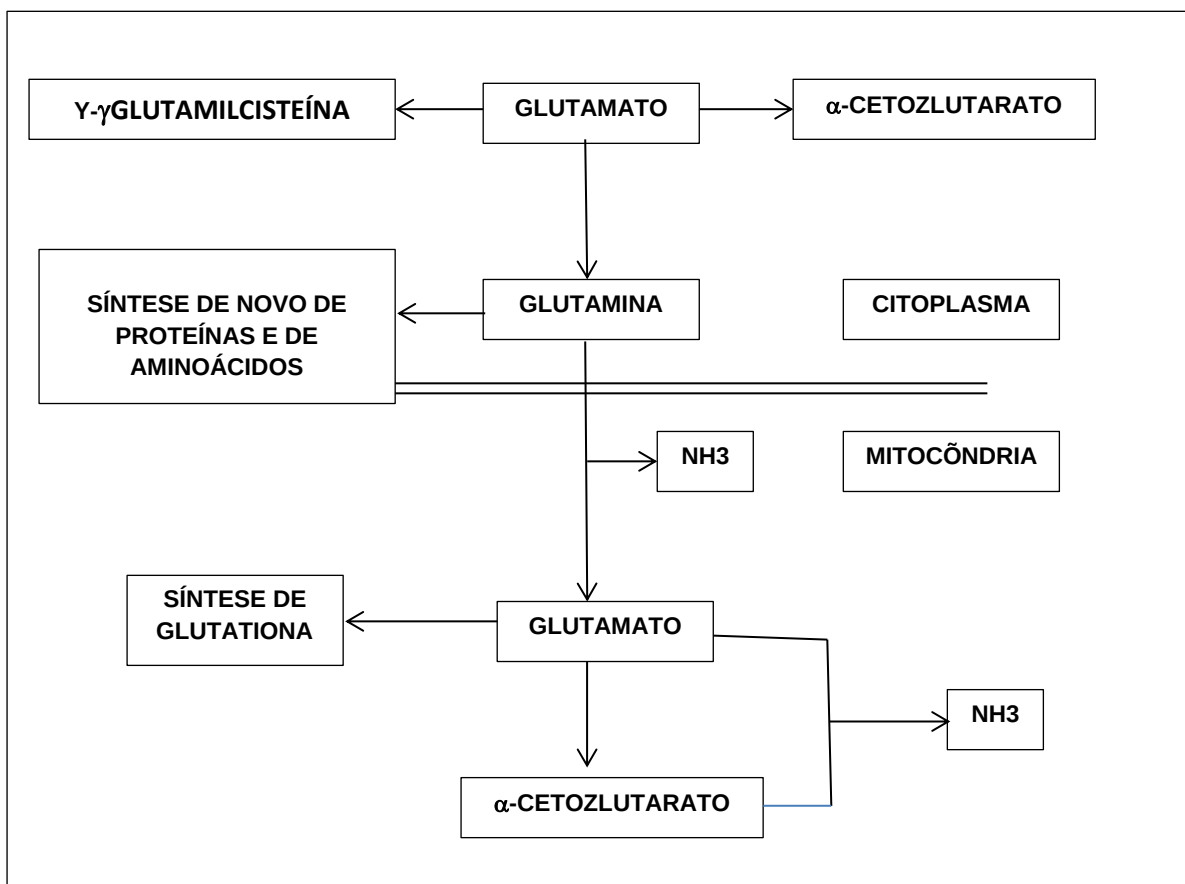


Figura 2 - Vias metabólicas da GLM. GLN é um precursor da síntese de ácidos nucleicos, glutathione, aminoácidos e presumivelmente da síntese de novo de proteínas como proteínas do choque térmico (HSP). Embora a GIN seja tradicionalmente classificada como um aminoácido não-essencial por poder ser sintetizada a partir do glutamato, ela é essencial para a homeostase cerebral, intestinal e para saúde em geral.

1.7 Glutamina e sistema nervoso central

A glutamina é precursora do glutamato neuronal, que é o principal neurotransmissor do Sistema Nervoso Central (SNC) dos mamíferos (CURI, 2000).

O glutamato desempenha importante papel na manutenção de aspectos funcionais do cérebro, tais como os fenômenos vinculados ao desenvolvimento, ao aprendizado e à memória, cognição e controle motor (COLLINGRIDGE; LESTER, 1989; MELDRUM, 2000; DANBOLT, 2001).

O metabolismo celular da glutamina envolve tanto neurônios quanto astrócitos. Alterações na sua síntese podem resultar em acúmulo de glutamato nas células gliais e redução nos neurônios. Contudo, a função da glutamina não se limita simplesmente à síntese de glutamato, senão que tem participação muito mais ampla no metabolismo do sistema nervoso. O tráfego de glutamato e glutamina entre neurônios e astrócitos parece ser a maior rota de reciclagem do neurotransmissor glutamato no SNC (DANBOLT, 2001).

No sistema nervoso central (SNC), assim como na maioria dos sistemas, os aminoácidos são importantes para a manutenção da concentração de nitrogênio no tecido. A manutenção de compostos nitrogenados adquire uma importância que vai além das necessidades de síntese protéica, pois o fornecimento de determinados aminoácidos é indispensável para a manutenção do conteúdo dos neurotransmissores, uma vez que alguns aminoácidos são os próprios neurotransmissores ou servem como precursores para a síntese de aminas biogênicas (YUDKOLFF, 1997).

O ciclo glutamina-glutamato que ocorre entre as células da glia e as terminações nervosas é mantido por meio de constante e rápida captação de ácido gama-aminobutírico (GABA) e glutamato, liberados por determinadas terminações nervosas e prontamente captadas por astrócitos, localizados nas proximidades destas. No interior dos astrócitos, estes aminoácidos são convertidos em glutamina, que logo em seguida é exportada e captada por terminações nervosas para gerar novos neurotransmissores (CURI, 2000).

A ideia de que aminoácidos pudessem funcionar como neurotransmissores no sistema nervoso central (SNC) surgiu na década de 1950, época em que foi demonstrado que, ao aplicar-se glutamato em áreas motoras específicas no córtex cerebral de macacos, observava-se um movimento dos membros relacionados (ARAUJO *et al.*, 2006).

Os neurotransmissores são os mediadores da sinalização química entre os neurônios. Os aminoácidos são considerados neurotransmissores de moléculas pequenas e o glutamato é o neurotransmissor presente na grande maioria das sinapses excitatórias no SNC (BERNE; LEVY, 2009).

Além de seus importantes papéis fisiológicos, quando em excesso na fenda sináptica, o glutamato pode se tornar uma potente neurotoxina. O termo excitotoxicidade foi inicialmente introduzido ao se verificar que a administração exógena de altas concentrações de glutamato (Olney, 1969; Olney; Ho, 1970) ou compostos com ação agonistas nos receptores para glutamato (Olney, 1981), eram capazes de levar à morte celular. Posteriormente, verificou-se que a aplicação de antagonistas glutamatérgicos apresentava efeitos benéficos em modelos animais (MELDRUM, 1990).

Tanto em alterações neurológicas agudas (hipóxia, isquemia) como em alterações crônicas (doenças neurodegenerativas), as células neurais afetadas podem liberar grande quantidade de glutamato através de processos que envolvem a liberação vesicular e/ou a reversão dos carreadores glutamatérgicos de membrana (LIPTON; ROSENBERG, 1994; DANBOLT, 2001). O mecanismo primário da morte celular induzida por glutamato envolve o desequilíbrio iônico promovido pela entrada excessiva de cálcio, inicialmente por atuar via seus receptores ionotrópicos (KA, AMPA e NMDA) e posteriormente atuando também via seus receptores metabotrópicos (MICHAELIS, 1998).

O aumento de concentração de cálcio intracelular por períodos prolongados, ativa cascatas enzimáticas que contribuem para a morte neuronal (ADIBHATLA *et al.*, 2003).

Em situações de insulto isquêmico cerebral, a redução do suprimento sanguíneo faz com que a região lesada seja privada de glicose e oxigênio, alterando o balanço iônico através da membrana. Este desbalanço causa a liberação não controlada de glutamato, podendo levar à morte neuronal (ADIBHATLA *et al.*, 2003).

Quando o fluxo sanguíneo é restaurado após um episódio isquêmico (reperfusão), o oxigênio ofertado pode não ser totalmente reduzido, gerando radicais livres e assim causando peroxidação lipídica com consequente dano celular irreversível (STEVENS; LOWE, 2002).

A excitotoxicidade de glutamato pode desencadear a morte necrótica ou apoptótica (SASTRY; RAO, 2000).

Depleção metabólica de energia associada à isquemia pode resultar na liberação inapropriada de aminoácidos excitatórios neurotransmissores, tais como glutamato, iniciando assim injúria celular mediada pelo influxo maior de íons Ca através de receptores de glutamato do tipo NMDA. A elevação dos íons de Ca celular, por sua vez deflagra um amplo efeito, incluindo a ativação de vias de sinalização, geração de espécies reativas oxigenadas e injúria mitocondrial (ENG *et al.*, 2005).

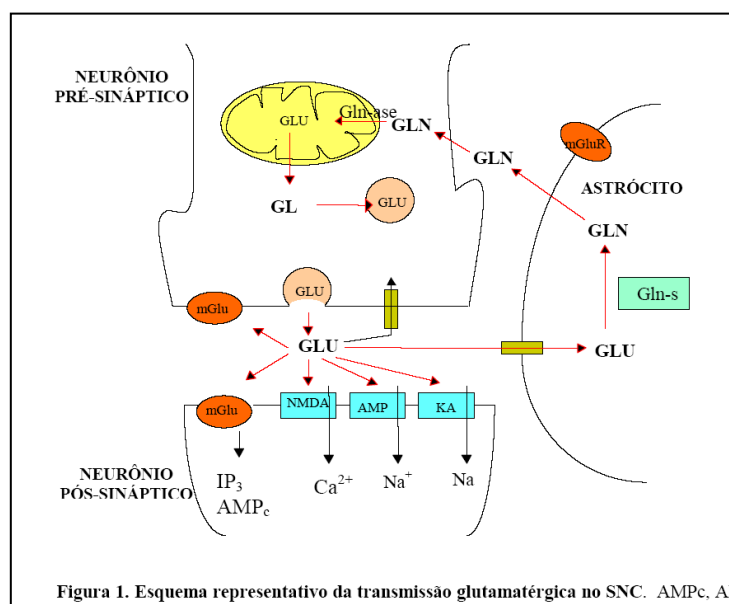


Figura 3 – Esquema representativo da transmissão glutamatérgica no SNC.

1.8 Pré-condicionamento isquêmico

O mecanismo de manutenção da respiração celular, a diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio e a preservação da integridade e do funcionamento das membranas celulares, por meio de diversos mediadores, estão sendo estudados como prováveis mecanismos de ação do pré-condicionamento isquêmico PCI (GÜRKE *et al.*, 1996; WALKER; YELLON, 1992).

A manutenção dos níveis de ATP e fosfato de creatina em conjunto com a redução da taxa de demanda energética pela célula tem se mostrado como hipótese central no mecanismo de ação do PCI, no que se refere à respiração celular (YELLON *et al.*, 1998; MURRY *et al.*, 1986; PANG *et al.*, 1995; MINNERS *et al.*, 2001; MOUNSEY *et al.*, 1992; MULLANE, 1992). Parece haver, durante os períodos de isquemia do PCI, redução dos depósitos de glicogênio, sendo a glicólise diminuída durante o período isquêmico sustentado (WALKER; YELLON, 1992). Em conjunto, pelo efeito de lavagem de catabólitos ocorrido durante os períodos de reperfusão do PCI, há menor acúmulo de lactato e íons hidrogênio (H⁺), o que diminui a velocidade de progressão da acidose isquêmica (MURRY *et al.*, 1986; PANG *et al.*, 1995).

Os primeiros estudos realizados com PCI envolveram o miocárdio. Em 1984, Neely e Grotyohann, utilizando miocárdio de coelhos, mostraram que um período curto de isquemia, prévio à isquemia cardíaca sustentada, produzia um efeito protetor contra a lesão cardíaca de isquemia/reperfusão (I/R). Posteriormente, Murry *et al.* (1990), utilizando o músculo miocárdio canino, documentaram o efeito protetor do PCI, quando foi definitivamente difundido o termo (PCI).

O PCI consiste em um fenômeno no qual um ou mais episódios breves de isquemia promove paradoxalmente uma proteção tecidual diante de um posterior episódio isquêmico mais prolongado, bem como contra a injúria de reperfusão pós-isquêmica. Ambas, modalidades de injúria celular situar-se-iam abaixo do limiar de dano celular, capazes, portanto, de ativar mecanismos neuroprotetores endógenos que diminuiriam significativamente o impacto de um insulto isquêmico

subsequente mais severo (DIRNAGL; SIMON; HALLENBECH, 2003; HARKIN *et al.*, 2002).

O termo PCI foi introduzido na literatura para indicar um certo efeito protetor induzido por breves períodos de isquemia (seguido ou não de pequeno período de reperfusão) na vigência de um episódio mais longo de isquemia (MURRY *et al.*, 1986).

O papel do PCI no aumento da tolerância à isquemia tem sido descrito em vários órgãos como coração, cérebro, medula espinhal, músculo esquelético, retina, rins, intestino e fígado. Entretanto, apesar de estudos sobre o mecanismo do efeito protetor do PCI, o seu real fundamento molecular não está ainda claramente definido (BULKLEY, 2000).

Estudos realizados por Kanoria *et al.* (2007); Murphy *et al.* (2007), utilizando a L-Ala-Gln em experimentos de PCI têm apontado este nutracêutico como agente protetor contra as lesões de isquemia e reperfusão em diversos órgãos (quando usados isoladamente não observou-se na literatura, registros dos dois pré-tratamentos associados).

Estudos realizados por Landim *et al.* (2008) demonstraram que a pré-administração de L-Ala-Gln em experimentos de PCI não modificou as concentrações plasmáticas de glutathiona reduzida (GSH). Já se observou que a pré-administração da L-Ala-Gln ou a ocorrência de PCI, isoladamente, reduz as concentrações pulmonares de mieloperoxidase (MPO) frente à lesão de isquemia.

1.9 Mediadores pró-inflamatórios

A exposição diária e contínua do organismo a uma variedade de patógenos ambientais e estímulos lesivos, tais como a isquemia, pode causar lesão celular e, como consequência conduzir a um fenômeno complexo denominado

“Processo Inflamatório ou Inflamação”, cujas primeiras descrições remontam aos papiros egípcios em 3000 a.C. (MEDIZHITOV, 2008).

O desencadeamento e a manutenção do estado inflamatório dependem de inúmeras substâncias conhecidas como mediadores da inflamação. Provenientes do plasma ou secretados por células ativadas, eles são liberados concomitantemente ou sequencialmente nos sítios da lesão, em resposta a um fator etiológico (HAJJAR; PINHEIRO, 1999; MELO; LAURINDO, 2000; MEDZHITOV, 2008).

1.9.1 Interleucina 6 (IL-6)

Dentre as citocinas, a interleucina 6 (IL-6) merece destaque devido à sua atividade pró e inflamatória (MALDOVEANU *et al.*, 2001; JAWA *et al.*, 2006). A IL-6 está entre os mediadores mais potentes da resposta aguda ao trauma; ela participa de uma cascata de reações que inicia com o dano tecidual e que objetiva, em última instância, a restauração do tecido (CRANE; MILLER, 1983). Estudos que focalizaram fenômenos ocorrentes em situações catabólicas, evidenciaram elevação na concentração plasmática de IL-6 (BENEDETTI *et al.*, 1997).

A IL-6 é uma citocina multifuncional produzida por uma variedade de células presentes em locais de inflamação, agindo em diferentes tipos de células e sistemas; seu papel na fisiologia da inflamação é, entretanto, controverso. Estudos recentes indicam que a IL-6 possui potente ação anti-inflamatória (VALENÇA; PORTO, 2008).

A IL-6 é uma citocina com atuação na resposta imune inata quanto na adaptativa. Ela é sintetizada principalmente por monócitos, células endoteliais e fibroblastos e outras células em resposta a micro-organismos e a estimulação por outras citocinas, principalmente a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (GOMES; MACEDO; BISPO, 2009). Constitui-se em importante marcador inflamatório, estando envolvida numa série de atividades imunológicas, é

amplamente expressa durante a reação inflamatória, produzindo efeitos indesejáveis em vários órgãos (GOMES; MACEDO; BISPO, 2009).

1.9.2 Fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$)

O fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$) desempenha relevante papel nos processos infecciosos. De acordo com sua origem, este fator é classificado em alfa ($\text{TNF}\alpha$), antes conhecido pela denominação caquequetina, e beta ($\text{TNF}\beta$), antes denominado linfotóxina (ROVERAN, 2008).

A principal função do $\text{TNF}\alpha$ é promover a resposta imune, por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, além de ativá-los. Constitui-se no principal mediador da resposta inflamatória aguda contra bactérias Gram-negativas e outros micro-organismos (ROVERAN, 2008).

O $\text{TNF}\alpha$ age nas células endoteliais, ativando a expressão de novos receptores e ligantes (selectinas, moléculas de adesão leucocitárias e ativação de integrinas) que irão promover a adesão de neutrófilos, monócitos e linfócitos. Também, estimulam as células endoteliais a secretarem quimiocinas com ação quimiotática sobre os leucócitos (ROVERAN, 2008).

No entanto, esse fator é responsável pelas infecções graves em várias complicações, uma vez que promove uma série de efeitos indesejáveis no organismo. O $\text{TNF}\alpha$ age no hipotálamo induzindo febre (pirógeno endógeno), por meio do aumento de síntese de prostaglandina. No fígado, o $\text{TNF}\alpha$ estimula a produção das proteínas da fase aguda no processo inflamatório e do fibrinogênio, conjuntamente com as interleucinas 1 e 6. Quando secretado em grande quantidade, pode desencadear o choque séptico, causando hiperglicemia, diminuição do tônus vascular e da contração do miocárdio, além da coagulação intravascular disseminada (ROVERAN, 2008).

Desta forma, o $\text{TNF}\alpha$ tem diversas ações benéficas ao organismo quando sintetizado em quantidades moderadas; porém acredita-se que tenha importante ação deletéria quando produzido em quantidades excessivas (FORTE, 2004).

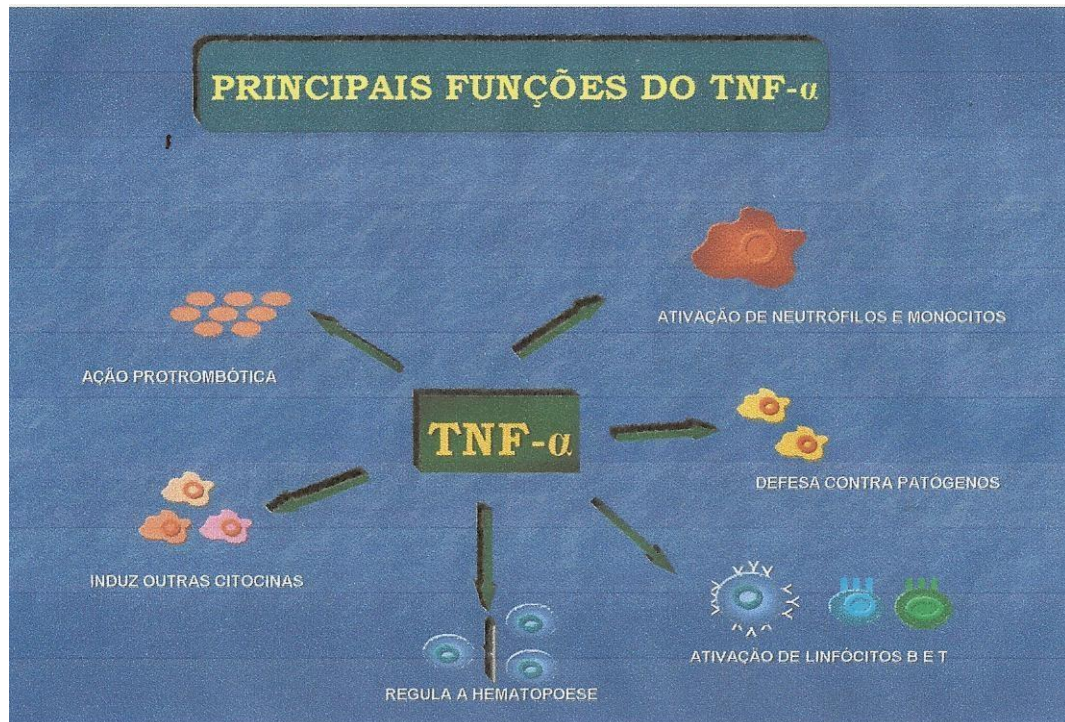


Figura 4 – Funções do TNF (adaptado por Roitt, 1999)

1.9.3 Fator de transcrição nuclear NFkappaB (NFkB)

O NFkB foi descoberto primeiramente nos linfócitos T (Nabel; Baltimore, 1987) como um regulador da transcrição da cadeia leve da k-imunoglobulina, mas está presente em todas as células dos mamíferos. O papel mais bem conhecido e estudado desse fator de transcrição se dá na resposta imunológica, na qual regula a expressão de genes, essenciais ao processo inflamatório e à defesa contra parasitas. Além disso, também atua na sobrevivência e proliferação celular, apoptose e funcionamento do SNC (XIAO, 2004).

O fator de transcrição NFkB foi conservado durante todo o processo da evolução e com ação descrita em diversas células que compõem os organismos complexos, apresentando uma amplitude de ação superior a todos os fatores de transcrição até então caracterizados. Essa superioridade deve-se aos variados

estímulos que o ativam, bem como na transcrição dos inúmeros genes envolvidos na resposta imune inata e na imunidade adaptativa, fenômenos que o NF-kB regula. Entre esses estímulos estão os neurotransmissores (tais como o glutamato), e as citocinas (interleucina-1 e fator de necrose tumoral). Independente do estímulo, parece haver participação de espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo) e o influxo de cálcio intracelular para a ativação do NF-kB (GLEZER *et al.* 2000).

No SNC, membros da família do NF-kB são ativados em função de uma neuropatologia e de apoptose. Também tem se mostrado que estes fatores de transcrição podem participar da regulação de atividades neurais não patológicas, como sinalizações sinápticas envolvidas no aprendizado e na memória (XIAO, 2004).

O NF-kB é expresso nos sistema nervoso central e no periférico, tanto por neurônio quanto por células da glia. Diversos dímeros já foram descritos no SNC, porém os mais comuns são p50-p65 e p50-p50 (O'NEILL; KALTSCHMIDT, 1997). Em condições não patológicas a ativação do NF-kB pode estar envolvida na plasticidade, desenvolvimento neural e na atividade sináptica.

Uma grande variedade de estímulos que ativam NF-kB no sistema imunológico também pode atuar no SNC, como por exemplo, citocinas (TNF e IL-1) e estresse oxidativo (BARGER; MATTSON, 1996).

A aplicação do neurotransmissor excitatório, glutamato em células granulares de cerebelo é capaz de ativar a translocação do NF-kB ao núcleo. O glutamato pode ativar o fator de transcrição NF-kB em preparações de compartimentos sinápticos através de uma via dependente de Ca^{++} (GUERRINI *et al.*, 1995).

1.9.4 Hemeoxigenase1 (HO-1)

A hemeoxigenase (HO) é uma enzima presente nos microsomas e que promove a catálise (degradação) do heme em monóxido de carbono (CO), biliverdina e ferro (ABRAHAM *et al.*, 1988).

Sua expressão ativa ocorre em situação de estresse oxidativo ou na presença de citocinas pró-inflamatórias, endotoxinas, heme e óxido nítrico (FUJITA *et al.*, 2001; YACHIE *et al.*, 2003).

Os produtos decorrentes da degradação enzimática do heme, tem numerosas ações biológicas. O CO tem efeito sobre o tônus vascular, modula a apoptose e atua no processo de sinalização inter-neural (MAINES, 1997).

A biliverdina desenvolve marcada ação antioxidante (Stocker *et al.*, 2004) e o heme, ao invés de estimular a produção de radicais livres, promove a infiltração de leucócitos no local da lesão e a expressão de moléculas de adesão.

Quando secretado em pequenas quantidades, o heme apresenta efeito anti-inflamatório mediante o aumento da expressão de HO-1 e o consequente aumento dos produtos decorrentes de sua ação sobre o heme (CO e biliverdina) (BELCHER *et al.*, 2006).

Estudos recentes vêm demonstrando que a HO-1, heme (seu substrato) e seus produtos CO e biliverdina, são capazes de modular o processo inflamatório. Foi demonstrado que o heme pode estimular a produção de radicais livres e estimular a expressão de moléculas de adesão e de promover a infiltração de neutrófilos no sítio lesionado (NISHIE *et al.*, 1996). Entretanto, pequenas concentrações de heme podem agir como anti-inflamatório e citoprotetor através do aumento da expressão da HO-1 e estimulação da formação de HO-1 e seus produtos, como o CO e biliverdina, demonstrando que reduzem a liberação, exsudação e migração de mediadores pró-inflamatórios, bem como a expressão de proteínas de adesão, sugerindo que a HO-1 possui efeito anti-inflamatório (HAYASHI *et al.*, 1999). O CO e o NO são gerados a partir das enzimas HO-1 e NOS induzidas respectivamente, sob

circunstâncias de stress ou injúria. Dado à sobreposição nas funções biológicas do CO e do NO, é possível que algumas ações do NO estejam aumentadas pela indução de HO-1 e consequente produção de CO, visto que HO-1 e os CO parecem servir como um mecanismo de feedback negativo, inibindo a atividade dos NOS (KOROLKIEWICZ *et al.*, 2003).

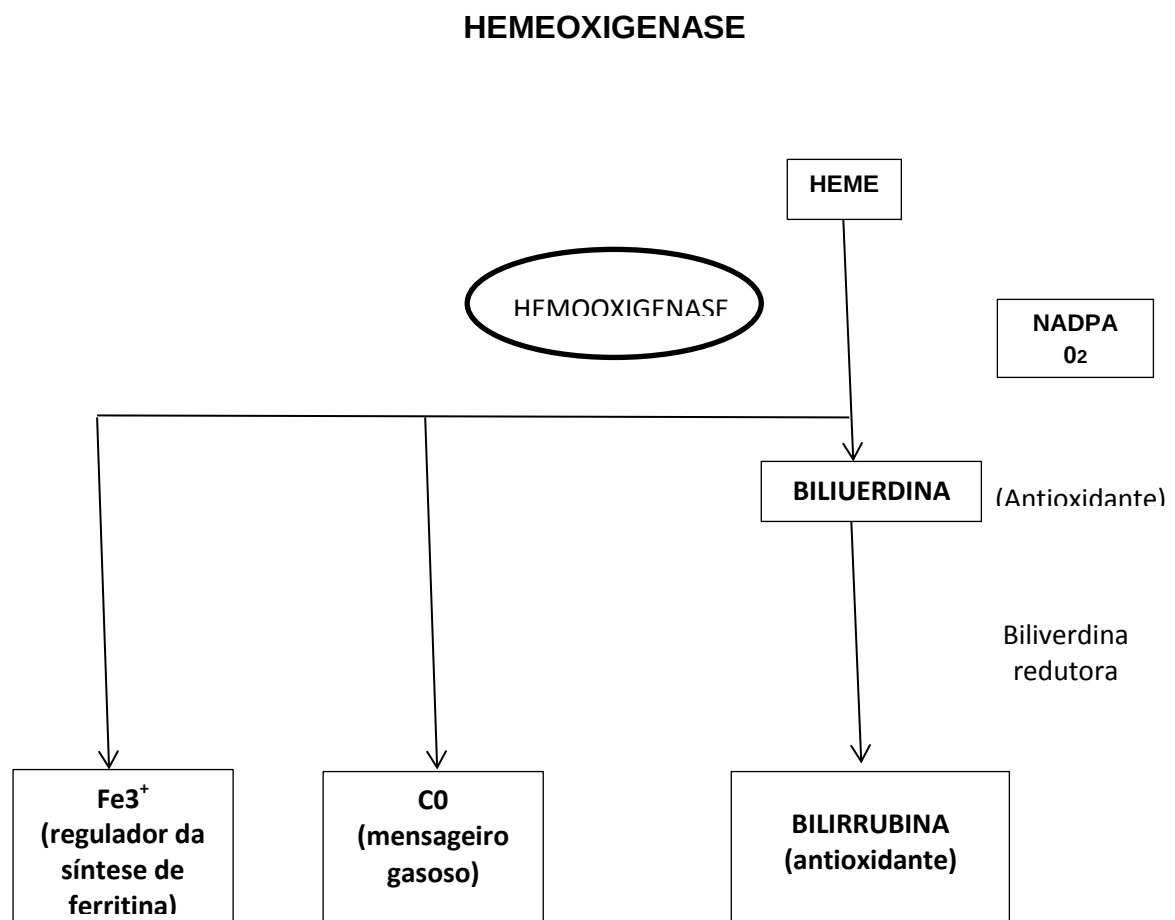


Figura 5 - Vias da degradação do heme pela HO-1. HO-1 é uma enzima limitadora da velocidade do catabolismo do heme, degradando por clivagem peridativa moléculas heme, gerando a biliverdina, monóxido de carbono e ferro. Subsequentemente, a biliverdina é convertida em bilirrubina através da biliverdina redutase. Existem dois informes de hemooxygenase que são produtos gênicos distintos: HO-1 é a forma induzível e sua indução é importante na resposta dos tecidos ao estresse oxidativo. A HO-2 é a forma constituída encontrada em vários tecidos.

1.10 Justificativa

A glutamina se constitui importante componente celular, contribuindo na formação de moléculas orgânicas complexas (macromoléculas) exercendo importante função reguladora da síntese e da degradação das proteínas.

A glutamina é, quantitativamente, o mais importante aminoácido do nosso organismo e funciona como reserva energética sempre disponível às células de proliferação rápida como àquelas do sistema imune e os enterócitos.

A glutamina desempenha destacada função no metabolismo das células neurais, regulando a utilização de vários metabólitos e atuando como fonte energética (PIRES, 2010).

As lesões produzidas no cérebro por isquemia seguida de reperfusão são capazes de provocar a ruptura das membranas celulares e de prejudicar o desempenho dos sistemas enzimáticos, adquirindo, muitas vezes, caráter irreversível.

O organismo lança mão de mecanismos citoprotetores na tentativa de impedir ou de minimizar os danos celulares.

O escopo do presente estudo é investigar o possível efeito protetor da L-alanil-glutamina sobre células cerebrais de gerbils submetidos à isquemia seguida de reperfusão.

A escassez de pesquisas utilizando esse dipeptídeo e a possibilidade de desenvolver o uso clínico efetivo desse nutracêutico justificam o presente trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar por imuno-histoquímica o efeito protetor e pré-condicionante da L-alanil-glutamina nas lesões de isquemia e reperfusão em cérebros de gerbils, através da detecção da expressão de mediadores pró-inflamatórios e da defesa anti-oxidante (IL-6, TNF α , NF-kB e HO-1), em comparação a grupo controle.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar as células nervosas imunomarcadas através da imunohistoquímica pelos anticorpos (anti-IL-6, -TNF- α , -NF-kB e -HO-1), em cada tempo (T0, T30 e T60) e em cada grupo.
- Fazer a análise comparativa entre os tempos e entre os grupos.

3 MÉTODOS

3.1 Amostra

Foram utilizados cinquenta e quatro gerbils da espécie *Meriones unguiculatus* (Takemoto *et al.*, 1995; Herrmann *et al.*, 2004), machos, (figura 3), saudáveis e bem nutridos, com idade entre 8 a 16 meses e peso variando entre 100 e 180 gramas.

Os animais foram provenientes do biotério da Faculdade Christus, em Fortaleza, e operados no laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina (UFC). No período de adaptação foram criados e mantidos sob condições ambientais e alimentares semelhantes. Todos os animais foram previamente examinados para exclusão de doenças neurológicas. Antes do experimento, os gerbils foram alojados em gaiolas individuais de poliuretano com grade de aço inox, com tamanho de 41 x 34 x 17cm, alimentados com ração para gerbils e com oferta livre de água potável. O ritmo circadiano dos animais foi respeitado e mantidos as condições sanitárias adequadas. No período de seis horas, que antecedeu o experimento, houve restrição de alimentos sólidos.

A amostra foi distribuída aleatoriamente em três grupos numericamente iguais e posteriormente redistribuídos em três subgrupos: T0 (tempo máximo de isquemia), T30 (após 30 minutos de reperfusão) e T60 (após 60 minutos de reperfusão), com seis animais cada (Figura 4)

Grupo Salina sem Isquemia (SSI): constituído de 18 gerbils, foi administrada solução salina a 0,9% com um volume de 2 ml por via endovenosa na veia femoral da pata traseira direita do animal 30 minutos antes do início dos experimentos. Neste grupo, não foi realizado nenhum procedimento cirúrgico. Em seguida, era realizada a craniotomia para a retirada do tecido cerebral, para serem realizadas as análises histopatológicas (Quadro 1).

Grupo Salina com Isquemia e Reperfusão (SIR): constituído de 18 gerbils, em que foi administrado solução salina a 0,9% com um volume de 2 ml por

via endovenosa 30 minutos antes da indução da isquemia cerebral na veia femoral da pata traseira direita do animal e submetidos aos procedimentos cirúrgicos que consistiram em tricotomia seguida de incisão na região ventral do pescoço, os tecidos musculares e subcutâneos foram divulsionados com individualização e isolamento bilateral das artérias carótidas comuns, que foram pinçados por um período de 15 minutos de isquemia cerebral. Em seguida, era realizada a craniotomia para a retirada do tecido cerebral, para a análise histopatológica. (Quadro 1).

Grupo L-alanil-glutamina com Isquemia e Reperfusão (GIR): constituído de 18 gerbils, tratados com L-alanil-glutamina (Ala-Gln) na concentração de 0,75g/kg, de peso corporal, por via endovenosa (Dipeptiven[®], do laboratório Fresenius) completando-se para um volume de 2,0 ml com solução salina a 0,9%, 30 minutos antes da indução da isquemia na veia femoral da pata traseira direita do animal. Em seguida, foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos que consistiram de tricotomia seguida de incisão na região ventral do pescoço; os tecidos subcutâneos e musculares eram divulsionados com visualização e isolamento bilateral das artérias carótidas comuns, seguindo-se o pinçamento, um período de 15 minutos de isquemia cerebral. Em seguida, era realizada a craniotomia para a retirada do tecido cerebral, para a análise histopatológica (Quadro 1).



Figura 6 - Gerbil da Mongólia (*Meriones unguiculatus*).

QUADRO 1- Denominação dos grupos, amostra, tempo pré-tratamento, droga utilizada, procedimentos executados, material coletado, substâncias a serem dosadas e tempo de coletas, em todos os grupos estudados.

Grupo s	Amostra (n)	Droga utilizada	Tempo pré-tratamento	Procedimento executado	Material coletado	Tempo de coleta de material
SSI	18	SF 0,9%(E.V.) (2ml)	-45 MIN	Incisão Cervical Craniotomia	tecido cerebral	T0 T30 T60
SIR	18	SF 0,9% (E.V.) (2ml)	-45 MIN	Com Isquemia- Reperusão (I/R) Craniotomia	tecido cerebral	T0 T30 T60
GIR	18	L-ala-gln 0,75g/kg (E.V.)	-45 MIN	Com Isquemia- Reperusão (I/R) Craniotomia	tecido cerebral	T0 T30 T60

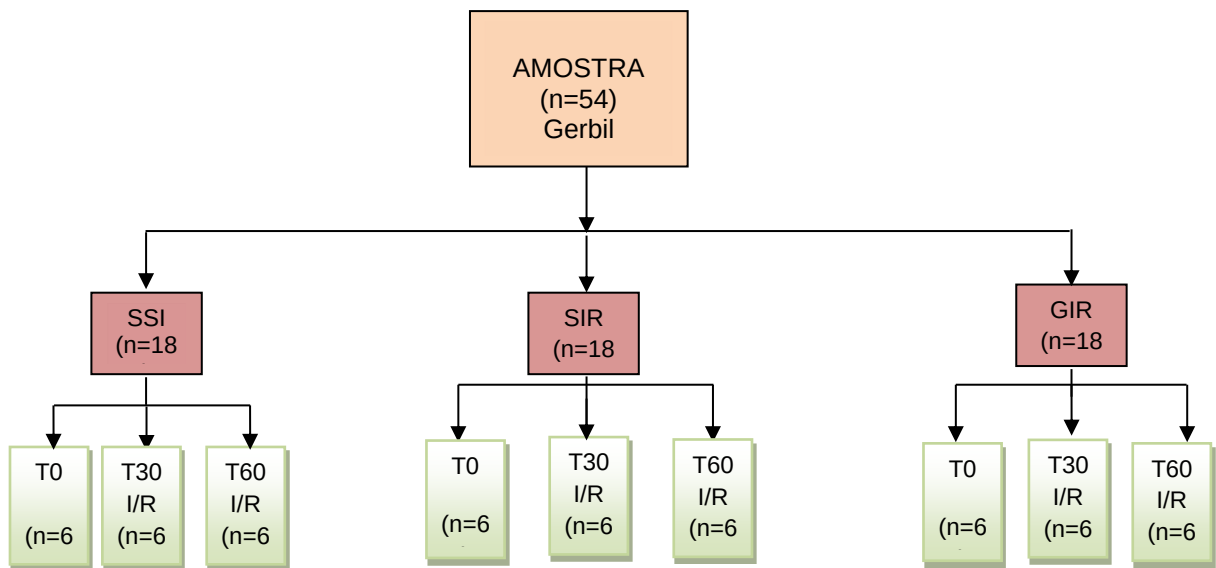


Figura 7 - Distribuição dos animais nos grupos descritos, e os subgrupos com os correspondentes tempos de coleta.

OCCLUSÃO LIBERAÇÃO

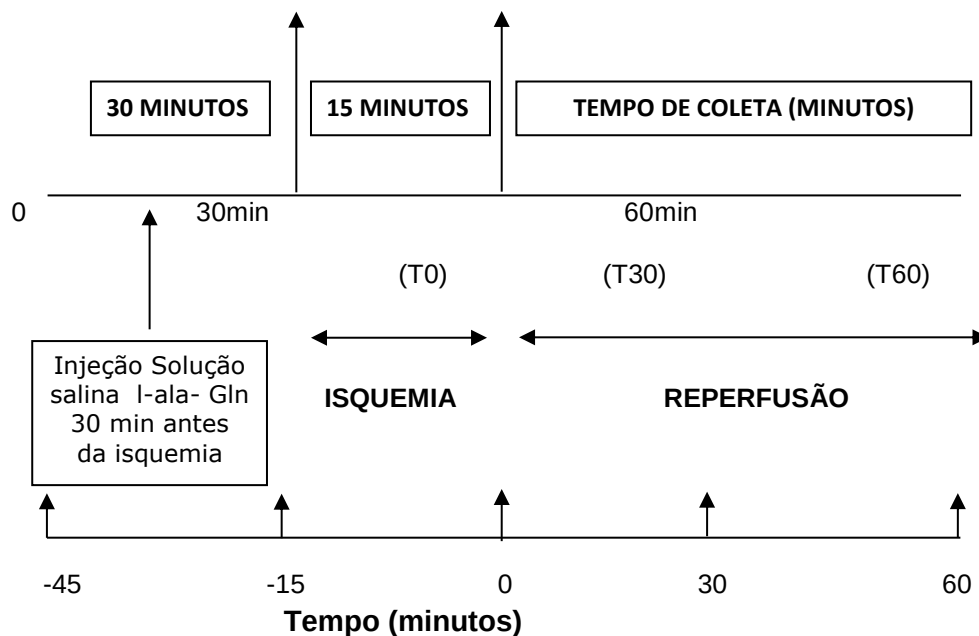


Figura 8 - Delineamento temporal do experimento. Aplicação intravenosa de Solução Salina 0,9% (SS) ou de L-alanil-glutamina (L-ala-Gln) 30 minutos antes da isquemia cerebral. Tempo de isquemia 15 minutos (oclusão), seguida de liberação (reperusão). Coletas: T0 (tempo de isquemia máxima), 30min (T30) e 60min (T60), de reperusão. Este modelo foi aplicado aos grupos SSI, SIR e GIR.

3.2 Experimento

Antes da realização do experimento, o projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEPA), da Universidade Federal do Ceará (UFC) para uso de animais experimentais em fevereiro de 2008, (processo no. 127/07), (Anexo A), estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Normas Internacionais para a Pesquisa Biomédica em Animais (1990) e de acordo com a Lei Federal n. 6.638, de 08 de maio de 1979.

Após terem sido pesados, os animais foram anestesiados com uretano na dose de (1,5g/kg de peso) por via intraperitoneal. O animal foi considerado anestesiado quando ocorreu perda dos reflexos córneo-palpebrais e de retirada da pata traseira contralateral, ao estímulo doloroso por preensão.

Em seguida, cada animal foi acomodado em bancada cirúrgica e posicionado em decúbito dorsal, imobilizado por meio de fitas adesivas aplicadas nos quatro membros, os quais eram mantidos em extensão durante todos os procedimentos.

Foi realizada tricotomia seguida de pequena incisão na pele e tecido subcutâneo, longitudinal na face medial da coxa, para exposição da veia femoral. Após a exposição do vaso foi realizada infusão de solução fisiológica ou L-alanil-glutamina dependendo do grupo em que o animal fazia parte, com um escalpe pediátrico n. 29.

A L-alanil-glutamina (Dipeptiven – composição: (8,20g L-alanina; 13,46g L-glutamina) 20 g; água para injeção q.s.p 100 mL) foi fabricada pela Frenesius Kabi Áustralia GmbH Graz / Áustralia, importada e distribuída por Frenesius Brasil Ltda. Portanto, o Dipeptiven é uma solução de L-alanil-glutamina a 20%, ou seja, cada mL contém 0,2g, sendo aplicada dose única de 0,75g/kg, 30 minutos antes do início do experimento, completando-se o volume administrado com solução salina 0,9% para atingir um volume final de 2,0 mL. O dipeptídeo quando administrado por veias

periféricas no sangue, sofre hidrólise liberando moléculas de aminoácidos livres alanina e glutamina (SOUBA, 1993).

A solução salina utilizada no estudo foi produzida pela Química Farmacêutica Gaspar Viana (Fortaleza, CE), sendo administrado um volume padronizado de 2,0 mL a 0,9%.

O procedimento cirúrgico iniciava-se com tricotomia seguida de incisão na região ventral do pescoço, os tecidos musculares e subcutâneos foram divulsionados com individualização e isolamento bilateral das artérias carótidas comuns (ACCs) a 0,5cm de bifurcação em artérias carótidas externa e interna (ponto de oclusão), seguida de identificação e clampeamento das artérias, com cliques vasculares tipo bulldog (Levine *et al.*, 1969; Muniz *et al.*, 2004), por um período de 15 minutos de isquemia (Olfihet *et al.*, 1991; Kimura *et al.*, 2002; Plaschkeet *et al.*, 2005), seguidos por dois períodos de reperfusão T30 e T60. Realizou-se a laparotomia mediana longitudinal anterior, dissecando e reparando a artéria aorta abdominal abaixo das artérias renais e acima das artérias ilíacas comuns, objetivando posterior punção arterial. Durante todo tempo, a região foi irrigada com solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril para prevenir a desidratação tecidual.

Foi realizada craniotomia para a retirada do tecido cerebral, utilizando-se rebolo flexível dupla face acoplada a um micromotor elétrico a 20.000 rpm para osteotomia (Micromotor Elétrico LB 100 – Beltec) acoplado a disco de corte, procedendo-se posterior abertura dural para extração dos hemisférios cerebrais (MUNIZ *et al.*, 2004). Os fragmentos de tecidos, imediatamente depois de retirados, foram prensados e mergulhados em nitrogênio líquido a cerca de -190 °C. Esta técnica faz baixar a temperatura tissular à aproximadamente -80 °C em um tempo inferior a 0,1 segundo. O tecido foi então triturado e transformado em pó com auxílio de gral e pistilo, sempre acrescentando nitrogênio líquido para manter o tecido congelado (WILLIAMSON *et al.*, 1967)

As amostras para confecção dos cortes histológicos para análise microscópica foram obtidas entre as linhas B, C (figura 6). Foi analisada

especificamente a camada piramidal interna do córtex cerebral por serem seletivamente mais vulneráveis a lesão hipóxica e/ou tóxica.

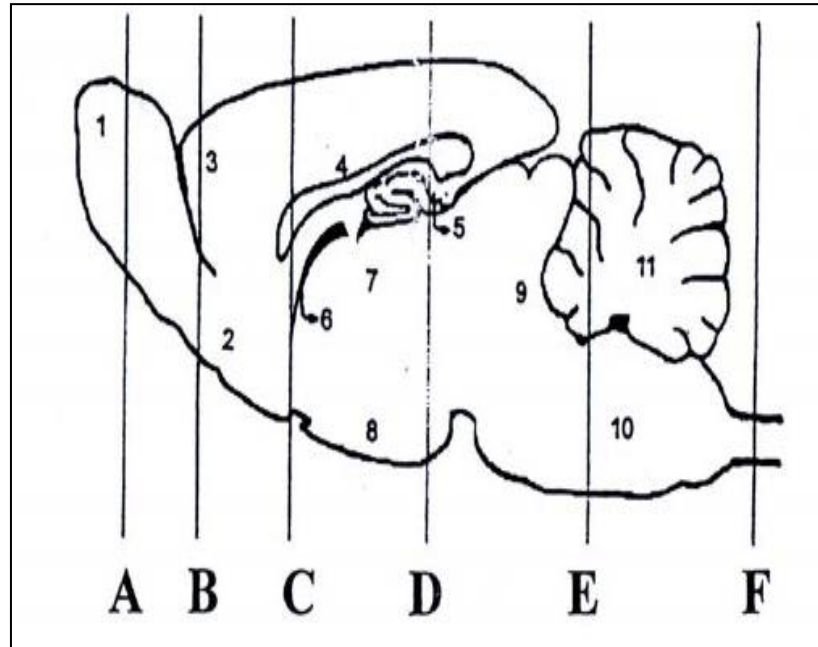


Figura 9 - Esquema de corte coronal mediano do encéfalo e medula espinal cervical de roedores. As linhas representam os planos cortados transversalmente. A) bulbo olfatório, B) fissura rinal, C) quiasma óptico, D) infundíbulo hipofisário, E) ponte e F) medula espinal. Os números representam estruturas do encéfalo: 1) Bulbo olfatório, 2) Núcleo olfatório, 3) Córtex cerebral, 4) Corpo caloso, 5) Hipocampo, 6) Terceiro ventrículo, 7) Tálamo, 8) Hipotálamo, 9) Mesencéfalo, 10) Ponte e 11) Cerebelo. FONTE: MACHADO, 1994.

3.3 Imunohistoquímica para detecção da expressão de IL-6, $\text{TNF}\alpha$, NF-kB e HO-1

Após todos os procedimentos cirúrgicos as amostras de tecido cerebral foram coletadas nos três tempos, 0, 30 e 60 minutos, os animais foram sacrificados e tiveram os tecidos cerebrais removidos e fixados em formol a 10% durante 24 horas, a fim de serem devidamente processados para inclusão em parafina. Após esse procedimento, foram feitos cortes de 4 μ em micrótomo manual e colocados em lâminas de L-polilisina, apropriadas para a realização da imunohistoquímica.

Foi utilizado o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981). Os cortes histológicos foram desparafinizados em três banhos de xilol, (5min cada), e duas vezes banhados em concentrações decrescentes de álcool absoluto 95% e 70% (10min cada), seguindo-se a três lavagens em água destilada para hidratação. Em seguida foi realizada a recuperação do antígeno em micro-ondas em potência máxima (lâminas imersas em tampão citrato pH 6.0 diluído com água destilada) por 10 minutos. Em seguida foram retiradas do micro-ondas para esfriar durante 20 minutos em temperatura ambiente. A seguir, escoou-se o tampão citrato e feita a lavagem em água destilada antes do bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3%, (2 banhos de 10min cada). As lâminas foram lavadas com solução tampão fosfato (PBS) (2 banhos de 5 minutos cada) e incubadas em temperatura ambiente com leite desnatado (10 g de leite desnatado diluído em 100 ml de água destilada) por 30 minutos. Realizou-se, então, a incubação com o anticorpo primário overnight, a 4°C. Anticorpo primário de cabra polyclonal IL-6, diluição em BSA 5% 1:200; anticorpo primário de cabra polyclonal TNF α , diluição 1:200; anticorpo primário de rato monoclonal NF-kB, diluição 1:200; anticorpo primário de rato monoclonal HO-1 diluição 1:200 Santa Cruz® (o controle negativo não recebe anticorpo primário, apenas albumina bovina (BSA)).

Na manhã seguinte as lâminas foram retiradas da geladeira e expostas em temperatura ambiente durante 10 minutos. Após esse tempo foram lavadas em PBS, 2 vezes, durante 5min cada e incubadas com o anticorpo secundário adequado para cada anticorpo primário utilizado por 30 minutos, diluição em BSA 1:200. Em seguida, as lâminas foram banhadas em PBS e aplicado o complexo ABC Santa Cruz®, (estrepto-avidina-conjugada) durante 30 minutos, seguindo as instruções do fabricante. As lâminas foram lavadas em PBS, três vezes (5min cada), seguidas da secagem das lâminas e aplicação do cromógeno 3,3 diaminobenzidine (DAB) DAKO®. A coloração foi monitorada pela observação ao microscópio. Seguiu-se a lavagem com água destilada até remover o excesso de corante e contra-coloração com hematoxilina de Mayer. Após a contra-coloração, foram lavadas com água corrente até a retirada total do corante. Por fim, foi feita nova lavagem com água destilada, seguida de imersão em álcool absoluto de 100% 3 vezes e xilol, em seguida, montagem das lâminas utilizando Entelan Merck® para colagem das lamínulas.

3.4 Análise morfológica

A análise morfológica foi realizada de forma quantitativa. A avaliação quantitativa foi feita por meio de contagem das células nervosas imunomarcadas, tanto neurônios quanto células da neuroglia, observadas com aumento de 400X em microscópio óptico modelo Olympus BX41. Foram observados dez campos de cada corte, com um total de 4 cortes por grupo, procurando sempre iniciar pela camada piramidal interna.

As análises foram realizadas por observador experiente, de maneira a que o mesmo não tivesse conhecimento sobre a qual grupo pertencia cada corte.

Depois da análise do examinador, os achados da imunohistoquímica foram encaminhados para testes estatísticos de concordância.

3.5 Análise estatística

Os dados do estudo foram digitados pelo Excel for Windows, versão 2007 da Microsoft e analisados através do software SPSS, versão 17.0. Para comparações entre os tempos e entre os grupos foram utilizados: Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey (post. hoc). O valor de $P < 0,05$ foi considerado como significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Imunomarcção do fator de necrose tumoral alfa (TNF α) entre os grupos SSI e SIR

4.1.1 Células TNF α positivas por campo microscópico

Na análise comparativa microscópica constatou-se que entre os grupos SSI e SIR, as células marcadas no grupo SIR foi significativamente maior que o observado no grupo SSI, nos tempos T30(p=0,99) e T60(p=0,00).

TABELA 1– Células TNF α positivas por campo, observadas nos grupos tratados com salina sem isquemia (SSI) e com isquemia (SIR), nos tempos 0, 30', 60'. Dados referentes às células marcadas em 10 campos de cada corte histológico, com um total de 4 cortes por grupo.

Tempo (min)	SSI	SIR	Significância
	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	
0	149,8 $\pm$ 118,2	30,3 $\pm$ 36,0	p=1,000
30	214,0 $\pm$ 17,3	333,0 $\pm$ 395,6	p=0,999
60	263,8 $\pm$ 42,9	1015,5 $\pm$ 102,8	p=0,000

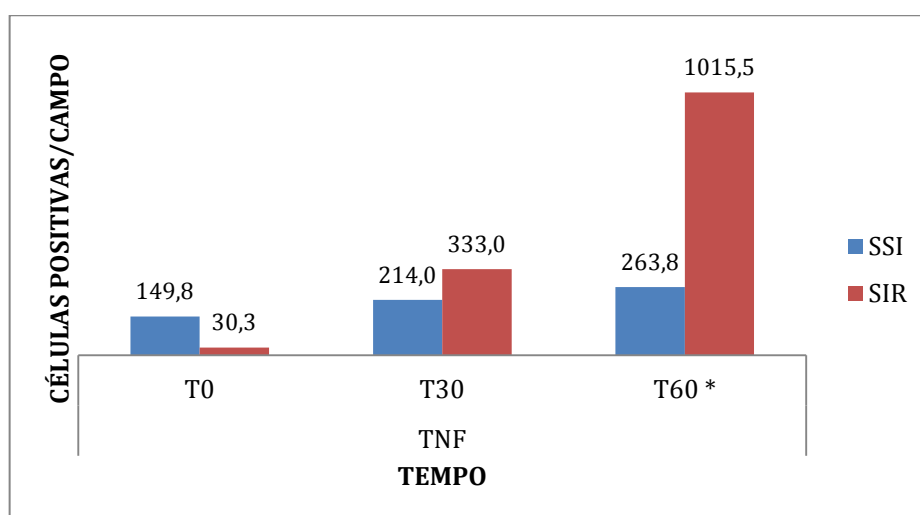


Figura 10 – Representação gráfica das células TNF α positivas por campo nos grupos tratados com salina sem isquemia (SSI) e com isquemia (SIR) nos tempos 0, 30', 60'. Dados expressos (Medias $\pm$ D.P) dos grupos, análise dos dados pelo teste de Tukey para variáveis não emparelhadas: TNF p= 1,000: comparado ao respectivo grupo SSI, p=0,999: comparado ao respectivo grupo SSI. p=0,000: comparado ao respectivo grupo SSI.

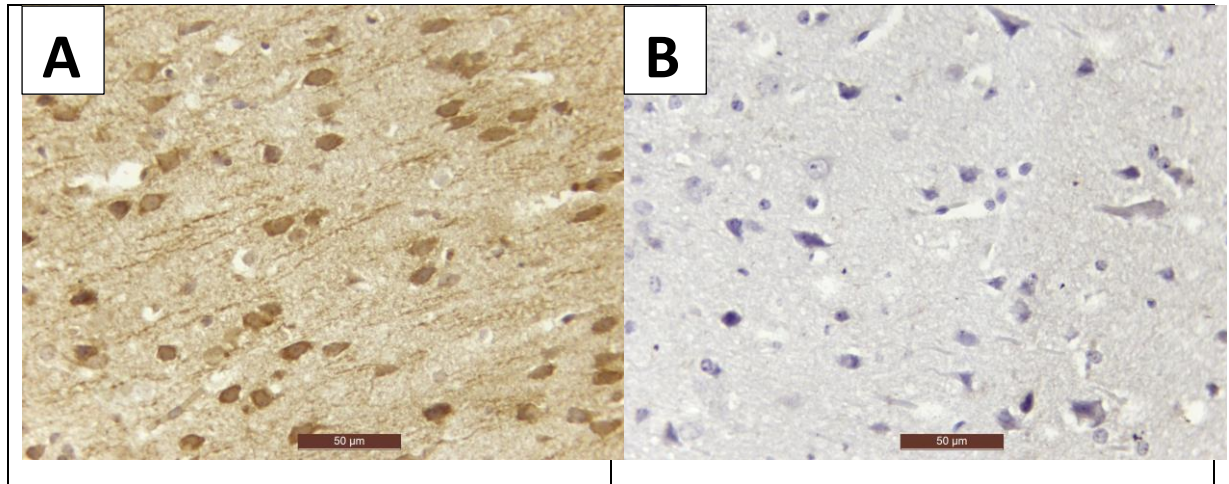


Figura 11 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para $\text{TNF}\alpha$ do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina sem isquemia (SSI) (A) e com isquemia (SIR) (B) nos tempos 0.

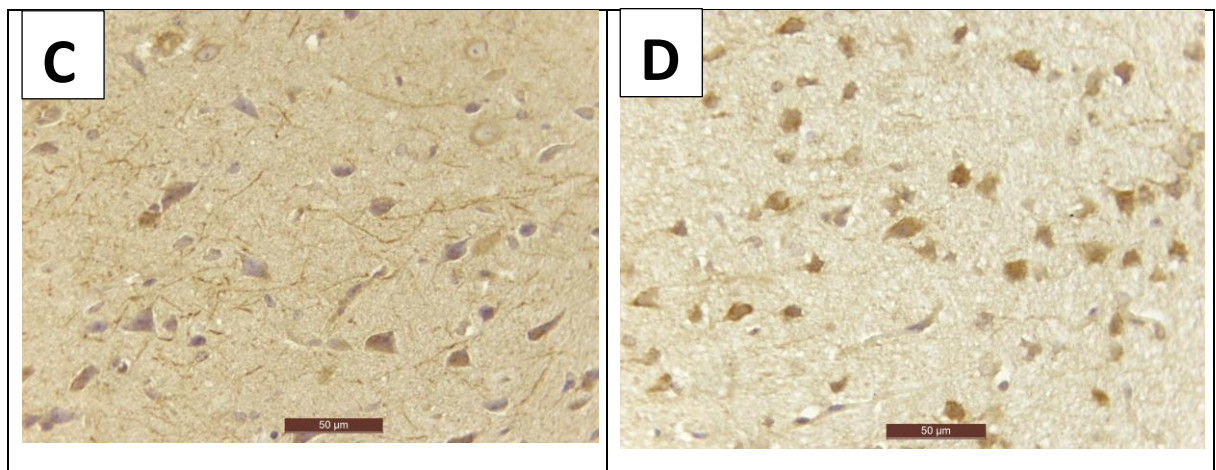


Figura 12 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para $\text{TNF}\alpha$ do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina sem isquemia (SSI) (C) e com isquemia (SIR) (D) nos tempos 30.

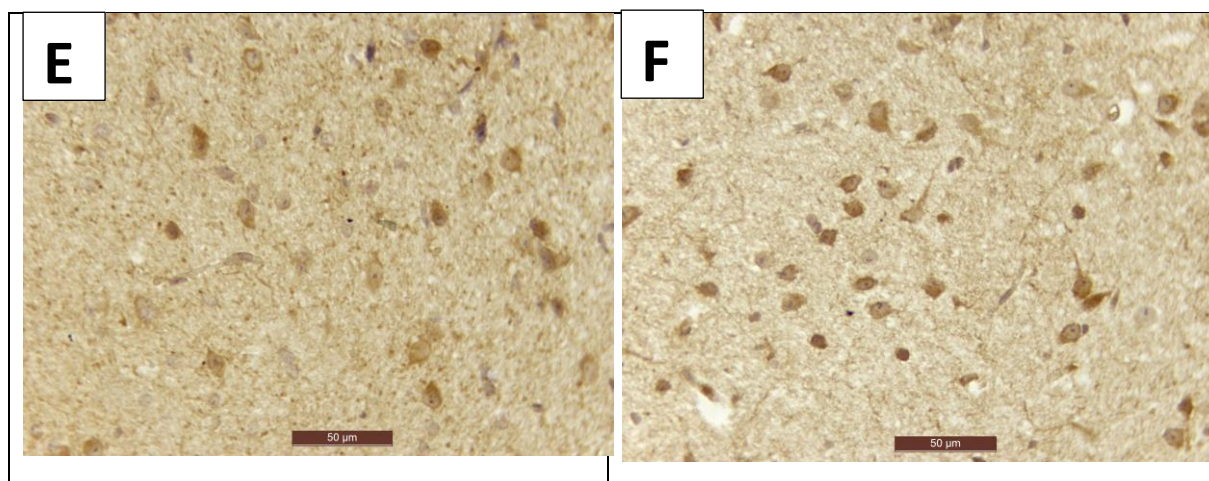


Figura 13 - Fotomicrografias de imunohistquímica para $TNF\alpha$ do córtex cerebral na câmada piramidal interna dos grupos tratados salina sem isquemia (SSI) (E) e com isquemia (SIR) (F) nos tempos 60.

4.2 Imunomarcção do fator nuclear kB (NFkB) entre os grupos SSI e SIR

4.2.1 Células NFkB positivas por campo microscópico

Observou-se que, em relação ao grupo SSI, a contagem de células do NFkB positivas no grupo SIR teve um aumento estatisticamente significativo em T30 ($p=0,000$) e T60 ($p=0,000$).

TABELA 2 – CélulasNFkB positivas por campo, observadas nos grupos tratados com salina sem isquemia (SSI) e com isquemia (SIR) nos tempos 0, 30, 60. Dados referentes às células marcadas em 10 campos de cada corte histológico, com um total de 4 cortes por grupo.

Tempo (min)	SSI	SIR	Significância
	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	
0	505,0 $\pm$ 114,9	463,0 $\pm$ 535,0	P=1,000
30	238,3 $\pm$ 218,4	1234,8 $\pm$ 144,9	P=0,000
60	586,5 $\pm$ 141,2	1286,3 $\pm$ 85	P=0,000

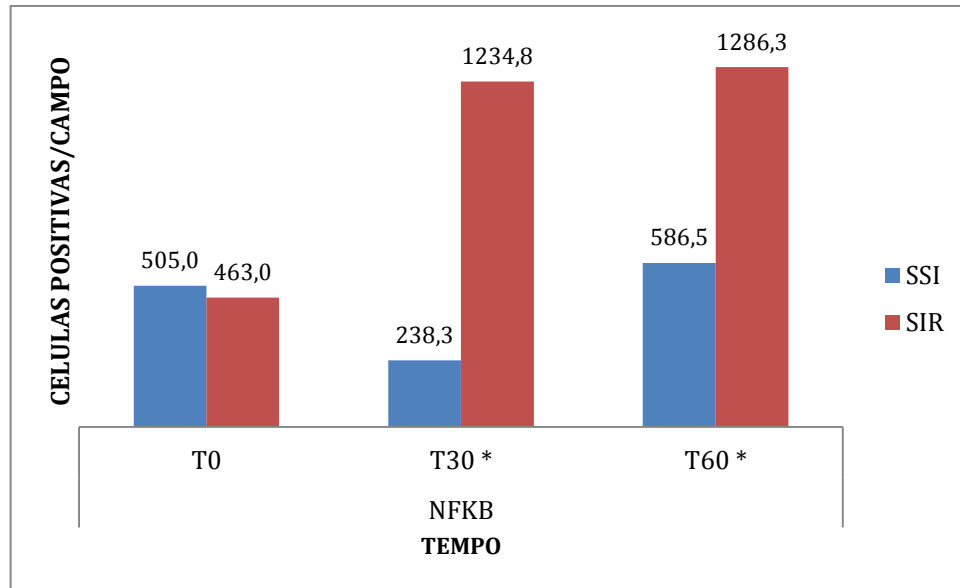


Figura 14 – Representação gráfica das células NFκB positivas por campo nos grupos tratados com salina sem isquemia (SSI) e com isquemia (SIR) nos tempos T0, T30', T60'. Dados expressos (Medias±D.P.) dos grupos, análise dos dados pelo teste de Tukey para variáveis não emparelhadas: p=1,000: comparado ao respectivo grupo SSI; p=0,000: comparado ao respectivo grupo SSI; p=0,000: comparado ao respectivo grupo SSI.

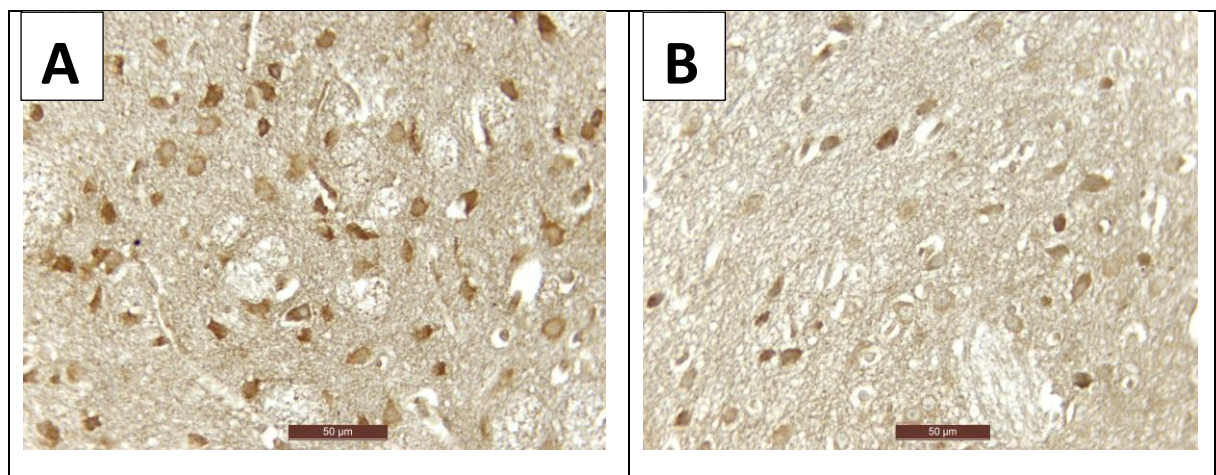


Figura 15 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para NFκB do córtex cerebral na câmada piramidal interna dos grupos tratados salina sem isquemia (SSI) (A) e com isquemia (SIR) (B) nos tempos 0.

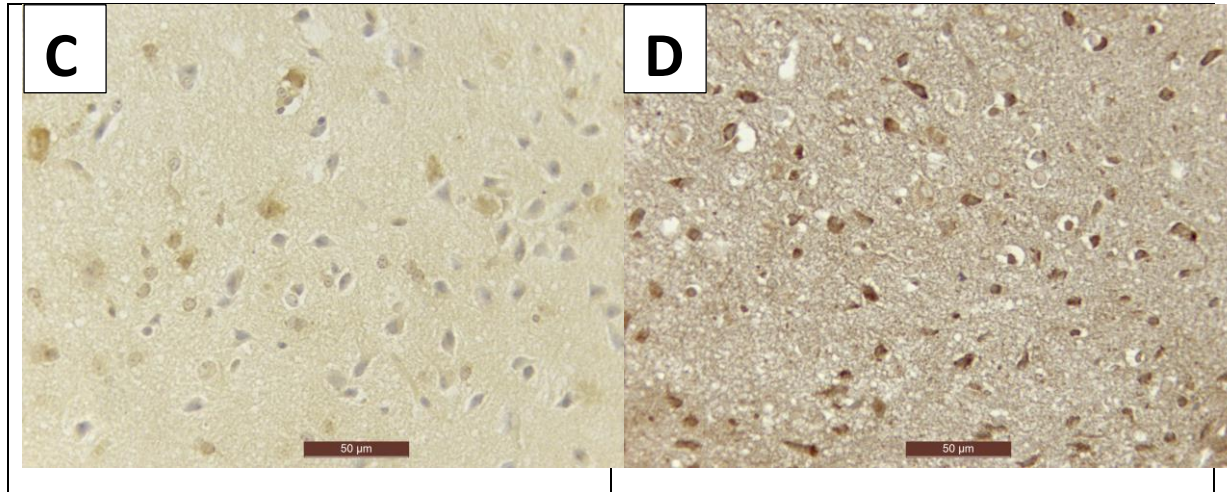


Figura 16 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para NFκB do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina sem isquemia (SSI) (C) e com isquemia (SIR) (D) nos tempos 30.

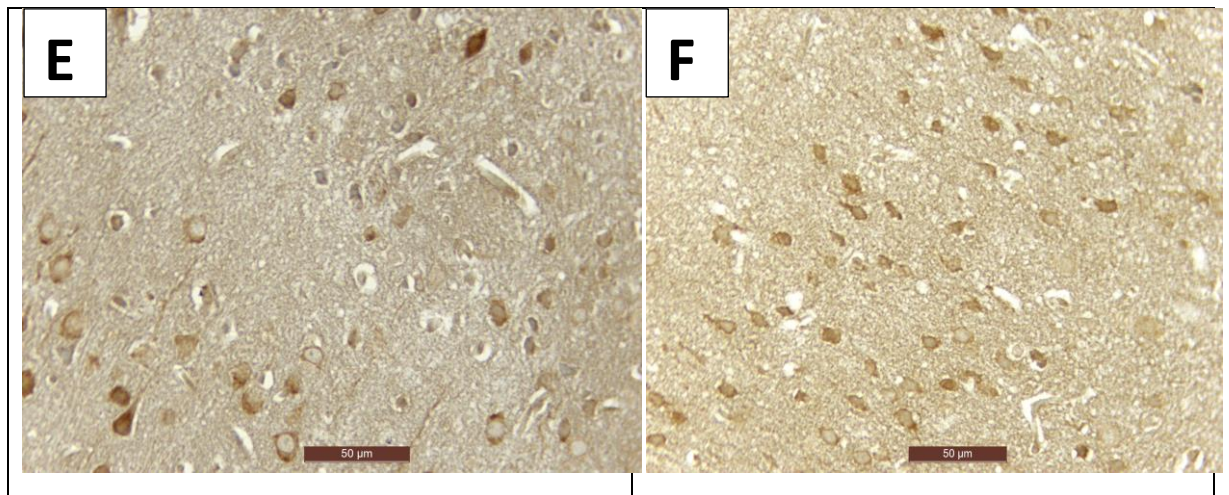


Figura 17 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para NFκB do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina sem isquemia (SSI) (E) e com isquemia (SIR) (F) nos tempos 60.

4.3 Imunomarcação da interleucina 6 (IL-6) entre os grupos SSI e SIR

4.3.1 Células IL-6- positivas por campo microscópico

Na análise comparativa entre os grupos verificou-se aumento significativo das células marcadas pela IL-6 no tempo T60 ($p=0,999$) no grupo SIR, em comparação ao grupo SSI.

TABELA 3 – Células IL-6 positivas por campo, observadas nos grupos tratados com salina sem isquemia (SSI) e com isquemia (SIR) nos tempos 0, 30', 60'. Dados referentes às células marcadas em 10 campos de cada corte histológico, com um total de 4 cortes por grupo.

Tempo (min)	SSI	SIR	Significância
	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	
0	686,3 $\pm$ 112,2	311,0 $\pm$ 246,5	$p=0,523$
30	562,5 $\pm$ 112,7	536,3 $\pm$ 119,8	$p=1,000$
60	206,8 $\pm$ 248,3	316,0 $\pm$ 365,4	$p=0,999$

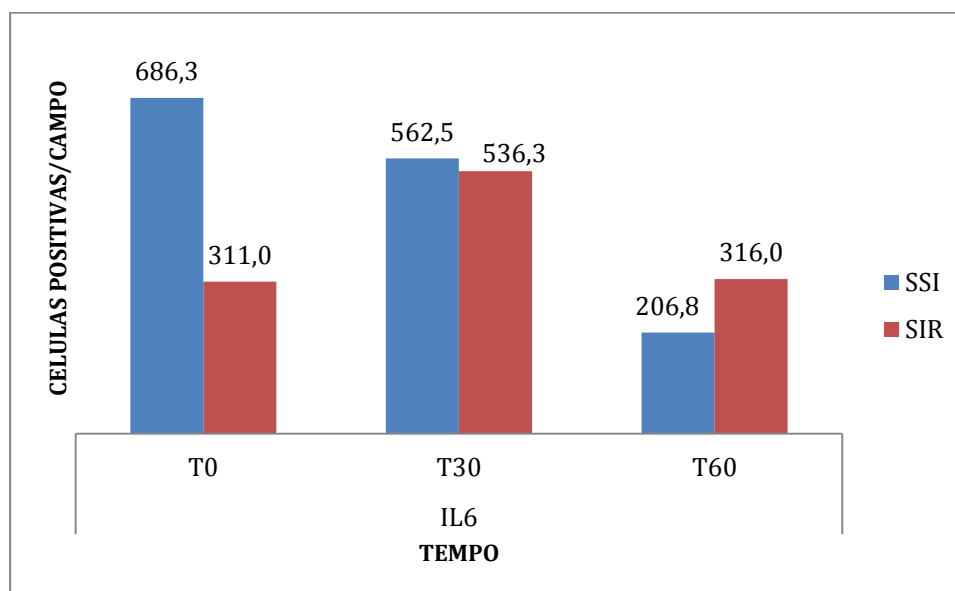


Figura 17 – Representação gráfica das células IL-6 positivas por campo nos grupos tratados com salina sem isquemia (SSI) e com isquemia (SIR) nos tempos T0, T30', T60'. Dados expressos (Médias $\pm$ D P.) dos grupos, análise dos dados pelo teste de Tukey para variáveis não emparelhadas: $p=0,523$: comparado ao respectivo grupo SSI; $p=1,000$: comparado ao respectivo grupo SSI; $p=0,999$: comparado ao respectivo grupo SSI.

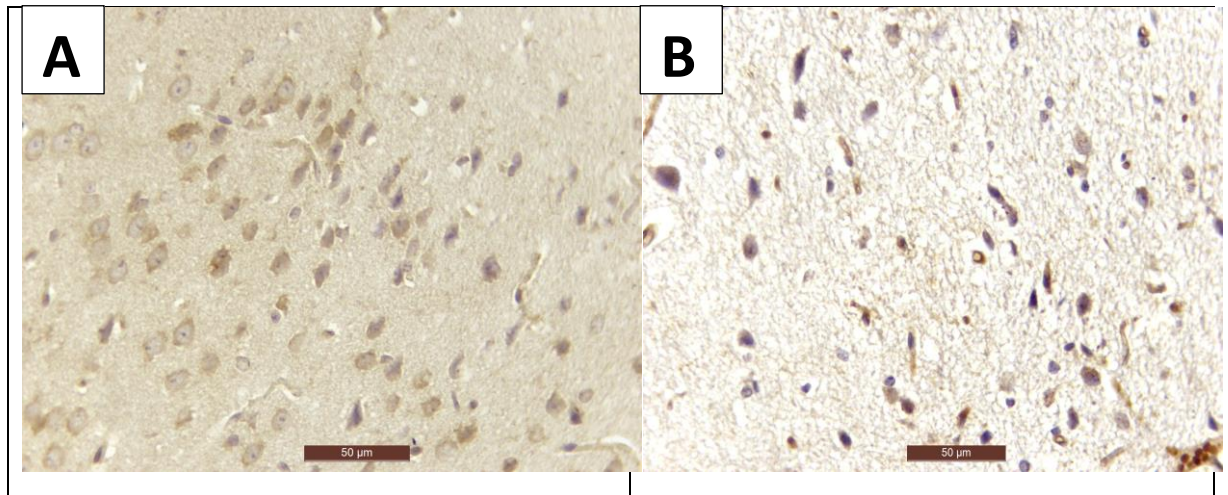


Figura 18 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para IL-6 do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina sem isquemia (SSI) (A) e com isquemia (SIR) (B) nos tempos 0.

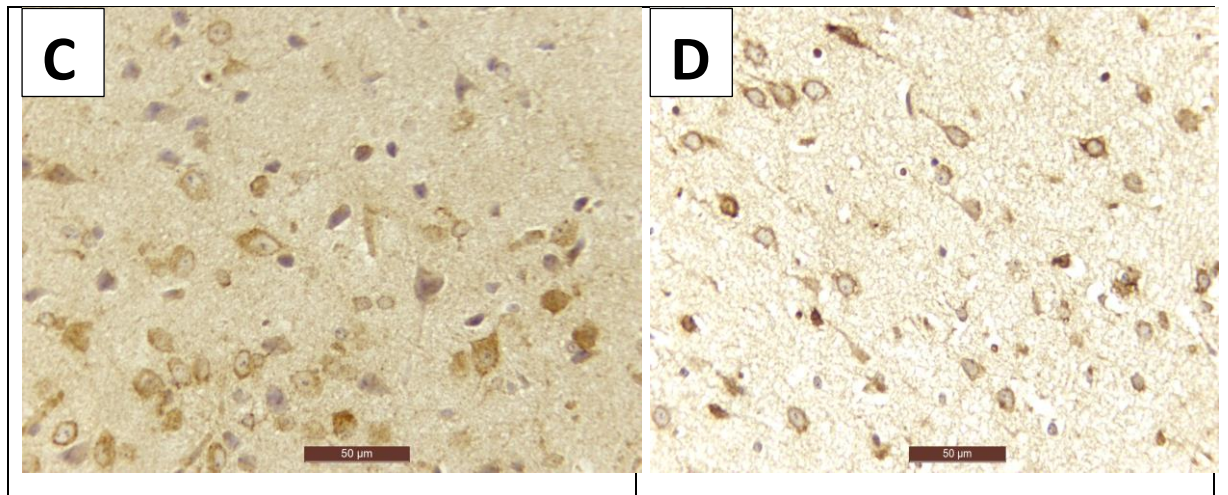


Figura 19 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para IL-6 do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina sem isquemia (SSI) (A) e com isquemia (SIR) (B) nos tempos 30.

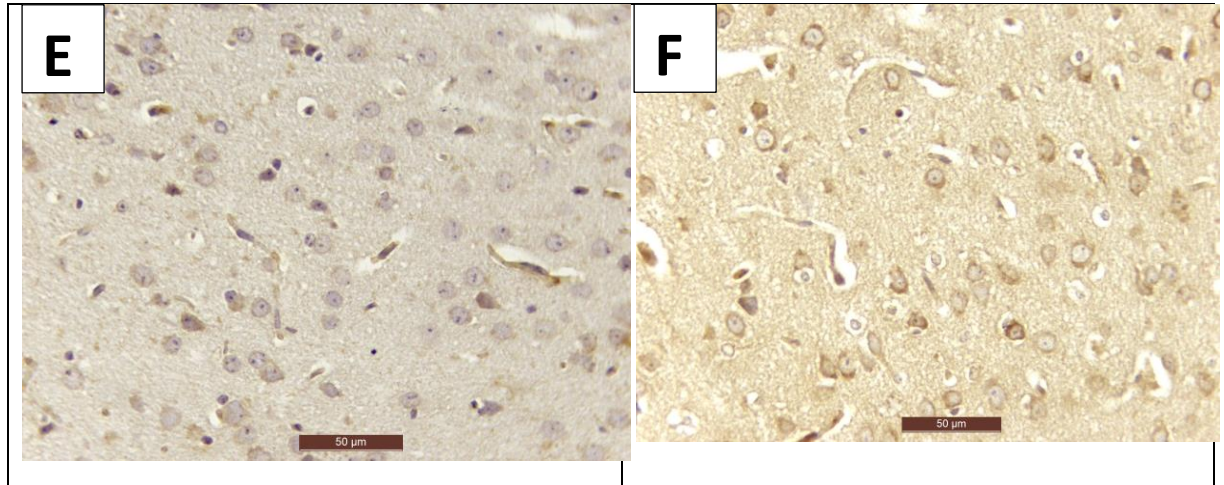


Figura 20 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para IL-6 do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina sem isquemia (SSI) (E) e com isquemia (SIR) (F) nos tempos 60.

4.4 Imunomarcação da hemeoxigenase1 (HO-1) entre os grupos SSI e SIR

4.4.1 Células HO-1- positivas por campo microscópico

No presente experimento constatou-se que, em relação ao grupo SSI, as células marcadas pela HO-1 no grupo SIR diminuiu, significativamente, em T30 ($p=1,000$) e T60($p=1,000$).

TABELA 4 – Células HO-1 positivas por campo, observadas nos grupos tratados com salina sem isquemia (SSI) e com isquemia (SIR), nos tempos 0, 30', 60'. Dados referentes às células marcadas em 10 campos de cada corte histológico, com um total de 4 cortes por grupo.

Tempo (min)	SSI	SIR	Significância
	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	
0	33,5 $\pm$ 11,2	32,5 $\pm$ 9,7	$p=1,000$
30	25,8 $\pm$ 3,9	11,3 $\pm$ 13,0	$p=1,000$
60	18,5 $\pm$ 7,6	9,8 $\pm$ 13,7	$p=1,000$

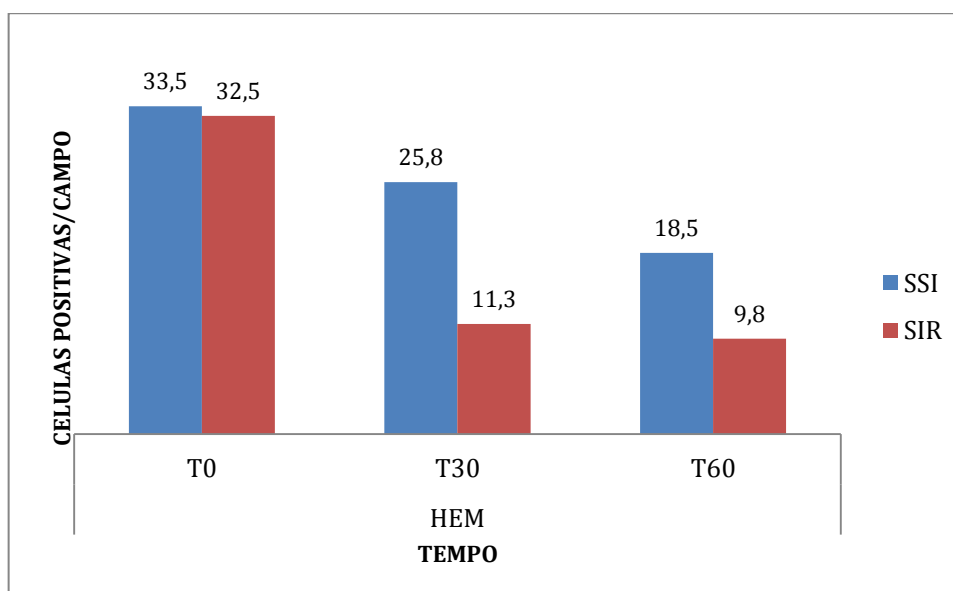


Figura 21 – Representação gráfica das células HO-1 positivas por campo nos grupos tratados com salina sem isquemia (SSI) e com isquemia (SIR) nos tempos T0, T30', T60'. Dados expressos (Medias $\pm$ DP.) dos grupos, análise dos dados pelo teste de Tukey para variáveis não emparelhadas: $p=1,000$: comparado ao respectivo grupo SIR; $p=1,000$: comparado ao respectivo grupo SIR; $p=1,000$: comparado ao respectivo grupo SIR.

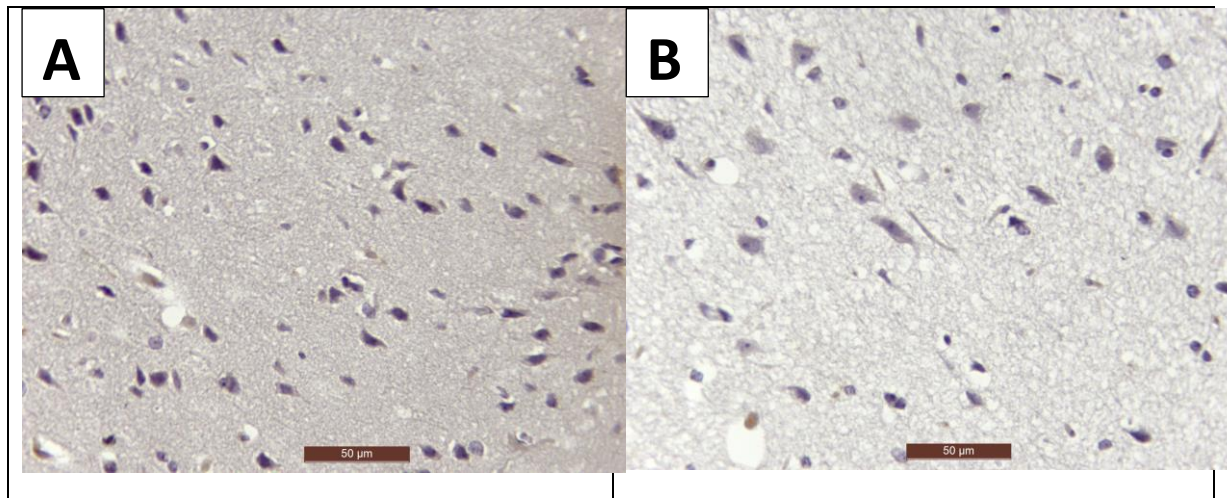


Figura 22 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para HO-1 do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina sem isquemia (SSI) (A) e com isquemia (SIR) (B) nos tempos 0.

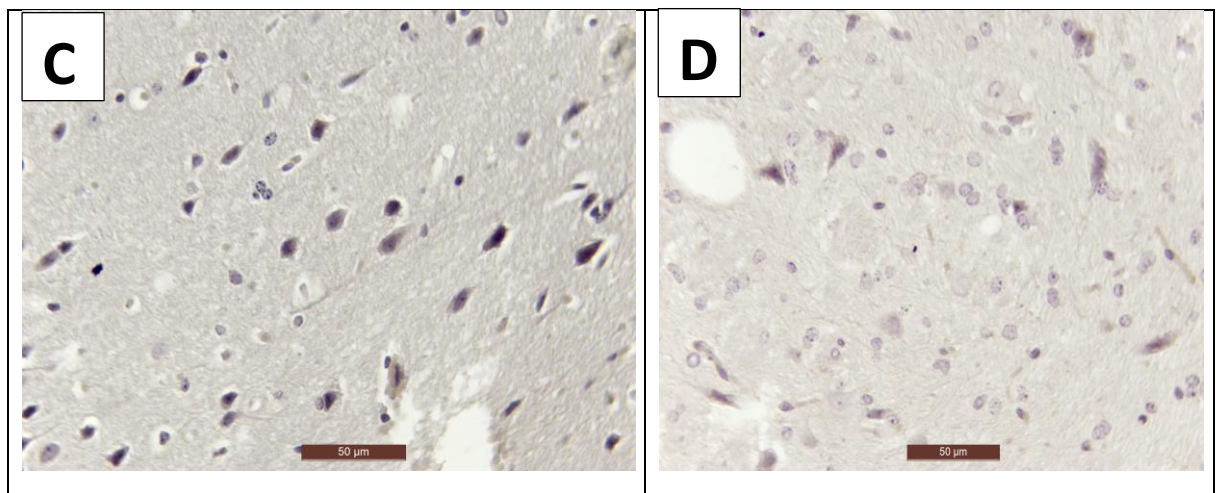


Figura 23 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para HO-1 do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina sem isquemia (SSI) (A) e com isquemia (SIR) (B) nos tempos 30.

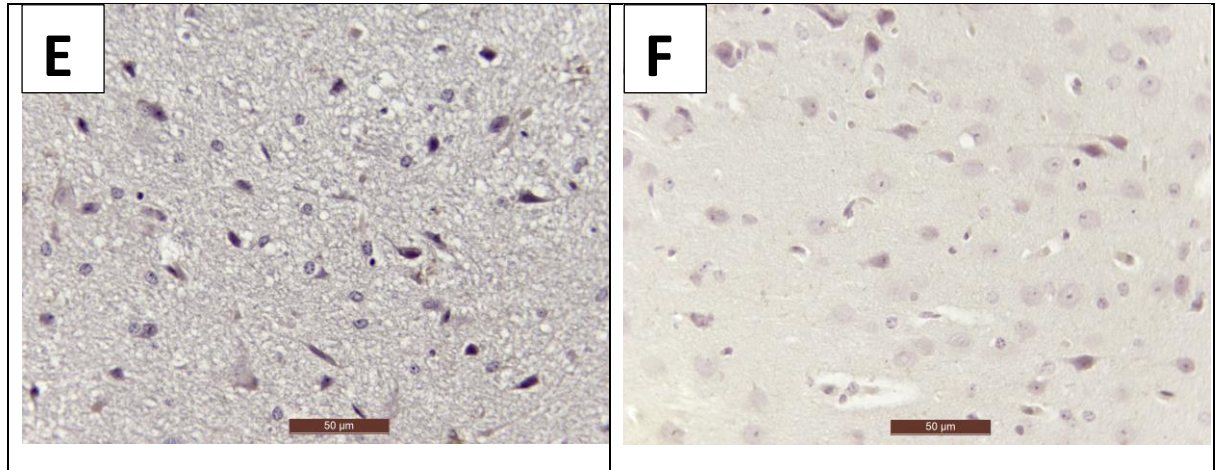


Figura 24 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para HO-1 do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina sem isquemia (SSI) (A) e com isquemia (SIR) (B) nos tempos 60.

4.5 Imunomarcção do fator de necrose tumoral alfa (TNF α) entre os grupos SIR e GIR

4.5.1 Células TNF α positivas por campo microscópico

No presente estudo, constatou-se que, comparando-se os grupos SIR e GIR, as células marcadas pelo TNF α no grupo GIR foi significativamente menor que o observado no grupo SIR nos tempos T0 ($p=1,000$), T30 ($p=0,503$) e T60 ($p=0,000$).

TABELA 5 – Células TNF α positivas por campo, observadas nos grupos submetidos à isquemia e reperfusão e tratados com salina (SIR) e l-alanil-glutamina (GIR) nos tempos 0, 30, 60. Dados referentes às células marcadas em 10 campos de cada corte histológico, com um total de 4 cortes por grupo.

Tempo (min)	SIR	GIR	Significância
	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	
0	30,3 $\pm$ 36,0	3,5 $\pm$ 7,0	$p=1,000$
30	333,0 $\pm$ 395,6	3,5 $\pm$ 7,0	$p=0,503$
60	1015,5 $\pm$ 102,8	3,5 $\pm$ 7,0	$p=0,000$

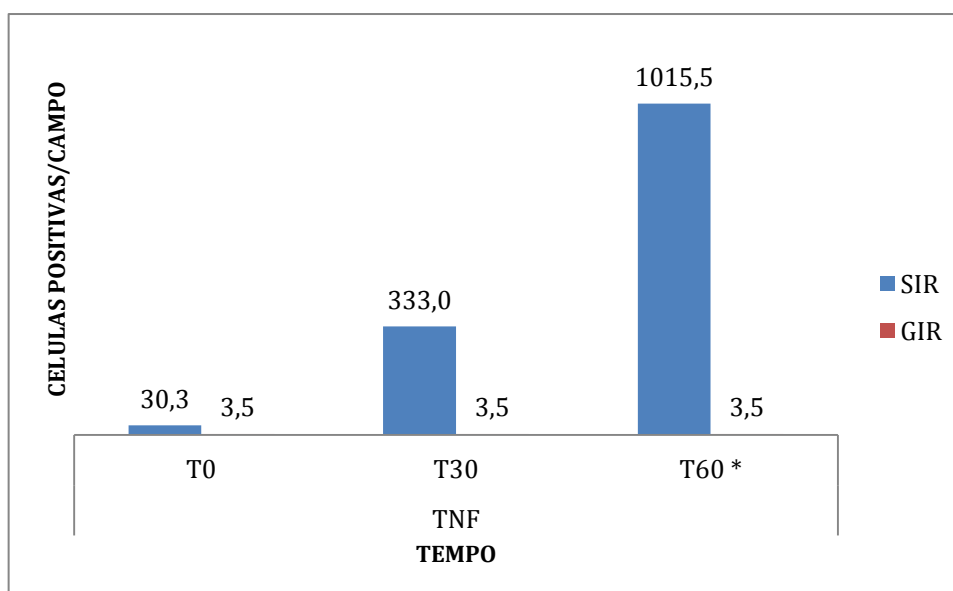


Figura 25 – Representação gráfica das células TNF α positivas por campo nos grupos submetidos à isquemia e reperfusão e tratados com salina (SIR) e l-alanil-glutamina (GIR) nos tempos T0, T30, T60. Dados expressos (Medias $\pm$ D.P.) dos grupos, análise dos dados pelo teste de Tukey para variáveis não emparelhadas: $p=1,000$: comparado ao respectivo grupo SIR; $p=0,503$: comparado ao respectivo grupo SIR; $p=0,000$.

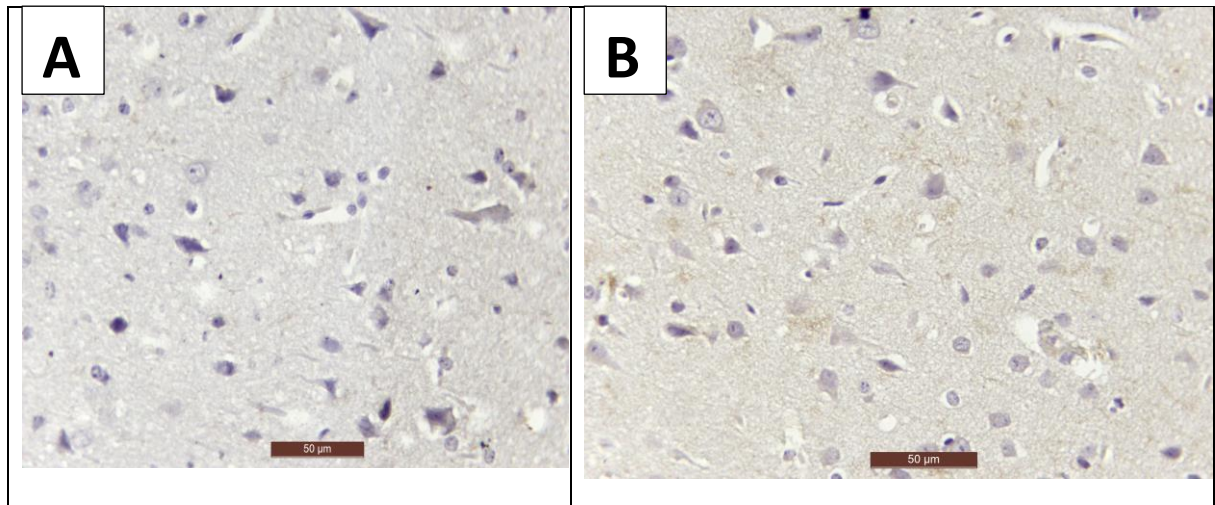


Figura 26 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para $\text{TNF}\alpha$ do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina com isquemia e repercussão (SIR) (A) e glutamina com isquemia e repercussão (GRI) (B) nos tempos 0.

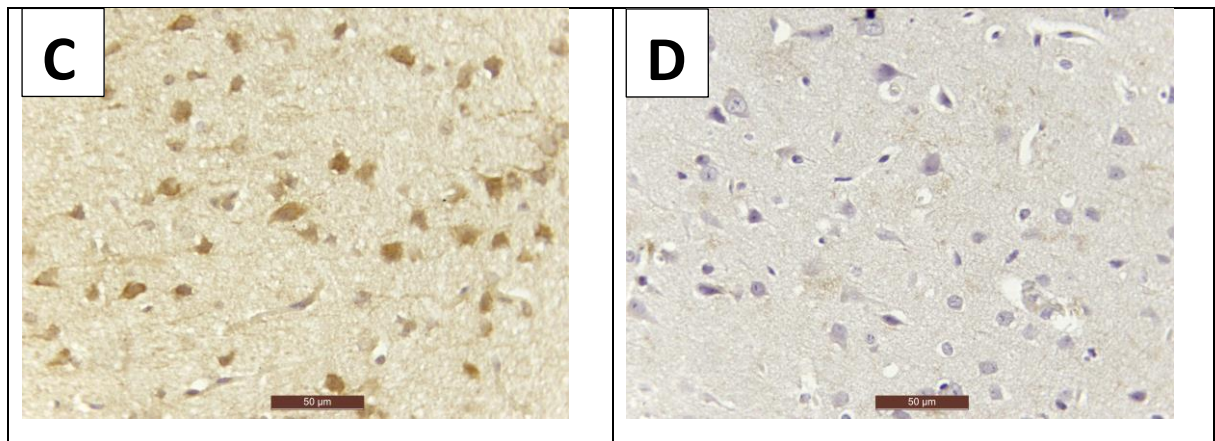


Figura 27 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para $\text{TNF}\alpha$ do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina com isquemia e repercussão (SIR) (A) e glutamina com isquemia e repercussão (GRI) (B) nos tempos 30.

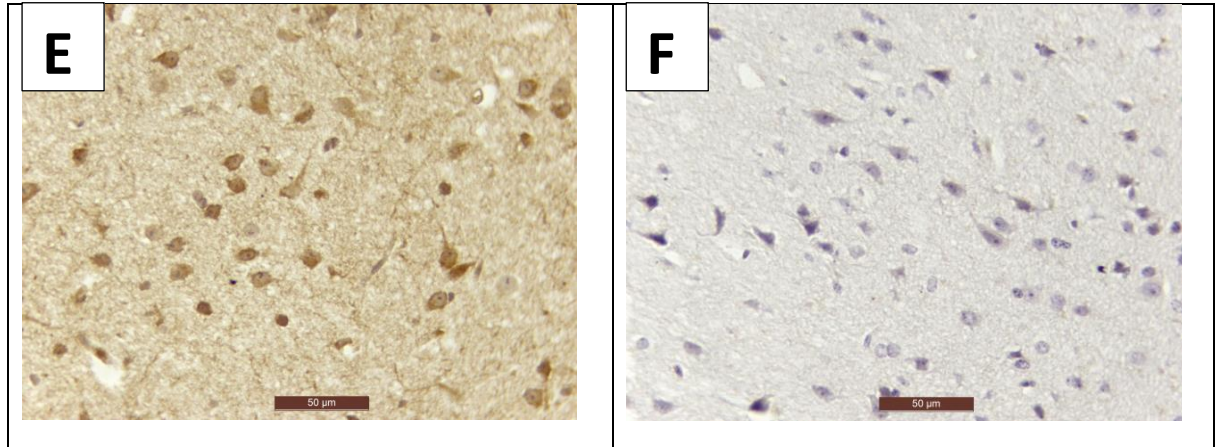


Figura 28 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para $\text{TNF}\alpha$ do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina com isquemia e repercussão (SIR) (A) e glutamina com isquemia e repercussão (GRI) (B) nos tempos 60.

4.6 Imunomarcação do fator nuclear kB (NFkB) entre os grupos SIR e GIR

4.6.1 Celulas NFkB- positivas por campo microscópico

Verificou-se que nas comparações entre os grupos, a presença de células NFkB positivas no grupo GIR foi significativamente menor que o observado no grupo SIR nos tempos T0 (p=1,000), T30(p=0,000) e T60(p=0,000).

TABELA 6 – Células NFkB positivas por campo, observadas nos grupos submetidos à isquemia e reperfusão e tratados com salina (SIR) e l-alanil-glutamina (GIR), nos tempos 0, 30', 60'. Dados referentes às células marcadas em 10 campos de cada corte, com um total de 4 cortes por grupo.

Tempo (min)	SIR	GIR	Significância
	Média ± DP	Média ± DP	
0	463,0±535,0	450,3±523,8	p=1,000
30	1234,8±144,9	247,5±495,0	p=0,000
60	1286,3±85	217,8±435,5	p=0,000

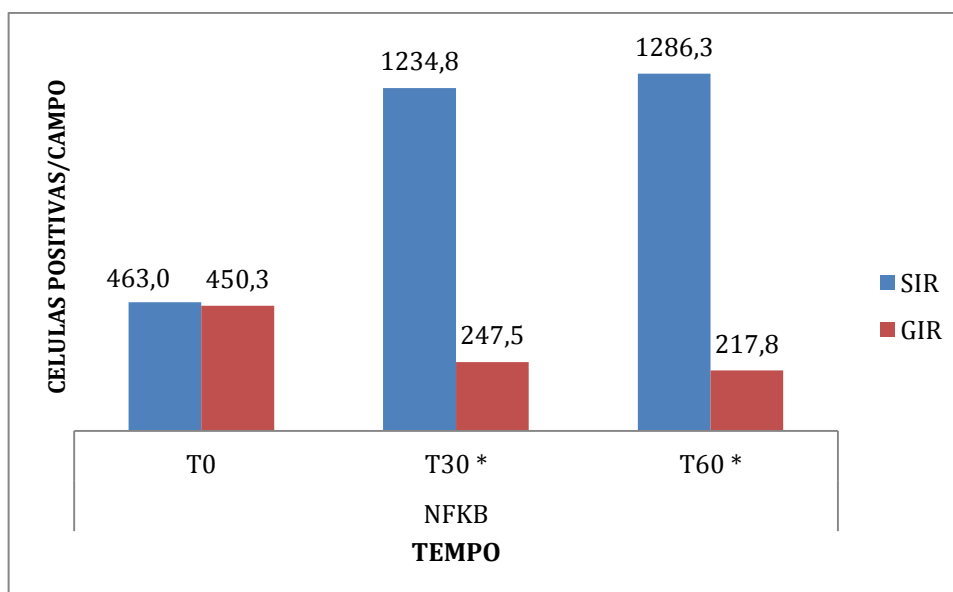


Figura 29 – Representação gráfica das células NFkB positivas por campo nos grupos submetidos à isquemia e reperfusão e tratados com salina (SIR) e l-alanil-glutamina (GIR) nos tempos T0, T30', T60'. Dados expressos (Medias±D.P.) dos grupos, análise dos dados pelo teste de Tukey para variáveis não emparelhadas: p=1,000 comparado ao respectivo grupo SIR; p=0,000 comparado ao respectivo grupo SIR; p=0,000 comparado ao respectivo grupo SIR.

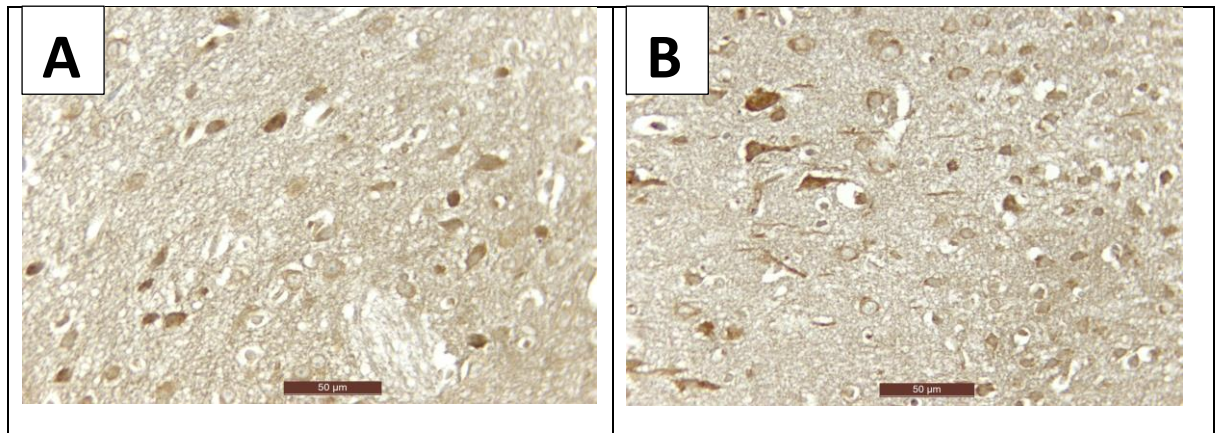


Figura 30 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para NFkB do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina com isquemia e repercussão (SIR) (A) e glutamina com isquemia e repercussão (GRI) (B) nos tempos 0.

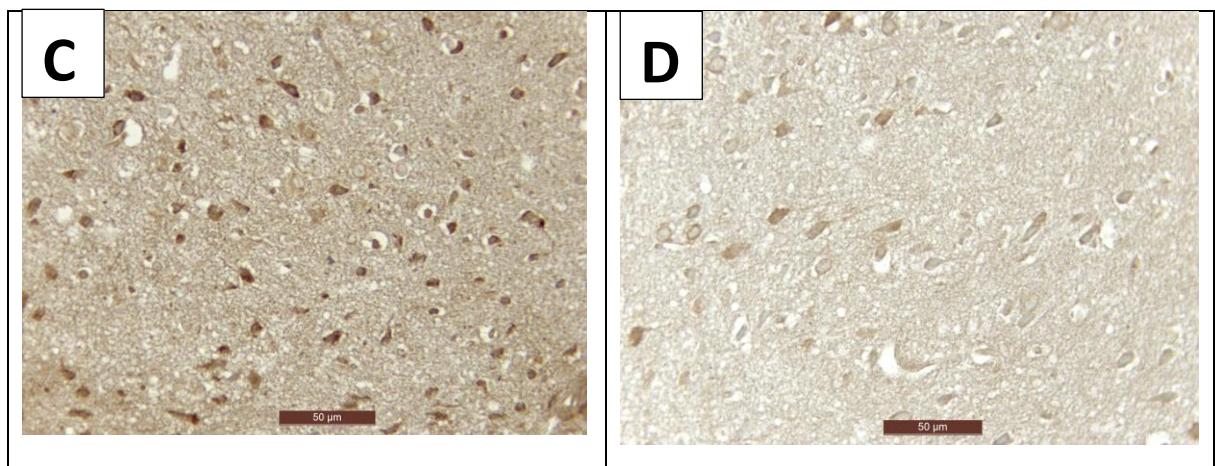


Figura 31 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para NFkB do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina com isquemia e repercussão (SIR) (A) e glutamina com isquemia e repercussão (GRI) (B) nos tempos 30.

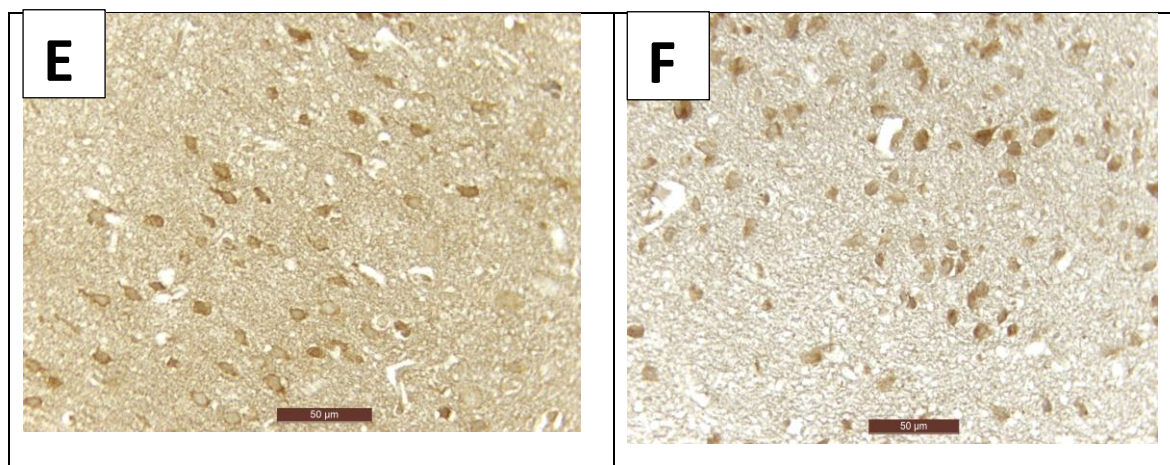


Figura 32 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para NFkB do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina com isquemia e repercussão (SIR) (A) e glutamina com isquemia e repercussão (GRI) (B) nos tempos 60.

4.7 Imunomarcção da Interleucina6 (IL-6) entre os grupos SIR e GIR

4.7.1 Células IL-6 positivas por campo microscópico

Constatou-se que a presença de células marcadas pela IL-6 no grupo GIR foi significativamente menor que o observado no grupo SIR, nos tempos T0 ($p=0,817$), T30 ($p=0,033$) e T60 ($p=0,591$).

TABELA 7– Células IL-6 positivas por campo, observadas nos grupos submetidos á isquemia e reperfusão e tratados com salina (SIR) e l-alanil-glutamina (GIR) nos tempos 0, 30', 60'. Dados referentes às células marcadas em 10 campos de cada corte histológico, com um total de 4 cortes por grupo.

Tempo (min)	SIR	GIR	Significância
	Média ± DP	Média ± DP	
0	311,0±246,5	14,8±29,5	$p=0,817$
30	536,3±119,8	9,0±18,0	$p=0,33$
60	316,0±365,4	28,5±57,0	$p=0,591$

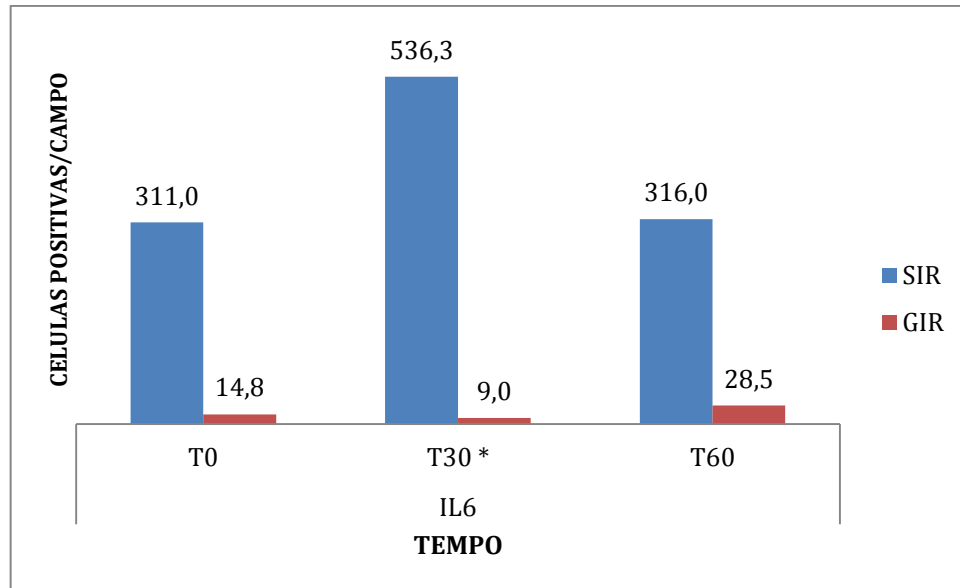


Figura 33 – Representação gráfica das células IL-6 positivas por campo nos grupos tratados salina com isquemia e reperfusão (SIR) e glutamina com isquemia e reperfusão (GIR) nos tempos T0, T30', T60'. Dados expressos (Medias $\pm$ D.P.) dos grupos, análise dos dados pelo teste de Tukey para variáveis não emparelhadas: $p=0,817$ comparado ao respectivo grupo SIR; $p=0,033$ comparado ao respectivo grupo SIR; $p=0,591$ comparado ao respectivo grupo SIR.

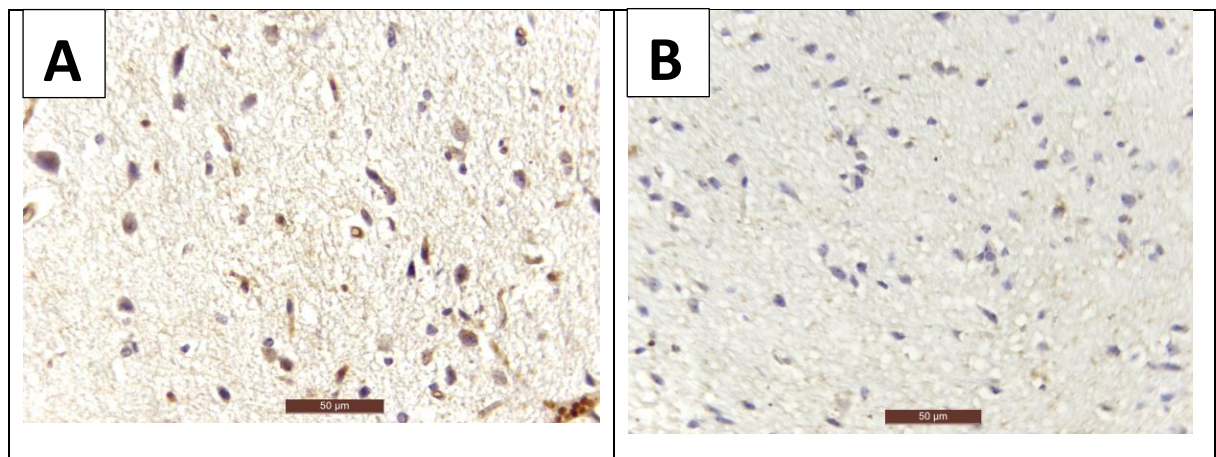


Figura 34 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para IL-6 do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina com isquemia e repercussão (SIR) (A) e glutamina com isquemia e repercussão (GRI) (B) nos tempos 0.

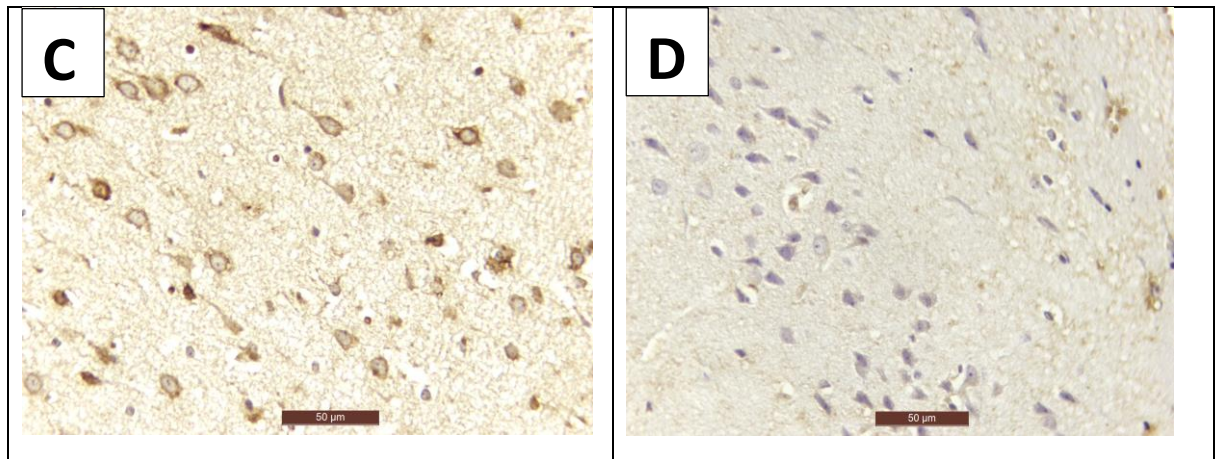


Figura 35 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para IL-6 do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina com isquemia e repercussão (SIR) (A) e glutamina com isquemia e repercussão (GRI) (B) nos tempos 30.

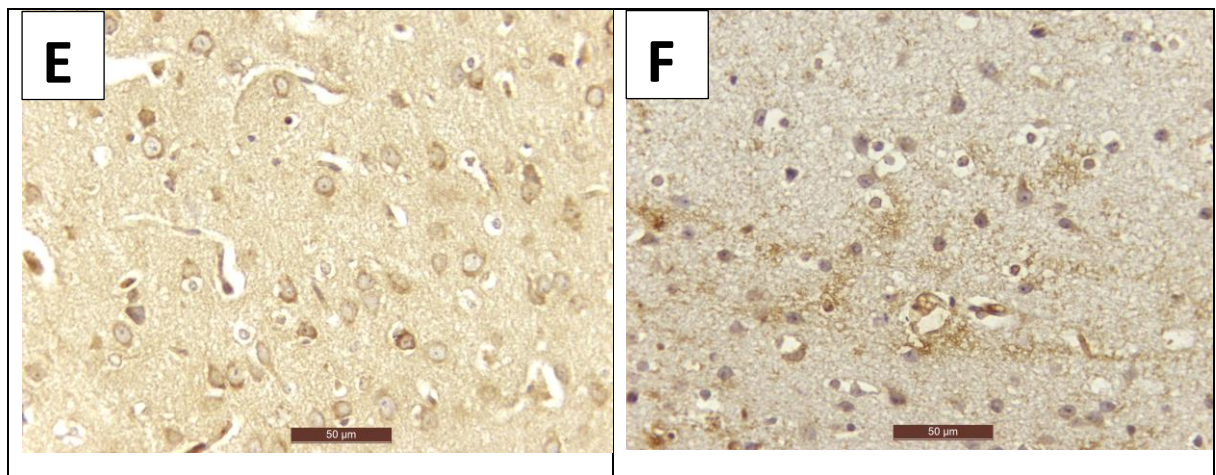


Figura 36 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para IL-6 do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina com isquemia e repercussão (SIR) (A) e glutamina com isquemia e repercussão (GRI) (B) nos tempos 60.

4.8 Imunomarcção da hemeoxigenase1 (HO-1) entre os grupos SIR e GIR

4.8.1 Células HO-1 positivas por campo microscópico

Verificou-se que, nas comparações entre os grupos GIR e SIR, as células marcadas pela HO-1 presente no grupo GIR foi significativamente maior que o observado no grupo SIR nos tempos T0(p=1,00), T30 (p=1,000) e T60 (p=1,000).

TABELA 8– Células HO-1 positivas por campo, observadas nos grupos submetidos à isquemia e reperfusão e tratados com salina (SIR) e l-alanil-glutamina (GIR), nos tempos 0, 30', 60'. Dados referentes às células marcadas em 10 campos de cada corte histológico, com um total de 4 cortes por grupo.

Tempo (min)	SIR	GIR	Significância
	Média ± DP	Média ± DP	
0	32,5±9,7	0.0±0,0	p=1,000
30	11,3±13,0	7,5±15,0	p=1,000
60	9,8±13,7	6,8±13,5	p=1,000

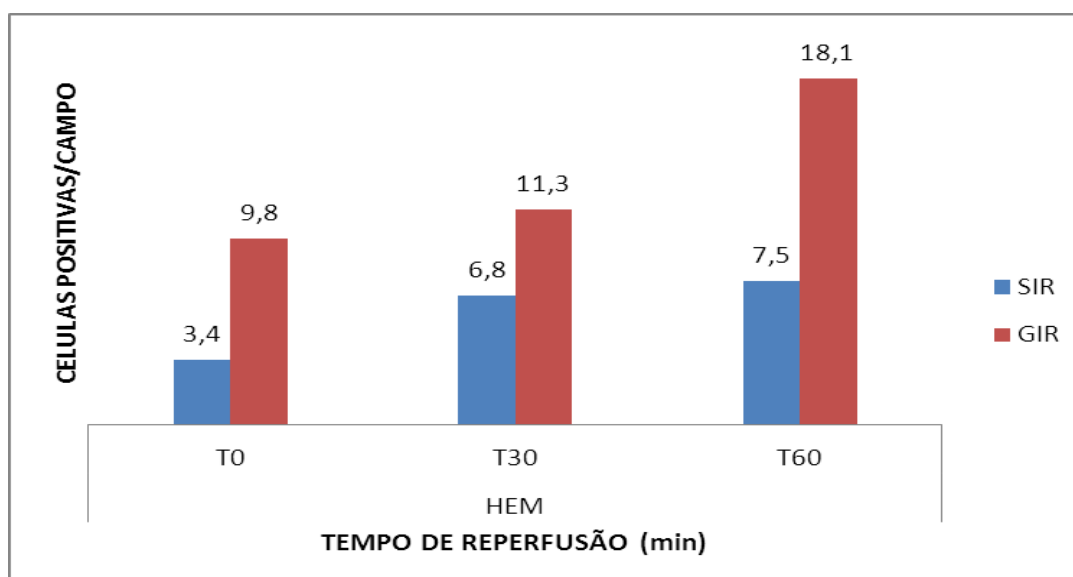


Figura 37 – Representação gráfica das células HO-1 positivas por campo nos grupos submetidos à isquemia e reperfusão e tratados com salina (SIR) e l-alanil-glutamina (GIR) nos tempos T0, T30', T60'. Dados expressos (Medias±D.P.) dos grupos, análise dos dados pelo teste de Tukey para variáveis não emparelhadas: p=1,000 comparado ao respectivo grupo SIR; p=1,000 comparado ao respectivo grupo SIR; p=1,000 comparado ao respectivo grupo SIR.

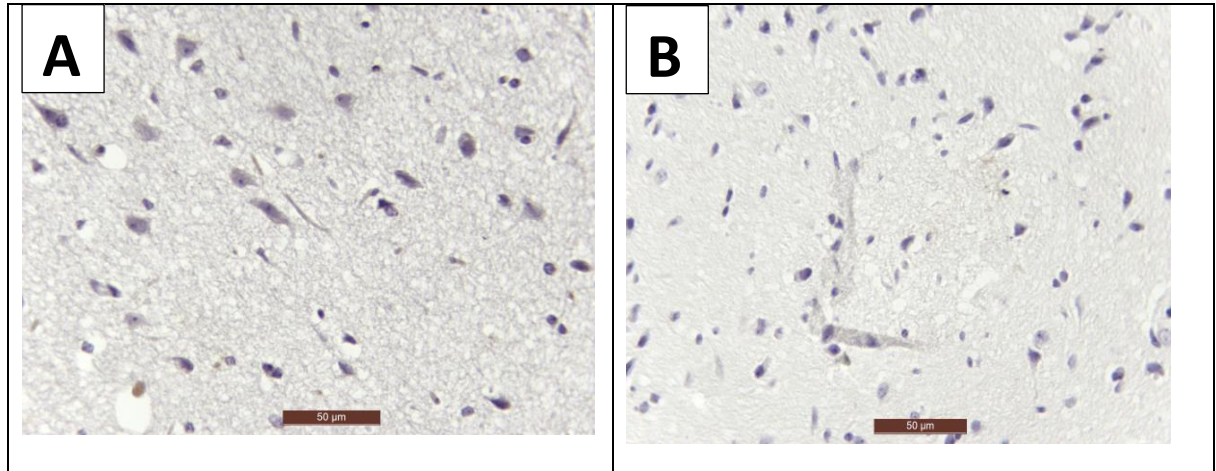


Figura 38 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para HO-1 do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina com isquemia e repercussão (SIR) (A) e glutamina com isquemia e repercussão (GRI) (B) nos tempos 0.

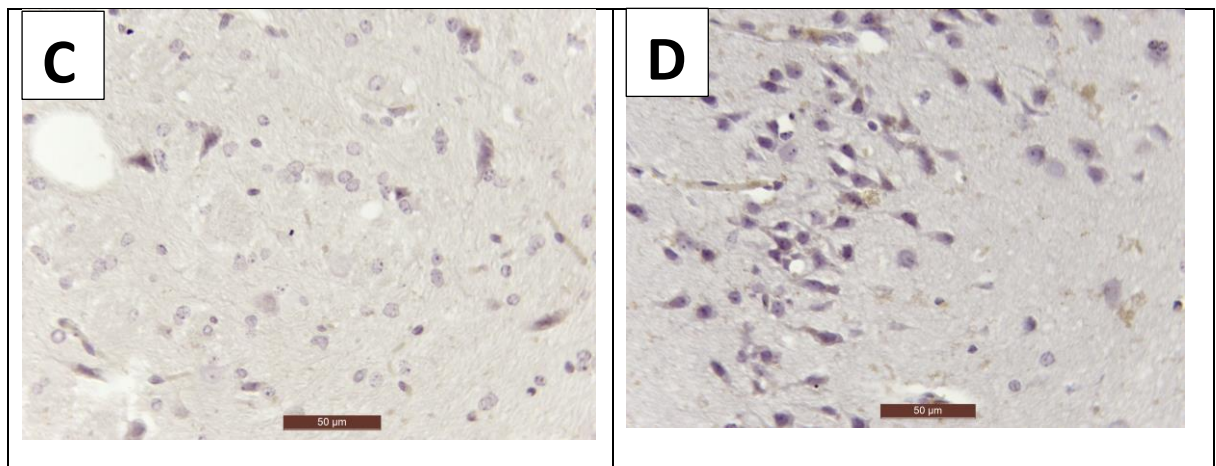


Figura 39 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para HO-1 do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina com isquemia e repercussão (SIR) (A) e glutamina com isquemia e repercussão (GRI) (B) nos tempos 30.

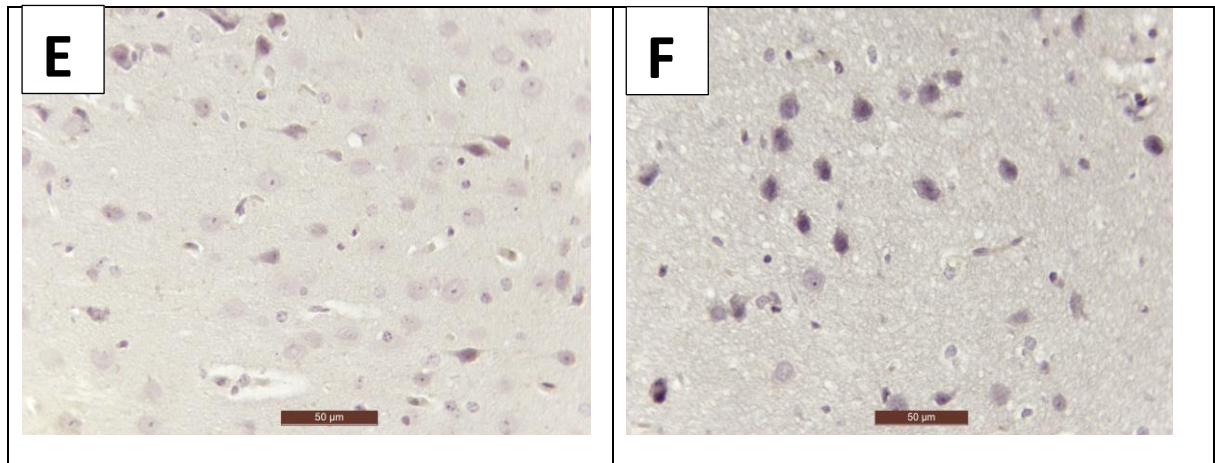


Figura 40 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para HO-1 do córtex cerebral na camada piramidal interna dos grupos tratados salina com isquemia e repercussão (SIR) (A) e glutamina com isquemia e repercussão (GRI) (B) nos tempos 60.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho demonstramos o efeito protetor da L-alanil-grutamina através de técnicas de imunohistoquímica a fim de se avaliar as alterações microscópicas e a imunomarcação em um modelo de isquemia e reperfusão cerebral da expressão dos seguintes biomarcadores de ativação celular: Inteleucina 6 (IL6); Fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$); Fator de transcrição nuclear NFkappaB (NFkB); Hemeoxigenase 1(HO-1), em grupos de animais tratados com salina sem isquemia (SSI) e com isquemia (SIR) e L-alanil-glutamina GIR.

O NFkB é um fator de transcrição redox sensível que regula uma bateria de genes inflamatório, tendo sido implicado como indutor do desenvolvimento de vários processos patológicos (LU., et al, 2004). A ativação de programas gênicos NFkB induzidos, leva a transcrição de fatores promotores da cascata inflamatória, tais como: moléculas de adesão leucocitária (ICAM-1), citocinas e quimiocinas. Alguns poucos mediadores com efeitos anti-inflamatório são também regulados por este fator de transcrição. Evidências envolvendo o NFkB como fator chave da fisiopatologia da lesão de Isquemia/Reperfusão cerebral e miocárdica são inquestionáveis (VALEN., et al, 2001). A maioria destas evidências apontam, portanto, para a indução de genes pró-inflamatórios. Mais recentemente, entretanto, tem sido demonstrado fortes indícios do envolvimento do NFkB na ativação de vias de sinalização de fatores de proteção neurais e miocárdicos, induzíveis por agentes farmacológicos preconditionantes ou por surtos repetidos de isquemia de curta duração e de baixa intensidade. Portanto, o NFkB tem se revelado como um novo alvo terapêutico da proteção celular contra o estresse oxidativo pró-inflamatório e pró-esclerosante em diversos tecidos nobres, tais como miocárdio e o cérebro (VALEN., et al, 2001).

No presente experimento, utilizando-se a imunomarcação por técnica imunohistoquímica, pôde-se observar uma diferença significativa das células NFkB-positivas utilizando-se o modelo experimental de Isquemia/Reperfusão em gerbhos do grupo Salina/Isquemia/Reperfusão T30 e T60 em relação ao grupo Salina/Sem/Isquemia e do grupo Glutamina/Isquemia/Reperfusão T0, T30 e T60 com relação ao grupo Salina/Isquemia/Reperfusão. Estes resultados reproduzem em

grande parte com os experimentos de outros autores (YL. GUO; W. SHEN; F. DU, 2011).

O $\text{TNF}\alpha$ (caquexina ou fator de necrose tumoral α) é uma citocina envolvida na resposta inflamatória sistêmica e focal, sendo um membro de um grupo de citocinas que induz a reação de fase aguda associada à resposta inflamatória aguda (PCR, fibrinogênio e amiloide sérico tipo A (SAA)). É produzida principalmente por macrófagos ativados, embora possa ser produzida por outros tipos celulares, tais como linfócitos TCD4^+ e células NK (natural killer) (KUMAR, ABBAS, ASTER, 2013).

A ação precípua do $\text{TNF}\alpha$ é regular células imunoinflamatórias. O $\text{TNF}\alpha$ é também um pirógeno endógeno, sendo capaz de induzir febre, morte celular apoptótica, sepse (através da produção de IL-1 e IL-6), bem como a indução de caquexia, dano inflamatório, anti-tumorigênese e reduzida (KUNTSCHER et al., 2007).

Em relação à resposta inflamatória aguda o $\text{TNF}\alpha$, juntamente com a IL-1, a IL-6 são um conjunto de citocinas quimioatraentes conhecidas como quimiocinas, são os mensageiros moleculares mais importantes (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

No presente experimento, em relação ao $\text{TNF}\alpha$, constatou-se uma diferença estatisticamente significativa, comparando-se os grupos SSI e SIR. A análise comparativa por técnica imunohistoquímica de células $\text{TNF}\alpha$ -positivas revelou que no grupo SIR, quando comparado ao grupo SSI, as células $\text{TNF}\alpha$ -positivas foram significativamente mais numerosas. Estes achados reforçam dados obtidos por outros autores (PANDYA; SULLIVAN; PETTIGREW, 2011). Estes resultados, portanto, sugerem fortemente o dano oxidativo aumentado nos experimentos de isquemia/reperfusão. Em grande parte estes efeitos injuriantes são mediados por ações pro- e pré-inflamatórias, bem como por ativação de células endoteliais na microvasculatura e de leucócitos em diapedese, atestando, assim, o dano celular por peroxidação lipídica em focos de isquemia e perfusão mediada por radicais livres oxigenados e por estresse nitrosativo mediado pelo peroxinitrito. A estreita relação espacial e temporal entre o TNF -alfa e o NF-kB dá sustentação ao

importante papel deste fator de transcrição nuclear na síntese de TNF-alfa e de seus efeitos injuriantes que acompanham a resposta inflamatória aguda local, mormente como ativador endotelial e leucocitário em relação ao metabolismo oxidativo NDPH-induzido.

A heme oxigenase do tipo 1 (HO-1) é uma enzima microsomal que cataliza a degradação do heme em monóxido de carbono (CO), biliverdina (BVD) e ferro (ABRAHAM et al., 1988).

Alguns trabalhos têm demonstrado que a indução de enzima HO-1 promove uma proteção celular contra injúria oxidativa envolvendo diferentes mecanismos, como o controle dos níveis intracelulares de hemelivre (ação anti-oxidante), produção de biliverdina (ação anti-oxidante), melhor perfusão nutritiva via liberação de CO e induz a síntese de ferritina (GOMES, 2009) através da liberação de ferro livre (RYTER & TYRRELL, 2000). Foi demonstrado que o heme é capaz de estimular a produção de radicais livres, a expressão de moléculas de adesão e a infiltração de neutrófilos para o sítio lesado (SHONO et al., 1996).

Por outro lado pequenas concentrações do heme podem possuir efeitos anti-inflamatórios e citoprotetores importantes, através do aumento da expressão da HO-1 e estimulação da formação de HO-1 e seus produtos, como o CO e biliverdina (BELCHER et al, 2006).

O presente trabalho demonstrou que o número de células hemeoxigenase-1-positivas diminuiu significativamente no grupo SSI nos tempos T30 e T60 em relação ao Grupo SIR. Tal resultado muito provavelmente atesta a depleção enzimática da HO-1 em decorrência do intenso estresse oxidativo verificado no grupo submetido à isquemia por mais de 30 minutos, seguida de reperfusão. No grupo previamente tratado com L-alanil-glutamina pôde-se, entretanto, verificar o potente efeito indutor pré-condicionante deste nutracêutico, em relação à proteção das células do sistema nervoso central, comparativamente ao grupo controle, na indução da HO-1 e de seus efeitos redox-protetores, corroborando assim os dados de outros autores (YASUBARA., 2001).

A interleucina-6 é uma citocina multifuncional produzida por vários tipos de células, principalmente células do sistema fagocítico mononuclear (SFM). O mecanismo exato pelo qual ela medeia seus efeitos protetores em modelos animais e em humanos não está totalmente definido. Entretanto, está bem estabelecido que a IL-6 pode afetar as respostas imunes inata e adaptativa. Entre outras atividades, são bem conhecidas as seguintes: diferenciação de linfócitos B, proliferação e diferenciação de células T citotóxicas, diferenciação de linfócitos TCD4⁺ produtoras de citocinas do perfil Th2, formação de colônias de células multipotentes em células tronco hemopoiéticas, secreção de imunoglobulinas, secreção de múltiplas proteínas sistêmicas de fase aguda da inflamação ("sickness") e, não menos importante, diferenciação e maturação de macrófagos (TRIPATHY et al., 2010). Consequentemente, a IL-6 joga importante papel na suscetibilidade a infecções causadas por uma vasta pletera de agentes biopatogênicos: virais, fúngicos, bacterianos e parasíticos (SCHELLER; ROSE-JOHN, 2006).

A microvasculatura cerebral parece ser o alvo preferencial da convergência de processos inflamatórios agudos e oxidativos. O estresse oxidativo, que resulta do desequilíbrio entre a geração de EROs e a capacidade de promover o decaimento e neutralização de radicais livres por parte das enzimas da defesa antioxidante, é particularmente importante no cérebro pela sua alta taxa metabólica de natureza oxi-redox. A hipótese dominante é a de que a injúria e disfunção da microvasculatura cerebral, resultante dos fenômenos de peroxidação lipídica membranar, estresse oxidativo-induzido, libera fatores pró-inflamatórios, tais como citocinas e quimiocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , TGF β e proteína quimioatraente monocítica (MCP-1), que têm efeito injuriante e neurotóxico direto. O presente experimento revelou haver no tempo T60, comparando-se os grupos SIR e SSI, uma diferença significativa no número de células imunomarcadas pela IL-6, que foi mais elevado no primeiro. Entretanto, comparando-se os grupos SIR e GIR, pode-se constatar uma diferença expressiva estatisticamente significativa no número de células IL-6-positivas, a favor do grupo não tratado pela L-alanil-glutamina (grupo SIR), atestando, assim, o efeito protetor desta em relação ao dano celular induzido pelas citocinas e mediadores pró-inflamatórios liberados por ocasião da injúria microvascular e citotóxica EROs-mediada. Tais achados confirmam os resultados de

outros autores em relação ao modelo da isquemia-reperfusão cerebral (MURPHY et al., 2007).

Sobre o efeito pré-condicionante da glutamina, faz-se mister, na ocasião, enfatizar que a mesma é o aminoácido livre mais abundante nos músculos e sangue de seres vivos (MURPHY; NEUSHOLME, 1999). Sua molécula compreende cinco carbonos e tem muitas funções metabólicas importantes, tais como: combustível oxidativo, transferência de nitrogênio e carbono entre tecidos, regulação na homeostasia ácido-base, como precursora da amônia excretada pelo rim, além de ser uma molécula precursora da gliconeogênese, da biossíntese de purinas, de pirimidinas (e, conseqüentemente, ácidos nucleicos) e de outros aminoácidos (LEITÃO, 2007). É um aminoácido condicionalmente essencial, pois se torna indispensável nas condições de estresse, sendo ativamente transportada, principalmente para células da resposta imune mediada por células. Estudos realizados por Wischmeyer (2008) já puderam evidenciar que a glutamina está envolvida no mecanismo de proteção e sobrevivência celular para limitar o dano e a morte apoptótica associada ao estresse oxidativo celular. Estes achados demonstraram que a célula utiliza preferencialmente os níveis de glutamina intracelular como um sensor de estresse e de ativação celular. Outras pesquisas têm demonstrado que a glutamina tem a capacidade de atenuar o dano tecidual que acompanha a resposta imuno-inflamatória, através de efeitos regulatórios sobre a via de sinalização do fator nuclear κB (NF κB), dados estes muito análogos aos obtidos no presente experimento. Pesquisas em laboratório têm demonstrado que uma única dose de glutamina (0,75g/kg) é capaz de atenuar a via de ativação da ligação nuclear do NF κB e evitar, assim, a degradação de sua proteína inibitória I $\kappa B\alpha$ (PIRES, 2010).

Na mesma linha de investigação perseguida por nosso grupo, a glutamina tem sido amplamente usada, em diversos experimentos e laboratórios, com vista se avaliar vias e mecanismos de lesão tecidual em modelos de isquemia e reperfusão, em diversos órgãos-alvos (TORRES et al., 2003; BARBOSA et al., 2003; ALVES et al., 2003). A maioria destes estudos puderam fornecer fortes evidências do efeito citoprotetor deste aminoácido em diversos tipos celulares bem como das bases moleculares e bioquímica das vias de sinalização de sobrevivência celular implicadas na

defesa antioxidante e na ação anti-inflamatória (“down-regulation”), provavelmente, anti-esclerótica da L-alanil-glutamina.

Ademais, Tang, Rao e Hu (2000), ao estudarem as alterações nos níveis de aminoácidos no córtex cerebral e hipocampo, na isquemia cerebral global em gerbils, puderam mostrar que a diminuição de alguns aminoácidos, como aspartato e glutamina, podem constituir as bases bioquímicas da lesão e morte neuronal, implicando-os, portanto, no crucial papel da via glutaminérgica na proteção e sobrevivência das células neurais em modelos experimentais, análogos ao presente estudo.

Já Tardini et al. (2003), ao avaliarem dois modelos experimentais de isquemia e reperfusão cerebral em ratos, através da oclusão temporária carotídea, associada ou não a oclusão vertebral, não puderam demonstrar alterações consistentes de marcadores de lesão cerebral aguda nem de diferença significativa no percentual de área de necrose isquêmica do grupo SIR com relação ao grupo glutamina GIR. Por outro lado, Nogueira (2009) foi capaz de demonstrar que a administração prévia de L-alanil-glutamina é capaz de reduzir a extensão da área de lesão celular grave com infarto durante eventos de isquemia e reperfusão em modelos experimentais. Tal efeito protetor envolveria supostamente a via nitrérgica por bloquear os efeitos danosos da NO produzido pela NOsintetase neuronal que, por sua vez, inibe a atividade da glutamina sintetase. Além da supressão da síntese de NO haveria também o envolvimento de outras enzimas, como a glutamina sintetase. É digno de menção o fato que as maiores alterações metabólicas verificadas por alguns autores (Faria, Muniz e Vasconcelos, 2007), foram registradas nos primeiros minutos de reperfusão, sendo, portanto, uma reação bem precoce e inicial ao estresse oxidativo reperfusão-induzido. Tal fato poderia explicar a aparente ineficácia comparativa da administração controlada de L-alanil-glutamina, ao não ter este aminoácido, ao término do experimento, induzido diferença estatisticamente significativa da área de necrose isquêmica nos diferentes grupos de animais, com e sem L-alanil-glutamina, como registrado em alguns poucos estudos (TARDINI et al., 2003).

Em modelo experimental em Gerbils idêntico a este, Pires (2010), analisando microscopicamente o dano neuronal agudo, pôde demonstrar a presença de neurônios vermelhos, que é um biomarcador citológico bastante sensível de lesão neuronal aguda irreversível pós-isquêmica, na camada granular interna do córtex cerebral nos grupos de gerbils submetidos à Isquemia/Reperusão. Ao proceder à análise comparativa foi apta, igualmente, de constatar uma redução estatisticamente significativa do número de neurônios vermelhos no subgrupo de animais tratados previamente com glutamina (GIR), nos tempos 30 e 60 minutos, em relação ao subgrupo com Isquemia/Reperusão, porém tratado unicamente com salina (SIR). Tal estudo demonstra de modo elegante e em bases morfológicas a ação protetora da L-alanil-glutamina como agente preconditionante na injúria celular induzida pelo estresse agudo provocado por eventos de Isquemia/Reperusão. O presente estudo reproduz amplamente tais resultados e permite se tirar a mesma ilação em relação à ação citoprotetora efetiva deste nutracêutico. Fomos capazes de demonstrar, à luz de técnicas imunohistoquímicas, o efeito fortemente protetor da L-alanil-glutamina, pois esta mostrou-se efetiva na capacidade de reduzir a expressão de citocinas inflamatórias e do fator de transcrição nuclear de genes de ativação celular, ao mesmo tempo que foi capaz de, também, aumentar a expressão de enzimas da defesa anti-oxidante. Tais efeitos puderam se traduzir, em termos estruturais e imunohistoquímicos, em redução da extensão e da gravidade do dano tecidual ao inibir o estresse oxidativo-nitrégico e pró-inflamatório, ambos constituindo a base etiofisiopatogênica da lesão de isquemis/reperusão e da necrose liquefativa do infarto cerebral.

Em que pese às limitações e possíveis falhas da metodologia empregada, o presente estudo provê outros indícios experimentais que consubstanciam a hipótese do efeito protetor da L-alanil-glutamina na lesão de isquemia e reperusão cerebral.

Caberá a estudos futuros e com o emprego destes e de outros marcadores inflamatórios e de ativação celular, determinar a real eficácia e segurança da utilização da L-alanil-glutamina como agente protetor e pré-condicionante em relação aos efeitos deletérios próprios da lesão de isquemia e reperusão cerebral experimental.

CONCLUSÕES

1. A administração prévia de L-alanil-glutamina a gerbils em modelo experimental de lesão cerebral de Isquemia/Reperusão promove proteção tecidual na medida da redução significativa, em comparação a grupo controle, do perfil de expressão, por técnica imunohistoquímica, das seguintes citocinas e fatores de transcrição de genes pró-inflamatórios: TNF-alfa, IL-6 e NFkB. Concomitantemente, induz expressão aumentada de agente anti-oxidante celular, redox-sensível, a HO-1.

2. O pré-condicionamento com L-alanil-glutamina em Gerbils, no modelo de isquemia/reperusão cerebral, reduz a expressão fenotípica de mediadores pró-inflamatórios em comparação com o grupo de Isquemia/Reperusão não tratado pela L-alanil-glutamina, em ambos os tempos T30 e T60.

3. O pré-condicionamento com L-alanil-glutamina promove, de modo significativo, em comparação ao grupo de Isquemia/Reperusão simples, a hiper-expressão da proteína anti-oxidante HO-1, atestando o efeito protetor deste nutracêutico na lesão de Isquemia/Reperusão decorrente do estresse oxidativo, em gerbils.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.

ABRAHAM, N. G.; KAPPS, A. Pharmacological and Clinical Aspects of hemeoxygenase. **Pharmacological Reviews.**, v.60, n.1, p. 79-127, 2008.

ADIBHATLA, R.M.; HATCHER, J.F.; DEMPSEY, R.J. Phospholipase A2, hydroxyl radicals, and lipid peroxidation in transient cerebral ischemia. **Antiox. Redox Signal.**, v.5, n. 5, p.647-654, 2003.

ALBERTINI, S. M.; RUIZ, M. A. O papel da glutamina na terapia nutricional do transplante de medula óssea. **Rev. Bras. Hematol.Hemoter.**, v. 23, n.1, p. 41-47, jan./abr. 2001.

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

ALFACE, J. L. S. Metabolismo dos aminoácidos. In: HALPERN, M. J. (Coord.). **Bioquímica**. Lisboa: Lidel, 1997.

ALZENMAN, E.; SINOR, J. D.; BRIMECOMBE, J. C.; HERIN, G. A. Alterations of N-Methyl-D-aspartate receptor properties after chemical ischemia. **J.Pharmacol. Exp.Therap.**, v. 295, n. 2, p.572-577, 2000.

ARAUJO, D. A. M.; MONTENEGRO, F. C.; MAFRA, R. A.; ALVES, A. R. A.; OLIVEIRA, F. A.; CRUZ, J. S. Principais Sistemas de Neurotransmissão. In: Reinaldo Nóbrega de Almeida (Org.). **Psicofarmacologia: Fundamentos Práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 2, p. 25-45, 2006.

ALMEIDA, R. N. A. (Org.). **Fundamentos práticos da psicofarmacologia**. Ri de Janeiro:Guanabara Koogan, v. 2, p. 25-45, 2006.

BARBOSA, R. C.; GUIMARÃES, S. B.; VASCONCELOS, P. R. C. V.; CHAVES, C. R.; VASCONCELOS, P. R. L. Efeitos metabólicos da glutamina em ratos submetidos à queimadura por água fervente (escaldadura). **Acta Cir. Bras.**, v. 18, n. 6, p. 527-533, 2003.

BARGER, S. W.; MATTSON, M. P. Induction of neuroprotectivekB-dependent transcription by secreted forms of the Alzheimer's B-amyloid precursor.**Brain Res. Mol. Brain Res.**, v. 40, n. 1, p.116-126, 1996.

BARREIROS, L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova**, v.29, n. 1, 2006.

BAYIR, H. Reactiveoxygensspecies.**CriticalCare Medicine**, v. 33, n. 12, p. 498-501, 2005.

BAYNES, J.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica Médica**. São Paulo: Manole, 2000.

BELCHER, J.D.; MAHASETH, H.; WELCH, T. E.; OTTERBEIN, L. E.; HEBBEL, P. R.; VERCELLOTTI, G. M. Heme oxygenase-1 is a modulator of inflammation and vaso-occlusion in transgenic sickle mice.**J Clin Invest.**, v. 116, n. 3, p. 808-816, 2006.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. **Fisiologia**.Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

BRADFORD, H. F.; WARD, H. Glutamine a major substrat for serve endings.**J. Neurochem.**, v. 30, n. 6, p.1453-1456, 1987.

BRATINA, P.; GRENBER, L.; PASTEUR, W.; GROTA, J. C. Current Emergency Department Management of Stroke in Houston, Texas.**Stroke**, v. 26, p. 409-414, 1995.

BULKLEY, G. B. Preconditioning for protection from ischemia injury: Discriminating cause from the effect from epiphenomenon. **Ann. Surg.**, v. 232, n. 2, p.163-165, 2000.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R. A.**Bioquímica Ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, 1996.

CHOI, D. W.; MAULUCCI-GEDDE, M.; KRIEGSTEIN, A. R. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture.**J.Neurosci.**, v.7, n. 2, p.357-368, 1987.

CHYCZEWSKA, E.; MRÓZ, R. M.; KOWAL, E. TNT-alfa, IL-1 and IL-6 concentration in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of non-small cell lung cancer (NSCLC). **Rocz.Akad.Med. Bialymst.**, v. 42, Supl. 1, p.123-135, 1997.

COLLINGRIDGE, G. L.; LESTER, R. A. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system.**Pharmacol. Rev.**, v.41, n. 2, p.144-209, 1989.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins Patologia estrutural e funcional**. 6. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

CURI, R. **Glutamina**: metabolismo e aplicações clínicas no esporte. Rio de Janeiro: Sprint, 2000.

CURTHOYS, N. P.; WATFORD, M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. **Annu. Rev. Nutr.**, v.15, p.133-159, July 1995.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Prog. Neurobiol.**, v. 65, n. 1, p.1-105, 2001.

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

DIESTEL, C. F.; PAULO, F. L.; MARQUES, R. G.; HORST, N. L.; CAETANO, C. E. R. Efeito da suplementação oral de L-glutamina na parede colônica de ratos submetidos à irradiação abdominal. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 1, supl. 1, 2005.

DIRNAGL, U.; SIMON, R. P.; HALLENBECK, J. M. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. **Trends Neurosci.** v.26, n. 5, p.248-254, 2003.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, v.82, n.1, p. 47-95, 2002.

DUARTE, S. G.; CAMPOS, A. D.; COLLI, B. O. Funcional evaluation of temporary focal cerebral ischemia. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 3-B, n. 61, p. 751-756, 2003.

ENG, H. L.; MOSKOWITZ, M. A.; JACOBS, T. P. Exciting, Radical Suicidal: How Brain Cells Die After Stroke. **Stroke**, v. 36, n. 2, p.189-192, 2005.

FABRIS, V. E. Morte e necrose celular. **Medicina**, Ribeirão Preto, v.25, p.143-152, 1991.

FARIA, M. H. G.; MUNIZ, L. R. F.; VASCONCELOS, P. R. L. Metabolismo dos corpos cetônicos durante as lesões de isquemia e reperfusão cerebrais após oclusão bilateral das artérias carótidas comuns em ratos. **Acta Cirurg. Bras.**, v. 22, n. 2, p. 125-129, 2007.

FORTE, W. N. **Imunologia básica e aplicada**. São Paulo: Artemed, 2004.

FURST, P.; STEHLE, P. **Nutrição parenteral**: Dipeptiven (alanil-glutamina a 2090 IV). [S.l.]: Fresenius- Kabi, [s.d.]. Monografia Científica.

GAGLIARDI, R. J. Tratamento da fase aguda do Acidente Vascular Cerebral. Projeto de diretrizes da Academia Brasileira de Neurologia. **Associação Médica Brasileira e conselho Federal de Medicina**, jul. 2001.

GALERA, S. C. **Efeitos da Suplementação Oral de Glutamina sobre o Estresse Oxidativo em indivíduos de Meia-Idade e Idosos**. 2008. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

GARCIA, J. H. Experimental ischemic stroke: A review. **Stroke**, v.15, p.5-14, 1984.

GINBERG, M. D.; BUSTO, R. Rodent Model of Cerebral Ischemia. **Stroke**, v. 20, n.12, p.1627-1642, 1989.

GLEZER, I.; MARCOURAKIS, T.; AVELLAR, M. C. W.; GORENSTEIN, C.; SCAVONE, C. O fator de transcrição NF- κ B nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v.22, n.1, p.26-30, 2000.

GOMES, A. S. **Efeito protetor da via hemeoxigenase 1/biliverdina/CO em modelos de lesões gástricas em camundongos – papel da guanilato ciclase solúvel (GCS) e da NO sintase (NOS)**. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. Ceará. 2009.

GOMES, M. A. M.; MACEDO NETO, N. C.; BISPO, I. G. A. Interleucina-6, Moléculas de Adesão Interleucina-1 Microalbuminúria na avaliação da lesão Endotelial: Revisão de literatura. **Rev. Socerj**, v.22, n. 6, p. 398-403, 2009.

GUERRINI, L.; BLASI, F.; DENIS-DONINI, S. Synaptic activation of NF- κ B by glutamate in cerebellar granule neurons in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, n. 20, p.9077-9081, 1995.

GÜRKE, L.; MARK, A.; SUTTER, P. M. Ischemic preconditioning improves post ischemic skeletal muscle function. **Am. Surg.**, v. 62, n. 5, p. 391-394, 1996.

HAJAR, L. A.; PINHEIRO, A. M. C. Ação do furoato de mometasona, sobre as citocinas inflamatórias. **An. Bras.Dermatol.**, v. 74, supl.1, p. 1-22, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Nova York: Oxford University Press, 2007.

HARKIN, D. W.; D'AS, A. A. B. B.; MCCALLION, K.; HOPER, M.; CAMPBELL, F. C. Ischemic preconditioning before lower limb ischemia-reperfusion protects against acute lung injury. **J. Vasc. Surg.**, v.35, n. 6, p. 1264-1273, 2002.

HERRMANN, M.; STERN, M.; ENWEIDER, F.; NITSCH, C. Effect of inherent epileptic seizures on brain injury after transient cerebral ischemia in Mongolian gerbils. **Exp. Brain Res.**, v.154, n. 2, p.176-182, Jul. 2004.

HOMI, H. M.; FREITAS, J. J. S.; CURI, R.; VELASCO, I. T.; JUNIOR, B. A. S. Changes in superoxide dismutase and catalase activities of rat brain regions during early global transient ischemia/reperfusion. **Neuroscience letters**, v. 333, n. 1, p. 37-40, 2002.

HSU, S. M.; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **J HistochemCytochem.**, v. 9, n.11, p. 1349-1353, 1981.

JENNINGS, R. B.; REIMER, K. A. Lethal myocardial ischemia injury. **Am. J. Pathol.**, v.102, n. 2, p. 241-255, 1981.

KANORIA, S.; JALAN, R.; SEIFALIAN, A. M.; WILLIAMS, R.; DAVIDSON, B. R. Protocols and mechanism for remote ischemic preconditioning: a novel method for reducing ischemia reperfusion injury. **Transplantation**, v.84, n.4, p. 445- 458, 2007.

KERRIGAN, C. L.; STOLAND, M. A. Ischemia reperfusion injury: a review. **Microsurgery**, v.14, n. 3, p.165-175, 1993.

KIMURA, C.O. M.; ITO, Y. Hypoxia-induced alterations in Ca^{2+} mobilization in brain microvascular endothelial cell. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v.279, n. 5, p.2310-2318, 2000.

KIMURA, T.; SAKO, K.; TANAKA, K.; KUSAKABE, M.; TANAKA, T.; NAKADA, T. Effect of mild hypothermia on energy state recovery following transient forebrain ischemia in the gerbil. **Exp. Brain. Res.**, v.145, n.1, p.83-90, 2002.

KOROLKIEWICZ, R. P.; SEIN-ARNAUD, J.; RUCZYNSKI, J.; REKOWSKI, P.; BIENIASZEWSKI, L.; CHODOROWSKI, Z.; PETRUSEWICZ, J.; UJDA, M.; DABKOWSKI, J.; BITEK, M. The role and interactions of nitric oxide (NO), carbon monoxide (CO), and prostanooids in the pathogenesis of postoperative ileus in rats. **Journal of gastrointestinal surgery**, v. 8, n. 3, p. 346-357, 2003.

KUNTSCHER, V.; TRESKA, V.; RACEK, J.; KOBR, J.; TREFIL, L.; HES, O.; Does the administration of antioxidants as scavengers of reactive oxygen species in kidney transplantation really have sense? **Bratisl Lek Listy** ., v. 9, n. 108. p. 385-387, 2007.

LANDIM, E.R. **Efeito do pré tratamento com L alanil glutamina e pré condicionamento isquêmico em modelo de isquemia reperfusão de membros pélvicos de ratos**. 2008. 125f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Salvier, 2002.

LEITÃO, R. F. C. **Estudo do papel do óxido nítrico nas mucosites oral e intestinal induzidas por 5-fluorouracil e metotrexato e efeito da glutamina e alanil-glutamina na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. Ceará. 2007.

LESSA, I. Epidemiologia das doenças cerebrovasculares no Brasil. **Rev. Soc Cardiol. Estado de São Paulo**. v.9, n.4, p. 509-518, 1999.

LEVINE, S.; SHON, D. Cerebral ischemia in infant and adult gerbils. **Arch. Path.**, v.87, n.3, p.315-317, 1969.

LEVINE, S.; PAYAN, H. Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (*Merionesunguiculatus*). **Exp. Neurol.**, v.16, n. 3, p. 255-262, 1996.

LIPTON, S. A.; ROSENBERG, P. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurological disorders. **N Eng. J. Med.**, v. 330, n. 9, p.613-622, 1994.

LOTUFO, P. A. Mortalidade pela doença cerebrovascular no Brasil. **Rev. Bras. Hipertens.**, v. 4, p. 387-391, 2000.

LU, L.; CHEN, S. S.; ZHANG, J. Q.; RAMIRES, F. J.; SUN, Y. Activation of nuclear factor-kB and its proinflammatory mediator cascade in the infarcted rat heart. **Biochemical and Biophysical Research Communications.**, v. 321, p. 879-885, 2004.

MAINES, M. D. The hemeoxygenase system: a regular of second messenger gases. **Annu. Rev.Pharmacol.Toxicol.**,v.37, p.517-554, 1997.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 24, p. 428-435, 2008.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology. **J. Nutr.**, v. 130, n. 4S suppl., p.1007S-1015S, 2000.

MELDRUM, B.S. Protection against ischemic neuronal damage by drugs acting on excitatory neurotransmission. **Cerebrovasc. BrainMetab. Rev.**, v. 2, n. 1, p. 27-57, 1990.

MELO, S. B. V.; LAURINDO, I. M. M. A resposta inflamatória. In: YOHINARI, N. H.; BONFA, E. S. D. O. **Reumatologia para o clínico**. São Paulo: roca, 2000.

MENZIES, S. A.; HOLF, J.T.; BETZ, A. L. Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model (see comments). **Neurosurgery**, v.31, n. 1, p.100-106, discussion, p.106-107, 1992.

MICHAELIS, E. K. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. **Prog.Neurobiol.**, v.54, n. 4, p.369-415, 1998.

MINNERS, J.; LACERDA, L.; MCCARTHY, J.; MEIRING, JJ.; YELLON, DM.; SACK, MN. Ischemic and pharmacological preconditioning in Girardicells and C212 yotubes induce mitochondrial uncoupling. **Circ Res.**, v. 89, n. 9, p. 787-792, 2001.

MORO, M. A.; ALMEIDA, A.; BOLAÑOS, J. P.; LIZASOAIN, I. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. **Free Rad. Biol. Med.**, v.39, n. 10, p.1291-1304, 2005.

MOUNSEY, R. A.; PANG, C. Y.; BOYD, J. B.; FORREST, C. Augmentation of skeletal muscle survival in the latissimusdorsi porcine model using acute ischemic preconditioning. **J.Otolaryngol.**, v. 21, n. 5, p. 315-320, 1992.

MULLANE, K. Miocardial preconditioning: part of the adenosine revival. **Circulation**, v. 85, n. 2, p. 845-847, 1992.

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

MURPHY, C.; NEWSHOLME, P. Macrophage-mediated lysis of a beta-cell line, tumour necrosis factor-alpha release from bacillus Calmette-guerin (BCG) – activated murine macrophages and interleukin-8 release from human monocytes are dependent on extracellular glutamine concentration and glutamine metabolism. **Clin Sci Lond**), v. 96, n. 1, p. 89-97, 1999.

MURPHY, C. G.; CHEN, G.; WINTER, D. C.; BOUCHIER-HAYES, D. J. Glutamine preconditioning protects against tourniquet-induced local and distant organ injury in a rodent ischemia-reperfusion model. **Acta Orthop.**, v.78, n.4, p. 559- 566, 2007.

MURRY, C. E.; JENNINGS, R. B.; REIMER, K. A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. **Circulation**, v.74, n. 5, p. 1124-36, 1986.

NISHIZAWA, Y. Glutamate release and neuronal damage in ischemia. **Life Sci.**, v. 69, n. 4, p. 369-381, June 2001.

NOGUEIRA, A. M. C. **Efeitos da L-alanil-glutamina na isquemia e reperfusão em cérebro de ratos wista**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. Ceará. 2009.

O'NEILL, L. A.; KALTSCHMIDT, C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. **Trends Neurosci.**, v. 20, n. 6, p. 252-258, 1997.

OLFIH, Z.; KOMOLY, S.; NAGASHIMA, N.; JO, F.; RAPP, U. R.; ANDERSON, W. B. Cerebral ischemia induces transient intracellular redistribution and intranuclear translocation of the raf proto-oncogene product in hippocampal pyramidal cell. **Exp. Brain Res.** v.84, n.2, p.403-410, 1991.

OLIVEIRA, A. P.R. **Avaliação Clínico-comportamental e histopatológica do encéfalo de Gerbils submetidos à isquemia Cerebral experimental induzida por oclusão permanente da artéria carótida**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Franca, São Paulo, 2005.

OLIVEIRA, E. M.; RAMIRES, P. R.; LANCH JR, A. H. nutrição e bioquímica do exercício. **Rev. Paul. Educ. Fis.**, v. 18, n. esp., p. 7-19, ago. 2004.

OLNEY, J. W. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, v.164, n. 3880, p. 719-721, 1969.

OLNEY, J. W. Kainic acid and other excitotoxins: a comparative analysis. Adv. Biochem. **Psychopharmacology**, v.27, p.375-384, 1981.

OLNEY, J. W.; HO, O.L. Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. **Nature** v. 227, n. 5258, p.609-611, 1970.

PANDYA, J. D.; SULLIVAN, P. G.; PETTIGREW, L. C. Focal cerebral ischemia and mitochondrial dysfunction in the TNF α – transgenic rat. **Brain Research.**, v. 1384, p.151-160, 2011.

PANG, C. Y.; YANG, R. Z.; ZHONG, A.; XU, N.; BOYD, B.; FORREST, C. R. Acute ischemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. **Cardiovasc. Res.**, v.29, n. 6, p. 782-788, 1995.

PERROTA, V.; SHINAIDER, A. Radicais livres de oxigênio: importância na fisiopatologia das lesões isquêmicas viscerais. **Acad. Med.**, v.152, n.1, p.22-27, 1992.

PIRES, V.L. S. **Pré-Condicionamento com L-Alanil-Glutamina na Lesão Aguda de Isquemia e Reperfusão Cerebral em Gerbils**. 2010. 163 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

PLASCHKE, K.; SOMMER, C.; SCHROECH, H.; MATEJIC, D.; KIESSLING, M.; MARTIN, E.; WEIGAND, M.A.; BARDENHEUER, H. J. A mouse model of cerebral oligemia: relation to brain histopathology, cerebral blood flow, and energy state. **Exp. Brain Res.**, v.162, n.3, p.324-331, 2005.

POLI FIGUEIREDO, L. F.; CRUZ JR, R. J.; MORSCH, R. D. Desvascularização e reperfusão no trauma vascular. In: ROSSI, M. **Trauma vascular**. 1. ed. Rio de Janeiro: Revinter, p.628-633, 2005.

RIEDEMANN, N.; WARD, P. A. Complement in ischemia e reperfusion injury. **Am. J. Pathol.**, v. 162, n. 2, p.363-367, 2003.

RYTER, S. W.; TYRREL, R. M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Hemeoxygenase has both pro- and antioxidant properties. **Free Radic Biol Med.**, v. 15, n. 2, p. 289-309; 2000.

RODWELL, V. W. Biosíntese de aminoácidos nutricionalmente não essenciais. In: MURRAY, R. K. et al. **Harper: Bioquímica**. 8.ed. São Paulo: Ateneu, 1998.

ROGERO, M. M.; TIRAPGUI, J.; PEDROSA, R. G.; CASTRO, I. A. de; PIRES, I. S. de O.; OLIVEIRA, A. A. M.; SALGADO, M. M.; PINTO, A. R.; UEDA, M. Efeito da suplementação com L-Alanil-L-Glutamina sobre a resposta de hipersensibilidade do tipo tardio em ratos submetidos ao treinamento intenso. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v.38, n. 4, p.487-497, Dez. 2002.

ROJAS, H.; RITTER, C.; PIZZOL, F. D. Mecanismo de disfunção da barreira hematoencefálica no paciente criticamente enfermo: ênfase no papel das metaloproteínas de matriz. **Rev. Bras. Ter. Intensiva**, v. 23, n. 2, p. 222-227, 2011.

ROVERAN, V. **Expressão local do Fator de necrose Tumoral alfa (TNFalfa) na ruptura prematura de membranas**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa, São Paulo, 2008.

SASTRY, P.S.; RAO, K.S. Apoptosis and the nervous system. **J. Neurochem.**, v.74, n. 1, p.1-20, 2000.

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

SHONO, T.; ONO, M.; IZUMI, H.; JIMI, S. I.; MATSUSHIMA, K.; OKAMOTO, T.; KOHNO, K. ; KUWANO, M. Involvement of the transcription fator NF-kappaB in tubular morphogenesis of human microvascular endothelial cells by oxidative stress. **Mol Cell Biol.**, v.16, p. 4231-4239, 1996.

SILVA, J.C.C. B.; BURIHAN, E. Diagnóstico clínico da isquemia crítica dos membros. **Rev. Bras.Clin. Ter.**, v. 25, n. 2, p. 71-79, 1999. E proteína –C reativa (PCR) na síndrome coronariana aguda sem supradesnivelamento do ST em pacientes com diabetes tipo 2. **ArqBrasCardiol.**, v. 90, n. 2, p. 94-99, 2008.

SOUZA, J. R. M.; OLIVEIRA, R. T.; BLOTTA, M. H. S. L.; COELHO, O. R. Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6), interleucina-18 (IL-18)

STEVENS, A.; LOWE, J. Patologia. 2. ed. São Paulo. Manole, 2002.

STOKES, M. Acidente Vascular Cerebral. In: _____. **Neurologia para Fisioterapeutas Cash**. São Paulo: Premier, 2000.

TAKEMOTO, O.; TOMIMOTO, H.; YANAGIHARA, T. Induction of c-fos and c-jun gene products and heat shock protein after brief and prolonged cerebral ischemia in gerbils. **Stroke**, v. 26, n. 9, p.1639-1648, 1995.

TARDINI, D.M.S.; YOSHIDA, W. B. Lesões cerebrais decorrentes da isquemia e reperfusão na cirurgia de endarterectomia de carótida. **J. Vasc. Bras.**, v.2, n. 2, p. 119-128, 2003.

TARDINI, D.M. S.; YOSHIDA, W. B.; NOVELLI, E. L. B.; SEQUEIRA, J. L. Avaliação de dois modelos experimentais de isquemia e reperfusão cerebral em ratos com oclusão temporária carotídea associada ou não à oclusão vertebral. **Acta Cir. Bras.**, v.18, n.6, p. 514-517, 2003.

TERENT, A.; MARKE, L-A.; ASPLUND, K.; NORRVING, B.; JONSSON, E.; WESTER, P-O. Costs of Stroke in Sweden. A National Perspective. **Stroke**, v. 25, n. 12, p. 2363-2369, 1994

THIERFELDER, H.; SHERWIN, C.P. apud FÜRST, P.; STEHLE, P. **Nutrição parenteral**: dipeptiven (alanil-glutamina a 2020 IV). [s.l]: Fresenius-Kabi, [s.d]. Monografia Científica.

TOPCUOGLU, M. A.; DEMIRKAYA, S. Low plasma antioxidant activity is associated with high lesion volume and neurological impairment in stroke. **Stroke**, v.31, n. 9, p.33-39, 2000.

VALEN, G.; YAN, Z.; HANSSON, G. K. Nuclear Factor Kappa-B and the heart. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 38, n. 2, p. 307-14, 2001.

VALENÇA, S. S.; PORTO, L. C. Estudo imunohistoquímico do remodelamento pulmonar em camundongos expostos à fumaça de cigarro. **J. Bras.Pneumol.**, v. 34, n. 10, p. 787-795, 2008.

WALKER, D. M.; YELLON, D. M.; Ischaemic preconditioning: from mechanisms to exploitation. **Cardiovasc.Res.**, v. 26, n. 8, p. 734-739, 1992.

WEIGAND, M. A.; LAIPPLE, A.; PLASCHKE, K.; ECKSTEIN, H. H.; MARTIN, E.; BARDENHEUER, F. H. Concentration changes of malondialdehyde across the cerebral vascular bed and shedding of L-selectin during carotid end arterectomy. **Stroke**, v.30, n. 24, p.306-311, 1999.

XIAO, W. Advances in NF- κ B signaling transduction and transcription. **Cell. Mol. Immunol.**, v.1, n. 6, p. 425-433, 2004.

YASUHARA, M. L-glutamine-induced hemeoxygenase – 1 Protects Small Intestine from warm ischemia and reperfusion injury in the rat. **Hokkaido J Med Sci.**, v. 76, n. 1, p. 21-34, 2001.

YELLON, D.M.; BAXTER, G. F.; DORADO, D. G.; HEUSCH, G.; SUMERAY, M. S. Ischaemic preconditioning: present and future directions. **Cardiovasc.Res.**, v. 37, n. 1, p. 21-33, 1998.

YUDKOLFF, M. Brain metabolism of branched – chain amino acids. **Glia**, v.21, n. 1, p. 92, 1997.

APÊNDICE

APÊNDICE – DADOS BRUTOS

		SSI		SIR		Diferença	Sig
		Media	DP	Media	DP		
TNF	T0	149,8	118,2	30,3	36,0	119,500	1,000
	T30	214,0	17,3	333,0	395,6	-119,000	,999
	T60 *	263,8	42,9	1015,5	102,8	-751.750*	,000
		SSI		SIR		Diferença	Sig
		Media	DP	Media	DP		
NFKB	T0	505,0	114,9	463,0	535,0	42,000	1,000
	T30 *	238,3	218,4	1234,8	144,9	-996.500*	,000
	T60 *	586,5	141,2	1286,3	85,0	-699.750*	,000
		SSI		SIR		Diferença	Sig
		Media	DP	Media	DP		
IL6	T0	686,3	112,2	311,0	246,5	375,250	,523
	T30	562,5	112,7	536,3	119,8	26,250	1,000
	T60	206,8	248,3	316,0	365,4	-109,250	,999
		SSI		SIR		Diferença	Sig
		Media	DP	Media	DP		
HEM	T0	33,5	11,2	32,5	9,7	1,000	1,000
	T30	25,8	3,9	11,3	13,0	14,500	1,000
	T60	18,5	7,6	9,8	13,7	8,750	1,000

SIR x GIR							
		SIR		GIR		Diferença	Sig
		Media	DP	Media	DP		
TNF	T0	30,3	36,0	3,5	7,0	26,750	1,000
	T30	333,0	395,6	3,5	7,0	329,500	,503
	T60 *	1015,5	102,8	3,5	7,0	1012.000*	,000
		SIR		GIR		Diferença	Sig
		Media	DP	Media	DP		
NFKB	T0	463,0	535,0	450,3	523,8	12,750	1,000
	T30 *	1234,8	144,9	247,5	495,0	987.250*	,000
	T60 *	1286,3	85,0	217,8	435,5	1068.500*	,000
		SIR		GIR		Diferença	Sig
		Media	DP	Media	DP		
IL6	T0	311,0	246,5	14,8	29,5	296,250	,817
	T30 *	536,3	119,8	9,0	18,0	527.250*	,033
	T60	316,0	365,4	28,5	57,0	287,500	,591
		SIR		GIR		Diferença	Sig
		Media	DP	Media	DP		
HEM	T0	32,5	9,7	0,0	0,0	32,500	1,000
	T30	11,3	13,0	6,8	13,5	4,500	1,000
	T60	9,8	13,7	7,5	15,0	2,250	1,000

ANEXO

ANEXO A- PARECER COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA

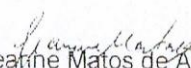
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA
Rua Coronel Nunes do Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 80430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366-8331 Fax (85) 3366-8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 127/07, sobre o projeto intitulado: "ESTUDO DA ATIVIDADE CITOPROTETORA CEREBRAL DA L-ALANIL-GLUTAMINA NA LESÃO DE ISQUEMIA REPERFUSÃO EM GERBIL". de responsabilidade de Vilma Leite de Sousa Pires, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal CEPA em reunião realizada em 12 de fevereiro de 2008.

Fortaleza, 15 de fevereiro 2008


Prof. Dra. Geanine Matos de Andrade Cunha
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA

10/09/08