



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

EDUARDO BACELAR ALMEIDA

**PÓS-CONDICIONAMENTO COM L- ALANIL-GLUTAMINA NA ISQUEMIA E
REPERFUSÃO CEREBRAL EM RATOS**

FORTALEZA

2016

EDUARDO BACELAR ALMEIDA

**EFEITOS DO PÓS-CONDICIONAMENTO COM L- ALANIL-GLUTAMINA NA
ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico Cirúrgicas, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Médico Cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

Co-orientador: Prof. Dr. Marcio Wilker Soares Campelo

FORTALEZA

2016

A446p Almeida, Eduardo.
Pós-condicionamento com L- Alanil-Glutamina na isquemia e reperfusão cerebral em ratos / Eduardo Almeida. – 2017.
72 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Fortaleza, 2017.

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

Coorientação: Prof. Dr. Marcio Wilker Soares Campelo.

1. Isquemia cerebral. 2. L-alanil-glutamina. 3. MALDI-TOF. 4. lipidômica. I. Título.

CDD 617

EDUARDO BACELAR ALMEIDA

**EFEITOS DO PÓS-CONDICIONAMENTO COM L- ALANIL-GLUTAMINA NA
ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico Cirúrgicas, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Médico Cirúrgicas.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Márcio Wilker Soares Campelo
(Co – orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Aline Maria Araújo Martins
Universidade de Brasília (UNB)

A Deus.

Aos meus pais Gilmário Holanda Almeida e Lúcia de Fátima Bacelar Almeida, pelo modelo ético e profissional, além da dedicação, carinho e amparo incondicionais.

Aos meus irmãos Alexandre Bacelar Almeida e Raquel Bacelar Almeida, colegas de profissão e parceiros nos bons e maus momentos.

A minha companheira Taíse Araújo Lopes pela cumplicidade, carinho e paciência. Obrigado por me ajudar a tornar a vida mais leve. Amo você.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS**, doutor em medicina pela universidade de Oxford (Inglaterra), professor titular do departamento de cirurgia da universidade federal do Ceará (UFC). Agradeço inicialmente a receptividade, abrindo as portas para meu retorno a Fortaleza com a possibilidade desta pesquisa. Como orientador se mostrou disponível, tranquilo na resolução dos problemas e criativo para lidar com imprevistos. Fico agradecido pela confiança, oportunidade de aprendizado e respeito com o qual sempre fui tratado.

Ao Prof. Dr. **MÁRCIO WILKER SOARES CAMPELO**, doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas pela Universidade Federal do Ceará (UFC), médico, cirurgião vascular. Pelo auxílio na realização do experimento, disponibilidade e orientação em todas as etapas desse estudo. Agradeço também aos conselhos e incentivo, mesmo nos momentos mais difíceis.

A Prof. Dra. **ALINE MARIA ARAÚJO MARTINS**, Doutorado em Biotecnologia. Rede Nordeste de Biotecnologia, RENORBIO, Brasil com período sanduíche em Univerità degli Studi di Siena. Professora da universidade de Brasília (UNB). Pela colaboração imprescindível para a realização desta pesquisa, mostrando-se atenciosa e disponível.

Ao Prof. Dr. **FRANCISCO DE ASSIM GONZAGA GONDIM** e Dr. **PAULO ROBERTO CAVALCANTE DE VASCONCELOS** que gentilmente aceitaram participar da banca de qualificação dessa dissertação pelo tempo e valiosas colaborações.

À PROFESSORA **GERLY ANNE DE CASTRO BRITO**, doutora em Farmacologia (UFC), prof. Titular do departamento de morfologia da Universidade Federal do Ceará, coordenadora do programa de pós-graduação em ciências morfofuncionais, por possibilitar acesso Laboratório de Morfologia (UFC).

Ao aluno de graduação **PAULO VASCONCELOS MAPURUNGA**, Estudante de Medicina pela UFC, bolsista de iniciação científica pelo CNPQ, formado em psicologia pela UFC. Pela participação na realização do trabalho experimental,

sempre disposto a ajudar e proativo na execução do experimento, mesmo quando solicitado aos finais de semana ou ao final do dia.

Ao técnico de laboratório **ADALBERTO NASCIMENTO DE LIMA JÚNIOR**, técnico em histopatologia do laboratório de Morfologia da universidade federal do Ceará (UFC) pela disponibilidade, agilidade e boa vontade no preparo das amostras.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, **Sra. MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA e Sra. MAGDA GOMES FONTENELE**, pela dedicação, compreensão, conselhos e apoio para a resolução dos problemas.

Ao Sr. **BENTO FRANCISCO DE OLIVEIRA**, assistente técnico do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, e a seu filho **TANCREDO** pelo auxílio com os animais utilizados nesse experimento. Sempre solícito e dedicado.

Aos **COLEGAS** do mestrado, pela troca de ideias, apoio e ajuda nas diversas etapas desse estudo e nas disciplinas.

*“Experiência não é o que acontece com um homem;
é o que um homem faz com o que lhe acontece.”*
Aldous Huxley

RESUMO

PÓS-CONDICIONAMENTO COM L- ALANIL-GLUTAMINA NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL EM RATOS. EDUARDO BACELAR ALMEIDA. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico Cirúrgicas, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Médico Cirúrgicas. Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

INTRODUÇÃO E OBJETIVO: Estudos recentes têm mostrado a eficácia da l-alanil-glutamina (Aln-Gln) na proteção de estados de isquemia e reperfusão em diversos órgãos. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação da Aln-Gln no pós condicionamento em lesão de isquemia e reperfusão cerebral em em ratos.

MÉTODO: Amostra de 72 ratos da linhagem Wistar distribuídos em 06 grupos. Cada grupo possuía 12 animais dos quais 6 animais foram coletados os hipocampus para análise de espectrometria de massas e 6 animais amostras para estudo histológico. Destes, 02 grupos realizaram apenas a cervicotomia (**Sham 1h e 24h**); 02 grupos receberam solução salina e a lesão de isquemia e reperfusão (**SS + I/R 1h e 24h**) e 02 grupos receberam L-Alanil-Glutamina e a lesão de isquemia e reperfusão (**GLUT +I/R 1h e 24h**).

RESULTADOS: O exame histológico (H & E) da região CA1 do hipocampo evidenciou um aumento significativo ($p < 0,05$) de neurônios eosinofílicos no grupo solução salina + isquemia e reperfusão (SS+I/R) quando comparado com o grupo controle (SHAM), após 1h ($p = 0,002$) e 24h ($p = 0,01$). Quanto aos grupos SS+I/R e GLUT +I/R, houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da porcentagem de neurônios eosinofílicos nos grupos GLUT + I/R, com 1h ($p = 0,01$) e 24h de reperfusão ($p = 0,001$). Na análise por espectrometrias de massa do hipocampo foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa no perfil de lipídios dos grupos ($p < 0,05$). Foi encontrada diferença significativa na intensidade relativa dos lipídios dos grupos Sham quando comparado ao grupo SS + I/R ($p < 0,05$) e GLUT+I/R comparado ao SS+I/R ($p < 0,05$).

CONCLUSÃO: O pós-condicionamento com l-alanil-glutamina teve efeito neuroprotetor no hipocampo de ratos, indicado pela contagem de neurônios vermelhos. A intensidade relativa e o perfil dos lipídios do hipocampo na análise por espectrometria de massas está alterada em lesões de isquemia e reperfusão e é diversa dos animais pós-condicionados com l-alanil-glutamina.

DESCRITORES: Isquemia cerebral; L-alanil-glutamina; MALDI-TOF; lipidômica

ABSTRACT

POSTCONDITIONING WITH L-ALANYL-GLUTAMINE IN BRAIN ISCHEMIA AND REPERFUSION IN RATS. Eduardo Bacelar Almeida. Submitted to the Graduate Program *Stricto Sensu* in Surgical Medical Sciences, Surgery Department, Faculty of Medicine of the Federal University of Ceará, as a partial requirement to obtain a Master's degree in Surgical Medical Sciences. Advisor: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

INTRODUCTION AND OBJECTIVE: Recent studies have shown the effectiveness of L-alanyl-glutamine (Aln-Gln) in protection of ischemia and reperfusion states in various organs. The aim of this study was to evaluate Aln-Gln post conditioning effects in brain ischemia and reperfusion injury in an experimental model of brain ischemia and reperfusion in rats.

METHODS: A sample of 72 rats (Wistar) was divided into 06 groups. Each group had 12 animals, 6 animals provided hippocampal samples for mass spectrometry analysis and 6 animals samples for histological analysis. 02 groups carried cervicotomy (Sham 1h and 24h); 02 groups received saline and ischemia/ reperfusion injury (SS + I/R 1h and 24h), and 02 groups received L-Alanyl-Glutamine and ischemia/reperfusion injury (GLUT + I/R 1h and 24h).

RESULTS: The histology (H & E) of hippocampal CA1 area revealed a significant increase ($p < 0.05$) of eosinophilic neurons in saline + ischemia and reperfusion group (SS + I/R) compared to the control group (SHAM) after 1 hour ($p = 0.002$) and 24h ($p = 0.01$). When compared (SS + I/R) and (GLUT + I/R) groups a significant decrease ($p < 0.05$) of percentage of eosinophilic neurons was observed in GLUT + I / R, with 1h ($p = 0.01$) and 24 hours of reperfusion ($p = 0.001$). In the hippocampal spectrometry's analysis there was a statistically significant difference between the groups lipid profile ($p < 0.05$). A significant difference in relative intensity of lipids and lipid profile from Sham groups when compared to SS + I/R group ($p < 0.05$) and GLUT+ I/R when compared to SS+ I/R group ($p < 0.05$).

CONCLUSION: The postconditioning with L-alanyl-glutamine had neuroprotective effect in the hippocampus of this experimental model, indicated by the number of red neurons. The relative intensity of the hippocampus lipids in the analysis by mass spectrometry is altered in ischemic and reperfusion injury, and is different from postconditioned animals with L-alanyl-glutamine.

KEY WORDS: cerebral ischemia; L-alanyl-glutamine; MALDI-TOF, lipidomics

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Cascata neurotóxica dos mecanismos envolvidos na isquemia e reperfusão cerebral	17
Figura 2	Mecanismo da geração de radicais livres na lesão I/R	20
Figura 3	Fórmula estrutural da glutamina	24
Figura 4	Destinos e funções da glutamina	25
Figura 5	Foto-micrografia do hipocampo de ratos Wistar	28
Figura 6	Distribuição dos grupos do experimento	35
Figura 7	Escala temporal do grupo Sham 1h	36
Figura 8	Escala temporal do grupo Sham 24 h	36
Figura 9	Escala temporal do grupo SS+ I/R 1h	37
Figura 10	Escala temporal do grupo SS + I/R 24h	37
Figura 11	Escala temporal do grupo GLUT + I/R 1h	37
Figura 12	Escala temporal do grupo GLUT + I/R 24h	38
Figura 13	Dissecação da artéria carótida comum bilateral	39
Figura 14	Artérias carótidas comuns pinçadas	39
Figura 15	Exposição cérebro após craniectomia	40
Figura 16	Cérebro dentro da matriz para cortes	40
Figura 17	Cortes do cérebro com lâminas de platina	41
Figura 18	Imagem dos neurônios eosinofílicos em 2 grupos	42
Figura 19	Fluxo de preparo das amostras para espectrometria de massas	43
Figura 20	Percentual de neurônios eosinófilos entre grupos	46
Figura 21	Distribuição dos lipídios pós análise de variância	47
Figura 22	Intensidade relativa dos lipídios (PLS-DA)	48
Figura 23	Lipídios com maior intensidade relativa grupo SS+ I/R 1h e 24h	49
Figura 24	Lipídios com maior intensidade relativa grupo Sham 1h e 24h	50
Figura 25	Lipídios com maior intensidade relativa grupo GLUT 1h e 24h	51
Tabela 1	Porcentagem de neurônios eosinofílicos comparando todos os grupos do experimento	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Pós - condicionamento	15
1.2	Lesão de isquemia e reperfusão cerebral	16
1.3	Modelos de isquemia/ reperfusão experimental	22
1.4	Glutamina e l- alanil- glutamina	24
1.5	Consequências da lesão de isquemia e reperfusão	27
2	OBJETIVOS	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Aspectos éticos	34
3.2	Amostra.....	34
3.3	Delineamento.....	34
3.4	Distribuição de grupos	35
3.5	Avaliação do dano de isquemia/ reperfusão.....	40
3.6	Análise estatística	44
4	RESULTADOS	45
4.1	Quantificação dos neurônios eosinofílicos da região CA1 do hipocampo .	45
4.2	Espectrometria de massa	46
5	DISCUSSÃO	52
6	CONCLUSÃO	60
7	REFERÊNCIAS	61

ANEXO 1 – Termo comitê de ética animal

1 INTRODUÇÃO

O Acidente Vascular Cerebral (AVC) é uma das principais causas de incapacidade e mortalidade no mundo (GOULART et al., 2010). A doença cerebrovascular atinge 16 milhões a cada ano. Dessas, 6 milhões evoluem com óbito. No Brasil, são registradas cerca de 68 mil mortes por AVC anualmente, fato que gera grande impacto econômico e social (Ministério da Saúde, 2013).

O acidente vascular cerebral se caracteriza pela instalação de um déficit neurológico focal, repentino e não convulsivo, determinado por uma lesão cerebral, secundária a um mecanismo vascular e não traumático. Pode ser secundário à embolia arterial e processos de trombose arterial e/ou venosa, causando isquemia e/ou hemorragia cerebral. O acidente vascular cerebral é comumente classificado em hemorrágico e isquêmico (ROBERTS; COUNSELL, 1998).

O acidente vascular isquêmico é uma das principais causas de isquemia cerebral, sendo uma doença complexa influenciada por aspectos clínicos, genéticos e fatores de risco ligados ao estilo de vida (HOLLIDAY et al., 2015). Isquemia é a perda do suprimento sanguíneo por redução do fluxo arterial de um tecido, em que há comprometimento da oferta de substratos metabólicos, incluindo a glicose (COTRAN et al., 2000).

A isquemia cerebral pode ser resultante de doenças que acometem o leito vascular cerebral que frequentemente envolve as artérias carótidas e ou as artérias do polígono de Willis (GAGLIARDI, 2006; HARUKUNI; BHARDWAJ, 2006). Uma oclusão aguda das artérias cerebrais, não revertida em um curto período de tempo, frequentemente resulta isquemia cerebral com morte celular na região afetada (SHALLER et al, 2004).

Reperusão é o termo utilizado para definir o restabelecimento do fluxo após um período de isquemia (EVORA et al., 1996). Paradoxalmente, a reperusão pode ser tão ou mais danosa que a isquemia para o tecido cerebral, em decorrência da produção de ROS e da cascata imune e inflamatória desencadeada pelo evento (ZHAO et al, 2009; XIE et al, 2013).

O dano celular induzido após perfusão de um órgão isquêmico é denominado lesão de isquemia/reperusão (I/R). Diversos mecanismos encontram-se envolvidos na fisiopatogênese da lesão secundária à isquemia e reperusão. O entendimento

dos mecanismos envolvidos nos danos da I/R é essencial para projetar estratégias terapêuticas e minimizar suas consequências (CHEN, H. J.; LEE; WEI, 1992).

A intensidade da lesão no tecido cerebral é um importante preditor do comprometimento neurológico dos indivíduos acometidos. Diversos estudos têm buscado alternativas terapêuticas que podem atenuar a lesão do tecido cerebral. Dentre essas alternativas pode-se destacar o pós-condicionamento e uso de nutracêuticos como a l-alanil-glutamina. (SHALLER et al, 2004)(ZHOU et al., 2015) (DENG et al., 2015) (DE VASCONCELOS et al., 2015).

1.1 Pós - Condicionamento

Pós-condicionamento consiste em aplicar um estímulo a um organismo que foi submetido a um evento que alterou sua condição inicial. Tem o intuito de propiciar uma maior resiliência, tolerância ou proteção a uma situação adversa subsequente ao evento (PINHEIRO et al., 2011). Quanto a isquemia cerebral, refere-se classicamente a uma ampla gama de estímulos subletais realizados imediatamente ou até 2 dias após o evento isquêmico (*BURDA et al., 2006; VINTEN-JOHANSEN et al., 2005*).

O conceito inicial de pós condicionamento isquêmico foi desenvolvido por Zhao (2003) e consistia em ciclos de oclusões mecânicas e reperfusões breves para o tratamento da isquemia do miocárdio, após a fase de isquemia e antes de se reestabelecer a reperusão permanente (NA et al., 1996; ZHAO, Z. Q. et al., 2003).

Foi demonstrado que o efeito de proteção do pós-condicionamento isquêmico poderia ser tão efetivo quanto do pré-condicionamento isquêmico, no qual uma prévia isquemia, breve e subletal, protege o tecido miocárdico de uma lesão isquêmica de maior gravidade e da subsequente lesão de reperusão (MURRY; JENNINGS; REIMER, 1986); (LEGER et al., 2015; ZHAO, H., 2009). Posteriormente, esse campo de interesse evoluiu para estudos em outros órgãos como cérebro e rins demonstrando bons resultados com pós-condicionamento (LEGER et al., 2015; SUN et al., 2007).

Atualmente o conceito de pós-condicionamento isquêmico evoluiu e engloba diversos estímulos ou gatilhos (ZHAO, H., 2009). Pode ser definido como uma ampla

gama de estímulos subletais realizados imediatamente ou até 2 dias após a isquemia cerebral que pode se dar por interrupções de reperfusão, isquemias breves e aplicação de uma ação farmacológica (BURDA et al., 2006; PIGNATARO et al., 2009; ZHAO, H., 2009).

Embora o pré-condicionamento tenha se mostrado uma abordagem clínica bem-sucedida em determinadas situações, como procedimentos cirúrgicos, sua aplicabilidade clínica é limitada devido a dificuldade em se prever o início da lesão isquêmica. Entretanto, a aplicação de um condicionante pós evento isquêmico é viável, pois o início da reperfusão é mais previsível e o paciente pode estar em monitoramento clínico (ZHAO, Z. Q. et al., 2003) O pós-condicionamento, tanto precoce quanto tardio, tem sido reconhecido como uma estratégia simples e promissora no tratamento do AVC (WU et al., 2015).

1.2 Lesão de isquemia e reperfusão cerebral

1.2.1 Lesão de isquemia

O termo isquemia se refere a restrição do aporte sanguíneo a órgãos e tecidos. A interrupção do fluxo sanguíneo para o cérebro ou parte dele é chamada de isquemia cerebral ou infarto (SAAD et al., 2015). A hipóxia decorrente da interrupção do fluxo sanguíneo pode levar a lesão no tecido cerebral que pode ser confinada a uma região específica ou global (CAMPELO et al., 2012).

Como ocorre em outros eventos traumáticos será suscitada uma resposta orgânica que desencadeará alterações e reações diversas de natureza inflamatória, hormonal e humoral, com a finalidade de reestabelecer o equilíbrio biológico (DE VASCONCELOS et al. 2015; RAHDLE et al., 1996).

Estas mudanças acarretam em lesão ou morte das células mais vulneráveis do sistema nervoso central, primariamente localizadas no hipocampo, especialmente na sub-região CA1 (BUWALDA et al., 1995; DELL'ANNA et al., 1991; HU; PETERSON; CHAO, 1997; JAYALAKSHMI et al., 2007), no córtex cerebral e núcleos basais. Estas áreas estão envolvidas em funções cognitivas como aprendizado e memória, além de funções motoras (CIRULLI et al., 2003; LOIDL et al., 2000).

O estudo da fisiopatologia dos mecanismos envolvidos na lesão neuronal isquêmica e de seu tratamento é imprescindível na formulação de estratégias que reduzam tanto a mortalidade como as sequelas neurológicas do processo patológico (MUNIZ, et al., 2004).

1.2.2 A cascata isquêmica

A privação de oxigênio provocada pelo evento isquêmico dispara uma cascata de eventos bioquímicos que envolve interrupção do metabolismo energético, desequilíbrio acidobásico, acúmulo de espécies oxigênio-reativas e de aminoácidos excitatórios no espaço extracelular, perda do equilíbrio de água celular e início da apoptose/meiose (Figura 1) (ENGIDAWORK et al., 1997; VEXLER; FERRIERO, 2001).

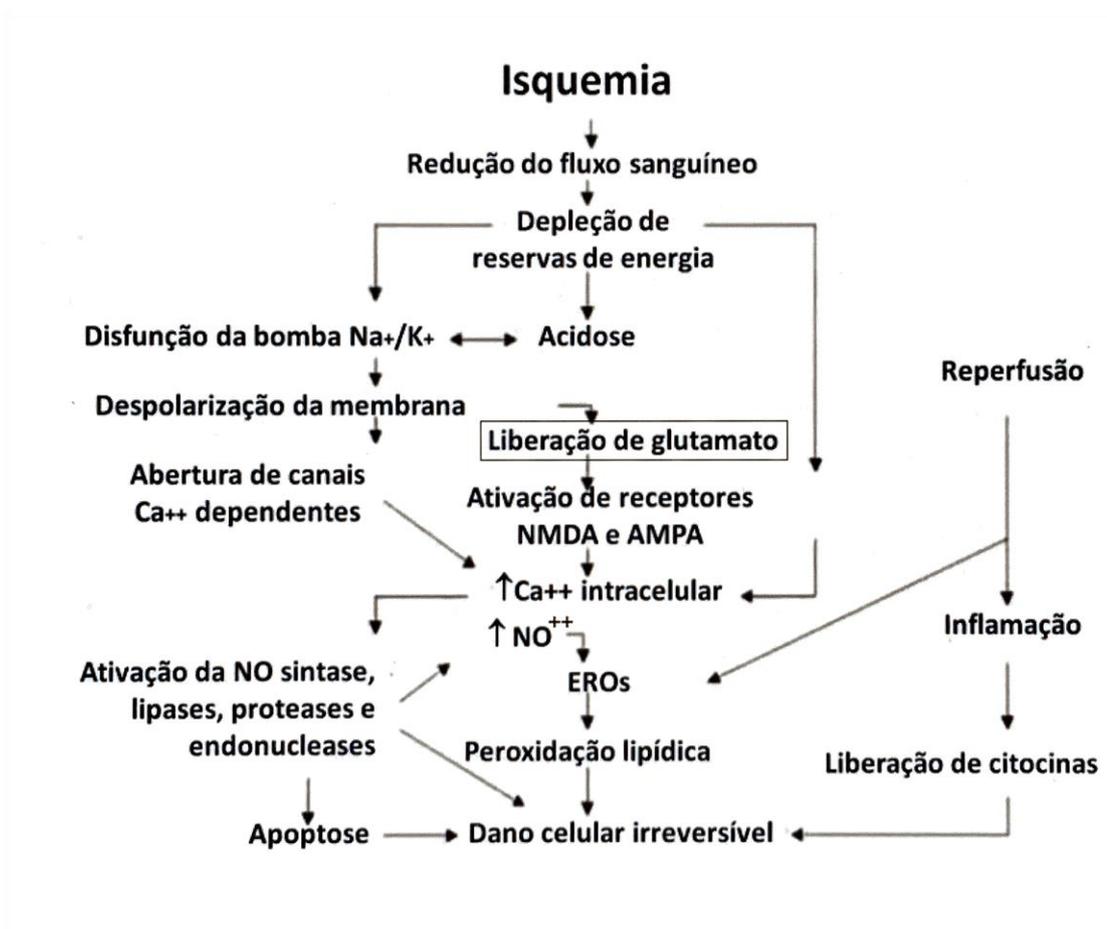


Figura 1 - Cascata neurotóxica simplificada dos mecanismos envolvidos na isquemia e reperfusão cerebral. Adaptado de GILGUN-SHERKI et al. (2002)

Logo após a diminuição de fluxo sanguíneo cerebral, a cascata isquêmica é iniciada. A redução do fluxo sanguíneo cerebral em 20% a 30% abaixo do normal é suficiente para iniciar esses eventos (OHTAKI et al., 2005). O comprometimento permanente irá variar de acordo com a intensidade e duração da isquemia. (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999; LAKHAN; KIRCHGESSNER; HOFER, 2009).

A diminuição da disponibilidade de oxigênio no tecido lesado leva a inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial e a queda da produção de adenosina-trifosfato (ATP). O estoque ATP será degradado em adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP) e, posteriormente, em adenosina, inosina e hipoxantina. O cálcio no citosol provoca a ativação da protease calpáina, que promove a quebra de uma ponte peptídica da enzima xantina desidrogenase (XD), levando a formação da xantina oxidase (XO) que necessita de oxigênio para ser convertida em xantina (TARDINI; YOSHIDA, 2003).

Quatro componentes estruturais e funcionais são particularmente sensíveis à hipóxia decorrente da isquemia: a membrana celular, responsável pelo equilíbrio iônico e osmótico; a síntese de proteínas estruturais e enzimáticas; a respiração aeróbica, responsável pela inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial e produção de adenosina-trifosfato (ATP) e a síntese do aparato de reparo do DNA, relacionada a multiplicação da membrana celular (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2005). A perda da permeabilidade e o desequilíbrio iônico afetam a mitocôndria. Esta pode ser prejudicada pela elevação do cálcio citosólico, estresse oxidativo e degradação de fosfolípidios (CAMPELO et al., 2012).

A falta de energia celular afeta a bomba de sódio e potássio (Na^+ / K^+). Com a falência dessa bomba passa a haver um acúmulo de sódio intracelular e perda de (K^+) para o meio extracelular com posterior edema da célula e organelas. Ocorre simultaneamente um aumento de cálcio (Ca^{2+}) e cloreto (Cl^-) para o meio intracelular (LEGER et al., 2015; LIPTON, 1999; ZHAO, H., 2009). Esse aumento intracelular de cálcio, é considerado um gatilho para diversos processos intracelulares complexos e deletérios, que resultam na ativação de enzimas catabólicas como as fosfolipases (contribuem para a quebra da membrana celular, produção de ácido

araquidônico e formação de radicais livres) e endonucleases (contribuem para fragmentação do DNA e falha energética devido à disfunção mitocondrial)(MITANI et al., 1993).

Concomitante ao aumento de cálcio citosólico, neurônios glutamatérgicos liberam glutamato que inicia um processo de excitotoxicidade. O glutamato ativa receptores ionotrópicos extracelulares excitatórios como N-metil-D-aspartato (NMDA) e α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole (AMPA) e estimula os canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes permitindo mais influxo de Ca^{2+} (OHTAKI et al., 2005;GILGUN-SHERKI et al., 2002; KUNZ; DIRNAGL; MERGENTHALER, 2010)

Secundariamente ao aumento intracelular de cálcio na isquemia há formação de óxido nítrico (NO) a partir da L-arginina pela ação da óxido nítrico sintetase constitutiva (cNOS) que é Ca^{2+} dependente(DAVIES; FULTON; HAGEN, 1995; KLATT et al., 1993; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

A excitotoxicidade pode desencadear eventos moleculares que culminam com apoptose/necrose e/ou a inflamação nas áreas de penumbra cerebral(GILGUN-SHERKI et al., 2002; KUNZ et al., 2010).

Evidências demonstram que os leucócitos também participam das lesões de isquemia e reperfusão cerebral. Supõe-se que durante a isquemia ocorra a ativação de leucócitos que ficam presos na vasculatura cerebral e passam a liberar fatores quimiotáticos para leucotrienos na reperfusão. Além dos leucócitos, as células da glia também são importantes nessas lesões. Acredita-se que essas células podem aumentar a oferta de óxido nítrico contribuindo para a atividade citotóxica cerebral (TARDINI; YOSHIDA, 2003).

Os principais processos que contribuem para o dano neuronal pós-isquêmico envolvem: aumento na concentração de cálcio intracelular, neurotoxicidade mediada por receptores glutamatérgicos, elevação nos níveis de lactato e ácidos graxos livres, o aumento na formação de radicais livres e diminuição da concentração de ATP, culminando com eventos de apoptose/necrose e inflamatórios (CASTRO et al., 2014).

1.2.3 Lesão de reperfusão

A reperfusão é definida como o retorno do fluxo de sangue oxigenado aos tecidos previamente desprovidos de oxigênio. É fundamental para o retorno do metabolismo aeróbio (HALLIWELL et al., 1992).

A reperfusão tem consequências benéficas como retorno da disponibilidade de energia e remoção de metabólitos tóxicos, entretanto pode acarretar efeitos metabólicos sistêmicos devido ao retorno de sangue com PH ácido e rico em potássio para a circulação sistêmica. A reperfusão pode ocorrer de maneira incompleta fenômeno conhecido como “não refluxo”. Esse fenômeno é dependente do tempo de isquemia e pode estar relacionado ao edema intersticial, auto regulação inapropriada do fluxo sanguíneo ou lesão endotelial (EVORA et al., 1996).

Na reperfusão, o ácido araquidônico acumulado durante a isquemia sofre metabolização pelas vias da lipoxigenase e cicloxigenase, formando tramboxanos, prostaglandinas e superóxido (TARDINI; YOSHIDA, 2003). A hipoxantina necessita de oxigênio para ser oxidada e com a reperfusão está é transformada em xantina e posteriormente em ácido úrico originando um ânion superóxido (KONTOS et al., 2001) (Figura 2).

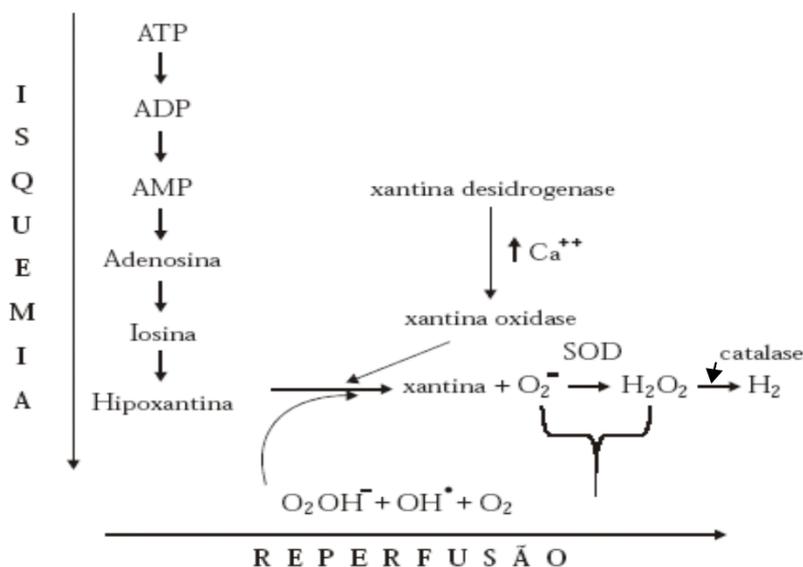


FIGURA 2 - Mecanismo proposto para geração de radicais livres de oxigênio após períodos de isquemia e reperfusão. SOD: superóxido dismutase.

Fonte: CAMPOS & YOSHIDA (2004)

A produção do ânion superóxido, um radical livre, pode ter diversas origens: a via da cicloxigenase, oxidação de pequenas moléculas de hemoglobina e mioglobina, de componentes mitocondriais e ácidos graxos insaturados. O superóxido é um oxidante fraco, mas em função dos subprodutos de sua redução como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical peroxila ($-HO_2$) e o radical hidroxila ($-OH$) tem ação tóxica. São as chamadas espécies reativas a oxigênio (EROS) (TARDINI; YOSHIDA, 2003).

Sabe-se que, após eventos de isquemia e reperfusão, o aumento de substâncias pró-oxidantes pode causar dano neuronal agindo em macromoléculas como proteínas, lipídios e DNA. Conseqüentemente, poderá interferir indiretamente nas vias de sinalização celular ou expressão gênica. (PIRES et al., 2011).

Durante eventos de isquemia e reperfusão, em cérebro de ratos, observa-se a presença de fatores com propriedades neurotrópicas, neuroprotetoras, além de mediadores neuroinflamatórios (WAINWRIGHT et al., 2007). *Neste contexto, os astrócitos promovem uma barreira à desordem iônica causada pela isquemia e reperfusão, além de removerem neurotransmissores excitatórios que podem ativar receptores NMDA (durante eventos de isquemia e reperfusão). Dessa forma, há um aumento de influxo de Ca^{2+} , ativação da óxido nítrico sintase neuronal (NOS_n) e induzido (NOS_i) que podem aumentar a área de lesão por produzirem radicais livres nitrogenados (BUISSON; PLOTKINE; BOULU, 1992; MODERSCHEIM et al., 2007)*

Radicais livres são espécies moleculares que contém um ou mais elétrons não pareados na camada de valência. Interagem ativamente com outras moléculas como DNA, proteínas e lipídios causando oxidação e lesão celular. Antioxidantes endógenos como superóxido dismutase, glutathiona peroxidase e catalase desempenham um importante papel para a manutenção da baixa concentração de oxidantes e da homeostase do tecido (CHEN, H. et al., 2011).

O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre a produção de radicais livres, com destaque para as Espécies reativas a oxigênio (EROS) e a capacidade de defesa do organismo que busca a redução destas, além da busca do organismo para a manutenção da homeostase (MORO et al., 2005).

Acredita-se que desempenhe um papel central no processo fisiopatológico que ocorre no evento isquêmico e a degeneração neuronal resultante. O estresse oxidativo contribui para a lesão isquêmica através da ativação e geração de

espécies reativas a oxigênio, ativação de leucócitos e dano oxidativo no endotélio com diminuição do óxido nítrico, hiperhomocisteinemia, peroxidação lipídica do plasma e componentes celulares, oxidação dos macrófagos, processo que pode ser exacerbado através de mecanismo de *feedback* positivo (ALEXANDROVA; BOCHEV, 2005)

A reperfusão é contribui para diversas reações enzimáticas, pois após a isquemia ocorre uma produção em excesso de EROS na mitocôndria. A mitocôndria produz ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) sob condições normais. Essa constante produção é controlada pela superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase. Outros antioxidantes como a glutathione, ácido ascórbico e alfa-tocoferol também exercem influência nesse processo (WADA et al., 2006).

Estudos demonstram que os lipídios, particularmente os fosfolipídios, são importantes no funcionamento celular manutenção da estrutura celular e envolvimento em vias de sinalização. Após o tecido adiposo, o tecido cerebral contém a segunda maior concentração de fosfolipídios (20-25%) que corresponde a cerca de 50% do seu peso seco (ADIBHATLA; HATCHER; DEMPSEY, 2006; FAROOQUI; HORROCKS; FAROOQUI, 2000; TRIM et al., 2008).

A membrana neuronal dos fosfolipídios é extremamente afetada pelo estresse oxidativo decorrente das lesões de isquemia, porém ainda carecemos de estudos que demonstrem a distribuição dos lipídios em eventos isquêmicos cerebrais (KOIZUMI et al., 2010). Diante desses dados a identificação dos principais lipídios que expressem as mudanças que ocorrem durante um evento de isquemia e reperfusão, assim como a alteração dos lipídios decorrentes de uma intervenção como, por exemplo, a utilização da l-alanil-glutamina, pode auxiliar no entendimento e redução dos danos cerebrais em eventos isquêmicos (SHANTA et al., 2012).

1.3 Modelos de Isquemia/reperfusão experimental

O uso de modelos animais para explicar os efeitos da isquemia cerebral tem sido frequente nos últimos anos. Estes estudos têm procurado identificar os mecanismos patológicos envolvidos nas lesões de isquemia, reperfusão e morte celular (PIRES et al., 2011).

Nos modelos animais de isquemia e reperfusão testados nos últimos anos o uso de ratos Wistar tem se mostrado uma boa alternativa, pois possui baixo custo, fácil manejo, possibilita homogeneidade de amostras, procedimento cirúrgico

simples, além de similaridade fisiológica e anatômica com outras espécies (MUNIZ et al., 2004; PIRES et al., 2011).

Os modelos de isquemia cerebral podem ser subdivididos em isquemia cerebral global e isquemia cerebral focal (GINSBERG; BUSTO, 1989). O intuito de modelos de isquemia global é reproduzir condições clínicas de isquemia cerebral ocasionadas por acidentes cardiovasculares (TARDINI; YOSHIDA, 2003).

Levine et al (1960) publicou o primeiro modelo que consistia numa oclusão unilateral, no qual realizava ligadura na artéria carótida comum direita de ratos Wistar (LEVINE et al., 1960). No experimento foi evidenciado que o hipocampo era a região mais afetada. Modelos posteriores foram aprimorando a técnica e complementando as análises com monitoramento fisiológico e análise histopatológica (BECKER et al., 1962).

Alguns modelos apresentaram dificuldades na obtenção do evento isquêmico, devido a extensa circulação colateral nestes animais através do polígono de Willis, das anastomoses término-terminais e dos ramos corticais provindos do sistema carotídeo interno e externo (MUNIZ et al, 2004).

Um modelo bastante utilizado consiste na oclusão de 4 vasos, com oclusão reversível das artérias carótidas associada a uma interrupção permanente das artérias vertebrais via eletro cauterização que resulta em uma isquemia de alto dano cerebral (PULSINELLI; BRIERLEY, 1979)

Outro modelo consiste na oclusão de forma isolada de ambas as artérias carótidas (ISLEKEL et al., 1999). Já a oclusão da artéria carótida comum (ACC), bilateralmente, combinada com hipotensão arterial sistêmica pela aplicação de manguito de pressão ao redor do pescoço, desencadeia uma isquemia suficiente para reduzir de forma acentuada o fluxo sanguíneo cerebral (COLLI; SILVA; CARLONI, 1998; ISLEKEL et al., 1999).

Em estudo realizado por Muniz (2004) foi utilizado um modelo experimental de isquemia global reversível do prosencéfalo por oclusão bilateral e simultânea das artérias carótidas comuns (ACCs), sem a necessidade de manobras ou recursos acessórios, em ratos Wistar. Foi constatada uma isquemia global transitória parcial, com repercussão sistêmica, evidenciando a aplicabilidade do mesmo no estudo da fisiopatologia e de recursos terapêuticos na doença cerebrovascular. Posteriormente este modelo foi replicado com boa reprodutibilidade (CAMPELO et al., 2012;

tecidos (LABOW; SOUBA, 2000). Sua biossíntese ocorre a partir do ácido α -cetoglutárico, valina e isoleucina, principalmente no fígado (hepatócitos periportais) no músculo esquelético, nos pulmões e no tecido adiposo (RODWELL, et al., 1998).

A glutamina exerce um papel importante na síntese de precursores de macromoléculas celulares e na geração de energia, sendo substrato para a gliconeogênese. É utilizada como combustível oxidativo por células de intensa atividade mitótica como linfócitos, fibroblastos, enterócitos e células tumorais (NEWSHOLME et al., 2003).

As enzimas glutamina sintetase e glutaminase são responsáveis pela síntese de glutamina a partir do glutamato ou por sua degradação em glutamato, respectivamente. A glutamina sintetase é fundamental para a síntese de glutamina e regulação do metabolismo celular do nitrogênio. Essa enzima tem ampla distribuição no organismo e no cérebro, sendo utilizada na redução da amônia, com consequente desintoxicação e síntese de glutamina para nova síntese de glutamato. A glutaminase catalisa a hidrólise de glutamina em glutamato e íon amônio (CRUZAT; TIRAPEGUI, 2009) (Figura 4).

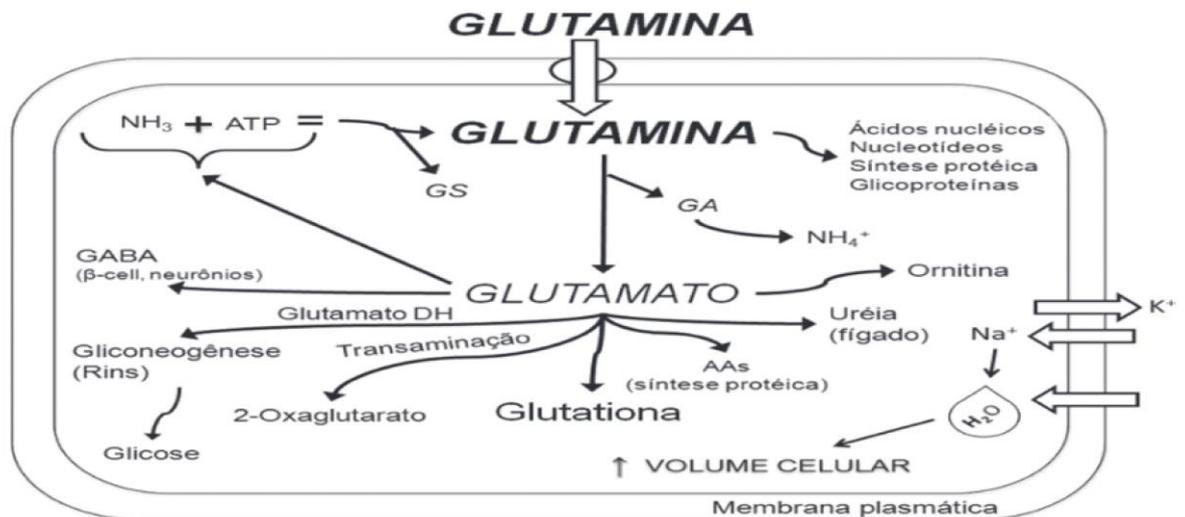


Figura 4 – Destinos e funções da glutamina. A partir da glutamina o glutamato é sintetizado por meio da ação da enzima glutaminase (GA). O glutamato pode ser convertido no ácido γ -amino butírico (GABA), 2-oxaglutarato, glicose, ornitina, uréia, síntese de outros aminoácidos (AAs) ou glutatona. Quando associado a amônia (NH_3) e trifosfato de adenosina (ATP), sob a ação da enzima glutamina sintetase (GS), o glutamato converte-se novamente em glutamina. Outras abreviaturas: NH_4^+ = íon amônio, Na^+ = sódio, K^+ = potássio. Modificado de Newsholme et al. (2003).

Esse aminoácido apresenta diversas funções, tais como: detoxificação da amônia; crescimento e diferenciação celular; regulação da síntese e degradação proteica; fornecimento de energia aos fibroblastos; precursor anabólico no crescimento muscular; regulador renal do equilíbrio acidobásico, substrato para gliconeogênese hepática e renal; precursor de energia para o intestino e células do sistema imune; transportador de nitrogênio entre os órgãos; precursor na síntese de neurotransmissores, como o GABA e o glutamato, ácidos nucléicos e nucleotídeos e síntese da glutathione, principal antioxidante celular (NEWSHOLME et al., 2003; NOVELLI et al. 2007;).

Pelas propriedades da glutamina, acredita-se que uma menor disponibilidade desse aminoácido pode levar ao comprometimento da função imune por alterações na capacidade de proliferação das células envolvidas. Estudos demonstram a importância do metabolismo da glutamina na função de macrófagos, durante reações inflamatórias e imunológicas, através da liberação de citocinas (COSTA ROSA; SAFI; CURI, 1994).

A intensa utilização da glutamina por diversos órgãos e sua marcada diminuição no plasma em situações de estresse tem reforçado a importância desse aminoácido (LEITAO et al., 2011). Entretanto, a glutamina tem solubilidade limitada e elevada instabilidade. Em algumas circunstâncias, o uso do dipeptídeo L- Alanil - Glutamina (Aln-Gln) pode ser uma alternativa para a realização de experimentos. Estudos em voluntários sadios mostraram que Aln-Gln é rapidamente eliminada no plasma e hidrolisada aumentando as concentrações livre de alanina e glutamina (ALVES et al., 2010).

Estudos recentes têm demonstrado a eficácia dessa substância na proteção de estados de isquemia e reperfusão em lesões no intestino, coração, fígado e músculo esquelético (JIA et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2011).

Ao ser administrada a glutamina aumenta a glutathione reduzida (GSH) em relação à glutathione oxidada (GSSH). Esse processo faz com que a subunidade I κ B não seja liberada do NF κ B (fator nuclear κ B). Dessa forma, este não entra no núcleo celular, não aumentando as citocinas inflamatórias dependentes de NF κ B, que podem ser lesivas para a célula (ROTH et al., 2006).

Estudos demonstraram que a glutamina também pode aumentar a expressão

do mRNA para HSP (proteína de choque térmico), em especial HSP 72 e 27 em ratos (WISCHMEYER, 2002).

As HSP podem prevenir a ativação do NF κ B e, conseqüentemente, diminuir a expressão de citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-1, além da expressão da NOS_i.

A infusão de Aln-Gln tem mostrado uma redução no estresse oxidativo e na degeneração neuronal em roedores submetidos a lesões de isquemia e reperfusão (DE VASCONCELOS et al., 2015). O pré-condicionamento com Aln-Gln não alterou a área de morte neuronal após isquemia, mas diminuiu a área de necrose cerebral após isquemia e reperfusão (LOVAT; PREISER, 2003).

Diante das propriedades descritas da L-alanil-glutamina é esperado que com a administração desta substância ocorra como resposta, uma diminuição das lesões causadas pela isquemia e reperfusão e, assim como, menor estresse oxidativo. Além da alteração na transcrição de diversos genes que podem estar envolvidos, tanto no processo inflamatório, como na morte celular programada por meio da síntese de proteínas antioxidantes, além do aumento da HSP e HIF-1-alpha como também a diminuição da NF κ B pela maior oferta de alanil-glutamina, assim como interferir na expressão gênica de mRNA

Além disso, é esperado que um maior aporte de nutrientes e oxigênio para a área submetida à isquemia/reperfusão, possa diminuir o foco de necrose e possibilitar a recuperação do tecido cerebral, levando, possivelmente, a um menor dano neuronal e menor alteração ao exame neurológico após isquemia e reperfusão.

1.5 Consequências da lesão de isquemia e reperfusão

1.5.1 Análise Histológica

A lesão de isquemia cerebral resulta em um padrão histológico previsível, no qual populações específicas de neurônios são afetadas, de acordo com a vulnerabilidade característica (HARUKUNI; BHARDWAJ, 2006). Há várias formas bem caracterizadas de reação patológica dos neurônios, sendo as mais importantes a degeneração neuronal e morte celular e reações associadas com a reparação depois da lesão. A morte neuronal ocorre ou como morte celular programada (apoptose) ou como uma lesão celular aguda ou lentamente progressiva, culminando com necrose (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2005).

O hipocampo é a região mais utilizada para estudar a fisiopatologia da lesão

de isquemia e reperfusão cerebral, devido ao seu arranjo neuronal e sensibilidade a lesão (KIRINO et al., 1982). A anatomia do hipocampo consiste em 2 camadas de neurônios, dobradas uma sobre a outra. Uma camada é denominada giro denteado e a outra corno de Amon. O corno de Amon pode ser subdividido em CA1, CA2 e CA3. Ao analisar o corte histológico pode-se perceber que a região CA1 contém células piramidais convergindo para região dorsal. Quando essas células piramidais ficam maiores forma a região CA2. A transição CA2-CA3 é difícil de ser detectada morfologicamente e a região CA3 se estende até o hilo do giro denteado (FRIED; NOWAK, 1987; SCHMIDT-KASTNER; FREUND, 1991) (Figura 5).

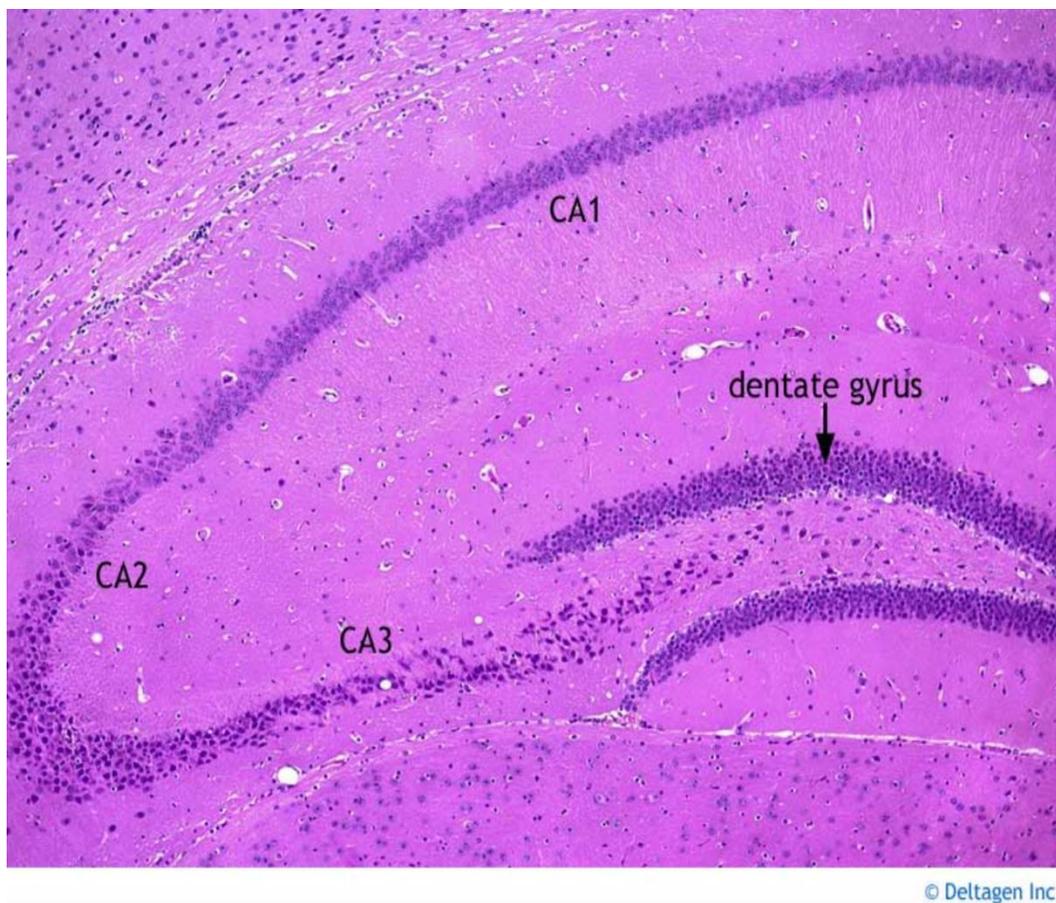


Figura 5 – Fotomicrografia do hipocampo de ratos Wistar. Pode-se observar o giro denteado formado por neurônios granulares. Diferenciação dos neurônios piramidais em CA1-CA3. Aumento de 10x. Fonte: http://www.deltagen.com/target/histologyatlas/atlas_files/nervus/cerebrum/hippocampus_10x.jpg.

Embora a reperfusão promova o reestabelecimento do fluxo sanguíneo,

paradoxalmente pode contribuir para o agravamento da lesão com o aumento de espécies reativas ao oxigênio (EROS), edema celular e desencadear uma cascata imune e inflamatória, pelo influxo de Ca^{2+} e excitabilidade (GILGUN-SHERKI et al., 2002).

A morte celular pode se dar por necrose isquêmica, nas regiões criticamente afetadas, relacionada a perda da homeostase cálcio/glutamato ou por indução de apoptose pela excitotoxicidade, em decorrência de eventos isquêmicos moderados e gradativos a depender da ativação de uma sequência de genes (MERGENTHALER; DIRNAGL; MEISEL, 2004; SCHALLER; GRAF, 2004).

A lesão neuronal aguda, neurônio vermelho ou neurônios eosinofílicos se refere ao espectro de alterações que acompanha a hipóxia isquemia aguda do sistema nervoso central (SNC) ou outros insultos agudos que levam eventualmente a morte da célula. São evidentes nas preparações de hematoxilina / eosina, (HE). As características consistem de encolhimento do corpo celular, picnose do núcleo, desaparecimento do nucléolo e perda da substância de Nissl, com intensa eosinofilia no citoplasma. Frequentemente o núcleo assume a forma angulada do pericárdio encolhido (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2005).

1.5.2 Análises por espectrometria de massas

A investigação de biomarcadores de uma lesão de isquemia e reperfusão através de técnicas de espectrometria de massas, tais como *Matrix Assisted Laser desorption/ionization time of flight mass spectrometer* (MALDI-TOF), pode representar uma boa alternativa no estudo da fisiopatologia e repercussões clínicas de uma lesão de isquemia e reperfusão (CHO et al., 2013).

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica extremamente valiosa em que moléculas de uma amostra são convertidas em íons em fase gasosa, que são subsequentemente separados no espectrômetro de massas de acordo com sua razão massa (m) sobre a carga (z), m/z (JACKSON; WANG; WOODS, 2005).

Técnicas de ionização, como a ionização/ dessorção a laser assistida por matriz (*MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionization*), tornaram possível a determinação precisa de massas de compostos de alto e baixo peso molecular, o que permitiu a aplicabilidade da espectrometria de massas para quase todas as

moléculas biológicas (FRANCK et al., 2010; JARDIN-MATHE et al., 2008).

A técnica de *Matrix Assisted Laser desorption/ionization time of flight* (MALDI-TOF) apresenta várias vantagens em aplicações clínicas como simplicidade, baixo consumo de amostra, aquisição de dados rápida, identificação precisa e alta frequência analítica em métodos de rotina (CHO et al., 2013). O material biológico é misturado a uma matriz, composto orgânico que absorve radiação a laser, que contribui para a ionização das moléculas da amostra (HORTIN, 2006).

As moléculas carregadas são desorvidas para a fase gasosa e atraídas para o analisador de massas onde é determinado a razão m/z dos íons. Os íons de cada amostra são registrados e assim é definido um perfil para cada amostra, que em conjunto podem ser comparados, definindo assim, um perfil para o grupo de amostras. A discriminação dos íons pode ser feita a partir de base de dados ou um manual de interpretação de espectro (CHO et al., 2013; HORTIN, 2006).

As aplicações da técnica incluem visualização e distribuição de diversas moléculas (SHANTA et al., 2012) e descoberta de biomarcadores (LIU et al., 2014; SHETH et al., 2015)

A técnica de MALDI-TOF pode ter diversas aplicações em análises clínicas e pode ser utilizada no diagnóstico baseado em assinaturas no perfil de proteínas/lipídios que complementam a histopatologia, na busca pela detecção precoce de um dado estado fenotípico (FRANCK et al., 2010).

Diversos estudos têm utilizado a espectrometria de massas para avaliar lesões de isquemia e reperfusão cerebral (HAMAZAKI; KIM, 2013; HATTORI et al., 2010; KOIZUMI et al., 2010; LIU et al., 2014; WANG; MA; HATTORI, 2010; XU et al., 2013).

A partir desses estudos tem se traçado um perfil das mudanças na composição dos lipídios no tecido cerebral, nas lesões de isquemia e reperfusão. Essa identificação de fosfolipídios pode ser útil como biomarcador de lesão isquêmica e para a avaliação de fármacos neuroproterores (SHANTA et al., 2012). Outros estudos tem buscado entender por que algumas regiões do tecido cerebral, particularmente do hipocampo, são mais susceptíveis a lesões que outras (HAMAZAKI; KIM, 2013; XU et al., 2013).

O perfil de lipídios modificados pela L-alanil-glutamina também pode ser identificado por espectrometria de massa, fato que correlacionado com outros

marcadores de lesão pode sugerir possíveis efeitos protetores dessa substância (VETYUKOV; KUZIN; KROMMER, 2011).

O tratamento atual da isquemia cerebral não tem mostrado eficácia na totalidade dos casos. Em decorrência disso, vários pesquisadores têm procurado maiores esclarecimentos acerca da sua fisiopatologia, com o objetivo de encontrar um tratamento mais confiável. Diversas drogas que atuam nos vasos cerebrais e no próprio ambiente neuronal têm sido testadas, envolvendo desde a expressão de ácidos nucleicos, proteínas totais (CHEN, H. et al., 2011) receptores de membrana (DENG et al., 2015) mudanças no microambiente intra e extracelular (GIFFARD et al., 2008) e nas proteínas quinases (DE VASCONCELOS et al., 2015). Estudos de pré-condicionamento com Aln-Gln demonstraram diminuição da área de necrose em lesões de isquemia e reperfusão (DE VASCONCELOS et al., 2015; LOVAT; PREISER, 2003).

Pesquisas recentes desenvolvidas na Universidade Federal do Ceara/Faculdade de Medicina/Laboratório de Nutrigenômica demonstram que o pré-condicionamento com L-alanil-glutamina, em ratos submetidos à isquemia e reperfusão cerebral apresenta neuroproteção (confirmado com análise histopatológica) da região do hipocampo, diminui o edema cerebral, ativa proteínas quinase neuroprotetoras (AKT, CREB,) e inibe proteína quinase neurotóxica JNK (cJun) (DE VASCONCELOS et al., 2015).

Entretanto o estudo da utilização da L-Alanil-glutamina, até o presente momento, só foi realizado como pré-condicionamento ao acidente vascular cerebral experimental em ratos, não sendo utilizado em nenhum outro centro de pesquisa na isquemia cerebral no país ou que seja relatado na literatura mundial.

Como o acidente vascular cerebral, na prática médica, não pode ser previsível de forma exata, há necessidade de estudar em modelo experimental, após a indução da isquemia/reperfusão cerebral, ou seja, como pós-condicionamento/tratamento para verificar se o mesmo tem algum efeito no período

de isquemia e após lesão de isquemia/reperfusão em ratos.

A utilização da L-alanil-glutamina no período pós isquemia (tratamento) cerebral em ratos constituirá uma forma inovadora de utilização deste dipeptídeo, com grande potencial de efeito neuroprotetor, sendo potencialmente útil para tratamento da isquemia cerebral.

Esse estudo constitui continuidade de projetos executados com isquemia/reperfusão cerebral bilateral visando a consolidação de uma possível linha de pesquisa, sendo proposto neste projeto continuação do estudos *in vivo* como tratamento da isquemia/reperfusão cerebral em ratos (estudo pré-clínicos), podendo o Brasil ser o pioneiro na utilização do dipeptídeo, desde o seu estudo pré-clínico e até no futuro solicitar autorização para estudos clínicos.

2.Objetivos

Objetivo principal

Estudar os efeitos do pós-condicionamento com l-alanil-glutamina (Aln-Gln) em modelo experimental de isquemia/reperfusão cerebral global em ratos.

Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito pós-condicionante da Aln-Gln na lesão de isquemia/reperfusão cerebral após 1h e 24 h do início de reperfusão sobre a apoptose cerebral na área hipocampal A₁.
2. Investigar alterações lipídicas no hipocampo do cérebro de ratos após isquemia/reperfusão e o efeito do pós-condicionamento com Aln-Gln, utilizando técnica de alta performance analítica como a MS.

3. MÉTODO

3.1 Aspectos éticos

O estudo foi de caráter experimental, com o uso de animais vivos e controle intra-indivíduo, realizado de acordo com as Normas Internacionais para a Pesquisa Biomédica em Animais (1990) e de acordo com a Lei Federal no. 6.638, de 08 de maio de 1979. Foi realizado em animais de laboratório (ratos Wistar), do biotério do Departamento de Cirurgia, Divisão de Cirurgia Experimental, sendo processadas as amostras no laboratório de nutrigenômica (departamento de cirurgia) e no laboratório de morfologia, pertencente à Universidade Federal do Ceará e no ThoMSON laboratório de espectrometria de massas da UNICAMP.

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

O modelo do estudo, assim como a revisão científica, foi avaliado pelo comitê de Ética em Investigação Animal competente da Universidade Federal do Ceará, tendo sido aprovado sob protocolo número 04/2016 em 23 de maio de 2016.

Os animais foram manipulados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os esforços foram realizados no sentido de reduzir o número de animais utilizados.

3.2 Amostra

Amostra de 72 ratos machos da linhagem Wistar (*Ratus norvegicus*, *Rodentia Mammalia*) procedentes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, com peso corporal médio de 250-300mg. Estes animais foram abrigados a 24^o C em ciclos luz/escuro de 12 horas. Foram observados quanto a condições de saúde durante 20 vinte dias e receberam ração padrão e água *ad libitum* no biotério do laboratório de Cirurgia Experimental – LABCEX.

3.3 Delineamento

Estudo experimental, com uso de animais vivos e controle intra-indivíduo.

3.4 Distribuição de grupos

Um total de 72 animais foi distribuído aleatoriamente em 06 grupos. Cada grupo possuía 12 animais dos quais 6 animais foram coletados tecidos hipocâmpais para análise de espectrometria de massas e 6 animais foram coletados tecidos cerebrais em formaldeído para estudo histológico. Sendo, 02 grupos (**Sham 1h e Sham 24h**) realizada apenas a cervicotomia, **grupo Sham (1h)** com sacrifício do animal após 1h do início da reperfusão e **grupo Sham (24h)** com sacrifício do animal após 24h do início da reperfusão; 02 grupos (**SS + I/R 1h e SS + I/R 24h**) administrada solução fisiológica 0,9% após 20 minutos de isquemia, completados 30 minutos de isquemia foram retiradas as pinças e iniciada a reperfusão, **grupo (SS + I/R (1h))** com sacrifício do animal após 1h do início da reperfusão e **grupo (SS + I/R 24h)** com sacrifício do animal após 24h do início da reperfusão e 2 Grupos (**GLUT + I/R 1h e GLUT + I/R 24h**) administrada L-Alanil-Glutamina após 20 minutos de isquemia, ao completar 30 minutos de isquemia foram retiradas as pinças e iniciada a reperfusão **grupo (GLUT + I/R (1h))** com sacrifício do animal após 1h do início da reperfusão e **grupo (GLUT + I/R (24h))** com sacrifício do animal após 24h do início da reperfusão.

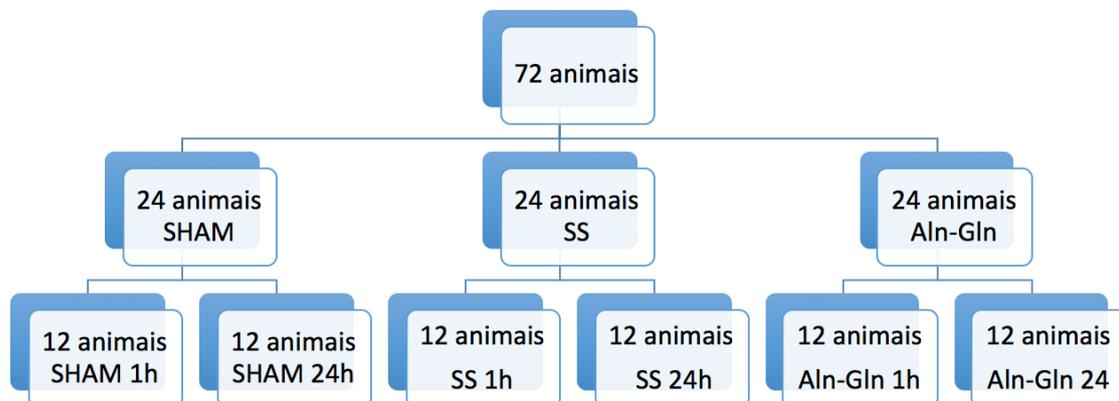


Figura 6 - Distribuição dos grupos do experimento.

3.4.1 Grupos apenas com cervicotomia (Sham)

SF 0,9% - Sham: Foi realizada cervicotomia e após 20 min injetada solução com soro fisiológico 0,9% endovenoso.

Decorridos 30 minutos da cervicotomia foi realizada sutura da incisão inicial com mononylon 4.0, os animais retornaram para a gaiola e foi realizado novo exame neurológico após 1h e 24h. Após o último exame neurológico, os animais foram decapitados (Figuras 7 e 8).

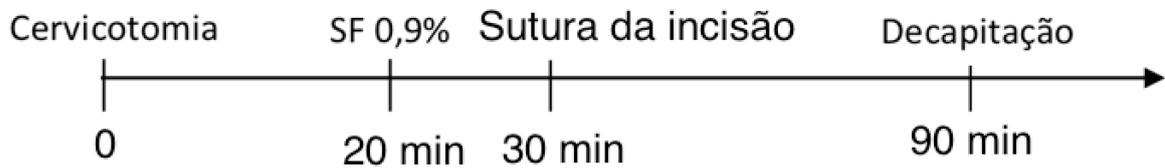


Figura 7 - Escala temporal do grupo Sham (1h)

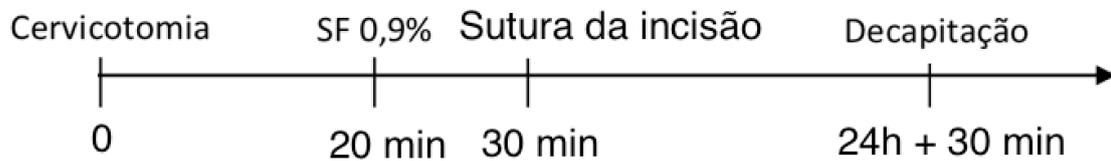


Figura 8 - Escala temporal do grupo Sham (24h)

3.4.2 Grupos com solução salina (SF 0,9%) + isquemia/reperfusão (SS + I/R)

Solução salina (SF 0,9%) + isquemia/reperfusão: Foi realizada cervicotomia e pinçadas as artérias carótidas comuns direita e esquerda, mantendo-as pinçadas por 30 minutos. Após 20 min foi injetada solução com soro fisiológico 0,9% endovenoso.

Decorridos 30 minutos da cervicotomia foram retirados os grampos vasculares e liberado o fluxo cerebral por (I/R 1h) ou 24h (I/R 24h) e, após os tempos estabelecidos de reperfusão, os animais foram submetidos a exame neurológico e, em seguida, sacrificados (Figuras 9 e 10).

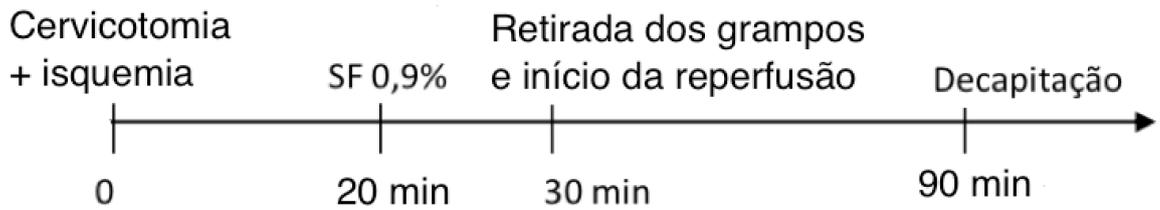


Figura 9 - Escala temporal do grupo SS + I/R (1h)

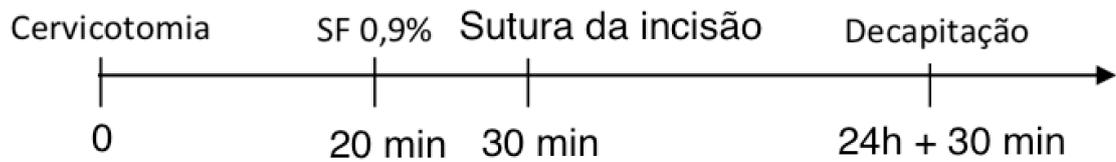


Figura 10 - Escala temporal do grupo SS + I/R (24h)

3.4.3. Grupos com L-Alanil-Glutamina 20% (0,5g/Kg p.c.) e isquemia /reperfusão (GLUT + I/R)

L-alanil-glutamina + isquemia/reperfusão: Foi realizado exame neurológico inicial e estabelecido o escore conforme protocolo já publicado, em seguida realizada cervicotomia e pinçadas as artérias carótidas comuns direita e esquerda, mantendo-as pinçadas por 30 minutos. Após 20 min foi injetada solução com L-Alanil-Glutamina 20% (0,5g/Kg p.c.) endovenoso.

Decorridos 30 minutos da cervicotomia, foram retirados os grampos vasculares e liberado o fluxo cerebral por (I/R 1h) ou 24h (I/R 24h). Após os tempos estabelecidos de reperfusão, os animais foram submetidos a exame neurológico e, em seguida, sacrificados (figuras 11 e 12).

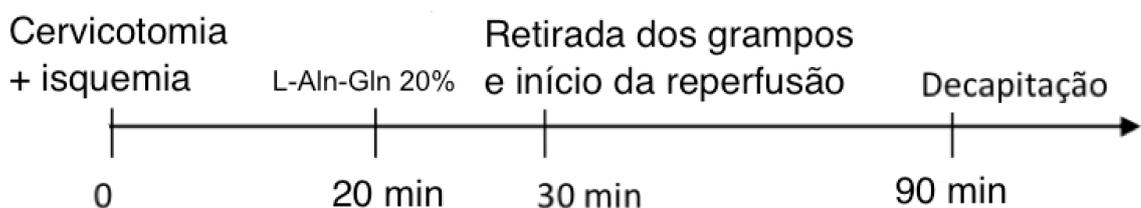


Figura 11 - Escala temporal do grupo GLUT + I/R (1h)

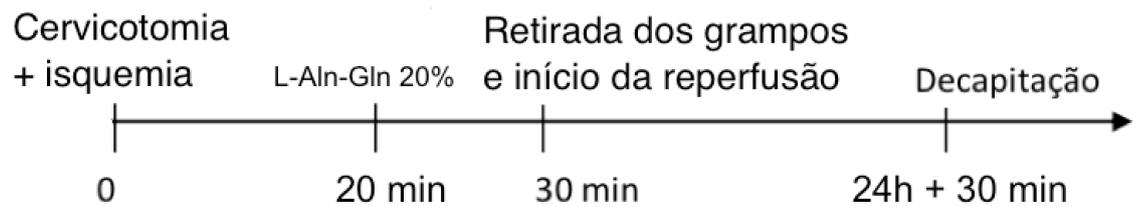


Figura 12 - Escala temporal do grupo GLUT + I/R (24h)

Ato anestésico

Os ratos foram anestesiados através de uma associação de cloridrato de cetamina (90mg/Kg) e cloridrato de xilasina (10mg/Kg) administrada simultaneamente por via intramuscular.

Pós-condicionamento com L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln)

Vinte minutos após início da isquemia, foi administrada solução de L-Ala-Gln 20% (0,75g/kg) intravenosa. Essa dosagem foi baseada em experimentos prévios envolvendo isquemia e reperfusão em pré-condicionamento (VASCONCELOS et al., 2015). O grupo controle recebeu solução salina.

Atos cirúrgicos

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

Após anestesia, foi realizada uma cervicotomia mediana longitudinal anterior com individualização e isolamento bilateral das Artérias Carótidas Comuns (ACCs) a 0,5cm da bifurcação em artérias carótidas externa e interna, conforme descrito por Muniz et al., 2004. Neste procedimento houve um cuidado para não estimular ou lesar os nervos vagos, conforme orientado por Nandagopal et. al, 2011(Figura 13).

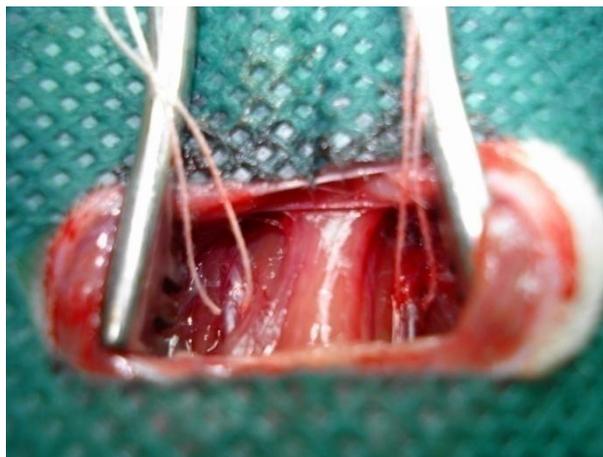


Figura 13 - Dissecção da artéria carótida comum bilateral de rato e isoladas com fio de algodão para colocação das pinças.

Indução da isquemia/reperfusão cerebral

De acordo com as manobras cirúrgico-experimentais previstas para cada grupo, realizou-se oclusão bilateral e simultânea das ACCs com pinças vasculares atraumáticas a 0,5 cm de sua bifurcação (Figura 14).



Figura 14 - Campo cirúrgico evidenciando as artérias carótidas comuns pinçadas com pinças vasculares.

Após a isquemia foi realizada dissecção da artéria femoral esquerda dos animais para que pudesse ser injetada L-alanil-glutamina ou solução salina no vigésimo minuto de isquemia. Nos animais dos grupos Sham foram realizados apenas o isolamento e separação das artérias carótidas comuns bilaterais, sem o pinçamento ou oclusão destas.

Após 30 minutos, foram retiradas, simultaneamente, as pinças das carótidas dos animais, observado o retorno do fluxo sanguíneo pela carótida e verificada a pulsatilidade do vaso visualmente. Em seguida foi realizada a síntese da pele e os

animais distribuídos de acordo com os respectivos grupos.

3.4.4 Morte dos animais e extração do cérebro

De acordo com os tempos propostos em cada subgrupo os animais sofreram craniotomia que levou à morte dos animais pela decapitação. Imediatamente, procedeu-se à craniectomia (abertura da caixa craniana) com delicada extração dos cérebros para análise (figura 15).



Figura 15 – Exposição do cérebro logo após a craniectomia (rato Wistar)

3.5 Avaliação do dano de isquemia/reperfusão

3.5.1 Preparação dos tecidos para exame histológico

Para um grupo de animais, os cérebros foram cuidadosamente removidos da caixa craniana, com o auxílio de uma espátula, e colocados com a sua região ventral voltada, para cima, e a região dorsal para baixo, dentro da matriz cerebral para ratos (*Brain Matrix; Zivic Instruments*®) (Figura 16).

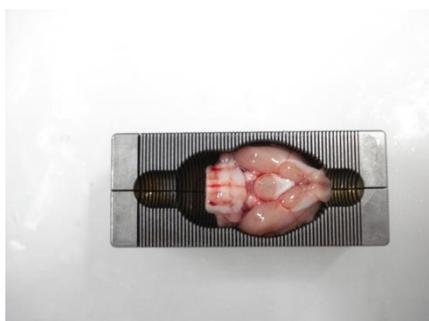


Figura 16: Fotografia do cérebro alocado dentro da matriz para cortes milimetrados do cérebro do animal experimental (rato wistar).

Foram introduzidas lâminas de platina, adquiridas em conjunto com o *Brain matrix - Zivic Instruments*®, cortantes (umedecidas com soro fisiológico), manteve-se a distância de 2 mm entre as lâminas a partir do polo anterior (denominado como ponto zero) até o fim do cérebro. Não foram inclusas as regiões do cerebelo e tronco encefálico.

As lâminas foram retiradas da matriz simultaneamente e em bloco. Cada fatia de tecido cerebral foi retirada individualmente da superfície da lâmina (Figura 17) e colocada em solução de formolína a 10% tamponada com solução para cada análise dos tecidos para histopatologia do hipocampo (Figura 17). Em seguida, sofreram imersão e fixação em formalina por 24 horas antes de serem transferidas para uma solução de etanol a 70%, quando foram processadas, embebidas em parafina, e cortadas para gerar fatias de 5 μ m e montadas em lâminas histológicas.



Figura 17: Fotografia dos cortes do cérebro de rato realizado na matriz com lâminas de platina com intervalo de dois milímetros entre os cortes.

3.5.2 Análise histopatológica do hipocampo

As lâminas coradas com hematoxilina e eosina foram utilizadas para avaliar a extensão da lesão no hipocampo, usando um microscópio (Olympus, X 400). O número de neurônios eosinofílicos na região CA1 foram contados, como descrito por KAKU (1993). O dano neuronal na região CA1 do hipocampo foi expresso como percentual de células eosinofílicas (neurônios vermelhos) em um total de células encontradas em um campo de microscópio com aumento de 200 vezes nessa região do hipocampo.

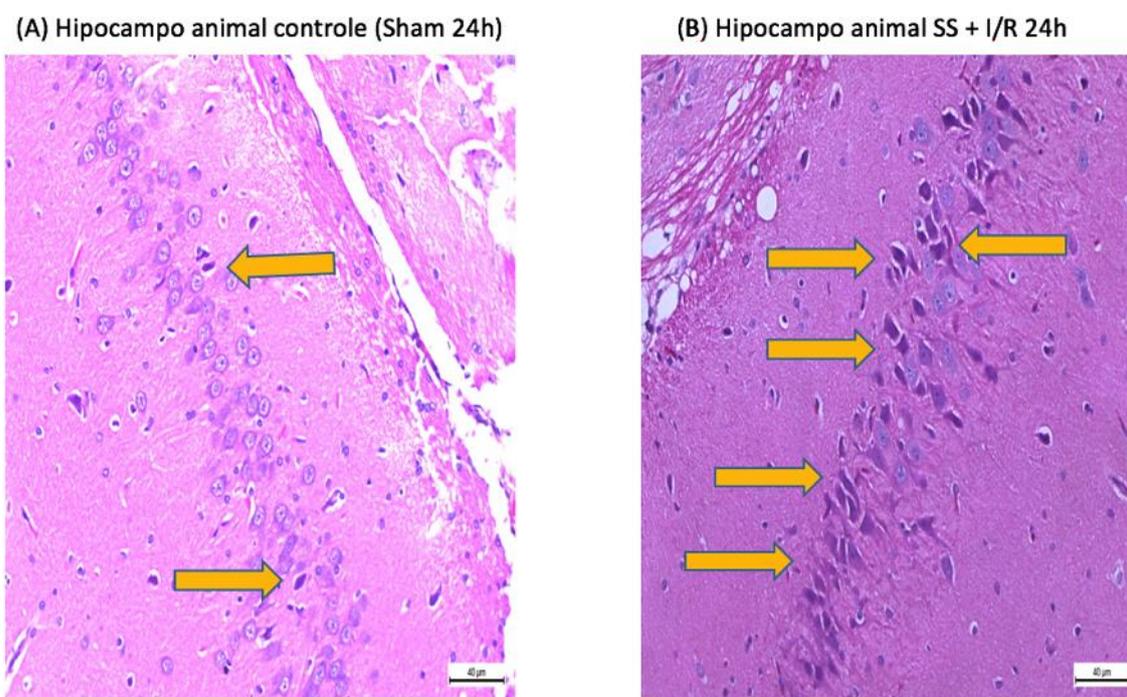


Figura 18. Imagem representativa dos neurônios

3.5.3 Análise por espectrometria de massas

3.5.3.1 Preparo de amostras e extração

De acordo com os tempos de cada subgrupo, todo o tecido hipocampal foi cuidadosamente removido e rapidamente congelado em nitrogênio líquido e estocado a -80°C conforme Campelo et.al, 2012.

O preparo de amostra foi feito com a extração por Bligh-Dyer. O método de extração Bligh-Dyer modificado, emprega a mistura clorofórmio/metanol (2:1) seguido de agitação vórtex por 5 min. A fase inferior, rica em lipídios, foi coletada, diluída e analisada por MALDI-TOF.

3.5.3.2 Análise dos *fingerprinting* de metabólitos por MALDI-MS

Extração de lipídios por Bligh & Dyer: em um microtubo, uma pequena quantidade do tecido foi ressuspensa em aproximadamente 150 μL de água Milli Q. A esta suspensão foram adicionados 190 μL de clorofórmio (grau HPLC) e 375 μL de metanol (grau HPLC). Após 2 minutos no vórtex, foram adicionados 187,5 μL de

clorofórmio (grau HPLC) e 150 μL de água Milli Q. A mistura bifásica foi coletada separadamente. A fase inferior contendo lipídeos em solução de clorofórmio foi transferida para outro microtubo e concentrada para eliminar o solvente (procedimento adaptado de Bligh & Dyer, 1959). A fração metanólica rica em lipídios apolares foi coletada. Ambos os extratos foram armazenados a -20°C . O extrato apolar foi redissolvido em metanol/clorofórmio 2:1 no momento da análise. Para o preparo das placas de MALDI, 1-2 μL da solução do extrato foi depositado em cada poço da placa de MALDI, seguida de secagem em temperatura ambiente. O sobrenadante seco foi recoberto com 1-2 μL de solução de matriz, composta de ácido 2,5-diidroxi-benzóico (DHB) diluído em acetonitrila 50% e de ácido trifluoroacético 2,5% (Figura 19).

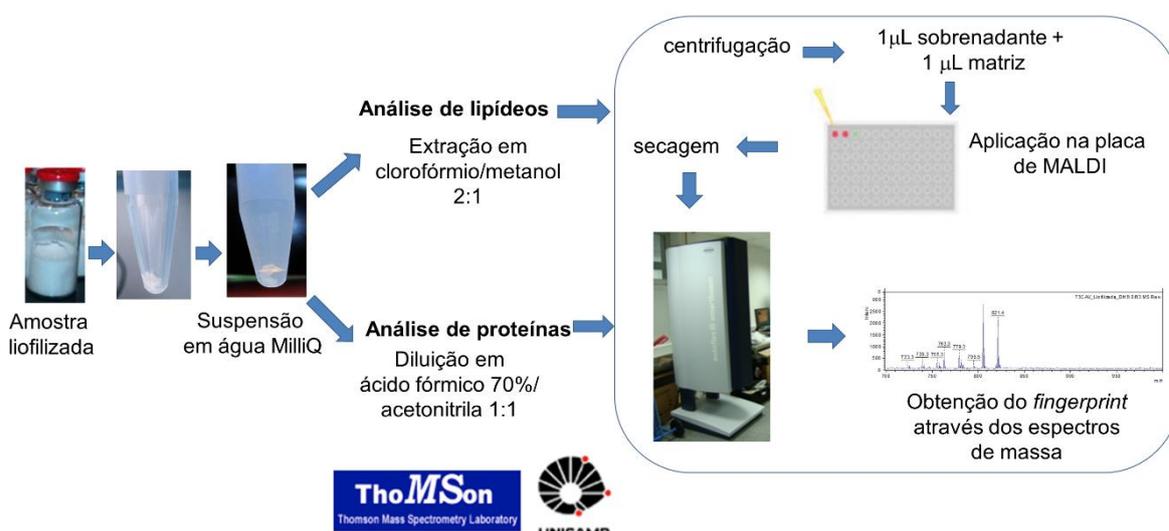


Figura 19: Fluxo de preparo de amostras para o *fingerprinting* de isolados por MALDI-TOF-MS.

3.5.3.4 Processamento dos dados

Após a otimização do método de extração e obtenção dos espectros com alta reprodutibilidade, as amostras analisadas foram comparadas. Assim, a análise estatística multivariada foi realizada por análise de componentes principais (Para tanto, de cada espectro de massas foi gerada uma lista considerando-se os íons de intensidade relativa maior de 20% em cada amostra. As listas das amostras foram organizadas em matrizes de dados e a análise de PCA e HCA através do *software Pirouette 3.11* (Infometrix, Estados Unidos). Este método permitiu representar um conjunto de dados por novas variáveis, que são chamadas de componentes principais (XIA et al, 2009;2011;2013)

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

Para análise multivariada dos dados MALDI-MS, os íons dos lipídios foram obtidos, compilados e processados através do *software FlexAnalysis*. Os íons foram alinhados com a tolerância de massa/carga 0.4 Da para lipídios. A intensidade relativa dos picos dos íons foram normalizadas e pre-processadas para a análise multivariada. A análise de componentes principais (PCA) e a análise parcial de mínimos quadrados (PLS-DA) foram realizadas nos dados usando o *MetaboAnalyst* (software versão 3.0) (XIA & WISHART, 2016) para discriminar as amostras com base em suas impressões digitais MALDI-TOF MS. Para determinar fatores independentes e características relevantes no experimento foram utilizadas a Importância Variável em Projeção (VIP) da análise PSL-DA. Todos os dados foram obtidos a partir de análises não-paramétricas. O *Human Metabolome DataBase - HMDB* (WISHART et al., 2013) e a *Estratégia LIPID Metabolites And Pathways - LIPID MAPS®* (Wellcome Trust) foram utilizados para identificar os lipídios.

4 RESULTADOS

4.1 Quantificação dos neurônios eosinofílicos da região CA1 do hipocampo

O exame histológico (H & E) da região CA1 do hipocampo evidenciou um aumento significativo ($p < 0,05$) de neurônios eosinofílicos no grupo solução salina + isquemia e reperfusão (SS + I/R) quando comparado com o grupo controle (SHAM), tanto na primeira hora de reperfusão (1h) ($p = 0,002$) como na vigésima quarta hora de reperfusão (24h) ($p = 0,01$) (Tabela 1 e Figura 15).

Ao comparar os grupos SS+I/R com os grupos Glutamina + lesão de isquemia e reperfusão (GLUT + I/R), há uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da porcentagem de neurônios eosinofílicos nos grupos GLUT + I/R, isso ocorre tanto na primeira hora de reperfusão (1h) ($p = 0,01$) como na vigésima quarta hora de reperfusão (24h) ($p = 0,001$) (Tabela 1 e Figura 15).

Não houve diferença estatística significativa quando comparados os grupos SHAM com os grupos GLUT + I/R ($p > 0,05$) nem na primeira hora de reperfusão (1h) nem na vigésima quarta hora de reperfusão (24h) (Tabela 1 e Figura 20).

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

	SHAM		SS + I/R		GLUT + I/R	
	1h	24h	1h	24h	1h	24h
Média	9,2	10,6	26,4	35,2	11,6	17
Desvio Padrão	2,28	6,69	1,94	10,89	2,51	6,44

Resultado expresso em média e desvio padrão da média. Abreviaturas: SHAM = grupo controle; SS + I/R = Grupo que sofreu isquemia e reperfusão e pós-condicionamento com solução salina; GLUT + I/R = Grupo que sofreu isquemia e reperfusão e pós-condicionamento com L-Aln-Gln.

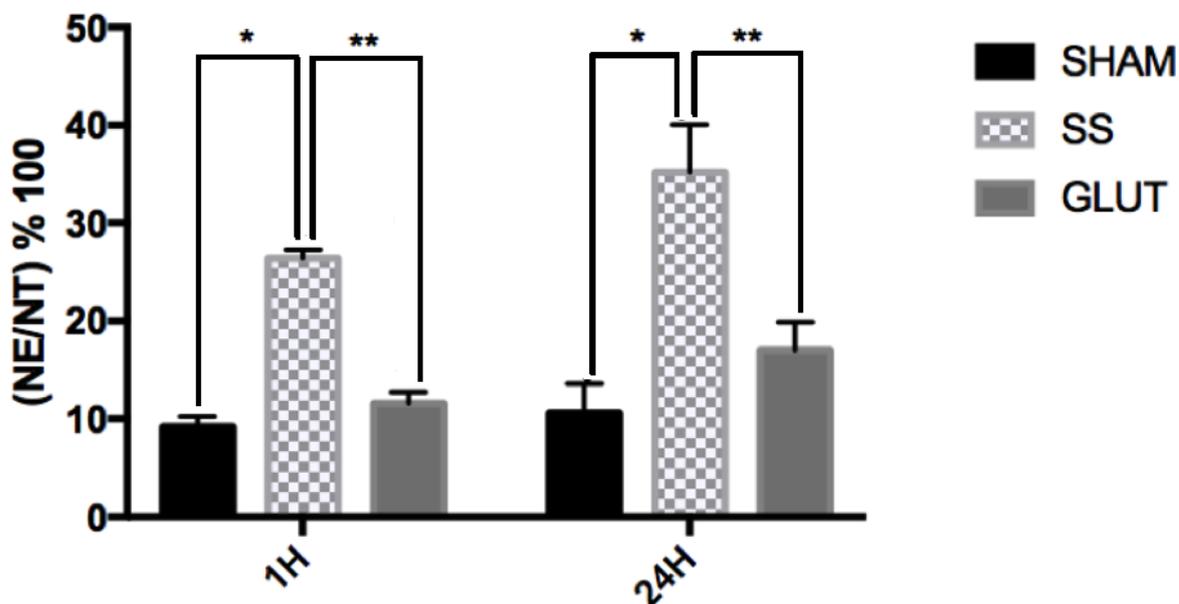


Figura 20: Porcentagem de neurônios eosinofílicos (relação entre número de neurônios eosinofílicos e o número de neurônios totais sendo resultado multiplicado por 100). Resultado foi expresso em média + desvio padrão da média. Teste estatístico: ANOVA two way, seguido do teste de Tukey. Abreviaturas: NE = neurônios eosinofílicos; NT=neurônios totais; SHAM = grupo controle; SS = grupo que sofreu isquemia e reperfusão e pós condicionamento com solução salina. GLUT = grupo que sofreu isquemia e reperfusão e pós condicionamento com L-alanil-glutamina, *1h, $p = 0,0019$; *24h, $P < 0,0001$; **1h, $p = 0,008$; ** 24h, $p = 0,001$.

4.2 Espectrometria de massas

A análise das espectrometrias de massas obtidas do hipocampo dos animais de cada grupo encontrou uma diferença estatisticamente significativa entre os íons massa/ carga do perfil de lipídios dos grupos ($p < 0,05$) após normalização e aplicação do teste ANOVA *one-way*. É possível observar que a massa/carga de alguns lipídios possui maior intensidade relativa em determinadas condições quando comparado a outros. O estudo desses lipídios pode contribuir para a identificação e diferenciação dos cenários após lesão de isquemia e reperfusão, sem lesão e após a intervenção com L-alanil-glutamina. As massas /carga dos lipídios identificados de vermelho são os que apresentam diferenças significativas na totalidade do experimento (Figura 21). Pode-se perceber a diferença de intensidade de determinadas massa/carga de acordo com o fenótipo (Figura 22). Nos grupos que receberam solução salina (SS) + isquemia e reperfusão 1h e 24h, se observa maior

intensidade relativa dos lipídios: 735, 761, 736, 762 e 763 (Figura 23). Nos grupos controle (Sham) 1h e 24h se observa lipídios com massa /carga 799, 773 e 775 com maior intensidade relativa (Figura 24). Já nos grupos que receberam l-alanil-glutamina + lesão de isquemia e reperfusão 1h e 24h , se destacam os lipídios 756, 800, 650,617 e 750 (Figura 25).

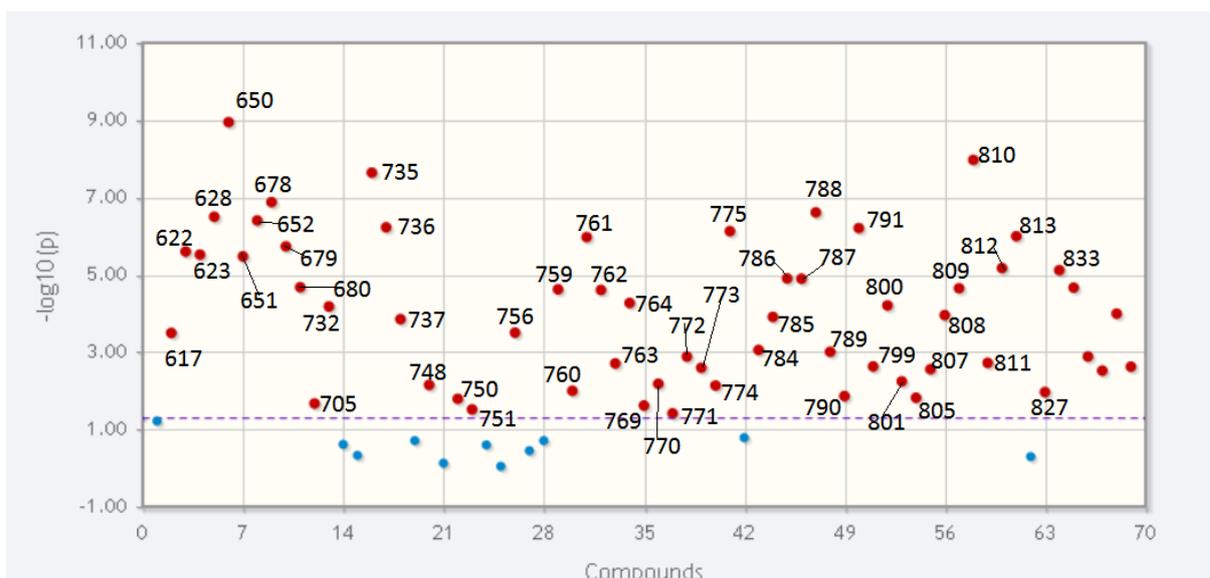


Figura 21 - Imagem da distribuição dos lipídios pós **análise de variância, não paramétrica**. Os números acima indicam os valores massa/carga dos íons. Os pontos vermelhos representam os íons com massa/carga com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

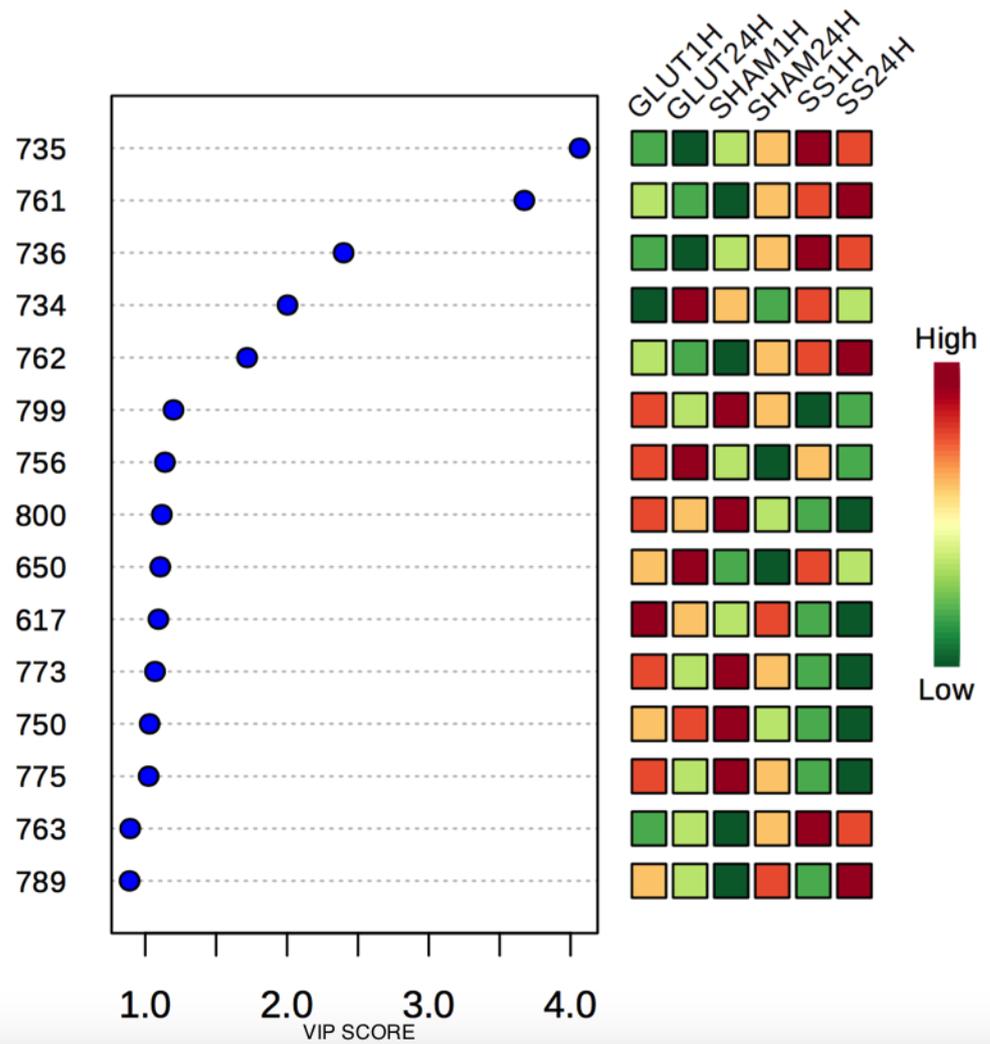


Figura 22 - Características importantes identificadas por *Partial Least Squares - Discriminant Analysis* (PSL-DA). As caixas coloridas na direita indicam as concentrações relativas de cada lipídio correspondente em cada grupo de estudo.

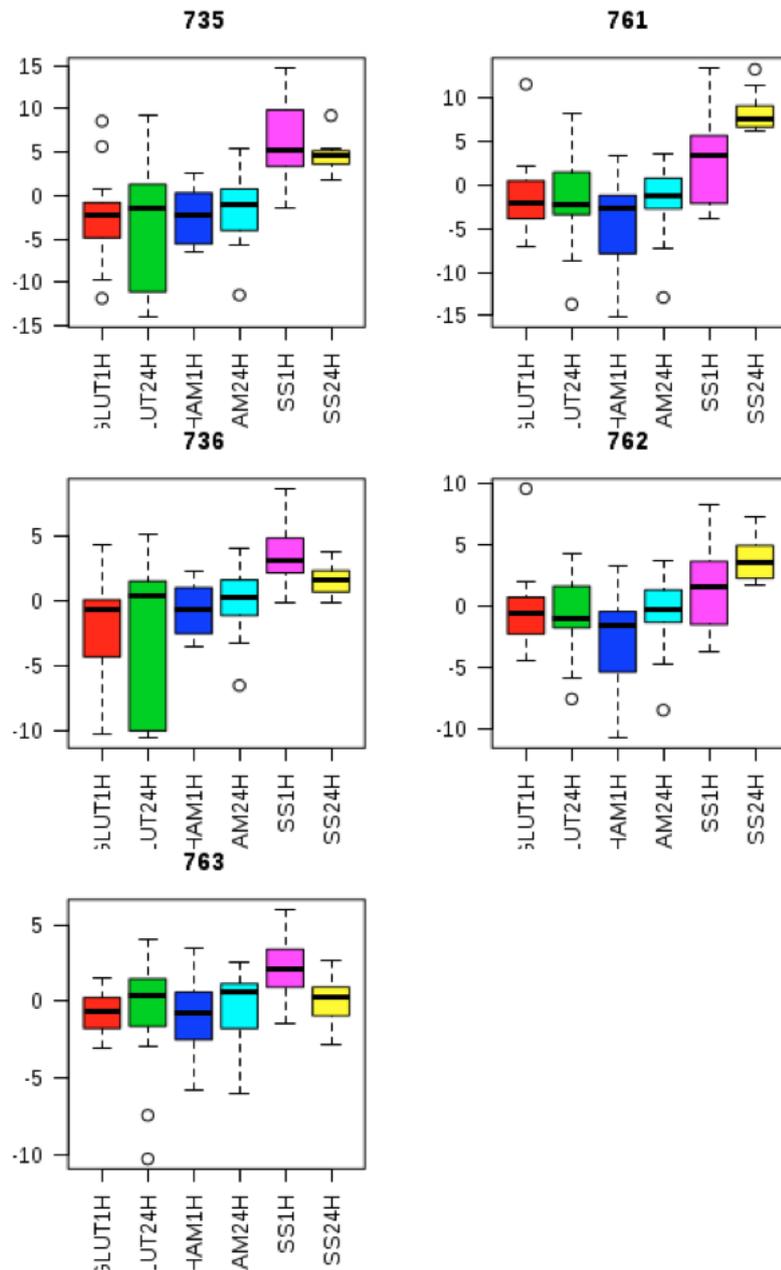


Figura 23 - Lipídios com maior intensidade relativa nos grupos solução salina + lesão de isquemia e reperfusão 1h e 24h. No eixo das abscissas temos os grupos de estudos e no eixo das ordenadas o desvio padrão. Para $^{\circ} p < 0,05$; $^{\circ\circ} p < 0,01$ e $^{\circ\circ\circ} p < 0,001$.

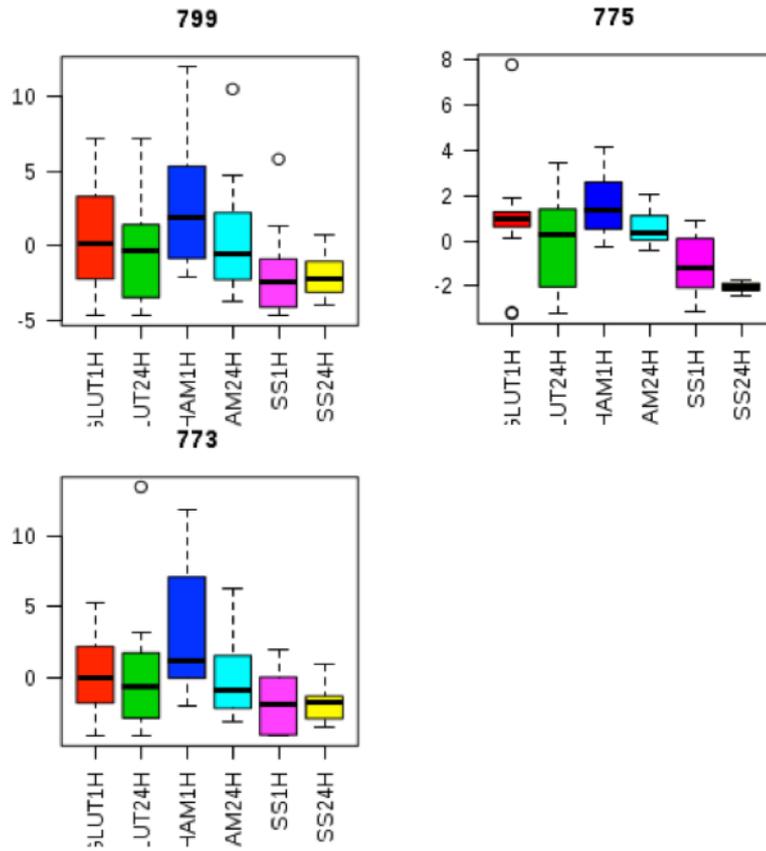


Figura 24 - Lipídios com maior intensidade relativa maior intensidade nos Grupos controle (Sham) 1h e 24h. No eixo das abscissas temos os grupos de estudos e no eixo das ordenadas o desvio padrão. Para $^{\circ} p < 0,05$; $^{\circ\circ} p < 0,01$ e $^{\circ\circ\circ} p < 0,001$.

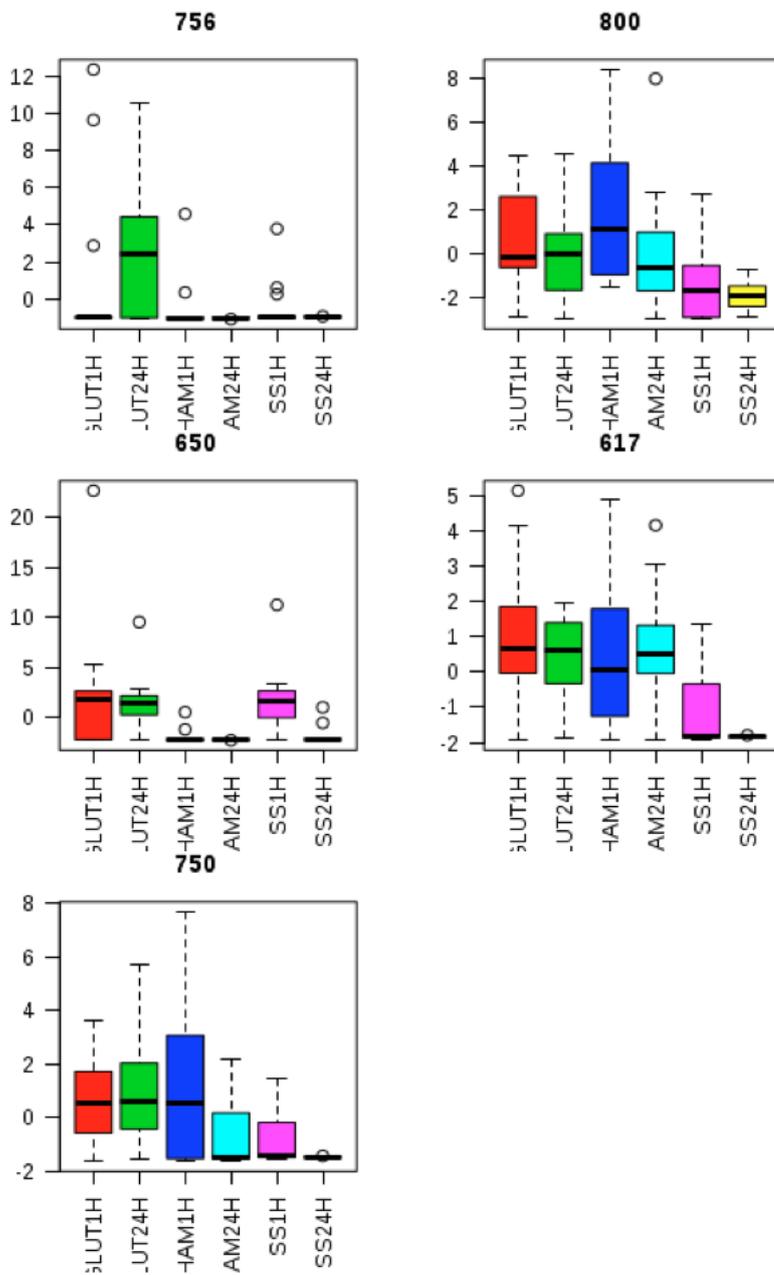


Figura 25 - Lipídios com maior intensidade relativa maior intensidade nos nos grupos que receberam l-alanyl-glutamina e lesão de isquemia e reperfusão 1h e 24h . No eixo das abscissas temos os grupos de estudos e no eixo das ordenadas o desvio padrão. Para ° $p < 0,05$; °° $p < 0,01$ e °°° $p < 0,001$.

5 DISCUSSÃO

Pacientes submetidos a estresse cirúrgico ou traumatismos se encontram em um estado dinâmico entre a resposta inflamatória sistêmica e a resposta inflamatória compensatória (PINHEIRO et al, 2011). Diversos estudos têm sido realizados na busca de drogas eficientes, antioxidantes e nutracêuticos para reverter ou atenuar lesões de isquemia e reperfusão (ALVES et al., 2010). Nutrientes terapêuticos ou nutracêuticos são nutrientes isolados ou combinados que, em doses farmacológicas, podem modificar a resposta metabólica em situações de estresse (MARTINDALE; ZHOU et al, 2006).

Os nutracêuticos mais comumente utilizados são os antioxidantes, ácidos graxos ω -3 (EPA e DHA), glutamina, arginina e nucleotídeos. A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no plasma e músculo esquelético. Possui um papel importante nas mudanças bioquímicas que ocorrem nas lesões de isquemia e reperfusão (ALVES et al., 2010; PIRES et al., 2011). Esse aminoácido apresenta diversas funções, tais como: substrato para síntese proteica, precursor anabólico no crescimento muscular, regulador renal do equilíbrio acidobásico, substrato para gliconeogênese hepática e renal, combustível oxidativo para o intestino e células do sistema imune, transportador de nitrogênio entre os órgãos, precursor na síntese de neurotransmissores, ácidos nucleicos e nucleotídeos, bem como na síntese de glutathione (NEWSHOLME et al., 2003).

Devido as propriedades citadas, a opção de uso deste aminoácido na forma de peptídeos, tais como a Glycyl-glutamina (Gly-Gln) ou a L-alanil-glutamina (Aln-Gln), tem sido a alternativa adotada por vários pesquisadores em virtude de sua alta solubilidade em água e estabilidade durante os procedimentos de preparo, armazenamento e administração das soluções nutricionais (ALVES, et al., 2010; BEZERRA FILHO et al., 2002; GUIMARAES FILHO et al., 2014; TORRES et al., 2003).

Quando em corrente sanguínea, o dipeptídeo, L-alanil-glutamina (Aln-Gln) é altamente estável e quando infundido endovenoso pode ser hidrolisado em glutamina e alanina (LEITAO et al., 2011). Neste estudo a glutamina foi utilizada na forma de L-alanil-glutamina (Aln-Gln) e foi avaliada a sua ação no pós-condicionamento de uma lesão de isquemia e reperfusão.

Diversos estudos têm demonstrado efeitos dessa substância como: diminuição do estresse oxidativo e morte celular em lesões de I/R como pré-

condicionamento com significativa redução da proporção de neurônios eosinófilos tanto 1h como após 24h de reperfusão em ratos Wistar (DE VASCONCELOS et al., 2015); diminuição do estresse oxidativo, degeneração nuclear (picnose) e morte celular no tecido cerebral de gerbils (PIRES et al., 2011).

Foi observado também uso de l-alanil-glutamina em queimaduras, aumentando a disponibilidade de glutamato e melhora da glicólise anaeróbia, com possível ativação do transportador malato-aspartato (BARBOSA et al, 2005). Em lesões de I/R hepática foi sugestiva a proteção hepática por redução da alanina aminotransferase, diminuição de lactato desidrogenase e da expressão da caspase-3 (ARAUJO JUNIOR et al., 2011).

Estudos com l-alanil-glutamina em pré-condicionamento de pacientes submetidos a transplante hepático encontraram menor estresse oxidativo e redução da peroxidação lipídica nos enxertos dos pacientes transportados (BARROS et al., 2015). No pré-condicionamento de lesão testicular foi observada diminuição da peroxidação lipídica durante a isquemia e proteção do estresse oxidativo (LEITAO et al., 2011).

Foi utilizada também no pré-operatório de pacientes com isquemia crítica submetidos a revascularização distal, reduzindo o dano do tecido e protegendo contra o estresse oxidativo (ALVES et al., 2010) e como suplemento nutricional em pacientes com síndrome de resposta inflamatória sistêmica em decorrência de infecção pulmonar, nos quais aumentou a contagem de linfócitos, entretanto sem afetar a resposta inflamatória e capacidade antioxidante da glutatona (CAVALCANTE et al., 2012).

Além disso, estudos com pós-condicionamento isquêmico, têm mostrado neuroproteção em lesões de isquemia/reperfusão, provavelmente, devido a um aumento da glutamina sintetase, reforçando a importância dessa substância na resposta inflamatória (ZHANG et al., 2011; ZHAO, H., 2009).

No presente estudo foi encontrada diminuição da proporção de neurônios eosinofílicos (vermelhos) nos animais que receberam L-alanil-glutamina em pós condicionamento da lesão isquêmica tanto em 1h como em 24h, após a reperfusão. Estes achados corroboram com dados encontrados em estudos semelhantes em pré-condicionamento em ratos Wistar (DE VASCONCELOS et al., 2015) e em

camundongos da Mongólia (PIRES et al., 2011). Não foi encontrado na literatura estudo que utilize a glutamina como intervenção de pós-condicionamento.

A espécie animal utilizada foi o rato Wistar albino. Esta espécie já foi objeto de vários estudos nesta linha de pesquisa (CAMPELO et al., 2012; MUNIZ, 2004; VASCONCELOS et al., 2011) nos proporcionando, portando, um importante parâmetro de avaliação, comparação e análise. O porte do animal é favorável ao manuseio, possibilita uma boa homogeneidade de amostras e baixo custo quando comparado a outras espécies. Sabe-se também que este animal possui elevada resistência a infecção e ao trauma cirúrgico e notável sistema de homeostasia (MUNIZ et al., 2004). O rato Wistar possui o polígono de Willis similar ao dos humanos, diferindo de outras espécies de animais como os camundongos da Mongólia (TORRES et al., 2003). A massa corpórea dos animais foi entre 250 – 300 g, fato que minimizou a mortalidade dos animais do estudo, conforme relatado por Fujishima (1976) que encontrou maior mortalidade em animais com mais de 300g submetidos a lesão de isquemia e reperfusão cerebral global.

Foi realizada como técnica anestésica uma associação de cloridrato de cetamina (90mg / kg) e cloridrato de xilasina (10mg / kg). Estas drogas têm ação sinérgica com diminuição de efeitos colaterais como salivação excessiva, hipotensão e depressão cardiorrespiratória, assim como potencialização da sedação, analgesia e relaxamento muscular (SILVA et al., 2002). A dose utilizada é capaz de reduzir o fluxo sanguíneo cerebral, pressão parcial do oxigênio cerebral e não altera a temperatura corporal quando comparada aos grupos controle (MUNIZ, et al., 2004). Este modelo anestésico já foi utilizado em diversos estudos (CAMPELO et al., 2011; CAMPELO et al., 2012; KUNIMATSU et al., 2001; LEVINE, 1960; SCHALLER; GRAF, 2004; VASCONCELOS et al., 2015).

Diversos modelos animais de isquemia e reperfusão têm sido testados nos últimos anos. O modelo de oclusão das artérias carótidas unilateral ou bilateral em ratos, utilizado neste experimento, demonstrou boa reprodutibilidade e praticidade, pois tem baixo custo, propiciando uma homogeneidade de amostras, procedimento cirúrgico simples, além de similaridade fisiológica e anatômica com outras espécies (MUNIZ, 2004; PIREZ et al., 2011). Um estudo realizado por Schaller et al (2004) mostrou que esse tipo de oclusão interfere na irrigação da maioria das artérias

antero-mediais cerebrais. Outro estudo evidenciou redução de cerca de 60% do fluxo cerebral através do doppler (KUNIMATSU et al., 2001). Os tempos de isquemia são bem variados nos estudos. Neste estudo foram utilizados os tempos de decapitação dos animais após lesão de isquemia/reperfusão de 1h e 24h, semelhante ao modelo de outros estudos do mesmo grupo de pesquisa (CAMPELO et al., 2012; VASCONCELOS et al., 2015).

Negovskii (1962) propôs que a extensão da lesão de isquemia reflete o dano que pode ocorrer na reperfusão, particularmente no hipocampo na região Ca1 e neurônios corticais piramidais. A micro vacuolização do citosol é notada nos primeiros 15 minutos, com substancial melhora após 1h de reperfusão. Evidências morfológicas relatam dano progressivo aos neurônios após 6h, com desintegração após 48-72h (TRIM et al., 2008). Estudos demonstram que a perfusão do córtex capilar é somente 30% normal após 90 min de reperfusão seguidas de 10-20 min de isquemia global. Esse fenômeno funciona como uma isquemia secundária com aumento do metabolismo e morte neuronal durante a reperfusão (SHANTA et al., 2012).

A isquemia cerebral induz uma grande variedade de alterações na estrutura dos neurônios afetados, que incluem: retração e condensação (neurônios escuros), picnose nuclear, eosinofilia citoplasmática (neurônios vermelhos) e precipitação do pigmento formaldeído (incrustação). A lesão que inicialmente se mostra com retração e edema celular, fica mais evidente a microscopia ótica quando evolui para morte e necrose, pela visualização dos neurônios vermelhos (GARCIA et al., 1997).

Neste trabalho foi utilizada a contagem de neurônios eosinofílicos (neurônios vermelhos) como método para mensurar a morte neuronal. Esse método tem sido bastante utilizado por outros estudos e tem se mostrado um bom parâmetro independentemente da etiologia dos mamíferos (RISSI et al., 2006)

A vulnerabilidade à isquemia varia de acordo com a população de neurônios no hipocampo. Sabe-se que 5 minutos de isquemia global acarreta morte neuronal na área hipocampal CA1, mas sem afetar outras populações, enquanto que um período de 20 minutos de isquemia global causa a morte de neurônios da área CA3 (LIPTON et al., 1999). Os neurônios em CA1 do hipocampo são os mais susceptíveis à isquemia e que em modelos experimentais de isquemia cerebral global com oclusão bilateral das artérias carótidas comuns houve danos em CA3 do

hipocampo após 20 minutos de oclusão. Anatomicamente as células piramidais em CA3 são maiores que em CA1 e possuem vias de entrada e saída diferentes (JOHNSTON et al., 2004). Estudos demonstraram que os astrócitos em CA1 são mais sensíveis a isquemia que os do giro denteado e que a ativação da tirosinoquinase e fosfatase pode diferir entre essas regiões (GEE et al., 2006).

Lesões em outras áreas, como no córtex cerebral e no cerebelo não se mostraram tão consistentes (ALI et al., 2004). O hipocampo foi escolhido por ser a região mais utilizada para estudar a fisiopatologia da isquemia cerebral, devido sensibilidade a lesão dessa região e arranjo neuronal (KIRINO, 1982).

O modelo experimental empregado foi adequado e consistente, pois a contagem de neurônios eosinófilos foi maior nos animais do grupo SS que sofreram isquemia e reperfusão tanto 1h quanto 24h, sendo a lesão 24 h mais grave, quando comparados ao grupo Sham corroborando os achados dos outros estudos (CAMPELO et al., 2012; ZHANG et al., 2011; ZHAO, H. et al., 2014; ZHOU et al., 2015)

Variados mecanismos estão relacionados com as lesões cerebrais após eventos de isquemia e reperfusão (CHO et al., 2013; TARDINI; YOSHIDA, 2003; PENG et al, 2012) CHO et al., 2013). Merecem destaque as lesões causadas por metabólitos das purinas, ácidos graxos livres, leucócitos e formação de óxido nítrico, daí a importância do estudo de drogas antioxidantes (TARDINI; YOSHIDA, 2003).

A espectrometria de massas tem se mostrado uma interessante técnica na identificação da mudança do perfil de lipídios, em particular dos fosfolipídios, durante um evento de isquemia/reperfusão (HATTORI et al., 2010; KOIZUMI et al., 2010; LIU et al., 2014; SHANTA et al., 2012; WANG et al., 2010; XU et al., 2013).

Os lipídios correspondem a cerca de metade do peso seco do tecido cerebral. Eles desempenham inúmeras tarefas como armazenamento de energia, estruturação das membranas biológicas e transdução de sinais através das membranas. Os lipídios cerebrais dividem-se principalmente em 3 grandes categorias: colesterol, esfingolipídios (esfingomiéline, cerebrosídeos, sulfatídeos e gangliosídeos) e glicerofosfolipídios (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol). Níveis alterados de lipídios estão associados a diversas doenças como doença de Alzheimer e Doença de Niemann-Pick (JACKSON et al., 2005).

A análise por espectrometrias de massa obtidas do hipocampo dos animais de cada grupo encontrou uma diferença estatisticamente significativa entre as

massa/ carga do perfil de lipídios dos grupos ($p < 0,05$) após realização do ANOVA one-way. Foi observado, a partir das massa/carga mais intensas, que alguns lipídios têm maior prevalência em determinadas grupos. Na análise por espectrometria de massa do hipocampo dos animais que receberam solução salina (SS) + isquemia e reperfusão 1h e 24h, se observou uma maior intensidade relativa dos lipídios com massa/carga 735, 761, 736, 762 e 763; nos grupos controle (Sham) 1h e 24h se observou maior intensidade de lipídios com massa /carga 799, 773 e 775 e nos grupos que receberam l-alanil-glutamina + lesão de isquemia e reperfusão 1h e 24h , se destacaram os lipídios com massa/carga 756, 800, 650,617 e 750, todos com significância estatística ($p < 0,05$).

A Regulação positiva de fosfolipases, especialmente a fosfolipase A2, está entre os eventos iniciados na isquemia e responsáveis pelo aumento de lipídios que foram associados com as respostas inflamatórias intensificadas. Simultaneamente ao aumento de fosfolipídios se dá aumento de ácidos graxos livres no tecido cerebral enfartado. Os eicosanoides, produto metabólico do ácido araquidônico (AA), podem contribuir para a perda de esfingomielina parenquimatosa através da ativação da esfingomielinase (SHETH et al., 2015; TRIM et al., 2008)

Em modelos de isquemia cerebral em ratos analisados por MALDI-MSI foi observado uma maior intensidade de fosfatidilcolina nas células do parênquima lesado e proposto como um biomarcador para a lesão cerebral (HANKIN et al., 2011; LIU et al., 2014).

Vale salientar que a informação da detecção por espectrometria de massa direta de fosfolipídios é influenciada pela distribuição cátions no tecido alterado que aumentou a ionização de fosfolipídios nas suas formas alcalinizadas, fato que pode mascarar a revelação das mudanças de subjacentes fosfolipídios pelas condições patológicas (YIN, 2008).

Estudos anteriores por MALDI dos lipídios do cérebro de ratos relataram alterações corticais de fosfatidilcolina e liso-fosfatidilcolina por isquemia focal e mudanças de esfingolipídios no hipocampo após isquemia global transitória (Nakamura et al, 1989)

Estas alterações corroboram os dados de Koizumi (2010) no qual foi realizada espectrometria de massas por imagem para identificar a distribuição dos lipídios durante uma isquemia cerebral focal em ratos. Neste estudo, após a identificação dos lipídios, foi observada uma conversão da fosfatidilcolina em liso-fosfatidilcolina nas áreas com lesão isquêmica. Estudos prévios mostraram que a fosfatidilcolina pode ser hidrolizada pela fosfolipase A2 e gerar liso-fosfatidilcolina e ácidos graxos(STEINBRECHER; PRITCHARD, 1989).

Sabe-se que o dano isquêmico causado pela infusão de Ca^{2+} depende da ativação da fosfolipase A2 via receptor NMDA. Acredita-se que essa via pode estar relacionada com a produção de ácido araquidônico e eicosanoides que regulam a degeneração neuronal. Sabe-se também que a liso-fosfatidilcolina esta relacionada com aterosclerose e inflamação alterando a função de diversas células como células endoteliais, monócitos, macrófagos e células T (TRIM et al., 2008).

Outro estudo realizado por Hamazaki, et al., (2010), demonstrou que a lesão de isquemia pode causar significativa lesão nas células piramidais da região CA1 do hipocampo de ratos com concomitante redução de fosfatidilserina, fosfatil-inositol, fosfatidiletanolamina, plasmalogen e esfingomielina. O estudo sugere, ainda, que a ativação de fosfolipase A2 pode não estar diretamente relacionada a maior susceptibilidade na região CA1 e que as diferenças entre CA1 e CA3 quanto a susceptibilidade a lesão não está relacionada ao seu perfil lipídico (HAMAZAKI; KIM, 2013).

Outro estudo de espectrometria de massas, porém com imagem, encontrou dezenove metabólitos envolvidos em redes metabólicas durante lesão de isquemia e reperfusão. Destaque para as redes metabólicas do metabolismo de ATP, ciclo tri carboxílico (TCA), ciclo glutamato-glutamina e transporte de malato-aspartato, assim como íons metálicos e fosfolipídios, todas as mudanças observadas após 24h(LIU et al., 2014).

Estudo realizado por Katsuji (2010) com espectrometria de massas por imagem e utilizando um modelo de oclusão da artéria cerebral média e metabólica trouxe dados importantes a respeito da fisiopatologia da lesão ao demonstrar que ao contrário do núcleo onde o ATP diminuiu, a penumbra exibiu elevação paradoxal de ATP, apesar do fornecimento de sangue restrito. Os resultados sugeriram que o metabolismo na penumbra isquêmica não responde

passivamente a circulação comprometida, mas tenta compensar a perda de ATP (HATTORI et al., 2010)

Outro estudo de espectrometria de massas por imagem mostrou a partir do perfil de lípidos que a liso-fosfatidilcolina e fosfatidilcolina estavam diminuídas na isquemia e os ácidos graxos poliinsaturadosnoinsaturados (PUFAS) aumentados. Os resultado citados foram divergentes de estudos anteriores com MALDI-MSI e sugeriram uma janela de intervenção que poderia beneficiar no manejo de acidentes cerebrovasculares e outras lesões cerebrais (WANG et al., 2010).

No presente estudo, observou-se a predominância, estatisticamente significativa, de alguns lipídios por fenótipos. A identificação desses lipídios será realizada posteriormente como complemento do estudo inicial e comparada aos dados da literatura.

6. CONCLUSÃO

1. O pós-condicionamento com l-alanil-glutamina tem efeito neuroprotetor no hipocampo de ratos, indicado pela contagem de neurônios vermelhos.
2. A intensidade relativa dos lipídios hipocampo na análise por espectrometria de massas está alterada em lesões de isquemia/reperfusão e é diversa dos animais pós-condicionados com l-alanil-glutamina, o que por analogia aos resultados histopatológicos, indicaria que estes íons, em diferentes fenótipos, estariam relacionados com cada uma das diferenças fenotípicas encontradas.

7. REFERÊNCIAS

ADIBHATLA, R. M.; HATCHER, J. F.; DEMPSEY, R. J. Lipids and lipidomics in brain injury and diseases. **AAPS J**, v. 8, n. 2, p. E314-21, 2006.

ALEXANDROVA, M. L.; BOCHEV, P. G. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. **Free Radic Biol Med**, v. 39, n. 3, p. 297-316, Aug 1 2005.

ALI, H. et al. Selective translocation of diacylglycerol kinase zeta in hippocampal neurons under transient forebrain ischemia. **Neurosci Lett**, v. 372, n. 3, p. 190-5, Dec 6 2004.

ALVES, W. F. et al. L-alanyl-glutamine preoperative infusion in patients with critical limb ischemia subjected to distal revascularization reduces tissue damage and protects from oxidative stress. **Ann Vasc Surg**, v. 24, n. 4, p. 461-7, May 2010.

ARAUJO JUNIOR, R. J. et al. Preconditioning with L-alanyl-glutamine reduces hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. **Acta Cir Bras**, v. 26 Suppl 1, p. 8-13, 2011.

BARROS, M. A. et al. L-Alanyl-Glutamine Attenuates Oxidative Stress in Liver Transplantation Patients. **Transplant Proc**, v. 47, n. 8, p. 2478-82, Oct 2015.

BARBOSA, R. C.; GUIMARÃES, S. B.; VASCONCELOS, P. R. C.; VASCONCELOS, P. R. L. Efeitos metabólicos da glutamina em ratos submetidos à queimadura por água fervente (escaldadura). **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 6, 2003.

BECKER, W. A. Choice of animals and sensitivity of experiments. **Nature**, v. 193, p. 1264-6, Mar 31 1962.

BEZERRA FILHO, J. E.; GUIMARÃES, S. B.; CHAVES, C. R.; QUEIROZ, D. A. F.; VASCONCELOS, P. R. C.; VASCONCELOS, P. R. L. Effects of L-alanyl-glutamine on in vivo kidney and blood concentrations of glucose, pyruvate and lactate in rats subjected to unilateral renal ischemia and reperfusion. **Rev. Bras. Nut. Clin.**, v. 17, n. 4, p. 122-125, 2002.

BUISSON, A.; PLOTKINE, M.; BOULU, R. G. The neuroprotective effect of a nitric oxide inhibitor in a rat model of focal cerebral ischaemia. **Br J Pharmacol**, v. 106, n. 4, p. 766-7, Aug 1992.

BURDA, J. et al. Delayed postconditioning initiates additive mechanism necessary for survival of selectively vulnerable neurons after transient ischemia in rat brain. **Cell Mol Neurobiol**, v. 26, n. 7-8, p. 1141-51, Oct-Nov 2006.

BUWALDA, B. et al. Effects of early postnatal anoxia on adult learning and emotion in rats. **Behav Brain Res**, v. 67, n. 1, p. 85-90, Feb 1995.

CAMPELO, M. W. et al. Effects of Rut-bpy (Cis-[Ru(bpy)₂(SO₃)(NO)]PF 6), a novel nitric oxide donor, in L-NAME-induced hypertension in rats. **Acta Cir Bras**, v. 26 Suppl 1, p. 57-9, 2011.

CAMPELO, M. W. et al. Preconditioning with a novel metallopharmaceutical NO donor in anesthetized rats subjected to brain ischemia/reperfusion. **Neurochem Res**, v. 37, n. 4, p. 749-58, Apr 2012.

CASTRO, C. C. et al. Coumestrol treatment prevents Na⁺, K⁺ -ATPase inhibition and affords histological neuroprotection to male rats receiving cerebral global ischemia. **Neurol Res**, v. 36, n. 3, p. 198-206, Mar 2014.

CAVALCANTE, A. A. et al. Enteral nutrition supplemented with L-glutamine in patients with systemic inflammatory response syndrome due to pulmonary infection. **Nutrition**, v. 28, n. 4, p. 397-402, Apr 2012.

CHEN, H. et al. Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. **Antioxid Redox Signal**, v. 14, n. 8, p. 1505-17, Apr 15 2011.

CHEN, H. J.; LEE, T. C.; WEI, C. P. Treatment of cerebellar infarction by decompressive suboccipital craniectomy. **Stroke**, v. 23, n. 7, p. 957-61, Jul 1992.

CHO, Y. T. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry for clinical diagnosis. **Clin Chim Acta**, v. 415, p. 266-75, Jan 16 2013.

CIRULLI, F. et al. Long-term effects of acute perinatal asphyxia on rat maternal behavior. **Neurotoxicol Teratol**, v. 25, n. 5, p. 571-8, Sep-Oct 2003.

COSTA ROSA, L. F.; SAFI, D. A.; CURI, R. Effect of thioglycollate and BCG stimuli on glucose and glutamine metabolism in rat macrophages. **J Leukoc Biol**, v. 56, n. 1, p. 10-4, Jul 1994.

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

COTRAN.; KUMAR, V. ; ROBBINS, S. Patologia estrutural e funcional. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 105-173.

CRUZAT, V. F.; TIRAPEGUI, J. Effects of oral supplementation with glutamine and alanyl-glutamine on glutamine, glutamate, and glutathione status in trained rats and subjected to long-duration exercise. **Nutrition**, v. 25, n. 4, p. 428-35, Apr 2009.

CURTHOYS, N. P.; WATFORD, M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. **Annu Rev Nutr**, v. 15, p. 133-59, 1995.

DAVIES, M. G.; FULTON, G. J.; HAGEN, P. O. Clinical biology of nitric oxide. **Br J Surg**, v. 82, n. 12, p. 1598-610, Dec 1995.

DE VASCONCELOS, P. R. et al. Preconditioning with L-alanyl-glutamine upon cerebral edema and hippocampus red neurons counting in rats subjected to brain ischemia/reperfusion injury. **Acta Cir Bras**, v. 30, n. 3, p. 199-203, Mar 2015.

DELL'ANNA, M. E. et al. Neonatal anoxia induces transitory hyperactivity, permanent spatial memory deficits and CA1 cell density reduction in developing rats. **Behav Brain Res**, v. 45, n. 2, p. 125-34, Nov 26 1991.

DENG, H. et al. Alphaipoic acid protects against cerebral ischemia/reperfusion-induced injury in rats. **Mol Med Rep**, v. 11, n. 5, p. 3659-65, May 2015.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends Neurosci**, v. 22, n. 9, p. 391-7, Sep 1999.

ENGIDAWORK, E. et al. Effect of perinatal asphyxia on systemic and intracerebral pH and glycolysis metabolism in the rat. **Exp Neurol**, v. 145, n. 2 Pt 1, p. 390-6, Jun 1997.

EVORA, P. R. et al. [Ischemia-reperfusion lesion. Physiopathologic aspects and the importance of the endothelial function]. **Arq Bras Cardiol**, v. 66, n. 4, p. 239-45, Apr 1996.

FAROOQUI, A. A.; HORROCKS, L. A.; FAROOQUI, T. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. **Chem Phys Lipids**, v. 106, n. 1, p. 1-29, Jun 2000.

FRANCK, J. et al. MALDI mass spectrometry imaging of proteins exceeding 30,000 daltons. **Med Sci Monit**, v. 16, n. 9, p. BR293-9, Sep 2010.

FRIED, R. L.; NOWAK, T. S., JR. Opioid peptide levels in gerbil brain after transient ischemia: lasting depletion of hippocampal dynorphin. **Stroke**, v. 18, n. 4, p. 765-70, Jul-Aug 1987.

GAGLIARDI, J. R. Early phases of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. **Brain research**, v. 1116, p. 159-165, 2006.

GARCIA, J. H. et al. Incomplete infarct and delayed neuronal death after transient middle cerebral artery occlusion in rats. **Stroke**, v. 28, n. 11, p. 2303-9; discussion 2310, Nov 1997.

GEE, C. E. et al. NMDA receptors and the differential ischemic vulnerability of hippocampal neurons. **Eur J Neurosci**, v. 23, n. 10, p. 2595-603, May 2006.

GILGUN-SHERKI, Y. et al. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. **Pharmacol Rev**, v. 54, n. 2, p. 271-84, Jun 2002.

GINSBERG, M. D.; BUSTO, R. Rodent models of cerebral ischemia. **Stroke**, v. 20, n. 12, p. 1627-42, Dec 1989.

GOULART, A. C. et al. A stepwise approach to stroke surveillance in Brazil: the EMMA (Estudo de Mortalidade e Morbidade do Acidente Vascular Cerebral) study. **Int J Stroke**, v. 5, n. 4, p. 284-9, Aug 2010.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J Neurochem**, v. 59, n. 5, p. 1609-23, Nov 1992.

HAMAZAKI, K.; KIM, H. Y. Differential modification of the phospholipid profile by transient ischemia in rat hippocampal CA1 and CA3 regions. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 88, n. 4, p. 299-306, Apr 2013.

HANKIN, J. A. et al. MALDI mass spectrometric imaging of lipids in rat brain injury models. **J Am Soc Mass Spectrom**, v. 22, n. 6, p. 1014-21, Jun 2011.

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

HATTORI, K. et al. Paradoxical ATP elevation in ischemic penumbra revealed by quantitative imaging mass spectrometry. **Antioxid Redox Signal**, v. 13, n. 8, p. 1157-67, Oct 2010.

HOLLIDAY, E. G. et al. Genetic overlap between diagnostic subtypes of ischemic stroke. **Stroke**, v. 46, n. 3, p. 615-9, Mar 2015.

HORTIN, G. L. The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. **Clin Chem**, v. 52, n. 7, p. 1223-37, Jul 2006.

HU, S.; PETERSON, P. K.; CHAO, C. C. Cytokine-mediated neuronal apoptosis. **Neurochem Int**, v. 30, n. 4-5, p. 427-31, Apr-May 1997.

ISLEKEL, S. et al. Alterations in superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in experimental cerebral ischemia-reperfusion. **Res Exp Med (Berl)**, v. 199, n. 3, p. 167-76, Dec 1999.

JACKSON, S. N.; WANG, H. Y.; WOODS, A. S. Direct profiling of lipid distribution in brain tissue using MALDI-TOFMS. **Anal Chem**, v. 77, n. 14, p. 4523-7, Jul 15 2005.

JARDIN-MATHE, O. et al. MITICS (MALDI Imaging Team Imaging Computing System): a new open source mass spectrometry imaging software. **J Proteomics**, v. 71, n. 3, p. 332-45, Aug 21 2008.

JAYALAKSHMI, K. et al. N-acetyl cysteine supplementation prevents impairment of spatial working memory functions in rats following exposure to hypobaric hypoxia. **Physiol Behav**, v. 92, n. 4, p. 643-50, Nov 23 2007.

JIA, C. J. et al. Alanyl-glutamine dipeptide inhibits hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 9, p. 1373-8, Mar 7 2006.

KAKU, Y. et al. Alterations of a 200 kDa neurofilament in the rat hippocampus after forebrain ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 13, n. 3, p. 402-8, May 1993.

KIRINO, T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. **Brain Res**, v. 239, n. 1, p. 57-69, May 6 1982.

KLATT, P. et al. Multiple catalytic functions of brain nitric oxide synthase. Biochemical characterization, cofactor-requirement, and the role of N omega-hydroxy-L-arginine as an intermediate. **J Biol Chem**, v. 268, n. 20, p. 14781-7, Jul 15 1993.

KOIZUMI, S. et al. Imaging mass spectrometry revealed the production of lysophosphatidylcholine in the injured ischemic rat brain. **Neuroscience**, v. 168, n. 1, p. 219-25, Jun 16 2010.

KONTOS, H. A. Oxygen radicals in cerebral ischemia: the 2001 Willis lecture. **Stroke**, v. 32, n. 11, p. 2712-6, Nov 2001.

KREBS, H. A. Metabolism of amino-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. **Biochem J**, v. 29, n. 8, p. 1951-69, Aug 1935.

KUNIMATSU, T. et al. Effects of glutamate receptor agonist on extracellular glutamate dynamics during moderate cerebral ischemia. **Brain Res**, v. 923, n. 1-2, p. 178-86, Dec 27 2001.

KUNZ, A.; DIRNAGL, U.; MERGENTHALER, P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v. 24, n. 4, p. 495-509, Dec 2010.

LABOW, B. I.; SOUBA, W. W. Glutamine. **World J Surg**, v. 24, n. 12, p. 1503-13, Dec 2000.

LAKHAN, S. E.; KIRCHGESSNER, A.; HOFER, M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. **J Transl Med**, v. 7, p. 97, Nov 17 2009.

LEGER, P. L. et al. Ischemic postconditioning in cerebral ischemia: Differences between the immature and mature brain? **Int J Dev Neurosci**, v. 45, p. 39-43, Oct 2015.

LEITAO, J. P. et al. L-alanyl-glutamine dipeptide pretreatment attenuates ischemia-reperfusion injury in rat testis. **Acta Cir Bras**, v. 26 Suppl 1, p. 21-5, 2011.

- LEVINE, S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. **Am J Pathol**, v. 36, p. 1-17, Jan 1960.
- LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiol Rev**, v. 79, n. 4, p. 1431-568, Oct 1999.
- LIU, H. et al. 1,5-Diaminonaphthalene hydrochloride assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging of small molecules in tissues following focal cerebral ischemia. **Anal Chem**, v. 86, n. 20, p. 10114-21, Oct 21 2014.
- LOIDL, C. F. et al. Effects of hypothermia and gender on survival and behavior after perinatal asphyxia in rats. **Physiol Behav**, v. 68, n. 3, p. 263-9, Jan 2000.
- LOVAT, R.; PREISER, J. C. Antioxidant therapy in intensive care. **Curr Opin Crit Care**, v. 9, n. 4, p. 266-70, Aug 2003.
- MARTINDALE, R.; ZHOU, M. Terapia nutricional imunomoduladora. In: **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2009. cap 119, p. 1987- 2006.
- MERGENTHALER, P.; DIRNAGL, U.; MEISEL, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. **Metab Brain Dis**, v. 19, n. 3-4, p. 151-67, Dec 2004.
- MITANI, A. et al. Origin of intracellular Ca²⁺ elevation induced by in vitro ischemia-like condition in hippocampal slices. **Brain Res**, v. 601, n. 1-2, p. 103-10, Jan 22 1993.
- MODERSCHEIM, T. A. et al. Prolactin is involved in glial responses following a focal injury to the juvenile rat brain. **Neuroscience**, v. 145, n. 3, p. 963-73, Mar 30 2007.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, n. 2, p. 109-42, Jun 1991.
- MORO, M. A. et al. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. **Free Radic Biol Med**, v. 39, n. 10, p. 1291-304, Nov 15 2005.
- MUNIZ, R. R. F. F., 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. 529-34, 2004.
- 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, Nov 1986.
- NA, H. S. et al. Ventricular premature beat-driven intermittent restoration of coronary blood flow reduces the incidence of reperfusion-induced ventricular fibrillation in a cat model of regional ischemia. **Am Heart J**, v. 132, n. 1 Pt 1, p. 78-83, Jul 1996.

NEWSHOLME, P. et al. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 2, p. 153-63, Feb 2003.

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

NOVELLI, M.; STRUFALDI, M.B.; ROGERO, M.M.; ROSSI, L. Suplementação de glutamina aplicada a atividade física. **Rev. Bras. Ci. e Mov.**, v.15, n.1, p.109-117, 2007.

OHTAKI, H.; DOHI, K.; NAKAMACHI, T.; YOFU, S.; ENDO, S.; KUDO, Y.; SHIODA, S. Evaluation of brain ischemia in mice. *Acta Histochemica et Cytochemica*, Kyoto, v. 38, n. 2, p. 99-106, 2005.

PATEL, R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. **Clin Chem**, v. 61, n. 1, p. 100-11, Jan 2015.

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

PIGNATARO, G. et al. Post-ischemic brain damage: effect of ischemic preconditioning and postconditioning and identification of potential candidates for stroke therapy. **FEBS J**, v. 276, n. 1, p. 46-57, Jan 2009.

PIRES, V. L. et al. Preconditioning with L-alanyl-L-glutamine in a Mongolian gerbil model of acute cerebral ischemia/reperfusion injury. **Acta Cir Bras**, v. 26 Suppl 1, p. 14-20, 2011.

PINHEIRO, P.M.A.; et. al. Preconditioning with oil mixes of high ratio Omega-9: Omega-6 and a low ratio Omega-6:Omega-3 in rats subjected to brain ischemia/reperfusion. *Acta Cir. Bras*. [online]. 2011, vol.26, suppl.1, pp. 32-37. ISSN 1678-2674.

PULSINELLI, W. A.; BRIERLEY, J. B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. **Stroke**, v. 10, n. 3, p. 267-72, May-Jun 1979.

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

ROBERTS, L.; COUNSELL, C. Assessment of clinical outcomes in acute stroke trials. **Stroke**, v. 29, n. 5, p. 986-91, May 1998.

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

ROTH, D. J. *et al.* A novel method of monitoring response to islet transplantation: bioluminescent imaging of an NF- κ B transgenic mouse model. **Transplantation**, v. 81, n. 8, p. 1185-90, Apr 27 2006.

SAAD, M. A. *et al.* Ischemic preconditioning and postconditioning alleviates hippocampal tissue damage through abrogation of apoptosis modulated by oxidative stress and inflammation during transient global cerebral ischemia-reperfusion in rats. **Chem Biol Interact**, v. 232, p. 21-9, May 5 2015.

Saúde, M. d. (2013). Manual de rotinas para atenção ao AVC. D. d. A. a. o. Especializada. Brasília, Ministério da Saúde: 50.

SILVA JUNIOR, O., *et al.*, Basic aspects of the ischemia reperfusion injury and of the ischemicpreconditioning. **Acta Cir. Bras.**, v. 17, p. 96-100, 2002.

SCHALLER, B.; GRAF, R. Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 24, n. 4, p. 351-71, Apr 2004.

SCHMIDT-KASTNER, R.; FREUND, T. F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. **Neuroscience**, v. 40, n. 3, p. 599-636, 1991.

SCHWARTZ, S. A.; REYZER, M. L.; CAPRIOLI, R. M. Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation. **J Mass Spectrom**, v. 38, n. 7, p. 699-708, Jul 2003.

SHANTA, S. R. *et al.* Global changes in phospholipids identified by MALDI MS in rats with focal cerebral ischemia. **J Lipid Res**, v. 53, n. 9, p. 1823-31, Sep 2012.

SHETH, S. A. *et al.* Targeted Lipid Profiling Discovers Plasma Biomarkers of Acute Brain Injury. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0129735, 2015.

SOUBA, W. W. Total parenteral nutrition with glutamine in bone marrow transplantation and other clinical applications. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 17, n. 5, p. 403, Sep-Oct 1993.

STEINBRECHER, U. P.; PRITCHARD, P. H. Hydrolysis of phosphatidylcholine during LDL oxidation is mediated by platelet-activating factor acetylhydrolase. **J Lipid Res**, v. 30, n. 3, p. 305-15, Mar 1989.

SUN, S. L. et al. Modulation of signal transducers and activators of transcription (STAT) factor pathways during focal cerebral ischaemia: a gene expression array study in rat hippocampus after middle cerebral artery occlusion. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 34, n. 11, p. 1097-101, Nov 2007.

TARDINI, D. M.; YOSHIDA, W. B. [Brain injury due ischemia and reperfusion in carotid endarterectomy surgery]. **Rev Port Cir Cardiorac Vasc**, v. 10, n. 3, p. 133-40, Jul-Sep 2003.

TORRES, J. M. S., et. al. Efeitos metabólicos da L-alanil- glutamina em ratos submetidos à isquemia da pata traseira esquerda seguida de reperfusão. **Acta Cir. Bras.**, v. 18, n. 1, 2003.

TRIM, P. J. et al. Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging of lipids in rat brain tissue with integrated unsupervised and supervised multivariate statistical analysis. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 22, n. 10, p. 1503-9, May 2008.

VASCONCELOS, P. R. et al. Effect of glutamine on the mRNA level of key enzymes of malate-aspartate shuttle in the rat intestine subjected to ischemia reperfusion. **Acta Cir Bras**, v. 26 Suppl 1, p. 26-31, 2011.

VASCONCELOS, P. R. et al. Preconditioning with L-alanyl-glutamine upon cerebral edema and hippocampus red neurons counting in rats subjected to brain ischemia/reperfusion injury. **Acta Cir Bras**, v. 30, n. 3, p. 199-203, Mar 2015.

VETYUKOV, Y.; KUZIN, A.; KROMMER, M. Asymptotic splitting in the three-dimensional problem of elasticity for non-homogeneous piezoelectric plates. **Int J Solids Struct**, v. 48, n. 1, p. 12-23, Jan 1 2011.

VEXLER, Z. S.; FERRIERO, D. M. Molecular and biochemical mechanisms of perinatal brain injury. **Semin Neonatol**, v. 6, n. 2, p. 99-108, Apr 2001.

VINTEN-JOHANSEN, J. et al. Myocardial protection in reperfusion with postconditioning. **Expert Rev Cardiovasc Ther**, v. 3, n. 6, p. 1035-45, Nov 2005.

WADA, H. et al. Increased oxidative stress in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) as measured by redox status of plasma coenzyme Q10. **Pathophysiology**, v. 13, n. 1, p. 29-33, Feb 21 2006.

WAINWRIGHT, M. S. et al. A nitric oxide donor reduces brain injury and enhances recovery of cerebral blood flow after hypoxia-ischemia in the newborn rat. **Neurosci Lett**, v. 415, n. 2, p. 124-9, Mar 26 2007.

WANG, W.; MA, C. M.; HATTORI, M. Metabolism of isorhynchophylline in rats detected by LC-MS. **J Pharm Pharm Sci**, v. 13, n. 1, p. 27-37, 2010.

WATFORD, M. Hepatic glutaminase expression: relationship to kidney-type glutaminase and to the urea cycle. **FASEB J**, v. 7, n. 15, p. 1468-74, Dec 1993.

WISCHMEYER, P. E. Glutamine and heat shock protein expression. **Nutrition**, v. 18, n. 3, p. 225-8, Mar 2002.

WISHART, D.S., et al. *HMDB 3.0 — The Human Metabolome Database in 2013*. *Nucleic Acids Res.* 2013.

XIA, J.; WISHART, D.S. (2016) Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis *Current Protocols in Bioinformatics*, 55:14.10.1-14.10.91

WU, H. et al. Combination of early and delayed ischemic postconditioning enhances brain-derived neurotrophic factor production by upregulating the ERK-CREB pathway in rats with focal ischemia. **Mol Med Rep**, v. 12, n. 5, p. 6427-34, Nov 2015.

XU, M. et al. Baicalin can scavenge peroxynitrite and ameliorate endogenous peroxynitrite-mediated neurotoxicity in cerebral ischemia-reperfusion injury. **J Ethnopharmacol**, v. 150, n. 1, p. 116-24, Oct 28 2013.

YIN, H. New techniques to detect oxidative stress markers: mass spectrometry-based methods to detect isoprostanes as the gold standard for oxidative stress in vivo. **Biofactors**, v. 34, n. 2, p. 109-24, 2008.

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

ZHANG, W. et al. Neuroprotective effects of ischemic postconditioning on global brain ischemia in rats through upregulation of hippocampal glutamine synthetase. **J Clin Neurosci**, v. 18, n. 5, p. 685-9, May 2011.

ZHAO, H. Ischemic postconditioning as a novel avenue to protect against brain injury after stroke. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 29, n. 5, p. 873-85, May 2009.

ZHAO, H. et al. Ischemic postconditioning relieves cerebral ischemia and reperfusion injury through activating T-LAK cell-originated protein kinase/protein kinase B pathway in rats. **Stroke**, v. 45, n. 8, p. 2417-24, Aug 2014.

ZHAO, Z. Q. et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 285, n. 2, p. H579-88, Aug 2003.

ZHOU, Y. et al. Orally administrated pterostilbene attenuates acute cerebral ischemia-reperfusion injury in a dose- and time-dependent manner in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 135, p. 199-209, Aug 2015.



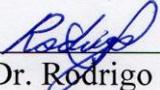
Universidade Federal do Ceará
 Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
 Cep: 60430-970 Fortaleza-CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "EFEITOS DO PÓS – CONDICIONAMENTO COM L-ALANIL-GLUTAMINA NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL EM RATOS", protocolo nº 04/2016, sob responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrada (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 15 23 de maio de 2016

Vigência do projeto	01/01/2015 a 30/08/2016
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico
Nº de Animais	36
Peso/Idade	250-300g / 5-6 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 23 de maio de 2016


 Prof. Dr. Rodrigo Siqueira
 Coordenador do CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
 RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
 ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Siape: 1520734