



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

PAULO ROBERTO CAVALCANTE DE VASCONCELOS

**PRÉ-CONDICIONAMENTO COM L-ALANIL-GLUTAMINA E
NEUROPROTEÇÃO CONTRA A LESÃO CEREBRAL DE
ISQUEMIA/REPERFUSÃO EM RATOS**

**FORTALEZA
2014**

PAULO ROBERTO CAVALCANTE DE VASCONCELOS

PRÉ-CONDICIONNAMENTO COM L-ALANIL-GLUTAMINA E
NEUROPROTEÇÃO CONTRA A LESÃO CEREBRAL DE
ISQUEMIA/REPERFUSÃO EM RATOS

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas.
Orientador: Prof. Dr. Sergio Botelho Guimarães

FORTALEZA
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

V451p Vasconcelos, Paulo Roberto.
Pré-Condicionamento com L-alanil glutamina e neuroproteção contra a lesão cerebral de
isquemia/reperfusão / Paulo Roberto Vasconcelos. – 2014.
70 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Cirurgia, Fortaleza, 2014.

Orientação: Prof. Dr. Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães.

1. L-Alanil glutamina. 2. Lesão de Isquemia/Reperfusão Cerebral. 3. Neuroproteção. 4.
Sinalização intracelular das vias de proteínas quinases. 5. Apoptose. I. Título.

CDD 617

PAULO ROBERTO CAVALCANTE DE VASCONCELOS

PRÉ-CONDICIONAMENTO COM L-ALANIL-GLUTAMINA E NEUROPROTEÇÃO
CONTRA A LESÃO CEREBRAL DE ISQUEMIA/REPERFUSÃO EM RATOS

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Aprovada em 29/08/2014

BANCA EXAMINADORA

Profa Dra Maria Tereza Aguiar Pessoa Morano
Universidade de Fortaleza-UNIFOR

Prof. Dr. Cícero Igor Simões Moura Silva
Instituto Superior de Teologia Aplicada- INTA-SOBRAL

Prof. Dr. Otoni Cardoso do Vale
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Porto Pinheiro
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

A **DEUS**, que está sempre presente em minha vida, me iluminando e mostrando o caminho certo a ser seguido

Aos meus pais Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos e Dione Cavalcante Vasconcelos pela formação moral, ética e profissional, cujo amor incondicional, nunca sempre permeou na trajetória da minha vida.

Aos meus filhos Paulo Roberto Cavalcante Vasconcelos Filho e Isabela Cavalcante Vasconcelos

Que por curiosidade leiam este texto, pensem e reflitam a importância da vida acadêmica e principalmente os estudos na vida do ser humano e espalhem esta informação, para que todos possam refletir

Ao meu avô paterno Francisco Domingos de Vasconcelos *In memoriam*, sei que se sentiria orgulhoso e feliz ao meu lado neste momento.

A minha avó paterna Francisca Celina Leitão, a qual muito orgulho de ser seu neto.

Aos meus avós maternos Luiz Melo Cavalcante e Antônio Mourão Cavalcante *In memoriam*, que certamente também ficariam orgulhosos com meu sucesso

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor **SÉRGIO BOTELHO GUIMARÃES**, Professor Associado, PROPAP Programa de Pós Graduação do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal e exigência do Ceará, pela demonstração de competência como orientador, pelo apoio para realização desta pesquisa, pelo estímulo e ensinamentos em momentos oportunos.

Ao Professor Doutor **PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS**, Professor Titular em Cirurgia e Coordenador do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade em participar como doutorando no programa, apoiando-me, possibilitando a minha titulação.

Ao Doutorando **MÁRCIO WILKER SOARES CAMPELO**, por ter a oportunidade de juntos terminar o experimento. Que Deus sabe como foi difícil e árduo, pensando muitas vezes em desistir, mas ele sempre me apoiando e incentivando para seguir e chegar até o fim.

Aos **PROFESSORES DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *Stricto Sensu*** do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela qualidade e empenho com que ministram as disciplinas, orientam e com presteza sempre dispostos a ajudar os alunos.

Ao **CORPO DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *Stricto Sensu*** em Cirurgia ao tive oportunidade de conviver e muito acrescentou como doutorando

AO MESTRE FRANCISCO FÁBIO BEZERRA DE OLIVEIRA, agradeço por sua dedicação e paciência na realização de todos os experimentos, na qual sem sua ajuda nada seria possível. Obrigado por tudo.

Ao aluno da Iniciação Científica, **JOHNATA Kael MARINHO**, pela dedicação e exímia ajuda, de domingo a domingo, durante toda a fase experimental.

Às secretárias do programa de Pós-Graduação em Cirurgia, **MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA E MAGDA MARIA GOMES FONTENELE**, por todo o apoio, compreensão e dedicação permanente aos alunos do Programa.

Ao Senhor **BENTO FRANCISCO DE OLIVEIRA**, técnico do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio e dedicação no tratamento dos animais utilizados no experimento.

Ao **CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO** (CNPq) por meio de bolsa concedida para financiamento da execução da tese.

A **TODOS** que auxiliaram de forma direta ou indireta, durante todas as etapas deste trabalho os meus sinceros agradecimentos .

“Eu queria saber o que faço para agradar o mundo,
Se preciso dar murro em ponta de faca ou não,
Se não devo parar os meus passos à beira do abismo
Para ter uma estátua na praça” ele era tão bom”.

Alcymar Monteiro

“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ela possa ser realizado.”

Roberto Shinyashiki

RESUMO

Pré-condicionamento com l-alanil-glutamina e neuroproteção contra a lesão cerebral de isquemia/reperfusão em ratos PAULO ROBERTO CAVALCANTE DE VASCONCELOS.. **Pós-Graduação *Stricto Sensu*, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará (Grau de Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas).** agosto, 2014. Orientador: Prof. Dr. Sergio Botelho Guimaraes.

Este estudo objetivou avaliar os efeitos do dipeptídeo l-alanil-glutamina (l-ala-gln) com um agente pré-condicionante para potencialmente promover redução na intensidade da lesão ou induzir resiliência em ratos submetidos à lesão de isquemia/reperfusão (I/R) global em ratos. Edema cerebral, morte neuronal e sinalização intracelular por meio das vias das proteínas quinases foram estudados. L-ala-gln foi administrada por via intravenosa (0,75g/kg) 30 minutos antes do procedimento simulado (sham) ou do da indução da lesão de isquemia/reperfusão cerebral global. Tecido cerebral foi analisado 1h e 24h após a reperfusão. Mensuração do edema cerebral, contagem de neurônios vermelhos e determinação das concentrações das proteínas quinases (ERK/MAP quinase 1/2 (Thr185/Tyr187), Akt (Ser473), STAT3 (Ser727), JNK (Thr183/Tyr185), p70 S6 kinase (Thr412), STAT5A/B (Tyr694/699), CREB (Ser133), e p38 (Thr180/Tyr182) foi realizada. Os resultados foram expressos como Média±DP para resultados com distribuição normal e Mediana±Percentil (25-75) para dados não paramétricos. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$. A lesão de isquemia/reperfusão cerebral global causou edema cerebral no tempo 24 h após a reperfusão, enquanto o pré-condicionamento com l-ala-gln não induziu qualquer mudança no edema. Por outro lado, o pré-condicionamento com l-alanil-glutamina diminuiu significativamente a contagem de neurônios vermelhos (morte celular) tanto a 1 h quanto a 24 h após a reperfusão. A l-alanil-glutamina promoveu significativo decréscimo nas concentrações de JNK após a reperfusão quando comparadas às encontradas nos ratos controle submetidos somente a I/R a 1h e a 24h pós-reperfusão. Por outro lado, o pré-condicionamento com l-ala-gln induziu significativa elevação nas concentrações cerebrais de P70 a 1 h e a 24 h após a reperfusão, de P38 a 1 h após a reperfusão, e de CREB 24 h pós-reperfusão. Houve, portanto, um significativo efeito pré-condicionante com l-alanil-glutamina reduzindo morte cerebral (contagem de neurônios vermelhos) tanto precocemente (1h) ou mais tardiamente (24h) após a reperfusão no tecido cerebral. O decréscimo nas concentrações cerebrais de JNK, assim como a elevação das concentrações de P70, P38 e CREB induzidos pelo pré-condicionamento com l-ala-gln indicam efeitos neuroprotetores produzidos por este dipeptídeo. Mais estudos são necessários para confirmar os presentes achados, e para investigar outras vias de sinalização intracelular, e outros mecanismos envolvidos neste efeito neuroprotetor.

Palavras chaves: L-alanil-glutamina; Isquemia/reperfusão; apoptose; ratos

ABSTRACT

L-alanyl-glutamine preconditioning and neuroprotection against brain ischemia/reperfusion injury in rats. PAULO ROBERTO CAVALCANTE DE VASCONCELOS. ***Strictu Sensu* Post-graduation in Surgery, Department of Surgery, School of Medicine, Federal University of Ceará (Degree of Doctorate of Medical and Surgical Sciences). April, 2014. Advisor: Prof. Sérgio Botelho Guimarães.**

This study aimed to evaluate the effects of the dipeptide L-alanyl-glutamine (L-ala-gln) as a preconditioning agent to potentially promote reduction in the intensity of the lesion or induction of resilience in rats subjected to global cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury. Cerebral edema, neuronal death and intracellular protein kinase signaling were studied. L-ala-gln was administered intravenously (0.75g/kg) 30 minutes before sham procedure or induction of global brain I/R injury. Cerebral tissue was analysed 1h and 24h after reperfusion. Brain edema, red neuron counting (cell death) and hippocampus concentrations of protein kinases (ERK/MAP kinase 1/2 (Thr185/Tyr187), Akt (Ser473), STAT3 (Ser727), JNK (Thr183/Tyr185), p70 S6 kinase (Thr412), STAT5A/B (Tyr694/699), CREB (Ser133), e p38 (Thr180/Tyr182) were determined. Results expressed as Mean \pm SD for normal results and Median \pm Percentil (25-75) for non parametric data. Significance established at $p < 0.05$. Global I/R injury promoted increase in brain edema at 24 h after reperfusion, whereas preconditioning with L-ala-gln induced no change in edema. On the other hand, L-ala-gln preconditioning decreased significantly red neurons counting both at 1h and 24h post reperfusion. L-alanyl-glutamine promoted significant decreased concentrations of JNK after reperfusion as compared to I/R controls at 1h and at 24h post reperfusion. On the other hand, L-ala-gln preconditioning induced significant elevation of brain concentrations of P70 at 1h and at 24h post reperfusion, P38 at 1h after reperfusion and CREB at 24h post reperfusion. There was a significant preconditioning effect with L-alanyl-glutamine decreasing cell death (red neurons counting) at early (1h) and late reperfusion (24h) in the cerebral tissue. Decreased brain concentrations of JNK and elevated concentrations of P70, P38 and CREB induced by preconditioning with L-ala-gln indicate neuroprotective effects of by this peptide. More studies are necessary to confirm the present results and to investigate other intracellular pathways and other mechanisms involved in this neuroprotective event.

Key words: L-alanyl-glutamine; ischemia/reperfusion; apoptosis; rats

LISTA DE FIGURAS

Fig 1-	Estabelecimento da isquemia
Fig E1	Edema Cerebral
Fig E2	Edema Cerebral
Fig N1	Contagem de Neurônios Vermelhos
Fig N2	Contagem de Neurônios Vermelhos
Fig X1	Expressão da Proteína quinase B (AKT)
Fig X2	Expressão da Quinase extra-celular sinal-regulada (ERK)
Fig X3	Expressão da Quinase com N-terminal C-Jun (JNK)
Fig X4	Expressão da Quinase da proteína mitogen-ativada (P38)
Fig X5	Expressão da Quinase ribossomal S6 (P70)
Fig X6	Expressão do STAT 3
Fig X7	Expressão do STAT 5
Fig X8	Expressão do CREB

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Expressão da Proteína quinase
Tabela 2-	Expressão da Quinase extra-celular sinal-regulada
Tabela 3-	Expressão da Quinase com N-terminal C-Jun
Tabela 4-	Expressão da Quinase da proteína mitogen-ativada
Tabela 5-	Expressão da Quinase ribossomal S6
Tabela 6-	Expressão do STAT 3
Tabela 7-	Expressão do STAT 5
Tabela 8-	Expressão do CREB

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVO	27
3 MATERIAL E METODO	28
3.1 Desenho do estudo e aspectos éticos.....	28
3.2 Animais	28
3.3 Delineamento experimental	29
3.3.1 Grupos e procedimentos	29
3.3.2 Anestesia	29
3.3.3 Técnica Cirúrgica	29
3.3.3.1 Procedimento Inicial	30
3.3.3.2 Isquemia e Reperusão	30
3.3.3.3 Histopatologia do hipocampo	31
3.3.3.4 Medida do conteúdo de água cerebral	32
3.3.3.5 Estudo de sinalização intracelular pelas proteínas quinases	32
3.4 Análise Estatística	34
4 RESULTADOS	35
4.1 Quinases	39
4.1.1 Proteína quinase B (AKT)	39
4.1.2 Quinase extra-celular sinal-regulada (ERK)	40
4.1.3 Quinase com N-terminal C-Jun (JNK)	41
4.1.4 Quinase da proteína mitogen-ativada (P38)	42
4.1.5 Quinase da proteína ribossomal S6 (P70)	43
4.2 TRANSDUTORES DE SINAL E ATIVADORES DA TRANSCRIÇÃO	44
4.2.1 Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT 3)	44
4.2.2 Transdutor de sinal e ativador da transcrição 5 (STAT 5)	45

4.3	Proteína de ligação em resposta ao cAMP (CREB)	46
5	DISCUSSÃO	47
6	CONCLUSÃO	54
7	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	55
8	APENDICE	66
9	ANEXOS	70

1 INTRODUÇÃO

Considerações Iniciais

Pré-condicionamento com o dipeptídeo l-alanil-glutamina tem sido utilizado para preparar o hospedeiro frente a uma futura lesão, atuando reduzindo a intensidade de sua resposta ou promovendo resiliência do organismo para enfrentar o desafio biológico que irá ocorrer (Pinheiro et al, 2011).

Vários estudos, experimentais e clínicos, têm proporcionado evidência dos efeitos pré-condicionantes da l-alanil-glutamina (l-ala-gln). Este dipeptídeo foi usado para a proteção de testículos de ratos submetidos à lesão de isquemia/reperfusão (I/R) induzindo uma diminuição na peroxidação lipídica e no estresse oxidativo (Leitão et al, 2011). L-ala-gln também foi capaz de promover proteção hepática contra a lesão normotérmica de I/R em ratos (Araújo Jr et al, 2011). O uso endovenoso de 50g deste dipeptídeo durante 3 horas precedentes à operação de revascularização de membros atenuou o dano no tecido muscular e protegeu do estresse oxidativo pacientes com isquemia crítica de membros inferiores (Alves et al, 2010). Da mesma maneira, o uso intravenoso de l-ala-gln (0,5g/kg) no período pré-operatório imediato reduziu a resposta inflamatória aguda em crianças submetidas a palatoplastia (Cunha Filho et al, 2011).

A infusão prévia de l-alanil-glutamina foi demonstrada reduzir o estresse oxidativo e a degeneração neuronal nuclear em esquilos da mongólia submetidos à lesão de isquemia/reperfusão cerebral global (Pires et al, 2011). Pré-condicionamento com l-ala-gln não induziu mudanças na área de morte neuronal na lesão isquêmica, entretanto promoveu diminuição da área de necrose cerebral após 1h de reperfusão em modelo de isquemia cerebral global no rato (Nogueira, 2010).

Entretanto, quais mecanismos efetores estão envolvidos, e, mais especificamente, quais vias protéicas de sinalização intracelular das quinases participam neste processo de pré-condicionamento da l-alanil-glutamina necessitam ser elucidados. Ativação da via quinase P13K/Skt foi relacionada à proteção e manutenção da unidade neurovascular após a lesão de isquemia/reperfusão (Lan et al, 2013). Inibição da MEK1, parte da via Ras-Raf-MEK-ERK quinase promoveu neuroproteção contra a lesão de I/R (Wang et al, 2003). Neuroproteção da lesão

cerebral isquêmica focal foi descrita pela inibição de c-Jun N-terminal quinase (Gao et al, 2005). Elevação da atividade da quinase p-CREB foi relacionada ao pré-condicionamento promovendo neuroproteção com o resveratrol (Lin et al, 2013). Degradação de uma tirosina fosfatase, ricamente presente no tecido cerebral, STEP, ativa durante a reperfusão, precede o dano isquêmico cerebral e está associada com a ativação secundária da quinase p38 MAPK (Deb et al, 2013). O fator neurotrófico derivado cerebral (BDNF) tem sido demonstrado como benéfico nas funções neuronais após a hypoxia-isquemia pela inibição da via Akt/mTOR/p70S6K (Chen et al, 2013). A expressão gênica de STAT2, 5a, 5b e 6 foi aumentada pela isquemia provavelmente devido a uma resposta compensatória do cérebro, que pode ter desempenhado um papel protetor no tecido cerebral lesionado (Sun et al, 2007). Efeitos neuroprotetores têm sido obtidos por meio de limpadores de espécies reativas ao oxigênio (ROS), e regulação para baixo da ativação da quinase STAT3 (Lei et al, 2011).

Há, portanto, a necessidade da realização de trabalhos experimentais visando investigar várias das vias de proteínas quinase relacionadas à proteção neural, após o estabelecimento de modelo de lesão de isquemia/reperfusão cerebral, em animais pré-condicionados com nutracêuticos, fitoterápicos, metalofármacos, e outros agentes.

Lesão de isquemia/reperfusão cerebral

A isquemia cerebral é causada por uma redução transitória ou permanente do fluxo sanguíneo, e é considerada uma das principais causas de mortalidade e morbidade humanas (NISHIZAWA, 2001). As consequências desta restrição dependem das características metabólicas do tecido atingido, da existência de circulação colateral e do tempo de restrição (SCHALLER; GRAF, 2004). À semelhança de outros tipos de trauma, provoca resposta orgânica, determinando alterações e reações diversas de natureza inflamatória, hormonal, humoral e metabólica, com a finalidade precípua de restabelecer o equilíbrio biológico do chamado meio interno (RAHDLE *et al.*, 1996).

Quatro componentes estruturais e funcionais são particularmente sensíveis à

hipóxia decorrente da isquemia: a membrana celular, responsável principal pelo equilíbrio iônico e osmótico; a respiração aeróbica, que compreende, entre outros eventos, a fosforilação oxidativa e a produção de ATP (adenosina-trifosfatada); a síntese de proteínas estruturais e enzimáticas e a cromatina responsável pela reprodução celular (COTRAN; KUMAR; ROBBIN, 1996). As repercussões da isquemia estão associadas a alterações morfológicas e funcionais resultantes da necrose tecidual. As alterações provocadas pela falta de aporte sanguíneo desencadeiam processos metabólicos celulares e moleculares que induzem a célula a sua autodestruição sem a característica reação inflamatória, conhecida como fenômeno de apoptose (TOLDY *et al.*, 2008).

A lesão de reperfusão é um termo usado para descrever as alterações funcionais e estruturais, que se tornam aparentes durante o restabelecimento do fluxo após um período de isquemia. O afluxo de sangue oxigenado aos tecidos previamente desprovidos de oxigênio é fundamental para o reinício do metabolismo aeróbico (TARDINI; YOSHIDA, 2003). Paradoxalmente, associado ao efeito benéfico da reperfusão, ocorrem fenômenos deletérios: células irreversivelmente lesadas, acentuado edema celular e restauração não-uniforme do fluxo para todas as porções dos tecidos. Essa restauração caótica do fluxo tissular é conhecida como fenômeno do “não refluxo”, no qual interagem múltiplos fatores, tais como um círculo vicioso de disfunção endotelial vascular, a redução da perfusão local e acentuação do edema (EVORA *et al.*, 1996). Durante a reperfusão, ocorre formação excessiva de substâncias reativas ao oxigênio (EROS), que constituem moléculas com coexistência e que contém um ou mais elétrons não pareados na camada de valência. Esta configuração faz dos radicais livres espécies altamente instáveis, de meias-vidas relativamente curtas e quimicamente muito reativas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre a produção de radicais livres, em particular espécies reativas de oxigênio (EROs), e a capacidade

de defesa do organismo contra essas espécies, levando a um progressivo dano oxidativo (MORO *et al.* 2005). Mesmo sob condições fisiológicas, o metabolismo neuronal e glial produz EROs. Aproximadamente 2-5% do fluxo de elétrons da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de cérebro produz ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL, 1992). Acredita-se que o estresse oxidativo é um dos mecanismos que desempenha papel central no processo patofisiológico durante o evento isquêmico, e a degeneração neuronal resultante vem sendo associada com o aumento da produção de radicais livres. Durante a isquemia cerebral, inúmeros eventos predisõem o encéfalo à formação de EROs, como o rápido decréscimo nos níveis de ATP, perda da homeostase do Ca^{2+} , excitotoxicidade, metabolismo e liberação do ácido araquidônico, disfunção mitocondrial, acidose e edema (ALEXANDROVA; BOCHEV, 2005).

A reperfusão, após isquemia cerebral, eleva a formação de espécies pró-oxidantes no tecido encefálico, as quais podem contribuir para a lesão neuronal por atacar diretamente macromoléculas, incluindo proteínas, lipídeos e DNA, ou indiretamente atingindo os caminhos de sinalização celular e regulação da expressão gênica (MORO *et al.*, 2005). Existem várias evidências a partir de modelos experimentais de formação aumentada de radicais livres no encéfalo durante a isquemia/reperfusão. A verificação direta das medidas da relação entre isquemia cerebral e o estresse oxidativo são ainda deficientes, principalmente devido às dificuldades morfológicas encontradas na determinação de radicais livres no tecido encefálico (HOMI *et al.*, 2002; DANIELISOVÁ *et al.*, 2005).

O equilíbrio entre a geração e a neutralização de oxidantes por diferentes mecanismos de defesa intra e extracelular ajuda a proteger os componentes vitais da célula (ZIMMERMANN *et al.*, 2004). A atividade enzimática antioxidante do tecido afetado pela isquemia/reperfusão é particularmente importante como defesa endógena primária contra as espécies pró-oxidantes que induzem a lesão (HOMI *et al.*, 2002). Assim, a capacidade antioxidante plasmática pode ser um importante fator que fornece proteção contra o dano neurológico causado pelo estresse oxidativo associado ao evento vascular isquêmico (LEINONEN *et al.*, 2000). Durante a fase recente após isquemia/reperfusão, os antioxidantes podem ser mobilizados, embora essa capacidade possa ser limitada, em função do tempo, pela sua baixa

disponibilidade ou excessivo estresse oxidativo (ALEXANDROVA; BOCHEV, 2005).

Isquemia Cerebral Experimental

Diferentes modelos animais são utilizados para estudar a susceptibilidade de populações neurais às lesões isquêmicas e mecanismos que envolvem a degeneração celular (CHOI; MAULUCCI-GEDDE; KRIEGSTEIN, 1987). A isquemia do prosencéfalo por oclusão de dois vasos foi o primeiro modelo proposto para estudar o fluxo sanguíneo cerebral, o estado metabólico e as alterações ácidas básicas dos encéfalos de ratos submetidos à isquemia. Este modelo proporciona alto grau de isquemia reversível do prosencéfalo, o que é conseguido à custa da oclusão da artéria carótida comum bilateralmente, combinada com hipotensão arterial sistêmica suficiente para reduzir de forma acentuada o fluxo sanguíneo cerebral do prosencéfalo (COLLI; SILVA; CARLONI, 1998).

Outro modelo de isquemia realizado em ratos Wistar é por oclusão de quatro vasos, as duas ACCs a ambas as artérias vertebrais (PUSINELLI; BUCHAN, 1988).

O modelo de compressão provocando uma isquemia prosencefálica bilateral descrito em ratos Wistar consiste na infusão de líquido encéfalo-raquidiano (LCR) artificial na cisterna magna, de modo a elevar a pressão liquórica (PL) 20 a 70 mmHg acima da pressão arterial, o que produz isquemia cerebral completa (YOSHIDA *et al.*, 1982).

O modelo de isquemia com elevação da PL foi desenvolvido por Busto e Ginsberg (1989), onde é produzida uma isquemia hemisférica unilateral. Este método consiste na oclusão temporária da artéria carótida comum e a elevação da PL (40 a 45 mmHg), por infusão de LCR artificial na cisterna magna.

O modelo hipóxia-isquemia original desenvolvido por Levine (1960) e Levine Shon (1969) consistia na ligadura unilateral da ACC em ratos Wistar, seguido de vinte e quatro horas de exposição gradual a um ambiente anóxico por até 45 minutos, sem monitorização fisiológica; foi subsequentemente refinado, instruindo-se monitorização fisiológica e controles cuidadosos, caracterização dos metabólitos cerebrais e da histopatologia (BROWN; BRIERLY, 1968).

No presente estudo foi utilizado um modelo experimental de isquemia global reversível do prosencéfalo por oclusão de dois vasos (ACCs), sem manobras ou recursos acessórios, em ratos da linhagem Wistar. Em estudo de Muniz, Faria e Vasconcelos (2004) a oclusão bilateral das artérias carótidas comuns produziu isquemia global transitória parcial, comprovada pela redução de ATP no tecido cerebral, com repercussão sistêmica. As alterações metabólicas mais significativas foram verificadas nos primeiros minutos de reperfusão, caracterizadas pela mobilização e consumo de substratos energéticos sistêmicos e consequente superprodução de ATP, tipificando a “lesão de reperfusão”. O modelo experimental mostrou-se simples e reprodutível, tendo sido por este motivo utilizado como ferramenta para estudo da administração da L-alanil-glutamina (Ala-Gln) na isquemia e reperfusão cerebral.

Dipeptídeo

Trinta minutos antes da indução da anestesia, L-alanil-glutamina em solução a 20% (0,75g/kg) foi administrada por via endovenosa. A dose utilizada no presente estudo foi baseada em experimentos prévios (Nogueira et al, 2010, Alves et, 2010, Cunha Filho, 2011).

Glutamina e L-alanil-glutamina

A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no músculo e no plasma humano, sendo também encontrada em concentrações relativamente elevadas em muitos tecidos (MURPHY, 1999). Seu peso molecular é de 146,15 kDa. É instável em solução, particularmente em ácido, ou quando estocada por períodos prolongados, podendo resultar na geração de produtos tóxicos, como o glutamato, o que tem limitado o seu uso (KHAN, 1991). Esse problema, no entanto, tem sido superado pela adição de aminoácidos à molécula de glutamina, formando compostos estáveis e altamente solúveis, como a alanil-glutamina. O uso da alanil-glutamina tem-se mostrado bem tolerado, seguro (FURST; ALBERS; STEHLE, 1989;

FURST; POGAN; STEHLE, 1997) e eficaz, tanto em estudos clínicos (TREMEL, 1994; MORLION, 1998), quanto experimentais (CARNEIRO-FILHO, 2003; CARNEIRO-FILHO, 2004a; BRITO, 2005).

A existência da glutamina (Gln) foi considerada pela primeira vez por Hlaziwetz e Habermann, em 1873, quando sugeriram que a amônia encontrada em hidrolisados protéicos era o resultado da sua liberação a partir de glutamina e asparagina. O isolamento da glutamina a partir do hidrolisado protéico foi descrito em 1932 e a presença de enzimas que catalisam a síntese e a hidrólise de glutamina foi descrita primeiramente em 1935 por *Sir* Hans Krebs. Os conhecimentos dos aspectos relativos às vias de síntese e degradação da glutamina aumentaram significativamente nos anos seguintes, porém pouco progresso no entendimento das funções metabólicas desse aminoácido foi encontrado entre 1940 e 1950 (Curi, 2000).

A molécula de glutamina compreende cinco carbonos e tem muitas funções metabólicas importantes. Devido a sua larga distribuição em todo o corpo e por ser constituída por dois grupos amina (NH^+), a glutamina participa da transferência de nitrogênio e carbono entre os tecidos (ALBERTINI; RUIZ, 2001). Esse efeito é particularmente importante no sistema nervoso central, onde a metabolização de aminoácidos resulta na produção de grupamentos de amônia, os quais são tóxicos em grandes quantidades. A síntese da glutamina protege o organismo, o cérebro em particular, da toxicidade da amônia.

A amônia pode ser incorporada às moléculas de glutamina e, posteriormente, liberada no fígado para a síntese mitocondrial da uréia, produto final do metabolismo dos aminoácidos, e excretado pelos rins. A glutamina é precursora do glutamato neuronal, que é o principal mediador dos sinais excitatórios do Sistema Nervoso Central (SNC) dos mamíferos. Neste sentido, este aminoácido tem um papel importante na ligação metabólica entre neurônios e células glia. Alterações na sua síntese podem resultar em acúmulo de glutamato nas células gliais e redução na síntese de glutamato nos neurônios. Contudo, a função da glutamina não se limita simplesmente à síntese de glutamato, mas tem uma participação muito mais ampla no metabolismo do sistema nervoso. Existe uma grande interação da glutamina com o metabolismo energético das células neurais, tanto no sentido de

gerar diretamente substratos para a produção de energia como sua ação de regular a utilização de outros metabólitos pelo SNC (CURI, 2000).

O ciclo glutamina-glutamato que ocorre entre as células da glia e as terminações nervosas é mantido através de constante e rápida captação de ácido gama-aminobutírico (GABA) e glutamato, liberados por determinadas terminações nervosas e prontamente captadas por astrócitos, localizados nas proximidades destes. No interior dos astrócitos, estes aminoácidos são convertidos em glutamina, que logo em seguida é exportada e captada por terminações nervosas, para gerar novos neurotransmissores (CURI, 2000). A glutamina também participa na manutenção do equilíbrio ácido-básico através do transporte de íons amônio para os rins, possibilitando sua posterior eliminação pela urina (SMITH; WILMORE, 1990).

As primeiras evidências de que a glutamina possui propriedades metabólicas importantes surgiram em 1955, quando Eagle demonstrou que a glutamina é importante para o crescimento e manutenção de células em cultura. Resultados semelhantes foram posteriormente encontrados para diferentes tipos de tecidos e células, demonstrando ser esse aminoácido precursor de nucleotídeos e de outras moléculas, além de substrato energético para a proliferação celular (Curi, 2000). A glutamina do organismo advém da produção endógena, somada à aquisição pela dieta, apresentando uma boa absorção pelos enterócitos (MASSAMBANI; BAZOTTE, 1998). A sua síntese envolve a adição de um grupamento amina à molécula de glutamato, catalizada endogenamente pela glutamina sintetase. Em condições normais, a produção endógena sozinha responde pelas necessidades de glutamina, por isso, tradicionalmente, a glutamina era considerada um aminoácido não essencial (DARMAUND *et al.*, 1994).

No entanto, seus estoques podem ser depletados na vigência de estados catabólicos, como trauma cirúrgico, infecção, jejum prolongado, exercício extenuante, queimaduras extensas e infecção. Nesses casos, a concentração de glutamina plasmática declina, podendo ficar abaixo da metade dos valores normais, o que reflete sua maior utilização por leucócitos, enterócitos, fibroblastos e outras células, cuja atividade é estimulada nessas situações (PETERSEN, 1996; FURUKAWA, 2000; NEWSHOLME, 2001; BARBOSA, 2003). Faz-se então, necessária a suplementação de glutamina por meio da dieta, para a manutenção de

seus níveis plasmáticos fisiológicos. Por isso, a glutamina tem sido caracterizada como um aminoácido condicionalmente essencial (LACEY, 1990; GARCIA DE LORENZO *et al.*, 2003).

A glutamina também é muito importante para os processos mitóticos por exercer um papel essencial na síntese de precursores de macromoléculas celulares e na geração de energia, sendo substrato para a gliconeogênese. Por isso, é utilizada rapidamente, como combustível oxidativo por células de intensa atividade mitótica, incluindo linfócitos, fibroblastos, enterócitos e células tumorais (NEWSHOLME *et al.*, 1999). Os grupamentos NH₂ da glutamina ainda podem ser utilizados para a produção de novos aminoácidos ou incorporados à purina e pirimidinas, na síntese de ácidos nucleicos. Ademais, tem sido demonstrado que a glutamina, através da conversão à glutamato, é um importante precursor na síntese de glutathione, o principal antioxidante intracelular (HONG *et al.*, 1992; DENNO *et al.*, 1996; YU *et al.*, 1996; YU; JIANG; LI, 1999.), essencial para o funcionamento celular normal (NEWSHOLME, 2001).

Pelas propriedades da glutamina, supõe-se que a diminuição da disponibilidade desse aminoácido pode levar ao comprometimento da função imune por alterações na capacidade de proliferação das células envolvidas. Curi e colaboradores (1995) evidenciaram que a glutamina age em neutrófilos normais *in vitro*, aumentando sua atividade bactericida. Também tem-se apontado a importância do metabolismo da glutamina na função de macrófagos, durante reações inflamatórias e imunológicas, provavelmente via liberação de citocinas (COSTA ROSA; SAFI; CURI, 1994.).

Dentre as principais funções deste aminoácido estão: precursora de nitrogênio para a síntese de nucleotídeos; manutenção do balanço ácido-base durante acidose; transferência de nitrogênio entre órgãos; detoxificação da amônia; crescimento e diferenciação celular; possível regulador direto da síntese e degradação proteica; fornece energia para as células de rápida proliferação, como enterócitos e células do sistema imune; veículo de transporte de cadeia carbônica entre os órgãos; age como precursora da ureogênese e gliconeogênese hepática, e de mediadores, como o GABA e glutamato; fornece energia aos fibroblastos, aumentando a síntese de colágeno; promove melhora da permeabilidade integridade

intestinal; aumenta a resistência à infecção por aumento da função fagocitária; substrato para a síntese da glutatona e estimula a síntese de citrulina e arginina (NOVELLI *et al.* 2007).

A diminuição da disponibilidade de metabólitos e oxigênio durante a isquemia pode induzir a perda da viabilidade celular causada por uma onda excitotóxica devido a um aumento na liberação de aminoácidos excitatórios. Este processo, poderia comprometer as defesas antioxidantes celulares, causando o comprometimento de funções vitais desempenhadas pelo SNC.

Há, portanto, a necessidade da realização de trabalhos experimentais, visando investigar neuroproteção e o comportamento de várias das vias de proteínas quinase. O presente estudo visa tentar elucidar a ação do pré-condicionamento com o nutracêutico l-alanil-glutamina sobre possível proteção neuronal e sobre a modulação de algumas das vias intracelulares das proteínas quinases frente a isquemia/reperfusão cerebral.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo principal

O presente estudo visa investigar o efeito pré-condicionante do nutracêutico dipeptídeo l-alanil-glutamina (l-ala-gln) em modelo de indução de isquemia/reperfusão cerebral global em ratos.

2.1 Objetivos Secundários

1. Verificar o papel do pré-condicionamento utilizando l-ala-gln no desenvolvimento e instalação do edema cerebral após a lesão de

isquemia/reperfusão.

2. Analisar se o dipeptídeo glutamina detém ação pré-condicionante neuroprotetora sobre a sobrevivência/morte neuronal frente à lesão de isquemia/reperfusão.
3. Ajudar elucidar se o pré-condicionamento com l-alanil-glutamina é capaz de promover ação moduladora sobre algumas das vias intracelulares de proteínas quinases (AKT, ERK, JNK, P38, P70, STAT3, STAT5 e CREB), no que concerne à neuroproteção, frente à lesão de isquemia/reperfusão.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Desenho do estudo e aspectos éticos

Estudo 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, no Biotério do Departamento de Cirurgia, Seção de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina, pertencente à UFC.

Os protocolos experimentais foram executados de acordo com as diretrizes aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) do Departamento de

Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) para uso de animais experimentais (68/08), (Anexo 1).

As condições, desde alojamento até o bem estar geral dos animais foram controladas pela direção do biotério e os procedimentos basearam-se nos princípios das 3Rs (“Replacement, Reduction, Refinement”). Os animais foram manipulados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os esforços foram realizados no sentido de reduzir o número de animais utilizados.

3.2 Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia Mammalia*) procedentes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos no Laboratório de Cirurgia Experimental – LABCEX.

A média de idade dos animais com peso médio de 280-300g. Todos receberam ração padrão e água *ad libitum*, e foram mantidos nas mesmas condições ambientais. Durante os experimentos, foram previamente deixados em jejum durante 12 horas.

3.3 Delineamento experimental

3.3.1 Grupos e procedimentos

Os animais foram distribuídos de forma randômica em 6 grupos: Sham 1h (Solução salina com falsa isquemia/reperfusão 1h); Sham 24h (Solução salina com falsa isquemia/reperfusão 24h); SS+I/R 1h (Solução salina seguida de isquemia/reperfusão 1h); SS+I/R 24h (Solução salina seguida de isquemia/reperfusão 24h); Gln I/R 1h (L-alanil-glutamina seguida de isquemia/reperfusão 1h) e GLN I/R 24h (L-alanil-glutamina seguida de isquemia/reperfusão 24h).

3.3.2 Anestesia

Os ratos foram anestesiados, por uma injeção intramuscular, de uma solução composta por xilazina (10mg/kg) e ketamina (90gm/kg). A temperatura retal foi também monitorada com um termômetro digital e mantida de 35-37°C.

3.3.3 Técnica Cirúrgica

Os animais foram acomodados em bancada cirúrgica durante todo o procedimento. As dissecções foram realizadas com instrumental microcirúrgico adequado. Foi realizado controle rigoroso dos tempos, frequência respiratória e temperatura (termômetro retal) dos animais durante todo o procedimento cirúrgico. Após a anestesia, foi realizada tricotomia seguida de incisão na região femural e injetado solução de Ala-Gln ou solução salina na veia femural de acordo com o protocolo experimental. Passados 30 minutos da infusão iniciava-se o procedimento cirúrgico.

3.3.3.1 Procedimento Inicial

Procedeu-se cervicotomia mediana longitudinal anterior com individualização e isolamento bilateral das ACCs a 0,5cm de sua bifurcação em artérias carótidas externa e interna (ponto de oclusão).

3.3.3.2 isquemia e Reperfusão

Estabelecimento da isquemia/reperfusão cerebral de acordo com as manobras cirúrgicas previstas para cada grupo, realizou-se oclusão bilateral, ou falsa oclusão – *sham*, e concomitante das ACCs com cliques vasculares tipo *bulldog* (FIGURA X). Durante todo o tempo, a região foi irrigada com solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril para prevenir a desidratação tecidual.

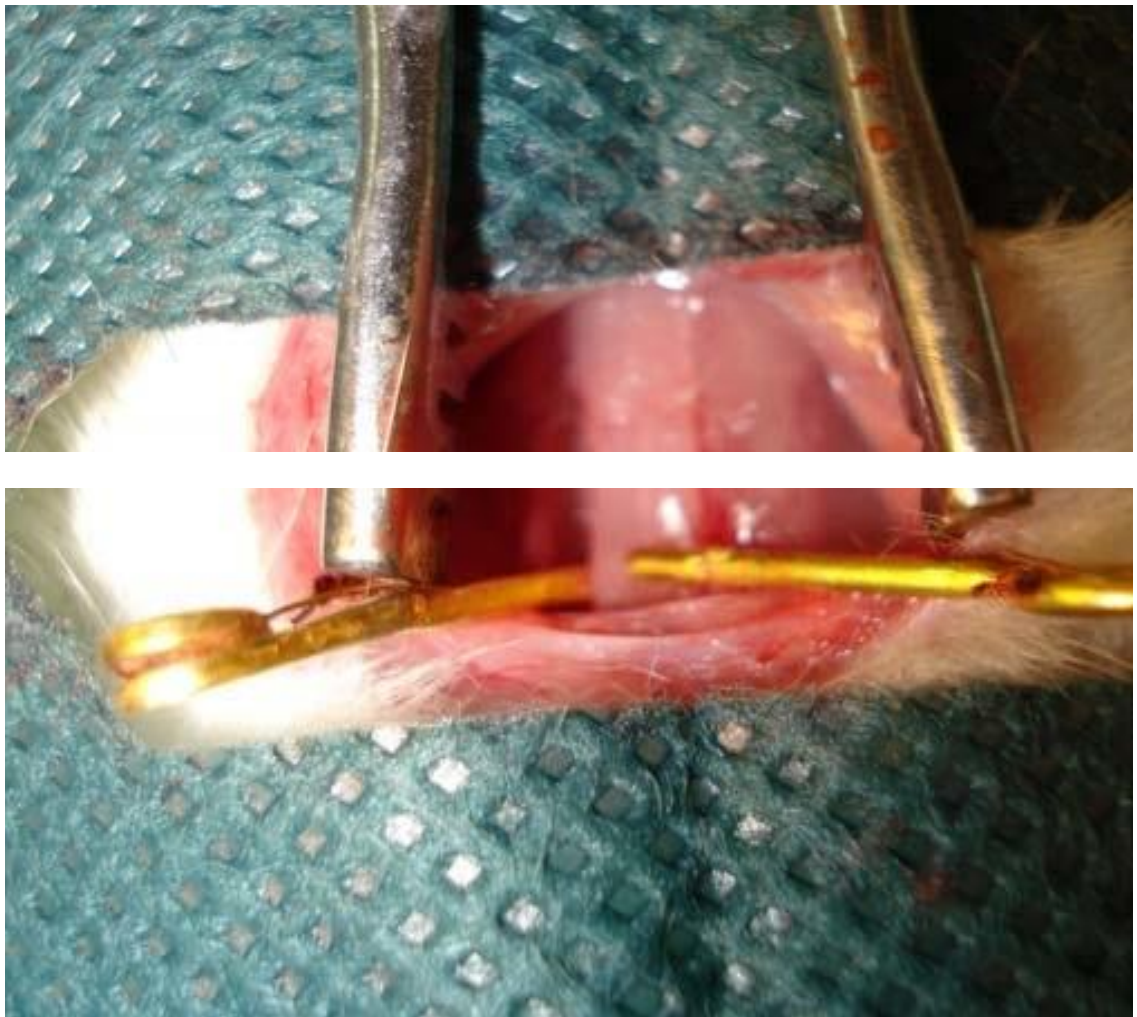


FIGURA 1- Estabelecimento da isquemia [Fonte: Autor]

Após a realização de todas as manobras cirúrgicas planejadas, e passado o período de reperfusão (1h e 24h), sob efeito anestésico adequado, os animais foram decapitados e imediatamente após foi realizada a craniectomia, utilizando-se micromotor elétrico de 20.000 rpm para osteotomia (Micromotor Elétrico LB 100 – Beltec ®) acoplado a um disco de corte, procedendo-se posterior abertura dural para

acesso e extração dos hemisférios cerebrais.

3.3.3.3 Histopatologia do hipocampo

O cérebro foi removido da caixa craniana e quatro secções coronais foram realizadas (2 mm cada) e em seguida sofreram imersão e fixação em formalina por 24 horas antes de serem transferidas para um solução de etanol a 70%, quando foram processadas, embebidas em parafina, e cortadas para gerar fatias de 5 µm, e montadas em lâminas. As lâminas foram coradas utilizando hematoxilina e eosina. A extensão da lesão no hipocampo foi avaliada por um neuropatologista, sem identificação dos grupos às quais as pertenciam, usando um microscópio (Olympus, X400). O número de neurônios acidofílicos de cor vermelha (neurônios vermelhos) foram contados, como descrito por Kaku *et al*

The number of pink acidophilic dead neurons (red neurons) were counted, as described by Kaku et al, 1993. Dano neuronal nas áreas Ca1 e Ca2/Ca3 do hipocampo foi expresso como percentual de células mortas em um total das encontradas em um campo de microscópio com aumento de 400 vezes.

3.3.3.4 Medida do conteúdo de água cerebral

Vinte e quatro horas após os procedimentos cirúrgicos (falsa ou isquemia/reperfusão cerebral real), os ratos foram mortos e os cérebros removidos como descrito acima. As pontes e o bulbo olfatório foram removidos e os cérebros foram pesados para obtenção do peso molhado. Logo após, os cérebros foram secados a 110°C por 24 h para determinação do seu peso seco. A quantidade de água cerebral foi calculada pelo uso da seguinte fórmula= (peso molhado/peso secoX100).

3.3.3.5 Estudo de sinalização intracelular pelas proteínas quinases

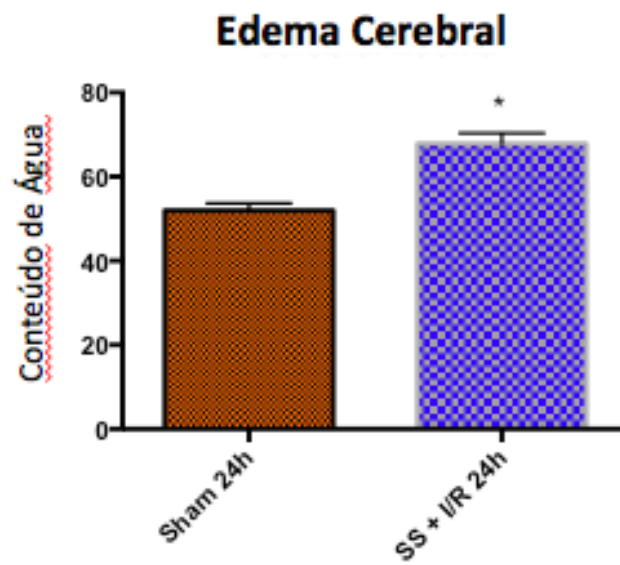
Imediatamente após o tempo de reperfusão (1h e 24h), todo o hipocampo foi cuidadosamente removido e rapidamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C. Espécimes descongelados foram pulverizados com homogeneizador elétrico (ultra-Turrax homogenizer, Sigma, St. Louis, MO, USA), contendo uma solução tampão de lise e então transferidos para tubos de ensaio com um cocktail inibidor de protease e centrifugado a 14.000 rpm. Os sobrenadantes

foram submetidos ao ensaio pelo método ácido bi-cinchrônico, com kit de ensaio protéico (Pierce, Rockford, IL, USA) para, de forma padronizada, obter 50 µg de proteína de cada amostra. Um ensaio com um kit MILLIPLEX Rat 9 – Plex Multi-detector é um método rápido, é uma conveniente alternative ao Western Blotting (Pathway Magnetic Bead Kit). Este kit foi utilizado para detector mudanças nas quinases fosforiladas: ERK/MAP quinase 1/2 (Thr185/Tyr187), Akt (Ser473), STAT3 (Ser727), JNK (Thr183/Tyr185), p70 S6 kinase (Thr412), STAT5A/B (Tyr694/699), CREB (Ser133), e p38 (Thr180/Tyr182) em lisados celulares utilizando um sistema Luminex. Os procedimentos de imunoprecipitação foram realizados de acordo com os guidelines do fabricante. Os dados foram expressos com valores médios±DP da media da intensidade de fluorescência (MFI).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

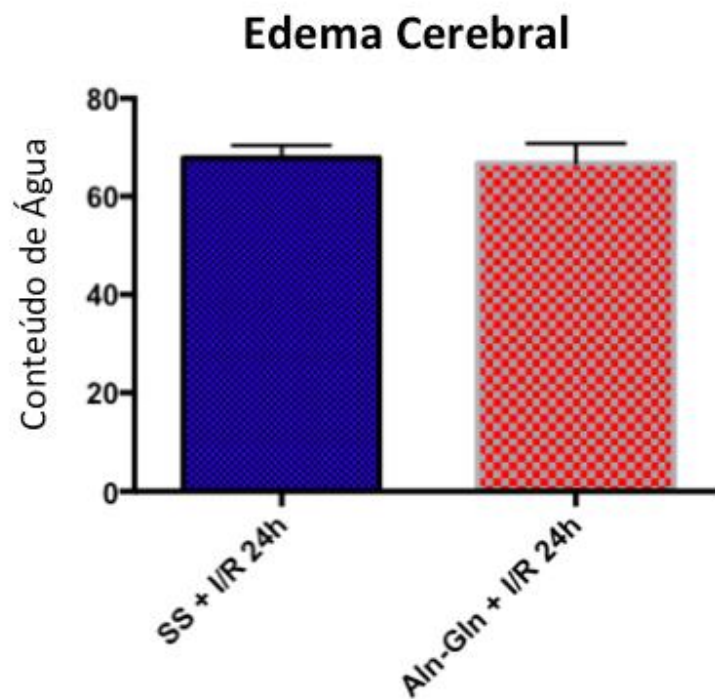
Os dados foram analisados pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov para testar sua distribuição. Os dados com distribuição normal foram submetidos a análise de variância simples (ANOVA), e em seguida, ao teste de comparações múltiplas de Tukey (para comparações entre três ou mais grupos), e os resultados expressos como média \pm DP. Dados não paramétricos (histopatologia) foram expressos como medianas e percentil (25-75), e analisados pelo teste de Mann Whitney. O nível de significância foi estabelecida em 5%.

4 RESULTADOS



Dados expressos como Média±DP – One Way ANOVA com Teste de Tukey.
* $p < 0,05$ quando comparado SS+IR vs Sham 24 h

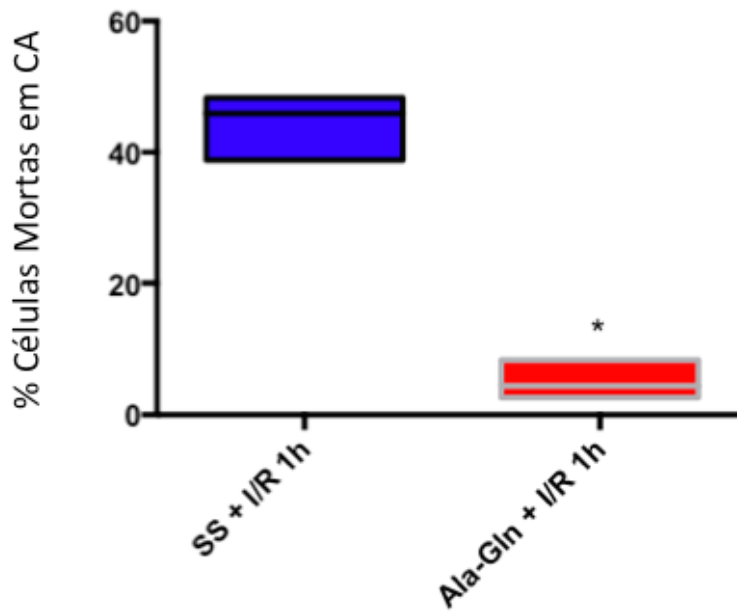
Figura E1



Dados expressos como Média±DP – One Way ANOVA com Teste de Tukey
P > 0,05 - NS - quando comparado Ala-Gln + I/R 24h vs SS+I/R 24h

Figura E2

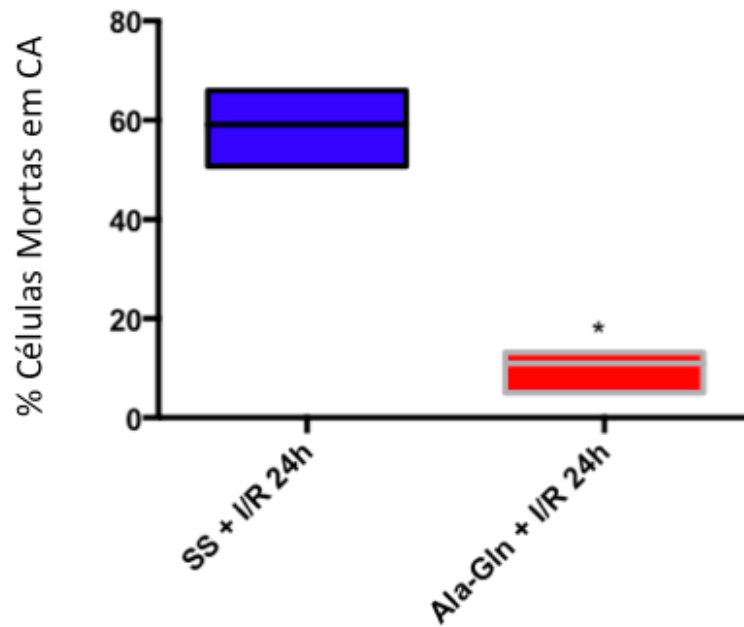
Contagem de Neurônios Vermelhos



Dados expressos como Média±Percentil – Teste de Mann-Whitney
P = 0,0286 quando comparado Ala-Gln+I/R 1h vs SS+I/R 1h

Figura N1

Contagem de Neurônios Vermelhos



Dados expressos como Média±Percentil – Teste de Mann-Whitney
P = 0,0290 quando comparado Ala-Gln+I/R 24h vs SS+I/R 24h

Figura N2

4.1 QUINASES

4.1.1 Proteína quinase B (AKT)

Houve diminuição significativa da expressão da AKT nos ratos tratados com salina após 1 h ($p < 0,05$) e após 24 h de isquemia ($p < 0,0001$). Não foram observadas diferenças significantes na comparação dos ratos tratados com Ala-Gln após 1/24h de isquemia, comparados aos respectivos controles (Tabela X1 e Figura X1).

TABELA X1 - Expressão da Proteína quinase B (AKT) nos ratos tratados com solução salina ou Alanil-Glutamina e submetidos à isquemia / reperfusão cerebral, após 1 e 24h do procedimento cirúrgico

GRUPOS					
Sham 1h	Sham 24 h	SS+I/R 1h	SS+I/R 24h	ALA-GLN+I/R 1h	ALA-GLN+I/R 24h
57,83±4,88	61,50±3,78	51,42±4,50 *	51,33±2,58***	54,42±5,10	52,00±4,06

* $p < 0,05$ - SS+IR 1h vs Sham 1h; *** $p < 0,0001$ SS+IR 24h vs Sham 24h

Teste *t* de Student (não pareado)

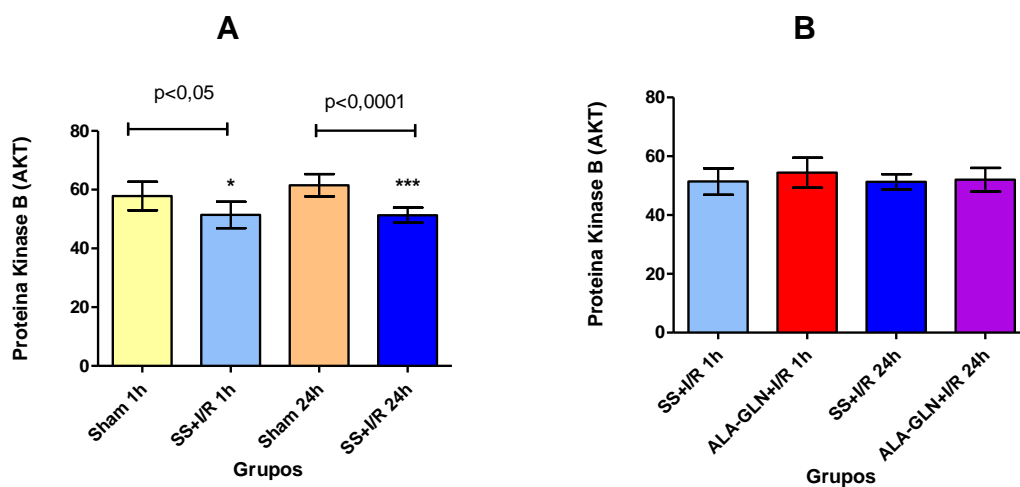


FIGURA X1 - Expressão da Proteína quinase B (AKT) nos ratos tratados com solução salina ou Alanil-Glutamina e submetidos à isquemia / reperfusão cerebral, após 1 e 24h do procedimento cirúrgico.

Teste *t* de Student (não pareado) * $p = 0,05$, *** $p < 0,0001$

A - O modelo B= O efeito droga

4.1.2 Quinase extra-celular sinal-regulada (ERK)

Houve diminuição significativa da expressão da quinase ERK nos ratos tratados com salina ($p < 0,01$) e nos ratos tratados com GLN ($p < 0,01$), 24 h após a isquemia. Houve aumento significativo da expressão da quinase ERK nos ratos tratados com GLN ($p < 0,01$), 1 h após a isquemia (Tabela X2 e Figura X2).

TABELA X2 - Expressão da Quinase extra-celular sinal-regulada (ERK) nos ratos tratados com solução salina ou Alanil-Glutamina e submetidos à isquemia / reperfusão cerebral, após 1 e 24h do procedimento cirúrgico

GRUPOS					
Sham 1h	Sham 24 h	SS+I/R 1h	SS+I/R 24h	ALA-GLN+I/R 1h	ALA-GLN+I/R 24h
1181,00±540,70	1194,00±431,80	344,30±121,90	525,50±143,40**	482,10±138,80**	285,80±122,10**

**p<0,01 - SS+I/R 1h vs Sham 1h **p<0,01- ALA-GLN+I/R 1h vs SS+I/R 1h

**p<0,01 - SS+I/R 24h vs Sham 24h **p<0,01- ALA-GLN+I/R 24h vs SS+I/R 24h

Testes:ANOVA / Tukey

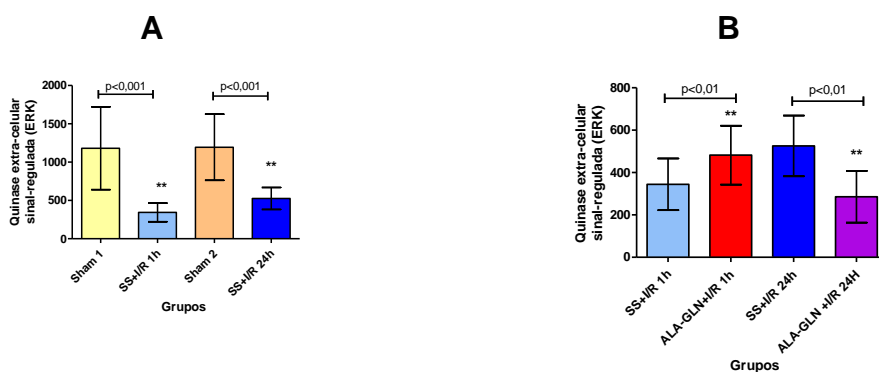


FIGURA X2 - Expressão da Quinase extra-celular sinal-regulada (ERK) nos ratos tratados com solução salina ou Alanil-Glutamina e submetidos à isquemia / reperfusão cerebral, após 1 e 24h do procedimento cirúrgico.

Teste *t* de Student (não pareado) **p=0,05, ***p<0.001. ****p<0.0001

A - O modelo **B**= O efeito droga

4.1.3 Quinase com N-terminal C-Jun (JNK)

Houve aumento significativo da expressão da quinase JNK nos ratos tratados com salina (p<0,0001) 24 h após a isquemia. Houve diminuição significativa da expressão da quinase JNK nos ratos tratados com ALA-GLN (p<0,001), 1 e 24 h após a isquemia. Tabela X3 e Figura X3).

TABELA X3 - Expressão da Quinase com N-terminal C-Jun (JNK) nos ratos

tratados com solução salina ou Alanil-Glutamina e submetidos à isquemia / reperfusão cerebral, após 1 e 24h do procedimento cirúrgico

GRUPOS					
Sham 1h	Sham 24 h	SS+I/R 1h	SS+I/R 24h	ALA-GLN+I/R 1h	ALA-GLN+I/R 24h
2327,00±135,20	1085,00±282,10	2424,00±191,50	2151,00±420,00	1004,00±295,60	161,00±225,60***
			***	***	

***p<0,0001 - SS+I/R 24h vs Sham 24h ***p<0,0001 ALA-GLN+I/R 1h vs- SS+I/R 1h

***p<0,0001 ALA-GLN+I/R 24h vs- SS+I/R 24h

Teste *t* de Student (não pareado)

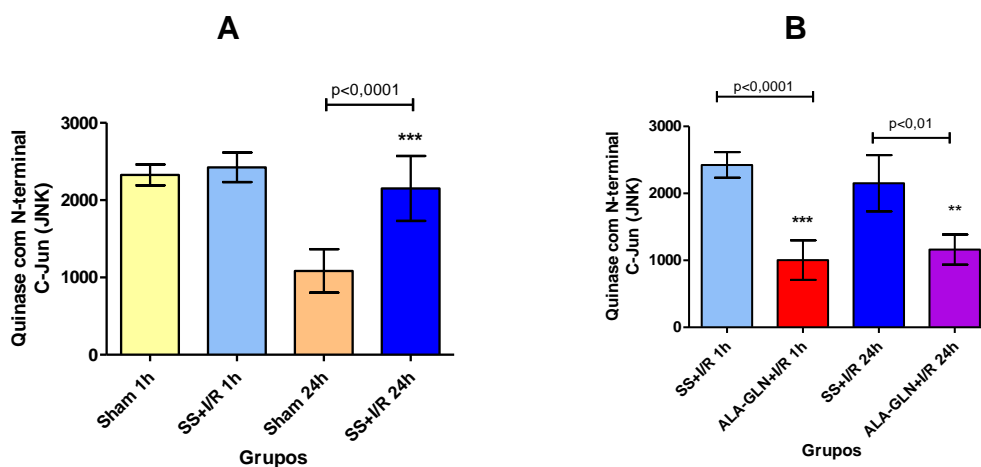


FIGURA X3 - Expressão da Quinase extra-celular sinal-regulada (ERK) nos ratos tratados com solução salina ou Alanil-Glutamina e submetidos à isquemia / reperfusão cerebral, após 1 e 24h do procedimento cirúrgico.

Teste *t* de Student (não pareado) ***p<0.0001

A - O modelo B= O efeito droga

4.1.4 Quinase da proteína mitogen-ativada (P38)

Houve diminuição significativa da expressão da quinase P38 nos ratos tratados com salina 1 h (p<0,01) e 24h (p<0,0001) de isquemia e após 24h nos ratos submetidos à I/R cerebral, comparados aos respectivos controles. Houve aumento significativo da expressão da quinase P38 nos ratos tratados com Ala-Gln após 1 h de I/R cerebral Tabela X4 e Figura X4).

TABELA X4 - Expressão da Quinase da proteína mitogen-ativada (P38) nos ratos tratados com solução salina ou Alanil-Glutamina e submetidos à isquemia

/ reperfusão cerebral, após 1 e 24h do procedimento cirúrgico

GRUPOS					
Sham 1h	Sham 24 h	SS+I/R 1h	SS+I/R 24h	ALA-GLN+I/R 1h	ALA-GLN+I/R 24h
78,25±6,46	78,42±5,89	64,50±4,43*	69,92±5,63***	73,67±4,13**	68,30±7,60

*p<0,05- SS+I/R 1h vs Sham 1h ***p<0,0001 SS+I/R 24h vs Sham 24h

***p<0,001 ALA-GLN+I/R 1h vs- SS+I/R 1h

Teste *t* de Student (não pareado)

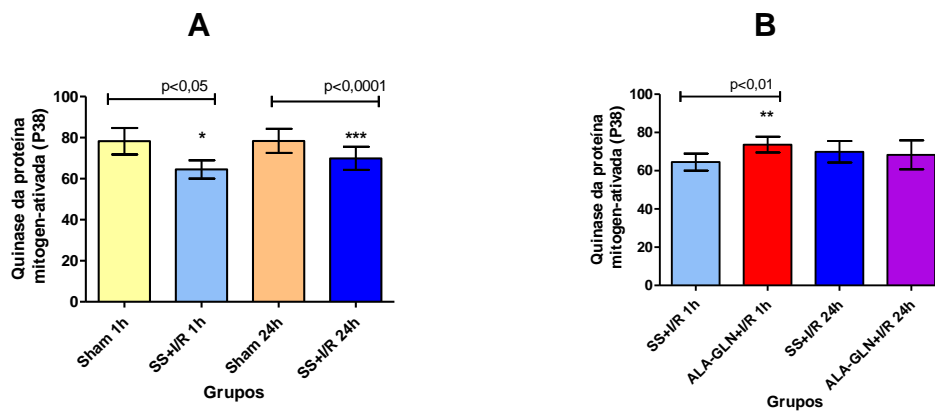


FIGURA X4 - Expressão da Quinase da proteína mitogen-ativada (P38) nos ratos tratados com solução salina ou Alanil-Glutamina e submetidos à isquemia / reperfusão cerebral, após 1 e 24h do procedimento cirúrgico.

Teste *t* de Student (não pareado) *p<0.05 **p<0.01***p<0.0001

A - O modelo B= O efeito droga

4.1.5 Quinase da proteína ribossomal S6 (P70)

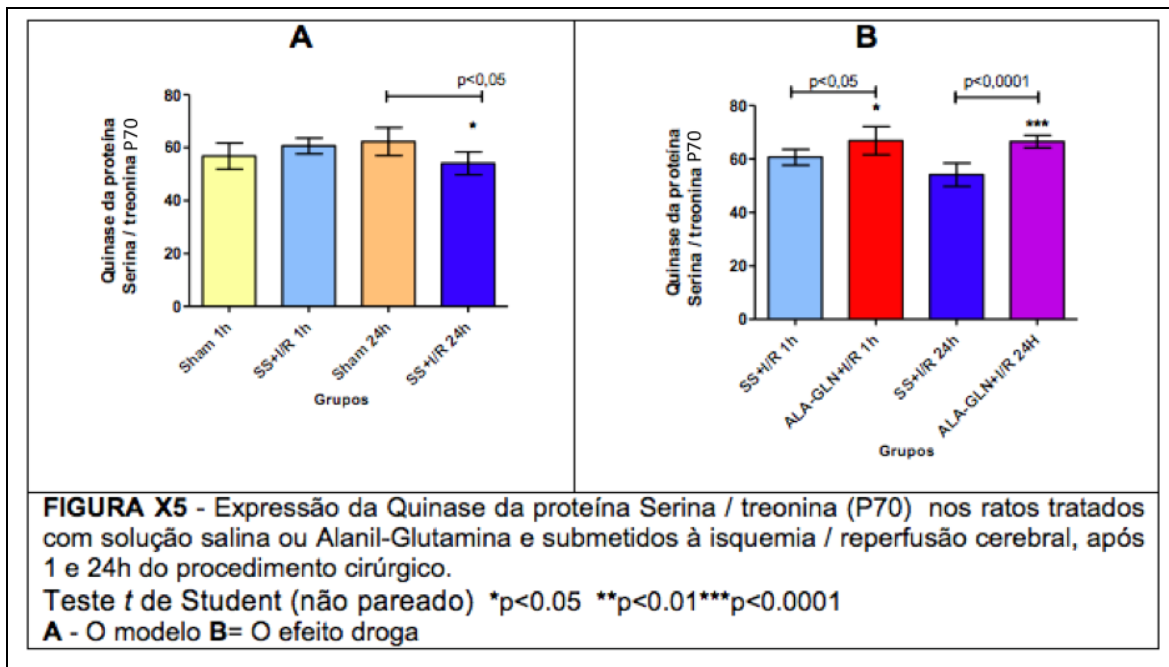
Houve diminuição significativa da expressão da quinase P70 nos ratos do grupo SHAM 24h comparado ao grupo SS-IR 24h (p<0,05). Houve aumento significativo da P70 nos ratos tratados com GLN (p<0,05 e p<0,0001), 1h e 24 h após a isquemia, comparados aos respectivos controles (SS+IR 1h e SS+IR 24h)

TABELA X5 - Expressão da Quinase ribossomal S6 (P70) nos ratos tratados com solução salina ou Alanil-Glutamina e submetidos à isquemia / reperfusão cerebral, após 1 e 24h do procedimento cirúrgico

GRUPOS					
Sham 1h	Sham 24 h	SS+I/R 1h	SS+I/R 24h	ALA-GLN+I/R 1h	ALA-GLN+I/R 24h

			54,08±4,32*		
56,83±4,96	62,33±5,28	60,67±2,99		66,83±5,27*	66,50±2,34***

*p<0.05 - SS+I/R 24h vs Sham 24h **p<0.05 - GLN+I/R 1h vs SS+IR 1h ***p<0,001
GLN+I/R 24h vs SS+I/R 24h. Teste t de Student (não pareado)



4.2 TRANSDUTORES DE SINAL E ATIVADORES DA TRANSCRIÇÃO

4.2.1 - Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT 3)

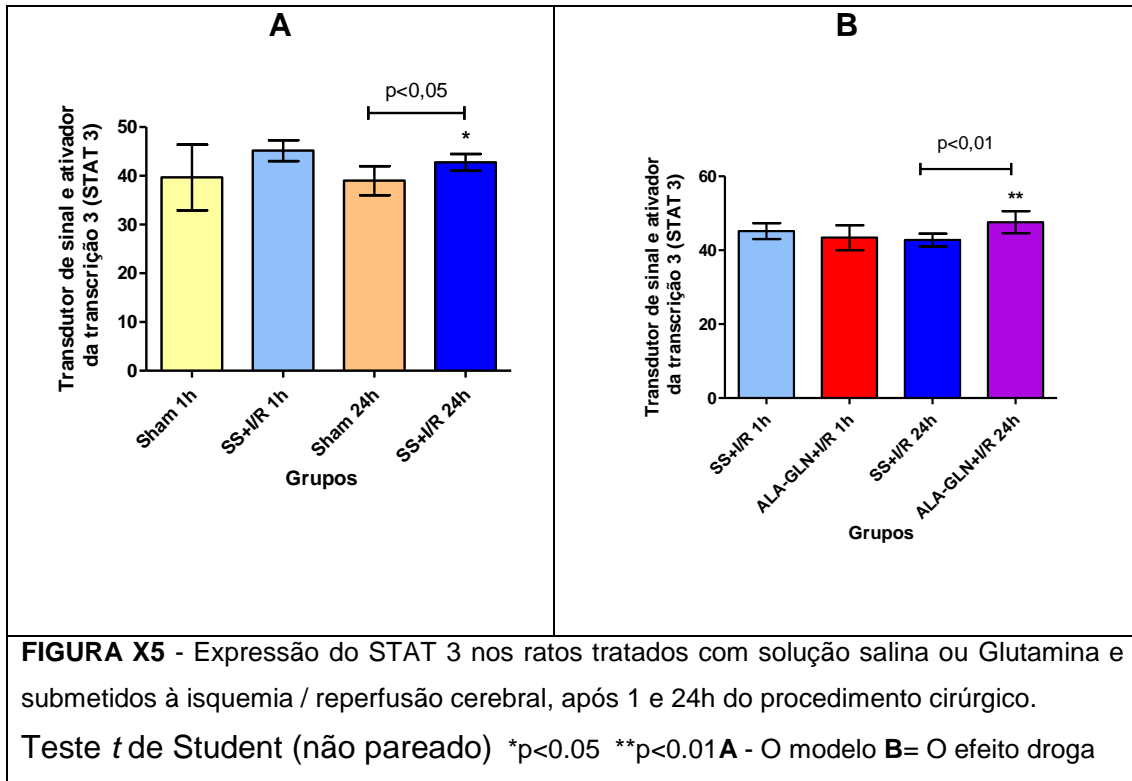
Houve aumento significativo da expressão do STAT 3 nos ratos do grupo SS+IR 24h vs. SHAM 24h e no grupo GLN+IR 24h comparado ao grupo SS+IR 24h (p<0,001) (Tabela X6 e Figura X6).

TABELA X6 - Expressão do STAT 3 nos ratos tratados com solução salina ou Glutamina e submetidos à isquemia / reperusão cerebral, após 1 e 24h do procedimento cirúrgico

GRUPOS					
Sham 1h	Sham 24 h	SS+I/R 1h	SS+I/R 24h	GLN+I/R 1h	GLN+I/R 24h
39,67±6,71	39,00±2,97	45,17±2,14	42,75±1,72*	43,42±3,38	47,60±2,97**

*p<0.05- SS+IR 24h vs Sham 24 h; **p<0.01- ALA-GLN+I/R 24h vs SS+IR 24h

Teste t de Student (não pareado)



4.2.2 - Transdutor de sinal e ativador da transcrição 5 (STAT 5)

Não foram observadas diferenças significantes na comparação dos grupos submetidos à isquemia/reperfusão comparados aos controles (Tabela X7, Figura X7)

TABELA X7 - Expressão do STAT 5 nos ratos tratados com solução salina ou Glutamina e submetidos à isquemia / reperfusão cerebral, após 1 e 24h do procedimento cirúrgico

GRUPOS					
Sham 1h	Sham 24 h	SS+I/R 1h	SS+I/R 24h	GLU+I/R 1h	GLU+I/R 24h
70,17±5,27	72,5±2,81	72,33±3,61	72,33±3,43	73,83±4,83	70,6±3,36

Teste *t* de Student (não pareado) diferenças não significantes

A	B

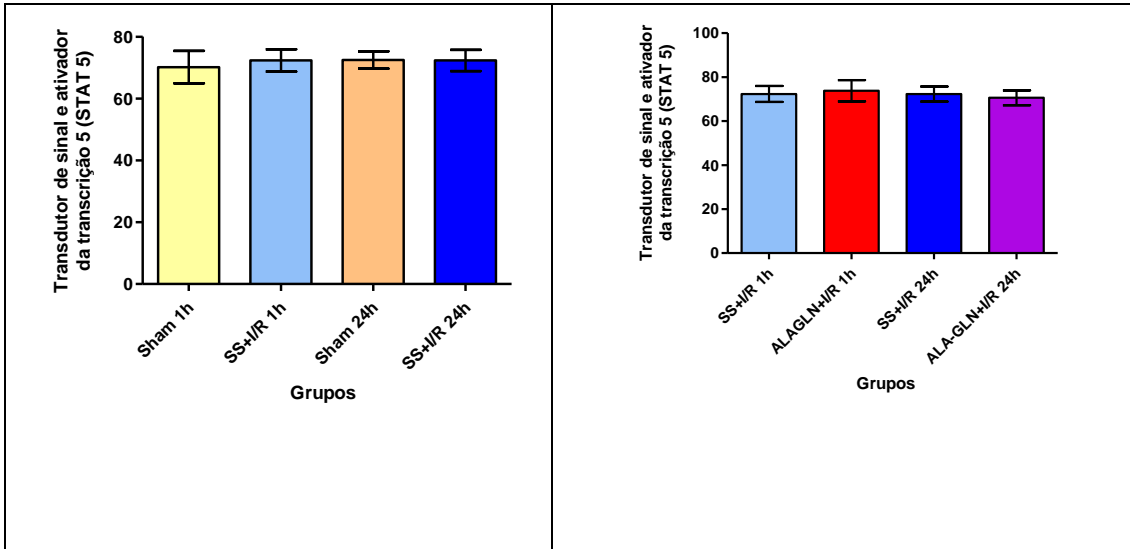


FIGURA X7 - Expressão do STAT 5 nos ratos tratados com solução salina ou Glutamina e submetidos à isquemia / reperfusão cerebral, após 1 e 24h do procedimento cirúrgico. Teste *t* de Student (não pareado) diferenças não significantes
A- O modelo **B=** O efeito droga

4.3 Proteína de ligação em resposta ao cAMP (CREB)

Houve diminuição significativa da expressão do CREB nos ratos tratados com salina ($p < 0,01$) 1 e 24 h após a isquemia e nos ratos tratados com GLN ($p < 0,5$) 24h após a isquemia. (Tabela X9 e Figura X9).

TABELA X8 - Expressão do CREB nos ratos tratados com solução salina ou Glutamina e submetidos à isquemia / reperfusão cerebral, após 1 e 24h do procedimento cirúrgico

GRUPOS					
Sham 1h	Sham 24 h	SS+I/R 1h	SS+I/R 24h	GLN+I/R 1h	GLN+I/R 24h
57,50±5,50	57,00±3,95	49,00±4,52**	45,75±2,50***	53,08±2,54	53,40±2,30*

* $p < 0,05$ SS+I/R 1h VS SHAM 1H ; *** $p < 0,001$ SS+I/R 24h vs SHAM 24h vs

*** $p < 0,001$ - ALA-GLN 24h vs SS+I/R 24h

A	B
----------	----------

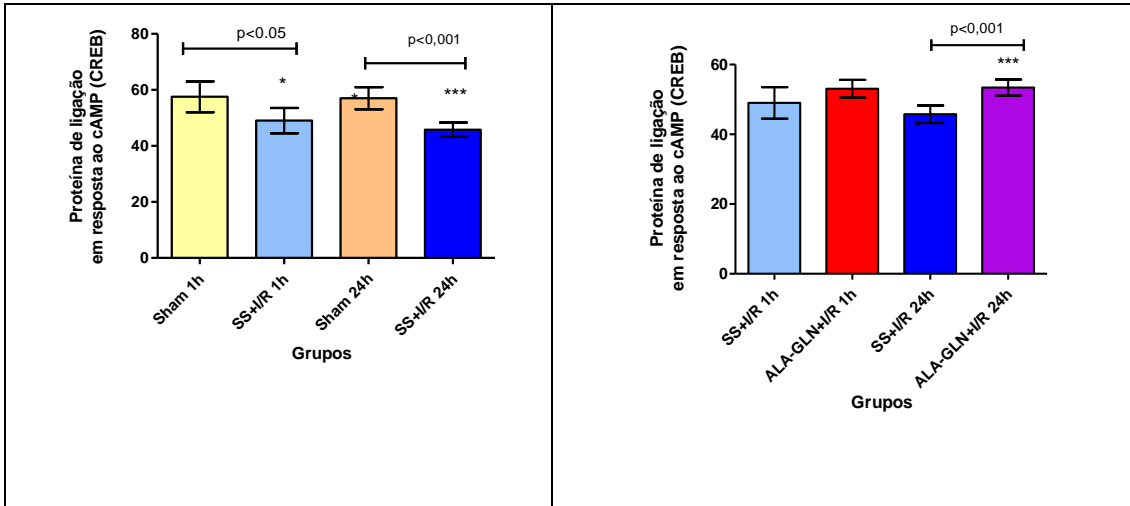


FIGURA X8 - Expressão da Proteína de ligação em resposta ao cAMP (CREB) nos ratos tratados com solução salina ou Alanil-Glutamina e submetidos à isquemia / reperfusão cerebral, após 1 e 24h do procedimento cirúrgico.

Teste *t* de Student (não pareado) * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$

A - O modelo **B** = O efeito droga

5 DISCUSSÃO

Nutracêuticos têm sido usados ou como ferramenta de pré-condicionamento ou como tratamento a fim de modular a resposta metabólico/oxidativa ao trauma, dentre os quais, à lesão de isquemia/reperfusão (Vasconcelos et al, 2011). Pré-condicionamento com l-alanil-glutamina em esquilos da mongólia submetidos a isquemia/reperfusão cerebral tem sido reportado como capaz de reduzir o estresse oxidativo no tecido cerebral (Pires et al, 2011) e de reduzir, em ratos, a área de morte cerebral consequente da lesão de I/R cerebral global (Nogueira, 2010). Pós-condicionamento cerebral isquêmico é a indução de breve períodos de I/R antes da realização da lesão isquêmica, e tem sido demonstrado promover efeitos neuroprotetores. O pós-condicionamento isquêmico resulta em significativo aumento na expressão da enzima glutamina sintetase (GS) comparados grupos pós-condicionados com grupos sham. Isto sugere que elevação da atividade da GS após a I/R constitui-se em mecanismo neuroprotetor (Zang et al, 2011), ressaltando a relevância da disponibilidade de glutamina para o tecido cerebral lesionado. O pré-condicionamento com l-alanil-glutamina aumenta a disponibilidade de glutamina, a qual é utilizada por tecidos ricos em glutaminase. A prévia utilização de l-ala-gln, por via endovenosa, tem sido demonstrada diminuir necrose cerebral em modelo de rato submetido a I/R cerebral global, promovendo portanto neuroproteção (Nogueira, 2010).

Jiedu Tongluo, uma injeção com extrato complexo de ervas, tem sido demonstrado apresentar um efeito protetor sobre o cérebro de ratos contra o edema cerebral induzido pela lesão cerebral focal de I/R (Wu et al, 2014). In vitro, uma nova liga mutidirecionada (JM-20 – 1 e 10 μ M) administrada durante a reperfusão reduziu significativamente a morte celular em segmentos de tecido do hipocampo submetidos à deprivação de oxigênio e glicose. In vivo, tratamento com JM-20 (4 e 8mg/kg) diminuiu significativamente os escores de déficit neurológico, a formação de edema, os volumes de infarto cerebral e alterações histológicas em diferentes regiões do cérebro (Nuñez-Figueredo et al, 2014). Rapamicina teve ação na melhora da progressão do edema cerebral após a lesão de reperfusão agindo por meio da manutenção da integridade da barreira hemato-encefálica e pela inibição das expressões da metaloproteinase 9 e da aquaporina 4 (AQP4) (Guo et al, 2014). No presente estudo, a lesão de I/R causou edema 24h após a reperfusão (Fig E1). O

pré-condicionamento com l-alanil-glutamina não apresentou nenhum efeito sobre o desenvolvimento do edema cerebral 24 h após a lesão global de isquemia/reperfusão (Fig E2).

Infusão intra-venosa prévia de l-ala-gln em esquilos da Mongólia submetidos a lesão cerebral de isquemia/reperfusão demonstrou redução na degeneração nuclear (piquinose) e na morte cerebral (contagem de neurônios vermelhos) no tecido cerebral (Pires et al, 2011). Pré-condicionamento com misturas de óleos contendo elevada relação ω -9/ ω -6 e baixa relação ω -6/ ω -3 protegeu neurônios do hipocampo contra a lesão de I/R em um modelo de isquemia/reperfusão cerebral global agindo por meio da diminuição da contagem de neurônios vermelhos em CA3 (Pinheiro et al, 2011). Óleos de peixe ω -3 promoveram decréscimo no estado oxidativo e em mudanças apoptóticas durante a isquemia em hipocampo do rato, podendo a suplementação dietética com óleos n-3 ser benéfica para preservar ou melhorar a doença vascular isquêmica cerebral (Bas et al, 2007). No presente estudo, a administração endovenosa prévia de l-ala-gln reduziu morte cerebral (contagem de neurônios vermelhos) tanto 1h quanto 24h após a indução de lesão de isquemia/reperfusão cerebral global em ratos (Figs. N1 e N2).

Enquanto o pré-condicionamento isquêmico deflagra defesas contra um future evento pela exposição do hospedeiro a uma menor amostra do mesmo evento, o pré-condicionamento por oferta prévia de substrates ou nutracêuticos alarma genes protetores para produzir enzimas e proteínas, incluindo as proteínas quinase, tornando-as disponível quando a lesão principal ocorre a fim de ensejar endurance e de diminuir a magnitude da resposta à lesão futura. As quinases têm sido demonstradas desempenhar vários papéis sobre a lesão de isquemia/reperfusão em vários órgãos em estudos experimentais (Wang et al, 2003; Gao et al, 2005; Sun et al, 2007; Lei et al 2011; Lan et al, 2013; Lin et al, 2013; Deb et al, 2013; Chen et al, 2013).

A fosforilação da AKT resultou em decréscimo na lesão de I/R hepatocellular e elevar a taxa de sobrevivência em camundongos pré-condicionados com hélio (Zhang et al, 2014). Sulfeto de hidrogênio (H_2S) é um potente vasodilatador com ação reguladora da homeostase cardiovascular. A fosforilação da mTORC2 da AKT parecer ser um mediador chave na indução de cardioproteção por este vasodilatador na lesão de isquemia/reperfusão (Zhou et al, 2014). Jang et al (2014) indicaram que

o pré-condicionamento com sulfato de hidrogênio é capaz de restaurar a função neurológica após infarto cerebral por meio da promoção de angiogênese. H₂S estimulou a migração de células endoteliais, e a formação de tubos por meio da sinalização de P13K/AKT. Um estudo com indução de I/R global cerebral indicou que a combinação do complexo FKBP51-PHLPP2-AKT desempenha um papel crítico na mediação da morte cerebral em consequência da lesão de isquemia/reperfusão (Wei et al, 2014). No presente estudo, a lesão cerebral de I/R induziu redução nas concentrações de AKT 1h após a reperfusão (Fig X1). Entretanto, o pré-condicionamento com l-alanil-glutamina não resultou em mudanças nas concentrações desta quinase nem 1h ou tampouco 24 h após a reperfusão (Fig X1).

A genisteína, um fitoestrógeno natural, tem sido sugerida como sendo um agente neuroprotetor em potencial. Foi demonstrado em camundongos, pré-condicionados com genisteína e submetidos à lesão de isquemia/reperfusão cerebral focal, que houve aumento na fosforilação de ERK1/2 durante a reperfusão com consequente redução da severidade dos episódios de infarto cerebral subsequentes (Wang et al, 2014). Flavonóides totais de *Rhododendra simsii* promoveram significativa recuperação do EEG de ratos em modelo de lesão de I/R cerebral global provavelmente por mecanismo associado com o aumento da ativação de ERK1/2 (Guo et al, 2012). Os resultados oriundos do presente estudo indicaram redução nas concentrações de ERK em tecido cerebral após 1h e 24h da lesão de I/R global. O pré-condicionamento com o dipeptídeo l-alanil-glutamina, por outro lado, elevou significativamente a concentração cerebral de ERK 1h após a reperfusão, possivelmente propiciando neuroproteção neste tempo pós-lesão. Entretanto, 24h após a reperfusão cerebral as concentrações de ERK permaneceram baixas seguindo o mesmo padrão do grupo submetido a I/R cerebral focal pré-condicionado com solução salina (Fig X2).

Tanto as vias do metabolismo energético quanto as da apoptose durante a lesão de isquemia/reperfusão incluem o sinal de transdução da proteína quinase c-JUN terminal (Gao et al, 2005). Huang et al (2012) estudaram os efeitos neuroprotetores do extrato de astragalos utilizando um modelo de pinçamento bilateral da artéria carótida interna em camundongos para induzir I/R cerebral. Estes

autores demonstraram que o extrato de astragalos elevou significativamente a sobrevivência do neurócito e reduziu tanto a taxa de apoptose quanto a redução da expressão da quinase JNK1/2. No presente estudo, a lesão de I/R cerebral global induziu elevação nas concentrações de JNK 24h após a reperfusão. Por outro lado, o pré-condicionamento com l-alanil-glutamina reduziu as concentrações de JNK em tecido cerebral tanto 1h quanto 24h após a reperfusão, podendo ter exercido efeito neuroprotetor por redução da apoptose (Fig X3).

Estudo recente, utilizando lesão cerebral focal de I/R em ratos, sugere que a proteína-7 morfogênica para tecido ósseo (BMP-7) contribui para a tolerância à isquemia via pré-condicionamento cerebral isquêmico (IPC) pela ativação da via de sinalização da quinase p38 MAPK (Guan et al, 2014). No presente estudo, a lesão cerebral de I/R induziu diminuição nas concentrações cerebrais de P38 tanto a 1h quanto a 24h do início da reperfusão. Por outro lado, o pré-condicionamento com l-alanil-glutamina elevou as concentrações de P38 em tecido cerebral 1h pós-reperfusão (Fig X4).

Extrato rico em flavonoids (FRE) oriundo da fruta *Rosa laevigata* Michx melhorou a taxa de sobrevivência e previniu sequelas devido à lesão cerebral de I/R, assim como danos histológicos. Os mecanismos envolvidos incluem diminuição das expressões de NF- κ B, iNOS, MMP-9, COX-2, TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, e redução das expressões das vias de p-JNK, p-ERK e p38 em MAPK (Zhang et al, 2013). A isquemia cerebral global transiente aciona a supressão do processo de iniciação da síntese protéica, o qual é controlada pela função do retículo endoplasmático. Mengesdorf et al (2002) utilizando um modelo de isquemia cerebral focal em camundongos, investigaram mudanças decorrentes da isquemia nas concentrações de proteínas e nos estados de fosforilação dos fatores de iniciação eIF2 α , eIF2B epsilon, and eIF4G1 and of p70 S6 quinase. A quinase p70 foi completamente desfosforilada durante a isquemia, e a fosforilação não retornou aos níveis de recuperação completa após a reperfusão. A isquemia incompleta do cortex frontal e do hipocampo foi induzida em ratos, por meio do modelo de oclusão dos quatro vasos, e a atividade da p70 avaliada. A atividade da p70(S6K), que foi inibida em ambas as regiões durante a isquemia, retornou aos valores encontrados em controles, primeiro no hipocampo e depois no cortex (Martín de la Vega, 2001). A quinase serina-treonina Akt1 promove sobrevivência celular, por meio da inibição de

apoptose. Um dos potenciais alvos de ação da Akt1 é a quinase p70S6. A sinalização de vias que promovem sobrevivências celulares, tais como Akt1 e p70S6, é suprimida em decorrência de um evento de isquemia focal, fato este que contribui para a morte neuronal após a lesão isquêmica (Janelidze et al, 2001). A regulação da fosforilação protéica requer interações coordenadas entre as proteínas quinases e as proteínas fosfatases. O receptor de glutamate metabotrópico acoplado à proteína G α q (mGluR)₅ regula a elevação da ativação por fosforilação de MAPK/ERK1/2 e o aumento da fosforilação da tirosina (Tyr307) da PP2A, a qual é dependente da ativação de uma família de tirosina quinase chamada p60c-Src nos neurônios (Mao, 2005). A proteína tirosina quinase, p70, é sabidamente sofrer extensa fosforilação em treonina no seu terminal amino durante a mitose e pode exercer um papel sobre a proliferação celular e sobrevivência (Morgan et al, 1989). Os presentes resultados demonstraram diminuição nas concentrações tissulares cerebrais de P70 em ratos submetidos a I/R 24 h pós-reperfusão. De forma contrária, o pré-condicionamento com l-alanil-glutamina elevou as concentrações cerebrais de P70 1h e 24h após a perfusão (Fig X5).

Durante a lesão de I/R cerebral sinais transdutores e ativadores da transcrição e ativação da quinase STAT-1 estão associados com morte neuronal cerebral, contribuindo para a lesão isquêmica. Fludabarina, um inibidor específico da proteína STAT1, inibiu o nível de expressão da STAT1 fosforilada em modelo de lesão de I/R cerebral focal (Xu et al, 2014). Eritropoetina (EPO) promove regeneração por meio da proteína STAT3 e facilita a sobrevivência neuronal após a lesão isquêmica. As proteínas quinases P-STAT1 e P-STAT3 encontraram-se ligeiramente diminuídos e significativamente elevados, respectivamente, após tratamento com EPO. Os autores sugerem que a EPO exerce um efeito neuroprotetor por influenciarem a expressão de STAT3 e STAT1 na área lesada pela I/R, utilizando um modelo de isquemia/reperfusão focal em ratos (Jiang et al, 2013). Por outro lado, efeitos neuroprotetores têm sido obtidos por meio de limpadores de substâncias reativas ao oxigênio (ROS) e pela regulação negativa com redução da ativação de STAT3 (Lei et al, 2011). Os resultados deste trabalho apontam para um aumento nas concentrações cerebrais de STAT3, em resposta à lesão de I/R cerebral global, 24h após a perfusão. O mesmo ocorreu no tecido cerebral de animais submetidos a I/R cerebral global pré-condicionados com l-alanil-glutamina 24h após a perfusão (Fig

X6).

Sun *et al* (2007) determinaram as alterações gerais da expressão do gene STAT no hipocampo de ratos submetidos à I/R cerebral focal com o uso de análises de microarray. Os resultados deste estudo sugerem que a expressão dos genes STAT2, 5a, 5b e 6, assim como a sinalização da citocina (SOCS)4 estavam elevadas pela isquemia, provavelmente devido a uma resposta compensatória do cérebro, a qual pode exercer um papel protetor no tecido cerebral lesado. Não houve, no presente estudo, mudanças nas concentrações da proteína STAT5, seja em resposta à lesão de I/R cerebral global ou como resultado do pré-condicionamento com l-alanil-glutamina (Fig X7).

Calcitriol tem sido demonstrado promover neuroproteção contra a lesão de I/R. O efeito neuroprotetor do calcitriol foi investigado em ratos expostos à lesão de I/R cerebral induzida pela oclusão da artéria cerebral media. A administração intraperitoneal de calcitriol reduziu significativamente os volumes dos infartos cerebrais sete dias após a reperfusão. Estes resultados foram acompanhados pela elevação da atividade de p-CREB em neurônios do hipocampo (Fu et al, 2013). No presente estudo, não houve elevação nas concentrações da proteína CREB no tecido cerebral de animais pré-condicionados com l-alanil-glutamina 24 h após a reperfusão. Por outro lado, a lesão de I/R cerebral global reduziu as concentrações cerebrais de CREB tanto 1h quanto 24h após a reperfusão (Fig X8).

O pré-condicionamento com l-alanil-glutamina parece ter efetivo neuroprotetor pela modulação das vias intracelulares das proteínas quinases, já que promoveu um decréscimo nas concentrações cerebrais de JNK, tanto a 1h, quanto a 24h da reperfusão. Por outro lado, induziu elevação nas concentrações da proteína P70 em tecidos cerebrais, tanto 1h, quanto 24h pós-reperfusão. O pré-condicionamento com este dipeptídeo causou elevação precoce nas concentrações cerebrais da proteína P38, 1h após a reperfusão, e promoveu elevação tardia nas concentrações em tecidos cerebrais da proteína CREB 24 h após a reperfusão.

Mais estudos são necessários para ajudar a elucidar modificações na expressão de genes neuroprotetores, na atuação de agentes anti-apoptóticos, e no entendimento do papel dos diversos tipos de anti-oxidantes na proteção da lesão de

isquemia/reperfusão cerebral, tanto focal quanto difusa. Estudos experimentais e clínicos devem ser envisados, visando proteção contra o infarto cerebral já ocorrido, ou seja, estudos de pós-condicionamento contra a lesão de reperfusão com possíveis futuras aplicações clínicas em indivíduos que já chegam às unidades terciárias especializadas com a lesão isquêmica instalada.

6 CONCLUSÃO

1. O pré-condicionamento utilizando l-alanil-glutamina, frente à lesão de isquemia/reperfusão cerebral global, não modifica o desenvolvimento e evolução do edema cerebral.
2. Promove neuroproteção reduzindo morte celular neuronal por contagem de neurônios vermelhos.
3. O pré-condicionamento administrando l-alanil-glutamina tem ação neuroprotetora, por meio da modulação das vias intracelulares das proteínas quinases, reduzindo as concentrações cerebrais de JNK, e elevando as concentrações em tecido cerebral das proteínas quinases P70, P38 e CREB, após a reperfusão.

7 REFERÊNCIAS

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

ALEXANDROVA, M. L.; BOCHEV, P. G. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. **Free Radical Biology & Medicine**, v.39, p. 297-316, 2005.

ALVES, W. F.; GUIMARÃES, S. B.; VASCONCELOS, P. R. C.; VASCONCELOS, P. R. L. Repercussões da L-alanil-glutamina sobre as concentrações de lactato e lactato desidrogenase (LDH) em pacientes com isquemia crítica dos membros inferiores submetidos à revascularização distal. **Acta Cir. Bras.**, v. 18, n. 3, 2003.

ALVES, M. A.; GUIMARÃES, S. B.; DIAS, D. A.; VASCONCELOS, P. R. C.; COELHO, V. P. M.; VASCONCELOS, P. R. L. Effects of L-alanyl-glutamine upon the blood and kidney biochemical parameters in the rat hind limb model of ischemia/reperfusion. **Acta Cirurg. Bras.**, v. 20, n. 6, 2005.

Alves WF, Aguiar EE, Guimarães SB, da Silva Filho AR, Pinheiro PM, Soares Gdos S, de Vasconcelos PR. 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.* 2010 May;24(4):461-7. doi: 10.1016/j.avsg.2010.01.005. Epub 2010 Apr 3. PMID:20371164 [PubMed - indexed for MEDLINE]

ARAÚJO JÚNIOR, R.J.C.; SILVA JÚNIOR, R.G.; VASCONCELOS, M.P.P.; GUIMARÃES, S.B.; VASCONCELOS, P.R.L.; GARCIA, J.H.P. Preconditioning with L-alanyl-glutamine reduces hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Acta Cir. Bras.* [online]. 2011, vol.26, suppl.1, pp. 8-13. ISSN 1678-2674. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502011000700003>.

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.

BAS O¹, SONGUR, SAHIN O, MOLLAOGLU H, OZEN OA, YAMAN M, ESER O, FIDAN H, YAGMURCA M.A. The protective effect of fish n-3 fatty acids on cerebral ischemia in rat hippocampus. **Neurochem Int.** 2007 Feb;50(3):548-54. Epub 2006 Dec 21.

BEDERSEM, J. D.; PITTS, L. H.; GERMANO, S. M.; NISHIMURA, M. C.; DAVIS, R. L.; BARTKOWSKI, H. M. Evaluation of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. **Stroke**, v. 17, p. 1304-1308, 1986.

BENEDEK, A. B.; MÓRICZA, K.; JURÁNYIA, Z.; GIGLERA, G.; GYÖRGY LÉVAYA,

LÁSZLÓ G. HÁRSING JR., A.; PÉTER MÁTYUSB, GÁBOR SZÉNÁSIA; MIHÁLY ALBERT, A. Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phases of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. **Brain Research**, v. 1116, p. 159-165, 2006.

BERG A, ROOYACKERS O, NORBERG A, WERNERMAN J. Elimination kinetics of L-alanyl-L-glutamine in ICU patients. Amino Acids. 2005 Nov;29(3):221-8. Epub 2005 Aug 1.

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.

BOSE, B.; JONES, S. C.; LORIG, R.; FRIEL, H. T.; WEINSTEIN, M.; LITTLE, JR. Evolving focal cerebral ischemia in cats: spatial correlation of nuclear magnetic resonance image, cerebral blood flow, tetrazolium staining, and histopathology. **Stroke**, 1988.

BRITO, G. C. F. Clostridium difficile toxin A induces intestinal epithelial cell apoptosis and damage: role of Gln and Ala-Gln in toxin and effects. **Dig. Dis. Sci.**, v.50, n.7, p. 1271-1278, 2005.

BROWN, A. W.; BRIERLY, Y. J. B. The nature, distribution and earliest stages of anoxic ischemic nerve cell damage in the rat brain as defined by optical microscope. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 49, p. 78-106, 1968.

BUSTO, R. M.; GINSBERG, M. D. Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. **Stroke**, v. 20, p. 904-910, 1989.

CARNEIRO-FILHO, B. B. Glutamine analogues as adjunctive therapy for infectious diarrhea. **Curr. Infect. Dis. Rep.**, v. 5, n. 2, p. 114-119, 2003.

CARNEIRO-FILHO, B. L. Intestinal barrier function and secretion in methotrexate-induced rat intestinal mucositis. **Dig. Dis. Sci.**, v. 9, n. 1, p. 65-72, 2004a.

Chen A, Xiong LJ, Tong Y, Mao M. Neuroprotective effect of brain-derived neurotrophic factor mediated by autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway. **Mol Med Rep**. 2013 Oct;8(4):1011-6. doi: 10.3892/mmr.2013.1628. Epub 2013 Aug 13.

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

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: Editora Probel, cap. 65, p. 644-645, 1998.

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. 10-14, 1994.

COTRAN, R.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. **Robbins' Patologia** estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 5a. Ed., c.1, p. 105-173, 1996.

CUNHA FILHO JF, GONÇALVES II, GUIMARÃES SB, JAMACARU FV, GARCIA JH, VASCONCELOS PR. L-alanyl-glutamine pretreatment attenuates acute inflammatory response in children submitted to palatoplasty. [Acta Cir Bras.](#) 2011;26 Suppl 1:72-6.

CURI, R. Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas no esporte. Rio de Janeiro, **Sprint**, p. 261, 2000.

CURI, R., NEWSHOLME, P., PITHON-CURI, T. C., GARCIA, C., GUIMARÃES, A. R. P. Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. **Brazilian Journal of Medical and Biologic Research**, v. 32, p. 15-21, 1995.

DANIELISOVÁ, V.; NÉMATHOVÁ, M.; GOTTLIEB, M.; BURDA, J. Changes of Endogenous Antioxidant Enzymes during Ischemic Tolerance Acquisition. **Neurochemical Research**, v. 30, p. 559-565, 2005.

DARMAUND, D.; JUST, B.; MESSING, B.; RONGIER, M.; THUILLIER, F.; KOZIET, J.; GRASSET, E. Glutamine metabolism in health adult men: response to enteral and intravenous feeding. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 59, 1395-1402, 1994.

DEB I, MANHAS N, PODDAR R, RAJAGOPAL S, ALLAN AM, LOMBROSO PJ, ROSENBERG GA, CANDELARIO-JALIL E, PAUL S.. Neuroprotective role of a brain-enriched tyrosine phosphatase, STEP, in focal cerebral ischemia. **J Neurosci.** 2013 Nov 6;33(45):17814-26. doi: 10.1523/J NEUROSCI.2346- 12.2013.

DENNO, R., ROUNDS, J.D., FARIS, R., HOLEJKO, L. B., WILMORE, D. W. Glutamine-enriched total parenteral nutrition enhances plasma glutathione in the resting state. **J. Surg. Res.**, v. 61, n. 1, p. 35-38, 1996.

EVORA, P. R. B.; PEARSON, P. J.; SECCOMBE, J. F.; SCHAFF, H. V. Lesão de Isquemia-Reperusão. Aspectos Fisiopatológicos e a Importância da Função Endotelial. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 66, n. 4, p. 239-245, 1996.

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

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação**

Médica Brasileira, v. 43, p. 61-68, 1997.

FU J, XUE R, GU J, XIAO Y, ZHONG H, PAN X, RAN R. Neuroprotective effect of calcitriol on ischemic/reperfusion injury through the NR3A/CREB pathways in the rat hippocampus. *Mol Med Rep.*2013 Dec;8(6):1708-14. doi: 10.3892/mmr.2013.1734. Epub 2013 Oct 14.

FÜRST P, ALBERS S, STEHLE P. Stress-induced intracellular glutamine depletion. The potential use of glutamine-containing peptides in parenteral nutrition. *Beitr Infusionther Klin Ernahr.* 1987;17:117-36.

FURST, P.; ALBERS, S.; STEHLE, P. *et al.* Parenteral use of l-alanyl-glutamine and glycyl-L-tyrosine in postoperative patients. **Clin. Nutr.**, v.7, p. S41-S41 (abst), 1989.

FURST, P.; POGAN, K.; STEHLE, P. Glutamine dipeptides in clinical nutrition. **Nutrition**, v. 13, n. 7/8, p. 731-737, 1997.

FURUKAWA, S. S. Supplemental glutamine augments phagocytosis and reactive oxygen intermediate production by neutrophils and monocytes from postoperative patients in vitro. **Nutrition**, v. 16, p. 323-329, 2000.

GAO Y, SIGNORE AP, YIN W, CAO G, YIN XM, SUN F, LUO Y, GRAHAM SH, CHEN J.. Neuroprotection against focal ischemic brain injury by inhibition of c-Jun N-terminal kinase and attenuation of the mitochondrial apoptosis- signaling pathway. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005 Jun;25(6):694-712.

GARCIA DE LORENZO, A.; ZARAZAGA, A.; GARCÍA-LUNA, P. P.; GONZALES-HUIX, F.; LÓPES-MARTINEZ, J.; MIJÁN, A.; QUECEDO, L.; CASIMIRO, C.; USÁN, L.; LLANO, J. Clinical evidence for enteral nutrition support with glutamine: a systematic review. **Nutrition**, v. 19, p. 805-811, 2003.

GOLDLUSTE, E. J.; PACZYSSKI, R. P.; HE, Y. Y.; HSU, C. Y.; GOLDBERG, M. P. Automated measurement of infarct size with scanned images of triphenyltetrazolium chloride-stained rat brains. **Stroke**, v. 27, p. 1657-1662, 1996.

Guan J, Li H, Lv T, Chen D, Yuan Y, Qu S. Bone Morphogenic Protein-7 Contributes to Cerebral Ischemic Preconditioning Induced-Ischemic Tolerance by Activating p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway. *Inflammation.* 2014 Aug;37(4):1289-96. doi: 10.1007/s10753-014-9856-7.

GUIMARÃES FILHO, A.; GUIMARÃES, S. B.; VASCONCELOS, P. R. C.; VASCONCELOS, P. R. L. Efeitos metabólicos da L-alanil glutamina no sangue e fígado de ratos submetidos a hepatectomia parcial. **Rev. Bras. Nutr. Clin.**, v. 19, n. 2, p. 54-58, 2004.

GUO Y, CHEN ZW. [Effect of total flavones of *Rhododendra simsii* on the activation of ERK induced by cerebral ischemia-reperfusion in rats]. **Zhong Yao Cai.** 2012

Jul;35(7):1108-11.

GUO W, FENG G, MIAO Y, LIU G, XU C. Rapamycin alleviates brain edema after focal cerebral ischemia reperfusion in rats. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2014 Jun;36(3):211-23. doi: 10.3109/08923973.2014.913616. Epub 2014 Apr 29.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v. 59, p. 1609-1623, 1992.

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

HONG, R.W., ROUNDS, J.D., HELTON, W. S., ROBINSON, M. K., WILMORE, D. W. Glutamine preserves liver glutathione after lethal hepatic injury. **Ann. Surgery**, v. 215, n. 2, p. 114-119, 1992.

HUANG XP, TAN H, CHEN BY, DENG CQ. Astragalus extract alleviates nerve injury after cerebral ischemia by improving energy metabolism and inhibiting apoptosis. **Biol Pharm Bull**. 2012;35(4):449-54.

JANELIDZE S, HU BR, SIESJÖ P, SIESJÖ BK. Alterations of Akt1 (PKB α) and p70(S6K) in transient focal ischemia. **Neurobiol Dis**. 2001 Feb;8(1):147- 54

JANG H, OH MY, KIM YJ, CHOI IY, YANG HS, RYU WS, LEE SH, YOON BW. Hydrogen sulfide treatment induces angiogenesis after cerebral ischemia. **J Neurosci Res**. 2014 Jun 17. doi: 10.1002/jnr.23427. [Epub ahead of print]

JIANG C, XU Q, XU K, DAI H, ZHANG Z, WU W, NI J. Effects of erythropoietin on STAT1 and STAT3 levels following cerebral ischemia-reperfusion in rats *Int J Neurosci*. 2013 Oct;123(10):684-90. doi: 10.3109/00207454.2013.817409.

JOSHI, C. N.; JAIN, S. K.; MURTHY, P. S. R. An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts. **Brain Research**, v. 13, p. 11-17, 2004.

KHAN, D. E. Factors affecting the stability of L-glutamine solution. **Clin. Sci. (Colch)**, v. 92, n. 4, p. 186-192, 1991.

KAKU Y, YONEKAWA Y, TSUKAHARA T, OGATA N, KIMURA T, TANIGUCHI T (1993) Alterations of a 200 kDa Neurofilament in the Rat Hippocampus after Forebrain Ischemia . J Cereb Blood Flow Metab 13:402-408.

LACEY, J. W. Is glutamine a conditionally essential amino acid? **Nutr. Rev.**, v. 48, n. 8, p. 297-309, 1990.

RUE LAN, JUN XIANG, YONG ZHANG, GUO-HUA WANG, JIE BAO, WEN-WEI LI, WEN ZHANG, LI-LI XU, ANDDING-FANG CAI. PI3K/Akt Pathway Contributes to Neurovascular Unit Protection of Xiao-Xu- Ming Decoction against Focal Cerebral Ischemia and Reperfusion Injury in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** Volume 2013 (2013), Article ID 459467, 16 pages.

LEI C,DENG J,WANG B,CHENG D,YANG Q,DONG H,XIONG L. Reactive oxygen species scavenger inhibits STAT3 activation after transient focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Anesth Analg.**2011 Jul;113(1):153-9. doi: 10.1213/ANE.0b013e31821a9fbc

LEINONEN, J. S.; AHONEN, J. P.; LONNROT, K.; LEHKONEN, M.; DASTIDAR, P.; MOLNAR, G.; ALHO, H. Low plasma antioxidant activity is associated with high lesion volume and neurological impairment in stroke. **Stroke**, v. 31, p. 33-39, 2000.

LEITÃO, R. F. C.; RIBEIRO, A. M. S.; SILVA, L. R.; BELLAGUARDA, E. A. L.; MACEDO, F. D. B.; SOUSA, R. B.; BRITO, G. A. B. Glutamine and alanyl-glutamine accelerate the recovery from 5-fluoracil-induced experimental oral mucositis in hamster. **Cancer Chemotherapy Pharmacol.**, v.68, p. 215-222, 2008.

LEITÃO, J.P.V.; SANTOS, J.M.V.; VASCONCELOS, R.C.; GARCIA, J.H.P.; VASCONCELOS, P.R.L.; GUIMARÃES, S.B. L-Alanyl-Glutamine dipeptide pretreatment attenuates ischemia-reperfusion injury in rat testis. **Acta Cir. Bras.** [online]. 2011, vol.26, suppl.1, pp. 21-25. ISSN 1678-2674. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502011000700005>.

LEVINE, S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. **Am. J. Pathol.**, v. 36, p. 1-17, 1960.

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

Lin Y,Chen F,Zhang J,Wang T,Wei X,Wu J,Feng Y,Dai Z,Wu Q. Neuroprotective effect of resveratrol on ischemia/reperfusion injury in rats through TRPC6/CREB pathways. **J Mol Neurosci.** 2013 Jul;50(3):504-13. doi: 10.1007/s12031-013-9977-8.

LIU, F.; SCHAFFER, D. P.; Mc CULLOUGH, L. D. TTC, Fluor Jade B and Neon staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion. **J. of Neuroscience Methods**, 179, p. 1-8, 2009.

MAO L, YANG L, ARORA A, CHOE ES, ZHANG G, LIU Z, FIBUCH EE, WANG JQ. Role of protein phosphatase 2A in mGluR5-regulated MEK/ERK phosphorylation in neurons. **J Biol Chem.** 2005 Apr 1;280(13):12602-10. Epub 2005 Jan 2

MARTÍN DE LA VEGA C, BURDA J, NEMETHOVA M, QUEVEDO C, ALCÁZAR A, MARTÍN ME, DANIELISOVA V, FANDO JL, SALINAS M. Possible mechanisms involved in the down-regulation of translation during transient global ischaemia in the rat brain. **Biochem J.** 2001 Aug 1;357(Pt 3): 819-26.

MASSAMBANI, E. M.; BAZOTTE, R. B. Importância da glutamina na terapia nutricional. **Arq. Cienc. Saúde Unipar**, v. 2, n. 3, 1998.

MENGESDORF T, PROUD CG, MIES G, PASCHEN W. Mechanisms underlying suppression of protein synthesis induced by transient focal cerebral ischemia in mousebrain. **Neurol.** 2002 Oct;177(2):538-46.

MÖDERSCHEIM, T. A.; GORBA, T.; PATHIPATI, P.; KOKAY, I. C.; GRATTAN, D. R.; WILLIAMS, C. E.; SCHEEPENS, A. Prolactin is involved in glial responses following a focal injury to the juvenile rat brain. **Neuroscience**, v. 145, n.3, p. 963-73, 2007.

MORGAN DO, KAPLAN JM, BISHOP JM, VARMUS HE. Mitosis- specific phosphorylation of p60c-src by p34cdc2-associated protein kinase. **Cell.** 1989 Jun 2;57(5):775-86

MORLION, B. S. Total parenteral nutrition with glutamine dipptide after major abdominal surgery: a randomized, double-blind, controlled study. **Ann. Surg.**, v. 227, n. 2, p. 302-308, 1998.

MORO, M. A.; ALMEIDA, A.; BOLAÑOS, J. P.; LIZASOAIN, I. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. **Free Radical Biology & Medicine**, v.39, p.1291-1304, 2005.

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

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

NEWSHOLME, P.; CURI, R.; PITHON CURI, T. C.; MURPHY, C. J.; GARCIA, C.; PIRES DE MELO, M. Glutamine metabolism by lymphocytes, macrophages, and neutrophils: its importance in health and disease. **J. Nutr. Biochem.**, v. 10, p. 316-324, 1999.

NEW SHOLME, P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? **Nutrition**, 2001.

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

Nogueira A. N. C. Efeitos da L- alanil glutamina em modelo experimental experimental de isquemia e reperfusão em cérebro de ratos Wistar. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia. Universidade Federal do Ceará (2010) http://www.teses.ufc.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=4683

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.

NUÑEZ-FIGUEREDO Y, RAMÍREZ-SÁNCHEZ J, HANSEL G, SIMÕES PIRES EN, MERINO N, VALDES O, DELGADO-HERNÁNDEZ R, PARRA AL, OCHOA-RODRÍGUEZ E, VERDECIA-REYES Y, SALBEGO C, COSTA SL, SOUZA DO, PARDO-ANDREU GL. A novel multi-target ligand (JM-20) protects mitochondrial integrity, inhibits brain excitatory amino acid release and reduces cerebral ischemia injury in vitro and in vivo. **NEUROPHARMACOLOGY.** 2014 Oct;85:517-27. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.06.009. Epub 2014 Jun 19.

PETERSEN, S. J. Arterial-jugular vein free amino acid levels in patients with head injuries: important role of glutamine in cerebral nitrogen metabolism. **J. Trauma**, v. 41, n. 4, p. 687-694, 1996.

PINHEIRO, P.M.A.; CAMPELO, A.P.B.S.; GUIMARÃES, S.B.; PATROCÍNIO, R.M.V.; VALENÇA JÚNIOR, J.T.; VASCONCELOS, P.R.L. 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. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502011000700007>.

PIRES VL, SOUZA JR, GUIMARÃES SB, SILVA FILHO AR, GARCIA JH, VASCONCELOS PR.

Preconditioning with L-alanyl-L-glutamine in a Mongolian gerbil model of acute cerebral ischemia/reperfusion injury. **Acta Cir Bras.** 2011;26 Suppl 1:14-20

PUSINELLI, W. A.; BUCHAN, A. M. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. **Stroke**, v. 19, p.913-914, 1988.

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.**, v. 22, p. 1-48, 1996.

SAMALLI, A.; ORRENIUS, S. Heat shock protein: regulators of stress response and apoptosis. **Cell Stress & Chaperones**, v. 3, n. 4, p. 228-236, 1998.

SAVITZ, S. I., ROSEMBAUM, D. M. Apoptosis in neurological disease. **Neurosurgery**, v. 42, n. 3, p. 555-574

SCHALLER, B. AND GRAF, R. Cerebral ischemia and reperfusion: The pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. **J. Cer. Blood Flow & Metab.**, v. 24, p. 351-371, 2004.

SMITH, R. J., WILMORE, D. W. Glutamine nutrition and requirements. **J. Parenter. Enteral Nutr.**, v. 14, n. 4, p. 94-99, 1990.

SILVA JUNIOR, O. C.; CENTURION, S.; PACHECO, E. G.; BRISOTTI, J. L.; OLIVEIRA, A. F.; SASSO, K. D. Basics aspects of the ischemia reperfusion injury and of the ischemic preconditioning. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. 3, 2002.

Sun SL, Li TJ, Yang PY, Qiu Y, Rui YC. 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**. 2007 Nov;34(11):1097-101.

TANG, X. C.; RAO, M. N.; HU, G. Alterations of amino acid levels from striatum, hippocampus, and cerebral cortex induced by global cerebral ischemia in gerbil. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 21, n. 9, p. 819-823, 2000.

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

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

TREMEL, H. K. B. Glutamine dipeptide-supplemented parenteral nutrition maintains intestinal function in the critically ill. **Gastroenterology**, v. 107, n. 6, p. 1595-1601, 1994.

TOLDY, A., M. ATALAY, *et al.* The beneficial effects of nettle supplementation and exercise on brain lesion and memory in rat. **J. Nutr. Biochem.**, 2008.

TORRES, J. M. S.; GUIMARÃES, S. B.; VASCONCELOS, P. R. L.; MARTINS, M. C. R.; CHAVES, C. R.; VASCONCELOS, P. R. C. 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.

TORRES, B. B. **Nutrição e esporte uma abordagem bioquímica**. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP, 2003.

VALE, O. C.; FONTELES, D. S. R.; CABRAL, F. R.; TEIXEIRA, M. D. A.; FONTELES, C. Electrophysiological effects of glutathione in an animal model of cerebral ischemia. **Research Communications in Biological Psychology and Psychiatry**, v. 26, p. 57-70, 2001.

VALE, O. C.; FONTELES, D. S. R.; CABRAL, F. R.; FONTELES, M. C. Dupla ação do ácido-lipóico no encéfalo: uma avaliação eletrofisiológica. **Arq. Neuro Psiquiatr.**, v. 61, n. 3B, 2003.

VASCONCELOS, PAULO ROBERTO LEITÃO DE AND GUIMARAES, SÉRGIO BOTELHO. Selected papers presented at the Symposium on Nutrition and Metabolism of the Brazilian Society for Development of Research in Surgery (SOBRADPEC). **Acta Cir. Bras.**[online]. 2011, vol.26, suppl.1, pp. 1-1. ISSN 1678-2674.

WU LF, XING Y, GUAN YL, LIU ZQ, ZHANG WS. [Protective effect of jiedu tongluo injection on cerebral edema in rats with lesion of cerebral ischemia/reperfusion]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2014 Mar;39(6):1088-92. [Article in Chinese]

XINKANG WANG, HUGH WANG, LIN XU, DENNIS J ROZANKI , TAKU SUGAUARA, PAK CHAN. Significant Neuroprotection against Ischemic Brain Injury by Inhibition of the MEK1 Protein Kinase in Mice: Exploration of Potential Mechanism Associated with Apoptosis **JPET** 304:172–178, 2003

WANG S, WEI H, CAI M, LU Y, HOU W, YANG Q, DONG H, XIONG L. Genistein attenuates brain damage induced by transient cerebral ischemia through up-regulation of ERK activity in ovariectomized mice. **Int J Biol Sci.** 2014 Apr 8;10(4):457-65. doi: 10.7150/ijbs.7562. eCollection 2014.

WEI XE,ZHANG FY,WANG K,ZHANG QX,RONG LQ. Assembly of the FKBP51-PHLPP2-AKT signaling complex in cerebral ischemia/reperfusion injury in rats **Brain Res.** 2014 May 30;1566:60-8. doi: 10.1016/j.brainres.2014.04.009. Epub 2014 Apr 16.

WISCHMEYER, P. E. Glutamine and heat shock protein expression. **Nutrition**, v. 18, p. 225-228, 2002.

XU Q, JIANG C, RONG Y, YANG C, LIU Y, XU K. The Effects of Fludarabine on Rat Cerebral Ischemia. **J Mol Neurosci.** 2014 May 15. [Epub ahead of print]

YOSHIDA, S.; ABE, K.; BUSTO, R.; WATSON, D. B.; KOGURE, B. D.; GINSBERG, M. D. Influence of transient ischemic in lipid soluble antioxidants, free fatty acids and energy metabolites in rat brain. **Brain Res.**, v. 245, p. 307-426, 1982.

YU, J. C.; JIANG, Z. M.; LI, D. M.; YANG, N. F.; M-X, B. Alanyl-glutamine preserves hepatic glutathione stores after 5-FU treatment. **Clin. Nutr.**, v.15, n.5, p. 261-265, 1996.

YU, J.C., JIANG, Z. M., LI, D. M. Glutamine: precursors of glutathione and its effect on liver. **World. Gastroenterology**, v. 5, n.2, p. 143-146, 1999.

ZHANG W, MIAO Y, ZHOU S, JIANG J, LUO Q, QIU Y.

Neuroprotective effects of ischemic postconditioning on global brain ischemia in rats through upregulation of hippocampal glutamine synthetase. **J Clin**

Neurosci. 2011 May;18(5):685-9. doi: 10.1016/j.jocn.2010.08.027. Epub 2011 Mar 2.

ZHANG S, QI Y, XU Y, HAN X, PENG J, LIU K, SUN CK. Protective effect of flavonoid-rich extract from *Rosa laevigata* Michx on cerebral ischemia-reperfusion injury through suppression of apoptosis and inflammation. **Neurochem Int.** 2013 Nov;63(5):522-32

ZHANG R, ZHANG L, MANAENKO A, YE Z, LIU W, SUN X . Helium preconditioning protects mouse liver against ischemia and reperfusion injury through PI3k-Akt pathway. **J Hepatol.** 2014 Jun 24. pii: S0168- 8278(14)00450-4. doi: 10.1016/j.jhep.2014.06.020. [Epub ahead of print]

ZHOU Y, WANG D, GAO X, LEW K, RICHARDS AM, WANG P. MTORC2 Phosphorylation of Akt1: A Possible Mechanism for Hydrogen Sulfide- Induced Cardioprotection. PLoS One.2014 Jun 20;9(6):e99665. doi:10.1371/journal.pone.0099665. eCollection 2014.

ZIMMERMANN, C.; WINNEFELD, K.; STRECK, S.; ROSKOS, M.; HABERL, R. L. Antioxidant status in Acute Stroke Patients and Patients at stroke Risk. **European Neurology**, v.51, p. 157-61, 2004.

APÊNDICE

Sinalizadores Intracelulares Proteínas Quinases

ERK/MAP quinase 1/2 (Thr185/Tyr187)

A via MAPK/ERK é uma cadeia de proteínas no interior da célula que envia um sinal de um receptor na superfície da célula para o DNA no núcleo que expressa uma proteína e produz mudanças na célula, tais como divisão celular. Esta via inclui muitas proteínas, tais como MAPK (mitogen-activated protein kinases), originalmente chamadas de ERK (extracelular signal-regulated kinases), as quais se comunicam pela adição de grupos fosfatos para uma proteína na circunvizinhança, a qual passa a agir como um switch “liga”ou “desliga”. Esta via é também conhecida com a via Ras-Raf-MEK-ERK. PAI-1 (inibidor do ativador do plasminogênio) desempenha um papel anti-apoptótico em neurônios por meio da prevenção da desintegração das redes neuronais formadas via sinalização pela via MAPK/ERK (Soeda et al, 2008). GH e IGF-1 estão relacionados a neuroproteção, regeneração e função de plasticidade no cérebro adulto. A via sinalizadora MAPK é requerida para que a estimulação proliferativa de IGF-1 *in vitro*, enquanto a via P13K/Akt ou MAPK/ERK parece mediar efeitos anti-apoptóticos (Alberg et al, 2006).

Akt (Ser473)

Akt, também conhecida como proteína quinase B (PKB), é uma proteína específica serina/treonina que desempenha um papel chave em múltiplos processos celulares tais como no metabolismo da glucose, apoptose, proliferação celular, transcrição e migração celular. NAP (davunetida) é um peptídeo contendo 8 aminoácidos (NAPVSIPQ) que tem sido demonstrado como um agente potente promotor de neuroproteção *in vitro* e *in vivo*. NAP reduziu o número de neurônios apoptóticos por meio da ativação da via PI-3K/Akt na região cortical ou por ativação de ambas as vias PI-3K/Akt e MAPK/MEK1 quinases no massa branca cerebral (Gozes, 2011).

STAT3 (Ser727)

O transdutor de sinal e ativador da transcrição 3, também conhecido como STAT3, é um fator de transcrição que nos humanos é codificado pelo gene *STAT3* (Akira, 1994). STAT3 medeia a expressão de uma variedade de genes em resposta a estímulos celulares, e desta maneira desempenha um papel chave em muitos processos celulares tais como crescimento celular e apoptose. Lesão ao tecido neural induz à ativação da quinase STAT, e as STATs estão sendo cada vez mais reconhecidas por seu papel na sobrevivência neuronal. A STAT3, tem sido estudada, e um crescente corpo de evidências na literatura apontam investigações sobre os efeitos regenerativos e protetores de fatores de crescimento e citocinas que utilizam a via STAT3 para mediar seus efeitos, em parte por meio da regulação para cima da transcrição de genes neuroprotetores e neurotróficos (Dziennis e Alkayed, 2008).

JNK (Thr183/Tyr185)

Quinases c-Jun com terminal N (JNKs) foram originalmente identificadas como quinases que se ligam a fosforilam c-Jun em Ser-63 e Ser-73 em seu domínio de ativação transcripcional. Elas pertencem à família das proteínas quinases ativadas por mitógenos, e são responsivas a estímulos de estresse, tais como as citocinas, irradiação ultravioleta, choque térmico e choque osmótico. Elas também desempenham um papel nas vias de diferenciação celular e apoptose. Sua ativação ocorre por uma dupla fosforilação de resíduos da treonina e tirosina, dentro de uma localização (motif) no subdomínio da quinase VIII. Esta ativação ocorre por meio de duas quinases MAP, MKK4 e MKK7; e JNK pode ser inativado por proteínas fosfatases Serina/Treonina e Tirosina (Ip e Davis, 1998). Isquemia cerebral aciona uma complexa série de mecanismos bioquímicos e moleculares que danificam as funções neurológicas por meio da quebra da integridade celular, mediadas por sinalização glutamatergica excitotóxica, desequilíbrio iônico, reações com espécies reativas ao oxigênio, entre outros. Estes intrincados processos levam à ativação de mecanismos sinalizadores envolvendo quinases dependentes de cálcio/calmodulina (CaMKs) e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) tais como a quinase com regulação de sinalização extracelular (ERK), p38 e c-JUN com terminal N (JNK) (Mehta et al, 2007).

P70 S6 quinase (Thr412)

A quinase P70 é uma via sinalizadora que inclui mTOR (o alvo da rapamicina em mamíferos). mTOR pode ser ativada de distintas maneiras, deste modo ativando P70S6K. Por exemplo, aminoácidos de cadeia ramificada, tais como a leucina, são suficientes para ativar mTOR, resultando em aumento da fosforilação, e consequente ativação, de P70S6K. mTOR é também uma via sinalizadora abaixo da via quinase Akt. Akt é tipicamente ativada pela estimulação de uma célula com um fator de crescimento, tal como IGF-1. Akt então ativa mTOR, por inibição com complex Tsc, levando à ativação da via P70S6K (Chung et al, 1994). mTOR previne apoptose neuronal, inibe morte celular autofágica, melhora a neurogênese, podendo adquirir a capacidade de limitar a morte neuronal isquêmica e promover recuperação neuronal. Consequentemente, regular a atividade de mTOR apresenta-se como uma potencial nova estratégia terapêutica para a lesão cerebral isquêmica (Chong et al, 2013).

STAT5A/B (Tyr694/699)

A família STAT de fatores de transcrição, primeiro descrita como mediadores-chaves da sinalização para transdução de interferon, são hoje reconhecidos como fatores sinalizadores ativados por muitas citocinas, fatores de crescimento e hormônios. Há, pelo menos, sete STATs: STAT1, 2, 3, 4, 5^a, 5b e 6. Eles são responsáveis por uma gama de atividades celulares incluindo regulação de crescimento, sobrevivência, diferenciação, motilidade e pela resposta imune. STAT5 medeia a sinalização de citocinas atuando como um sinal transdutor de genes específicos. STAT5 está relacionado a uma variada quantidade de processos biológicos variando desde a regulação da apoptose até a proliferação da glândula mamária, diferenciação e sobrevivência celulares (Grimley et al, 1999). No cérebro, nos neurônios do hipocampo, STAT5 não é requerida para promover neuroproteção pela ação da eritropoietina (EPO), mas em conjunto com Akt é essencial para a atividade neurotrófica da EPO. Tanto STAT5 e Akt são necessárias para a sinalização neuroprotetora e neurotrófica promovida pelo GH sobre os neurônios (Byts et al, 2008).

CREB (Ser133)

CREB (proteína de ligação ao elemento resposta do cAMP) é um fator de transcrição. Ela se liga a determinadas sequências de DNA chamadas de elementos de resposta ao cAMP (CRE), deste modo aumentando ou diminuindo a transcrição de determinados genes (Montminy et al, 1987). CREB foi primeiramente descrita em 1987 como um fator da transcrição cAMP responsive regulador do gene da somatostatina. Genes os quais têm sua transcrição regulada por CREB incluem: c-

fos, fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), hidroxilase tirosina e muitos neuropeptídeos (tais como somatostatina, encefalina, VGF e homônio liberador de corticotrofina. CREB desempenha um papel bem documentado na plasticidade neuronal e na formação da memória de longo-prazo no cérebro (Mantamadiotis et al, 2002). CREB tem sido demonstrada como parte integral na formação da memória especial (Carlezon et al, 2005).

P38 (Thr180/Tyr182)

As proteínas quinases ativadas por mitógenos P38 são uma classe de proteínas ativadas por mitógenos que são responsivas a estímulos de estresse, tais com às citocinas, irradiação ultravioleta, choque térmico e choque osmótico (Tudor et al, 2009). A via quinase MAPK ativada pela proteína quinase 2 (MAPKAPK-2 or MK2) é um substrato formado pela quinase P38 MAPK responsável pela sinalização de eventos que influenciam a inflamação, divisão e diferenciação celulares, apoptose e motilidade celular em resposta a uma ampla variedade de estímulos extracelulares, estando envolvida no processo de neuroinflamação (Gurgis et al, 2014)

ANEXO I



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366 8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 62/08, sobre o projeto intitulado: "Efeitos do Cis-Ru(bpy)₂(SO₃)(NO)PF₆ após Isquemia e reperfusão em cérebro de ratos Wistar", de responsabilidade de Márcio Wilker Soares Campelo, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 30 de setembro de 2009.

Fortaleza, 01 de dezembro de 2009.


Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA