

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

**ANDRÉA DA NÓBREGA CIRINO NOGUEIRA**

**EFEITOS DA L-ALANIL-GLUTAMINA NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM  
CÉREBRO DE RATOS WISTAR**

**FORTALEZA**

**2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANDRÉA DA NÓBREGA CIRINO NOGUEIRA

**EFEITOS DA L-ALANIL-GLUTAMINA NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM  
CÉREBRO DE RATOS WISTAR**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Martins Rodrigues Sobrinho

**FORTALEZA**

**2009**

ANDRÉA DA NÓBREGA CIRINO NOGUEIRA

**EFEITOS DA L-ALANIL-GLUTAMINA NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM  
CÉREBRO DE RATOS WISTAR**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Cirurgia.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dr. Carlos Roberto Martins Rodrigues Sobrinho (Co-Orientador)  
**Universidade Federal do Ceará**

---

Profª Drª Helena Alves de Carvalho Sampaio  
**Universidade Estadual do Ceará**

N71e Nogueira, Andréa da Nóbrega Cirino  
Efeitos da L-alanil-glutamina na isquemia e reperfusão em  
cérebro de ratos wistar / Andréa da Nóbrega Cirino Nogueira.  
– Fortaleza, 2009.  
61 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.  
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Fortaleza-Ce, 2009

1. Isquemia Encefálica 2. Reperfusão 3. Glutamina 4.  
Necrose I. Vasconcelos, Paulo Roberto Leitão (orient.) II.  
Título

CDD: 616.81

*Aos meus pais Antônio Danúcio Diógenes Cirino Nogueira (in memoriam) e Adenilce da Nóbrega Cirino Nogueira, e minhas irmãs, Mara, Nice e Bruna, pelo imenso incentivo e apoio.*

*A meu marido, Pedro de Alcântara Cronemberger Júnior, pela paciência, companheirismo, apoio e acima de tudo, por respeitar meus ideais e permanecer ao meu lado enquanto busco conquistar cada um deles.*

## AGRADECIMENTOS

Ao PROFESSOR DOUTOR PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS, a quem, além da firme orientação do presente trabalho, agradeço a confiança, disponibilidade e atenção.

Ao PROFESSOR DOUTOR CARLOS ROBERTO MARTINS RODRIGUES SOBRINHO, pelas muitas oportunidades, por ter acreditado e confiado na minha capacidade de aprender e de recomeçar.

À PROFESSORA DOUTORA HELENA ALVES DE CARVALHO SAMPAIO, que gentilmente aceitou o convite para participar da banca examinadora desta Dissertação.

Aos examinadores da banca do exame de qualificação, PROFESSORES DOUTORES LUSMAR VERAS RODRIGUES e OTONI CARDOSO DO VALE e a PROFESSORA DOUTORA RAIMUNDA HERMELINDA MAIA MACENA, pela importante contribuição na análise crítica desta dissertação.

À PROFESSORA SORAYA MARIA DO NASCIMENTO REBOUÇAS VIANA, pela valiosa amizade, incentivo e colaboração na execução desse trabalho.

Ao colega do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, Dr. MÁRCIO WILKER SOARES CAMPELO que me ajudou a dar os “primeiros passos” no laboratório, pela disponibilidade e presteza em ajudar, por gentilmente ceder o método de coloração com 2,3,5 Trifenil Tetrazólio. Sem a sua ajuda não teria sido possível a execução desse trabalho.

Ao PROFESSOR DOUTOR JOSÉ TELMO VALENÇA JUNIOR, pela valiosa contribuição na análise histológica.

Ao PROFESSOR VASCO PINHEIRO DIÓGENES BASTOS, sempre disponível e presente.

Aos Residentes de Fisioterapia, RENATA DOS SANTOS VASCONCELOS, LUIZ HENRIQUE DE PAULA MELO, RAQUEL PINTO

SALES e WEDLA LOURDES REBOUÇAS MATOS, cujas participações foram decisivas e indispensáveis.

A ILNAIR MARTINS LEITE (Nina) e MARA DA NÓBREGA CIRINO DEMÉTRIO pela valiosa contribuição na revisão desse trabalho.

A todos os professores da pós-graduação em cirurgia que contribuíram para minha formação nesse curso, especialmente o PROFESSOR DOUTOR FRANCISCO VAGNALDO FECHINNI JAMACARU, por sua presteza em ajudar.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, SRA. MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA e SRA. MAGDA GOMES FONTENELE, pela boa vontade e dedicação.

Aos meus alunos, pela paciência, carinho, incentivo e compreensão nos momentos em que estive ausente.

Ao SR. BENTO FRANCISCO DE OLIVEIRA, assistente técnico do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina, pelo desvelo com que atendeu às nossas solicitações.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*Em todas as ocasiões, mantenha a mente aberta para a mudança. Receba-a de braços abertos. Corteje-a. Somente através do exame e reexame de suas opiniões e idéias você poderá evoluir.*

*Dale Carnegie*

## RESUMO

Efeitos da L-alanil-glutamina na isquemia e reperfusão em cérebro de ratos wistar. **ANDRÉA DA NÓBREGA CIRINO NOGUEIRA. Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará (Grau de Mestre em Cirurgia). Setembro, 2009. Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.**

O objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos da L-alanil-glutamina (Ala-Gln) na isquemia e reperfusão em cérebro de ratos. Foram utilizados 48 ratos machos, da linhagem Wistar, com idade média de 62 dias e peso médio de 276,38g, distribuídos em quatro grupos: Sham 30 minutos, Isquemia, Sham 90 minutos e Isquemia/ Reperfusão. Foi utilizado um modelo de isquemia cerebral experimental global, com oclusão da artéria carótida comum bilateral e administração de solução salina ou Ala-Gln. Os resultados do presente estudo mostraram elevação estatisticamente significativa no percentual de área de necrose do grupo Isquemia ( $13,24 \pm 8,82$ ) em relação ao grupo Sham 30 minutos ( $0,12 \pm 0,20$ ,  $p= 0,01$ ). O mesmo ocorreu em relação à área de necrose do grupo Isquemia/Reperfusão ( $13,30 \pm 9,91$ ) em relação ao Sham 90 minutos ( $0,70 \pm 1,35$ ,  $p= 0,01$ ). Tais resultados demonstram a efetividade do modelo Isquemia e Isquemia/Reperfusão cerebrais utilizados. Não foi observada alteração significativa no percentual de área de necrose entre os grupos Isquemia Salina ( $13,24 \pm 8,82$ ) e Isquemia Ala-Gln ( $15,35 \pm 6,80$ ,  $p= 0,34$ ). A média do percentual de área isquêmica do grupo Isquemia/Reperfusão Ala-Gln ( $4,65 \pm 1,44$ ) foi significativamente inferior àquela encontrada no grupo Isquemia/Reperfusão Salina ( $13,30 \pm 9,91$ ,  $p= 0,03$ ). A administração prévia de Ala-Gln a ratos submetidos à Isquemia/reperfusão cerebral não promoveu redução no percentual de área de necrose na lesão isquêmica. Por outro lado, esse dipeptídeo reduziu o percentual de necrose cerebral na lesão Isquemia/Reperfusão cerebral.

Palavras-chave: Isquemia cerebral. Reperfusão. L-alanil-glutamina. Necrose.

## ABSTRACT

Effects of l-alanyl-glutamine in ischemia and reperfusion in the brain of Wistar rats. **ANDRÉA DA NÓBREGA CIRINO NOGUEIRA**, *Stricto Sensu Post-graduation*. Department of Surgery, Medicine School, Federal University of Ceará (Degree of Master of Surgery). September, 2009. Advisor: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

The aim of this study was to investigate the effects of L-alanyl-glutamine (Ala-Gln) in ischemia and reperfusion in rat brain. We used 48 male rats, Wistar, with a mean age of 62 days and average weight of 276.38 g, divided into four groups: Sham 30 minutes ischemia, 90 minutes and Sham Ischemia / Reperfusion. We used a model of experimental global cerebral ischemia with occlusion of bilateral common carotid artery and administration of saline or Ala-Gln. The results of this study showed a statistically significant increase in the percentage of necrotic area of the ischemia group ( $13.24 \pm 8.82$ ) than in group Sham 30 minutes ( $0.12 \pm 0.20$ ,  $p= 0.01$ ). The same occurred in relation to the area of necrosis in ischemia-reperfusion group ( $13.30 \pm 9.91$ ) compared to Sham 90 minutes ( $0.70 \pm 1.35$ ,  $p= 0.01$ ). These results demonstrate the effectiveness of the model Ischemia and Ischemia / Reperfusion brain used. There was no significant change in the percentage of necrotic area between Salina ischemia groups ( $13.24 \pm 8.82$ ) and ischemia Ala-Gln ( $15.35 \pm 6.80$ ,  $p= 0.34$ ). The average percentage of ischemic area of group Ischemia / Reperfusion Ala-Gln ( $4.65 \pm 1.44$ ) was significantly lower than that in group Ischemia / Reperfusion Salina ( $13.30 \pm 9.91$ ,  $p= 0.03$ ). The prior administration of Ala-Gln in rats subjected to ischemia / reperfusion did not cause reduction in the percentage of necrosis in ischemic injury. Moreover, this dipeptide reduced the percentage of necrosis in the cerebral injury cerebral ischemia / reperfusion.

**Keywords:** Cerebral ischemia. Reperfusion. L-alanyl-glutamine. Necrosis.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01	Formação de espécies reativas de oxigênio (NORDBERG; WARNER, 2001)	16
FIGURA 02	Dano oxidativo às macromoléculas biológicas (TORRES, 2003)	17
FIGURA 03	Fórmula estrutural da glutamina (Gln)	20
FIGURA 04	Modelo experimental usado no estudo	27
FIGURA 05	Grupo Sham 30 minutos	28
FIGURA 06	Grupo Isquemia	29
FIGURA 07	Grupo Sham 90 minutos	30
FIGURA 08	Grupo Sham Isquemia/ Reperfusão	31
FIGURA 09	Estabelecimento da isquemia	33
FIGURA 10	Brain Matrix (Zivic Instruments®)	34
FIGURA 11	Secções de 2 mm antes da coloração TTC	34
FIGURA 12	Imagem digitalizada, Grupo Sham	35
FIGURA 13	Imagem digitalizada, Grupo Isquemia 60min corado com TTC	35
FIGURA 14	Distribuição da variabilidade do percentual de área isquêmica por grupos, Sham 30' e Isquemia Salina	37
FIGURA 15	Distribuição da variabilidade do percentual de área isquêmica por grupos, Isquemia Salina e Isquemia Ala-Gln	38
FIGURA 16	Distribuição da variabilidade do percentual de área isquêmica por grupos, Sham 30' e Isquemia Ala-Gln	39
FIGURA 17	Distribuição dos grupos Sham 90' e Isquemia/Reperfusão Salina por percentual de área isquêmica	40
FIGURA 18	Distribuição dos grupos Isquemia/Reperfusão Salina e Isquemia/Reperfusão Ala-Gln por percentual de área isquêmica	41
FIGURA 19	Distribuição dos grupos Sham 90' e Isquemia/Reperfusão Ala-Gln por percentual de área isquêmica	42

## LISTA DE TABELAS

TABELA 01	Distribuição da variabilidade do percentual de área isquêmica por grupos, Sham 30' e Isquemia Salina	37
TABELA 02	Distribuição da variabilidade do percentual de área isquêmica por grupos, Isquemia Salina e Isquemia Ala-Gln	38
TABELA 03	Distribuição da variabilidade do percentual de área isquêmica por grupos, Sham 30' e Isquemia Ala-Gln	39
TABELA 04	Distribuição dos grupos Sham 90' e Grupo Isquemia/Reperusão Salina por percentual de área isquêmica	40
TABELA 05	Distribuição dos grupos Isquemia/Reperusão Salina e Isquemia/Reperusão Ala-Gln por percentual de área isquêmica	41
TABELA 06	Distribuição dos grupos Sham 90' e Isquemia/Reperusão Ala-Gln por percentual de área isquêmica	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACCs	Artérias carótidas comuns
Ala-Gln	L-alanil-glutamina
ATP	Adenosina-trifosfatada
C	Celsius
CAPES	Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
cm	Centímetro
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CT	Cervicotomia
DC	Decapitação
EROs	Espécies reativas de oxigênio
G	Grama
GABA	Ácido gamaaminobutírico
Gln	Glutamina
H <sup>+</sup>	Hidrogênio
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HPS	Proteína de choque térmico
I	Isquemia
IL-1	Interleucina 1
IC	Intervalo de confiança
I/R	Isquemia/reperfusão
Kg	Kilograma
LABCEX	Laboratório de Cirurgia Experimental
LCR	Líquido encéfalo-raquidiano
m (dp)	Média (desvio padrão)
mg	Miligrama
mm	Milímetro
NFκB	Fator de transcrição NFκB
NH <sup>+</sup>	Grupos amina
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
PL	Pressão liquórica
SNC	Sistema Nervoso Central
SF	Soro fisiológico 0,9%;
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TTC	Cloreto de 2,3,5-Trifenil Tetrazólio
UFC	Universidade Federal do Ceará
UTHSCSA	The University of Texas Health Science Center in San Antonio
30'	30 minutos
90'	90 minutos

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
	<i>ISQUEMIA CEREBRAL EXPERIMENTAL</i>	<b>18</b>
	<i>O USO DA GLUTAMINA E ALANIL-GLUTAMINA</i>	<b>19</b>
	<i>CLORETO DE 2,3,5 TRIFENIL TETRAZÓLIO</i>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>25</b>
<b>2.1</b>	<b>GERAL</b>	<b>25</b>
<b>2.2</b>	<b>ESPECÍFICO</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>MÉTODO</b>	<b>26</b>
<b>3.1</b>	<b>DESENHO DO ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS</b>	<b>26</b>
<b>3.2</b>	<b>ANIMAIS</b>	<b>26</b>
<b>3.3</b>	<b>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</b>	<b>27</b>
3.3.1	Grupos e procedimentos	<b>27</b>
3.3.2	Técnica Anestésica	<b>32</b>
3.3.3	Técnica Cirúrgica	<b>32</b>
3.3.3.1	Procedimento Inicial	<b>32</b>
3.3.3.2	Estabelecimento da isquemia/reperfusão cerebral	<b>32</b>
3.3.3.3	Morte dos animais	<b>33</b>
<b>3.4</b>	<b>AVALIAÇÃO DO DANO ISQUÊMICO</b>	<b>33</b>
3.4.1	Preparação dos tecidos	<b>33</b>
3.4.2	Coloração	<b>34</b>
3.4.3	Análise das imagens	<b>35</b>
<b>3.5</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<i>Análise histoquímica das áreas de isquemia</i>	<b>37</b>

4.1.1	Sham 30 minutos <i>versus</i> Isquemia Salina	37
4.1.2	Isquemia Salina <i>versus</i> Isquemia Ala-Gln	38
4.1.3	Sham 30 minutos <i>versus</i> Isquemia Ala-Gln	39
4.1.4	Sham 90 minutos <i>versus</i> Isquemia/Reperfusão Salina	40
4.1.5	Isquemia/Reperfusão Salina <i>versus</i> Isquemia/Reperfusão Ala-Gln	41
4.1.6	Sham 90 minutos <i>versus</i> Isquemia/Reperfusão Ala-Gln	42
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	43
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	48
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	49
<b>8</b>	<b>APÊNDICE</b>	57
8.1	APÊNDICE A	57
8.2	APÊNDICE B	57
8.3	APÊNDICE C	58
<b>9</b>	<b>ANEXOS</b>	60

## 1 INTRODUÇÃO

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 radicais livres de oxigênio, que constituem moléculas com coexistência independente (o que explica o uso do termo “livre”) e que contém um ou mais elétrons não pareados na camada de valência (Figura 1). Esta configuração faz dos radicais livres espécies altamente instáveis, de meias-vidas relativamente curtas e quimicamente muito reativas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

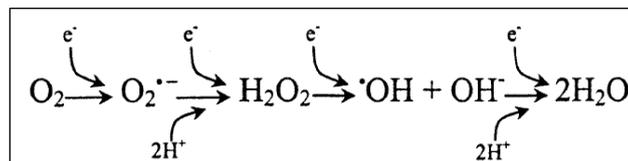


FIGURA 1 – Formação de espécies reativas de oxigênio (NORDBERG; WARNER, 2001)

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 ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (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  $\text{Ca}^{2+}$ , 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 injúria 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).

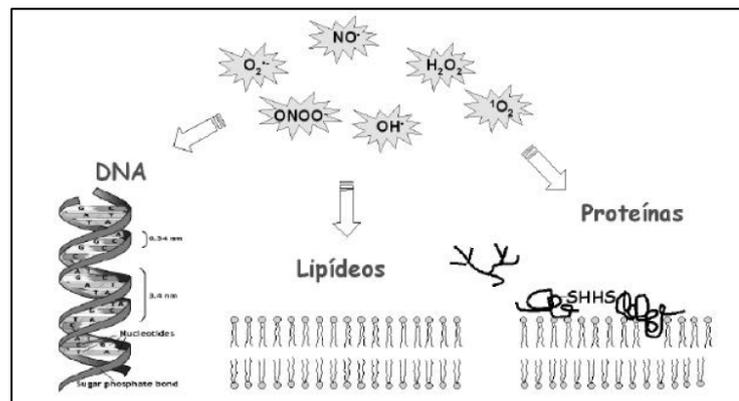


FIGURA 2 - Dano oxidativo às macromoléculas biológicas (TORRES, 2003)

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 injúria (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 aos insultos isquêmicos 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.

### **O USO DA 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 ( $\text{NH}^+$ ), 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.

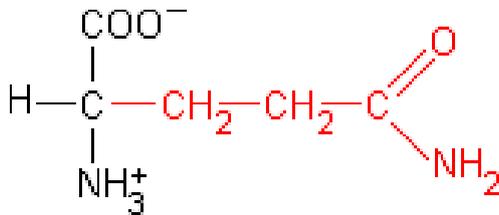


FIGURA 3 – Fórmula estrutural da glutamina (Gln)

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, necessário a suplementação de glutamina através 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  $\text{NH}_2$  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 glutathione 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.

### **CLORETO DE 2,3,5 TRIFENIL TETRAZÓLIO**

O Cloreto de 2,3,5 Trifenil Tetrazólio (TTC) foi sintetizado pela primeira vez em 1894 e foi usado inicialmente para testar a viabilidade das sementes. Desde 1958 tem sido utilizado como corante para determinar área de infarto isquêmico em tecidos dos mamíferos (BEDERSON *et al.*, 1986).

A coloração TTC é um método histoquímico, relativamente simples e rápido, comumente utilizado para avaliar lesão cerebral. É realizado em fatias de cérebro fresco e as preparações estão disponíveis para análise em menos de 60 minutos. No tecido isquêmico, a falta de coloração é considerada infartada e definida como núcleo e o tecido viável é manchado de vermelho (BENEDEC *et al.*, 2006).

O TTC age como um receptor de prótons para nucleotídeos piridina, enzima ligada ao sistema de desidrogenase, que juntamente com os citocromos, formam parte integrante da membrana mitocondrial interna e formam a cadeia de transporte de elétrons. A coloração com TTC depende da viabilidade das enzimas do transporte de cadeia de elétrons, como tal, é representada como a variável que pode ser interpretada como uma medida da viabilidade do tecido (LIU; SCHAFER; Mc COLLOUGH, 2009).

Quando incubados em tecidos metabolicamente viáveis, o TTC que é uma solução incolor é convertido em composto Formazan vermelho. Assim, tecidos normais apresentam-se corados em vermelho, enquanto as áreas ainda não infartadas, mas com isquemia apresentam-se rosa e completamente infartadas brancas. Ou seja, zonas normais – vermelho; zonas de transição ou zonas de penumbra isquêmica – cor de rosa; e totalmente isquêmicas aparecem em branco (faltam enzimas da cadeia de transporte) (BOSE *et al.*, 1988).

Embora amplamente aceitos e utilizados, a coloração com TTC tem recebido críticas, pois o TTC é um marcador de tecido desidrogenase e disfunção mitocondrial e pode não representar morte celular irreversível, portanto, este método pode superestimar o tamanho do infarto (BENEDEK *et al.*, 2006). Apesar desta crítica, TTC é um método confiável, rápido e barato utilizado para analisar a disfunção enzimática da célula (JOSHI; JAIN; MURTHY, 2004).

Uma importante vantagem do corante TTC é que fornece preparações de alto contraste para a determinação do volume de tecido infartado com o uso de imagens adquiridas por vídeo/câmaras digitais ou fotografias digitalizadas ou ainda secções diretamente digitalizadas com um scanner de mesa (GOLDLUST *et al.*, 1996).

A lesão ocasionada por isquemia cerebral tem importância fundamental na evolução de pacientes portadores de doença cerebrovascular. O estudo de mecanismos protetores da lesão isquemia/reperfusão tem implicações no tratamento desses pacientes. Tendo em vista a possibilidade de avaliar a gravidade da lesão isquêmica com TTC, e os possíveis efeitos benéficos da L-alanil-glutamina, estudos com modelos experimentais de isquemia/reperfusão devem ser realizados.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 GERAL**

Estudar os efeitos da utilização de L-alanil-glutamina em modelo experimental de isquemia e reperfusão de cérebro de ratos.

### **2.2 ESPECÍFICO**

- Determinar o percentual da área de dano isquêmico cerebral e necrose celular, após a utilização de solução salina e de L-alanil-glutamina, com e sem oclusão arterial.

### 3 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 (processo nº 69/09), (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 48 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 foi 62 dias (mínima de 60 e máxima de 64 dias) e peso médio de 276,38g (mínimo de 250 e máximo de 300g).

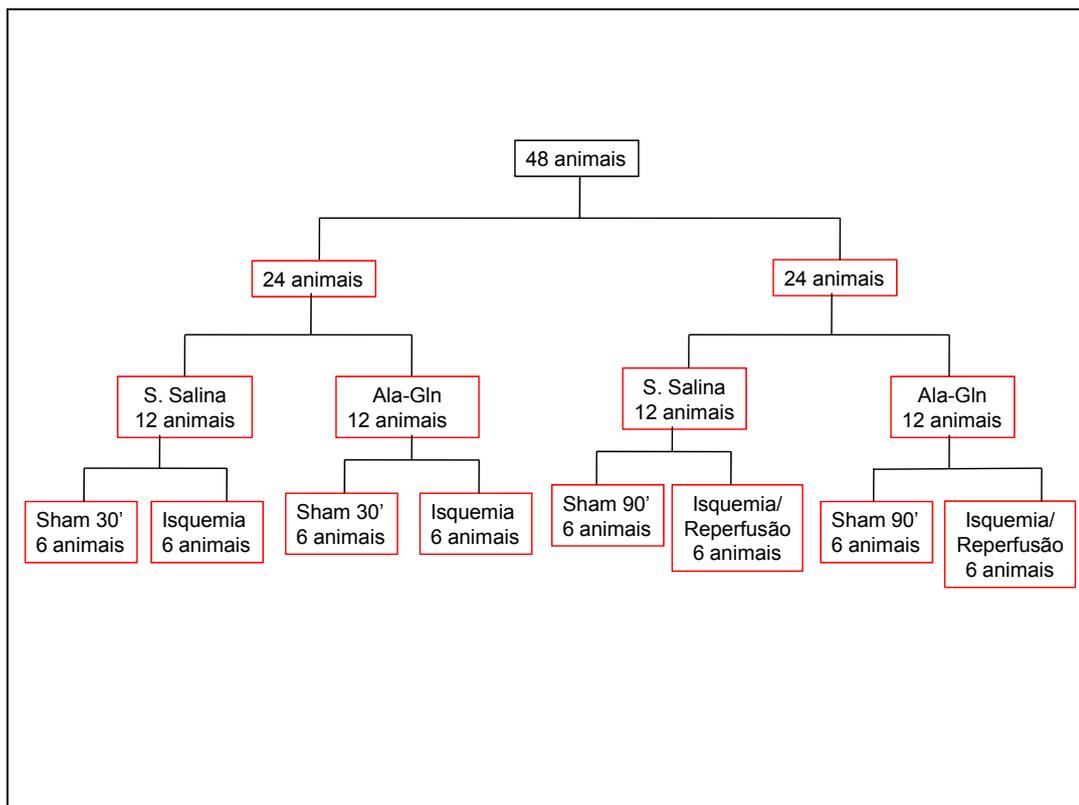
Todos receberam ração padrão e água *ad libitum*, e foram mantidos nas mesmas condições ambientais. Durante os experimentos, foram previamente deixados em jejum durante 12 horas.

Foram excluídos do estudo cinco animais (1 apresentou alteração da temperatura, 1 apresentou mioclonias durante o período de isquemia, 2 animais foram excluídos por ter havido dificuldade de puncionar a veia femoral e em 1 animal houve lesão do vaso durante o pinçamento das ACCs).

### 3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

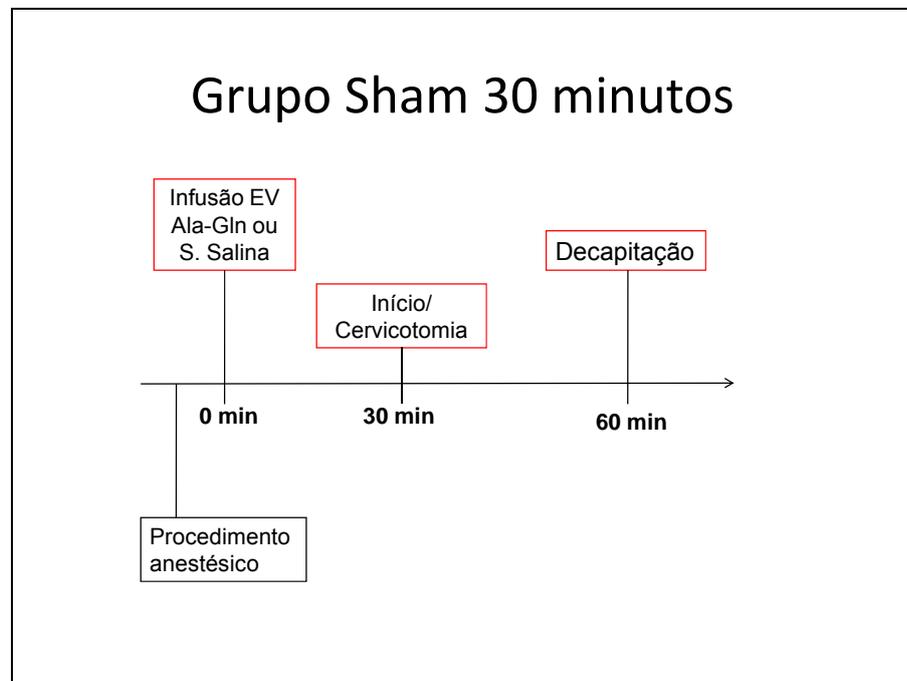
#### 3.3.1 Grupos e procedimentos

Foi utilizado o seguinte delineamento experimental originando os quatro grupos, a saber:



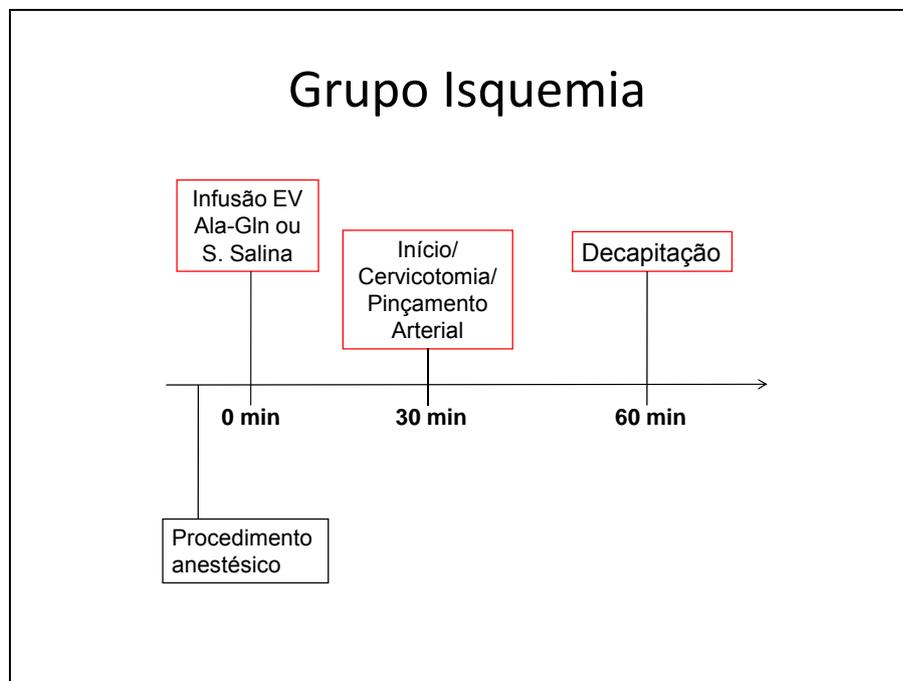
**FIGURA 4** - Modelo experimental usado no estudo  
Abreviaturas: 30' = 30 minutos; 90' = 90 minutos

**Sham 30 minutos:** animais submetidos a procedimento cirúrgico sem oclusão das artérias carótidas comuns (ACCs). Foi injetada solução salina ou L-alanil-glutamina (Ala-Gln) a 20% na dose de 0,5g/Kg (Dipeptiven ®, do Laboratório Fresenius) na veia femoral, decorridos 30 minutos foi realizada cervicotomia, decorridos mais 30 minutos os animais foram decapitados e os hemisférios cerebrais removidos. (FIGURA 5)



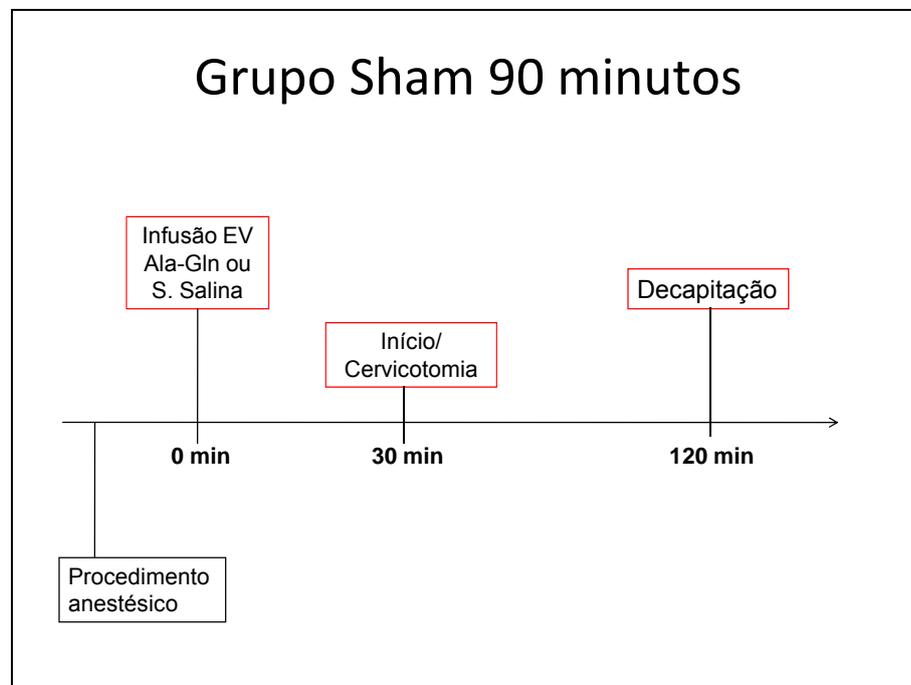
**FIGURA 5** - Grupo Sham 30 minutos

**Isquemia:** animais submetidos a procedimento cirúrgico com oclusão das ACCs. Foi injetada solução salina ou Ala-Gln a 20% na dose de 0,5g/Kg na veia femoral, decorridos 30 minutos foi realizado cervicotomia e oclusão das ACCs, após 30 minutos de isquemia os animais foram decapitados e os hemisférios cerebrais retirados. (FIGURA 6)



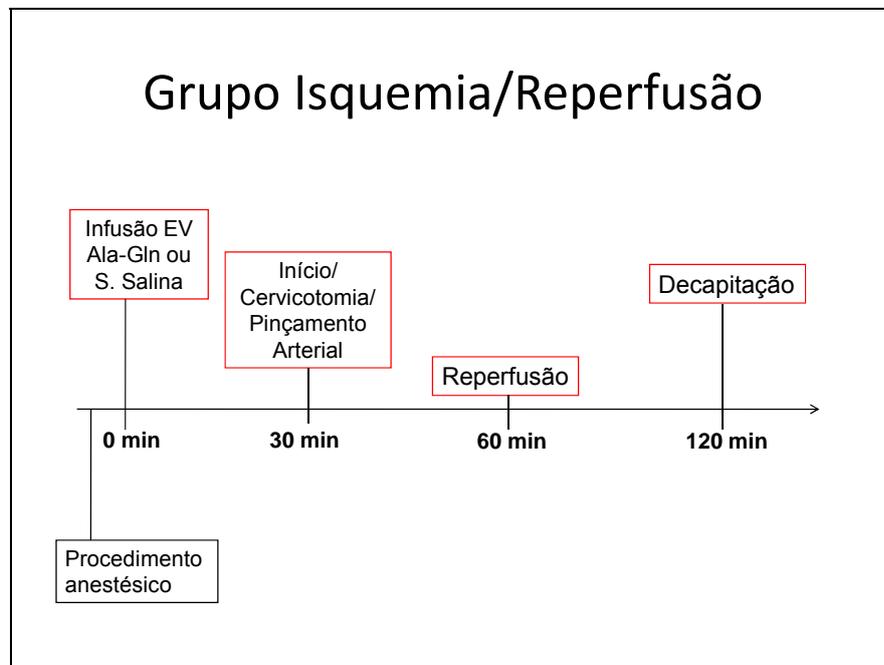
**FIGURA 6** – Grupo Isquemia

**Sham 90 minutos:** animais submetidos a procedimento cirúrgico sem oclusão das ACCs. Foi injetada solução salina ou Ala-Gln a 20% na dose de 0,5g/Kg na veia femoral, decorridos 30 minutos foi realizada cervicotomia, após 60 minutos os animais foram decapitados e os hemisférios cerebrais retirados. (FIGURA 7)



**FIGURA 7** - Grupo Sham 90 minutos

**Isquemia/Reperusão:** animais submetidos a procedimento cirúrgico com oclusão das ACCs. Foi injetada solução salina ou Ala-Gln a 20% na dose de 0,5g/Kg na veia femoral, decorridos 30 minutos foi realizada cervicotomia e oclusão das ACCs, após 30 minutos de isquemia os cliques foram retirados simultaneamente e deixados 60min de reperusão, logo em seguida os animais foram decapitados e os hemisférios cerebrais retirados. (FIGURA 8)



**FIGURA 8** – Grupo Sham Isquemia/ Reperusão

### 3.3.2 Técnica Anestésica

Os animais foram anestesiados através de uma associação de cloridrato de cetamina a 10% na dose de 90mg/kg e cloridrato de xilasina a 10% na dose de 10mg/kg administrada simultaneamente por via intramuscular na parte posterior da coxa. O animal foi considerado anestesiado quando ocorreu perda dos reflexos córneo-palpebrais e de retirada da pata traseira contralateral ao estímulo doloroso por prensão.

### 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.

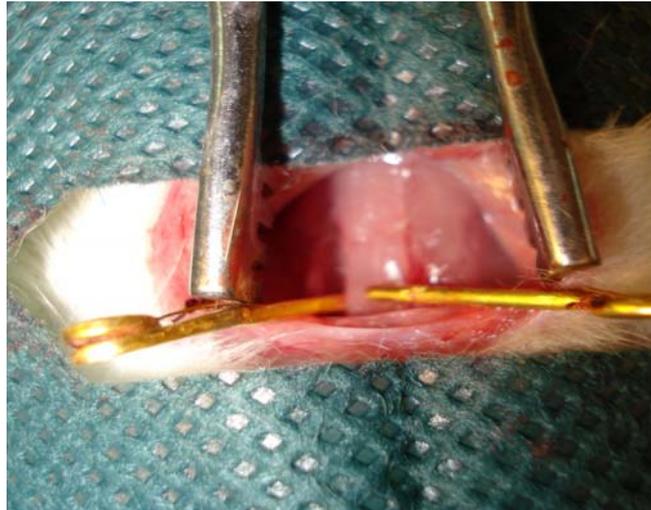
Após a anestesia, foi realizada tricotomia seguida de incisão na região femural e injetado solução de Ala-Gln ou solução salina na veia femural de acordo com o protocolo experimental. Passados 30 minutos da infusão iniciava-se o procedimento cirúrgico.

#### 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 Estabelecimento da isquemia/reperfusão cerebral

De acordo com as manobras cirúrgicas previstas para cada grupo, realizou-se oclusão bilateral e concomitante das ACCs com cliques vasculares tipo bulldog (FIGURA 9). Durante todo o tempo, a região foi irrigada com solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril para prevenir a desidratação tecidual.



**FIGURA 9** - Estabelecimento da isquemia

### 3.3.3.3 Morte dos animais

Após a realização de todas as manobras cirúrgicas planejadas, ainda sob efeito anestésico adequado os animais foram decapitados e imediatamente após foi realizado 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.

## 3.4 AVALIAÇÃO DO DANO ISQUÊMICO

### 3.4.1 Preparação dos tecidos

Em seguida os cérebros foram rapidamente removidos, e cortados em seções de 2 mm de espessura a partir do pólo anterior no sentido coronal utilizando a matriz cerebral do rato (Brain Matrix; Zivic Instruments ®). (FIGURA 10)

As fatias do cérebro foram lavadas em solução salina a temperatura ambiente até serem transferidas para o TTC.



**FIGURA 10** - Brain Matrix (Zivic Instruments®)

### 3.4.2 Coloração

O cloreto de 2,3,5 Trifenil Tetrazólio foi dissolvido em solução salina na concentração de 1% (w/v) e imediatamente utilizado para a coloração das fatias do cérebro.

As fatias do cérebro foram imersas em solução de TTC a 1% (10 ml), protegido da luz e colocados em banho maria em temperatura de 37°C por 30 minutos. No decorrer desse tempo de imersão no corante, os cortes foram mudados de posição a cada 10 minutos para garantir que ambos os lados corassem com a mesma intensidade. Em seguida foi realizada a lavagem em solução salina a 37° C (três lavagens, 1 minuto cada), de acordo com o protocolo utilizado por Joshi, Join, e Murthy em 2004.



**FIGURA 11** - Secções de 2 mm antes da coloração TTC

### 3.4.3 Análise das imagens

Após a coloração, as fatias foram transportadas em uma placa de Petri de vidro, submersas em solução salina e colocadas diretamente na mesa de digitalização com as superfícies do corte a serem comparadas de frente para o scanner.

As imagens das cores das fatias foram obtidas diretamente da digitalização dos cortes, em um scanner de mesa (HP Scanjet G 2410 / G 2710 ®) controlado por um computador com Processador Intel Core 2 Duo (Core 2 Duo, Memória 4 GB, HD 160 STATA, Windows Vista ®).

Os cortes foram digitalizados em scanner de alta resolução (600 dpi scanner), sem correção de cor, realce de imagem ou ganho linear, e as imagens foram armazenadas no disco rígido descompactado no formato de arquivo de imagem.

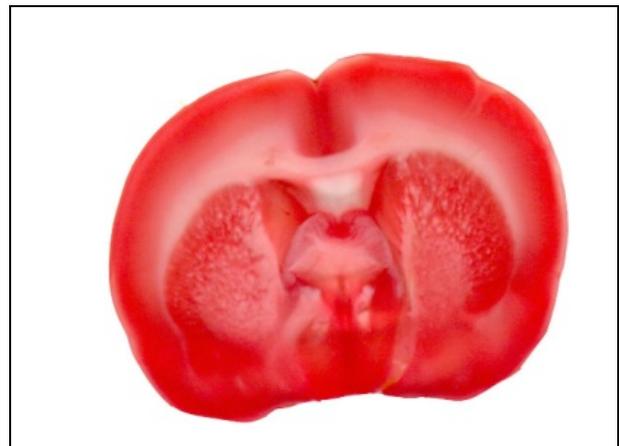
A área do dano isquêmico dos hemisférios foi medida em cada fatia do cérebro utilizando o programa morfométrico The University of Texas Health Science Center in San Antonio (UTHSCSA), Image Tool for Windows. Version 3.00 ®.

O método de determinação de área foi calculado diretamente a partir da escala de calibração linear da imagem, juntamente com as fatias do cérebro, subtraindo a área total da fatia do percentual de área isquêmica.

A área de infarto foi expressa como % de infarto, contendo área do hemisfério.



**FIGURA 12** – Imagem digitalizada, Grupo Sham 60min corado com TTC



**FIGURA 13** - Imagem digitalizada, Grupo Isquemia corado com TTC

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados do estudo foram digitados pelo Excel for Windows, versão 2007 da Microsoft e analisados através do STATA™, versão 10.0, desenvolvido pela STATA Corporation, Texas, USA.

A estatística descritiva foi expressa através de mediana, erro e desvio-padrão. Para comparar os valores pré e pós-procedimento da situação indutora de estresse foram empregados os testes "t" *student* pareado e ANOVA após análise de normalidade através do teste Shapiro-Wilk. A significância foi mantida em 5% para todos os casos.

## 4 RESULTADOS

A seguir são apresentados os dados resultantes da análise macroscópica e histopatológica dos grupos estudados.

### 4.1 Análise histoquímica das áreas de isquemia

#### 4.1.1 Sham 30 minutos versus Isquemia Salina

A média do percentual de área isquêmica do grupo Sham 30' foi inferior ao grupo Isquemia com diferença estatisticamente significativa ( $p= 0,01$ ). (FIGURA 14; TABELA 1).



**FIGURA 14** – Distribuição da variabilidade do percentual de área isquêmica por grupos, Sham 30' e Isquemia Salina.

**TABELA 1** - Distribuição da variabilidade do percentual de área isquêmica por grupos, Sham 30' e Isquemia Salina.

GRUPO	n	PERCENTUAL DE ÁREA ISQUÊMICA		
		m (dp)	IC (95%)	p
Sham 30'	6	0,12 ±0,20	0,98 a 0,34	0,01
Isquemia Salina	6	13,24 ± 8,82	3,98 a 22,50	

Teste t pareado

#### 4.1.2 Isquemia Salina versus Isquemia Ala-Gln

Apesar da diferença do percentual de área isquêmica do grupo Isquemia Salina versus Isquemia Ala-Gln não foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p= 0,34$ ). (FIGURA 15; TABELA 2).



**FIGURA 15** - Distribuição da variabilidade do percentual de área isquêmica por grupos, Isquemia Salina e Isquemia Ala-Gln.

**TABELA 2** - . Distribuição da variabilidade do percentual de área isquêmica por grupos, Isquemia Salina e Isquemia Ala-Gln.

GRUPO	n	PERCENTUAL DE ÁREA ISQUÊMICA		
		m (dp)	IC (95%)	p
Isquemia Salina	6	13,24 ± 8,82	3,98 a 22,50	0,34
Isquemia Ala-Gln	6	15,35 ± 6,80	8,20 a 22,49	
Teste t pareado				

#### 4.1.3 Sham 30 minutos versus Isquemia Ala-Gln

A média do percentual de área isquêmica do grupo Sham 30' foi inferior ao grupo Isquemia Ala-Gln com diferença estatisticamente significativa ( $p= 0,03$ ). (FIGURA 16; TABELA 3).



**FIGURA 16.-** Distribuição da variabilidade do percentual de área isquêmica por grupos, Sham 30' e Isquemia Ala-Gln.

**TABELA 3 -** Distribuição da variabilidade do percentual de área isquêmica por grupos, Sham 30' e Isquemia Ala-Gln.

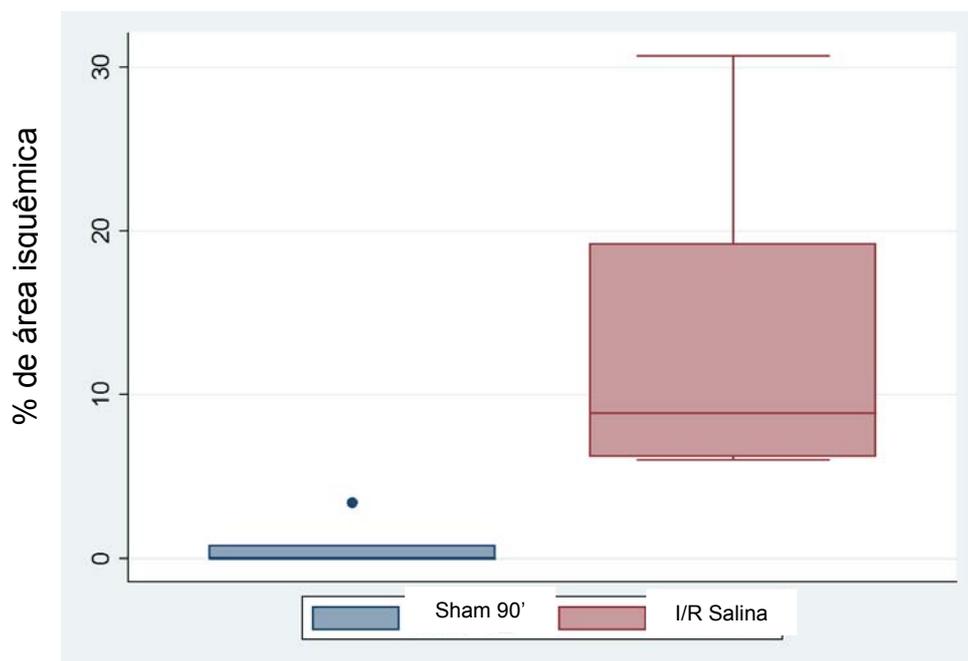
GRUPO	n	PERCENTUAL DE ÁREA ISQUÊMICA		
		m (dp)	IC (95%)	p
Sham 30'	5	0,55 ± 0,53	0,11 a 1,21	
Isquemia Ala-Gln	5	16,64 ± 6,73	8,28 a 25,01	0,03

Teste t pareado

Um animal de cada grupo foi excluído por ter apresentado quadro convulsivo e aumento da temperatura, respectivamente.

#### 4.1.4 Sham 90 minutos *versus* Isquemia/Reperusão Salina

A média do percentual de área isquêmica do grupo Sham 90' foi inferior ao grupo Isquemia/Reperusão Salina com diferença estatisticamente significativa ( $p=0,01$ ). (FIGURA 17; TABELA 4).



**FIGURA 17** - Distribuição dos grupos Sham 90' e Isquemia/Reperusão Salina por percentual de área isquêmica.

**TABELA 4** - Distribuição dos grupos Sham 90' e Grupo Isquemia/Reperusão Salina por percentual de área isquêmica.

GRUPO	PERCENTUAL DE ÁREA ISQUÊMICA			
	n	m (dp)	IC (95%)	p
Sham 90'	6	0,70 ± 1,35	0,72 a 2,12	0,01
Isquemia/Reperusão Salina	6	13,30 ± 9,91	2,90 a 23,71	

Teste t pareado

#### 4.1.5 Isquemia/Reperusão Salina *versus* Isquemia/Reperusão Ala-Gln

A média do percentual de área isquêmica do grupo Isquemia/Reperusão Salina foi superior ao grupo Isquemia/Reperusão Ala-Gln com diferença estatisticamente significativa ( $p=0,03$ ). (FIGURA 18; TABELA 5).



**FIGURA 18.-** Distribuição dos grupos Isquemia/Reperusão Salina e Isquemia/Reperusão Ala-Gln por percentual de área isquêmica.

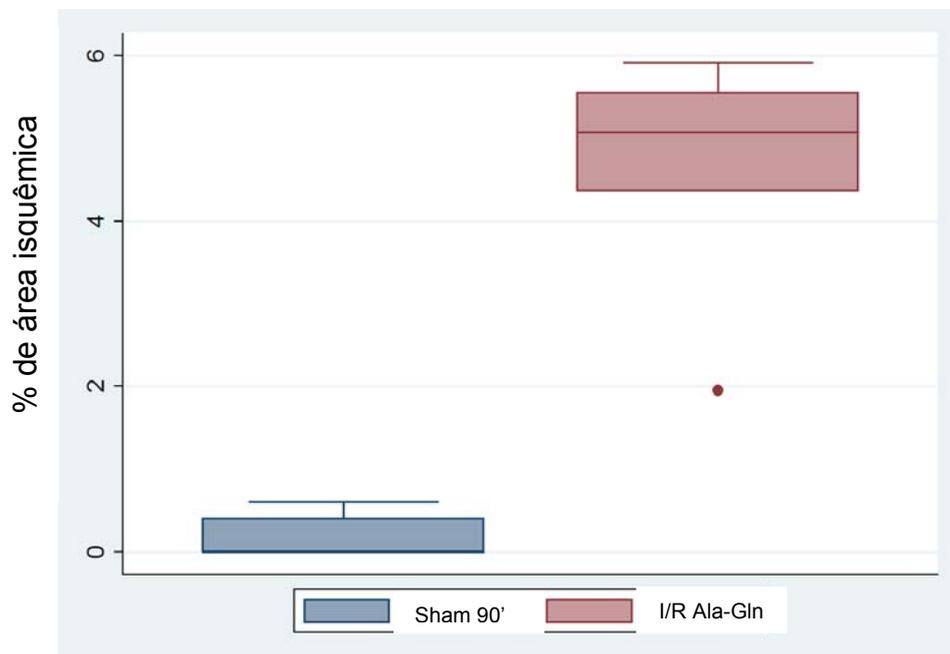
**TABELA 5** - Distribuição dos grupos Isquemia/Reperusão Salina e Isquemia/Reperusão Ala-Gln por percentual de área isquêmica.

GRUPO	n	PERCENTUAL DE ÁREA ISQUÊMICA		
		m (dp)	IC (95%)	p
Isquemia/Reperusão Salina	6	13,30 ± 9,91	2,90 a 23,71	0,03
Isquemia/Reperusão Ala-Gln	6	4,65 ± 1,44	3,13 a 6,17	

Teste t pareado

#### 4.1.6 Sham 90 minutos *versus* Isquemia/Reperusão Ala-Gln

A média do percentual de área isquêmica do grupo Sham 90' foi inferior ao grupo Isquemia/Reperusão Ala-Gln com diferença estatisticamente significativa ( $p=0,01$ ). (FIGURA 19; TABELA 6).



**FIGURA 19** - Distribuição dos grupos Sham 90' e Isquemia/Reperusão Ala-Gln por percentual de área isquêmica.

**TABELA 6** - Distribuição dos grupos Sham 90' e Isquemia/Reperusão Ala-Gln por percentual de área isquêmica.

GRUPO	PERCENTUAL DE ÁREA ISQUÊMICA			
	n	m (dp)	IC (95%)	p
Sham 90'	6	0,17 ± 0,27	0,11 a 0,45	
Isquemia/Reperusão Ala-Gln	6	4,65 ± 1,44	3,13 a 6,17	0,01

Teste t pareado

## 5 DISCUSSÃO

O principal resultado encontrado no presente estudo foi que a média do percentual de área isquêmica do grupo Isquemia/Reperusão Salina foi superior ao grupo Isquemia/Reperusão Ala-Gln com diferença estatisticamente significativa ( $p=0,03$ ). Esses resultados sugerem que o aumento da biodisponibilidade de glutamina, como consequência da administração exógena, foi capaz de restaurar gradativamente os níveis de glutatona, o que pode ter diminuído a geração de radicais livres e estresse oxidativo e resultado em maior proteção e proliferação celulares.

O animal de experimentação escolhido foi o rato Wistar albino, do sexo masculino, com o peso variando entre 250 a 300g. Trata-se de um mamífero de baixo custo de aquisição e manutenção, de fácil manuseio, elevada resistência à infecção e ao trauma cirúrgico e com admirável sistema de homeostasia, além de grande semelhança, do ponto de vista da anatomia e fisiologia cerebrovasculares, com as outras espécies, inclusive a humana (TORRES, 2003).

Quanto à anestesia, optou-se pela administração de uma associação de cloridrato de cetamina (90mg/kg) e cloridrato de xilasina (10mg/kg), administrada simultaneamente por via intramuscular na região posterior da coxa. O sinergismo entre essas drogas promove diminuição dos efeitos colaterais (salivação, hipotensão e depressão cardiovascular), anestesia, analgesia e relaxamento muscular o que permite cirurgias mais invasivas (SILVA, 2002).

Tem-se utilizado diversos modelos animais para estudar os mecanismos neurais que envolvem a degeneração celular e as respostas ao insulto isquêmico. O modelo de isquemia global leva a uma grande extensão de lesões celulares, uma vez que as ACCs contribuem para a irrigação da maior parte das regiões ântero-mediais do cérebro (SCHALLER; GRAF, 2004).

No presente estudo foi utilizado um modelo experimental de isquemia global reversível do prosencéfalo por oclusão de dois vasos (ACCs) que produziu isquemia global transitória parcial, sem manobras ou recursos acessórios seguindo o protocolo estabelecido por Muniz, Faria e Vasconcelos (2004), o qual se mostrou 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.

Os resultados do presente estudo mostraram diferenças estatisticamente significantes no percentual de área isquêmica do grupo Sham 30 minutos com relação ao grupo Isquemia Salina ( $p= 0,01$ ) e do grupo Sham 90 minutos com relação ao grupo Isquemia/Reperfusão Salina ( $p= 0,01$ ).

Trabalho semelhante foi realizado por Vale *et al.* em 2001, onde além da oclusão bilateral da artéria carótida comum com controle da temperatura foi associada hipotensão arterial para a detecção de anormalidades metabólicas ou eletrofisiológicas.

Estudos prévios (BEZERRA FILHO *et al.*, 2002; BARBOSA *et al.*, 2003; LEITÃO *et al.*, 2008; ALVES *et al.*, 2005) utilizaram a glutamina com o intuito de proteção do evento isquêmico, semelhante ao utilizado no presente estudo. A forma de aplicação utilizada foi a L-alanil-glutamina, um dipeptídeo precursor da glutamina, que apresenta funções metabólicas importantes, tais como: combustível oxidativo, transferência de nitrogênio e carbono entre os tecidos, regulação na homeostasia ácido-base, precursora da amônia excretada pelo rim, além de ser uma molécula precursora da gliconeogênese, da biossíntese de purinas, de pirimidinas (e, conseqüentemente ácidos nucleicos) e de outros aminoácidos.

Bezerra Filho *et al.* (2002) mostraram, *in vivo*, que o pré tratamento com Ala-Gln em isquemia renal provoca alterações significativas de lactacemia e concentrações de lactato do tecido renal, promovendo o aumento de glicose e posteriormente aumentando a disponibilidade de glutamato, mostrando ativação do malato aspartato.

A oferta endovenosa de Ala-Gln promove biodisponibilidade de glutamato aos tecidos, já que a Ala-Gln é convertida em glutamato pela enzima glutaminase. O glutamato, gerado a partir da glutaminólise, favorece a conversão de malato em oxaloacetato, potencializando a atividade da lançadeira malato-aspartato, que, por sua vez, regenera o NAD<sup>+</sup> no citosol, favorecendo a conversão de 1 molécula de glicose em 2 moléculas de piruvato (DANIELISSOVÁ *et al.*, 2005).

Barbosa *et al.* (2003) em estudo sobre a administração da Ala-Gln em ratos submetidos a queimadura em água fervente, mostraram que a utilização do piruvato pela glicólise no músculo é preponderantemente anaeróbica. O aumento da

concentração de lactato tecidual pode vir a ser decorrente da oferta exógena de Ala-Gln, que transformada em glutamato, leva a ativação do ciclo malato aspartato com consequente favorecimento da glicólise anaeróbica. A oferta da Ala-Gln induziu um possível aumento na captação de glicose tanto na pele sadia quanto na pele queimada.

Vale *et al.* (2003) mostraram o efeito citoprotetor da infusão de solução de glutathione em isquemia cerebral experimental por oclusão das artérias carótidas comuns em ratos.

Por mais de duas décadas, o cloreto de 2,3,5 Trifenil Tetrazólio (TTC) tem sido utilizado para identificação e determinação do tamanho do infarto cerebral em diferentes modelos animais de isquemia cerebral (LIU; SCHAFER; Mc COLLOUGH, 2009). No presente estudo, utilizou-se TTC a 1%, e comparou-se o contraste da coloração (em termos de densidade ótica) e a área/tamanho do infarto seguindo o protocolo proposto por Joshi, Jain e Murphy (2004). Bederson *et al.* (1986) ao avaliar a utilização do TTC na detecção e quantificação cerebral experimental em ratos 24 horas após evento isquêmico evidenciou a efetividade da técnica, além das vantagens do custo, rapidez e conveniência do método.

Os resultados do presente estudo mostraram diferenças estatisticamente significantes no percentual de área isquêmica do grupo Sham 30 minutos com relação ao grupo Isquemia Ala-Gln ( $p=0,03$ ) e do grupo Sham 90 minutos com relação ao grupo Isquemia/Reperusão Ala-Gln ( $p=0,01$ ). O achado demonstra o declínio da concentração de glutamina plasmática na vigência de estados catabólicos, como injúria e infecção (FURUKAWA *et al.*, 2000, LEITÃO *et al.*, 2008; ALVES *et al.* 2003). Esse fato é relevante, especialmente em indivíduos susceptíveis, como em portadores de doenças cardiovasculares, neoplasia ou ainda em indivíduos em recuperação pós-operatória (GUIMARÃES FILHO *et al.*, 2004)

A constância do fluxo sanguíneo cerebral é importante para o fornecimento de glicose e oxigênio para o metabolismo aeróbico. A redução de 25 a 40% do normal em uma zona de penumbra isquêmica é suportada pelo cérebro em torno de até 4 horas. Reduções maiores levam a perda da homeostase iônica, que se inicia com a depleção de ATP, alterando os sistemas de transporte ativo, seguindo-se a abertura dos canais dos receptores tipo NMDA estimulados pelo glutamato, permitindo a penetração do  $Ca^{++}$  em grande quantidade para o interior das células, o que

desencadeia a cascata metabólica culminando na morte e lise celular (MÖDERSCHEIM *et al.*, 2007).

De acordo com Savitz e Rosebaum (1998), com a extensão do dano cerebral, o estímulo nocivo pode levar as células nervosas à necrose, havendo ruptura da membrana celular e liberação do material intracitoplasmático, do tecido vizinho (WISCHMEYER, 2002). Pode, ainda, ocorrer a apoptose, em que a célula nervosa mantém sua membrana plasmática, portanto, não liberando seu material intracelular, não havendo liberação de substância com atividade pró-inflamatória e, assim, não agredindo outras células. A apoptose é desencadeada na presença de certos estímulos lesivos, principalmente pela toxicidade do glutamato, por estresse oxidativo e alteração na homeostase do  $\text{Ca}^{++}$  (SAMALLI; ORRENIUS, 1998).

Tang, Rao e Hu (2000) ao estudarem as alterações nos níveis de aminoácidos no córtex cerebral e hipocampo, na isquemia cerebral global em gerbils, mostraram que a diminuição de alguns aminoácidos como aspartato e glutamina podem constituir as bases bioquímicas da lesão cerebral.

Já Tardini *et al.* (2003) ao avaliarem dois modelos experimentais de isquemia e reperfusão cerebral em ratos, com oclusão temporária carotídea, associada ou não a oclusão vertebral, não demonstraram alterações consistentes de marcadores de lesão cerebral.

Esse estudo não mostrou uma diferença do percentual de área isquêmica do grupo Isquemia Salina com relação a Isquemia Ala-Gln ( $p= 0,34$ ). As maiores alterações metabólicas verificadas no estudo de Faria, Muniz e Vasconcelos (2007), foram nos primeiros minutos de reperfusão, o que poderia justificar o fato de a administração de Ala-Gln não ter apresentado diferença estatisticamente significativa da área de infarto.

Apesar das limitações da metodologia aplicada, o presente estudo fortalece a hipótese de efeito protetor da L-alanil-glutamina na isquemia e reperfusão cerebral.

Como foi demonstrado por Wischmeyer em 2002, a glutamina aumenta a expressão do mRNA para proteína de choque térmico (HPS), em especial HSP 72 e 27 em ratos. As HPS podem prevenir a ativação do fator de transcrição NF $\kappa$ B; e com isso, diminuir a expressão de citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 (IL-1), além da expressão da NOS $_i$  (WISHMEYER, 2002).

Caberá a trabalhos posteriores a utilização desses marcadores inflamatórios para enfatizar a efetividade da utilização de Ala-Gln nos mecanismos deletérios encontrados na lesão de isquemia/reperfusão cerebral.

## 6 CONCLUSÃO

A administração prévia de L-alanil-glutamina (Ala-Gln) a ratos submetidos à isquemia e isquemia/reperfusão cerebral:

1. Não promove redução no percentual de área de necrose na lesão isquêmica.
2. Reduz o percentual de necrose cerebral na lesão isquemia/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, 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, 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

FURST, P.; ALBERS, S.; STEHLE, P. *et al.* Parenteral use of l-alanyl-glutamine and glycyl-L-tirosine 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.

- GARCIA DE LORENZO, A.; ZARAZAGA, A.; GARCÍA-LUNA, P. P.; GONZALES-HUIX, F.; LÓPEZ-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.
- 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.
- 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.
- 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.
- LACEY, J. W. Is glutamine a conditionally essential amino acid? **Nutr. Rev.**, v. 48, n. 8, p. 297-309, 1990.
- 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.
- 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.
- LIU, F.; SCHAFER, 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.
- MASSAMBANI, E. M.; BAZOTTE, R. B. Importância da glutamina na terapia nutricional. **Arq. Cienc. Saúde Unipar**, v. 2, n. 3, 1998.
- 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.
- MORLION, B. S. Total parenteral nutrition with glutamine dipaptide 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.

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.

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.

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.

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.

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

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.

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.

## 8 APÊNDICE

### 8.1 APÊNDICE A - DROGAS, SOLUÇÕES, LÍQUIDOS E CORANTES UTILIZADOS

- Cetamina (90mg/kg)
- Cloridrato de xilasina (10mg/kg)
- Solução salina a 0,9%
- L-alanil-glutamina (Ala-Gln) a 20% (Dipeptiven®, do Laboratório Fresenius)
- Cloreto de 2,3,5-Trifenil Tetrazólio a 1% diluído em solução salina

### 8.2 APÊNDICE B – Teste Estatístico de Normalidade (Shapiro Wilk)

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
Sham 30'	6	0,84	1,93	1,07	0,14
Isquemia Salina	6	0,89	1,29	0,39	0,34
Sham 30'	5	0,69	3,60	2,39	0,00
Isquemia Ala-Gln	6	0,82	2,12	1,25	0,10
Sham 90'	6	0,75	3,00	1,98	0,02
I/R Salina	6	0,80	2,37	1,48	0,06
Sham 90'	6	0,87	1,56	0,70	0,24
I/R Ala-Gln	6	0,83	2,05	1,18	0,11

## 8.3 APÊNDICE C – Dados brutos

GRUPO	Animal	Área Total (AT)	Área Isquêmica (AI)	AI/AT	%
Sham 30 minutos (Salina)	1	72.706,00	163,00	0,002	0,22
Sham 30 minutos (Salina)	2	12.476,00	0,00	0,000	0,00
Sham 30 minutos (Salina)	3	14.206,00	0,00	0,000	0,00
Sham 30 minutos (Salina)	4	13.028,00	0,00	0,000	0,00
Sham 30 minutos (Salina)	5	13.186,00	0,00	0,000	0,00
Sham 30 minutos (Salina)	6	84.268,00	429,00	0,005	0,51
Isquemia Salina	1	563.942,00	146.705,00	0,260	26,01
Isquemia Salina	2	497.841,00	49.458,00	0,099	9,93
Isquemia Salina	3	668.305,00	14.994,00	0,022	2,24
Isquemia Salina	4	79.597,50	7.660,50	0,096	9,62
Isquemia Salina	5	60.824,00	13.170,00	0,217	21,65
Isquemia Salina	6	67.231,00	6.731,00	0,100	10,01
Sham 30 minutos (Ala-Gln)	1	73.778,00	0,00	0,000	0,00
Sham 30 minutos (Ala-Gln)	2	69.919,00	0,00	0,000	0,00
Sham 30 minutos (Ala-Gln)	3	77.972,50	564,50	0,007	0,72
Sham 30 minutos (Ala-Gln)	4				
Sham 30 minutos (Ala-Gln)	5	84.853,50	1.022,50	0,012	1,21
Sham 30 minutos (Ala-Gln)	6	71.994,50	594,50	0,008	0,83
Isquemia Ala-Gln	1	66.613,00	7.306,50	0,110	10,97
Isquemia Ala-Gln	2	83.565,00	18.827,00	0,225	22,53
Isquemia Ala-Gln	3	80.582,50	17.794,50	0,221	22,08
Isquemia Ala-Gln	4	67.705,50	6.010,50	0,089	8,88
Isquemia Ala-Gln	5	83.478,50	16.452,50	0,197	19,71
Isquemia Ala-Gln	6	70.734,00	5.617,00	0,079	7,94
Sham Isquemia/Reperusão (Salina)	1	91.548,50	3.107,00	0,034	3,39
Sham Isquemia/Reperusão (Salina)	2	79.118,00	655,50	0,008	0,83
Sham Isquemia/Reperusão (Salina)	3	70.489,50	0,00	0,000	0,00
Sham Isquemia/Reperusão (Salina)	4	479.278,00	0,00	0,000	0,00
Sham Isquemia/Reperusão (Salina)	5	78.198,50	0,00	0,000	0,00
Sham Isquemia/Reperusão (Salina)	6	534.564,50	0,00	0,000	0,00
Isquemia/Reperusão (Salina)	1	523.529,00	32.564,50	0,062	6,22
Isquemia/Reperusão (Salina)	2	500.161,00	30.106,00	0,060	6,02
Isquemia/Reperusão (Salina)	3	517.869,50	99.466,00	0,192	19,21
Isquemia/Reperusão (Salina)	4	550.525,00	35.718,50	0,065	6,49
Isquemia/Reperusão (Salina)	5	76.470,50	8.561,00	0,112	11,20
Isquemia/Reperusão (Salina)	6	523.295,00	160.677,00	0,307	30,70

Sham 90 minutos (Ala-Gln)	1	128.155,00	0,00	0,000	0,00
Sham 90 minutos (Ala-Gln)	2	137.181,50	834,00	0,006	0,61
Sham 90 minutos (Ala-Gln)	3	143.378,00	0,00	0,000	0,00
Sham 90 minutos (Ala-Gln)	4	65.768,00	0,00	0,000	0,00
Sham 90 minutos (Ala-Gln)	5	82.275,00	340,00	0,004	0,41
Sham 90 minutos (Ala-Gln)	6	77.852,50	0,00	0,000	0,00
Isquemia/Reperusão (Ala-Gln)	1	73.615,00	1.436,50	0,020	1,95
Isquemia/Reperusão (Ala-Gln)	2	18.374,50	802,00	0,044	4,36
Isquemia/Reperusão (Ala-Gln)	3	72.099,00	3.389,00	0,047	4,70
Isquemia/Reperusão (Ala-Gln)	4	72.229,50	3.943,00	0,055	5,46
Isquemia/Reperusão (Ala-Gln)	5	85.983,00	5.094,00	0,059	5,92
Isquemia/Reperusão (Ala-Gln)	6	75.557,00	4.197,00	0,056	5,55

**8. ANEXOS**

---



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 n° 69/09, sobre o projeto intitulado: “EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE I-ALANIL-GLUTAMINA APÓS ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM CÉREBRO DE RATOS WISTAR”, de responsabilidade de ANDRÉA DA NÓBREGA CIRINO NOGUEIRA, 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 29 de junho de 2009.

Fortaleza, 30 de junho de 2009.

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

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)