



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Kelston Paulo Felice de Sales

**Efeito do uso de vitamina C na prevenção de lesões cerebrais por
reperfusão: estudo experimental em ratos**

Rio de Janeiro

2019

Kelston Paulo Felice de Sales

Efeito do uso de vitamina C na prevenção de lesões cerebrais por reperfusão:
estudo experimental em ratos

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Nigri

Coorientador: Prof. Dr. Sebastião Barreto de Brito Filho

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S163 Sales, Kelston Paulo Felice de.
Efeito do uso de vitamina C na prevenção de lesões cerebrais por
reperfusão: estudo experimental em ratos / Kelston Paulo Felice de
Sales. - 2019.
51 f.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Nigri
Coorientador: Prof. Dr. Sebastião Barreto de Brito Filho

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-Graduação em
Ciências Médicas.

1. Lesão cerebral – Teses. 2. Lesões encefálicas – Prevenção e
controle. 3. Vitamina C. 4. Reperfusão. 5. Endarterectomia das
carótidas. 6. Estresse oxidativo. I. Nigri, Flávio. II. Brito Filho,
Sebastião Barreto de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.831-005.1

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira - CRB/7 5302

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial
desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Kelston Paulo Felice de Sales

**Efeito do uso de vitamina C na prevenção de lesões cerebrais por reperfusão:
estudo experimental em ratos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2019.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Nigri
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ
Coorientador: Prof. Dr. Sebastião Barreto de Brito Filho
Universidade Federal do Maranhão

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Egas Caparelli Moniz Dáquer
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Elington Lannes Simões
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Bruno Araújo Serra Pinto
Universidade Federal do Maranhão

Rio de Janeiro
2019

DEDICATÓRIA

A Deus em primeiro lugar pela dádiva da vida e à minha mãe, Antonia Benedita Felice, pelo amor incondicional e meu exemplo de vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar pela dádiva da vida e pela oportunidade de realizar o aprimoramento contínuo.

À minha mãe Antonia Benedita Felice, pelo amor incondicional e o exemplo de vida.

À minha irmã por sempre me apoiar e incentivar a lutar pelos meus sonhos.

À Mayara Rebonatto por toda cumplicidade, contribuição e por saber entender tantas ausências.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Flavio Nigri, meu muito obrigado pela paciência, confiança e ensinamentos durante esta jornada.

Ao meu chefe e co-orientador Prof. Dr. Sebastião Barreto de Brito Filho agradeço pela liderança, amizade e incentivo a realização do projeto.

À Profa. Dra. Rita da Graça Carvalho Frazão Corrêa pela determinação incansável e o apoio irrestrito na execução de todas as etapas deste estudo.

Ao Prof. Dr. Humberto Milani e toda equipe do Laboratório de Isquemia Cerebral e Neuroproteção da Universidade Estadual de Maringá, meus agradecimentos pelos ensinamentos na graduação e neste mestrado.

Ao Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão - HUUFMA, pelo interesse e possibilidade em qualificar seus técnicos por meio do Termo de Cooperação junto ao PGCM.

Aos membros do Laboratório de Fisiologia da UFMA, em especial aos Professores Dr. Marcos Paes e Dr. Bruno Araújo pelo esforço conjunto e apoio fundamental.

Aos professores das disciplinas, obrigatórias ou eletivas, pela grande contribuição. Aos amigos conquistados nesse caminho.

Enfim, a todos que participaram direta ou indiretamente e estiveram envolvidos neste projeto, meu muito obrigado.

Combati o bom combate, acabei a carreira, guardei a fé ...

2 Timóteo 4:7-8

RESUMO

SALES, Kelston Paulo Felice de. **Efeito do uso de vitamina C na prevenção de lesões cerebrais por reperfusão: estudo experimental em ratos.** 20019. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

A síndrome de reperfusão após endarterectomia de carótida é uma complicação associada à autorregulação cerebrovascular em um hemisfério cerebral hipoperfundido cronicamente, levando a danos neurológicos graves. A vitamina C é um importante antioxidante no metabolismo do cérebro que tem mostrado algumas ações neuroprotetoras. Este trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos potenciais da vitamina C no tratamento da reperfusão cerebral em comparação ao placebo (salina) em ratos. Foram realizados experimentos com ratos Wistar machos divididos em 3 grupos: i) Sham (n = 4), animais que receberam injeção intraperitoneal de soro fisiológico – NaCl a 0,9% (0,1 mL / kg) e foram submetidos à dissecação de artérias carótidas sem clameamento; ii) Controle (n = 4), animais que receberam injeção intraperitoneal de soro fisiológico – NaCl a 0,9% (0,1 mL / kg) e foram submetidos à dissecação das artérias carótidas com pinçamento temporário das duas artérias; iii) Vitamina C (n = 4), animais que receberam injeção intraperitoneal de vitamina C (750mg / kg) e foram submetidos á dissecação de artérias carótidas com clameamento temporário. A avaliação comportamental foi então realizada em todos os grupos, incluindo o campo aberto, o teste do labirinto de água de Morris e o teste do Rotarod. Os níveis de malondialdeído (MDA) no hipocampo e estriado foram medidos usando fluorometria. Os resultados do experimento realizado mostraram que os ratos tratados com Vitamina C apresentaram um comportamento similar em todos os três testes em comparação ao grupo Sham ($p > 0,05$), e significativamente diferente dos controles ($p < 0,05$). Os níveis de MDA no hipocampo e estriado também foram diminuídos no grupo de vitamina C em comparação com o placebo ($p < 0,05$). Os resultados encontrados permitiram concluir que a vitamina C associou-se à preservação comportamental e motora, bem como à diminuição dos níveis de MDA cerebral após isquemia cerebral induzida em ratos.

Palavras-chave: Endarterectomia de Carótida. Síndrome de Reperfusão. Estresse Oxidativo. Malondialdeído. Vitamina C

ABSTRACT

SALES, Kelston Paulo Felice de. **Effect of vitamin C on the prevention of reperfusion brain injury: experimental study in rats..** 20019. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Reperfusion syndrome after carotid endarterectomy is a complication associated with cerebrovascular self-regulation in a chronically hypoperfused cerebral hemisphere, leading to neurological damage. Vitamin C is an important antioxidant in blood metabolism that has been shown some neuroprotective actions. This study aims to evaluate the potential effects of vitamin C in the treatment of cerebral reperfusion compared to placebo (saline) in rats. Experiments were performed with male Wistar rats divided into 3 groups: i) Sham (n = 4), animals receiving intraperitoneal injection of NaCl 0.9% saline solution (0.1 mL / kg) and underwent carotid artery dissection without clamping; ii) Control (n = 4), animals receiving intraperitoneal injection of NaCl 0.9% saline solution (0.1 mL / kg) and submitted to dissection of the carotid arteries with temporary clamping of the two arteries; iii) Vitamin C (n = 4), animals receiving intraperitoneal injection of vitamin C (750mg / kg) and underwent a carotid artery dissection with temporary clamping. Behavioral assessment was performed in all groups, including the open field, the Morris water maze test, and the Rotarod test. The levels of malondialdehyde (MDA) not hippocampus and striatum were measured using fluorometry. The results of the experiment were compared with the same response parameters of the sham group ($p > 0.05$), and the different types of controls ($p < 0.05$). MDA levels in the hippocampus and striatum were also decreased in the vitamin C group compared to placebo ($p < 0.05$). The results found allowed vitamin C to be associated with induced cerebral ischemia in rats.

Keywords: Carotid Endarterectomy. Reperfusion Syndrome. Oxidative Stress. Malondialdehyde. Vitamin C.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 -	Fluxograma de desenho experimental	24
Figura 02 -	Fluxograma do procedimento experimental	25
Figura 03 -	Rato sob anestesia geral tricotomizado	26
Figura 04 -	Equipamento de anestesia	26
Figura 05-	Esquema da anatomia vascular cervical do rato	27
Figura 06 -	Clampes aplicadas em ambas carótidas comuns durante o procedimento	28
Figura 07 -	Dissecção da artéria carótida comum esquerda	28
Figura 08 -	Teste de campo aberto	30
Figura 09 -	Teste rotarod	31
Figura 10 -	Teste labirinto aquático	32
Figura 11-	Cérebro íntegro	33
Figura 12 -	Hipocampo e corpo estriado	34

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Parâmetros morfométricos	37
Gráfico 2 -	Avaliação Motora. Habilidades motoras e avaliação de equilíbrio pelo tempo	38
Gráfico 3 -	Avaliação comportamental exploratório	39
Gráfico 4 -	Avaliação da função cognitiva	40
Gráfico 5 -	Avaliação da peroxidação lipídica por quantificação fluorimétrica de Malondialdeído no Hipocampo e no Corpo estriado	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACAS	Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BCCAO	Bilateral Comum Carotid Artery Occlusion
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
EC	Endarterectomia de Carótida
ECST	European Carotid Surgery Trial
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GSH	Glutathiona reduzida
GSH-Px	Glutathiona Peroxidase
GSH-Rd	Glutathiona-reductase
GSSG	Glutathiona Oxidada
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
MDA	Malondialdeído
NASCET	North American Symptomatic
OACCB	Oclusão da Artéria Carótida Comum Bilateral
SHAM	Cirurgia Fictícia
SHC	Síndrome de Hiperperfusão Cerebral
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Tiobarbitúrio
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
VIT C	Vitamina C

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	OBJETIVOS	21
1.1	Geral	21
1.2	Específicos	21
2	MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1	Tipo de estudo	22
2.2	Local e período	22
2.3	Drogas e produtos químicos	22
2.4	Animais	23
2.5	Abordagem experimental	23
2.6	Procedimento cirúrgico	25
2.7	Avaliação das funções comportamentais	29
2.7.1	<u>Teste de campo aberto</u>	29
2.7.2	<u>Teste de Rotarod</u>	30
2.7.3	<u>Teste do labirinto aquático</u>	31
2.8.	Eutanásia	33
2.9	Isolamento de áreas cerebrais	34
2.10	Destino das carcaças	34
2.11	Dosagens de Malondialdeído	35
2.12	Análise dos dados	35
2.13	Aspectos éticos	35
3	RESULTADOS	37
3.1	Avaliação Motora / Teste Rotarod	38
3.2	Teste de campo aberto	39
3.3	Teste do Labirinto Aquático	40
3.4	Dosagem de MDA	41
4	DISCUSSÃO	42
	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45

APÊNDICE A - Ficha de acompanhamento	49
ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais	50
ANEXO B - Comprovação de publicação do artigo científico	51

INTRODUÇÃO

O Acidente Vascular Cerebral (AVC) é a segunda maior causa de morte no mundo, responsável por 6,7 milhões de óbitos em 2012. No Brasil, entre as principais causas de morte, as doenças cerebrovasculares estão em primeiro lugar, seguidas do infarto agudo do miocárdio. Em 2014 o grupo com 80 anos ou mais representou aproximadamente 37% dos óbitos e a incidência foi semelhante em ambos os gêneros, 50,1% dos casos em homens. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que até 2030, o AVC continue sendo a segunda maior causa de mortes no mundo, sendo responsável por 12,2% dos óbitos previstos para o ano (ARAUJO et al., 2018).

Dentro das causas de AVC destaca-se a doença aterosclerótica carotídea que é responsável por 20 a 30% de todos os casos (GOKALDAS et al., 2015). Estudos prospectivos importantes como o NASCET (North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial) e o ECST (European Carotid Surgery Trial), que focalizaram pacientes sintomáticos, e o ACAS (Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study) e Veterans Affairs Cooperative Study Group, que selecionaram pacientes assintomáticos, demonstraram que os pacientes submetidos à cirurgia de Endarterectomia de Carótida (EC) apresentaram redução significativa das taxas de ocorrência de AVC em relação aos pacientes tratados clinicamente. Entretanto, na cirurgia de EC, independentemente da técnica cirúrgica empregada, há a necessidade de se promover a oclusão temporária da artéria a ser operada, o que pode, eventualmente, desencadear lesões decorrentes de isquemia cerebral de intensidade variável, seguida de reperfusão. Como manifestação clínica, poderá haver a presença de edema cerebral, caracterizando a síndrome de hiperperusão pós-operatória, a qual, ocorre mais frequentemente em pacientes hipertensos crônicos e/ou portadores de estenoses carotídeas maiores que 90% (TARDINI; YOSHIDA, 2003).

A Síndrome de Hiperperusão Cerebral (SHC) após EC foi originalmente descrita por Sundt e colaboradores em 1981. Durante seu estudo avaliou 1145 procedimentos de endarterectomia carotídea identificando 10 pacientes com cefaleia ipsilateral grave, convulsões e até hemorragia intracraniana atribuídas a um componente hemodinâmico envolvido na isquemia cerebral quando a autorregulação

cerebral está paralisada (SUNDT et al., 1981).

A SHC é uma complicação devastadora e pouco compreendida que pode ocorrer após a EC. Acredita-se que esse fenômeno seja devido a vasos intracranianos cronicamente vasodilatados que perdem sua capacidade de constrição ou auto regulação na presença de isquemia cerebral crônica. Para o entendimento da fisiopatologia da SHC deve-se observar o aumento nos níveis de óxido nítrico durante o clampeamento da artéria carótida interna e o aumento nos radicais livres derivados do oxigênio produzidos durante a restauração da perfusão cerebral. Esse mecanismo está envolvido na disfunção do endotélio e na deterioração dos mecanismos de autorregulação após a endarterectomia (MOULAKAKIS et al., 2009).

Karapanayiotides et al. (2005) sugeriram que a terminologia reperfusão, em vez da hiperperfusão, é o termo que pode abranger melhor todos os mecanismos patogênicos hemodinâmicos e neuroefetivos envolvidos nesta rara, mas sempre intrigante, complicação após EC.

O estresse oxidativo está intimamente relacionado aos danos causados pela produção excessiva de citocinas inflamatórias, no qual estimula a produção aumentada de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e citocinas pró-inflamatórias, e a produção de citocinas inflamatórias, como IL-s e TNF- α sendo um dos principais fatores reguladores do mecanismo da inflamação induzida pela isquemia-reperfusão (YANG et al., 2016). Infelizmente, até o momento, não existe uma diretriz definindo protocolos preventivos e terapêuticos para a síndrome de reperfusão cerebral. O desenvolvimento pós-operatório de déficits neurológicos focais pode ainda ser indicativo de várias outras causas que necessitam de considerações diagnósticas e terapêuticas diferentes e não apenas da síndrome de reperfusão (SIROOS et al., 2017).

Em metanálise de estudos sobre a Síndrome da Hiperperfusão Cerebral comparando pacientes submetidos à revascularização carotídea com endarterectomia e à angioplastia com Stent, observou-se que 3,4% dos pacientes submetidos à endarterectomia apresentaram síndrome de reperfusão cerebral em comparação com 2.2% dos pacientes submetidos à angioplastia carotídea (OR agrupado = 1,432 [IC 95% = 1,078-1901]; P = 0,015) (GALYFOS, 2017). Devido a sua ocorrência rara, com uma incidência citada de 0% a 3% na literatura, continua sendo um fenômeno pouco compreendido, mas é uma complicação com implicações

gravíssimas, associada a uma taxa de mortalidade de até 50%, especialmente quando ocorre no tratamento da estenose carotídea assintomática como estratégia primária de prevenção de AVC (SIROOS et al., 2017; WANG et al., 2016).

O grande número de modelos experimentais em animais que foram desenvolvidos para o estudo da fisiopatologia e terapia da isquemia cerebral oferece a oportunidade de selecionar um modelo apropriado para cada tarefa. No entanto, essa riqueza também tem o risco de que, sem o conhecimento adequado da fisiopatologia individual, as seleções erradas podem levar a conclusões errôneas. Uma consideração importante é também o controle rigoroso das variáveis fisiológicas, porque mesmo pequenas alterações na temperatura corporal, pressão arterial, gases sanguíneos ou níveis de glicose são fontes de variabilidade que podem confundir a validade do modelo (HOSSMANN, 1998).

O modelo experimental de oclusão de dois vasos para provocar isquemia do prosencéfalo foi desenvolvido há mais de 40 anos e foi inicialmente usado para caracterizar o estado de energia cerebral após isquemia incompleta (EKLÖF; SIESSJÖ, 1972). Neste modelo, a oclusão da artéria carótida comum bilateral (OACCB) está associada à hipotensão sistêmica para produzir uma isquemia reversível do prosencéfalo e tanto a isquemia quanto a reperfusão são quase imediatas. O fluxo sanguíneo cerebral, quando medido entre 5 e 15 min de isquemia, é reduzido para menos de 5% no córtex e, em menor grau, no tálamo e mesencéfalo. Desta forma, a lesão ocorre em áreas seletivamente vulneráveis, como os neurônios piramidais CA1 (Corno de Ammon 1) do hipocampo, do corpo estriado e do neocórtex (TRAYSTMAN, 2003).

Para evitar equívocos e assegurar um máximo de relevância médica, os modelos animais devem ser selecionados de acordo com os seguintes critérios: 1. O problema médico sob investigação (por exemplo, AVC isquêmico ou hemorrágico, ressuscitação cerebral após parada cardíaca, etc.) deve ser claramente definido e os critérios fisiopatológicos característicos desta condição devem ser estabelecidos. 2. O modelo experimental deve ser escolhido de acordo com estes critérios, para corresponder ao tipo e padrão de distúrbios hemodinâmicos e/ou metabólicos com o da condição clínica. 3. O mecanismo principal do processo patológico deve ser identificado e claramente diferenciado dos epifenômenos da lesão que não requerem tratamento específico. 4. O tratamento deve interferir com a causa suspeita e o efeito pretendido da intervenção deve ser documentado (por exemplo, intervenções

hemodinâmicas devem resultar em aumento do fluxo sanguíneo; a aplicação de anti-radicais livres deve resultar em melhora das alterações bioquímicas mediadas por radicais livres, etc.). 5. Recomendações clínicas devem ser dadas somente quando as avaliações finais das intervenções terapêuticas forem feitas no modelo clinicamente relevante apropriado (HOSSMANN, 1998).

Um modelo reprodutível de isquemia cerebral global transitória é essencial para elucidar os mecanismos moleculares da lesão cerebral isquêmica e para descobrir novos tratamentos. Experimentos com ratos são particularmente importantes devido à abundância destes animais geneticamente modificados que podem ser usados para testar hipóteses específicas. O modelo experimental em ratos com a OACCB em combinação com hipotensão induzida por isoflurano é um modelo de isquemia global eficiente e simples de reproduzir que leva a danos do hipocampo em ratos adultos. Esta técnica de isquemia global pode ser facilmente usada para testar novos efeitos de drogas e novas hipóteses quando utilizando animais transgênicos (ONKEN *et al.*, 2012).

Para avaliação dos efeitos da isquemia cerebral global transitória é importante a realização dos testes comportamentais. Os efeitos da OACCB se mostram transitórios na memória espacial e o comportamento semelhante à ansiedade permanece elevado 28 dias após a reperusão, o que pode estar relacionado à lesão do hipocampo induzida pelo OACCB em camundongos. Estudos prévios relataram que a OACCB induz danos cognitivos na evitação passiva e tarefas espaciais em camundongos. No labirinto aquático de Morris, a OACCB aumentou a latência para encontrar a plataforma e o tempo gasto no quadrante correto, indicando déficits de aprendizado e memória, respectivamente (SOARES *et al.*, 2013).

Além dos testes comportamentais, alguns pesquisadores realizaram análises histológicas durante seus experimentos, porém raramente encontraram danos neuronais fora do hipocampo em relação a comprometimentos comportamentais após isquemia global. Apenas alguns autores demonstraram alterações induzidas pela isquemia da atividade celular em regiões do cérebro fora do hipocampo, o que poderia ter um impacto significativo na recuperação comportamental após isquemia (SCHIAVON *et al.*, 2014).

Uma questão crucial na tradução do ambiente experimental para o clínico é a escolha do desfecho. Existem diferenças fundamentais nas medidas de recuperação funcional adotadas para humanos e animais, e estas inevitavelmente contribuem

para a dificuldade de replicar resultados experimentais em pacientes. Diversas revisões abrangentes de testes comportamentais estão disponíveis (ZARRUK, *et al.*, 2011). Para um melhor entendimento, os domínios relevantes são: função motora, função sensorial e processamento cognitivo. Não existe um teste “puro” e os vários testes disponíveis sondam diferentes combinações de vários domínios. Portanto, é vital combinar múltiplas avaliações, realizadas de maneira altamente controlada (CANAZZA *et al.*, 2014).

O Teste Rotarod tem sido o método mais sensível para determinar a função vestibulomotora em ratos após lesão cerebral pós-traumática detectando déficits na função vestibulomotora mesmo quando outros testes parecem mostrar esta função normal. Por isso, o Rotarod difere de outros testes funcionais motores pois também testa a força de preensão, coordenação e equilíbrio do animal, o que contribui para sua sensibilidade, de tal forma que ele pode detectar lesões de "baixo nível" como a lesão cerebral traumática leve (AWWAD, 2016).

Testes que tocam mais diretamente a função geral comportamental e cognitiva incluem o teste de campo aberto e o labirinto de água. O teste de campo aberto envolve posicionar o animal em uma grande arena aberta (50 a 100 cm) cercada por paredes adequadas e quantificar o comportamento exploratório com base em pontos de referência, como quadrados ou com rastreamento de movimento automatizado; a atividade horizontal e vertical (em pé) é quantificada. O teste do Labirinto da Água envolve colocar o animal numa piscina, onde uma plataforma de fuga está escondida logo abaixo da superfície da água; na presença de função de memória intacta, a posição da plataforma é rapidamente aprendida a partir de dicas ambientais. Na presença de dano hipocampal ou comprometimento sensoriomotor, a trajetória de escape torna-se menos direta (CANAZZA *et al.*, 2014).

A partir de uma perspectiva neuroanatômica, os testes acima sondam diferentes combinações de integridade cortical e subcortical e como tal, são complementares em relação à avaliação do comprometimento funcional e recuperação após isquemia experimental. Além disso, alguns testes parecem ser particularmente adequados para a medição de déficits de longo prazo, já que evitam os efeitos de pico devido à rápida recuperação do desempenho de base na fase subaguda. Nessa perspectiva, testes que fazem parte da integridade comportamental geral, como os testes de remoção de campo aberto e labirinto aquático, parecem ser mais sensíveis do que o teste Rotarod (CANAZZA *et al.*,

2014).

Formas de avaliar a extensão do dano cerebral e o grau de recuperação são questões importantes nos modelos de isquemia, sendo os testes motores e cognitivos um procedimento relevante em termos de ciência translacional. Numerosos testes comportamentais foram elaborados para atingir esse objetivo, mas nem todos fornecem resultados iguais, eficientes e válidos, fato que pode ser explicado pela abordagem experimental (modelo de isquemia, treinamento, uso de drogas, tempos de avaliação, etc.) de cada estudo (ZARRUK *et al.*, 2011).

As ERO podem ser causa ou consequência de doenças humanas associadas ao estresse oxidativo, como ocorre na isquemia cerebral. Os métodos mais utilizados para aferição indireta das ERO e, conseqüentemente das lesões oxidativas, são os espectrofotométricos e cromatométricos, que medem a atividade enzimática através da Superóxido dismutase (SOD), Catalase, Glutathione-peroxidase (GSH-Px) e da glutathione-redutase (GSH-Rd) e/ou a concentração de tripeptídeos como a Glutathione reduzida (GSH), glutathione oxidada (GSSG) e malondialdeído (MDA). Estas medidas podem ser realizadas em tecidos, sangue e outros fluidos. A lipoperoxidação de membranas é habitualmente monitorada pelo método do MDA e o estresse oxidativo, por sua vez é monitorado por dosagens de GSSG e/ou pelo cálculo da razão GSSG/GSH. Estes dados reforçam a recomendação do uso de antioxidantes naturais e sintéticos para o alívio dos sinais e sintomas destas doenças e, mesmo, para bloquear sua evolução (FERREIRA; MATSUBARA 1997; GRINTZALIS *et al.*, 2013).

A peroxidação lipídica e a deposição de MDA podem ser os resultados dessa reação, o que pode levar, conseqüentemente, ao metabolismo anormal dos neurônios, danos aos receptores de membrana e até a morte celular. Sob condições fisiológicas, há uma série de radicais livres no corpo que podem limpar enzimas radicais como a SOD. Quando a quantidade de radicais livres gerados for pequena, eles serão rapidamente removidos pelo sistema de dispersão de radicais livres sem causar dano às células do tecido. Durante a reperfusão após isquemia cerebral, as ERO estão significativamente aumentadas, e a SOD e outras enzimas invasoras são excessivamente consumidas, resultando em diminuição da atividade e causando lesões por estresse oxidativo das células teciduais (YAN *et al.*, 2017).

A quantificação de produtos de peroxidação lipídica primária (hidroperóxidos) é difícil devido à natureza instável e reativa desses compostos. Assim, a avaliação

da peroxidação lipídica é geralmente realizada pela análise de produtos de oxidação secundária, como o MDA (GRINTZALIS *et al.*, 2013).

O MDA é um produto secundário da peroxidação lipídica, derivado da β -ruptura de endociclicização de ácidos graxos poliinsaturados com mais de duas duplas ligações, tais como ácido linoléico, araquidônico e docosaexanóico (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Este composto distinto tem sido empregado como um composto modelo para o estudo de produtos secundários de degradação da peroxidação lipídica. A condensação de MDA com duas moléculas de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) tem sido amplamente utilizada para medir a extensão da deterioração oxidativa de lipídios em sistemas biológicos e alimentares. A absorvância do complexo é geralmente medida por espectrofotometria ou espectrofluorometria, ou por técnicas específicas, também baseadas no produto TBA, onde se emprega a separação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com detecção espectrofotométrica ou espectrofluorométrica ou MS. O nível de estresse oxidativo no plasma e no tecido geralmente se correlaciona com a concentração de MDA (LOVRIC *et al.*, 2008).

Diante do desafio de controlar os efeitos adversos do estresse oxidativo, muitos estudos com agentes antioxidantes exógenos, tais como o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, resveratrol e o Canabidiol têm sido realizados. Esses agentes podem ser eficazes na proteção de células neuronais devido ao efeito de ERO em danos celulares neuronais e consumo rápido de enzimas antioxidantes endógenas (VARSHOSAZ *et al.*, 2014; SCHIAVON *et al.*, 2014).

A vitamina C (VIT C) é um antioxidante importante no metabolismo cerebral (SONG, *et al.*, 2015) e estudos têm demonstrado ações neuroprotetoras com a sua utilização para prevenção da síndrome da reperfusão além de muitos outros benefícios relacionados ao sistema imunológico e metabolismo celular (FREITAS; TOMÉ, 2010).

A VIT C não é produzida pelo corpo humano e sua absorção pode ocorrer pela via enteral ou parenteral. A via oral em estudos experimentais pode representar um fator adverso devido a possibilidade de perda da substância administrada por fatores diversos como a regurgitação. Já a administração intraperitoneal da VIT C mostrou-se efetiva quando comparada com as administrações pela via intravenosa e oral atingindo sua concentração máxima 60 minutos após a sua administração

oferecendo uma via mais simples e de eficácia comprovada (QI CHEN et al., 2007). Ratos que receberam VIT C por gavagem (0,5 mg/g) aumentaram a concentração sanguínea e extracelular para níveis de pico inferior a 150 μ M. Por outro lado, as concentrações atingiram níveis máximos de quase 3 mM em ratos que receberam injeções intraperitoneais, enquanto a injeção intravenosa aumentou os níveis de pico para > 8 mM. A suplementação de ascorbato em água potável a 1g/kg apenas aumentou as concentrações plasmáticas para menos de 50 μ M. Estes resultados indicam claramente que as concentrações farmacológicas ideais da VIT C não podem ser obtidas por administração oral (JUAN DU; CULLEN; BUETTNER, 2012).

Poucos estudos investigaram o efeito da VIT C na lesão de isquemia e reperfusão cerebral. Em macacos pré-tratados com VIT C na dosagem de 2 g i. v. pouco antes da oclusão, o tamanho da isquemia cerebral diminuiu de 22% para 7%, e nos ratos gerbos a VIT C protegeu o estriado (SPOELSTRA DE MAN; ELBERS; OUDEMANS-VAN-STRAATEN, 2018) demonstrando um grande potencial neuroprotetor pelo uso intravenoso da VIT C num quadro de isquemia cerebral.

No presente estudo decidimos investigar o potencial benefício da utilização da VIT C na prevenção da síndrome de reperfusão após EC utilizando modelo experimental em ratos.

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

Avaliar o efeito neuroprotetor e antioxidante do uso de VIT C na prevenção da síndrome de reperfusão cerebral após isquemia induzida em ratos.

1.2 Específicos

- a. Determinar o dano isquêmico cerebral através da dosagem da MDA no hipocampo e no corpo estriado como produto do estresse oxidativo nos grupos estudados.
- b. Avaliar e comparar as alterações comportamentais nos grupos estudados.

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo experimental com ratos Wistar.

2.2 Local e período

Os experimentos foram realizados na Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luis, Maranhão, Brasil, nas dependências do Laboratório de Fisiologia Experimental. O estudo foi realizado no período de junho a agosto de 2018.

2.3 Drogas e produtos químicos

Foram utilizados os seguintes produtos químicos: Soro Fisiológico 0,9%, VIT C 100mg / ml (Farmace, Barbalha, CE, Brasil), Isoflorano 100% 1ml / ml (Cristália, Itapira, SP, Brasil), Quetamina (Ceva, Paulínia SP, Brasil) e Xilazina a 1% (König, Mairinque, SP, Brasil), Digloconato de clorexidina 10mg / ml (Neo Química, Anápolis, GO, Brasil) durante os procedimentos.

O hipocampo e estriado foram homogeneizados em solução de tampão fosfato 20 mM contendo cloreto de potássio 140 mM (pH 7,4, 1:10 peso / volume).

Na avaliação do estresse oxidativo foram utilizadas as soluções de Hidroxitolueno Butilado 0,01%, EDTA 1mM, ácido tricloroacético 10%, ácido tiobarbitúrico (TBARS) 0,67%, sulfato de sódio 7,1%, butanol P.A e 1,1,3,3 tetrametoxipropano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

2.4 Animais

Neste estudo foram utilizados ratos da linhagem Wistar com 6 meses de idade (adultos), machos; n = 12; com aproximadamente 485g, oriundos do Biotério Central da UFMA e mantidos no Biotério Setorial da Pós-Graduação da UFMA em gaiolas de polietileno forradas com xilana (máximo de 3 animais/gaiola), em ambiente controlado (23 ± 2 °C; umidade 60%; ciclo claro/escuro de 12h) e com livre acesso à água e ração do tipo Novlab.

2.5 Abordagem experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos de quatro animais cada. O grupo 1 ou grupo SHAM recebeu uma injeção intraperitoneal de solução salina (NaCl 0,9%) na dose de 0,1ml/kg 30 minutos antes do procedimento cirúrgico. Este grupo foi submetido ao experimento de dissecação das artérias carótidas sem o seu clampeamento. O grupo 2 também recebeu uma injeção intraperitoneal de solução salina na dose de 0,1ml/kg 30 minutos antes e foi submetido ao procedimento cirúrgico com a dissecação das artérias carótidas comuns e o clampeamento das duas artérias carótidas comuns com uso de cliques por 20 minutos seguido de nova exposição cirúrgica e remoção dos cliques sob anestesia geral. O Grupo 3, ou grupo VIT C, recebeu a injeção intraperitoneal de VIT C na dose de 750mg/kg, 30 minutos antes do procedimento cirúrgico com a dissecação das artérias carótidas comuns e clampeamento das duas artérias carótidas comuns com uso de cliques por 20 minutos seguido de nova exposição cirúrgica e remoção dos cliques sob anestesia geral.

Figura 1- Fluxograma do desenho experimental



Fonte: O Autor, 2018.

No período de uma semana anterior ao procedimento, todos os animais foram submetidos aos devidos treinamentos para os testes de avaliação comportamental: Rotarod, Labirinto Aquático e Campo aberto, que avaliam respectivamente capacidade motora e equilíbrio, capacidade cognitiva e atividade exploratória e comportamental.

Todos os animais foram submetidos ao protocolo anestésico com uso de Isoflurano a 1,3-1,5% em oxigênio a 100% e soro fisiológico 0,9%. Entre o procedimento de aplicação dos cliques e sua remoção os animais foram mantidos em gaiolas individuais sob aquecimento e redução da luminosidade. Após 24 horas do experimento cirúrgico, os animais foram submetidos aos testes de avaliação comportamental e em seguidas eutanizados para seguir a decapitação em guilhotina.

Figura 2: Fluxograma dos procedimentos



Fonte: O Autor, 2018.

2.6 Procedimento cirúrgico

Todos os animais foram submetidos ao procedimento de anestesia com hipotensão induzida pelo agente anestésico inalatório Isoflorano. Os ratos foram anestesiados com uma mistura de Isoflorano (Isoforine, Cristália, SP, Brasil) e oxigênio através de Aparelho de Anestesia Fuji (Takaoka, SP, Brasil) conectado a uma máscara de plástico adaptada ao nariz do animal.

Figura 3. Rato sob anestesia geral tricotomizado



Fonte: O Autor, 2018.

Figura 4. Equipamento utilizado para anestesia

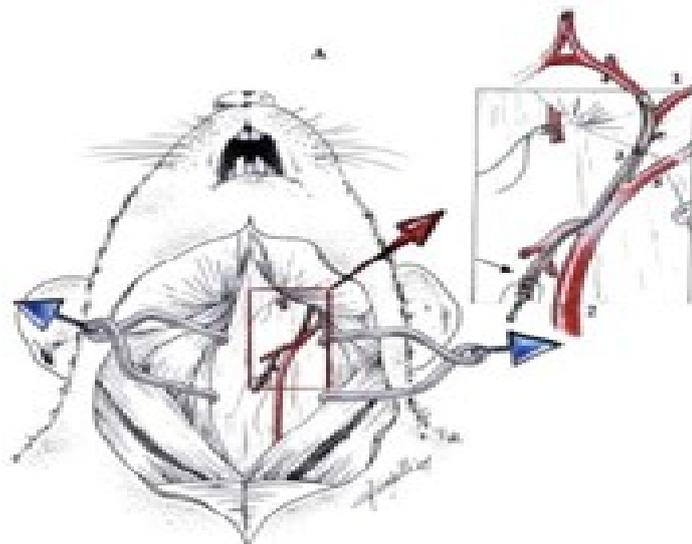


Fonte: O Autor, 2018.

O vaporizador foi regulado para liberar o fluxo mínimo (2,0 l/min). A mistura entregue ao animal foi monitorizada para manter a concentração mínima de isoflurano necessária para uma anestesia eficiente (avaliada apertando a cauda do animal). Nestas condições, o animal foi fixado em uma estrutura estereotóxica e a anestesia mantida com Isoflurano a 1,3-1,5% em oxigênio a 100% e soro fisiológico

0,9% durante o tempo necessário para fazer uma incisão no pescoço ventral para expor as artérias carótidas comuns (SCHIAVON et al., 2014).

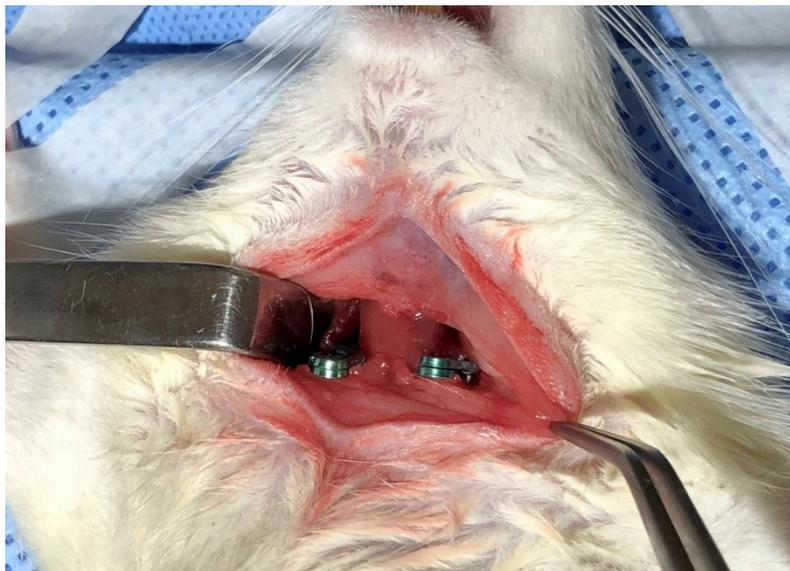
Figura 5- Esquema da anatomia vascular cervical do rato



Fonte: Tirapelli, 2007

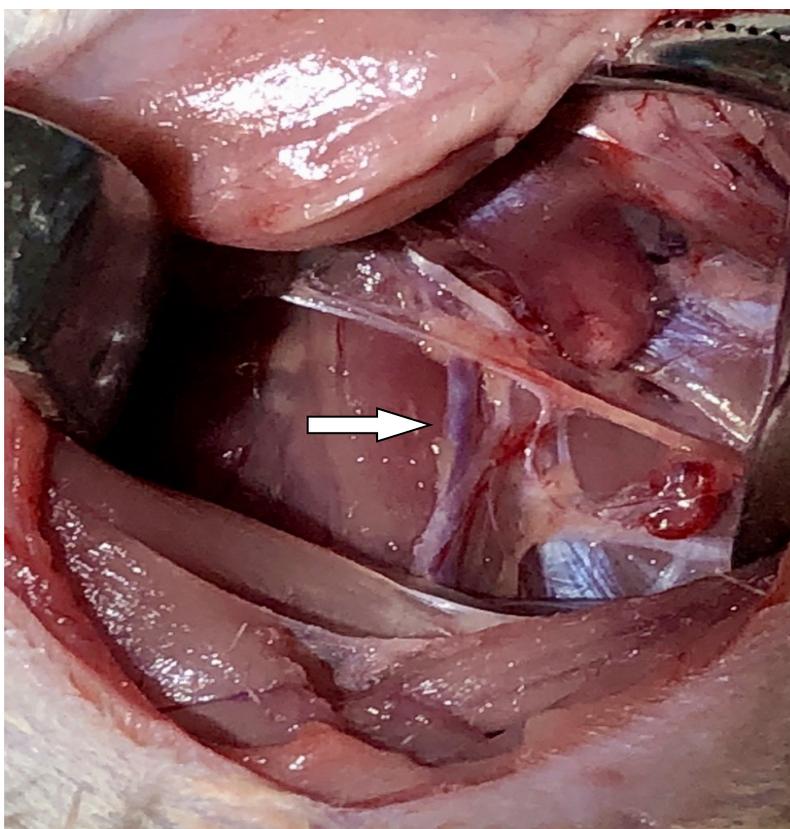
Após a anestesia foi realizada a tricotomia na região cervical seguida de antissepsia com Clorexidina alcoólica e a incisão mediana cervical com a dissecção até o isolamento das artérias carótidas comuns. No grupo Sham, não foi realizado o clampeamento das artérias carótidas e nos grupos VIT C e Solução salina foi induzida a isquemia cerebral global transitória pela OACCB através da aplicação de um clipe em cada artéria carótida.

Figura 6 - Clampes em ambas as carótidas comuns



Fonte: O Autor, 2018.

Figura 7- Dissecção da Artéria carótida comum esquerda .



Fonte: O Autor, 2018.

A temperatura no campo cirúrgico foi preservada durante a cirurgia e mantida a $37,5^{\circ}\text{C}$ usando aquecimento com luz. A isquemia cerebral foi induzida por 20 min de BCCAO usando Clipes de Aneurisma (ADCA, MG, Brasil). Durante o procedimento de oclusão, os ratos foram mantidos em uma caixa de aquecimento (temperatura interna de $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$) para evitar hipotermia cerebral induzida por isquemia (SEIF EL-NASR; NUGLISCH; KRIEGLSTEIN, 1992).

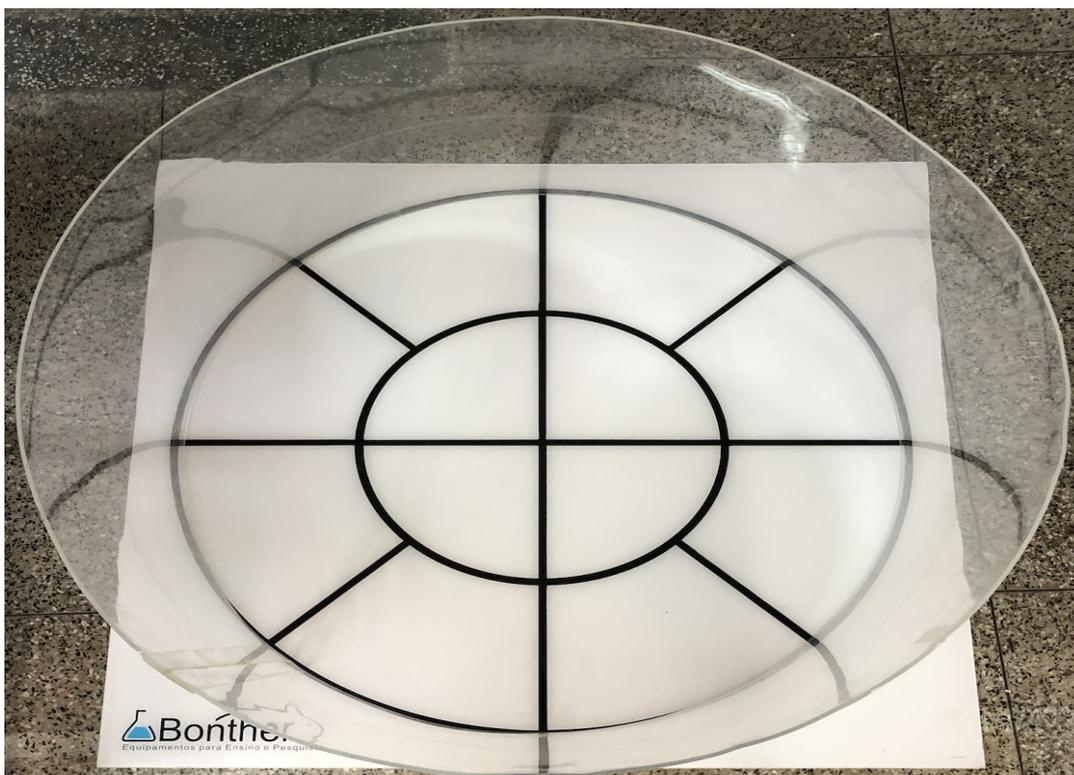
Após 20 minutos de clampeamento, os ratos foram novamente anestesiados e submetidos à abertura da incisão prévia. Os cliques foram removidos e as artérias carótidas foram visualmente inspecionadas para reperfusão a incisão foi fechada com suturas. Os animais foram então recolocados nas gaiolas .

2.7 Avaliação das funções comportamentais, cognitivas e motoras.

2.7.1 Teste de campo aberto

Este teste foi utilizado para estimar a atividade locomotora, disposição para explorar e comportamento semelhante à ansiedade em roedores. Ele mede o comportamento de um animal depois que ele é liberado ou entra, por conta própria, em uma arena aberta e nova (PERALS et al., 2017). Os animais foram colocados individualmente no centro de uma arena circular de campo aberto (140 cm^2), divididos em 9 quadrantes, por 5 minutos. O número total de cruzamentos de quadrantes, a frequência de entradas no quadrante central e os comportamentos estereotipados foram registrados para análise posterior.

Figura 8. Teste de Campo aberto

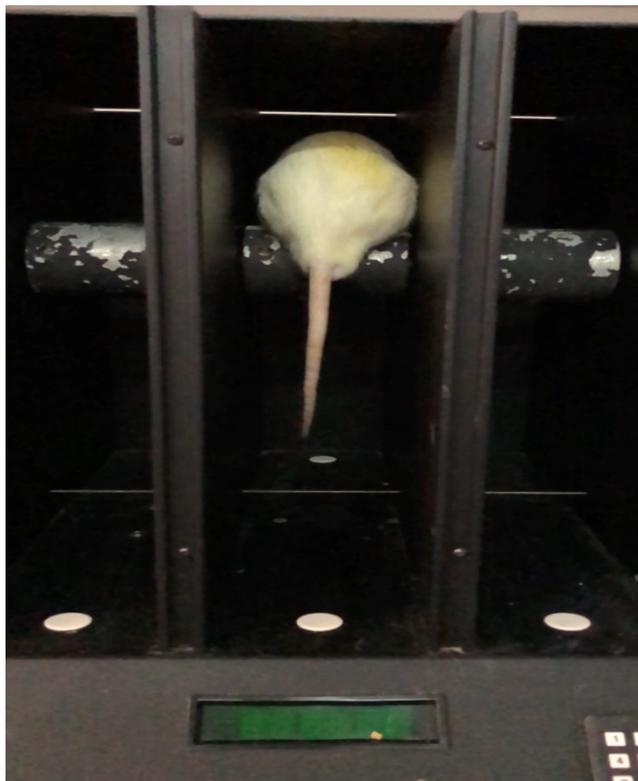


Fonte: O Autor, 2018.

2.7.2 Teste Rotarod

Para avaliar a atividade neuromotora foi utilizado o equipamento Rotarod. Neste teste os animais foram acomodados na haste e treinados 3 vezes ao dia durante 4 dias consecutivos antes do experimento. No dia 5, os animais foram submetidos ao experimento e 24 horas após foram submetidos novamente ao teste quando a haste foi regulada para 12 rpm e a latência para queda foi registrada em segundos por um máximo de 5 min (SRODULSKI et al.,2014).

Figura 9. Teste Rotarod



Fonte: O Autor

2.7.3 Teste do Labirinto Aquático (Water-Morris)

Para avaliar as funções de aprendizagem espacial/memória, os animais foram submetidos ao Teste de Labirinto Aquático - Water-Morris. O conceito por trás do teste do labirinto de água é determinar a memória de aprendizagem para ratos para localizar uma plataforma escondida em um tanque de água usando sinais distais que são colocados ao redor do labirinto de água depois de repetidas tentativas durante certo período de tempo. A integração da memória espacial depende de sinais espaciais e é de suma importância ter em mente que os ratos podem usar outros métodos para localizar a plataforma, como a dependência de sinais proximais ou simplesmente uma estratégia de fazer curvas consecutivas para encontrar a plataforma. (VORHEES; WILLIAMS, 2006; KOBEISSY et al., 2016).

O aparelho consistia em uma piscina circular de fibra de vidro cheia de água

e dividida em quatro quadrantes com a presença de sinais visíveis para os ratos nas paredes. Uma plataforma de fuga oculta foi submersa de forma que ficou 1,5 cm abaixo da superfície da água no quadrante pré-estabelecido.

Figura 10. Teste do Labirinto aquático



Fonte: O Autor, 2018.

Os animais foram submetidos a 4 tentativas por dia durante 3 dias consecutivos, quando foram soltos individualmente na água de um dos quatro quadrantes, de frente para a parede do labirinto, e deixados a nadar durante 120 segundos para encontrar a plataforma escondida. Os ratos que não conseguiram localizar a plataforma foram guiados suavemente até a plataforma e permaneceram nela por 30 segundos. A latência para encontrar a plataforma oculta foi registrada para avaliação de aprendizagem espacial e expressa como o tempo médio dos

ensaios diários. 24 horas após o experimento, a plataforma foi removida e os animais foram soltos no centro da piscina para nadar por 120 segundos. O tempo gasto no quadrante onde a plataforma deveria ser, bem como o número proporcional de entradas no quadrante alvo, foram registrados para avaliação de retenção de memória.

2.8 Eutanásia

Após a realização dos testes comportamentais, os animais foram submetidos ao aprofundamento anestésico usando Quetamina + Xilazina (3 a 4x a dose anestésica habitual 40mg/Kg de peso e 10mg/Kg de peso- respectivamente) e craniotomizados para isolamento dos hipocampo e corpo estriado, que foram lavados com solução salina, homogeneizados e congelados para avaliação do estresse oxidativo.

Figura 11: Cérebro íntegro



Fonte: O Autor

2.9 Isolamento de áreas cerebrais e preparação do homogenato de cérebro

Após a craniotomia dos animais eutanaziados, foi removido o cérebro do crânio e realizado o isolamento do hipocampo e corpo estriado. Os hipocampos e os corpos estriados foram então homogeneizados e mantidos sobre refrigeração em solução tampão fosfato 20mM contendo cloreto de potássio 140mM.

Figura 12: Hipocampo e Corpo Estriado



Fonte: O Autor, 2018.

2.10 Destino das carcaças

As carcaças dos ratos foram congeladas e acondicionadas em sacolas plástica devidamente identificadas e encaminhadas ao Biotério Central da UFMA para incineração.

2.11 Dosagem de MDA

Para avaliar o dano oxidativo cerebral, medimos os níveis teciduais de MDA, como descrito anteriormente (Sousa, 2018). Resumidamente, o hipocampo e o corpo estriado isolados foram homogeneizados individualmente em solução de tampão fosfato 20 mM contendo 140 mM de KCl (pH 7,4; 1:10 p / v) e centrifugados (750 g; 10 min; 4 °C) para separar o sobrenadante. Para evitar a formação de MDA durante o processamento da amostra, 0,01% em volume de Butil hidroxitolueno e 1 mM de EDTA foram adicionados ao tampão. Em seguida, 150 µL de sobrenadante foram adicionados a 300 µL de ácido tricloroacético a 10% frio (SIGMA-ALDRICH, ST. LOUIS, MO, EUA) e 0,67% de TBARS (MERCK, DARMSTADT, Alemanha) em 7,1% de sulfato de sódio e incubados em um banho-maria durante 25 min. A mistura foi arrefecida e a fase superior separada. O cromogênio rosa foi isolado por adição de butanol (2:1 v/v) seguido de centrifugação (3000 G; 10 min; 4 °C). Os níveis de TBARS foram determinados por Fluorimetria a λ_{ex} 515nm e λ_{em} 553nm. A curva de calibração foi realizada usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) como padrão. Os níveis de TBARS foram expressos em µM MDA.

2.12 Análises de dados

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). O teste de Kolmogorov-Smirnov foi usado para testar a normalidade das variáveis e foi seguido por ANOVA unidirecional e pelo teste post-hoc de Newman-Keuls, com nível de significância de 5%.

2.13 Aspectos éticos

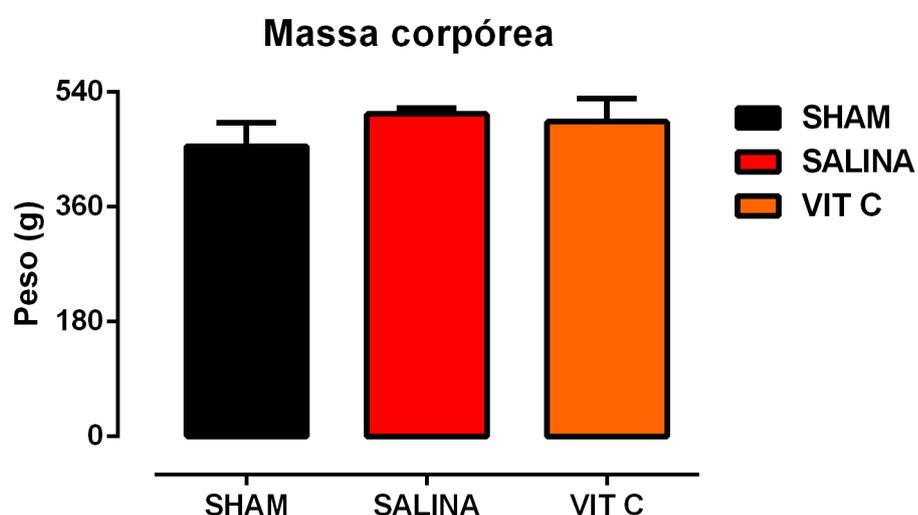
O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA) da UFMA com protocolo de número: 23115.013043/2015-58 (ANEXO A).

Respeitou-se os direitos dos animais utilizados na pesquisa dentro dos padrões legais, em apoio à Lei, Nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, regulamentado no inciso VII, do § 1º, art.225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso dos animais para fins de ensino e/ou pesquisa científica. Durante todo o decorrer da pesquisa, foi meta da equipe executora provocar o mínimo de sofrimento aos animais.

3 RESULTADOS

A massa corpórea dos animais no início do experimento foi de 484 gramas sendo que as médias nos grupos Sham, solução salina e VIT C foram de 480 gramas, 510 gramas e 502 gramas respectivamente, sem diferença significativa ($P < 0,05$, Teste Newman-Keuls) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Parâmetros morfométricos.



Nota: Peso corporal (PC, g) avaliado em 3 grupos de 4 animais cada: SHAM, Soro fisiológico (SALINA) e Vitamina C (VIT C). Barras representam média \pm SEM (one-way ANOVA-Newman Keuls). SALINA $p < 0,05$ quando comparado ao SHAM; VIT C $p < 0,05$ quando comparado ao SALINA.

Fonte: O Autor, 2018

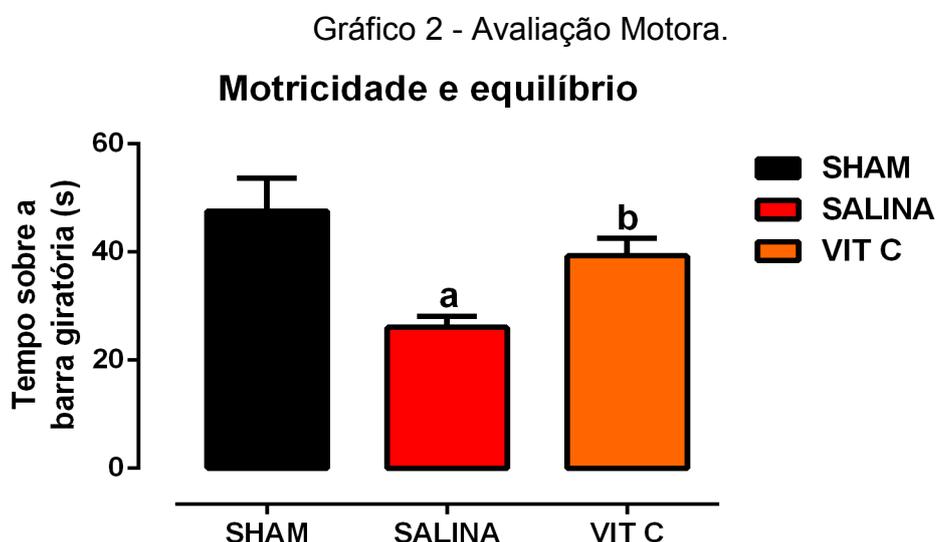
Houve um óbito durante o procedimento cirúrgico em decorrência de lesão da artéria carótida comum durante sua dissecação e outros dois óbitos no pós-operatório imediato por provável intercorrência relacionada ao procedimento anestésico.

Após a realização dos procedimentos foi possível observar uma alteração significativa no comportamento dos animais dos grupos dois e três durante o período de clampeamento notando-se uma hipoatividade e alteração de marcha nos animais submetidos ao clampeamento sendo que o Grupo Sham não apresentou nenhuma alteração.

Durante as 24 horas seguintes, nenhum outro animal apresentou alteração comportamental significativa nem crises convulsivas. Não houve diferenças estatisticamente significativas de peso corporal entre os ratos dos três grupos, sugerindo que os procedimentos cirúrgicos e os tratamentos não afetaram o ganho de peso dos animais no presente experimento.

3.1 Avaliação motora / Teste Rotarod

O Teste Rotarod foi realizado em todos os animais e mostrou uma perda significativa no tempo sobre a barra giratória no grupo de Solução Salina quando comparado com os demais grupos ($P < 0,05$) Teste de Newman-Keuls. Observou-se ainda que o grupo tratado com VIT C apresentou comportamento motor semelhante ao do grupo Sham ($p > 0,05$) (Gráfico 2).



Nota: Habilidades motoras e avaliação de equilíbrio pelo tempo na (s) haste (s) no ensaio Rotarod avaliado em três grupos de quatro animais cada: SHAM, Salina (SF) e Vitamina C (VIT C). Barras representam média \pm SEM (one-way ANOVA - Newman Keuls). a $p < 0,05$ quando comparado ao SHAM; b $p < 0,05$ quando comparado ao CTR.

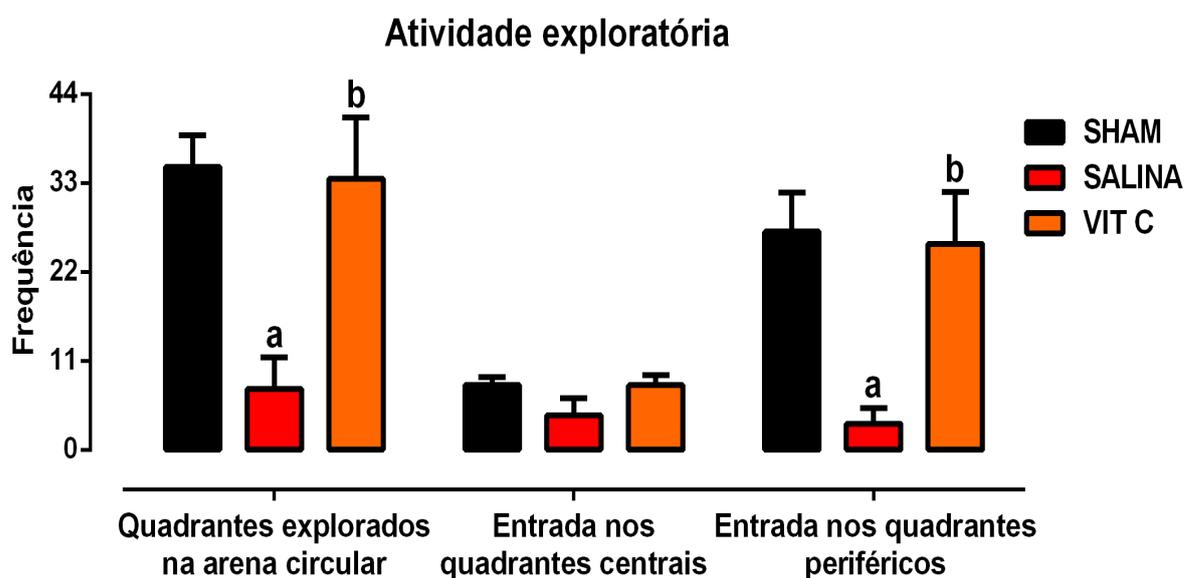
Fonte: O Autor, 2018

3.2 Teste de Campo Aberto

No teste de campo aberto observou-se que tanto o número de cruzamentos totais quanto as entradas nos quadrantes periféricos dos ratos do grupo VIT C foram semelhantes aos do grupo Sham ($p > 0,05$) e estatisticamente diferentes dos controles ($p < 0,05$), mas o número de entradas nos quadrantes centrais foi semelhante entre todos os três grupos ($p > 0,05$) (Gráfico3) demonstrando que não houve aumento da ansiedade.

Neste teste, foi possível ainda observar que os animais do Grupo Solução Salina apresentaram uma redução de mobilidade permanecendo mais tempo no centro da arena bem como menor frequência na exploração dos quadrantes periféricos e menor mobilidade global. Os demais grupos apresentaram preservação da mobilidade bem como das atividades exploratórias e entrada nos quadrantes periféricos.

Gráfico 3 - Avaliação comportamental exploratória



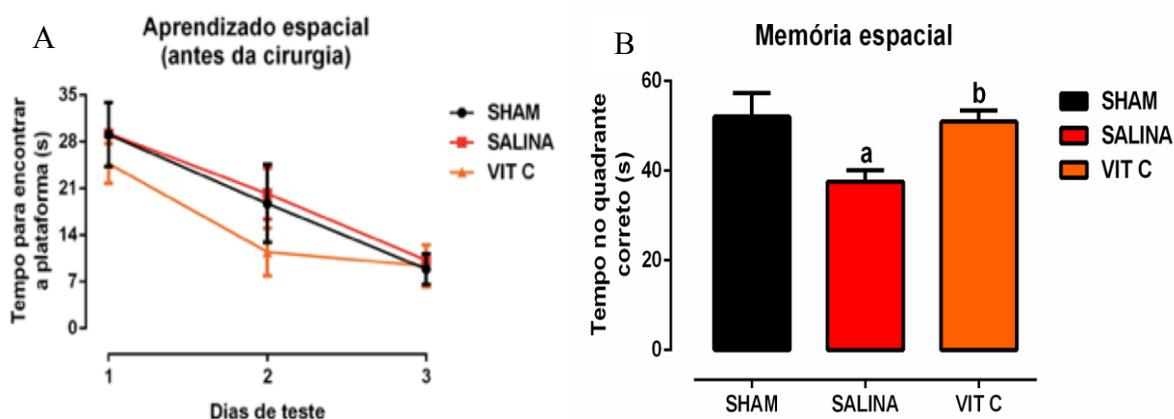
Nota: Comportamento exploratório avaliado pela frequência de cruzamentos totais, entradas de quadrados centrais e periféricos no teste de campo aberto avaliado em 3 grupos de 4 animais cada: SHAM, Salina (SF) e Vitamina C (VIT C). Barras representam média \pm SEM (one-way ANOVA - Newman Keuls). A $p < 0,05$ quando comparado ao SHAM; B $p < 0,05$ quando comparado ao CTR.

Fonte: O Autor, 2018

3.3 Teste do Labirinto aquático

Os Gráficos 4A e 4B ilustram os resultados para o teste do labirinto aquático de Morris, sendo o Gráfico 4A relativo aos três dias de treinamento e o Gráfico 4B relativo ao teste realizado após 24 horas do experimento. Após 3 dias de treinamento, os tempos de latência de escape para encontrar a plataforma escondida foram reduzidos em todos os 3 grupos, afastando a possibilidade de erro no teste após o experimento. Após o experimento observou-se que o tempo gasto no quadrante correto foi menor no grupo tratado com solução salina em comparação com o grupo Sham ou o grupo tratado com VIT C ($p < 0,05$), mas foi semelhante entre os grupos Sham e VIT C ($p > 0,05$) (Gráfico 4).

Gráfico 4. Avaliação da função cognitiva.



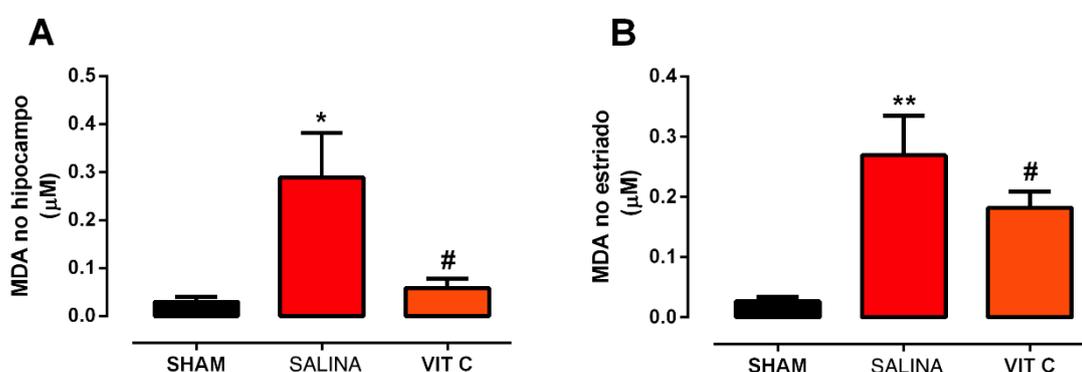
Nota: (A) Aprendizagem espacial avaliada pelo tempo (s) de latência para encontrar a plataforma oculta no teste do labirinto aquático; e (B), memória avaliada pelo tempo gasto (s) no quadrante correto no teste do labirinto aquático em 3 grupos de 4 animais cada: SHAM, Controle (CTR) e Vitamina C (VIT C). Pontos e barras representam média \pm SEM (one-way ANOVA - Newman Keuls). * $p < 0,05$ quando comparado ao SHAM; # $p < 0,05$ quando comparado ao CTR.

Fonte: O Autor, 2018

3.4 Dosagem de MDA

Os níveis de MDA foram avaliados separadamente no hipocampo e no corpo estriado em todos os ratos observando-se um aumento significativo no nível de MDA do grupo controle quando comparado com o grupo VIT C, principalmente ao nível do hipocampo ($p < 0,05$) (Gráfico 05).

Gráfico 5 - Perfil redox



Nota: Avaliação da peroxidação lipídica por quantificação fluorimétrica de Malondialdeído (MDA, µM) em amostras homogeneizadas de hipocampo (A) e estriado (B) em 3 grupos de 4 animais cada: SHAM, Controle (CTR) e Vitamina C (VIT C). Pontos e barras representam média \pm SEM (one-way ANOVA - Newman Keuls). $p < 0,05$ quando comparado ao SHAM; * $p < 0,01$ quando comparado ao SHAM; # $p < 0,05$ quando comparado ao CTR.

Fonte: O Autor, 2018

4 DISCUSSÃO

Este estudo experimental pode comparar o efeito da VIT C como agente antioxidante com Solução Salina e Grupo sem intervenção (SHAM) na prevenção de lesões cerebrais em decorrência de isquemia e reperfusão utilizando um modelo de isquemia cerebral global em ratos por OACCB combinada com hipotensão induzida por isoflurano (ONKEN; BERGER; KRISTIAN, 2012).

A SHC é uma complicação que pode ocorrer após a EC e tem sido associada à liberação de ERO (MOULAKAKIS et al., 2009). Na presente investigação, avaliamos se o tratamento com VIT C poderia melhorar os parâmetros motores e comportamentais, bem como modular os níveis de MDA em ratos submetidos à dissecação de artérias carótidas com clampeamento.

Os achados mostraram que ratos submetidos à dissecação de artérias carótidas com clampeamento e tratados com VIT C apresentaram melhores parâmetros motores e comportamentais avaliados pelos testes utilizados quando comparados aos ratos tratados com placebo.

Os antioxidantes têm sido amplamente investigados por suas propriedades protetoras contra o estresse oxidativo e vários estudos os testaram como potencial abordagem farmacológica para prevenir a lesão de reperfusão que ocorre no cérebro isquêmico (YANG et al., 2016).

A neuroproteção pela VIT C foi demonstrada em vários estudos recentes, tanto in vitro como in vivo. No estudo in vitro, foi relatado que a VIT C inibe o dano mitocondrial e a morte celular contra a lesão oxidativa (PUSKAS et al., 2000).

Estudos experimentais sugerem que a VIT C está envolvida na redução da formação de edema induzida por isquemia cerebral, na proteção da morte celular contra neurotoxicidade após isquemia cerebral e ligada à melhora da conexão sináptica do neurônio na isquemia cerebral (SONG et al, 2015).

No presente estudo, a OACCB por 20 min seguido por reperfusão de 24 h mostrou comprometimento significativo no grupo controle das atividades sensório-motoras demonstrado nos testes comportamentais de Rotarod, Morris watermaze e campo aberto. Esses achados corroboram com relatos anteriores que também documentaram déficits sensório-motores e neurológicos nos animais após OACCB e lesão de reperfusão (ONKEN; BERGER; KRISTIAN, 2012).

A isquemia cerebral global provoca disfunção da memória por causa de sua influência nos neurônios do hipocampo. O hipocampo é bem conhecido pela regulação da memória (JENKINS et al., 1981). Parece que a VIT C possui algum potencial terapêutico contra esse tipo de alteração comportamental na lesão de reperfusão isquêmica (SONG et al., 2015).

No grupo submetido á OACCB e com uso da VIT C os defeitos neurocomportamentais foram significativamente menores em comparação ao grupo controle e muito semelhante quando comparado ao Grupo Sham, mostrando assim um efeito protetor aos danos da isquemia e reperfusão pelo uso da VIT C.

Durante a isquemia e reperfusão cerebral, a produção de ERO pode causar danos na membrana pela peroxidação lipídica, inativação enzimática e disfunção estrutural das células neuronais. A formação de ERO provoca um distúrbio no mecanismo antioxidante celular (GOETTSCHE et al., 2011).

Enquanto muitos tipos de aldeídos (livres ou esterificados em fosfolípidios) são formados como produtos de peroxidação lipídica, o que mais tem sido estudado como marcador em uma ampla variedade de amostras agrícolas, biológicas e clínicas ainda é o MDA, devido à simplicidade do ensaio TBARS (SPICKETT et al., 2010).

Neste estudo os resultados mostram que os peróxidos lipídicos, medidos a partir dos níveis de MDA, aumentaram significativamente durante a isquemia e reperfusão cerebral induzida pelo oclusão temporária das artérias carótidas nos grupos submetidos ao clampeamento carotídeo bilateral. No entanto, os ratos que receberam o tratamento prévio com VIT C mantiveram os níveis de MDA nas regiões do corpo estriado e hipocampo do cérebro significativamente menor em relação ao grupo controle. Com base nestes dados é possível inferir que a VIT C é capaz de reduzir o stress oxidativo cerebral durante a isquemia e reperfusão cerebral.

CONCLUSÃO

As mudanças comportamentais relacionadas ao comportamento e mobilidade e as variações obtidas em dosagens de MDA, principalmente aquelas relacionadas ao hipocampo, permitem concluir que o modelo experimental determina estresse oxidativo ao nível cerebral e a administração de VIT C foi neuroprotetora contra a lesão cerebral por reperfusão em ratos adultos. Apesar destes resultados, novos estudos são necessários para confirmar os potenciais efeitos benéficos da VIT C na lesão cerebral por reperfusão.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, Jéssica Pizzato de *et al.* mortality trend due to cerebrovascular accident in the city of Maringá, Paraná between the years of 2005 to 2015. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 1, p. 56-62, 2018.
- AWWAD, Hibah O. Detecting behavioral deficits post traumatic brain injury in rats. *In*: KOBEISSY, F.; DIXON, C. E.; HAYES, R. L.; MONDELLO, S. (ed.). **Injury models of the central nervous system: methods and protocols**. Humana Press: New York, 2016. v. 1462, cap. 31, p. 573-596.
- CANAZZA, Alessandra *et al.* Experimental models of brain ischemia: a review of techniques, magnetic resonance imaging, and investigational cell-based therapies. **Frontiers in Neurology**, [Lausanne], v. 5, p. 1-15, 19 feb. 2014.
- EKLÖF, Bo; SIESJÖ, Bo K. The effect of bilateral carotid artery ligation upon the blood flow and the energy state of the rat brain. **Acta Physiologica Scandinavica**, Stockholm, v. 86, n. 2, p. 155-165, 1972.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FREITAS, Rivelilson Mendes de; TOMÉ, Adriana da Rocha. Ações neuroprotetoras da vitamina C no corpo estriado de ratos após convulsões induzidas pela pilocarpina. **Revista de Psiquiatria Clínica**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 105-108, 2010.
- GALYFOS, George; SIANOU, Argiri; FILIS, Konstantinos. Cerebral hyperperfusion syndrome and intracranial hemorrhage after carotid endarterectomy or carotid stenting: a meta-analysis. **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v. 381, p. 74-82, 2017.
- GOETTSCHE, Claudia *et al.* Arterial flow reduces oxidative stress via an antioxidant response element and Oct-1 binding site within the NADPH oxidase 4 promoter in endothelial cells. **Basic Research in Cardiology**, Darmstadt, v. 106, p. 551-561, 2011.
- GOKALDAS, Reshma *et al.* Carotid Stenosis: from diagnosis to management, where do we stand?. **Current Atherosclerosis Reports**, Philadelphia, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2015.
- GRINTZALIS, Konstantinos *et al.* Method for the simultaneous determination of free/protein malondialdehyde and lipid/protein hydroperoxides. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 59, p. 27-35, 2013.
- HOSSMANN, Konstantin-Alexander. Experimental models for the investigation of brain ischemia. **Cardiovascular Research**, London, v. 39, p. 106-120, 1998.

JENKINS, L. W. *et al.* The role of postischemic recirculation in the development of ischemic neuronal injury following complete cerebral ischemia. **Acta Neuropathologica**, Berlin, v. 55, p. 205-220, 1981.

JUAN, Du; CULLEN, Joseph J.; BUETTNER, Garry R. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1826, p. 443-457, 2012.

KARAPANAYIOTIDES, Theodoros *et al.* Postcarotid endarterectomy hyperperfusion or reperfusion syndrome. **Stroke**, Dallas, v. 36, n.1, p. 21-26, jan. 2005.

KOBEISSY, Firas H *et al.* Neuroproteomics and systems biology approach to identify temporal biomarker changes post experimental traumatic brain injury in rats. **Frontiers in Neurology**, [Lausanne], v. 7, p. 2-16, nov. 2016.

LOVRIĆ, Jasna *et al.* Measurement of malondialdehyde (MDA) level in rat plasma after simvastatin treatment using two different analytical methods. **Periodicum Biologorum**, Croatia, v. 110, n. 1, p. 63-67, 2008.

MOULAKAKIS, Konstantinos G. *et al.* Hyperperfusion syndrome after carotid revascularization. **Journal of Vascular Surgery**, St. Louis, v. 49, n. 4, p. 1060-1068, apr. 2009.

ONKEN, Mitch; BERGER, Stephanie; KRISTIAN, Tibor. Simple model of forebrain ischemia in mouse. **Journal of neuroscience methods**, Amsterdam, v. 204, n. 2, p. 254-261, mar. 2012.

PERALS, Daniel *et al.* Revisiting the open-field test: what does it really tell us about animal personality? **Animal Behaviour**, London, v. 123, p. 69-79, 2017.

PUSKAS, Ferenc *et al.* Stimulation of the pentose phosphate pathway and glutathione levels by dehydroascorbate, the oxidized form of vitamin C. **FASEB journal**, Bethesda, v. 14, n. 10, p. 1352-1361, july 2000.

QI, Chen *et al.* Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 21, p. 8749-8754, may 2007.

SCHIAVON, Angélica Pupin *et al.* Protective effects of cannabidiol against hippocampal cell death and cognitive impairment induced by bilateral common carotid artery occlusion in mice. **Neurotoxicity Research**, New York, v. 26, n. 4, p. 307-316, nov. 2014.

SEIF EL NASR, Mona; NUGLISCH, Jörg; KRIEGLSTEIN, Josef. Prevention of ischemia-induced cerebral hypothermia by controlling the environmental temperature. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, New York, v. 27, n. 1, p. 23-26, mar. 1992.

SIROOS, Bahaadin *et al.* Cerebral hyperperfusion syndrome, an unusual but disastrous complication of carotid recanalization: a case report. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, Philadelphia, v. 27, n. 2, p. e1-e3, 2017.

SOARES, Lígia Mendes *et al.* Cognitive impairment and persistent anxiety-related responses following bilateral common carotid artery occlusion in mice. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 249, p. 28-37, 2013.

SOUSA, Rosângela Maria Lopes *et al.* Long-term high-protein diet intake reverts weight gain and attenuates metabolic dysfunction on high-sucrose-fed adult rats. **Nutrition & Metabolism**, London, 15:53, 2018.

SONG, Juhyun *et al.* Dehydroascorbic acid attenuates ischemic brain edema and neurotoxicity in cerebral ischemia: an in vivo study. **Experimental Neurobiology**, Seoul, v. 24, n. 1, p. 41-54, mar. 2015.

SPICKETT, Corinne M *et al.* Advances in methods for the determination of biologically relevant lipid peroxidation products. **Free Radical Research**, Yverdon, v. 44, n. 10, p. 1172-1202, 2010.

SPOELSTRA-DE MAN, Angelique M. E.; ELBERS, Paul W. G.; OUDEMANS-VAN STRAATEN, Heleen M. Making sense of early high-dose intravenous vitamin C in ischemia/reperfusion injury. **Critical Care**, [London], v. 22, n.1, p. 1-9, 2018.

SRODULSKI, Sarah *et al.* Neuroinflammation and neurologic deficits in diabetes linked to brain accumulation of amylin. **Molecular Neurodegeneration**, [London], v. 9, n. 30, p. 1-12, 2014.

SUNDT, T. M. *et al.* Correlation of cerebral blood flow and electroencephalographic changes during carotid endarterectomy, with results of surgery and hemodynamics of cerebral ischemia. **Survey of Anesthesiology**, Baltimore, v. 56, n. 9, p. 200-201, 1981.

TARDINI, Daniela Mazza Sundefeld; YOSHIDA, Winston Bonetti. Lesões cerebrais decorrentes de isquemia e reperfusão na cirurgia de endarterectomia de carótida. **Jornal Vascular Brasileiro**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 119-128, 2003.

TIRAPELLI, D. P. C. **Expressão gênica da apoptose celular na isquemia cerebral focal em ratos e a ação neuroprotetora da hipotermia e do cetoprofeno.** 2007. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Univesidade de São Paulo, 2007.

TRAYSTMAN, Richard J. Animal models of focal and global cerebral ischemia. **ILAR Journal**, [Washington], v. 44, n. 2, p. 85-95, 2003.

VARSHOSAZ, Jaleh *et al.* Niosomes of ascorbic acid and α -tocopherol in the cerebral ischemia-reperfusion model in male rats. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2014, p. 1-9, 2014.

VASCONCELOS, Sandra Mary Lima *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VORHEES, Charles V.; WILLIAMS, Michael T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. **Nature Protocols**, London, v. 1, n. 2, p. 1-24, 2006.

WANG, Grace J. *et al.* Insight into the cerebral hyperperfusion syndrome following carotid endarterectomy from the national vascular quality initiative. **Journal of Vascular Surgery**, [New York], v. 65, n. 2, p.1-9, 2016.

YAN, R. Y. *et al.* The protective effect and its mechanism of 3-n-butylphthalide pretreatment on cerebral ischemia reperfusion injury in rats. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, Rome, v. 21, p. 5275-5282, 2017.

YANG, Zhang *et al.* Protective effects of mangiferin on cerebral ischemia–reperfusion injury and its mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 771, p. 145-151, 2016.

ZARRUK, Juan G. *et al.* Neurological tests for functional outcome assessment in rodent models of ischaemic stroke. **Revista de Neurologia**, Barcelona, v. 53, n. 10, p. 607-618, 2011.

APENDICE A- Ficha de acompanhamento

NOME DO ESTUDO: EFEITO DO USO DE VITAMINA C NA PREVENÇÃO DE LESÕES CEREBRAIS POR REPERFUSÃO: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.

FICHA DE ACOMPANHAMENTO DE PROCEDIMENTO**A. IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL:**

1. DATA / / 2018. HORA: __:__		2. MARCAÇÃO	
3. GRUPO	SHAM ()	SOLUÇÃO SALINA ()	VITAMINA C ()
4. PESO	_____GRAMAS	5. IDADE: _____MESES	

B. PROCEDIMENTO INICIAL:

6. TEMPO CIRÚRGICO	INÍCIO: h: min. FIM: h: min. TOTAL: min.
7. CLAMPEAMENTO CAROTÍDEO POR 20 MINUTOS	SIM () NÃO ()
8. ALTERAÇÃO COMPORTAMENTAL	NÃO () SIM () DESCRIÇÃO:
9. ÓBITO	NÃO () SIM (). DESCRIÇÃO:

C. ESTUDO COMPORTAMENTAL:

10. TESTE ROTAROD	
11. TESTE LABIRINTO AQUÁTICO	
12. TESTE DE CAMPO ABERTO	
13. DECAPITAÇÃO	DATA: / / 201__ . HORA: h: min.
14. PESO DO CÉREBRO	Gr.

D. DOSAGEM MDA - MALONALDEÍDO

CORPO ESTRIADO:	HIPOCAMPO:
-----------------	------------

E. OUTRAS OBSERVAÇÕES:

15. NÃO () SIM () Descrição:

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais - CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA
CIAEP:01.0341.2014

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Efeito do uso de vitamina C na prevenção de lesões cerebrais por reperfusão: estudo experimental com ratos**", registrada com o nº **23115.001635/2016-16**, sob a responsabilidade de Sebastião Barreto de Brito Filho que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **Aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UFMA) da Universidade Federal do Maranhão em reunião de 07/06/2016.

FINALIDADE	()ENSINO (X)PESQUISA () EXTENSÃO
Vigência da autorização	01/03/2016 a 01/06/2016
Espécie/linhagem/raça	Rato/ Wistar
Nº de animais	30
Peso/Idade	250-280g/60 dias
Sexo	Masculino
Origem	Biotério de criação UFMA

Lucilene Amorim Silva

Profª. Dra. Lucilene Amorim Silva
 Presidente da Comissão de Ética no uso de animais-CEUA
 UFMA

ANEXO B – Comprovante de publicação do artigo

Hindawi
International Journal of Vascular Medicine
Article ID 4090549

Research Article

Effects of Vitamin C on the Prevention of Ischemia-Reperfusion Brain Injury: Experimental Study in Rats

Kelston Paulo Felice de Sales ¹, Bruno Araújo Serra Pinto,²
Nathalee Liberal Xavier Ribeiro,² Thamys Marinho Melo,²
Leonardo Victor Galvão-Moreira ³, Sebastião Barreto de Brito Filho,^{1,4} and Flávio Nigri⁵

¹Department of Vascular and Endovascular Surgery, University Hospital, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil

²Laboratory of Experimental Physiology, Department of Physiological Sciences, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil

³School of Medicine, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil

⁴Department of Medicine II, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil

⁵Head of Neurosurgery Teaching and Assistance Unit, Department of Surgical Specialties, Pedro Ernesto University Hospital, Nervous System Electric Stimulation Laboratory (LabEEL) – Neurosurgery Teaching and Assistance Unit, Pedro Ernesto University Hospital, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence should be addressed to Kelston Paulo Felice de Sales; kelston@hotmail.com

Received 2 July 2019; Accepted 23 September 2019

Academic Editor: Antonio Bozzani

Copyright © 2019 Kelston Paulo Felice de Sales et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. Reperfusion syndrome after carotid endarterectomy is a complication associated with cerebrovascular self-regulation in a chronically hypoperfused cerebral hemisphere, leading to severe neurological damage. Vitamin C is an important antioxidant in brain metabolism that has shown some neuroprotective actions. **Objective.** To investigate the potential effects of vitamin C on cerebral reperfusion in comparison with placebo (saline) in rats. **Methods.** Male Wistar rats were divided into 3 groups: (i) Sham ($n = 4$), animals exposed to carotid arteries dissection without clamping; (ii) Control ($n = 4$), animals that received an intraperitoneal injection of 0.9% saline solution (0.1 mL/kg) and underwent carotid arteries dissection with temporary clamping; (iii) Vitamin C ($n = 4$), animals that received an intraperitoneal injection of vitamin C (750 mg/kg) and underwent carotid arteries dissection with temporary clamping. Behavioral assessment was then performed in all groups, which included the open field, Morris water maze and rotarod tests. Levels of malondialdehyde (MDA) in the hippocampus and striatum were measured using a fluorometric assay. **Results.** Rats treated with vitamin C presented with a similar behavior as compared to the Sham group in all the three tests ($p > 0.05$), but it was significantly different from controls ($p < 0.05$). Vitamin C was also found to reduce MDA levels in both hippocampus and striatum when compared to placebo ($p < 0.05$). **Conclusion.** In the present study, vitamin C was associated with behavioral and motor preservation as well as decreased cerebral MDA levels after induced cerebral ischemia in rats.

1. Introduction

Carotid atherosclerotic disease is a leading cause of stroke, accounting for 20–30% of all cases [1, 2]. Notably, patients submitted to carotid endarterectomy have shown reduced rates of stroke and death, similarly to those who underwent stenting [3]. Nonetheless, temporary artery occlusion can trigger lesions resulting from cerebral ischemia followed by reperfusion, characterizing a postoperative cerebral hyperperfusion syndrome (CHS). Indeed, individuals who undergo carotid revascularization with endarterectomy are more likely to develop CHS as compared to those treated with carotid stent angioplasty [1, 4].

CHS following carotid endarterectomy occurs more frequently in chronic hypertensive patients and/or in those with greater carotid stenosis, being characterized by severe ipsilateral headache, seizures, and intracranial hemorrhage [5–7]. Increased nitric oxide levels during clamping of internal carotid artery and release of oxygen-derived free radicals produced during brain perfusion restoration are involved in endothelial dysfunction and deterioration of post-endarterectomy autoregulation mechanisms [8]. Higher production of reactive oxygen species (ROS) and proinflammatory cytokines are some of the major regulating mechanisms of inflammation induced by ischemia-reperfusion [9]. Still, although CHS is