

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

SONIA ELIZABETH LOPEZ CARRILLO

ALTERAÇÕES METABÓLICAS NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO DA MEDULA  
ESPINHAL EM RATOS PRETRATADOS COM L- ALANIL GLUTAMAMINA.

FORTALEZA  
2003

SONIA ELIZABETH LOPEZ CARRILLO

ALTERAÇÕES METABÓLICAS NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO DA MEDULA  
ESPINHAL EM RATOS PRE TRATADOS COM L-ALANIL-GLUTAMINA.

Dissertação submetida à Coordenação do programa de  
Pós-Graduação *stricto sensu* em Cirurgia, da Universidade  
Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do  
Grau de Mestre em Cirurgia.

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

FORTALEZA  
2003

SONIA ELIZABETH LOPEZ CARRILLO

ALTERAÇÕES METABÓLICAS NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO DA MEDULA  
ESPINHAL EM RATOS PRE TRATADOS COM L-ALANIL-GLUTAMINA

Dissertação submetida à Coordenação do programa de  
Pós-Graduação *stricto sensu* em Cirurgia, da Universidade  
Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do  
Grau de Mestre em Cirurgia.

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

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

BANCA EXAMINADORA.

---

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

---

Prof. Dr. José Huygens P. Garcia  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Paulo Ferdinando de Melo Oliveira  
Faculdade Integrada do Ceará

À minha querida mãe Rosa, pela dádiva da vida e pelo extraordinário esforço ,dedicação e amor com seus filhos

Ao meu avô Felix Carrillo *in memoriam* pelos ensinamentos,intenso carinho e por tudo que represento na minha vida

Meus irmãos Miriam e Bernardo e sobrinhos pela ternura, insentivo e companheirismo.

Às minhas filhas Gabriela e Raysa, razão Maior da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Ao PROF. DR. PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS, orientador desse trabalho, pelo incentivo, ensinamento, dedicação acadêmica, paciência e disponibilidade na elaboração dessa pesquisa.

Ao PROF. SÉRGIO BOTELHO GUIMARÃES, pela valiosa ajuda na elaboração nas análises estatísticas e gráficos, por sua disponibilidade para elucidar toda e qualquer dúvida.

Ao PROF. DR. LUSMAR VERAS RODRIGUES, pelas valiosas sugestões e pelo exemplo de dedicação e eficiência.

Ao DR. ARTUR GUIMARAES E FAMILIA, pelo carinho, companheirismo e sugestões recebidas.

AO PROF.DR JOÃO MATINS DE SOUZA TORRES, pelo incentivo e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os PROFESSORES deste Programa de Pós-graduação do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, que por meio das disciplinas ministradas nos possibilitaram um valioso ensinamento.

Aos colegas do programa de mestrado de cirurgia pelos bons momentos que me propiciaram e pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

Ao bolsista PAULO ROBERTO CAVALCANTE VASCONCELOS, pela decisiva participação na elaboração deste trabalho, por sua competência e dedicação.

*Stricto Sensu* em Cirurgia, pelo entusiasmo, dedicação, disponibilidade e eficiência com que realiza

A SRA. MARIA LUCIENE DE OLIVEIRA, Secretária do Programa de pós-graduação  
*Stricto sensu* em cirurgia, pelo entusiasmo, dedicação disponibilidade e eficiência com que realiza seu trabalho.

AO PRF. DR .JOSÉ HUYGENS P. GARCIA, que gentilmente aceitou participar da Banca Examinadora desta dissertação.

Ao PROF.DR PAULO FERDINANDO DE MELO OLIVEIRA, pela  
gentileza de aceitar o convite para participar da Banca Examinadora desta dissertação de mestrado.

*“O valor de toda obra humana não está na obra em si mas no esforço em realizá-la”*

Thomas carlyle

## RESUMO

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO DA MEDULA ESPINHAL EM RATOS PRÉ-TRATADOS COM L-ALANIL-GLUTAMINA. SONIA ELIZABETH LOPEZ CARILLO.** Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia. Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

Foram investigados os efeitos do pré-tratamento com l-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) sobre as concentrações de glicose, piruvato, lactato e ATP na medula espinhal e sangue em ratos submetidos à isquemia/reperfusão medular. Utilizaram-se 72 ratos Wistar adultos, machos, distribuídos em dois grupos, numericamente iguais e pré-tratados com solução salina (2,0 ml) ou solução de L-Ala-Gln a 20% (0,75g/Kg peso) Após 30 minutos os ratos de cada grupo foram aleatoriamente distribuídos em dois subgrupos (n=18). Os ratos pré-tratados com solução salina (n=18) foram submetidos ao trauma cirúrgico (G1) ou ao trauma seguido de pinçamento da aorta abdominal infra-diafragmática durante 30 minutos (G2), seguido por 10 ou 20 minutos de reperfusão Os animais pré-tratados com L-Ala-Gln foram submetidos aos mesmos procedimentos. Amostras (medula espinhal e sangue arterial) foram coletadas ao término de período de isquemia e 10/20 minutos mais tarde. Os metabólitos foram determinados por ensaio enzimático e expressos como Média  $\pm$  E.P.M. Os testes “t” de Student ou Mann-Whitney foram utilizados nas análises estatísticas. O nível de significância foi de  $p < 0,05$ . O trauma cirúrgico seguido de isquemia/reperfusão (G2) não induziu alterações nas concentrações de glicose e lactato no sangue ou na medula dos animais pré-tratados com solução salina, comparados ao grupo G1. Entretanto, a concentração de piruvato medular reduziu-se significativamente aos 20 minutos de reperfusão, na medula no G2 e nos ratos pré-tratados com L-Ala-Gln (G3), comparados ao grupo G1. As concentrações de ATP reduziram-se significativamente no grupo G4, refletindo um maior consumo para a produção de energia. As concentrações de lactato aumentaram significativamente durante a reperfusão nos ratos pré-tratados com L-Ala-Gln, possivelmente por uma maior conversão de piruvato a lactato. Conclui-se que o modelo utilizado não foi eficiente na produção de uma isquemia medular importante. Por outro lado, o pré-tratamento com L-Ala-Gln na vigência do aumento das concentrações de lactato no sangue e na medula pode ser devido à glicólise aumentada, possivelmente secundária a maior disponibilidade de glutamato, produzindo ativação da lançadeira malato-aspartato.

**Descritores:** Medula espinhal. Isquemia. Lesão de reperfusão. Metabólitos. L-alanil-glutamina.

## ABSTRACT

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO DA MEDULA ESPINHAL EM RATOS PRÉ-TRATADOS COM L-ALANIL-GLUTAMINA. SONIA ELIZABETH LOPEZ CARILLO.** Post-Graduation Program in Surgery (*Stricto Sensu*) of the Surgical Department, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará (Master's Degree in Surgery). 2003. Professor: Dr. Roberto Leitão de Vasconcelos.

A study has been conducted to investigate the effects of L-alanyl-glutamine (L-Ala-Gln) upon blood and tissue (spinal cord) concentrations of glucose, pyruvate, lactate and ATP in rats subjected to spinal cord ischemia/reperfusion. Seventy-two male Wistar rats distributed in 2 equal groups received either saline 2.0 ml or 20% solution of L-Ala-Gln (0.75g/Kg). Thirty minutes later rats of each group were randomized in two subgroups (n=18) and subjected to surgical trauma (G1) or to surgical trauma and infradiafragmatic aortic clamping for 30 minutes (G2), followed by 10 or 20 minutes of reperfusion. L-Ala-Gln treated rats were subjected to the same procedures (G3 and G4, respectively). Arterial blood and spinal cord samples were collected and the end of ischemia and 10/20 minutes later. Metabolites were submitted to enzymatic analyses. Results were expressed as Mean  $\pm$  S.E.M. Student's "t" and Mann-Whitney tests were utilized for statistical analyses.  $P < 0.05$  was accepted as significant. Blood and spinal cord glucose and lactate were not different in G1 and G2 rats. However, spinal cord pyruvate concentrations decreased significantly after 20 minutes of reperfusion in L-Ala-Gln treated rats (G3) compared with G1. ATP concentrations decreased significantly in G4 rats, reflecting an increased utilization for energy production. Lactate concentrations were also increased during reperfusion in ischemic L-Ala-Gln treated rats (G4) possibly due to an increased turnover of pyruvate to lactate. It is concluded that the model utilized in this study did not induce an important spinal cord ischemia. Increased blood and spinal cord lactate concentrations could be related to enhanced glycolysis possibly secondary to increased glutamate availability leading to malate-aspartate shuttle activation.

**Keywords:** Spinal cord. Ischemia. Reperfusion injury. Metabolites. L-alanyl-glutamine

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 -Mecanismo de lesão da membrana por isquemia.....	4
FIGURA 02 – Estructura quimica da glutamina.....	8
FIGURA 03 –Vias metabólicas da glutamina.....	8
FIGURA 04 - Delineamento do estudo.....	14
FIGURA 05 - Foto mostrando clampeamento da aorta infradiafracmatica.....	15
FIGURA 06 - Foto mostrando laminectomia.....	15
FIGURA 07 - Concentrações médias de <b>glicose</b> ( $\mu\text{mol/ml}$ ) no sangue dos ratos pré-tratados com solução salina (SS) e submetidos ao trauma operatório (G1) ou ao trauma operatório + isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão.....	21
FIGURA 08 - Concentrações médias de <b>piruvato</b> ( $\mu\text{mol/ml}$ ) no sangue dos ratos pré-tratados com solução salina (SS) e submetidos ao trauma operatório (G1) ou ao trauma operatório + isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão.....	22
FIGURA 09 - Concentrações médias de <b>lactato</b> ( $\mu\text{mol/ml}$ ) no sangue dos ratos pré-tratados com solução salina (SS) e submetidos ao trauma operatório (G1) ou ao trauma operatório + isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão.....	22
FIGURA 10 - Concentrações médias de <b>glicose</b> ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinhal de ratos pré-tratados com solução salina (SS) e submetidos ao trauma operatório (G1) ou ao trauma operatório + isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão.....	23
FIGURA 11 - Concentrações médias de <b>piruvato</b> ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinhal de ratos pré-tratados com solução salina (SS) e submetidos ao trauma operatório (G1) ou ao trauma operatório + isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão.....	24
FIGURA 12 - Concentrações médias de <b>lactato</b> ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinhal de ratos pré-tratados com solução salina (SS) e submetidos ao trauma operatório (G1) ou ao trauma operatório + isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão.....	24
FIGURA 13 - Concentrações médias de <b>ATP</b> ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinhal de ratos pré-tratados com solução salina (SS) e submetidos ao trauma	

operatório (G1) ou ao trauma operatório + isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão.....25

FIGURA 14 - Concentrações médias de **glicose** ( $\mu\text{mol/ml}$ ) no sangue de ratos pré-tratados com solução salina (SS) (G1) ou L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) (G3) e submetidos ao trauma operatório sem isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão.....26

FIGURA 15 - Concentrações médias de **piruvato** ( $\mu\text{mol/ml}$ ) no sangue de ratos pré-tratados com solução salina (SS) (G1) ou L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) (G3) e submetidos ao trauma operatório sem isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão.....26

FIGURA 16 - Concentrações médias de **lactato** ( $\mu\text{mol/ml}$ ) no sangue de ratos pré-tratados com solução salina (SS) (G1) ou L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) (G3) e submetidos ao trauma operatório sem isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão.....27

FIGURA 17 - Concentrações médias de **glicose** ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinhal de ratos pré-tratados com solução salina (SS) (G1) ou L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) (G3) e submetidos ao trauma operatório sem isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão.....28

FIGURA 18 - Concentrações médias de **piruvato** ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinhal de ratos pré-tratados com solução salina (SS) (G1) ou L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) (G3) e submetidos ao trauma operatório sem isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão.....28

FIGURA 19 - Concentrações médias de **lactato** ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinhal de ratos pré-tratados com solução salina (SS) (G1) ou L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) (G3) e submetidos ao trauma operatório sem isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão.....29

FIGURA 20 - Concentrações médias de **ATP** ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinhal de ratos pré-tratados com solução salina (SS) (G1) ou L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) (G3) e submetidos ao trauma operatório sem isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão.....29

FIGURA 21- Concentrações médias de **glicose** ( $\mu\text{mol/ml}$ ) no sangue de ratos pré-tratados com L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) e submetidos ao trauma operatório (G3) ou ao trauma operatório + isquemia medular (G4), nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão.....30

FIGURA 22 - Concentrações médias de **piruvato** ( $\mu\text{mol/ml}$ ) no sangue de ratos pré-

tratados com L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) e submetidos ao trauma operatório (G3) ou ao trauma operatório + isquemia medular (G4), nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão.....	31
FIGURA 23 - Concentrações médias de <b>lactato</b> ( $\mu\text{mol/ml}$ ) no sangue de ratos pré-tratados com L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) e submetidos ao trauma operatório (G3) ou ao trauma operatório + isquemia medular (G4), nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão.....	31
FIGURA 24 - Concentrações médias de <b>glicose</b> ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinhal de ratos pré-tratados com L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) e submetidos ao trauma operatório (G3) ou ao trauma operatório + isquemia medular (G4), nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão.....	32
FIGURA 25 - Concentrações médias de <b>piruvato</b> ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinhal de ratos pré-tratados com L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) e submetidos ao trauma operatório (G3) ou ao trauma operatório + isquemia medular (G4), nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão.....	33
FIGURA 26 - Concentrações médias de <b>lactato</b> ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinhal de ratos pré-tratados com L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) e submetidos ao trauma operatório (G3) ou ao trauma operatório + isquemia medular (G4), nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão.....	33
FIGURA 27 - Concentrações médias de <b>ATP</b> ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinhal de ratos pré-tratados com L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) e submetidos ao trauma operatório (G3) ou ao trauma operatório + isquemia medular (G4), nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início reperfusão.....	34
FIGURA 28 –Ciclo malato –aspartato.....	39

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Concentrações médias de glicose, piruvato e lactato ( $\mu\text{mol/ml}$ ) no sangue de ratos pré-tratados com solução salina (SS) e submetidos ao trauma operatório (G1) ou ao trauma operatório + isquemia medular (G2), nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão.....	21
Tabela 2 – Concentrações médias de glicose, piruvato, lactato e ATP ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinhal de ratos pré-tratados com solução salina (SS) e submetidos ao trauma operatório (G1) ou ao trauma operatório + isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão.....	23
Tabela 3 – Concentrações médias de glicose, piruvato e lactato ( $\mu\text{mol/ml}$ ) no sangue de ratos pré-tratados com solução salina (SS) (G1) ou L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) (G3) e submetidos ao trauma operatório sem isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão.....	25
Tabela 4 – Concentrações médias de glicose, piruvato, lactato e ATP ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinhal de ratos pré-tratados com solução salina (SS) (G1) ou L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) (G3) e submetidos ao trauma operatório sem isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão.....	27
Tabela 5 – Concentrações médias de glicose, piruvato e lactato ( $\mu\text{mol/ml}$ ) no sangue de ratos pré-tratados com L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) e submetidos ao trauma operatório (G3) ou ao trauma operatório + isquemia medular (G4) nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão.....	30
Tabela 6 – Concentrações médias de glicose, piruvato, lactado e ATP ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinhal de ratos pré-tratados com L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) e submetidos ao trauma operatório (G3) ou ao trauma operatório + isquemia medular (G4), nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão.....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

® – Marca Registrada

ADP – Difosfato de Adenosina

ATP – Trifosfato de Adenosina

Ala-Gln– L-Alanil-Glutamiina

Dr. – Doutor

Dra. – Doutora

Ed. – Edição

EFM – Erro Padrão da Média

H<sup>+</sup> - Íon Hidrogênio

NAD<sup>+</sup> - Forma oxidada de nicotinamida adenina dinucleotídio

NADH – Forma Reduzida de nicotinamida adenina dinucleotídio

NADP<sup>+</sup> - Forma oxidada de nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato

NADPH – Forma reduzida de nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato

pH – Logaritmo Decimal do Inverso da Atividade dos Íons

μmol – Micromol

SS – Solução salina

I/R – Isquemia reperfução

## SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Isquemia	2
1.2 Reperfusão	4
1.3 Vias metabólicas para obtenção de energia	5
1.4 Glutamina	6
1.5 L-Alanil Glutamina	10
<b>2. OBJETIVO DO ESTUDO</b>	<b>11</b>
<b>3. MÉTODO</b>	<b>11</b>
3.1 Animais e ambientes de experimentação	12
3.2 Técnica anestésica	12
3.3 Técnica operatória	12
3.4 Delineamento experimental	13
3.5 Técnica laboratorial	16
3.6 Determinação de metabólitos	16
3.6.1 Determinação da glicose	16
3.6.2 Determinação de ATP	17
3.6.3 Determinação do Piruvato	18
3.6.4 Determinação de Lactato	19
3.7 Cálculo de metabólitos	20
3.8 Análise estatística	20
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>21</b>
4.1 Efeitos metabólicos do trauma operatório	21
4.1.1 No sangue	21
4.1.2 No tecido medular	23
4.2 Efeitos metabólicos da oferta de L-Ala-Gln sobre o trauma operatório	25
4.2.1 No sangue	25
4.2.2 No tecido medular	27
4.3 Efeitos metabólicos da oferta de L-Ala-Gln sobre isquemia / reperfusão da medula Espinhal	29
4.3.1 No sangue	30
4.3.2 No tecido medular	31
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>35</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>39</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	<b>40</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>4</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os estudos das lesões provocadas pela isquemia e reperfusão são amplos devido à conhecida sensibilidade dos neurônios à isquemia-anoxia, também devido à incapacidade de divisão das células nervosas, que é um fator limitante em procedimentos que afetem a medula e encéfalo. (SADER et al., 2002)

O pinçamento da aorta torácica em humanos é na aorta infradiafragmática nos ratos provoca isquemia distal de órgãos e sistemas vitais como rins e medula espinhal. A paraplegia, resultante do pinçamento aortico ou da hipotensão distal ou de ambos, ocorre em 10 a 15% em humanos submetidos à cirurgia para aneurismas toracoabdominais” (MARIÑO, 1991). Em animais, isquemia medular de 30 minutos resulta em paraplegia de 100%” (SADER et al., 2002).

Existe extensa investigação com a finalidade de entender a fisiopatologia e os meios de modificá-los. SPENCER e ZINMMERMAN (1950), demonstraram a importância da irrigação medular.

A irrigação medular é dada por ramos das artérias vertebrais no segmento cervical, pelas artérias intercostais nas regiões dorsal e lombares, além de ramos da artéria hipogástrica. Os ramos anteriores das artérias intercostais confluem para as artérias radiculares anteriores, sendo a magna ou de Adamkiewicz a mais importante na formação da artéria espinhal anterior, responsável pela irrigação dos 2/3 da circunferência anterior da medula. O terço restante é irrigado pela espinhal posterior, constituída pelas radiculares posteriores. (MARIÑO et al., 1991)

Em 90% dos casos a artéria radicular magna origina-se entre T-7 e T-12 predileção T-8 e T-9. Em 10% dos pacientes podem ter origem entre L-2 e L-4 em humanos. (MARIÑO et al., 1991)

Tem-se usado várias espécies de animais (rato, porco, cão, coelho) para estudar o possível efeito protetor de certos fármacos na medula isquêmica, dentre eles estão: esteróides e drenagem do líquido cérebro espinhal; (WADOUH et al., 1984), uso de nimodipina intravenoso (SCHITTEK et al., 1992); enzima superóxido dismutase (AGEE et al., 1991); flunarizina (JOHNSON et al., 1993); antagonistas do glutamato, (MADDEN, 1992); pentobarbital e hipotermia (TETIK et al., 2002); clorpromazine (SADER et al., 2002). Ginko biloba (MECHIROVA ; DOMORAKOVA et al., 2002), bem como de outros procedimentos, dentre eles esta a drenagem do líquido cérebro espinhal (CULLOUGH et al., 1988), hipotermia sistêmica (PONTIUS et al., 1954) hipotermia seletiva da medula (COLES et al., 1983; COLON et al., 1987; MARSALA et al., 1993; TABAYASHI et al., 1993; VANICKY et al., 1993) as derivações sanguíneas (ELMORE et al., 1992) e por último monitorização de potências evocados somato sensoriais; medidas da pressão aórtica distal, e da

pressão do líquido cérebro espinhal durante o pinçamento aórtico, se mostrou eficiente para prevenção e detecção de lesão da medula espinhal (WADA et al., 2001).

No humano, as medidas preventivas, como métodos para reduzir as consequências da reperfusão e a prevenção da isquemia, redução do metabolismo do tecido nervoso, aumento da pressão de perfusão medular são as seguintes:

Uso de barbitúricos e moderada hipotermia.

Uso de “shunts”, para o aumento de perfusão medular, drenagem de liquor e elevação da pressão sistólica proximal.

Reimplante de intercostais e lombares de grande calibre

Combate aos efeitos de radicais livres, liberados no período de isquemia e responsáveis pelos efeitos da reperfusão, com drogas derivadas superóxido-dismutase, glutatona-peroxidase e a catalase.

(MARIÑO, 1991; HOLIER, 1989) sugere o uso de corticoides e manitol.

Os estudos em humanos, se intensificaram na última década, usando diversos métodos e drogas sempre com o intuito de diminuir os efeitos nocivos da isquemia-reperfusão medular, durante a cirurgia para correção de aneurisma toracoabdominal.

Uso de drogas como naloxone e drenagem do fluido espinhal (ACHER et al., 1990; NIKKISO; COSELLI et al., 1998); drenagem do líquido cérebro espinhal e ponte entre o átrio esquerdo e artéria femoral (PLESTIS, 2001); perfusão fria do espaço epidural durante todo ou a maior parte do peroperatório (TABAYASHI et al., 2002; DOWNEY, 2000); perfusão distal (BONATTI, et al 1996); perfusão distal e drenagem do líquido cérebro espinhal (SAFI, 1996); perfusão distal hipotermia, reimplantação de artérias intercostais dentro da prótese e drenagem do líquido espinhal (HILGENBERG, 1999); drenagem do fluido do líquido cérebro espinhal combinado com uso de papaverina intratecal (SVENSSON et al., 1998). A reanastomose das artérias intercostais ou lombares, ponte com coração direito, e drenagem do líquido espinhal diminuiu para 4,5% de paraplegia ou paraparesia (COSELLE *et al.*, 2002).

Os resultados dos estudos experimentais da isquemia reperfusão da medula espinhal podem ser avaliados por parâmetros clínicos, eletrofisiológicos, estudos morfológicos, estudos bioquímicos e enzimáticos.

## 1.1 ISQUEMIA

A importância fundamental da circulação está, na ação de transporte, não só do oxigênio ligado à hemoglobina, como também no transporte de nutrientes anticorpos, hormônios, células

leucocitárias, calor substâncias residuais ,em respostas às exigências metabólicas que variam, amplamente de tecido para tecido e inclusive dentro de um mesmo tecido (LEHNINGER et al., 2000).

No caso do sistema nervoso central , após 5 a 15 min de isquemia já apresenta alteração na função celular. Tenta-se a indução ao coma com pentobarbital com o intuito de prolongar a tolerância do sistema nervoso central à isquemia (TETIK et al., 1999) No músculo esquelético, pela habilidade de manter funções celulares básicas através da glicólise anaeróbia (QUIÑONES et al., 1989),se encontra entre os tecidos que tem relativa tolerância a isquemia. O rim quando submetido a 60 minutos de isquemia quente revela lesões histológicas definitivas (JABLONSKI et al., 1983).

Durante a isquemia há redução ou ausência na oferta de oxigênio e substratos para as células, com inibição do metabolismo aeróbio e, conseqüentemente, diminuição do suprimento energético para a manutenção de metabolismo celular (CHERVU et al., 1989).

Com a queda acentuada de ATP celular, ocorre não só um aumento das concentrações de adenosina difosfato e monofosfato, xantina e hipoxantina ,como também de concentrações relativamente altas de xantina desidrogenase (TETIK et al., 1999).

A queda do ATP celular em associação com o aumento da adenosina monofosfato (AMP) estimula atividade da fosfofrutoquinase e fosforilase. Isto resulta em aumento da glicólise anaeróbica para manter fontes de energia celular pela geração de ATP pela queima das reservas de glicogênio. Portanto, depleção gradual das reservas energéticas (Adenosina Trifosfato); a qual seria agora produzida pelo metabolismo anaeróbio com a formação de lactato e fosfatos inorgânicos. (ROBBINS,1994).

Como conseqüência da diminuição do suprimento energético, há comprometimento da bomba de sódio e potássio, resultando em efeito adverso dos delicados sistemas enzimáticos, principalmente mudança da xantina desidrogenase para xantina oxidase com grande acúmulo de xantina e hipoxantina, resultando em edema celular e alterações das organelas celulares: tumefação das mitocôndrias; descolamento dos ribossomos e aparecimento das vesículas na superfície celular (COTRAN et al .,1996).

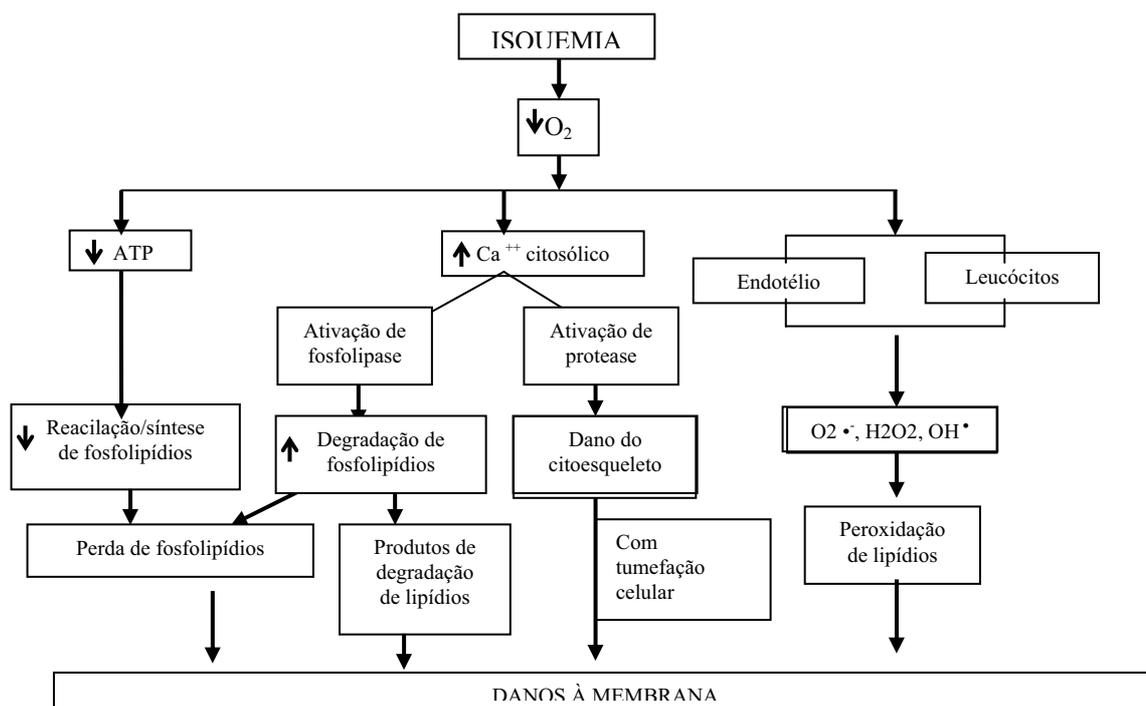
Esta tumefação celular constitui uma característica da lesão isquêmica mais grave, no entanto, o papel preciso desta tumefação na isquemia ainda é controverso (JAMART ;LAMBOTTE, 1982).

A distinção do limite preciso entre uma lesão reversível e irreversível é difícil de se determinar, porém estas alterações podem atingir as mitocôndrias e outras organelas, já constituindo evidente dano irreversível inicial na célula (PEGG,1986).

Caso a isquemia se prolongue e não havendo produção adequada de energia sob a forma de ATP, as alterações tornam-se mais graves em todas as organelas, levando não apenas as alterações nas mitocôndrias, como também a uma desintegração progressiva da membrana celular, principalmente devido a falha na bomba de sódio e potássio. Isso acontece em decorrência de um

influxo geral do cálcio dentro da célula, acarretando efeitos destrutivos nos sistemas enzimáticos delicados (HAIMOVICI,1979).

A ativação dessas enzimas e co-enzimas, e também a degradação cada vez mais os dos fosfolipídios comprometem a integridade da membrana celular, que não pode ser mantida, ocorrendo a morte celular (SCHOENBERG, et al, 1983)



**FIGURA 1** – Mecanismos de lesão da membrana por isquemia (ROBBINS, 1994).

## 1.2 REPERFUSÃO

Talvez, tão importantes quanto os danos provocados pela isquemia, sejam também aqueles causados pela reperfusão que agravam as lesões teciduais da isquemia (SCHOENBERG,1993).

O consenso é que lesão celular significativa já ocorre nas fases iniciais da reperfusão e, na proporção que ocorre um retardo na restauração do fluxo sanguíneo à área isquêmica, maior seria lesão celular, também conhecida como lesão de reperfusão (HAIMOVICI,1979)

Dois mecanismos têm sido enfatizados como responsáveis, pelas alterações provocadas pela isquemia-reperfusão, são: a geração de radicais livres de oxigênio e a ativação da fosfolipase A2 (GUNEL,1998). As lesões estruturais e funcionais provocadas pelos radicais livres são basicamente a peroxidação lipídica e a oxidação das proteínas. Está bem estabelecido que o sistema

hipoxantina/xantina oxidase e os granulócitos neutrófilos são fontes de produção de radicais livres de oxigênio (TETIK, 1999).

Esses radicais livres são, geralmente, produzidos pelas organelas celulares e membrana citoplasmática. Os leucócitos polimorfonucleares que invadem o local de isquemia, durante a reperfusão também produzem uma gama de radicais livres, derivados dos oxigênios lesivos a célula. Estudos têm sugerido a participação dos leucócitos nesse mecanismo lesivo, que, através de uma reação de degranulação, liberariam esses mediadores tóxicos, destruindo o ácido hialurônico com ruptura da membrana basal, aumentando a permeabilidade capilar (BELKIN et al., 1990).

Não havendo preparação adequada da célula, a revascularização provocaria o fenômeno do não – refluxo, no qual muitos capilares não são reperfundidos (BRAUNWALD et al., 1995).

Esse fenômeno adquire importância quando o intervalo isquêmico é alargado. A deposição de fibrina na microcirculação, também chamada de trombose de aposição, parece ser um fator significativo que pode requerer controle para otimizar a reperfusão (NEGLEN et al., 1986).

A maioria dos radicais livres de oxigênio é produzido como resultado de acumulação de hipoxantina e formação de xantina oxidase durante o período de isquemia seguido de reperfusão. GRANGER et al., (1981) propuseram que a enzima xantina oxidase era a principal fonte de produção de oxidante. A hipótese era de que a isquemia acelerava a conversão de xantina desidrogenase para o radical oxigênio, produzindo xantina oxidase. Concomitantemente, o ATP é catabolizado durante o período de hipoxia para hipoxantina. Com a reperfusão e conseqüente reoxigenação, o oxigênio molecular reage com hipoxantina e xantina oxidase, produzindo metabólitos de oxigênio altamente citotóxicos: superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (ZIMMERMAN ; GRANGER, 1992). Esses radicais de oxigênio altamente citotóxicos são capazes de permanentemente destruir as membranas celulares, principalmente causando lesões estruturais e funcionais pela peroxidação das proteínas (TETIK et al; 1999).

Os neutrófilos são amplamente aceitos como um dos maiores fatores responsáveis pelas alterações microvasculares e teciduais da isquemia seguida de reperfusão (HERNANDEZ et al., 1987; BARROSO-ARANDA et al., 1988; KORTHUIS et al., 1988). Esta aceitação é baseada em estudos que demonstram o efeito benéfico da limitação da interação dos neutrófilos com o endotélio microvascular através de modelos leucopênicos (WALKER et al., 1987).

### **1.3 VIAS METABÓLICAS PARA OBTENÇÃO DE ENERGIA CELULAR**

As células obtêm energia (ATP) por várias vias metabólicas. A quebra da glicose na ausência de oxigênio, é denominada glicólise anaeróbica. O processo é catalisado por enzimas do citosol e todos os intermediários são compostos fosforilados (LEHNINGER et al., 2000)

Entretanto, a maioria das células eucarióticas e muitas bactérias, normalmente, são aeróbias e oxidam seus combustíveis orgânicos completamente até CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, na fase aeróbica, esse processo é também denominado respiração celular. A respiração celular ocorre em 03(três) estágios: a formação oxidativa do Acetil-Coa, a partir de moléculas dos combustíveis orgânicos (glicose; ácidos graxos e alguns aminoácidos), a degradação dos resíduos de acetila pelo ácido cítrico com a liberação de CO<sub>2</sub> e de elétrons; a transferência de elétrons para o oxigênio molecular, acoplada a fosforilação do ADP em ATP. O catabolismo oxidativo da glicose libera muito mais energia que as vias fermentativas. No entanto, no processo isquêmico, as células utilizam vias alternativas como meio de contornar, pelo menos temporariamente, a condição anormal.

De um modo geral, as vias metabólicas alternativas não possuem a mesma eficiência bioquímica, nem a mesma duração das vias preferenciais. No entanto, se essa condição anômala persiste, termina dando lugar a alterações celulares importantes (COTRAN et al., 1996).

#### 1.4 GLUTAMINA

As células, em geral, contêm milhares de proteínas diferentes. Cada uma com uma função ou atividade biológica diferente. Essas funções incluem catálise enzimática, transporte molecular, nutrição motilidade do organismo, papéis estruturais, defesas do organismo, regulação e muitas outras.

Todas as proteínas são feitas do mesmo conjunto de 20 aminoácidos. As suas diferenças em função resultam das diferenças em composição e seqüência de seus aminoácidos. Os aminoácidos que não podem ser sintetizados pelo organismo, ou aqueles que são sintetizados em quantidades inadequadas (velocidade de síntese menor que a capacidade de utilização), são chamados essenciais e devem ser oferecidos por fontes exógenas. Os aminoácidos não essenciais ou aqueles dispensáveis na dieta diária podem ser sintetizados endogenamente a partir de outros aminoácidos. (LEHNINGER et al., 2000).

Mas recentemente, muita atenção tem sido conferida a um aminoácido neutro não essencial, L-glutamina, devido as suas diferentes funções desempenhadas na fisiologia do homem, animais e nas células em cultura.

A glutamina foi descrita, pela primeira vez em 1833, por SCHULZE E BOSSHARD, no entanto coube a THIERFELD (1914) elucidar as principais funções e a KREBS (1930), demonstrar a capacidade dos tecidos animais de sintetizá-la (SMITH et al., 1990).

A L-Glutamina, segundo descrição de Smith (1990), foi considerada um substrato biologicamente importante há cerca de 100 anos, quando se demonstrou com base em evidências indiretas, que este era o elemento estrutural das proteínas. A importância biológica da glutamina foi conferida através dos trabalhos desenvolvidos com cultura de células, há muitos anos. Um dos primeiros conceitos de que a glutamina possui propriedades metabólicas importantes, surgiu dos

trabalhos desenvolvidos por EAGLE (1955), o qual demonstrou que este aminoácido constitui nutriente importante para o crescimento e manutenção de células em cultura.

Resultados similares foram posteriormente obtidos para diferentes tipos de células e tecidos, demonstrando ser este aminoácido precursor da síntese de nucleotídeos e outras moléculas, bem como, fornecedor da energia necessária para a proliferação celular. MEISTER (1956) demonstrou que um grande variedade de células necessita de glutamina no meio de cultura como nutriente essencial para o crescimento e proliferação.

No período de 1950 a 1960 foram evidenciados a função da glutamina na síntese protéica e o seu papel como importante intermediário para um grande número de vias metabólicas em diferentes tipos celulares.(LIMA ,98)Em células musculares, grande quantidade de glutamina é encontrada livremente, o que significa que não esta ligada a nenhum outro aminoácido (O'DWYER et al., 1989).

A glutamina parece ser o principal nutriente para o reparo intestinal, acelerando, por exemplo, o processo cicatricial de úlceras gástricas crônicas (KABE et al., 1976), assim como, defendendo o tubo digestivo da ação lesiva de quimioterápicos (FOX,1988 ) e de radiação (KLIMBERG et al., 1990) sendo essencial para a síntese do DNA (divisão celular e crescimento), facilitando, dessa forma, o reparo e a cura do tecido.

A glutamina é muito importante para neutralizar toxinas no corpo, sendo a fonte energética principal para todo o sistema imunológico, ao incrementar a habilidade das células do sistema imunológico, a realizar o trabalho de identificar e destruir as bactérias (ZIEGLER,1992).Não tem sido demonstrado nenhum efeito adverso da glutamina após o seu emprego por via oral ou endovenosa (ZIEGLER, 1992).

Devido a sua grande participação nas reações de transaminação, a glutamina pode ser classificada como um verdadeiro regulador da homeostase de aminoácidos( PHROMPHET-CHARAT et al .,1981).

A glutamina é um aminoácido neutro não essencial que pode ser sintetizado virtualmente por todos os tecidos do organismo. Na sua composição química encontra-se, carbono (41,09%), hidrogênio (6,9 %), oxigênio ( 32,84 % ) e nitrogênio (19,17 % ). Em PH fisiológico , o grupamento carboxil carrega uma carga negativa, enquanto o grupo amino uma positiva. E um aminoácido glicogênico e diferentemente dos outros aminoácidos, possui dois grupamentos amina: um alfa- amino e outro amida, sendo este facilmente hidrolisável. Esta característica estrutural lhe confere importância como transportador de nitrogênio e carreador de amônia da periferia para os órgãos viscerais (ALFACE,1997) .

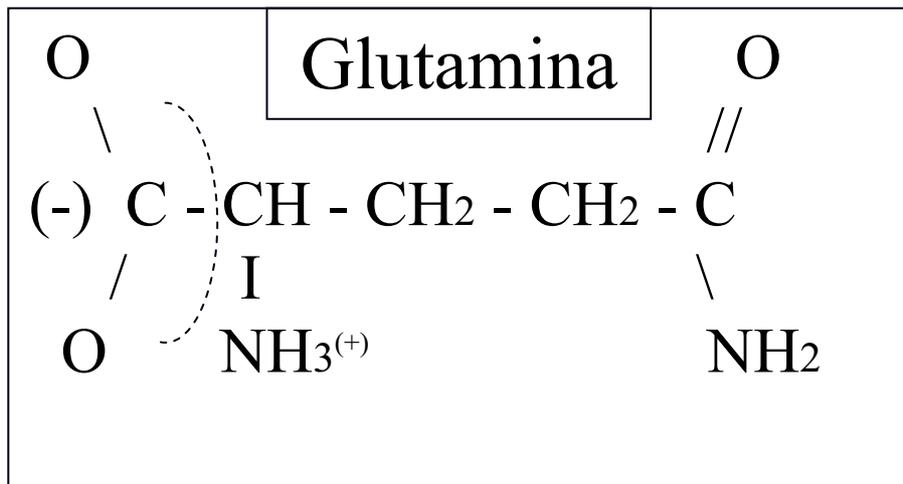


FIGURA 2 – Estrutura química da glutamina

Em todas as células, este aminoácido é o doador de átomos de nitrogênio durante a síntese de purinas, pirimidinas, nucleotídeos, além de ser um precursor da glutatona. Nos rins, a glutamina desempenha papel importante no equilíbrio ácido-básico, como o mais importante substrato para a amoniogênese. No fígado e rim pode servir como substrato gliconeogênico (LOCH ET et al., 1998).

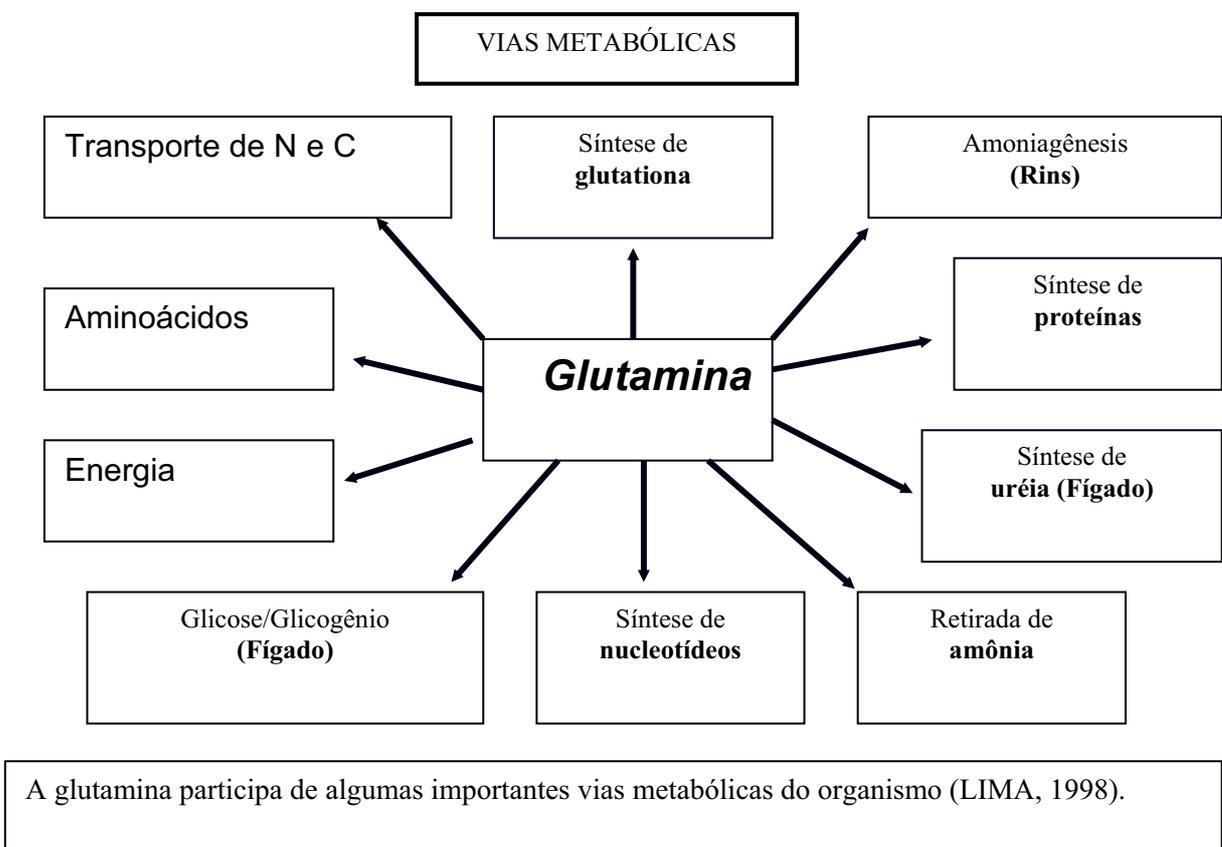


FIGURA 3 – Vias metabólicas da glutamina

A glutamina não está apenas envolvida nas múltiplas reações bioquímicas dentro da célula, mas desempenha importantes funções em tecidos específicos e na fisiologia inter-tecidos. Trata-se do aminoácido livre mais abundante do plasma e no “pool” intracelular.

Durante o período de tempo em que muitos desses trabalhos foram realizados, havia pouco interesse no estudo da glutamina, pois esta era considerada um aminoácido não essencial. Outro aspecto importante relacionava-se às dificuldades em quantificar a sua concentração plasmática e nos tecidos. Esta molécula é instável sob condições de PH baixo ou elevado, sendo facilmente degradada durante a preparação de amostras para a análise de aminoácidos e, diferente da maioria dos outros aminoácidos, é lábil ao calor e relativamente instável em solução aquosa (STEHLE et al., 1989).

Considerando todas as funções desempenhadas pela glutamina nos diferentes tecidos e células, atualmente, alguns autores chamam a atenção para a sua classificação como aminoácido não essencial. Os relatos atuais discutem a possibilidade de classificá-la como “nutriente condicionalmente essencial”, o qual torna-se necessário na dieta em muitos estados patológicos. Outros autores o consideram condicionalmente essencial porque é um aminoácido não essencial, sob certas condições de saúde, mas, nos estados patológicos em que a competição pela utilização excede a capacidade de síntese muscular e hepática para manter as concentrações plasmáticas normais, pode ser um nutriente essencial (WINDMUELLER e SPAETH, 1980).

Relatos atuais demonstram que este aminoácido é avidamente consumido pelas células de divisão rápida, tais como células da mucosa intestinal, células tumorais, fibroblastos, linfócitos e até mesmo macrófagos. A glutamina não atua somente como um precursor para a síntese protéica, mas também é um importante intermediário em um grande número de vias metabólicas. Sendo o aminoácido mais concentrado na corrente sangüínea, a glutamina funciona como um transportador de nitrogênio entre os vários tecidos. Devido à sua grande participação nas reações de transaminação, a glutamina pode ser classificada como um verdadeiro regulador da homeostase de aminoácidos (PHROMPHET-CHARAT et al., 1981; SIES et al., 1984).

A glutamina representa um importante combustível metabólico para as células do trato gastrointestinal. Tanto para os enterócitos como para os colonócitos (HULS, et al., 1993),

Recentemente, marcantes evidências demonstram que todas as células de proliferação rápida, principalmente as do sistema imunológico, são estritamente dependentes da disponibilidade de glutamina como fonte de energia (carbono, nitrogênio) (ALVERDY, 1990).

Embora a glutamina seja o mais abundante aminoácido de corpo, estudos científicos têm demonstrado que sob condições de estresse metabólico ocorre aumento significativo do consumo endógeno deste aminoácido, e nestas condições, o potencial de síntese hepática é muito comprometido (LACEY, 1990)

Estudos atuais demonstram que a suplementação extra de glutamina na dieta resulta em melhoria significativa do balanço nitrogenado e estímulo à resposta imunológica (LABOW & SOUBA, 2000 et al., 2002)

Vários trabalhos demonstraram que linfócitos e macrófagos – principais células do sistema de defesa – utilizam glutamina em altas taxas. Nas situações em que seja necessária restauração do metabolismo e funcionalidade destas células, certamente, a oferta exógena de glutamina deve ser aumentada. Taxas elevadas de consumo de glutamina, com oxidação parcial, detectadas nessas células, são características metabólicas também de enterócito, timócitos, colonócitos e fibroblastos (LACEY ; WILMORE, 1990).

As condições hipermetabólicas como as que ocorrem na presença de tumores, grandes queimaduras, cirurgias, traumas e sepse, são acompanhadas de mudanças significativas na distribuição tecidual de glutamina com diminuição da concentração intramuscular e plasmática. Em consequência, ocorre evidente redução na capacidade e velocidade de síntese endógena deste aminoácido e significativo aumento na capacidade de utilização celular (LACEY, 1990).

### **1.5 ALANIL GLUTAMINA**

A forma livre de glutamina (L- glutamina), tem sido normalmente utilizada nas soluções de aminoácidos e em suporte nutricional enteral ou oral. Esta forma livre, no entanto, possui pobre solubilidade em solução aquosa e baixa estabilidade em PH baixo e temperaturas elevadas. Além disso, do ponto de vista metabólico, a L –glutamina sofre conversão espontânea formando piroglutamato e amônia, produtos tóxicos ao organismo humano (STEHLE et al .,1989).

Essas importantes limitações no uso e na eficácia da glutamina livre têm levado a estudos cujos resultados recomendam a administração deste aminoácido na forma de peptídeo. Os peptídeos glicil-glutamina ou alanil-glutamina apresentam alta solubilidade em água e estabilidade durante os procedimentos de preparo, armazenamento e administração das soluções nutricionais.

Atualmente vários mecanismos são propostos para explicar a captação celular da glutamina peptídeo na corrente sangüínea: Hidrólise por enzimas presentes na membrana plasmáticas das células intestinais, e absorção intestinal de peptídeos intactos por transporte ativo ou difusão passiva (BAI et al., 1996).

Outros experimentos indicam que a taxa de remoção plasmática dos peptídeos depende da espécie, do tecido envolvido e do tipo de peptídeo administrado. Estes e outros estudos demonstram que o peptídeo glicil glutamina é captado principalmente pelos rins e pelas células intestinais. No entanto, a célula hepática parece possuir habilidade para remover eficientemente as duas formas de peptídeos (BAI et al .,1996).

Não parece haver na literatura consultada estudos abordando o uso de dipeptídeo L-alanil–glutamina como nutracêutico capaz de modificar a resposta metabólica do tecido submetido às lesões de isquemia e reperfusão medular, fato que incentivou a realização do presente trabalho.

## **2 OBJETIVO DO ESTUDO**

Verificar o eventual efeito da L-alanil glutamina sobre a isquemia e reperfusão na medula espinhal de ratos, através da determinação das concentrações *in vivo* no sangue e no tecido da medula espinhal , de glicose, lactato, piruvato e ATP.

### **3 MÉTODO**

A pesquisa experimental foi realizada de acordo com as Normas Internacionais para a Pesquisa Biomédica em Animais (CONSEJO DE ORGANIZACIONES INTERNACIONALES DE CIENCIAS MÉDICAS,1990) e de acordo com a Lei Federal n.º 6.638(estabelece normas para a prática didático-científica da vivissecação de animais),de 08 de maio de 1979.

#### **3.1 ANIMAIS E AMBIENTES DE EXPERIMENTAÇÃO**

Foram utilizados 72 ratos albinos (*Ratus norvegicus albicus*, Rodentia mammalia), da linhagem Wistar, machos .Durante o experimento os animais foram mantidos em condições controladas de luz (ciclo claro de 7 às 19 horas) e temperatura de 22 graus centígrados,provenientes do Biotério central da Universidade Federal do Ceará. O peso dos animais variou entre 300 e 350 gramas. Os animais eram mantidos no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina (UFC) em gaiolas de polipropileno, recebendo água e alimento adequado ad libitum, foram mantidos em condições controladas de luz (ciclo claro de 7 às 19 horas) e temperatura de 22 graus centígrados.

#### **3. 2 TÉCNICA ANESTÉSICA**

Os animais foram anestesiados com éter dietílico pela técnica inalatória, o animal posto sob campânula de plástico semifechado, exposto a éter embebido em chumaço de algodão. O nível anestésico era avaliado por parâmetros clínicos como respiração, frequência cardíaca, eventuais arritmias,(com uso de doppler portátil), movimentos evidenciando superficialização anestésica.

#### **3.3 TÉCNICA OPERATÓRIA**

Após a obtenção de um adequado plano anestésico, as operações foram realizadas seguindo as seguintes etapas:Imobilização do animal em decúbito dorsal, numa placa de madeira com fixação dos seus membros com liga elástica.

Laparotomia por incisão mediana de 5 cm de extensão a partir do processo xifóide. Exatamente após 30 minutos da injeção endovenosa de L-Alanil glutamina na dose 0,75g/kg no grupo experimento, por dissecação da jugular interna, e 2 ml de solução salina no grupo controle, era dissecado a seguir a aorta infradiafragmática, estabelecendo a isquemia através de pinça bulldoge pediátrico, durante 30, minutos, (período de isquemia).confirmava-se a eficiência da isquemia pelo desaparecimento do fluxo arterial ao uso do estetoscópio ultra-sônico Doppler, como também pela

percepção visual da ausência dos pulsos arteriais abaixo do pinçamento. O modelo de isquemia medular foi realizado segundo experiências de SADER;COUTINHO NETTO, *et al*.

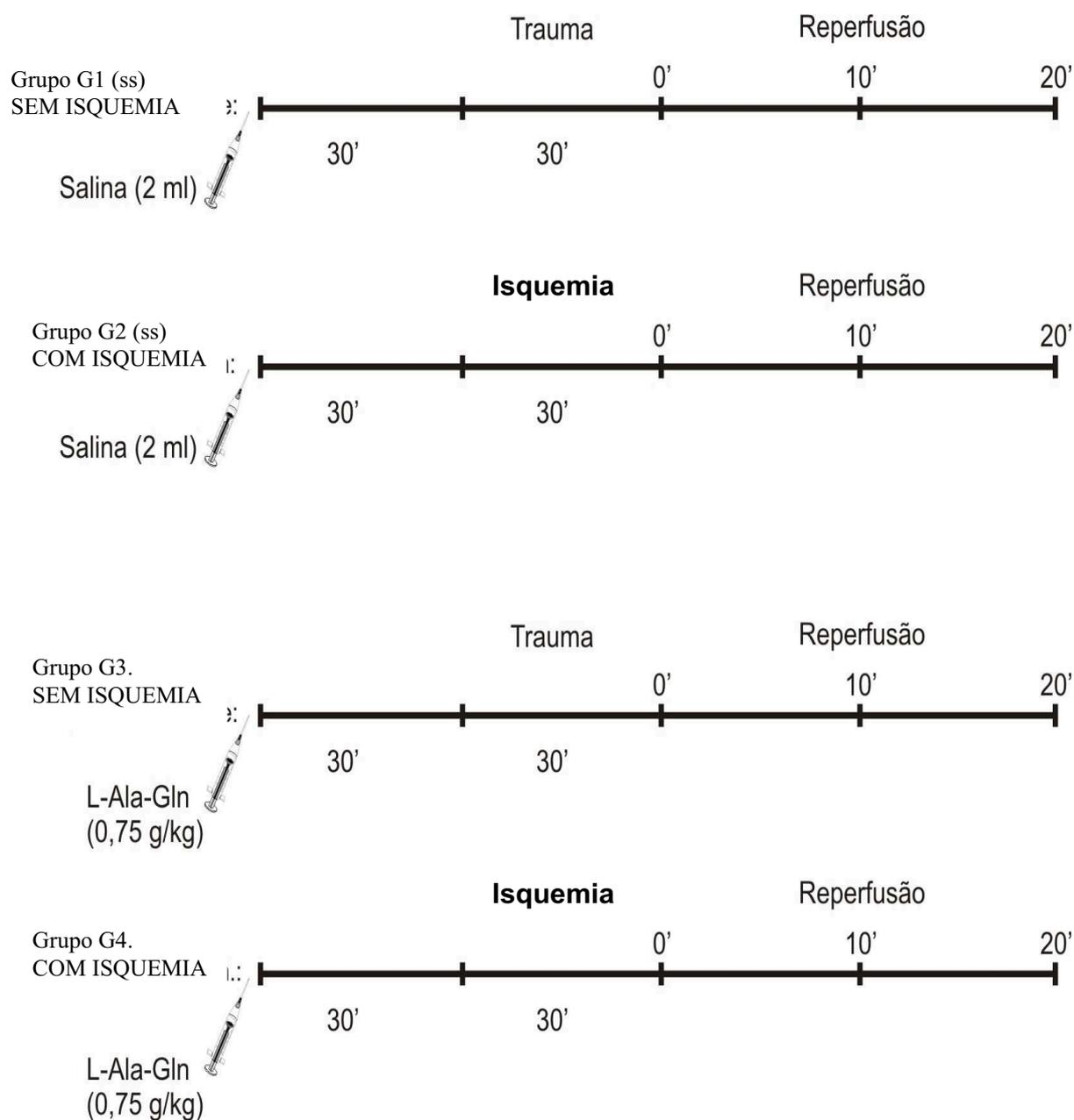
Passados 30 minutos de isquemia, retirava-se cuidadosamente a pinça buldogue da artéria aorta infradiafragmática, de imediato, o reaparecimento do fluxo arterial era verificado com o uso do fluxômetro Doppler e com os outros critérios clínicos. O tempo de reperfusão variava de acordo com cada grupo de estudo: 0, 10, 20 minutos. A seguir se realizou laminectomia, exérese da medula espinhal.

### **3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

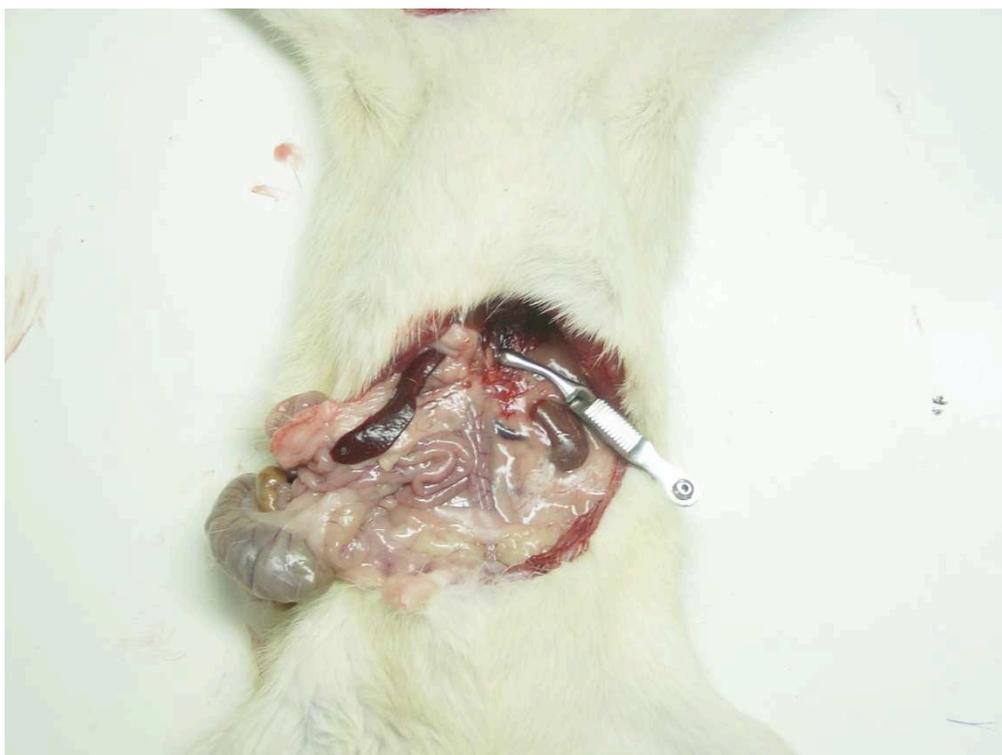
Foram estudados 72 animais distribuídos em 2 grupos: Grupo Controle (36 animais), submetidos à laparotomia, dissecação da aorta infradiafragmática, passagem de fio cirúrgico sem pinçamento do vaso. Grupo experimento (36 animais), submetidos à laparotomia, dissecação e pinçamento da aorta infradiafragmática, promovendo isquemia normotérmica por 30 minutos.

O grupo controle foi distribuído em 06 sub-grupos de 06 animais nos tempos: imediatamente 30 minutos pós-trauma 0 e subsequentemente 10 e 20 minutos. Metade dos animais foi infundido com a solução salina (0,9%) no volume de 2 ml, via veia jugular interna, meia hora antes do início do procedimento cirúrgico. Os outros três sub-grupos receberam L-Alanil-Glutamina, na dose de 0,75 g/kg de peso corporal na veia jugular interna meia hora antes do procedimento cirúrgico.

O grupo experimento (36 animais), foi distribuído em 06 sub-grupos de 06 animais e estudado nos tempos 0, 10 e 20 minutos de reperfusão. Metade dos animais foi infundido via veia jugular interna, com 2 ml de solução salina a 0,9%. Os outros 03 subgrupos receberam através da veia jugular interna L-Alanil-Glutamina na dose de 0,75 g/kg de peso meia hora antes do procedimento cirúrgico.



**FIGURA 4** - Delineamento do estudo.



**FIGURA 5** – Pinçamento da aorta infradiafragmática



**FIGURA 6** – Foto mostrando laminectomia

### 3.5 TÉCNICA LABORATORIAL

Preparação do tecido: medula espinhal e sangue.

Os fragmentos de medula espinhal, logo depois de retirados, eram imediatamente prensados e mergulhados em nitrogênio líquido a cerca de 190 graus centígrados negativos. Esta técnica baixa a temperatura tissular à aproximadamente 80 graus centígrados negativos em um tempo inferior a 0,1 segundo. O tecido da medula espinhal era então triturado e transformado em uma fina camada de pó com o auxílio de utensílios de porcelana (gral e pistilo), sempre acrescentando nitrogênio líquido para manter o tecido congelado (WILLIAMSON et al ., 1967.)

Tanto o sangue arterial como o tecido da medula espinhal em pó, eram colocados isoladamente em tubos de ensaio diferente, com capacidade de 10 ml, contendo 5 ml de ácido perclórico 0,75 M ,imersos em gelo no interior de um recipiente de isopor. A imersão neste ácido provoca inativação e precipitação rápida das proteínas que são removidas por centrifugação a 2000 rotações por minuto durante 10 minutos. Desprezando-se o precipitado, colocava-se o sobrenadante (extrato ácido) em tubos de ensaio de vidro de 10 ml, previamente pesados

Os tubos eram então novamente pesados, obtendo-se desta maneira um volume ácido. A seguir um indicador de pH universal era adicionado ao volume ácido juntamente com uma solução de hidróxido de potássio a 20% até que o pH permanecesse entre 7,0 e 8,0.

Os tubos eram então repesados e centrifugados a 2000 rotações por minuto durante 10 minutos. Novamente se transferia par outro tubo de ensaio o sobrenadante, agora extrato neutro, que foi utilizado para análise dos metabólitos por método espectrofotométrico. O piruvato e o acetoacetato foram medidos logo após a neutralização e os outros metabólitos dentro de duas semanas no máximo, as amostras, eram congeladas e mantidas a 20°C negativos.

### 3.6 DETERMINAÇÃO DOS METABÓLITOS.

Os metabólitos do sangue e do tecido, da medula espinhal foram determinados através de ensaios enzimáticos.

Os metabólitos lactato, piruvato, glicose e ATP foram estudados no sangue arterial e no tecido da medula espinhal.(ATP foi estudado somente no tecido medular).

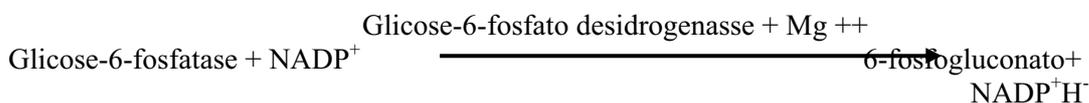
#### 3.6.1 DETERMINAÇÃO DA D-GLICOSE

A glicose foi determinada seguindo o método descrito por SLEIN (1963). Sequência da reação:

a) Reação auxiliar



b) Reação indicadora



Com o pH 7,5 o equilíbrio para reação indicadora é desviado para a direita, garantindo o término completo de ambas as reações, uma vez que a glicose-6-fosfatase, formada na reação anterior, é rapidamente usada na reação seguinte ainda que a hexoquinase catalise a fosforilação de vários outros monossacarídeos, a especificidade do ensaio consiste em a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) só reagir com a glicose-6-fosfato, não o fazendo com outras hexoses e pentoses.

Solução tampão para o ensaio:

20ml de tampão Tris 0,1 M, pH 8,0

02 ml de cloreto de magnésio 0,1 M

02 ml de ATP 0,01 M

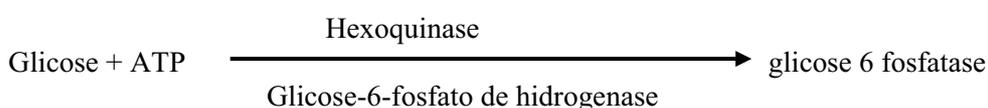
0,2 ml de NAD 1%

0,13 ml de G6 PD ( 1 mg/ml)

Esta solução foi renovada para cada ensaio. Cada cubeta tinha um volume total de 2 ml (= 0,1 da amostra neutralizada + 9 ml de água destilada + 1 ml da solução tampão). Todas as cubetas foram lidas a 340 nm, 10 e 15 minutos após adição de 0,01ml de hexoquinase.

### 3.6.2 DETERMINAÇÃO DA ADENOSINA 5' TRIFOSFATO E DA D-GLICOSE-6-FOSFATO.

A adenosina 5' trifosfato e a d-glicose 6 fosfato no sangue e no tecido foram determinadas utilizando uma combinação dos métodos descritos por (LANPRECHT; TRAUSHOOLD ; HOHORST, 1963), usando a mesma cubeta. A Hexoquinase catalisa a fosforilação da glicose com ATP, na presença de glicose 6 fosfato com a NADP. Cada mol de ATP forma 1 mol de NADPH.





Na presença de concentrações equivalentes de glicose e  $\text{Mg}^{++}$  o ATP é convertido quantitativamente pela hexoquinase em ADP. O equilíbrio da reações , pois a Glicose-6-fosfatase formada na primeira reação é rapidamente consumida na seguinte .

Solução tampão para o ensaio:

10 ml de Tris 0,1 M pH 7,4

1 mg/ml NADP (para cada 10 ml do tampão adicionar 1 ml do NADP a 1 % )

2 mg  $\text{Mg}^{++}$  0,1 M

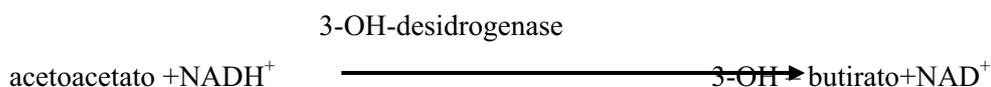
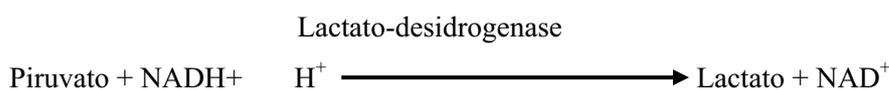
0,5 ml de glicose PA . 100%

lido em 340 nm 10 é 15'

### 3.6.3 DETERMINAÇÃO DO PIRUVATO

Como o piruvato, pode ser medido seqüencialmente na mesma amostra e na mesma cubeta, de acordo com a combinação de métodos descritos por HOHORST et al, (1959) e WILLIAM et al, (1962)

Seqüência da reação:



O equilíbrio da primeira reação em pH 7,0 é suficientemente desviado para a direita, o que garante uma medida quantitativa dos níveis de piruvato, desde que a concentração de NAD não seja inferior a 0,01mM. Com o mesmo pH e com excesso de NADH compatível, pelo menos 98% do acetoacetato é reduzido para 3-hidroxibutirato. Devido a baixa atividade da preparação de 3-hidroxibutirato desidrogenasse, a Segunda reação ocorre com uma velocidade inferior à primeira.

Solução tampão para ensaio:

10 ml de fosfato de potássio a 0,1 M, pH 6,9

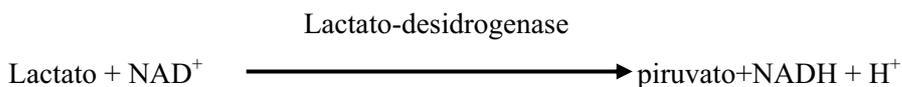
0,1 ml de NAD 0,5 %.

Para cada ensaio foi preparada uma solução fresca. O volume total em cada cubeta constou de 2 ml (1ml de ácido perclórico+1 ml de solução tampão). A cubeta para controle continha igualmente 2 ml (1 ml de água destilada e 1ml da solução tampão do ensaio). A leitura de cada cubeta no espectrofotômetro ocorreu antes e após 10 (dez) minutos da adição de 0,01 ml de lactato-desidrogenase a 340 nm. A seguir, adicionou-se 0,01 ml de 3-hidroxiacetato-desidrogenase em cada cubeta, as quais foram lidas novamente após 35 e 45 minutos.

### 3.6.4 DETERMINAÇÃO DO L-(+)- LACTATO.

As concentrações de lactato foram determinadas no tecido da medula espinhal e sangue conforme o método de HOHORST (1963).

Seqüência da reação:



O equilíbrio da reação ocorre no lado do lactato e  $\text{NAD}^+$ . Contudo, para garantir a completa conversão do lactato, devem ser removidos os produtos da reação. Por intermédio de uma reação alcalina são aprisionados prótons; o piruvato reage com hidrato de hidrazina na solução tampão formando piruvato de hidrazona e, além disto, usa-se um grande excesso de  $\text{NAD}^+$  e enzima para se obter rapidamente um ponto final da reação. Como a lactato-desidrogenase reage somente com o L-(+)-lactato. Tal fato confere especificidade para o ensaio:

Solução tampão para o ensaio:

40 ml de Tris 0,2 M

05 ml de hidrato de hidrazina 100%

25 mg de EDTA

Água destilada até completar 100 ml

O pH da solução foi ajustado com ácido hidrocloreto 5 M para 9,5. Esta solução pode ser estocada a 4 graus centígrados por até duas semanas. No início do ensaio, 1ml de  $\text{NAD}^+$  1 % foi adicionado a cada 10 ml de solução tampão. Em cada cubeta, o volume total foi de 2 ml (0,2 ml da amostra neutralizada + 0,8 ml de água destilada + 1 ml de solução tampão contendo  $\text{NAD}^+$  + 1%).

Todas as cubetas foram lidas a 340 nm antes e 35 a 45 minutos após adição de 0,02 ml de lactato-desidrogenase.

### 3.7 CÁLCULO DOS METABÓLITOS

Todos os cálculos dos metabólitos se baseiam nas alterações da densidade óptica, medidas a 340 nm nas amostras das cubetas, seguidas após adição da enzima e subtraídas das mudanças inespecíficas que podem ocorrer nas cubetas de controle.

Portanto: A diferença da densidade óptica (DDO) = (alteração da absorbância da amostra na cubeta) – (alteração na absorbância na cubeta controle).

Uma vez que o coeficiente molar da extinção NADH é de 6,22 cm<sup>2</sup>/μmol, a quantidade de substrato na cubeta é igual a (DDO/6,22) X volume total da cubeta. Este resultado é então multiplicado por um fator de diluição para cada amostra, resultando na concentração do substrato

Micromol do metabólito/ml de sangue ou grama de medula espinhal (peso de sangue ou medula espinhal + HClO<sub>4</sub>/peso de sangue ou medula espinhal) x peso extrato neutro/peso extrato ácido) x (volume total da cubeta / volume extrato neutro na cubeta) x (DDO/6,22)

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados deste estudo experimental foram expressos como média ± E.P.M. (Erro padrão de Média), acompanhando-se pelo número de observações (n). A significância estatística foi calculada conforme os testes não paramétricos Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, e teste de Dunn, através do programa Prism® para Windows, produzido pela Minitab INC; e Kruskal-wallis, teste de Dunn. O nível de significância estabelecido foi de p < 0,05 (SNEDECOR e COCHRAN, 1967; LEHMANN e D'ABRERA, 1975).

## 4 Resultados

### 4.1 Efeitos metabólicos do trauma operatório

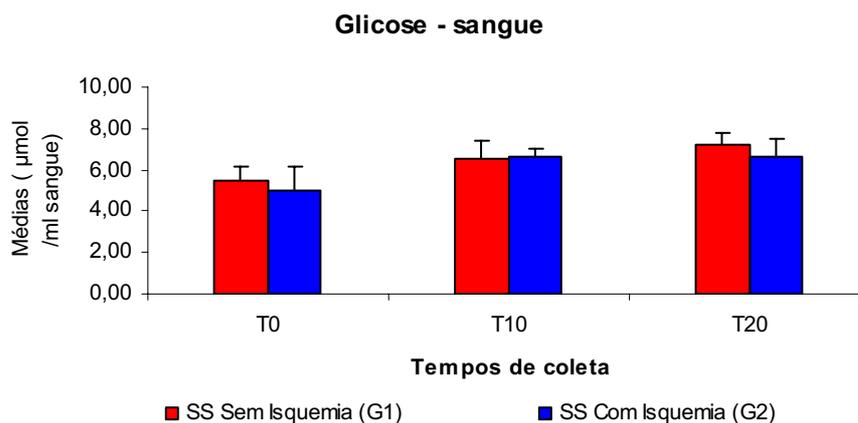
Não se observaram diferenças significantes nas concentrações dos metabólitos estudados (glicose, piruvato e lactato) no sangue dos animais, quando se compararam os grupos G-1 e G-2, constituídos por ratos pré-tratados com solução salina e submetidos ao trauma cirúrgico sem e com isquemia medular, respectivamente (Tabela 1, Figuras 7, 8 e 9).

#### 4.1.1 No sangue

**Tabela 1** – Concentrações médias de glicose, piruvato e lactato ( $\mu\text{mol/ml}$ ) no sangue de ratos pré-tratados com solução salina (SS) e submetidos ao trauma operatório (G1) ou ao trauma operatório + isquemia medular (G2), nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão

Metabólito	Grupo	Tempo de reperfusão (min)		
		0	10	20
Glicose	G1- (SS Sem Isquemia)	5,50 $\pm$ 0,70	6,58 $\pm$ 0,82	7,20 $\pm$ 0,55
	G2 - SS Com Isquemia)	4,96 $\pm$ 1,23	6,64 $\pm$ 0,38	6,67 $\pm$ 0,85
Piruvato	G1- (SS Sem Isquemia)	0,07 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,01
	G2 - SS Com Isquemia)	0,05 $\pm$ 0,09	0,08 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01
Lactato	G1- (SS Sem Isquemia)	3,51 $\pm$ 0,27	6,07 $\pm$ 1,26	5,72 $\pm$ 0,82
	G2 - SS Com Isquemia)	6,05 $\pm$ 0,87	9,31 $\pm$ 0,51	8,24 $\pm$ 1,36

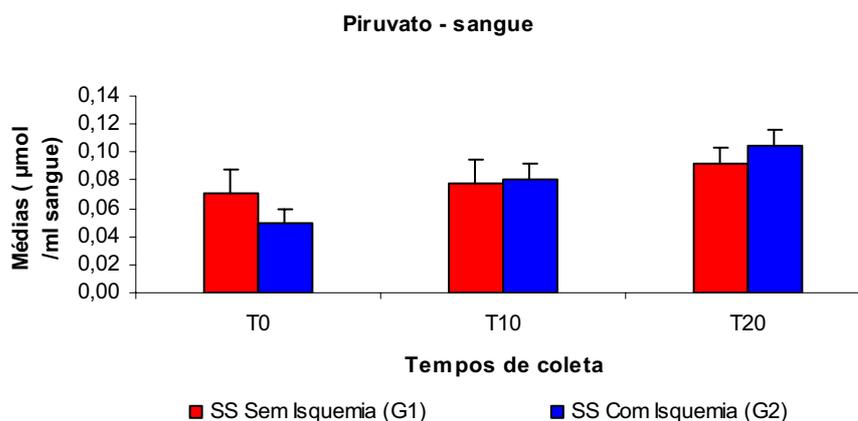
Dados não significantes. Testes “t” de Student (piruvato) e Mann-Whitney (glicose e lactato)



Dados não significantes

Teste de Mann-Whitney

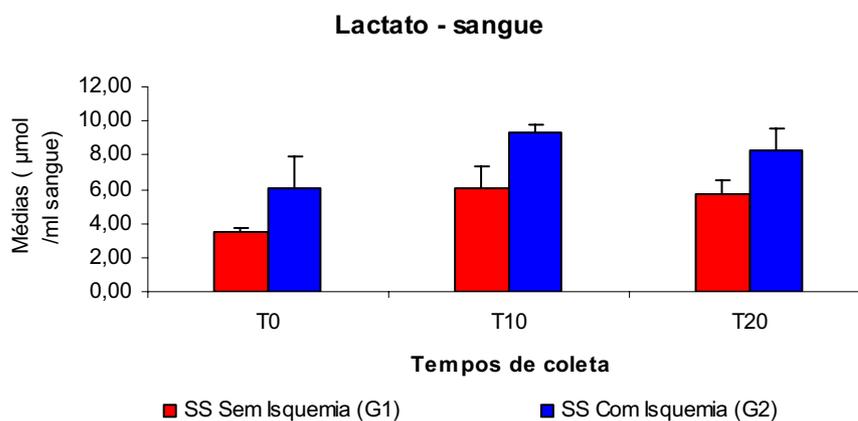
**Figura 7** - Concentrações médias de **glicose** ( $\mu\text{mol/ml}$ ) no sangue dos ratos pré-tratados com solução salina (SS) e submetidos ao trauma operatório (G1) ou ao trauma operatório + isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão



Dados não significantes

Teste “t” de Student

**Figura 8** - Concentrações médias de **piruvato** ( $\mu\text{mol/ml}$ ) no sangue dos ratos pré-tratados com solução salina (SS) e submetidos ao trauma operatório (G1) ou ao trauma operatório + isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão



Dados não significantes.

Teste de Mann-Whitney

**Figura 9** - Concentrações médias de **lactato** ( $\mu\text{mol/ml}$ ) no sangue dos ratos pré-tratados com solução salina (SS) e submetidos ao trauma operatório (G1) ou ao trauma operatório + isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão

#### 4.1.2 No tecido medular

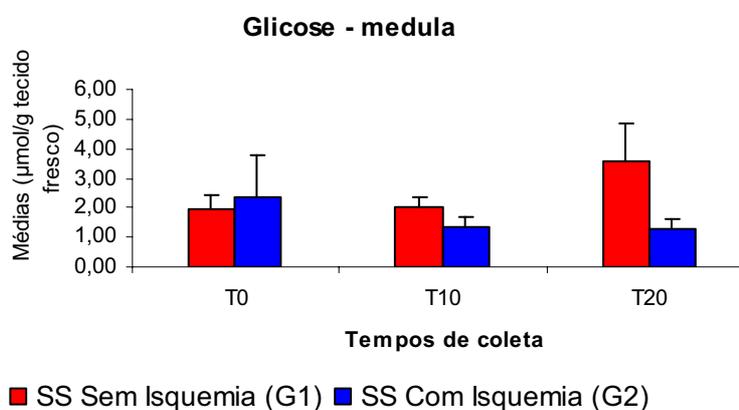
Não se observaram diferenças significantes nas concentrações dos metabólitos estudados (glicose, lactato e ATP) na medula dos animais, quando se compararam os grupos G-1 e G-2, constituídos por ratos pré-tratados com solução salina e submetidos ao trauma cirúrgico sem e com isquemia medular, respectivamente (Tabela 1). Houve redução significativa nas concentrações de piruvato no grupo G2, comparado ao grupo G1, após 20 minutos de perfusão.

**Tabela 2** – Concentrações médias de glicose, piruvato, lactato e ATP ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinal de ratos pré-tratados com solução salina (SS) e submetidos ao trauma operatório (G1) ou ao trauma operatório + isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperusão

Metabólito	Grupo	Tempo de reperusão (min)		
		0	10	20
Glicose	G1- (SS Sem Isquemia)	1,95 $\pm$ 0,45	2,00 $\pm$ 0,32	3,54 $\pm$ 1,34
	G2 - SS Com Isquemia)	2,36 $\pm$ 1,41	1,36 $\pm$ 0,31	1,29 $\pm$ 0,32
Piruvato	G1- (SS Sem Isquemia)	0,12 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,02
	G2 - SS Com Isquemia)	0,07 $\pm$ 0,03	0,09 $\pm$ 0,04	0,05 $\pm$ 0,00 **
Lactato	G1- (SS Sem Isquemia)	10,3 $\pm$ 1,59	6,50 $\pm$ 0,75	6,72 $\pm$ 1,27
	G2 - SS Com Isquemia)	7,10 $\pm$ 2,19	11,50 $\pm$ 2,50	8,03 $\pm$ 0,91
ATP	G1- (SS Sem Isquemia)	0,17 $\pm$ 0,05	0,17 $\pm$ 0,08	0,08 $\pm$ 0,01
	G2 - SS Com Isquemia)	0,27 $\pm$ 0,06	0,13 $\pm$ 0,04	0,07 $\pm$ 0,03

Testes: “t” de Student (Lactato e ATP) e Mann-Whitney (Glicose e Piruvato)

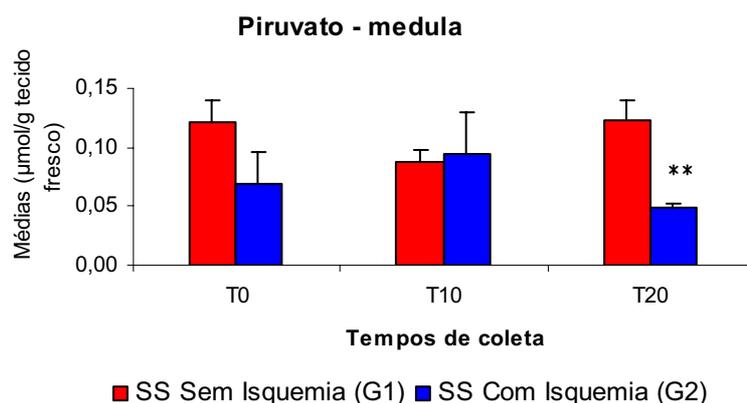
\*\*  $p < 0,01$  comparado ao respectivo controle



Dados não significantes

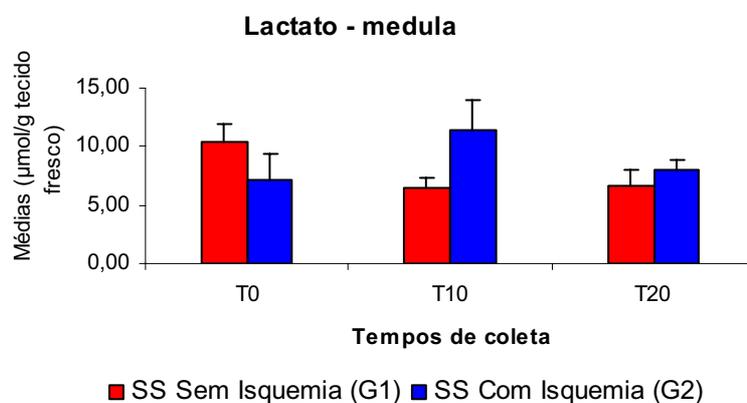
Teste de Mann-Whitney

**Figura 10** - Concentrações médias de **glicose** ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinal de ratos pré-tratados com solução salina (SS) e submetidos ao trauma operatório (G1) ou ao trauma operatório + isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperusão



\*\*  $p < 0,01$  comparado ao respectivo controle      Teste de Mann-Whitney

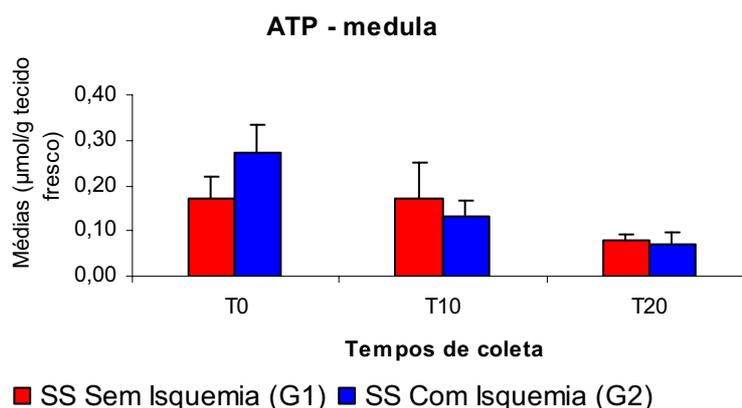
**Figura 11** - Concentrações médias de **piruvato** ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinhal de ratos pré-tratados com solução salina (SS) e submetidos ao trauma operatório (G1) ou ao trauma operatório + isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão



Dados não significantes

Teste “t” de Student

**Figura 12** - Concentrações médias de **lactato** ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinhal de ratos pré-tratados com solução salina (SS) e submetidos ao trauma operatório (G1) ou ao trauma operatório + isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão



Dados não significantes

Teste “t” de Student

**Figura 13** - Concentrações médias de ATP ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinhal de ratos pré-tratados com solução salina (SS) e submetidos ao trauma operatório (G1) ou ao trauma operatório + isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão

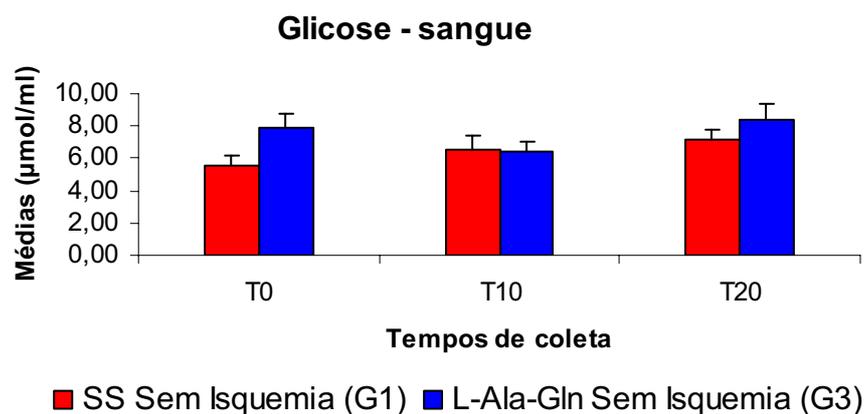
## 4.2 Efeitos metabólicos da oferta de L-Ala-Gln sobre o trauma operatório

### 4.2.1 No sangue

Não se observaram diferenças significantes nas concentrações dos metabólitos estudados (glicose, piruvato e lactato) no sangue dos animais, quando se compararam os grupos G-1 e G-3, constituídos por ratos pré-tratados com solução salina ou L-Ala-Gln, respectivamente, e submetidos ao trauma cirúrgico sem isquemia medular, (Tabela 3, Figuras 14, 15 e 16).

**Tabela 3** – Concentrações médias de glicose, piruvato e lactato ( $\mu\text{mol/ml}$ ) no sangue de ratos pré-tratados com solução salina (SS) (G1) ou L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) (G3) e submetidos ao trauma operatório sem isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão

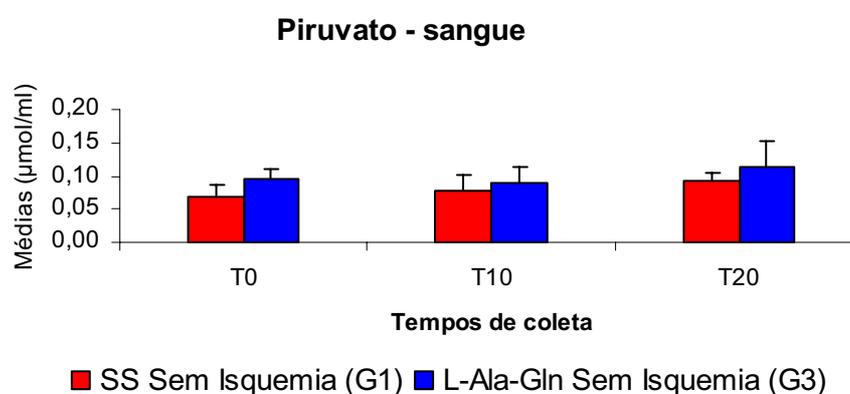
Metabólito	Grupo	Tempo de reperfusão (min)		
		0	10	20
<b>Glicose</b>	G1- (SS Sem Isquemia)	5,50 $\pm$ 0,70	6,58 $\pm$ 0,92	7,20 $\pm$ 0,56
	G3 – L-Ala-Gln Sem Isquemia	7,85 $\pm$ 0,89	6,44 $\pm$ 0,63	8,45 $\pm$ 0,97
<b>Piruvato</b>	G1- (SS Sem Isquemia)	0,07 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,01
	G3 – L-Ala-Gln Sem Isquemia	0,10 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,04
<b>Lactato</b>	G1- (SS Sem Isquemia)	3,51 $\pm$ 0,03	6,01 $\pm$ 1,27	5,72 $\pm$ 0,83
	G3 – L-Ala-Gln Sem Isquemia	6,15 $\pm$ 1,12	5,40 $\pm$ 0,55	4,65 $\pm$ 1,48
Dados não significantes		Teste de Mann-Whitney (Glicose e Lactato) e Teste “t” de Student (Piruvato)		



Teste de Mann-Whitney

Dados não significantes

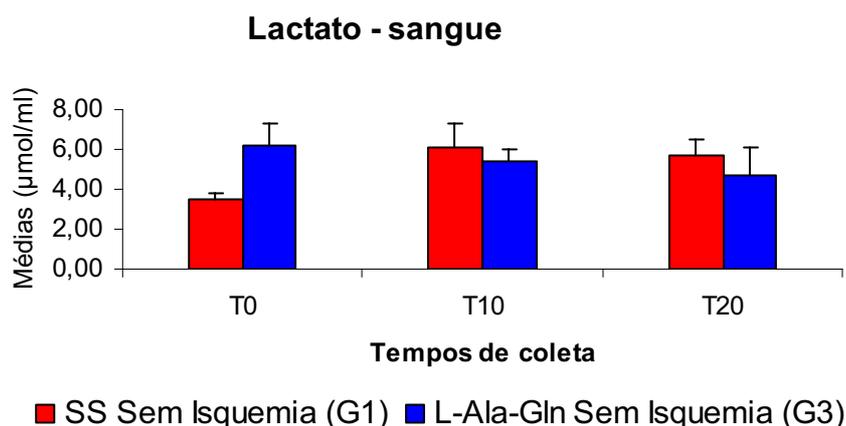
**Figura 14** - Concentrações médias de **glicose** ( $\mu\text{mol/ml}$ ) no sangue de ratos pré-tratados com solução salina (SS) (G1) ou L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) (G3) e submetidos ao trauma operatório sem isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão



Teste "t" de Student (

Dados não significantes

**Figura 15** - Concentrações médias de **piruvato** ( $\mu\text{mol/ml}$ ) no sangue de ratos pré-tratados com solução salina (SS) (G1) ou L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) (G3) e submetidos ao trauma operatório sem isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão



Teste de Mann-Whitney

Dados não significantes

**Figura 16** - Concentrações médias de **lactato** ( $\mu\text{mol/ml}$ ) no sangue de ratos pré-tratados com solução salina (SS) (G1) ou L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) (G3) e submetidos ao trauma operatório sem isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão

#### 4.2.2 No tecido medular

Não se observaram diferenças significantes nas concentrações dos metabólitos estudados (glicose e lactato) na medula dos animais, quando se compararam os grupos G-1 e G-3, constituídos por ratos pré-tratados com solução salina ou L-Ala-Gln, respectivamente, e submetidos ao trauma cirúrgico sem isquemia medular. Houve redução significativa nas concentrações de piruvato após 20 minutos de perfusão e na concentração de ATP, ao término da isquemia (T0), no grupo G3, comparado ao grupo G1 (Tabela 4, Figuras 17, 18, 19, 20).

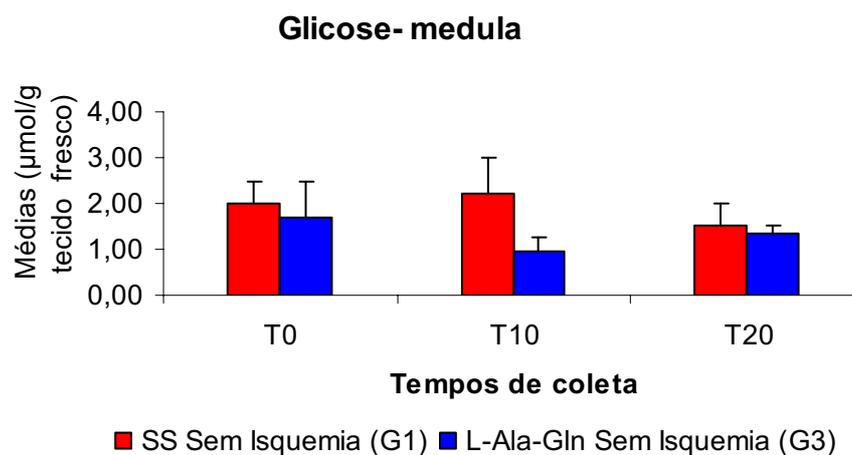
**Tabela 4** – Concentrações médias de glicose, piruvato, lactato e ATP ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinhal de ratos pré-tratados com solução salina (SS) (G1) ou L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) (G3) e submetidos ao trauma operatório sem isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão

Metabólito	Grupo	Tempo de reperfusão (min)		
		0	10	20
Glicose	G1- (SS Sem Isquemia)	1,95 $\pm$ 0,45	2,00 $\pm$ 0,32	3,54 $\pm$ 1,34
	G3 – L-Ala-Gln Sem Isquemia	2,00 $\pm$ 0,49	2,22 $\pm$ 0,80	1,52 $\pm$ 0,48
Piruvato	G1- (SS Sem Isquemia)	0,12 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,02
	G3 – L-Ala-Gln Sem Isquemia	0,07 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,01 **
Lactato	G1- (SS Sem Isquemia)	10,3 $\pm$ 1,58	6,50 $\pm$ 0,75	6,72 $\pm$ 1,26
	G3 – L-Ala-Gln Sem Isquemia	6,35 $\pm$ 1,14	4,33 $\pm$ 0,94	3,84 $\pm$ 0,99
ATP	G1- (SS Sem Isquemia)	0,17 $\pm$ 0,05	0,17 $\pm$ 0,08	0,08 $\pm$ 0,01
	G3 – L-Ala-Gln Sem Isquemia	0,06 $\pm$ 0,02 *	0,19 $\pm$ 0,09	0,17 $\pm$ 0,07

\*  $p < 0,05$  comparado ao respectivo controle

\*\*  $p < 0,01$  comparado ao respectivo controle

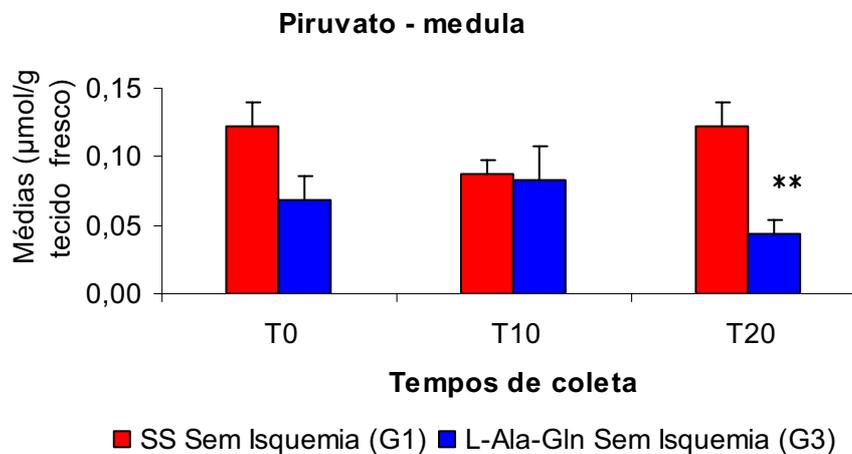
Teste “t” de Student



Dados não significantes

Teste “t” de Student

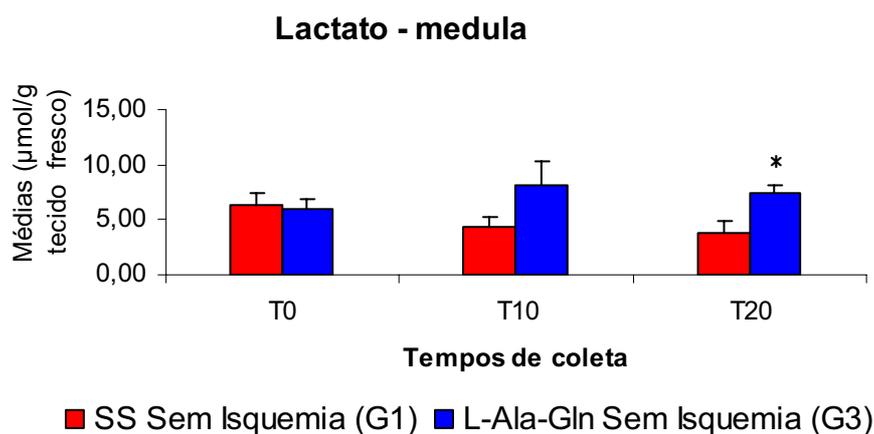
**Figura 17** - Concentrações médias de **glicose** ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinhal de ratos pré-tratados com solução salina (SS) (G1) ou L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) (G3) e submetidos ao trauma operatório sem isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperusão



\*\*  $p < 0,01$  comparado ao respectivo controle

Teste “t” de Student

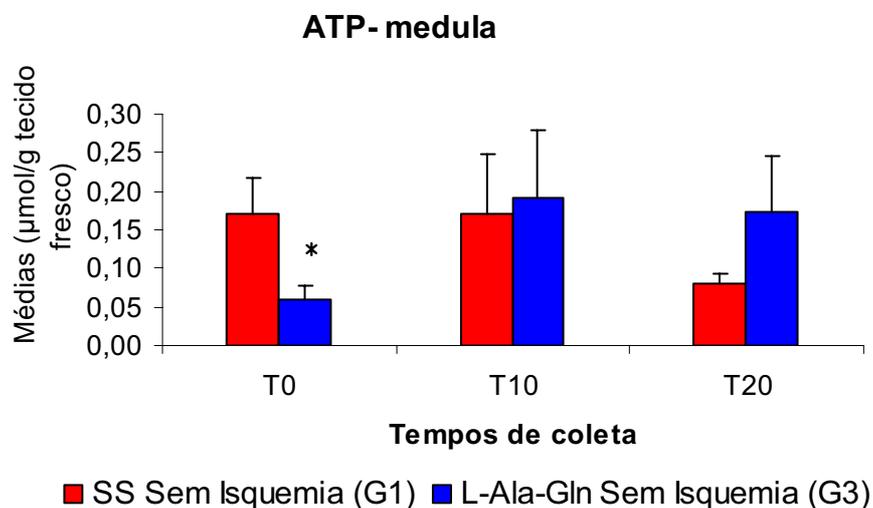
**Figura 18** - Concentrações médias de **piruvato** ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinhal de ratos pré-tratados com solução salina (SS) (G1) ou L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) (G3) e submetidos ao trauma operatório sem isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperusão



Dados não significantes

Teste “t” de Student

**Figura 19** - Concentrações médias de **lactato** ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinal de ratos pré-tratados com solução salina (SS) (G1) ou L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) (G3) e submetidos ao trauma operatorio sem isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão



\*  $p < 0,05$  comparado ao respectivo controle

Teste “t” de Student

**Figura 20** - Concentrações médias de **ATP** ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinal de ratos pré-tratados com solução salina (SS) (G1) ou L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) (G3) e submetidos ao trauma operatorio sem isquemia medular, nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão

#### 4.3 Efeitos metabólicos da oferta de L-Ala-Gln sobre isquemia / reperfusão da medula espinal

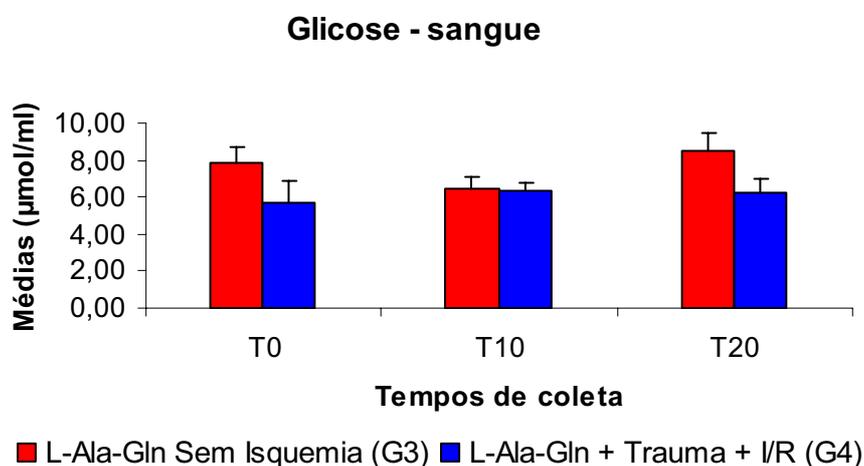
### 4.3.1 No sangue

Não se observaram diferenças significantes nas concentrações dos metabólitos estudados (glicose e piruvato) no sangue dos animais, quando se compararam os grupos G-3 e G-4, constituídos por ratos pré-tratados com L-Ala-Gln, e submetidos ao trauma cirúrgico sem e com isquemia medular, respectivamente. Por outro lado, houve aumento significativo da concentração de lactato, ao término da isquemia (T0) e após 10 minutos de reperfusão, no Grupo G4, comparado ao grupo G3 (Tabela 5, Figuras 21, 22 e 23).

**Tabela 5** – Concentrações médias de glicose, piruvato e lactato ( $\mu\text{mol/ml}$ ) no sangue de ratos pré-tratados com L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) e submetidos ao trauma operatório (G3) ou ao trauma operatório + isquemia medular (G4), nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão

Metabólito	Grupo	Tempo de reperfusão (min)		
		0	10	20
Glicose	G3 – L-Ala-Gln Sem Isquemia	$7,85 \pm 0,89$	$6,44 \pm 0,63$	$8,45 \pm 0,97$
	G4 – L-Ala-Gln + Trauma + I/R	$5,66 \pm 1,23$	$6,33 \pm 0,50$	$8,18 \pm 0,79$
Piruvato	G3 – L-Ala-Gln Sem Isquemia	$0,10 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,04$
	G4 – L-Ala-Gln + Trauma + I/R	$0,10 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$
Lactato	G3 – L-Ala-Gln Sem Isquemia	$6,15 \pm 1,12$	$5,40 \pm 0,55$	$4,65 \pm 1,48$
	G4 – L-Ala-Gln + Trauma + I/R	$9,51 \pm 0,64$ *	$8,70 \pm 0,51$ **	$7,59 \pm 1,19$

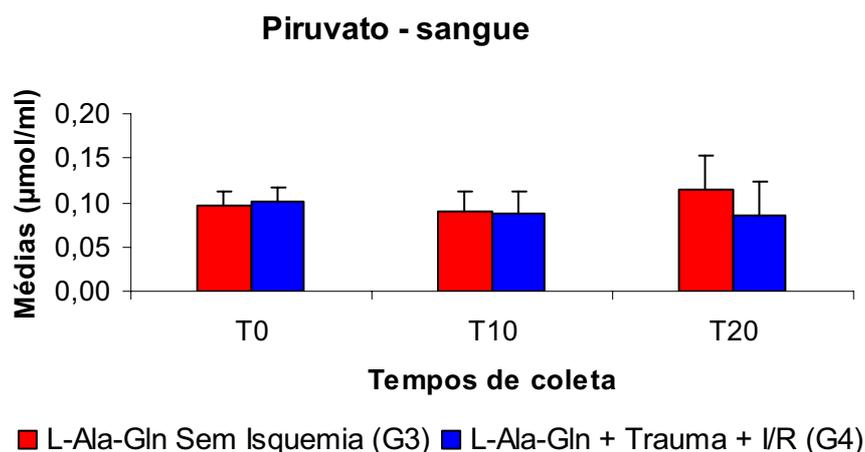
Testes “t” de Student (Glicose e Lactato) e Mann-Whitney (Piruvato) \*  $p < 0,05$  comparado ao respectivo controle \*\*  $p < 0,01$  comparado ao respectivo controle



Teste “t” de Student

Dados não significantes

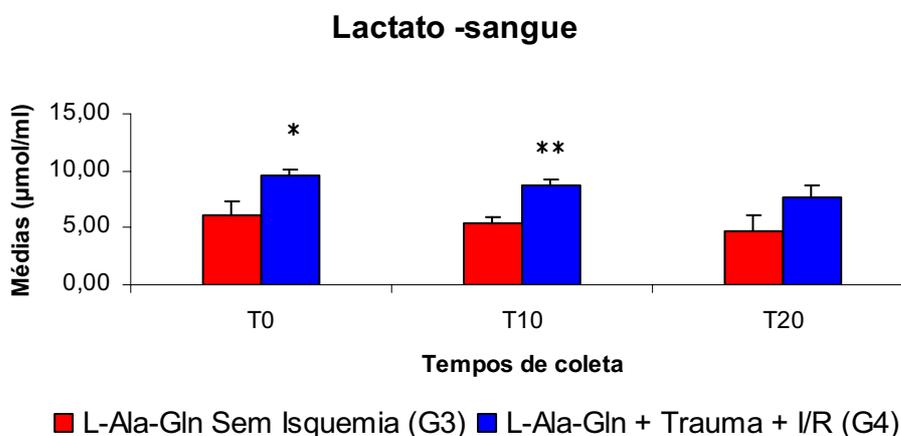
**Figura 21** - Concentrações médias de **glicose** ( $\mu\text{mol/ml}$ ) no sangue de ratos pré-tratados com L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) e submetidos ao trauma operatório (G3) ou ao trauma operatório + isquemia medular (G4), nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão



Teste de Mann-Whitney

Dados não significantes

**Figura 22** - Concentrações médias de **piruvato** ( $\mu\text{mol/ml}$ ) no sangue de ratos pré-tratados com L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) e submetidos ao trauma operatório (G3) ou ao trauma operatório + isquemia medular (G4), nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão



Teste “t” de Student

\*  $p < 0,05$  comparado ao respectivo controle

\*\*  $p < 0,01$  comparado ao respectivo controle

**Figura 23** - Concentrações médias de **lactato** ( $\mu\text{mol/ml}$ ) no sangue de ratos pré-tratados com L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) e submetidos ao trauma operatório (G3) ou ao trauma operatório + isquemia medular (G4), nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão

#### 4.3.2 No tecido medular

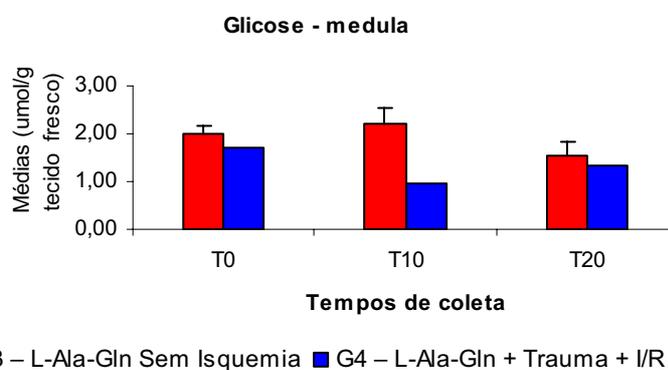
Observou-se aumento significativa da concentração de lactato 20 minutos após o início da reperfusão (T20) nos ratos do grupo G-4, pré-tratados com L-alanil-glutamina e submetidos ao trauma

operatório + isquemia/reperfusão, comparados ao grupo G-3, constituído por ratos também pré-tratados com L-alanil-glutamina e submetidos apenas ao trauma operatório. Não se observaram diferenças significantes nas concentrações de piruvato, glicose e ATP em nenhum dos tempos estudados (Tabela 6, Figuras 24, 25, 26 e 27)

Tabela 6 – Concentrações médias de glicose, piruvato, lactado e ATP ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinhal de ratos pré-tratados com L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) e submetidos ao trauma operatório (G3) ou ao trauma operatório + isquemia medular (G4), nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão

Metabólito	Grupo	Tempo de reperfusão (min)		
		0	10	20
Glicose	G3 – L-Ala-Gln Sem Isquemia	2,00 $\pm$ 0,49	2,22 $\pm$ 0,80	1,52 $\pm$ 0,48
	G4 – L-Ala-Gln + Trauma + I/R	1,72 $\pm$ 0,76	0,97 $\pm$ 0,27	1,33 $\pm$ 0,20
Piruvato	G3 – L-Ala-Gln Sem Isquemia	0,07 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,01
	G4 – L-Ala-Gln + Trauma + I/R	0,05 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,03	0,05 $\pm$ 0,01
Lactato	G3 – L-Ala-Gln Sem Isquemia	6,35 $\pm$ 1,14	4,33 $\pm$ 0,94	3,84 $\pm$ 0,99
	G4 – L-Ala-Gln + Trauma + I/R	5,98 $\pm$ 0,87	8,08 $\pm$ 2,14	7,43 $\pm$ 0,70 *
ATP	G3 – L-Ala-Gln Sem Isquemia	0,06 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,09	0,17 $\pm$ 0,07
	G4 – L-Ala-Gln + Trauma + I/R	0,16 $\pm$ 0,08	0,16 $\pm$ 0,07	0,12 $\pm$ 0,01

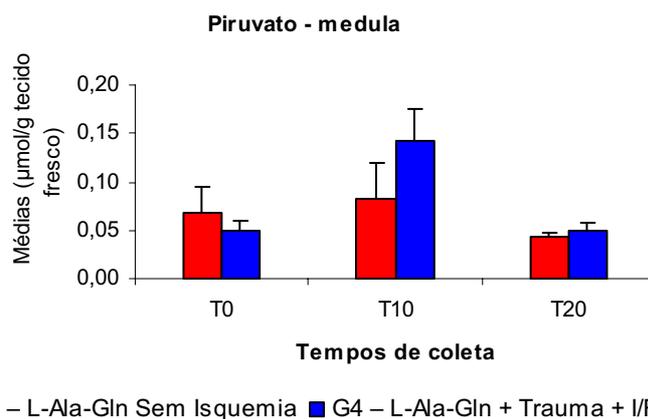
Testes “t” de Student (Glicose, Piruvato e Lactato) \*  $p < 0,05$  comparado ao respectivo controle e Mann-Whitney (ATP)



Dados não significantes

Teste de “t” de Student

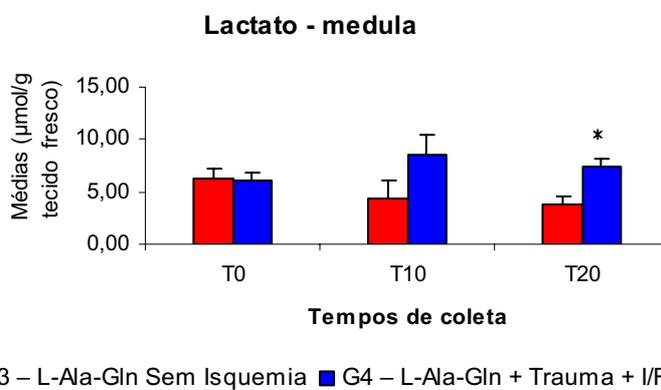
**Figura 24-** Concentrações médias de **glicose** ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinhal de ratos pré-tratados com L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) e submetidos ao trauma operatório (G3) ou ao trauma operatório + isquemia medular (G4), nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão



Dados não significantes

Teste de “t” de Student

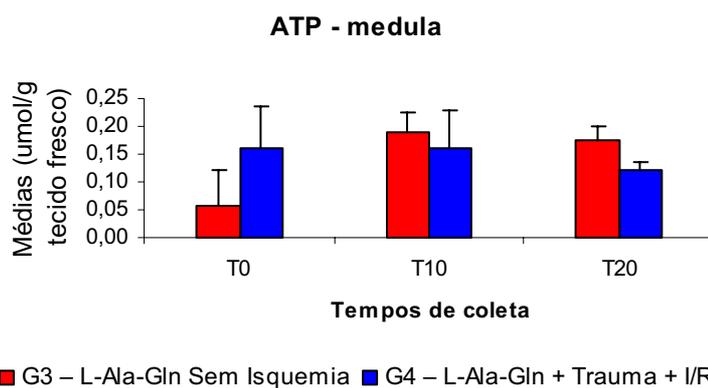
**Figura 25** - Concentrações médias de **piruvato** ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinhal de ratos pré-tratados com L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) e submetidos ao trauma operatório (G3) ou ao trauma operatório + isquemia medular (G4), nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão



\*  $p < 0,05$  comparado ao controle

Teste de “t” de Student

**Figura 26** - Concentrações médias de **lactato** ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinhal de ratos pré-tratados com L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) e submetidos ao trauma operatório (G3) ou ao trauma operatório + isquemia medular (G4), nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão



Dados não significantes

Teste de Mann-Whitney

**Figura 27** - Concentrações médias de ATP ( $\mu\text{mol/g}$ ) na medula espinhal de ratos pré-tratados com L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) e submetidos ao trauma operatório (G3) ou ao trauma operatório + isquemia medular (G4), nos três tempos do estudo: ao término da isquemia (tempo 0) e 10/20 minutos após o início da reperfusão

## 5 DISCUSSÃO

O rato foi o animal de experimentação escolhido para esse estudo, por tratar-se de um mamífero de baixo custo de aquisição e manutenção e apresentar elevada resistência à infecção e ao trauma cirúrgico (FESTING, 1979). A anatomia vascular do homem e do rato são similares com relação ao suprimento sanguíneo para a medula espinhal. Segundo Lang-Lazdunski et al. (2000), o modelo experimental, utilizando ratos, é adequado para o estudo da isquemia medular. No presente estudo utilizou-se o pinçamento infra-diafragmático da aorta abdominal para a obtenção de uma isquemia medular aguda e normotérmica. A duração da isquemia foi de 30 minutos. A técnica usada para produção da isquemia da medula espinhal no presente estudo é uma variação do modelo descrito por Sader et al. (1998) e desenvolvido no Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia, Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade São Paulo (USP). Esse modelo produzia uma isquemia acentuada que resultava em paraplegia (90-100%) dos animais, após 30 minutos de pinçamento da aorta torácica.

O éter dietílico foi o anestésico utilizado pela facilidade de uso com um mínimo de equipamento, apesar de suas conhecidas desvantagens: indução de salivação excessiva e irritação do epitélio respiratório. Os procedimentos foram de curta duração o que minimizou as complicações.

As lesões teciduais e celulares provocadas pela isquemia/reperfusão têm sido amplamente estudadas, principalmente em modelos experimentais. A literatura médica é abundante em estudos que buscam substâncias capazes de impedir ou minimizar as lesões da isquemia/reperfusão. Neste estudo, foram discutidas as alterações nas concentrações de metabólitos no sangue (glicose, piruvato e lactato) e nos tecidos da medula espinhal (glicose, piruvato, lactato e ATP) em ratos submetidos ao trauma cirúrgico e pré-tratados com solução salina ou L-Ala-Gln. Também foram estudadas as alterações das concentrações dos mesmos metabólitos em ratos submetidos ao trauma cirúrgico agravado pela isquemia da medula espinhal e pré-tratados com solução salina ou L-Ala-Gln.

Os resultados dos estudos experimentais da isquemia/reperfusão da medula espinhal podem ser avaliados por parâmetros clínicos, eletrofisiológicos, estudos morfológicos, estudos bioquímicos e enzimáticos. No presente estudo foram aferidas as concentrações de quatro metabólitos (glicose, piruvato, lactato e ATP) para avaliação dos efeitos do trauma operatório e da isquemia/reperfusão da medula espinhal sobre os parâmetros bioquímicos no sangue e no tecido medular de ratos Wistar.

Para avaliação dos efeitos metabólicos do trauma operatório, compararam-se as concentrações de metabólitos no sangue e na medula dos ratos pré-tratados apenas com solução salina e submetidos

ao trauma cirúrgico (G1) com o grupo de ratos submetidos à isquemia medular (G2). O pinçamento infra-diafragmático da aorta abdominal por 30 minutos não induziu alterações significativas nas concentrações de glicose, piruvato ou lactato, no sangue desses animais. Também não se observaram alterações nas concentrações de glicose, lactato e ATP na medula espinhal, embora os níveis de piruvato na medula tenham sido reduzidos após 20 minutos de reperfusão. Aparentemente a isquemia induzida pelo pinçamento aórtico não foi eficaz para determinar as alterações metabólicas observadas na isquemia/ reperfusão de órgãos ou tecidos. É possível que esse resultado se deva a uma irrigação anômala da medula espinhal, que impediu o estabelecimento de uma isquemia prolongada. Sabe-se que o pinçamento infra-renal da aorta raramente causa paralisia em humanos pela presença da artéria de Adamkiewicz, que nasce, na maioria dos casos, acima das artérias renais e é o vaso mais importante na formação da artéria espinhal anterior, responsável pela irrigação de 2/3 da circunferência anterior da medula (LANG-LAZDUNSKI et al., 2000). Ainda segundo esse pesquisadores, o pinçamento da artéria mamária interna esquerda é importante para assegurar-se uma isquemia adequada da medula espinhal.

O piruvato é o produto final da via glicolítica e desempenha um papel central importante no metabolismo dos carboidratos e lipídios. No citosol, independentemente da presença de oxigênio, ocorrem uma série de reações, que convertem um mol de glicose em dois moles de piruvato, produzindo-se dois moles de ATP (LEHNINGER, NELSON, COX, 2000). Nas mitocôndrias, a metabolização enzimática do piruvato necessita da presença de oxigênio. A enzima piruvato desidrogenase catalisa a descarboxilação do piruvato a acetil CoA, que logo é oxidada, através do ciclo tricarbóxico, a dióxido de carbono e água (GREKIN, 1988). Neste estudo, a diminuição dos níveis de piruvato, durante a reperfusão pode ser consequência de uma maior conversão desse metabólito em acetil CoA, diante da oferta de oxigênio decorrente da reperfusão.

Por outro lado, quando um tecido deixa de receber um influxo adequado de oxigênio, a fosforilação oxidativa mitocondrial é inibida, resultando na diminuição dos níveis de ATP. Na tentativa de restaurar os níveis de ATP, há ativação da glicólise anaeróbica com depleção das reservas de glicogênio hepático. Simultaneamente, há elevação no lactato no citosol, com redução do pH intracelular. Neste estudo, os níveis de ATP, comparando-se os animais submetidos à isquemia/reperfusão (G2) com os ratos submetidos ao trauma cirúrgico, sem isquemia (G1), não foram diferentes, do ponto de vista estatístico. Como não foram observadas diferenças significantes nas concentrações dos metabólitos estudados, pode-se admitir que não houve uma isquemia medular completa, neste estudo, o que impediu o aparecimento de alterações metabólicas detectáveis.

Para a avaliação dos efeitos metabólicos da oferta de L-Ala-Gln sobre o trauma operatório, foram comparados os animais do grupo G1 (trauma cirúrgico+solução salina) e G3 (trauma cirúrgico+L-Ala-Gln). Mais uma vez não foram encontradas diferenças significantes das concentrações de metabólitos (glicose, piruvato e lactato) no sangue e de glicose e lactato na medula desses animais. Entretanto, a análise dos dados obtidos na aferição das concentrações de piruvato no

tecido medular mostrou que houve redução significativa desse metabólito após 20 minutos de reperfusão ( $0,12 \pm 0,02$  versus  $0,04 \pm 0,01$ ,  $p < 0,01$ ), de modo semelhante ao que ocorreu quando se compararam os grupos G1 e G2. Também ocorreu redução dos níveis de ATP ( $0,17 \pm 0,05$  versus  $0,06 \pm 0,02$ ,  $p < 0,05$ ), que pode ser atribuída a uma maior utilização desse substrato para as funções energéticas.

Para a avaliação dos efeitos metabólicos da oferta de L-Ala-Gln sobre isquemia / reperfusão da medula espinhal, foram comparados os grupos G3 e G4, constituído por ratos submetidos ao trauma cirúrgico+isquemia/reperfusão e pré-tratados com solução salina (G3) ou L-ala-Gln (G4).

Todas as células são capazes de gerar lactato e liberá-lo na circulação sanguínea, como também podem extrair o lactato existente no sangue e utilizá-lo no metabolismo, com exceção das hemácias, as células da retina e as células da medula da glândula supra-renal, que são essencialmente glicolíticas. Em condições normais, o músculo esquelético, o cérebro, as hemácias e a pele são os principais produtores de lactato, enquanto o rim e o fígado cuidam de sua eliminação. Nesses órgãos, com mais intensidade no fígado, através da lactato desidrogenase (LDH) o lactato é convertido em piruvato e a seguida em glicose (gliconeogênese) ou ainda, através do ciclo tricarbóxico, em ATP, gás carbônico e água. A geração de lactato nas hemácias, músculo esquelético, cérebro e pele, com posterior gliconeogênese pelo fígado (ciclo de Cori), é útil como mecanismo para a manutenção da oferta de energia a órgãos que requerem glicose durante os estados de jejum (WATERHOUSE, KEILSON, 1969). Segundo Kreisberg (1972), os níveis de lactato dentro de uma célula são determinados pelos níveis de piruvato e a relativa prevalência de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) e nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada (NAD<sup>+</sup>).

Neste estudo, a oferta de L-ala-Gln não induziu alterações nas concentrações de glicose no sangue ou no tecido medular dos ratos pré-tratados com esse dipeptídeo. Tal fato sugere uma possível ação reguladora do fígado, impedindo uma diminuição das concentrações de glicose no tecido medular, devido à glicólise anaeróbica. A ausência de alterações nas concentrações de piruvato no sangue dos animais dos grupos G3 e G4 pode ser explicada por sua maior conversão a lactato, o que justificaria a elevação dos níveis de lactato, tanto no sangue, ao término da isquemia (T0) ( $6,15 \pm 1,12$  versus  $9,51 \pm 0,64$ ,  $p < 0,05$ ) e após 10 minutos de reperfusão (T10) ( $5,70 \pm 0,55$  versus  $8,70 \pm 0,51$ ,  $p < 0,01$ ) como na medula, após 20 minutos de reperfusão (T20) ( $3,84 \pm 0,99$  versus  $7,43 \pm 0,70$ ,  $p < 0,05$ ), nos animais pré-tratados com L-Ala-Gln, comparados aos animais pré-tratados com solução salina.

A maior atividade da via glicolítica no tecido medular submetido à isquemia/reperfusão tem suporte a partir do incremento observado das concentrações de lactato no tempo T20, nos animais pré-tratados com L-Ala-Gln e submetidos ao trauma cirúrgico+isquemia/reperfusão, comparados aos ratos pré-tratados com solução salina e submetidos ao trauma cirúrgico+isquemia/reperfusão. Há relatos na literatura de uma ação facilitadora da glicólise (fase 1 – conversão de uma molécula de glicose a duas moléculas de piruvato) decorrente da oferta exógena de L-ala-Gln. Esse dipeptídeo libera alanina e glutamina, quando introduzido na corrente sanguínea, que proporcionam uma maior regeneração de

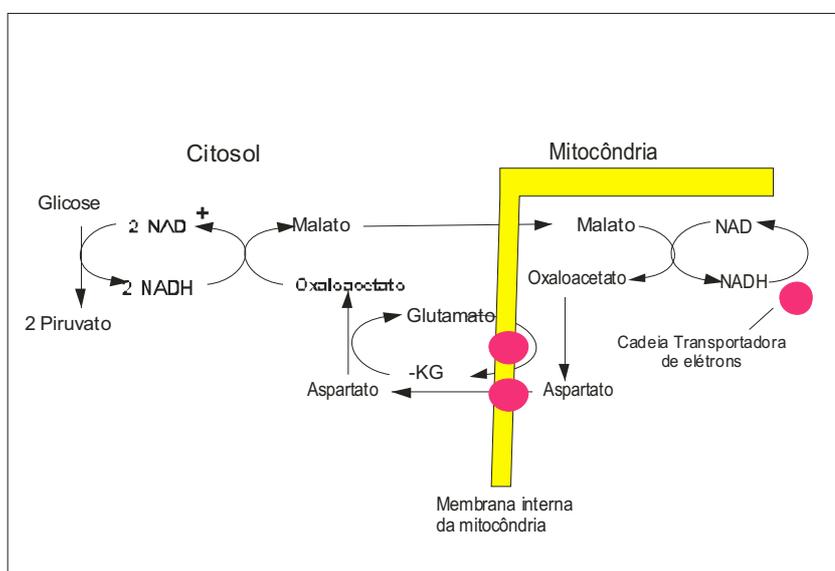
glutamato em tecidos ricos em glutaminase. A maior disponibilidade de glutamato ativaria o ciclo malato-aspartato com regeneração de  $\text{NAD}^+$  para o citosol, mantendo um estado redox citoplasmático/mitocondrial, favorecendo a glicólise (CAMPS et al., 2002; Bezerra et al., 2002).

As explicações aqui apresentadas para a ação glicolítica da L-Ala-Gln ainda estão no campo das hipóteses. Estudos adicionais, com aferição das concentrações da enzima malato-desidrogenase são necessários para a confirmação dos efeitos deste dipeptídeo na ativação da lançadeira-malato-aspartato.

## 6 CONCLUSÃO

O modelo de isquemia/reperfusão medular utilizado neste estudo não induziu uma isquemia total da medula, como pode ser demonstrado pela ausência de diferenças significantes nas concentrações de metabólitos nos ratos submetidos ao pinçamento infra-diafragmático, comparados aos ratos submetidos somente ao trauma cirúrgico.

A administração endovenosa de L-alanil-glutamina a ratos submetidos aos efeitos lesivos da isquemia/reperfusão causou aumento das concentrações de lactato no tecido medular e da lactacemia, possivelmente por ativação do ciclo malato-aspartato.



**FIGURA 28** – Ciclo malato-aspartato.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.

ACHER, C.W.; WYNN, M.M.; ARCHIBALD, J. Naloxone and spinal fluid drainage as adjuncts in the surgical treatment of thoracoabdominal and thoracic aneurysms. **Surgery** ,v.108 ,p. 755-61,1990.

AGEE, J.M.; FLANAGAN, T.; BLACKBOURNE, L.H.; KRON, I.L.; TRIBBLE, C.G. Reducing postischemic paraplegia using conjugated superoxide dismutase. **Ann Thorac Surg**, v. 51, p.911-4, jun 1991. discussion 914-5.

ALFACE, J.I.S. Metabolismo dos aminoácidos .In: Halper, M.j. Bioquímica. Lisboa , Editora Leidel Edições Técnicas, 1997

ALVERDY, J.C. Effects of glutamine-supplemented diets on immunology of the gut. J.Parenter. Enter. Nutr., v.14, p.109S-113S, 1990.

BAI , M.X.; JIANG, Z.M.; LIU, Y.W.; WANG, W.T.; LI, D.M.; WILMORE, D.W. Effects of alanyl-glutamine on gut barrier function. **Nutrition**, v.12, p.793-6, 1996.

BARROSO-ARANDA, J.; SCHMID SCHONBEIN, G.W.; ZWEIFACH B.W.; ENGLER, R.L. Granulocytes and no-reflow phenomenon in irreversible hemorrhagic shock. **Circ Res**, v.63, p.437-47, 1988

BELKIN, M.; wright, t.j.g.; hobson, k.w. Lloprost infusion decreases skeletal muscle ischemia reperfusion injury. **J Vasc Surg**, v.11, p.77-82, 1990 jan. discussion 82-3.

BONATTI, J.; WATZKA, S.; ANTRETTTER, H.; GERMANN, R.; FLORA, G.; DAPUNT, O.E. Spinal cord protection in descending and thoracoabdominal aortic surgery- the role of distal perfusion. **Thorac Cardiovasc Surg**, V.44, p. 136-9, 1996.

BRAUNWALD, E.; KLONER, R.A. Myocardial reperfusion: a double-edged sword **J Clin Invest**, v. 76 ,p. 1.713, 1995.

CAMP BELL, M.K. Bioquímica .Porto Alegre : Artmet, 2001.

COLES, J.G.; SIMA, F.; KLEMENT, P.; TAIT, G. WILLIAMS, W.G.; BAIRD, R.J. Intraoperative management of thoracic aortic aneurysm. Experimental evaluation of perfusion cooling of the spinal cord. **J thorac cardiovasc surg** , v. 85 p, 292-9, 1983.

COLON, R.; FRAZIER, H.; COOLEY, D.A.; McALLISTER, H.A. Hypothermic regional perfusion for protection of the spinal cord during periods of ischemia. **Ann Thorac surg**, v.43, p. 639-43, 1987.

COSELLI, J .S.; LEMAIRE, A.S.; LEDESMA, D.F.; OHTSUBO, S.; TAYAMA, E .; NOSE, Y. Initial experience with the nikkiso centrifugal pump during thoracoabdominal aortic aneurysm repair. **J vasc surg**, v.27, p. 378-83, 1998.

COSELLI, J .S.; CONKLIN, L.D.; LEMAIRE, A.S.; Thoracoabdominal aortic aneurysm repair: review and update current strategies. **Ann Thorac surg**, v.74, p.1881-4, 2002.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Lesão celular e morte celular. n: Robbins: **Patologia Estrutural e Funcional**. 5ª Ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 1996, c.1, p.1-3

CHERVU,A.;HOMSHER,A.;MOORE,W.S.;QUIÑONES-BALDRICH. J.Diferential recovery of skeletal muscle and peripheral nerve function after ischemia and reperfusion.**J Surg Res.**,v .47,p.12-19,1989.

CULLOUGH, J.L.;HOLLIER, L.H.;NUGENTM. Paraplegia after thoracic aortic occlusion:influence of cerebrospinal fluid drainage.Experimental and early clinical results.**J Vasc Surg.**, v.7,p.153-60,1988.

DOWNEY, C.Epidural cooling for spinal cord protection during thoracoabdominal aortic aneurysm repair.**Can oper room nurs j.**,v.18,p.9-14,2000.

ELMORE,J.R.;GLOVICZKI,P.;HARPER,JrC.M.;MURRAY,M.J.;WU,Q.H.;BOWE,T.C.;PAIROLER O,P.C.;NAESSENS,J.M.;DAUBE,J.R.Spinal cord injury in experimental thoracic aortic occlusion:investigation of combined methods of protection. **J Vasc Surg.**,v. 15,p.789-99,1992.

FESTING,M.F.W.Suitability of th rat for different investigations.In:ALTMAN,P.I.;KATZ,D.D.:(Eds) Inbred and genetically defined strains of laboratory animals, mause and rat.Bethesda,Fed.A.M.Soc. Exp.Biol.,v. 1,p.237-238,1979.

FOX, A. D.; KRIPKE, S. A.; DE PAULA, J.; BERMAN, J. M.; SETTLE, R. G.; ROMBEAU, J. L. Effects of glutamine-supplemented enteral diet on methotrexate-induced enterocolites. **J. Parenter. Enter. Nutr.**, v. 12, n. 4, p. 325-331, 1888.

GUNEL,E.;CACLAYAN,F.;CAGLAYAN,O.;DELSIZ,A.;DUMAN,S.;AKTAN,M.Treatment of intestinal reperfusion injury using antioxidative agents.**J Pediatric Surg.**,v.33,p.1536-9,1988.

GRANGER,D.N.;RUTILI,G.;MAC CORD,J.M. Superoxide radicals infeline intestinal inschemia.**Gastroenterology** .,v.81,p. 22-9,1981.

GREKIN, R.J. Cetoacidosis, estado hiperosmolar y acidosis láctica. In: KOKKO, J.;TANNEN, R.L. Líquidos y electrolitos. Buenos Aires: Panamericana., cap. 17, p. 811-813.1988.

HAIMOVICI,H.,Metabolic complications of acute arterial occlusion.**J Cardiovasc . Surg (torino).**,v.20,p.349-57,1979.

HERNANDEZ,L.A.;GUSHAM,M.B.;TWOHING,B.;ARFORS,K.E.;HORLAN,J.M.;GRANGER,D.N .Role of neutrophils in ischemia-reperfusion induced microvascular injury .**Am J Physiol.**,v.253,p. 699-703,1987.

HILGENBERG, A.D. Spinal cord protection for thoracic aortic surgery **cardiol clin** ;v. 17,p. 807-13,1999.

HULST, R. R. W. J.; MEYENFELD, M. F.; ARENDS, J. W.; KREEL, B. K. BRUMMER, R. J. M.; SOETERS, P. B.; DEUTZ, N. E. P. Glutamine and preservation of gut integrity. **Lancet**, v. 341, p. 1363-1365, 29 May 1993.

JABLOSKI,P.;HOWDEN,B.O.;RAE,D.A.;BIRNELL,C.S.;MARCHAL,V.C.;TANGE,G.J.An experimental model for assessmente of renal recovery from warm ischemia.**Transplantation.**,v.35,p .198-204,1983.

JACOBS, T.P.; KEMPSKI, O.; McKINLEY, D. ;DUTKA, A. J.; HALLENBECK,J.M.;FEUERSTEIN, G. Blood flow and vascular permeability during motor dysfunction in a rabbit model of spinal cord ischemia. **Stroke.**, v.23,p.367-73,1992.

JAMART,J.;LAMBOTTE,L. Differential effect of swelling and anoxia on kidney junction and its consequences on the mechanism of action of intracellular organ preservation solutions. *Transplantation* ,v.34,p.176-82,1982.

JOHNSON,S.H.;KRAIMER,J.M.; GRAEBER,G.M. Effets of flunarizine on neurological recovery and spinal cord blood flow in experimental spinal cord ischemia in rabbits. *Stroke*.,v. 24,p.1547-53,1993.

KORTHUIS,R.J.;GHISHAM,M.B.;GRANGER,D.N.Leukocyte depletion attenuates vascular injury in postischemic skeletal muscle .*Am J Physiol*.,v.254,p.4823-7 ,1998.

KLIMBERG, V. S.; SOUBA, W. W.; DOLSON, D. J.; SALLOUM, R. M.; HAUTAMAKI,R. D.; PLUMEY, D. A.; MENDENHALL, W. M.; BOVA, F. J.; KHAN, S. R.; HACKETT,R. L.; BLAND, K. I.; COPELAND, E. M. Prophylatic glutamine protects the intestinal mucosa from radiation injury. *Cancer*, v. 66, p. 62-68, 1990.

KREBS, H. A. apud FÜRST, P.; STEHLE, P. Nutrição parenteral: Dipeptiven (alanilglutamina a 20% IV). [s.l.]: Fresenius-Kabi, [s.d.]. Monografia científica.

LABOW,B.L.;SOUBA,W.W.Glutamine. *World J Surg*.,v.24,p.1503-13,2000.

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

LANG-LAZDUNSK,I .L.; MATSUSHITA, K.; HIRT, L.; WAEBER, C.; JEAN-PAUL, G.; VONSATTEL, J-PG.; MOSKOWITZ, M.A. Spinal Cord Ischemia. Development of a Model in the Mouse. *Stroke*., v. 31, p. 208-213, 2000.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. A Glicólise e Catabolismo das Hexoses. In: *Princípios da Bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 2 ed., cap.14, 2000. p. 20=97-330

LEHNINGER,A.L.;NELSON,D.L.;COX,M.M.Princípios de Bioquímica.Sao Paulo: Sarvier,2000.

MADDEN,K.P.;CLARK,W.M.;KOCHHAR,A.;ZIVIN,J.A.Efficacy of ly 233053,a competitive glutamate agonist,in experimental central nervous systems ischemia.*J Neuro Surg*.,v76,p.106-10,1992.

MARIÑO,J.C e ALBERS, M.T. Aneurismas toracoabdominais,p.31, 1991.

MARSALA, M.; VANICKY,I.;RADONAK,J.;KUNDRAT, I.;MARSALA,J. Panmyelic epidural cooling protects against ischemic spinal cord damage *J. Surgical Research*., v.55,p.21-31,1993.

MECHIROVA, E.; DOMORAKOVA ,I NADPH-diaphorase activity in the spinal cord after ischemic injury and the effects of pretreatment with ginkgo biloba extra (Egb 761).*Acta histochem*.,v. 104,p. 427-30,2002.

MEISTER,A.Metabolism of glutamine.*Physiol Rev*.,v.36,p103-27,1956.

NEGLEN,P.;JABS,C.M.;EKLOF,B.Plasma metabolic disturbances and reperfusion injury following partial limbs ischaemia in man.*EUA J Vasc Surg* .v.3,p.165-72,1989.

O'DWYER, S. T.; SMITH, R. J.; HWANG, T. L.; WILMORE, D. W. Maintenance of small bowel mucosa with glutamine-enriched parenteral nutrition. *J.Parenter. Enter. Nutr.*, v. 13,n. 6, p. 579-585, 1989.

OLSON, M. O. Oxidative phosphorylation. In: DEVLIN, T.M. (editor). Textbook of biochemistry with clinical correlations. New York: Wiley-Liss; 1997. p.261-273

PEGG,D.E.Organ preservation.Surg Clin North A.M.,v.66,p.617-32,1986.

PHROMPHETCHARAT,V.;JACKSON,A.;DASS,P.D.;WELBOUME,T.C.Ammonia partitioning between glutamine and urea:interorgan participation in metabolic acidosis.,*Kitney Int.*,v.20,p.598-605,1981.

PONTIUS,R.G.;BROCKMAN,H.L.;HARDY,E.G.;COOLEY,D.A; DeBAKEY.M.E.The use of hypothermia in the prevention of paraplegia following temporary aortic occlusion:experimental observations.*Surgery.*,v.36,p.33-8,1954.

RAO, V.S.N.; FIGUEIREDO, E.G.; MELO, C.L.; VIANA, G.S.B.; MENEZES, D.B.; MATOS, M.S.F.; SILVEIRA, E.R.Protective effect os ternatin, a flavonoid isolated from *Egletes viscosa* Less. , in experimental liver injury. *Pharmacology* ("in press").1993.

REUTER,D.G.;TACKER, Jr;W.A.; BADYLAK, S.F.; VOORHES,W.D.; KONRAD,P.E. Correlation of motor-evoked potential response to ischemic spinal cord damage. *Thorac Cardiovasc Surg.*,v.104,p.262-72,1992.

SADER, A.A.;BARBIERI-NETO, J.; SADER, S.L.; MAZZETTO, A.S.; ALVES, P. Jr.;VANNI, J.C.The protective action of chlorpromazine on the spinal cord of rabbits submitted to ischemia and reperfusion es dose-dependente.*J Cardiovasc Surg*;v.43,p.827-31,2002.

SADER, A. A.; COUTINHO-NETO, J.; LACHAT, J. J.; ROSELINO, J. E. S.; MAZZETTO, S. A. Isquemia da medula espinhal. In: SILVA JR., O. C.; ZUCOLOTO, S.; BEER JR., A. Modelos Experimentais de Pesquisa em Cirurgia. São Paulo: Ed. Robe, 1998. p. 663-669.

SAF, H.J..Role of the bio medicus pump and distal aortic perfusion in thoracoabdominal aortic aneurysm repair.,v. 20,p.694-9,1996.

SCHITTEK,A.;BENNIK,G.B.;COOLEY,D.A.;LANGFORD,L.A.Spinal cord protection with intravenous nimodipine.A functional and morphologic evaluation.*J Thorac Cardiovasc Surg.*,v. 104,p.1100-5,1992.

SCHOENBERG,M.;FREDHOLM,B.;HOHLBACH,G.;SCHILDBERG,F.W.Changes of the acid-bases status,serum lactate concentration and purinem metabolism in reconstructive arterial .*Surgery Chirug.*,v.54,p.728-33,1983.

SCHULTZE, E.; BOSSHARD, E. apud FÜRST, P.; STEHLE, P. Nutrição parenteral: Dipeptiven (alanil-glutamina a 20% IV). [s.l.]: Fresenius-Kabi, [s.d.]. Monografia científica.

SIES,H.;AKERBOOM,T.P.Glutathione disulfide efflux from cell and tissues.*Methods Enzymol.*,v.105,p.445-51,1984.

SMITH.R.J.Glutamine metabolism and its physiologic importance.*JPEN JPparenter Enteral Nutr.*,v.14,p.40s-44s,1990.

SPENCER, F.C. & ZIMMERMAN, J.M. . The influence of ligation of intercostal arteries on paraplegia in dogs. *Surg. Forum.*,v. 9,p.430.1950

STEHLE, P.; MERTES, N.; PUCHSTEIN, C.; ZANDER, J.; ALBERS, S.; LAWIN, P.;FÜRST, P. Effect of parenteral glutamine peptide supplements on muscle glutamine loss and nitrogen balance after major surgery. *Lancet*, v. 8632, p. 231-233, 4 Feb. 1989.

SVENSSON, L.; HESS, K.R.; D'AGOSTINO ,R.S.; ENTRUP, M.H.; HREIB, K.; KIMME, NADOLNY, E.;SHAHIAN, D.M.Reduction of neurologic injury a,fter high- risk thoracoabdominal aortic operation .Ann Thorac Surg.,v.66,p.132-8,1998.

TABAYASHI, K.;MOTOYOSHI ,N.;AKIMOTO, H .;TSURU, Y.; SAKURAI M.; ITOH, T.;FUKUJU, T.; IGUCHI.Epidural cooling for regional spinal cord hypothermia during or all of descending thoracic or thoracoabdominal aneurysm repair. Acta chir belg.,v.102,p. 224-9,2002.

TABAYASHI, NIIBORI,K.;KONNO,H.;MOHRI,H.Protection from postischemic spinal cord injury by perfusion cooling of the epidural space. Ann Thorac Surg .,v.56,p.494-8,1993.

THIERFELDER, H.; SHERWIN, C. P. apud FÜRST, P.; STEHLE, P. Nutrição parenteral: Dipeptiven (alanil-glutamina a 20% IV). [s.l.]: Fresenius-Kabi, [s.d.]. Monografia científica.

TETIK, O.; ISLAMOGLU, F.; GONCU, T.;CEKIRDEKCE, A.; BUKET S.Reduction of spinal cord injury with pentobarbital and hypothermia in a rabbit model,Eur J Vasc Endovasc Surg.,v.24,p.540-4,2002.

TETIK,C.;OZDEN,A.;CALLI,N.;BELGIHAN,A.;BOSTANCI,B.;YIS,O.;BAYRAMOGLU,H.Citopr ojective effect if trimetazidine in 60 min of intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. Transpl.Int.,v .12, p. 108-112, 1999.

VANICKY,I.;MARSALA,M.;GALIK,J.;MARSALA, J. Epidural perfusion cooling protection against protrated spinal cord schemia in rabbits Neurosurg.,v.79,p.736-41,1993.

WADA, T.; YAO, H.; MIYAMOTO, T.; MUKAI, S.; YAMAMURA ,M.Prevention and detection of spinal cord injury during thoracic thoracoabdominal aortic repairs,Ann Thorac Surg.,v.72,p.80-4,2001.

WADOUH, F.; LINDEMANN, E.M.; ARNDT,C.F;HETZER,R.; BORST,H.G. The arteria radicularis magna anterior as a decisive factor influencing spinal cord damage during aortic occlusion .J Thoraccardiovasc Surg.,v.88,p.1-10,1984

WALKER,F.B.;Michigam Medicine:a Walker tradition. Mich Med v.86,p.503-5.1987

WATERHOUSE, C.; KEILSON, J. Cori cycle activity in man. J. Clin. Invest., v.48, p.2359-2366,1969.

KREISBERG, R.A. Glucose-lactate interrelations in man. N. Engl. J. Med., v.287, p.132-137, 1972.

WILLAMSON,D.H.;LOPES.,VIEIRA,O.;WAKER,B.Concentrations of free gluconeogenic aminoacid in livers of rats subjected to various metabolic stresses.Bioch.J.,v. 104,p.497-502,1967.

WINDMUELLER,H.G.;SPAETH,A.E.Respiratory fuels and nitrogen metabolism in vivo in small intestine of fed rats,quantitative importance of glutamine,glutamate,and aspartate.,J Biol Chem.,v.255,p.107-12,1980.

ZIEGLER, T. R.; YOUNG, L. S.; BENFELL, K.; SCHELTINGA, M.; HORTOS, K.; BYE,R.; MORROW, F. D.; JACOBS, D. O.; SMITH, R. J.; ANTIN, J. H.; WILMORE, D. W.Clinical and metabolic efficacy of glutamine-supplemented parenteral nutrition after bone marrow transplantation. Ann. Intern. Med., v. 116, n. 10, p. 821-828, 1992.

ZIMMERMAN,B.J.; GRANGER,D.N.Reperfusion injury .Surg.Clic.North A.M.,v,72,p.65-83,1992.

## 8 ANEXOS

Drogas e soluções reagentes

Solução salina (solução de Na CL a 0,9 %)

Alanil –glutamina 20% (Dipeptiven- laboratório Frenesius)

Éter dietílico

Ácido perclórico 20% ( HClO<sub>4</sub>)

(haloquímica Ind. E Com. Ltda , são Paulo-SP, Brasil).

Cloreto de magnésio ( Mg CL 2 . 6 H<sub>2</sub>O)

(Grupo Química industrial Ltda, Rio de Janeiro-RJ Brasil)

EDTA (ácido etilenodiaminotetracético)

(c<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O)

fosfato de potássio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

(Reagen, Rio de Janeiro- RJ, Brasil).

Fosfato de potássio monobásico ( KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

(Reagen, Rio de Janeiro- RJ, Brasil).

Hidrato de hidrazina 80% (NH<sub>2</sub> NH<sub>2</sub>. H<sub>2</sub>O).

(Reagen, Rio de Janeiro- RJ, Brasil).

TRIS (Hidroximetil) Aminometano ( C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>)

(Reagen, Rio de Janeiro- RJ, Brasil).

Ácido clorídrico (HCL)

(Reagen, Rio de Janeiro- RJ, Brasil).

### **Bioquímicos e enzimas.**

Adenosina-5- triphosphato

(Boehringer Manheim-Germany)

glucose-6-phosphato-dehydrogenase de *leuconostoc mesenteroides*

(Boehringer Manheim-Germany)

Hexoquinase.

(Boehringer Manheim-Germany)

Hydroxyburate- desyrogenase de *Rhodopseudomonas spheroides*

(Boehringer Manheim-Germany)

lactate- dehydrogenase

(Boehringer Manheim-Germany)

NADH (C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O<sub>14</sub>Na<sub>2</sub>)

(Boehringer Mannheim-Germany)

NAD (C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O<sub>14</sub>P<sub>2</sub>.3H<sub>2</sub>O)

(Boehringer MannheimGermany)

### **APARELHAGEM**

Balança analítica (modelo H5, Merrler, Suíça)

Balança para animais (tara de 0 a 2000 g, Merrler P3.USA)

Centrífuga Eppendorf

Espectrofotômetro (Modelo DU, Beckman, Fullerton, CA, USA) com medidor de absorvância digital e outros acessórios (Modernization System, Gilford, Oberlin, Ohio, USA)

Medidor de PH micronal (PH-metro B 374)

Estetoscópio (fluxômetro) ultrassônico- Doppler IMBRACRIOS-EU 700-IND Brás.

### **DIVERSOS**

Cubeta para leitura ultravioleta (American Hospital Supply Corporation- USA)

Indicador de PH universal (Reagen, Rio de Janeiro-RJ, Brasil)

Nitrogênio líquido ( White Martins, São Paulo – SP, Brasil)

Tubos de ensaio de vidro de 10 ml

Pipeta automática de 5 a 1000 microlitros

Ponteiras descartáveis para pipeta automática

Provetas

Becher de 10, 50, e 100 ml (pyrex)

Gral e pistilo de porcelana

Garrafa térmica de 3 litros para acondicionar nitrogênio líquido durante o experimento

Pinça apreendedora (para manusear o tecido da espinha dorsal juntamente com o nitrogênio líquido)

Seringas de 3 ml e agulhas de 25/7

Gel (Aquasonic- para uso de fluxômetro Doppler, junto ao vaso arterial)

Material curúrgico: pinças de Halsted, bisturi lâmina 15, tesouras de metzenbau, fios de sutura (algodão), pinça vasculares oclusivas tipo buldogue

Luvas de procedimento (blowtex, USA)

Gazes, algodão e cotonetes

Recipiente de plástico, tipo poncheira, de 3 litros (para iniciar a anestesia do rato).