

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

EMANUEL ROCHA LANDIM

**EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM L-ALANIL GLUTAMINA E
PRECONDICIONAMENTO ISQUÊMICO EM MODELO DE ISQUEMIA /
REPERFUSÃO DE MEMBROS PÉLVICOS EM RATOS.**

FORTALEZA

2008

EMANUEL ROCHA LANDIM

**EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM L-ALANIL GLUTAMINA E
PRECONDICIONAMENTO ISQUÊMICO EM MODELO DE ISQUEMIA /
REPERFUSÃO DE MEMBROS PÉLVICOS EM RATOS.**

Dissertação submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação *Stricto Sensu* em
Cirurgia da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial para a
obtenção do Grau de Mestre em
Cirurgia.

Orientador:

Professor Doutor Paulo Roberto
Leitão de Vasconcelos

FORTALEZA

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

L246e Landim, Emanuel Rocha

Efeito do pré-tratamento com l-alanil glutamina e condicionamento isquêmico em modelo de isquemia / reperfusão de membros pélvicos em ratos/ Emanuel Rocha Landim. 2008.

70 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2008.

1. Glutamina 2. Precondicionamento Isquêmico 3. Traumatismo por Reperfusão 4. peroxidase 5. Estresse Oxidativo 6. Ratos. I. Vasconcelos, Paulo Roberto Leitão de (orient.). II. Escalante, Rodrigo Dornfeld (Co-orient.) III. Título.

CDD 616.135

EMANUEL ROCHA LANDIM

**EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM L-ALANIL GLUTAMINA E
PRECONDICIONAMENTO ISQUÊMICO EM MODELO DE ISQUEMIA /
REPERFUSÃO DE MEMBROS PÉLVICOS EM RATOS.**

Dissertação submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação *Stricto Sensu* em
Cirurgia da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial para a
obtenção do Grau de Mestre em
Cirurgia.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Dornfeld Escalante
Universidade de Fortaleza
Membro da Banca Examinadora

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Universidade Federal do Ceará
Membro da Banca Examinadora

Profa. Dra. Lucia Libanez Bessa Campelo Braga
Universidade Federal do Ceará
Membro da Banca Examinadora

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará
Presidente da Banca Examinadora

Ao nosso Senhor Jesus Cristo

**Aos meus Pais João Eudes
do Amaral Landim e Ana
Lúcia Rocha Landim a
minha eterna gratidão.**

**À minha esposa e
companheira Hévila e meus
filhos João Gabriel e
Samuel pelo apoio
incondicional e
compreensão nos momentos
de ausência.**

**Aos meus irmãos Noemia,
Fernanda, Salomão e Lucas
pelo companheirismo.**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **PROF. DR. PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS**, por sua disponibilidade, paciência e gentileza em transmitir com competência todos os ensinamentos para realização deste manuscrito.

Aos **PROFESSORES DOUTORES JOÃO ARAGÃO XIMENES, MARCOS RABELO DE FREITAS E LUSMAR VERAS RODRIGUES** pela participação na Banca de Qualificação e pelas oportunas e generosas contribuições na análise crítica desta Tese.

Aos **PROF. DR. RODRIGO DORNFELD ESCALANTE** da Universidade de Fortaleza (UNIFOR), **PROFA. DRA. NYLANE MARIA NUNES DE ALENCAR** da Universidade Federal do Ceará (UFC) e **PROFA. DRA. LUCIA LIBANEZ BESSA CAMPELO BRAGA** da Universidade Federal do Ceará (UFC) pela honrosa participação na Banca de Defesa desta Tese.

Ao **PROF. DR. RODRIGO DORNFELD ESCALANTE** pela ajuda no desenvolvimento do delineamento do estudo, análise dos resultados e na resolução das dificuldades enfrentadas ao longo deste trabalho.

Ao **PROF. DR. JOÃO ARAGÃO XIMENES**, pelo auxílio experiente na análise estatística deste estudo.

Ao **PROF. DR. SEBASTIÃO DIÓGENES PINHEIRO** pelas correções sugeridas.

À **DRA SIULMARA CRISTINA GALERA** e a todos os colegas da Pós-graduação pelo auxílio e companheirismo.

Ao **DR. ALBERT LEYVA** pela versão em inglês do resumo desta dissertação.

Aos acadêmicos **MARCELO PINHO PESSOA VASCONCELOS, LUIZ BRUNO PEREIRA LIMA, CAMILA MENEZES RABELO, RAQUEL C. VASCONCELOS, ALBERICO XIMENES DO PRADO NETO, ANTÔNIO CARLOS CABRAL UCHÔA OLIVEIRA E PRISCILA VALENTE BATISTA** pela dedicada colaboração na fase experimental deste estudo.

À senhora **MARIA LUCIENE DE OLIVEIRA** e senhora **MAGDA FONTENELE DE SOUSA**, secretárias do programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia, pela competência, eficiência e carinho dispensados aos alunos da Pós Graduação.

Ao senhor **FRANCISCO EVANIR GONÇALVES DE LIMA**, técnico da Unidade de Farmacologia da Universidade Federal do Ceará pelos esclarecimentos técnicos e presteza na preparação e execução dos ensaios laboratoriais.

Ao senhor **BENTO FRANCISCO DE OLIVEIRA**, assistente técnico do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina, sempre disponível no atendimento às nossas solicitações.

À senhora **ROSANE MARIA COSTA**, bibliotecária da Faculdade de Medicina (UFC) pela elaboração da ficha catalográfica.

À **EMPRESA VICCA EQUIPAMENTOS BIOMÉDICOS LTDA®** por ter cedido os miniclipes vasculares temporários e seu respectivo aplicador.

À **COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES)**, Ministério da Educação, pelo apoio concedido.

Ao **CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq)** pelo auxílio concedido.

Enfim a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

*A mente que se abre
para uma nova idéia, jamais
volta ao seu tamanho natural.*

Albert Einstein.

RESUMO

EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM L-ALANIL GLUTAMINA E PRECONDICIONAMENTO ISQUÊMICO EM MODELO DE ISQUEMIA / REPERFUSÃO DE MEMBROS PÉLVICOS EM RATOS. EMANUEL ROCHA LANDIM. Tese (Mestrado). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia. Universidade Federal do Ceará. Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

No presente trabalho, estudaram-se os efeitos da l-alanil glutamina (Ala-Gln), do condicionamento isquêmico (PCI) e das duas técnicas concomitantemente sobre a lesão pulmonar provocada por isquemia e reperfusão (I/R) causada por pinçamento da aorta infra-renal em ratos. Foram utilizados 60 ratos machos *Wistar*, randomizados em cinco grupos (n = 12) divididos em dois tempos (n = 6): Grupo **Simulado**, Grupo **I/R**, Grupo **PCI + I/R**, Grupo **Ala-Gln + I/R**, Grupo **Ala-Gln + PCI + I/R**. Tempos: **T1** (4h de isquemia) e **T2** (4 horas de isquemia e 1h de reperfusão). Todos os grupos receberam solução salina previamente, menos os grupos pré-tratados com Ala-Gln que receberam o dipeptídeo e solução salina em igual volume. Foi utilizado o modelo de pinçamento da aorta infra-renal com 4 horas de isquemia e 1 hora de reperfusão. Determinaram-se as concentrações de mieloperoxidase (MPO) pulmonar, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutatona reduzida (GSH) no sangue e pulmão para avaliar os grupos em estudo. O teste de Kolmogorov-Smirnoff mostrou distribuição normal dos dados. Dados expressos como média acompanhada pelo seu desvio padrão (Média ± DPM) sendo realizado teste t de Student. Para análise comparativa simultânea de três grupos utilizou-se o teste Anova com pós-teste de Tukey. Em todos os casos foi adotado o nível de significância de $p < 0,05$. Houve elevação das concentrações de MPO pulmonar tanto no grupo submetido à isquemia quanto no grupo que realizou a I/R. Ocorreu redução significativa das concentrações de MPO pulmonar nos grupos submetidos à isquemia pré-tratados com Ala-Gln e com PCI. Na avaliação dos grupos que sofreram I/R não foi observada alteração nas concentrações de MPO nos grupos pré-tratados Ala-Gln ou PCI. O grupo pré-tratado com as duas técnicas apresentou aumento significativo da MPO nos tempos estudados. A Ala-Gln como pré-tratamento isolado reduziu TBARS plasmático na isquemia e o aumentou no pulmão na I/R. Já no pulmão durante isquemia e no plasma na I/R houve redução da GSH. O PCI como pré-tratamento isolado elevou o TBARS pulmonar na I/R e reduziu a GSH pulmonar na I/R. A associação da Ala-Gln e PCI acresceu o TBARS plasmático na isquemia, também o elevando no pulmão e músculo na I/R. Já a GSH, com os dois pré-tratamentos, sofre redução plasmática na isquemia e pulmonar na I/R, com elevação plasmática na I/R. O presente estudo demonstra que tanto o pré-tratamento com Ala-Gln como o PCI protegem contra a lesão isquêmica à distância, em modelo murino de pinçamento da aorta infra-renal quando avaliado MPO pulmonar. O mesmo não ocorre na lesão por I/R. Não há benefício, e sim agravamento de lesão à distância pulmonar, na associação dos dois pré-tratamentos ao mensurar a MPO pulmonar.

PALAVRAS-CHAVE: Glutamina. Precondicionamento Isquêmico. Traumatismo por Reperfusão. Peroxidase. Estresse Oxidativo. Ratos.

ABSTRACT

EFFECT OF THE PRE-TREATMENT WITH L-ALANYL GLUTAMINE AND ISCHEMIC PRECONDITIONING IN AN ISCHEMIA / REPERFUSION MODEL OF HIND LIMBS IN RATS. EMANUEL ROCHA LANDIM. Dissertation (Master`s Degree in Surgery). Post-Graduation Program (*Stricto Sensu*) in Surgery. Federal University of Ceará. Advisor: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

The present work determined the effects of pre-treatment with L-alanyl glutamine (Ala-Gln) and ischemic preconditioning (IPC), alone and in combination, against lesions caused by I/R by clamping the infrarenal aorta in rats. Sixty *Wistar* rats were distributed into five groups (n = 12) divided into two times (n = 6): **Control**, Group **I/R**, Group **IPC + I/R**, Group **Ala-Gln + I/R**, Group **Ala-Gln + IPC + I/R**. Times: **T1** (infrarenal-aorta clamping ischemia-4h); **T2** (ischemia-4h plus reperfusion-1h). Pulmonary myeloperoxidase (MPO) and plasma TBARS concentrations were measured. Data expressed as mean \pm standard-deviation, analyzed by Student's t-test and ANOVA/Tukey's post-test. P-values < 0,05 were considered significant. Increased MPO concentrations in ischemic group and in I/R group occurred as compared to control. Reduction in MPO concentrations happened in ischemic groups pre-treated with either Ala-Gln or IPC. I/R induced no change in MPO concentrations in groups pre-treated with either Ala-Gln or IPC. Pre-treating with the two procedures showed increased MPO at both times studied. Reduction in TBARS concentrations occurred in Ala-Gln pre-treated group, whereas significant elevation was observed when Ala-Gln and IPC were associated in ischemic animals. Ischemia/reperfusion induced elevation of plasma TBARS. Pre-treatment with either Ala-Gln or IPC protects against distant pulmonary lesion due to ischemia. The same did not occur in I/R lesion. Combining the two procedures aggravated inflammation indicated by increased MPO concentrations. Elevated TBARS concentrations in ischemic animals pre-treated with the two procedures indicate increased lipid peroxidation, whereas pre-treatment with Ala-Gln induced decreased TBARS concentrations.

Keywords: Glutamine. Ischemic preconditioning. ischemia and reperfusion. Myeloperoxidase.. oxidative stress, Rat.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	Fórmula estrutural da glutamina (adaptada de Roskoski,1997).....	26
FIGURA 2 –	Principais funções da glutamina no organismo.....	27
FIGURA 3 –	Laparotomia.....	32
FIGURA 4 –	Identificação e isolamento da aorta infra-renal sob visão direta prestes a realizar o pinçamento. Segmento arterial distal ainda repleto de sangue e com pulso.....	32
FIGURA 5 –	Aorta infra-renal após o pinçamento. Segmento arterial distal sem pulso.....	32
FIGURA 6 –	Delineamento do experimento.....	33
FIGURA 7 –	Concentração da MPO pulmonar (unidade /g de tecido fresco) nos grupos submetidos à isquemia – T1.....	38
FIGURA 8 –	Concentração da MPO pulmonar (unidade /g de tecido fresco) nos grupos submetidos à isquemia e reperfusão – T2.....	39
FIGURA 9 –	Concentração de TBARS (μmol de MDA /ml) no sangue nos grupos submetidos à isquemia - T1.....	40
FIGURA 10 –	Concentração de TBARS (μmol de MDA /ml) no sangue nos grupos submetidos à isquemia e reperfusão – T2.....	41
FIGURA 11 –	Concentração de TBARS (μmol de MDA /g tecido fresco) no pulmão nos grupos submetidos à isquemia - T1.....	42
FIGURA 12 –	Concentração de TBARS (μmol de MDA /g tecido fresco) no pulmão nos grupos submetidos à isquemia e reperfusão - T2.....	43
FIGURA 13 –	Concentração de GSH (μmol /ml) no sangue nos grupos submetidos à isquemia - T1.....	44
FIGURA 14 –	Concentração de GSH (μmol /ml) no sangue nos grupos submetidos à isquemia e reperfusão - T2.....	45
FIGURA 15 –	Concentração de GSH (μmol /g de tecido fresco) no pulmão nos grupos submetidos à isquemia – T1.....	46
FIGURA 16 –	Concentração de GSH (μmol /g de tecido fresco) no pulmão nos grupos submetidos à isquemia e reperfusão – T2.....	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	–	Concentração de MPO pulmonar (unidade /g de tecido fresco) nos grupos submetidos à isquemia.....	38
TABELA 2	–	Concentração de MPO pulmonar (unidade /g de tecido fresco) nos grupos submetidos à I/R.....	39
TABELA 3	–	Concentração de TBARS plasmático (μmol of MDA /ml) nos grupos submetidos à isquemia.....	40
TABELA 4	–	Concentração de TBARS plasmático (μmol of MDA /ml) nos grupos submetidos à I/R.....	41
TABELA 5	–	Concentração de TBARS pulmonar (μmol de MDA /g tecido fresco) nos grupos submetidos à isquemia.....	42
TABELA 6	–	Concentração de TBARS pulmonar (μmol de MDA /g tecido fresco) nos grupos submetidos à I/R.....	43
TABELA 7	–	Concentração de GSH plasmática (μmol /ml) nos grupos submetidos à isquemia.....	44
TABELA 8	–	Concentração de GSH plasmática (μmol /ml) nos grupos submetidos à I/R.....	45
TABELA 9	–	Concentração de GSH pulmonar (μmol /g de tecido fresco) nos grupos submetidos à isquemia	46
TABELA 10	–	Concentração de GSH pulmonar (μmol /g de tecido fresco) nos grupos submetidos à I/R.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ala-Gln -	L-alanil-glutamina
AMP -	Adenosina monofosfato
ATC -	Ácido tricloroacético
ATP -	Adenosina-trifosfatada
DNA -	Ácido desoxirribonucléico
DPM -	Desvio padrão da média
DTNB -	Reagente de Ellman
EDTA -	Ácido etilenodiaminotetracético
ERMO -	Espécies Reativas do Metabolismo do Oxigênio
et al. -	E outros
Gly-Gln -	Glycil-glutamina
GSH -	Glutationa (forma reduzida)
GSSG -	Glutationa oxidada
HCO₃⁻ -	Íon bicarbonato
HClO₄ -	Ácido perclórico
HO₂⁻ -	Radical hidroperoxila
H₃PO₄ -	Ácido fosfórico
HSP_s -	Proteínas do choque térmico
HTAB -	Hexadecitrimetilamônio
KCl -	Cloreto de potássio
LFA-1 -	Antígeno de função leucocitária-1
ICAM-1 -	Molécula de adesão intercelular-1
IL-1β -	Interleucina-1- β
IL-6 -	Interleucina-6
I/R -	Isquemia e reperfusão
IP -	Anestesia intraperitoneal
I -	Isquemia
L\cdot -	Radical lipídico
Lap -	Laparotomia
LOO\cdot -	Radical peroxila
M -	Molar

Mg -	Miligrama
mM -	Milimolar
MDA -	Dialdeído malônico
nm -	Nanômetro
MPO -	Mieloperoxidase
O₂^{·-} -	Radical superóxido
OH^{·-} -	Radical hidroxila
PCI -	Precondicionamento isquêmico
RLO -	Radicais livres de oxigênio
r.p.m.	Rotações por minuto
SH -	Grupo sulfidrílico
SIRS -	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
T1 -	Tempo de isquemia máximo
T2 -	Tempo de isquemia e reperfusão
TBA -	Ácido tiobarbitúrico
TBARS -	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF-α -	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Lesão isquêmica	20
1.2 Lesão por reperfusão	22
1.3 Precondicionamento isquêmico	25
1.4 Glutamina	26
2 OBJETIVO	29
3 MÉTODO	30
3.1 Drogas e reagentes	30
3.2 Delineamento do estudo	30
3.3 Os animais	30
3.4 Procedimento anestésico	31
3.5 Técnica operatória	31
3.5.1 Punção e infusão endovenosa de substâncias testes e controles.....	31
3.5.2 Laparotomia.....	31
3.6 Coleta do material para análise	33
3.6.1 Coleta de sangue.....	33
3.6.2 Coleta de tecidos.....	33
3.7 Técnica laboratorial	34
3.7.1 Dosagem de mieloperoxidase.....	34
3.7.2 Avaliação da peroxidação lipídica pela reação com ácido tiobarbitúrico.....	34
3.7.3 Determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos.....	35
3.8 Análise estatística	37
4 RESULTADOS	38
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÃO	56
7 REFERÊNCIAS	57
APÊNDICE A	64
APÊNDICE B	65

APÊNDICE C	66
APÊNDICE D	67
ANEXO A	70

1. INTRODUÇÃO

Vários procedimentos cirúrgicos, tais como reparos de aneurisma da aorta abdominal, cirurgias ortopédicas de membros inferiores e procedimentos que se utilizam de torniquetes, submetem o membro a prolongados períodos de isquemia seguidos de reperfusão (I/R) (HARKIN *et al.*, 2002).

O retorno do suprimento sanguíneo, não obstante essencial para o restabelecimento da circulação, paradoxalmente, favorece a liberação de citocinas, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1- β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6), que levam a resposta inflamatória local e sistêmica. Com isso, ocorre ativação e seqüestro de neutrófilos principalmente nos pulmões, bem como aumento de sua permeabilidade microvascular (YASSIN *et al.*, 2002; PLITAS *et al.*, 2003).

Esse processo inflamatório deflagrado pela isquemia e reperfusão (I/R), caso as citocinas e os mediadores pró-inflamatórios saiam do controle, ativa sobremaneira os polimorfonucleares na microvasculatura pulmonar, fato este central para o desenvolvimento de lesão pulmonar aguda, na síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS). Sabe-se que a diminuição dos polimorfonucleares pulmonares mostra-se protetora de tal lesão. (HARKIN *et al.*, 2002; YASSIN *et al.*, 2002).

As alterações de I/R supracitadas podem desencadear lesões pulmonares com progressão à SIRS e falência múltipla dos órgãos, causa importante de morte em situações como aneurismas e trombose da aorta abdominal (PIMENTA *et al.*, 2007). A busca por meios que abrandem a inflamação pulmonar é relevante, pois tem potencial de reduzir a mortalidade envolvida no referido processo (HARKIN *et al.*, 2002).

1.1 Lesão isquêmica

A isquemia é definida pela insuficiência localizada de irrigação sangüínea, devido à constrição ou à obstrução mecânica do sistema arterial, que pode ocorrer em maior ou menor grau. Na vigência dessa condição ocorre, por conseqüência, supressão do fornecimento de nutrientes para os tecidos e a morosa retirada dos metabólitos que, de acordo com sua intensidade e duração, podem ser reversíveis ou não. Nesse contexto, quatro componentes estruturais e funcionais celulares são particularmente sensíveis. São eles: a membrana celular, principal responsável pelo equilíbrio iônico e osmótico; a respiração celular (aeróbica) que compreende, entre outros eventos, a fosforilação oxidativa e a produção de adenosina-trifosfatada (ATP); a síntese de proteínas estruturais e enzimáticas; e o componente genético (cromatina) responsável pela reprodução celular (CONN; STUMPF, 1998; COTRAN *et al.*, 2005).

No decorrer do processo isquêmico, o baixo teor de oxigênio intracelular obriga a mudança de metabolismo. A respiração celular passa da aerobiose para a anaerobiose. A fosforilação oxidativa, atividade executada pela membrana interna das mitocôndrias, não pode ser realizada pela carência de oxigênio. A interrupção desta importante função reduz ou anula a produção de ATP com acúmulo de adenosina monofosfato (AMP), que será metabolizada em adenosina, inosina e hipoxantina. Essa condição estimula as enzimas fosfofrutoquinase e fosforilase, resultando no aumento da glicólise anaeróbica com a finalidade de manter as fontes energéticas da célula gerando ATP a partir de glicogênio, a gliconeogênese. O glicogênio é rapidamente depletado. A glicólise anaeróbica resulta no acúmulo de ácido láctico e fosfatos inorgânicos pela hidrólise de ésteres de fosfato. Da utilização desta via alternativa resulta o acúmulo de ácido láctico com a subsequente queda do pH intracelular, caracterizando a acidose láctica (COTRAN *et al.*, 2005).

A redução do ATP afeta intensamente a membrana celular (OTAMIRI, 1989). Ocorre aumento da permeabilidade e desequilíbrio dos gradientes coloido-osmóticos intra e extracelulares, favorecendo a saída do potássio intracelular e a passagem de sódio para o interior da célula. Em consequência, sucede-se o ganho de soluto intracelular e subsequente edema celular (tumefação celular aguda), distensão do retículo endoplasmático, tumefação das mitocôndrias, descolamento dos ribossomos e surgimento de vesículas na superfície celular (COTRAN *et al.*, 2005).

Até certo ponto, todos esses distúrbios são reversíveis, caso ocorra a reperfusão e a oxigenação seja restaurada. Com a manutenção da isquemia, agravam-se as lesões celulares, surgindo a vacuolização das mitocôndrias e lesão do citoesqueleto com o desprendimento da membrana celular. Nessa situação, a membrana celular aumenta sua permeabilidade, facilitando a perda continuada de proteínas, enzimas, co-enzimas e material cromatínico. Somado a isso, ocorre influxo de cálcio, que corresponde a uma brusca passagem de cálcio ionizado para o interior da célula, ativando fosfolipases, proteases, endonucleases e ATP-ases. Amontoam-se produtos de degradação dos fosfolipídios tais como a acilcarnitina e lisofosfolipídeos lesivos à membrana celular e mitocondrial com escape de prótons e citocromo-c, intensificando a hiper-permeabilidade. O rompimento das membranas lisossômicas provoca o extravasamento de glicosidases, proteases e DNA-ases, que ativadas conduzem à lise dos componentes celulares, caracterizando a irreversibilidade das lesões e estabelecendo a morte celular (CHIU *et al.*, 1970; DAEMEN *et al.*, 2002).

1.2 Lesão por reperfusão

O retorno da irrigação sanguínea em tempo hábil, com o conseqüente retorno da oxigenação, é essencial para o estabelecimento do metabolismo aeróbico evitando as lesões irreversíveis da isquemia. A reperfusão, embora essencial para restabelecimento da homeostase celular, resulta em um efeito paradoxal, com aumento do dano, em decorrência da formação expressiva de espécies reativas do oxigênio, inflamação e ativação da via do complemento. Esse aumento do dano é denominado lesão de reperfusão (RIEDEMANN; WARD, 2003).

Durante o processo de reoxigenação ocorre aumento dos radicais livres de oxigênio nas células parenquimatosas, endoteliais e nos linfócitos que infiltram a lesão. Os radicais livres de oxigênio (RLO) são espécies químicas que têm um único elétron não pareado em um orbital externo. Em tal estado, o radical é extremamente reativo e instável, participando de reações com substâncias químicas inorgânicas ou orgânicas, proteínas, lipídios e carboidratos, particularmente com moléculas importantes nas membranas celulares e núcleo (ácidos nucleicos) (ANAYA-PRADO *et al.*, 2002).

Os RLO que são liberados no momento da reperfusão são responsáveis pela lise celular, além de ativar o processo peroxidativo das biomembranas lipídicas, levando, assim, ao dano tecidual. Somado a isso, iniciam reações autocatalíticas, nas quais as moléculas com as quais eles interagem podem ser convertidas em radicais livres para propagar a cadeia de danos. Em condições de homeostase, os RLO são produzidos em pequena quantidade e rapidamente inativados antes de provocar lesão significativa (COTRAN *et al.*, 2005).

Na verdade, radical livre não é o termo ideal para designar os agentes reativos que causam dano, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada. Como, em sua maioria, esses agentes reativos são derivados do metabolismo do oxigênio, essas substâncias foram denominadas de Espécies Reativas do Metabolismo do Oxigênio (ERMO) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

As ERMO são encontradas em todos os sistemas biológicos. Quando em condições fisiológicas do metabolismo aeróbico, o oxigênio sofre redução tetravalente com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água. No decorrer desse processo são desenvolvidos intermediários reativos, como os radicais superóxido (O_2^-), hidroperoxila (HO_2^-), hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (COHEN, 1989). Os agentes reativos podem ser produzidos pela atividade de uma variedade de enzimas oxidativas, em diferentes locais da célula tais como citosol, mitocôndria, lisossomos, peroxissomos e membrana citoplasmática, embora a redução completa do oxigênio ocorra freqüentemente na

mitocôndria. Um exemplo corriqueiro é a formação, em surtos rápidos, de superóxido pelos leucócitos polimorfonucleares ativados nos processos inflamatórios (DRÖGE, 2002).

A desmedida geração de ERMO e a capacidade do organismo de desativá-los significam o equilíbrio decisivo entre a reversibilidade das lesões e a morte celular (COTRAN *et al.*, 2005). Normalmente, em condições fisiológicas, a produção de radicais livres intracelulares é diminuta, uma vez que o sistema de enzimas antioxidantes impede a sua formação ou as remove. Fazem parte desse sistema protetor a catalase, glutaciona peroxidase, glutaciona redutase e superóxido dismutase. Portanto, em condições de homeostase há harmonia entre as substâncias pró-oxidantes e antioxidantes. Quando ocorre a quebra desse equilíbrio, ou por aumento da produção de ERMO, ou por déficit na proteção antioxidante, têm-se o estresse oxidativo (DRÖGE, 2002).

No intento de protegê-lo dos efeitos deletérios dos radicais livres, o organismo recorre a duas linhas diferentes: a **linha detoxificadora**, formada pela glutaciona reduzida, vitamina E e as enzimas superóxido-dismutase, catalase, glutaciona peroxidase, e a **linha reparadora** composta principalmente pelo ácido ascórbico e pelas enzimas glutaciona-redutase e glutaciona-peroxidase (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A glutaciona é um marcador de saúde celular e sua queda é indicativa de lesão oxidante. Seu déficit acarreta diminuição da resistência às drogas e radiações, bem como redução da capacidade de reversão de tumores e da síntese do ascorbato em animais. Trata-se de um tripeptídeo composto de aminoácidos não essenciais, descrita como importante agente antioxidante (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1995).

A glutaciona reduzida (GSH) é o tiol (-SH) mais abundante do meio intracelular. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro (GALLEANO; PUNTARULO, 1995), oxigênio hiperbárico, ozona, radiação e luz ultravioleta (DENEKE; FANBURG, 1989). Além disso, reduz a lesão renal decorrente da isquemia e reperfusão (SHAN *et al.*, 1990).

A oxidação da GSH forma a glutaciona oxidada (GSSG). Nas situações em que o sistema de oxido-redução está íntegro, haverá recuperação da GSH pela ação enzimática da glutaciona redutase. A relação ideal GSH/GSSG (100:1) é mantida por meio desse processo (MEISTER, 1988).

A peroxidação lipídica é um processo de agressão pelas ERMO aos ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios das membranas celulares. Tal processo provoca alterações da estrutura e permeabilidade das membranas. Conseqüentemente, há perda de seletividade na

troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (malonaldeído), culminando com a morte celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1995).

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. A iniciação processa-se quando uma ERMO, freqüentemente um radical hidroxila, seqüestra um hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH) da membrana celular com formação de um radical lipídico (L[•]). Na primeira equação de propagação, o radical lipídico (L[•]) reage rapidamente com oxigênio, resultando no radical peroxila (LOO[•]) que, por sua vez, seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, formando novamente o radical lipídico (L[•]) na segunda equação de propagação. O término da peroxidação lipídica dá-se quando os radicais L[•] e LOO[•] formados nos estágios anteriores consomem-se a si próprios (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Em sistemas biológicos, a aferição dos radicais livres é dificultada por suas concentrações extremamente baixas (da ordem de 10^{-11}) e por suas altas velocidades de reação. Os subprodutos das ERMO podem ser aferidos diretamente por técnica de ressonância paramagnética de elétrons, contudo, as limitações inerentes ao método e seu elevado custo dificultam sua utilização (FLOYD, 1990). Os métodos correntes mais utilizados para avaliação das lesões oxidativas são os de aferição indireta das ERMO por espectrofotometria e cromatografia. Com isso, determina-se a atividade enzimática (superóxido dismutase, catalase, glutathiona peroxidase e glutathiona reduzida) e a concentração de tripeptídeos e aldeídos (malonaldeído) nos tecidos, sangue e outros fluidos orgânicos (GUIMARÃES, 2005).

O estresse oxidativo pode ser avaliado por vários métodos. A lipoperoxidação é mensurada por um marcador de lesão das membranas celulares, pelo método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), através da formação de um composto intermediário da peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA). Esse teste foi introduzido por Kohn e Liversedge em 1994, e ainda é um dos métodos mais utilizados (CHIRICO, 1994). Outros métodos de avaliação do estresse oxidativo são a determinação da GSH e o cálculo da razão glutathiona reduzida/glutathiona (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

1.3 Precondicionamento isquêmico

O preconditionamento isquêmico (PCI) é um mecanismo onde breves períodos de isquemia seguidos de reperfusão provocam uma relativa resistência tecidual contra período de isquemia prolongado subsequente (HARKIN *et al.*, 2002). Citado fenômeno foi primeiramente descrito em 1984 por Neely e Grotyohann, que demonstraram o efeito protetor de um curto período de isquemia, anterior à isquemia e reperfusão (I/R), em miocárdio de coelhos.

Posteriormente, em 1986, Murry, Jennings e Raimer evidenciaram que PCI diminuía a proporção de infarto após a oclusão da artéria coronária durante 40 min em um modelo canino de isquemia miocárdica.

Estudos subsequentes têm confirmado os benefícios do PCI em vários tecidos, tais como músculo esquelético, rim, fígado, pulmão e endotélio mesentérico. O PCI induz a uma tolerância local à reperfusão por reduzir as espécies reativas do oxigênio, diminuir os neutrófilos ativados, restringir a apoptose e melhorar a perfusão na microcirculação (PASUPATHY; HOMER-VANNIASINKAM, 2005).

Além dos benefícios locais, o PCI pode gerar proteção à distância, o chamado *precondicionamento remoto*. Foi demonstrado que a realização de pequenos períodos de isquemia em um determinado órgão pode agir como fator de proteção em outros tecidos à distância (LI *et al.*, 2004). Esse fenômeno, descrito em 1993 por Przyklenk *et al.*, provocou a proteção remota em miocárdio canino (PRZYKLENK *et al.*, 1993).

O pulmão é descrito como órgão passível de proteção pelo preconditionamento remoto frente à lesão por I/R de membro pélvico em modelo murino (OLGUNER *et al.*, 2006). No fígado, quando breves isquemias foram realizadas em membro pélvico, estas proporcionaram proteção remota contra a lesão causada por I/R hepáticas em ratos (LAI *et al.*, 2006) e coelhos (KANORIA *et al.*, 2006). Ainda mais interessantes são os achados de proteção remota do miocárdio ao se realizar PCI do músculo esquelético (BIRNBAUM *et al.*, 1997) e do tecido intestinal (GHO *et al.*, 1996).

Suspeita-se que o preconditionamento remoto apresente duas fases de proteção. Uma fase recente, independente da síntese protéica (primeiras 4 horas), e uma fase tardia, dependente da síntese protéica (24-72 horas). A transmissão da informação aos órgãos remotos faz-se por meio de mediadores humorais ou através de vias neurogênicas ou, ainda, pela combinação das duas. Dentre os mediadores humorais possíveis destacam-se: opióides, óxido nítrico, adenosina, catecolaminas, bradicinina, proteínas do choque térmico (HSPs), TNF- α , prostaglandinas e angiotensina (KANORIA *et al.*, 2007).

1.4 Glutamina

Desde 1833, Schultze e Bosshard, descreveram uma substância extraída da beterraba, degradável em meio ácido quando aquecida em ácido glutâmico e amônia, que foi denominada glutamina. Passados 33 anos (1866), Ritthausen publicou a descoberta de uma “nova substância” encontrada em proteínas do tremoço e da amêndoa, obtida da ebulição do glúten na presença do ácido sulfúrico e que seria “um ácido monobásico contendo nitrogênio” (MARINHO, 1995). Na verdade tratava-se da glutamina, aclamada como uma amina; é, efetivamente, uma amida. Portanto, a nomenclatura adequada seria glutamida. Contudo, tempo e uso consagraram a denominação equivocada (FELTRE, 1998).

A fórmula empírica da glutamina é $C_n H_n O_n N_n$, a molecular é $C_5 H_{10} O_3 N_2$ e a estrutural está representada na **Figura 1**.

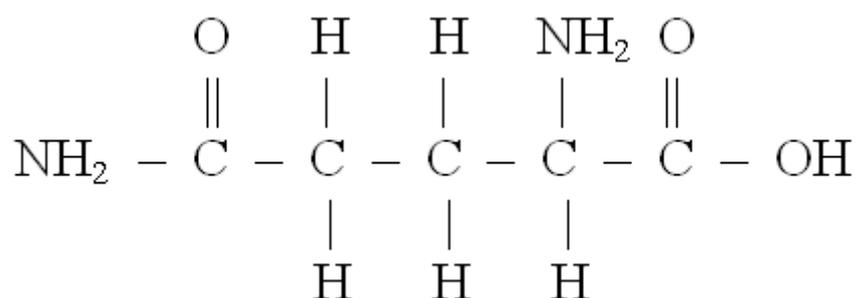


FIGURA 1 – Fórmula estrutural da glutamina (adaptada de Roskoski, 1997)

A fórmula exposta revela que a glutamina é um ácido carboxílico biaminado, característica que compartilha com asparagina e a lisina (ROSKOSKI, 1997), alinhando-se na categoria dos aminoácidos com grupos polares sem carga (LEHNINGER, 2000).

A glutamina é considerada um aminoácido não essencial por ser sintetizada pelo organismo. Embora o corpo possua grandes reservas e possa sintetizá-la em grande quantidade, estados catabólicos podem torná-la essencial, exigindo um aporte externo, quando as disponibilidades se tornam inferiores às necessidades do organismo. Além disto, a glutamina apresenta a capacidade de ser utilizado de formas diferentes nos mais diversos tecidos, sob diferentes estados fisiológicos (LABOW; SOUBA, 2000).

Esse aminoácido apresenta diversas funções, tais como: substrato para síntese protéica, precursor anabólico no crescimento muscular, regulador renal do equilíbrio ácido-básico, substrato para gliconeogênese hepática e renal, combustível oxidativo para o intestino e células do sistema imune, transportador de nitrogênio entre os órgãos, precursor na síntese de neurotransmissores, ácidos nucléicos e nucleotídeos, bem como na síntese de glutatona (NEWSHOLME *et al.*, 2003).

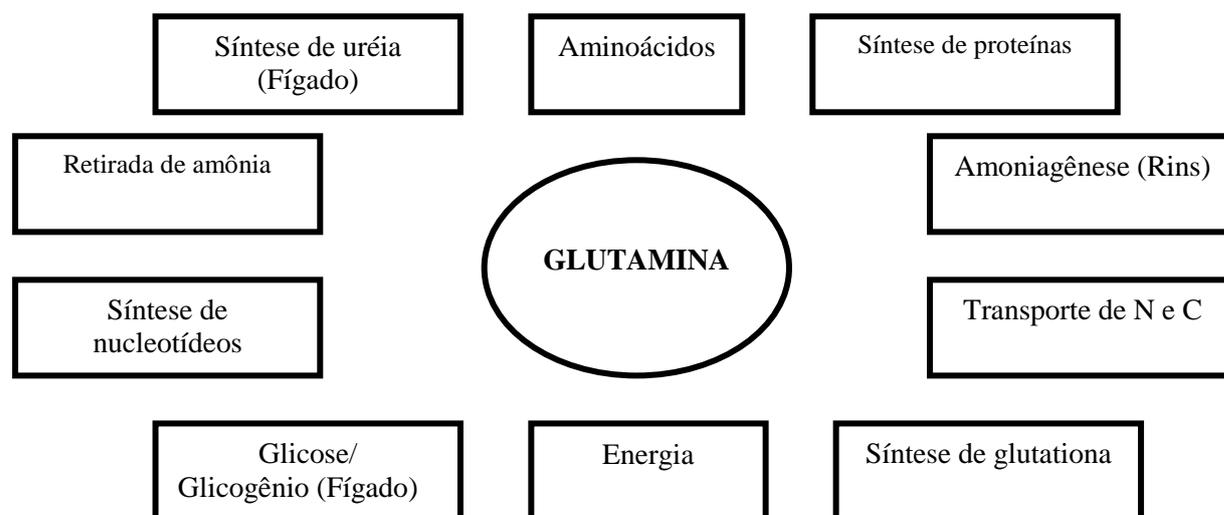


FIGURA 2 - Principais funções da glutamina no organismo. (Adaptada de LABOW; SOUBA, 2000).

Devido às propriedades físico-químicas da glutamina, o seu uso apresenta algumas restrições, uma vez que apresenta pouca solubilidade em solução aquosa e baixa estabilidade em pH baixo e temperaturas elevadas. O dipeptídeo pode sofrer conversão espontânea no organismo, formando piroglutamato e amônia, produtos tóxicos ao corpo humano (LABOW; SOUBA, 2000).

Tendo em vista as propriedades citadas, a opção de uso deste aminoácido na forma de peptídeos, tais como a glycil-glutamina (Gly-Gln) ou a L-alanil-glutamina (Ala-Gln), tem sido a alternativa adotada por vários pesquisadores (BEZERRA FILHO *et al.*, 2002; TORRES *et al.*, 2003; CAMPOS *et al.*, 2003; ALVES *et al.*, 2003; GUIMARÃES FILHO *et al.*, 2004; ALVES *et al.*, 2005) em virtude de sua alta solubilidade em água e estabilidade durante os procedimentos de preparo, armazenamento e administração das soluções nutricionais. Quando em corrente sanguínea, o dipeptídeo, L-alanil-glutamina sofre hidrólise liberando moléculas de aminoácidos livres alanina e glutamina (SOUBA, 1993).

Recentemente, o tratamento prévio com L-alanil glutamina (Ala-Gln) endovenosa demonstrou proteger contra lesão local, e a distância, provocada pela I/R de membro pélvico em modelo murino (MURPHY *et al.*, 2007). O mecanismo de ação permanece desconhecido, embora se suspeite que a Ala-Gln atue, tal qual o PCI, induzindo as proteínas do choque térmico (HSP_S) e, com isso, melhore a tolerância ao estresse tecidual local e remoto (WISCHMEYER 2002, WISCHMEYER *et al.* 2003, SINGLETON *et al.* 2005). Além dos

efeitos anteriores, esse aminoácido atenua o efeito de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (WISCHMEYER *et al.* 2003).

Conforme descrito, tanto o pré-tratamento com Ala-Gln quanto com PCI são estratégias potenciais a fim de preparar o organismo a tolerar o estresse em eventos de I/R (MURPHY *et al.*, 2007, KANORIA *et al.*, 2007). Não foram encontrados, na literatura pesquisada, estudos verificando o uso concomitante do pré-tratamento com Ala-Gln e com PCI. O presente estudo avalia alguns efeitos do pré-tratamento com Ala-Gln e com PCI, isolados e associados, frente às lesões causadas pela I/R da aorta infra-renal em ratos.

2. OBJETIVO

2.1 GERAL

Comparar os efeitos sistêmico e remoto entre a associação PCI / Ala-Gln e PCI ou Ala-Gln isolados em modelo de I/R dos membros pélvicos após pinçamento da aorta infra-renal em ratos.

2.2 ESPECÍFICOS

Avaliar o grau de lesão pulmonar remota, através da mensuração de mieloperoxidase (MPO), nesse órgão, em modelo de I/R.

Determinar o estresse oxidativo sistêmico e remoto, determinando os níveis séricos e pulmonar das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e da Glutathiona reduzida (GSH).

3. MÉTODO

O projeto foi enviado e aprovado previamente pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA, da Universidade Federal do Ceará, sob o número 43/05, em 16 de dezembro de 2005. Foram obedecidas às normas estabelecidas pelo *Council for international Organization of Medical Sciences* (CIOMS) e os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. A pesquisa foi realizada de acordo com as Normas Internacionais para a Pesquisa Biomédica em Animais (1990) e de acordo com a Lei Federal nº. 6.638, de 08 de maio de 1979.

3.1 Drogas e reagentes

Solução fisiológica

Composição por 100 ml:

Cloreto de sódio - 0,09g

Água purificada q.s.p – 100 ml

Dipeptiven® - N(2)-L-alanil-glutamina

Forma farmacêutica: solução de N(2)-L-alanil-glutamina para administração endovenosa.

Apresentação: Dipectiven® - Laboratório Frenesisus Kabi.

Composição em 100 ml:

N(2)-L-alanil-glutamina (8,20g de L-alanina; 13,46g de L-glutamina) – 20g

Água para injeção q.s.p. - 100 ml

3.2 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo experimental, randomizado, controlado e comparativo entre diferentes grupos de ratos Wistar, onde foi avaliado o grau de lesão pulmonar aguda e o estresse oxidativo em relação a I/R após pinçamento da aorta infra-renal em ratos pré-tratados com PCI ou Ala-Gln e ambos. A randomização dos grupos foi realizada através do “site” www.gaphpad.com, no ícone “quick calcs”, onde se randomizou a quantidade de ratos por cada grupo estudado.

3.3 Os animais

Foram utilizados 60 ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, machos, com massa corpórea oscilando entre 220 e 350 gramas e idade entre 52 a 127 dias. Os animais foram provenientes do biotério central da Universidade Federal do Ceará e mantidos no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Faculdade

de Medicina (UFC) em gaiolas de aço, recebendo água e alimento adequado *ad libitum* até 12 horas antes do início do experimento.

3.4 Procedimento anestésico

A técnica escolhida foi a anestesia intraperitoneal (IP) sem intubação traqueal e sem o emprego de suporte ventilatório. Os animais receberam infusões IP com xilazina e ketamina nas respectivas doses 10 e 90mg/Kg de peso, utilizando seringa e agulha de insulina (0,45 x 13mm) em quadrante inferior esquerdo. Durante o procedimento, a anestesia era mantida repetindo-se metade da dose inicial, sempre que necessário, a fim de manter o plano anestésico.

Obtido o nível anestésico adequado, os animais eram retirados do reservatório e posicionados na mesa operatória, em decúbito dorsal com extensão das quatro patas.

3.5 Técnica operatória

3.5.1 Punção e infusão endovenosa de substâncias testes e controles

Realizou-se a exposição da veia femoral de membro pélvico esquerdo a fim de infundir 2ml de solução salina 0,9% nos grupos que não receberam L-alanil-glutamina (Ala-Gln). Nos demais, infundiu-se 0,75 g/kg de Ala-Gln e solução salina, sempre respeitando o volume total de 2 ml. A infusão foi realizada previamente a realização da laparotomia.

A dissecação da veia foi efetuada através de pequena incisão na pele e tecido subcutâneo, longitudinal na face medial da coxa, permitindo a punção com uma agulha de insulina(0,25mm x 5mm) acoplada a seringa de 5 ml.

3.5.2 Laparotomia

Os grupos de estudo respeitaram um jejum de 12 horas, seguidos da infusão endovenosa, imediatamente anterior a laparotomia, conforme descrito anteriormente. Após assepsia e anti-sepsia adequadas, foi efetuada a abertura da cavidade abdominal, através de incisão mediana de cerca de 4cm de extensão (Figura 3). Afastam-se as alças intestinais a fim de dissecar aorta abdominal infrarrenal e isolá-la. Nos grupos pertinentes, efetuou-se o pinçamento conforme descrito a seguir, utilizando-se miniclipes vasculares temporários atraumáticos retos de cobalto TP 500-08 (Figura 4 e 5) e seu respectivo aplicador (Vicca Equipamentos Biomédicos LTDA®). Em todos os animais, foi realizada a síntese da parede abdominal com pontos separados e fechamento em massa do plano peritônio-músculo-aponeurótico com fio algodão 2-0 monofilamento preto esterilizado 15x25cm. Depois de decorrido o tempo apropriado e nova anestesia IP, retiraram-se os pontos e procedeu-se o sacrifício com coleta de material.



FIGURA 3 – Laparotomia

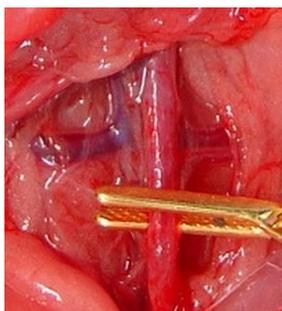


FIGURA 4 – Identificação e isolamento da aorta infra-renal sob visão direta prestes a realizar o pinçamento. Segmento arterial distal ainda repleto de sangue e com pulso.

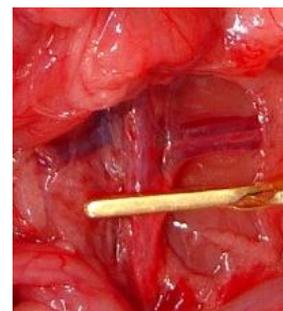


FIGURA 5 – Aorta infra-renal após o pinçamento. Segmento arterial distal sem pulso.

Cada grupo compreendeu 12 ratos, distribuídos em 6 animais por cada tempo, assim representados: **T1** (Tempo de isquemia máximo) – Animais submetidos apenas à isquemia de 4 horas e **T2** (Tempo de isquemia e reperfusão) – Ratos submetidos a I/R com sacrifício depois de decorridos 4 horas de isquemia e 1 hora de reperfusão. (Figura 6).

Os grupos são assim constituídos:

Grupo simulado: este grupo efetuou laparotomia e, passado 1 hora a fim de equiparar os tempos com os grupos submetidos ao PCI, realizou manipulação de alças intestinais com simulação do pinçamento da aorta abdominal, sacrificando-se 6 animais após 5 horas em T1 e 6 animais após 6 horas em T2. Desta forma, igualou-se os tempos dos grupos estudados.

Grupo I/R: realizou-se a laparotomia e, depois de 1 hora com a cavidade aberta, efetuou-se o pinçamento da aorta infra-renal, obedecendo ao processo de 4 horas de isquemia com sacrifício de 6 ratos no tempo máximo isquemia em T1(5 horas) e 6 ratos após 1 hora de reperfusão em T2 (6 horas).

Grupo PCI + I/R: procedeu-se o PCI, pinçando-se durante três períodos de 10 min. com intervalos de 10 min. cada, com uma posterior isquemia de 4 horas. Obedeceu-se aos mesmos tempos do grupo anterior para o sacrifício. O PCI em três ciclos foi baseado na evidência de que três ciclos são mais efetivos que apenas um (Saita *et al.*, 2002).

Grupo Ala-Gln + I/R: este grupo iniciou-se com a infusão de Ala-Gln imediatamente anterior à laparotomia. Esperou-se 1 hora com a cavidade aberta para, em seguida, pinçar a aorta infra-renal durante 4 horas. Sacrificou-se 6 animais no tempo máximo isquemia em T1 (5 horas) e após 1 hora de reperfusão em T2 (6 horas).

Grupo Ala-Gln + PCI + I/R: associou-se a Ala-Gln e o PCI como pré-tratamento, respeitando-se os mesmos tempos dos grupos anteriores (Figura 6).

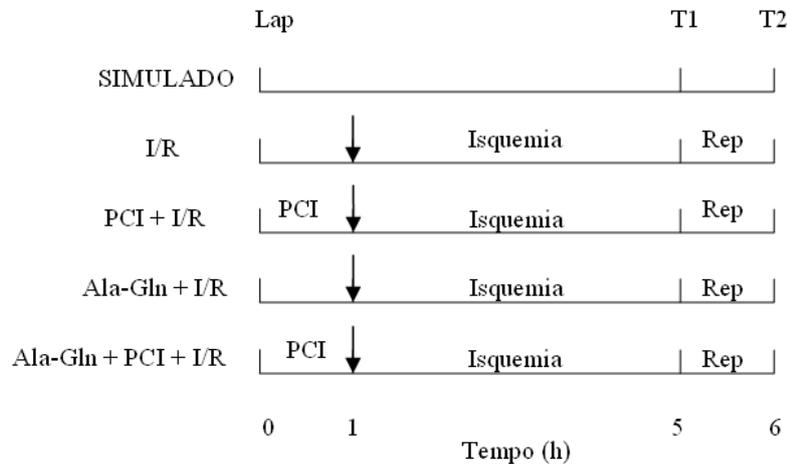


FIGURA 6 – Delineamento do experimento. Lap.: Laparotomia; PCI: condicionamento isquêmico; Ala-Gln: L-alanil-glutamina; I/R: Isquemia e reperfusão; T1: 4 h de isquemia (tempo de isquemia máximo); T2: 4 horas de isquemia e 1 hora de reperfusão; ↓: Momento do pinçamento em aorta infra-renal. Cada grupo foi composto de 12 animais com 6 animais sacrificados em cada tempo (T1, T2).

3.6 Coleta do material para análise

3.6.1 Coleta de sangue

Nos respectivos grupos de estudo, ainda sob narcose, procedeu-se a punção da aorta abdominal com agulha 0,6 x 25 mm e seringa de 10 ml previamente heparinizada. Foi retirado um mínimo de 3 ml de sangue por animal. Os tubos de ensaio contendo sangue arterial heparinizado foram acondicionados em centrífuga refrigerada Jouan modelo MR23i (França) e centrifugados a 4.000 r.p.m durante 10 minutos, mantendo-se a temperatura interna em 10° C. O plasma assim obtido foi dividido em alíquotas e imediatamente armazenado a -70° C.

3.6.2 Coleta de tecidos

Após a coleta de sangue, ainda sob efeito anestésico, os animais foram sacrificados por meio do deslocamento cervical. Em seguida, foram retirados fragmentos de tecido pulmonar de aproximadamente 1cm³ de volume do pulmão esquerdo. O material coletado foi lavado com soro fisiológico gelado (4° C) para a remoção de resquícios de sangue e imediatamente mergulhado em nitrogênio líquido em torno de -190 °C, baixando a

temperatura tissular à aproximadamente -80°C em um tempo inferior a 0,1 segundo. Após o congelamento, procedeu-se à fragmentação do material utilizando-se grau e pistilo de porcelana. Os fragmentos, em número variável (4 a 6), foram colocados em tubos de ensaio e armazenados a 70° centígrados negativos, até sua utilização.

3.7 Técnica laboratorial

3.7.1 Dosagem de mieloperoxidase

A MPO contida no tecido pulmonar foi determinada usando uma versão modificada da técnica descrita por Bradley *et al.* em 1982.

Realizou-se a toracotomia com retirada do esterno a fim de pinçar hilo pulmonar direito com pinça Kelly curva. Em seguida, procedeu-se a punção do átrio direito com seringa 60ml e agulha 0,7 x 25mm lavando-se o pulmão esquerdo com solução salina 0,9% até obter-se tecido pulmonar com coloração esbranquiçada. Reservou-se a amostra de tecido mais descorada para dosar MPO. Após o mergulho em nitrogênio líquido, o fragmento foi acondicionado em tubo tipo Eppendorf a -70°C .

Após o congelamento, amostra com 100mg de tecido pulmonar foi homogeneizada em uma solução de brometo de hexadecitrimetilamônio 0,5% (HTAB) em tampão fosfato 50mM, pH 6.0, (1 ml por 50g do tecido) .O homogenato foi submetido a três ciclos de congelamento (5 minutos a -70°C) e descongelamento (15 segundos no sonicador ULTRASONIC 1434DA - ODONTOBRAS®). As amostras foram então centrifugadas a 4000 r.p.m. em uma temperatura de 4°C , por 15 minutos, para remover o material insolúvel. A MPO contida no sobrenadante (0,1ml) foi analisada por espectrofotômetro VANKEL 50 UV VISIVEL (VARIAN® U.S.A) após a adição de 2,9ml de tampão fosfato (50 mM, pH6) contendo 0,167mg/ml de hidrocloreto de θ – dianisidine e 0,0005% de peróxido de hidrogênio. As cinéticas de mudança na absorbância a 470nm foram medidas no tempo 0 e 5 minutos (BRADLEY, 1982). Obtêm-se a concentração final de MPO comparando-se o valor da absorbância com uma tabela padrão de MPO, preparada previamente (Apêndice A) As concentrações de MPO foram expressas em unidade / g de tecido pulmonar.

3.7.2 Avaliação da peroxidação lipídica pela reação com ácido tiobarbitúrico

A técnica avalia o teor do dialdeído malônico (MDA) formado na lipoperoxidação. O MDA, quando aquecido em meio ácido, reage com ácido tiobarbitúrico (TBA) originando um solvente orgânico de cor rosa. A extração desse composto utilizando solvente orgânico (n-butanol) apresenta sua concentração determinada e expressa como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (UCHIYAMA; MIHARA, 1978; OHKHAWA *et al.*, 1979).

Reagentes:

Cloreto de potássio: 1,15%

Ácido tiobarbitúrico: 0,6%

Ácido fosfórico: 1%

N-butanol

Procedimento:

Através do método de Uchiyama e Mihara (1978), frequentemente utilizado para estimar a peroxidação lipídica, foi determinado o teor de TBARS. A amostra de tecido a ser estudada foi congelada em nitrogênio líquido e estocada a -70°C imediatamente após a coleta e lavagem com soro fisiológico gelado (4°C) para remover quaisquer vestígios de sangue. Após pesagem, o fragmento de tecido foi homogeneizado em KCl gelado 1,15%, resultando em uma solução ácida com concentração a 10%. Separou-se uma alíquota de 0,5 ml de cada amostra e acrescentou-se 1,0 ml da solução aquosa de TBA 0,6% e 3,0 ml da solução de ácido fosfórico (H_3PO_4 , 1%). O composto resultante foi colocado em banho fervente por 45 minutos, resfriado em banho de gelo seguido da adição de 4,0 ml de N-butanol. Após 2,0 minutos de agitação, a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 3000 r.p.m. A absorbância da camada orgânica sobrenadante (fase butanólica) foi medida em espectrofotômetro (VANKEL 50 UV VISIVEL – VARIAN® U.S.A) a 520 nm e 535 nm.

A diferença entre os valores obtidos nas duas leituras foi utilizada para calcular a concentração de TBARS, usando a regressão linear a partir de uma curva padrão, previamente preparada (Apêndice B) As concentrações do TBARS foram expressas em μmol de dialdeído malônico (MDA) /g de tecido fresco e μmol de MDA /ml de sangue.

3.7.3 Determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos

Para determinação da GSH calculou-se o teor dos grupos sulfidrílicos (SH) através do método de Sedlak e Lindsay (1968), baseado na reação de 5,5`-ditiobis (2-ácido nitrozenzóico) (DTNB – reagente de Ellman) com o tiol livre, originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A mensuração do produto de reação formado foi realizada por leitura da absorbância a 412nm em espectrofotômetro (VANKEL 50 UV VISIVEL – VARIAN® U.S.A)

Drogas e Reagentes:

Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)

Ácido tricloracético (ATC, 50%)

Tampão TRIS 0,4 M pH 8,9

5,5`-ditiobis (2-ácido nitrozenzóico) (DTNB) 0,5M)

Metanol

Glutathiona (GSH, 1 mg/ml)

Preparação dos reagentes:

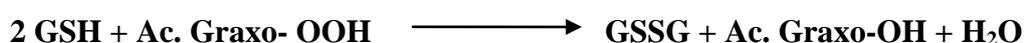
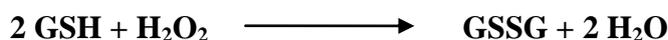
Ácido tricloroacético 50% - diluído em água destilada

Preparação dos reagentes:

EDTA Na₂ 0,2M PM 372,2 (% ,211g + H₂O qsp 70ml)

EDTA Na₂ 0,02M (30 ml de EDTA Na₂ 0,2M + H₂O qsp 300ml)

Reação:



Procedimento:

A amostra de tecido (500 mg) foi pesada e homogeneizada em 5 ml de EDTA 0,02M gelado, com bastão de vidro e filtrado em lã de vidro. Separou-se 4,0 ml do homogenado e misturou-se com 3,2 ml de água destilada e 0,8ml de ácido tricloroacético 50%. O tubo foi agitado e centrifugado a 3000 giros por 15 minutos. Retiraram-se 2,0 ml do sobrenadante e acrescentou-se 4,0 ml de TRIS 0,4 M (pH 8,9) e 0,1 ml de DTNB 0,01 M. Agitou-se a mistura para homogeneização. Em seguida, foram lidas as absorvâncias no espectrofotômetro VANKEL 50 UV VISIVEL (VARIAN® U.S.A) à 412nm, 5 minutos após o acréscimo de DTNB. Chegou-se à concentração final de GSH comparando-se o valor da absorvância com uma tabela padrão de GSH, adrede preparada (Apêndice C). As concentrações de GSH foram expressas em µmol /g de tecido fresco e µmol /ml de sangue.

3.8 Análise estatística

Para todas as variáveis estudadas, efetuou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov de normalidade. Diante da presença de normalidade, os dados foram expressos como média acompanhada pelo seu desvio padrão (Média \pm DPM) aplicando-se o teste t de Student quando comparados dois grupos e Anova com pós-teste de Tukey quando comparados três ou mais grupos.

Em todos os casos foi adotado o nível de significância de $p < 0,05$.

Para os cálculos estatísticos utilizou-se os programas *GraphPad Prism*® versão 4.00 para *Windows*, *GraphPad Software, San Diego, Califórnia, U.S.A.*, www.graphpad.com.

4. RESULTADOS

Os resultados foram apresentados em forma de tabelas e gráficos do tipo coluna, com os valores expressos pela média e desvio padrão, demonstrando-se o nível de significância, quando pertinente.

4.1 Dosagem de MPO pulmonar

4.1.1 Tempo de isquemia máximo – T1

TABELA 1 – Atividade da MPO pulmonar (unidade /g de tecido fresco) nos grupos submetidos à isquemia. Valores expressos em média \pm DPM.

	SIMULADO	I	PCI + I	ALA-GLN + I	ALA-GLN + PCI + I
MPO PULMÃO	0,153 \pm 0,05	0,447 \pm 0,04 [*]	0,31 \pm 0,06 ^{**}	0,066 \pm 0,15 ^{***}	1,372 \pm 0,1 ^{+ □}

* p < 0,05 comparado com o grupo Simulado – Teste t

** p < 0,01 comparado com o grupo I – Teste t

*** p = 0,001 comparado com o grupo I – Teste t

+ p < 0,001 comparado com o grupo PCI + I – Anova

□ p < 0,001 comparado com o grupo ALA-GLN + I – Anova

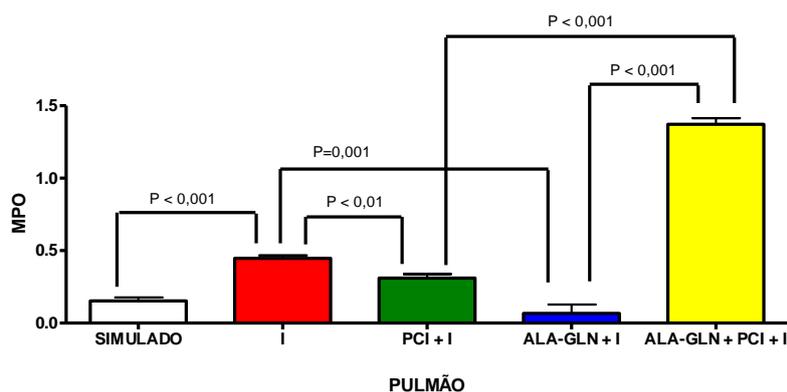


FIGURA 7 – Atividade da MPO pulmonar (unidade /g de tecido fresco).

Conforme os resultados obtidos através da comparação estatística entre os grupos **Simulado** e **Isquemia (I)** revelou-se elevação das concentrações de MPO pulmonar ($p < 0,001$). Na comparação entre os grupos **I** e **PCI + I**, bem como os grupos **I** e **Ala-Gln + I**, foi observada a redução da atividade da MPO pulmonar ($p < 0,01$ e $p = 0,001$). Já a associação dos dois pré-tratamentos (Ala-Gln e PCI) elevou a atividade de MPO pulmonar na isquemia quando comparado com o grupo **PCI + I/R** ($p < 0,001$) e o grupo **Ala-Gln + I/R** ($p < 0,001$).

4.1.2 Grupos submetidos à I/R- T2

TABELA 2 – Atividade da MPO pulmonar (unidade /g de tecido fresco) nos grupos submetidos à I/R. Valores expressos em média \pm DPM.

	SIMULADO	I/R	PCI + I/R	ALA-GLN + I/R	ALA-GLN + PCI+ I/R
MPO PULMÃO	0,17 \pm 0,09	0,826 \pm 0,08*	0,781 \pm 0,16	0,97 \pm 0,14	1,31 \pm 0,15** ***

* p < 0,001 comparado com o grupo Simulado - Teste t.

** p < 0,001 comparado com o grupo PCI + I/R - Anova

*** p < 0,01 comparado com o grupo ALA-GLN + I/R - Anova

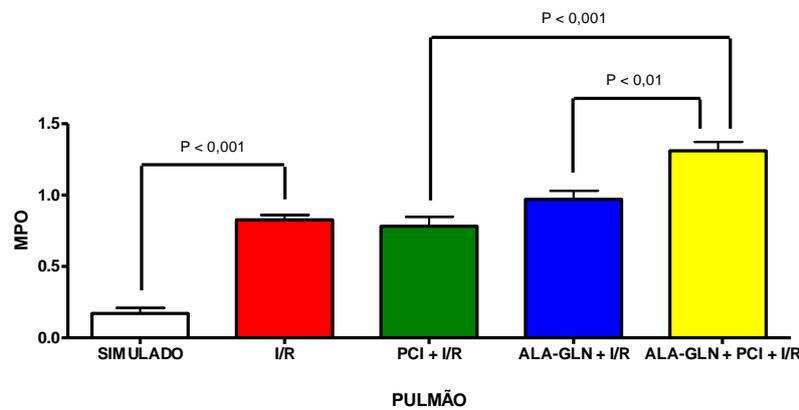


FIGURA 8 - Atividade da MPO pulmonar (unidade /g de tecido fresco).

Na comparação entre os grupos **Simulado** e **I/R** evidencia-se elevação da atividade da MPO pulmonar ($p < 0,001$). Não se observou alteração estatisticamente significativa nos níveis mensurados de MPO pulmonar nos grupos submetidos ao pré-tratamento com Ala-Gln ou com PCI. Já quando associados os dois pré-tratamentos (Ala-Gln e PCI) houve elevação significativa da atividade de MPO pulmonar na I/R quando comparado com o grupo **PCI + I/R** ($p < 0,001$) e o grupo **Ala-Gln + I/R** ($p < 0,01$).

4.2 Dosagem de TBARS plasmático

4.2.1 Tempo de isquemia máximo – T1

TABELA 3 – Atividade do TBARS plasmático (μmol of MDA /ml) nos grupos submetidos à isquemia. Valores expressos em média \pm DPM.

	SIMULADO	I	PCI + I	ALA-GLN + I	ALA-GLN + PCI + I
PLASMA TBARS	0,0107 \pm 0,043	0,0108 \pm 0,0061	0,0095 \pm 0,0022	* 0,0040 \pm 0,0014	** *** 0,0129 \pm 0,0004

* $p < 0,05$ comparado com o grupo I – Teste t

** $p < 0,01$ comparado com o grupo PCI + I - Anova

*** $p < 0,001$ comparado com o grupo ALA-GLN + I - Anova

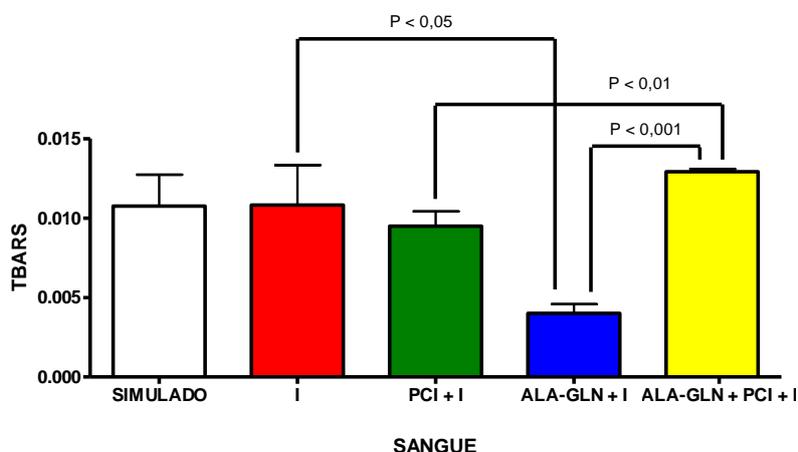


FIGURA 9 - Atividade do TBARS (μmol de MDA /ml) no sangue.

Na comparação entre os grupos **Simulado** e **Ala-Gln + I**, foi encontrada diferença significativa ($p < 0,05$) com diminuição da atividade sanguíneas do TBARS. Observou-se uma elevação estatisticamente significativa da atividade do TBARS na associação dos dois pré-tratamentos tanto na comparação do grupo **Ala-Gln + PCI + I** com o grupo **PCI + I** ($p < 0,01$), quanto com o grupo **Ala-Gln + I** ($p < 0,001$).

4.2.2 Grupos submetidos à I/R- T2

TABELA 4 – Atividade do TBARS plasmático (μmol of MDA /ml) nos grupos submetidos à I/R. Valores expressos em média \pm DPM.

	SIMULADO	I/R	PCI + I/R	ALA-GLN + I/R	ALA-GLN + PCI+ I/R
PLASMA TBARS	0,0047 \pm 0,0015	* 0,0195 \pm 0,0092	0,0168 \pm 0,004	0,0165 \pm 0,0039	0,0158 \pm 0,0116

* p = 0,01 comparado com o grupo Simulado – Teste t.

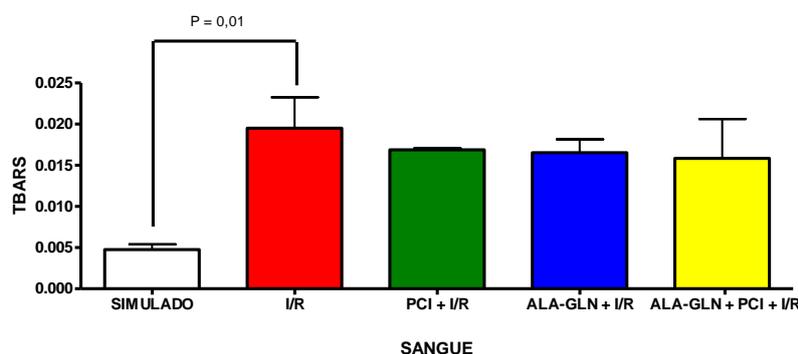


FIGURA 10 - Atividade do TBARS (μmol de MDA/ml) no sangue.

Ao se comparar os grupos **Simulado** e **I/R**, encontrou-se diferença significativa com elevação da atividade do TBARS ($p = 0,01$). Não foram evidenciadas alterações estatisticamente significantes nas demais comparações.

4.3 Dosagem de TBARS pulmonar

4.3.1 Tempo de isquemia máximo – T1

TABELA 5 – Atividade do TBARS pulmonar (μmol de MDA /g tecido fresco) nos grupos submetidos à isquemia. Valores expressos em média \pm DPM.

	SIMULADO	I	PCI + I	ALA-GLN + I	ALA-GLN + PCI + I
TBARS PULMÃO	0,011 \pm 0,0059	0,011 \pm 0,0087	0,006 \pm 0,001	0,006 \pm 0,0036	0,004 \pm 0,0006

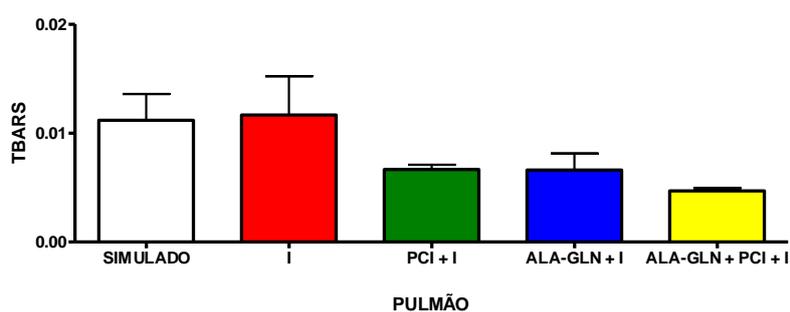


FIGURA 11 – Atividade do TBARS pulmonar (μmol de MDA /g tecido fresco)

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes com relação aos níveis de TBARS pulmonar nos grupos analisados durante a isquemia.

4.3.2 Grupos submetidos à I/R- T2

TABELA 6 – Atividade do TBARS pulmonar (μmol de MDA /g tecido fresco) nos grupos submetidos à I/R. Valores expressos em média \pm DPM.

	SIMULADO	I/R	PCI + I/R	ALA-GLN + I/R	ALA-GLN + PCI+ I/R
TBARS PULMÃO	0,009 \pm 0,0003	0,006 \pm 0,0017	0,001 \pm 0,0022	0,008 \pm 0,0028	0,01 \pm 0,0041

* $p < 0,01$ comparado com o grupo Simulado – Teste t

** $p < 0,01$ comparado com o grupo I/R – Teste t

*** $p < 0,05$ comparado com o grupo PCI + I/R- Anova

+ $p < 0,01$ comparado com o grupo ALA-GLN + I/R- Anova

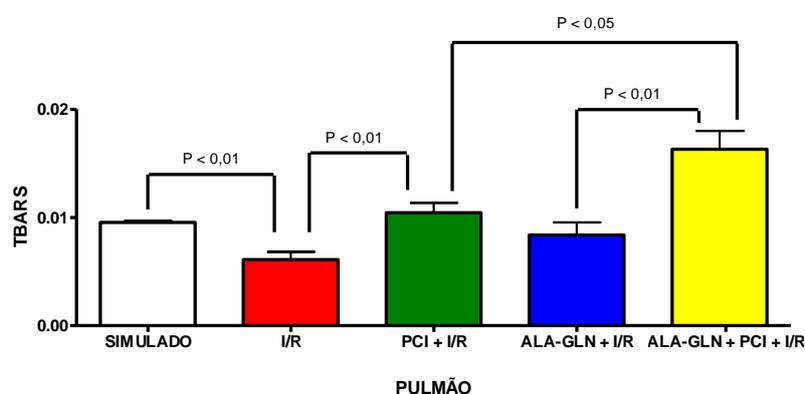


FIGURA 12 - Atividade do TBARS pulmonar (μmol de MDA /g tecido fresco).

Conforme os resultados obtidos através da comparação estatística entre os grupos **Simulado** e **I/R**, observou-se diferença significativa ($p < 0,01$) com redução da atividade pulmonar do TBARS. Ao se comparar os grupos **I/R** e **PCI + I/R**, nota-se diferença significativa ($p < 0,01$) com elevação na atividade do TBARS. Evidenciou-se um aumento significativo na atividade do TBARS na associação dos dois pré-tratamentos, tanto na comparação do grupo **Ala-Gln + PCI + I/R** com o grupo **PCI + I/R** ($p < 0,05$), quanto com o grupo **Ala-Gln + I/R** ($p < 0,01$).

4.4 Dosagem de Glutathiona plasmática

4.4.1 Tempo de isquemia máximo – T1

TABELA 7 – Atividade de GSH plasmática ($\mu\text{mol /ml}$) nos grupos submetidos à isquemia. Valores expressos em média \pm DPM.

	SIMULADO	I	PCI + I	ALA-GLN + I	ALA-GLN + PCI + I
GSH PLASMA	41,3 \pm 28,7	22,2 \pm 12,6	30,4 \pm 9,7	10,8 \pm 1,9	12,5 \pm 5,6 *

* $p < 0,001$ comparado com o grupo PCI + I - Anova

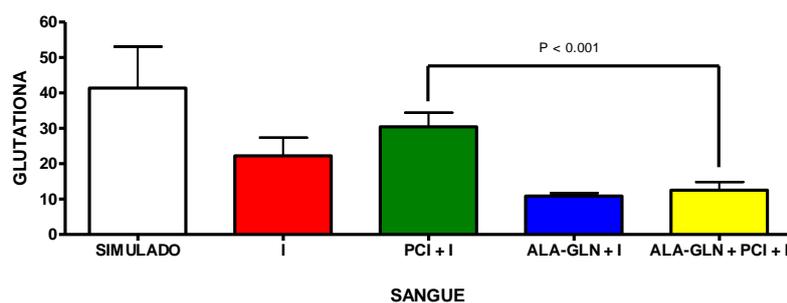


FIGURA 13 - Atividade plasmática de GSH ($\mu\text{mol /ml}$).

Verificou-se uma redução na atividade de GSH estatisticamente significativa na associação dos dois pré-tratamentos quando comparado o grupo **PCI + I** com o grupo **Ala-Gln + PCI + I** ($p < 0,001$).

4.4.2 Grupos submetidos à I/R- T2

TABELA 8 – Atividade de GSH plasmática ($\mu\text{mol}/\text{ml}$) nos grupos submetidos à I/R. Valores expressos em média \pm DPM.

	SIMULADO	I/R	PCI + I/R	ALA-GLN + I/R	ALA-GLN + PCI+ I/R
GSH PLASMA	19,1 \pm 2,8	18,9 \pm 4,3	23,7 \pm 4,4	2,4 \pm 0,83	33,3 \pm 5,4

* $p < 0,001$ comparado com o grupo I/R – Teste t

** $p < 0,01$ comparado com o grupo PCI + I/R - Anova

*** $p < 0,001$ comparado com o grupo ALA-GLN + I/R - Anova

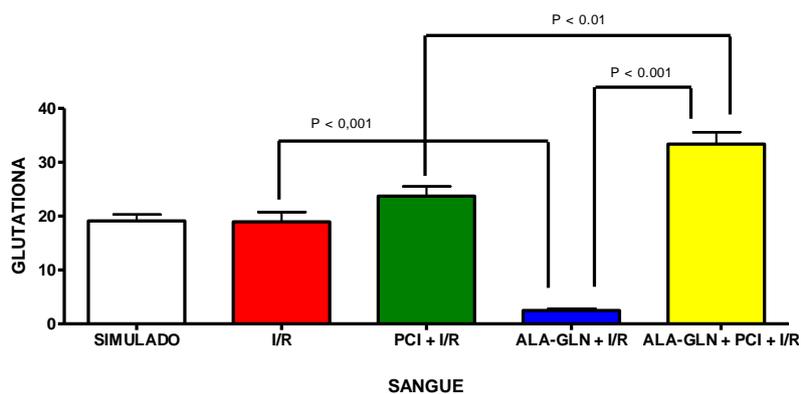


FIGURA 14 - Atividade plasmática de GSH ($\mu\text{mol}/\text{ml}$).

Houve redução significativa da atividade de GSH plasmática ($p < 0,001$) quando comparado o grupo **I/R** com o grupo **Ala-Gln + I/R**. Evidenciou-se um aumento significativo da atividade de GSH na associação dos dois pré-tratamentos, tanto na comparação do grupo **Ala-Gln + PCI + I/R** com o grupo **PCI + I/R** ($p < 0,01$), quanto com o grupo **Ala-Gln + I/R** ($p < 0,001$).

4.5 Dosagem de Glutathiona pulmonar

4.5.1 Tempo de isquemia máximo – T1

TABELA 9 – Atividade de GSH pulmonar ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco) nos grupos submetidos à isquemia. Valores expressos em média \pm DPM.

	SIMULADO	I	PCI + I	ALA-GLN + I	ALA-GLN + PCI + I
GHS PULMÃO	18,6 \pm 4,8	* 36,16 \pm 16,4	22,8 \pm 14,2	** 11,4 \pm 4,2	20,1 \pm 5,1

* p < 0,05 comparado com o grupo Simulado – Teste t

** p < 0,05 comparado com o grupo I – Teste t

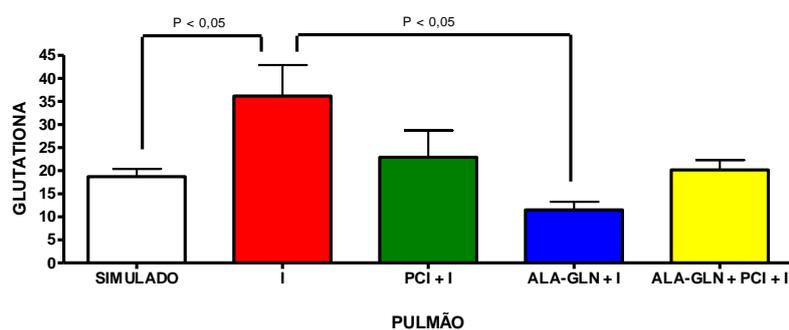


FIGURA 15 - Atividade de GSH pulmonar ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco).

Ao se comparar o grupo **Simulado** com o grupo **I**, encontrou-se diferença significante ($p < 0,05$) com elevação da atividade de GSH pulmonar. Ocorreu redução das concentrações de GSH pulmonar ($p < 0,05$) quando se comparou o grupo **I** com o grupo **Ala-Gln + I**.

4.5.2 Grupos submetidos à I/R- T2

TABELA 10 – Atividade de GSH pulmonar (μmol /g de tecido fresco) nos grupos submetidos à I/R. Valores expressos em média \pm DPM.

	SIMULADO	I/R	PCI + I/R	ALA-GLN + I/R	ALA-GLN + PCI + I/R
GSH PULMÃO	15,8 \pm 3,5	48,2 \pm 15,2 *	15,2 \pm 1,5 **	57,9 \pm 28,1	46,8 \pm 6,1 ***

* p < 0,01 comparado com o grupo Simulado – Teste t

** p < 0,01 comparado com o grupo I/R – Teste t

*** p < 0,01 comparado com o grupo ALA-GLN + I/R - Anova

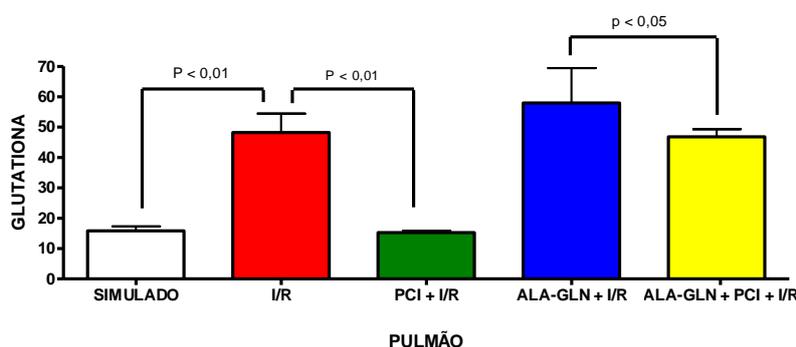


FIGURA 16 - Atividade de GSH pulmonar (μmol /g de tecido fresco).

Ao se comparar os grupos **Simulado** e **I/R**, foi evidenciada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) com aumento da atividade de GSH pulmonar. Observou-se redução significativa da atividade de GSH pulmonar ($p < 0,01$) quando comparado o grupo **I/R** com o grupo **PCI + I/R**. Houve redução significativa da atividade de GSH na associação dos dois pré-tratamentos quando comparados os grupos **PCI + I/R** e **Ala-Gln + PCI + I/R** ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

O rato da linhagem *Wistar* foi escolhido como animal de experimentação por apresentar fácil manuseio e elevada resistência à infecção e ao trauma cirúrgico, bem como primorosa hemostasia. Pelo exposto, esse animal é o preferido pela maioria dos pesquisadores em estudos experimentais semelhantes (FESTING, 1949). Além disso, o rato apresenta anatomia arterial e venosa de membro pélvico semelhante à do homem, proporcionando um bom modelo de estudo (TORRES, 2002).

A técnica escolhida foi a anestesia intraperitoneal (IP) com xilazina e ketamina (10 e 90mg/Kg de peso), sem intubação traqueal e sem o emprego de suporte ventilatório. Trata-se de técnica de fácil execução com o mínimo de equipamento e bem tolerada pelo animal.

Vários modelos experimentais de isquemia e reperfusão aguda de membro pélvico de ratos foram estudados nos últimos anos. Infelizmente, tais modelos são de difícil preparação e carecem de padronização, principalmente devido ao grande número de vasos colaterais desse animal. Essa alteração dificulta o estudo experimental do fenômeno obstrutivo, principalmente na região da artéria ilíaca externa e artéria femoral comum (BABUCCU *et al.*, 2004).

A maioria dos experimentos recentes sobre isquemia e reperfusão (I/R) de membro pélvico de rato apresenta o torniquete como meio para ocluir o sistema arterial, em geral com duração superior a duas horas (PREM *et al.*, 1999; BABUCCU *et al.*, 2004; AKGUN *et al.*, 2004; OLGUNER *et al.*, 2006; MURPHY *et al.*, 2007). A compressão extrínseca, embora evite um procedimento mais invasivo e delicado, apresenta a relevante desvantagem de ocluir, além do sistema arterial, o sistema venoso e linfático. Acrescenta-se a isso a dificuldade de mensurar a intensidade compressora e a dimensão do trauma sobre os nervos e partes moles da região comprimida, bem como as repercussões locais e sistêmicas desse modelo (CODEIRO; BARACAT, 1983; PEDOWITZ, 1991).

O presente trabalho utilizou o pinçamento da aorta infra-renal, sob visão direta, para obtenção de isquemia aguda e normotérmica com duração de 4 horas. Quando se oclui apenas a artéria, assemelha-se ao que ocorre na vivência clínica nos casos de isquemia aguda dos membros inferiores, por trombose ou embolia arterial (VOLLMAR, 1982; MELO, 1998). A oclusão da aorta abdominal infra-renal, utilizada no presente estudo de forma inédita, propicia uma maior intensidade de isquemia do que o método do torniquete. Este último apenas oclui a artéria femoral comum, mais distal e de menor eficácia isquêmica. Optou-se

por esse modelo, após vários pilotos, em que se variou o tempo cirúrgico e tempo de reperfusão, obtendo um modelo reprodutível com baixa mortalidade.

O condicionamento isquêmico (PCI) e a glutamina têm sido apontados como protetores contra as lesões de I/R nos mais diversos órgãos, quando usados isoladamente (KANORIA *et al.*, 2007; MURPHY *et al.*, 2007). Na literatura pesquisada, não se encontrou o registro dos dois pré-tratamentos associados.

O modelo ora proposto realizou o pré-tratamento com PCI e L-alanil glutamina (Ala-Gln) isolados e associados, a fim de estudar as alterações sistêmicas e remotas, frente à lesão de I/R da aorta infra-renal. Determinou-se a atividade de mieloperoxidase (MPO) pulmonar para avaliar neutrófilos ativados e conseqüente análise indireta da inflamação pulmonar como efeito remoto, bem como o nível sanguíneo e pulmonar das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da glutatona reduzida (GSH) como efeito sistêmico e remoto do estresse oxidativo.

A MPO é uma enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos ativados. Ultimamente, tem sido empregada como marcador quantitativo da infiltração neutrofílica em diversos tecidos acometidos por processos inflamatórios. A atividade da MPO é aceita como um padrão fidedigno da infiltração de neutrófilos ativados em tecidos inflamados (OLGUNER, *et al.*, 2006). Vários estudos utilizaram a MPO para este fim em modelos de I/R de membro pélvico (PREM *et al.*, 1999; HARKIN *et al.*, 2002; ÇALIKOGLU *et al.*, 2003; DURU *et al.*, 2005; MURPHY *et al.*, 2007).

Dessa forma, ao comparar o grupo Simulado com o grupo Isquemia (I) observou-se elevação das concentrações de MPO pulmonar caracterizando uma maior lesão pulmonar aguda à distância, por efeito da isquemia realizada em aorta infra-renal (Tabela 1 e Figura 7). Já na comparação do grupo Simulado com o grupo I/R, constatou-se uma elevação das concentrações de MPO pulmonar, refletindo também lesão pulmonar aguda decorrente de uma isquemia remota de 4 horas somada a 1 hora de reperfusão (Tabela 2 e Figura 8).

Desse modo, evidenciou-se a lesão remota pulmonar no modelo proposto tanto para a isquemia quanto para a I/R. Esses resultados corroboram com o encontrado na literatura durante a I/R de membro pélvico (HARKIN *et al.*, 2002; ÇALIKOGLU *et al.*, 2003; OKUTAN *et al.*, 2004; KAÇMAZ *et al.*, 2005; KURTOGLU *et al.*, 2007).

Constatou-se, ainda, o efeito protetor do PCI e da Ala-Gln na isquemia através da redução das concentrações de MPO pulmonar frente à lesão remota provocada pelo pinçamento da aorta infra-renal em ratos (Tabela 1 e Figura 7).

Harkin *et al.*, em 2002, demonstraram em porcos que a isquemia bilateral de membros inferiores, tal qual ocorre nas cirurgias aórticas, provoca lesão pulmonar, e o PCI a previne. Já Olguner *et al.*, em 2006, evidenciaram proteção remota pulmonar após PCI em modelo de I/R de membro pélvico por torniquete unilateral, demonstrando que até isquemias unilaterais, condição mais frequentemente encontrada nas aplicações clínicas atuais dos torniquetes, podem causar lesão pulmonar, e que o PCI tem um efeito protetor pulmonar.

Sabe-se que a lesão por I/R causa inflamação sistêmica por meio de citocinas sistêmicas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6), bem como pela ativação de monócitos e neutrófilos (WAKAI, *et al.*, 2001; YASSIN, *et al.*, 2002). Além disso, durante o processo inflamatório provocado pela I/R, o pulmão é o órgão a ser lesionado preferencialmente quando comparado com rim e fígado. Nesse contexto o TNF- α representa o mediador primário da síndrome da resposta inflamatória sistêmica e os seus níveis aumentam durante a I/R (YASSIN, *et al.*, 2002). O exato mecanismo de proteção realizado pelo PCI em lesões de I/R ainda é desconhecido, embora se suspeite que o PCI possa atenuar a ação de citocinas pró-inflamatórias nos tecidos isquêmicos reduzindo a disfunção endotelial e inibindo a expressão do TNF- α e das moléculas de adesão, principalmente da P-selectina (PERALTA, *et al.*, 2001).

É sabido que prolongadas isquemias de membros inferiores com subsequente reperfusão resultam em lesões locais e em órgãos remotos, e que nos casos mais acentuados de isquemia, a reperfusão posterior é associada à falência múltipla de órgãos e alto índice de mortalidade (YASSIN, *et al.*, 2002).

Desse modo, há um crescente corpo de evidências que suporta os benefícios do papel de PCI antes de procedimentos cirúrgicos que necessitam de isquemia, uma vez que a redução da lesão pulmonar pode diminuir a morbidade e a mortalidade (KANORIA *et al.*, 2007).

Já na avaliação da proteção pela Ala-Gln, pode-se dizer que uma hipótese para justificar esse efeito protetor encontra-se na propriedade da glutamina de induzir as proteínas do choque térmico (HSPs). Essas proteínas são responsáveis pela proteção contra diversas formas de lesão celular, tais como choque e I/R. Numerosos estudos demonstraram que a glutamina, um aminoácido condicionalmente essencial, pode aumentar a expressão “in vitro” das proteínas do choque térmico e aumentar a sobrevivência celular contra vários estímulos de estresse. (WISCHMEYER *et al.*, 2002, WISCHMEYER *et al.*, 2003, SINGLETON *et al.*, 2005).

SINGLETON *et al.*, em 2005, demonstraram que, em pacientes com choque séptico, uma única dose de glutamina pode aumentar a expressão da proteína do choque térmico – 70 (HSP-70) nos macrófagos e células epiteliais pulmonares, reduzindo, com isso, a disfunção metabólica pulmonar.

Além dos efeitos anteriores, esse aminoácido melhora as funções metabólicas tissulares, atenua o estresse oxidativo e reduz o efeito de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), reduzindo sobremaneira a resposta inflamatória sistêmica (WISCHMEYER, 2007).

MURPHY *et al.*, em 2007, demonstraram os efeitos protetores local e remoto do pré-tratamento com a glutamina contra a lesão por isquemia e reperfusão em modelo de isquemia de membro pélvico em rato, sugerindo um possível mecanismo de ação comum entre o pré-tratamento com glutamina e PCI, através da elevação da HSPs.

NAMAZI acredita que a glutamina possa diminuir a expressão da molécula de adesão dos neutrófilos, antígeno de função leucocitária-1 (LFA-1) que se liga à molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) expressa no endotélio. A interação da LFA-1/ICAM-1 é essencial para o ingresso dos neutrófilos nos sítios inflamados. A glutamina interfere na relação acima ao ligar-se à LFA-1, impossibilitando a entrada dos neutrófilos e, com isso, impedindo a liberação de espécies reativas do oxigênio e citocinas que causam dano extra nos tecidos lesados (NAMAZI, 2008).

No presente estudo não se evidenciou proteção pelo PCI ou pela Ala-Gln contra a lesão produzida pela I/R (Tabela 2 e Figura 8), conforme descrito por outros autores (HARKIN *et al.*, 2002; OLGUNER *et al.*, 2006; MURPHY *et al.*, 2007). Uma possível explicação seria o breve período de reperfusão (1 hora), visto que na maioria dos trabalhos publicados o tempo de reperfusão é geralmente superior ao empregado aqui. Em momento anterior, foi tentada a padronização de 4 horas de reperfusão, contudo, houve uma elevada mortalidade dos animais, inviabilizando o mesmo. Provavelmente, o pré-tratamento realizado isoladamente com PCI ou Ala-Gln não foi suficiente para suplantiar os danos provocados pelas 4 horas de isquemia e 1 hora de reperfusão empregados neste modelo.

Quando houve a associação entre o PCI e a Ala-Gln, como pré-tratamento, observou-se aumento da lesão pulmonar, tanto na isquemia quanto na I/R (Tabelas 1 e 2, Figuras 7 e 8).

O teste com ácido tiobarbitúrico permanece ainda hoje com um dos processos mais utilizados para mensurar a peroxidação lipídica (GUIMARÃES, 2005). Essa técnica é de

fácil execução, baixo custo, e pode ser empregada em diversos tecidos (UCHIYAMA; MIHARA, 1978; OHKHAWA *et al.*, 1979).

Trabalhos científicos, em modelos experimentais de I/R de membro pélvico, utilizando a determinação do TBARS para avaliar a peroxidação lipídica, estão disponíveis na literatura (HARKIN *et al.*, 2002; OLGUNER *et al.*, 2006).

No estudo vertente, durante a isquemia, os animais que receberam Ala-Gln apresentaram atividade plasmáticas de TBARS inferior, sugerindo algum efeito protetor sistêmico (Tabela 3 e Figura 9). Não foram encontrados, na literatura pesquisada, estudos avaliando a peroxidação lipídica plasmática e Ala-Gln na isquemia pura.

Após a reperfusão de 1 hora, observou-se um aumento do TBARS plasmático quando comparado ao grupo Simulado, evidenciando, como esperado, aumento da peroxidação lipídica, uma vez que há oxigênio no restabelecimento da circulação (Tabela 4 e Figura 10). Achados semelhantes foram encontrados na I/R de membro pélvico unilateral de ratos com aumento da lipoperoxidação plasmática após duas horas de reperfusão (OLGUNER *et al.*, 2006) e quatro horas de reperfusão (ÇALIKOGLU *et al.*, 2003).

O grupo onde foi realizado o PCI associado à Ala-Gln apresentou elevação dos níveis do TBARS, corroborando com os resultados de agravamento de lesão com os dois pré-tratamentos obtidos remotamente no pulmão com a MPO (Tabela 3 e Figura 9). Já quando avaliado o mesmo pré-tratamento na I/R, não se evidenciou diferença significativa na atividade do TBARS plasmático (Tabela 4, Figura 10).

No presente estudo, não houve diferença entre os grupos Simulado e I com relação à peroxidação lipídica, bem como nem o PCI nem a Ala-Gln protegeram o pulmão submetido à isquemia remota (Tabela 5 e Figura 11).

Na reperfusão, ao contrário do esperado, constatou-se uma menor peroxidação lipídica remota pulmonar quando se compara o grupo Simulado versus I/R de membro pélvico. O PCI aumentou a peroxidação lipídica pulmonar à distância nos grupos submetidos a I/R. Já a Ala-Gln não alterou a peroxidação lipídica pulmonar nos grupos com I/R (Tabela 6 e Figura 12).

Em estudo de I/R por torniquete de membro pélvico unilateral foi observado aumento da peroxidação lipídica pulmonar quando comparado com grupo controle submetido apenas à anestesia (ÇALIKOGLU *et al.*, 2003). Já Okutan *et al.*, em 2004, e Kurtoglu *et al.*, em 2007, também encontraram elevação da lipoperoxidação pulmonar em modelo de I/R através de pinçamento da aorta infra-renal.

Ressalta-se que o grupo Simulado do presente estudo não foi um grupo isento de trauma, uma vez que o mesmo foi submetido à laparotomia com duração de 5 ou 6 horas. Talvez, por esse motivo, observou-se também uma elevação da peroxidação lipídica nesses grupos.

A associação dos pré-tratamentos, PCI e Ala-Gln, agravaram a peroxidação lipídica pulmonar à distância nos grupos submetidos à I/R de membro pélvico (Tabela 6 e Figura 12).

Outro parâmetro utilizado para avaliação dos grupos em estudo foi a determinação da atividade da glutathiona reduzida (GSH). Este é um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997) e o maior redutor do estresse oxidativo (PREM *et al.*, 1999). Quando elevada, a GSH revela-se um marcador de saúde celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; GUIMARÃES, 2005).

No presente estudo, durante a isquemia, observou-se apenas redução significativa da atividade de GSH sanguínea quando associados os dois pré-tratamentos, Ala-Gln e PCI. Ou seja, ocorre redução das defesas antioxidantes plasmáticas quando associados os dois pré-tratamentos. Nos demais grupos, não ocorreram alterações da atividade da GSH estatisticamente significativa na isquemia (Tabela 7 e Figura 13).

Ao se avaliar o efeito sistêmico da Ala-Gln na I/R, observou-se redução na atividade da GSH sanguínea, provavelmente por uma maior captação tecidual de GSH. Já na associação dos dois pré-tratamentos (PCI e Ala-Gln), viu-se elevação da atividade de GSH sanguínea na I/R (Tabela 8 e Figura 14).

Na literatura pesquisada não foram encontrados trabalhos que determinem a GSH plasmática na isquemia pura. Já na I/R, Kanko *et al.*, em 2005, após 4 horas de isquemia e 6 horas de reperfusão por torniquete unilateral em membro pélvico de rato, verificaram redução da atividade de GSH sanguíneas. Atahan *et al.*, em 2007, confirmaram esses achados.

Ao se estudar o efeito isquemia no pulmão (Simulado x I), constatou-se elevação da atividade GSH pulmonar. Na análise do efeito Ala-Gln na isquemia (I x Ala-Gln + I), encontrou-se redução da atividade de GSH, ao contrário do observado com o PCI, que não apresentou efeito. Isso posto, revelou-se então a Ala-Gln superior ao PCI na redução da GSH pulmonar na isquemia. Já na associação dos dois pré-tratamentos, notou-se aumento da atividade de GSH pulmonar na isquemia (Tabela 9 e Figura 15).

Na observação do efeito da I/R (Simulado x I/R), constatou-se um aumento da atividade de GSH pulmonar. Ao se estudar o efeito da Ala-Gln na I/R (I/R x Ala-Gln + I/R) verificou-se uma reversão do resultado, diferente do efeito PCI na I/R (I/R x PCI + I/R), que

reduziu a GSH tecidual, demonstrando-se superior a Ala-Gln na diminuição da GSH pulmonar em vigência da I/R. Na associação dos dois pré-tratamentos percebeu-se uma redução da atividade da GSH pulmonar na I/R (Tabela 10 e Figura 16).

Diferentemente dos resultados do presente estudo, Kaçmaz et al., em 2005, evidenciaram a diminuição da atividade da GSH pulmonar frente à I/R, através do pinçamento da aorta infra-renal. Já Kango et al, em 2005, apresentaram redução da GSH em modelo de I/R por torniquete em membro pélvico unilateral de rato.

Contraditoriamente, em todos os momentos em que o pulmão foi agredido encontrou-se um aumento da GSH tecidual, ou pelo efeito da isquemia, ou pelo efeito da I/R. Por outro lado, nas ocasiões em que se tentou proteger, ou pelo PCI na I/R, ou pela Ala-Gln na isquemia, observou-se redução da GSH pulmonar.

Novamente, talvez o tempo de reperfusão possa ter influenciado nos resultados, uma vez que Akbas et al. (2005) e Kanko et al. (2005) evidenciaram redução da atividade da GSH plasmática e aumento do dialdeído malônico (MDA) em I/R de membro pélvico de rato, após 2 horas de reperfusão, no primeiro, e 6 horas de reperfusão, no segundo. Já Grisotto et al., em 2000, não encontraram alterações de GSH muscular após 3 horas de isquemia e após 45 minutos de reperfusão em modelo de torniquete de membro pélvico unilateral, ao avaliar o efeito local muscular. Possivelmente, períodos mais prolongados de reperfusão sejam necessários para promover alterações do estresse oxidativo na I/R, a depender do modelo e do órgão estudado.

De modo geral, os resultados obtidos sugeriram que a associação entre os dois pré-tratamentos, nas condições do estudo, obteve resultado ruim como a piora da lesão pulmonar ao se avaliar a MPO, tanto na isquemia quanto na I/R. Ocorreu também, aumento da atividade do TBARS e diminuição dos níveis de GSH pulmonar na I/R, bem como elevação da atividade de TBARS e diminuição dos níveis de GSH na isquemia.

Os resultados obtidos com a MPO podem significar que a associação PCI e Ala-Gln não traz benefício, pelo contrário agrava a lesão remota pulmonar no modelo do presente estudo, ou seja, indiretamente pioraria a inflamação pulmonar.

Kanoria *et al.*, em 2007, sugeriram que na fase recente do condicionamento remoto (primeiras 4 horas, independente da síntese protéica) haja a transmissão da informação aos órgãos por meio de mediadores humorais e/ou através de vias neurogênicas. Dentre os mediadores humorais possíveis destacam-se: opióides, óxido nítrico, adenosina, catecolaminas, bradicinina, proteínas do choque térmico (HSPs), TNF- α , prostaglandinas e angiotensina (Kanoria *et al.*, 2007).

Entre os mediadores humorais possíveis, Teoh *et al.*, em 2003, demonstraram que pequenas doses de TNF- α simulam o efeito biológico protetor em fase recente do PCI no fígado e Lecour *et al.* 2005 confirmaram tal efeito em termos de cardioproteção, utilizando apenas pequenas doses de TNF- α . A liberação do TNF- α é um fator decisivo na cardioproteção pelo condicionamento remoto, uma vez que ratos “knockouts” para TNF- α não apresentam proteção, enquanto ratos selvagens apresentam (Kanoria *et al.*, 2007).

Em resumo, o TNF- α em pequenas doses simula os achados clínicos do PCI e na sua ausência, não há proteção. Dessa forma, parece que, para ocorrer proteção remota pelo PCI, deve haver uma lesão inicial, de pequena monta, que funcionaria como gatilho, provavelmente iniciada pela liberação do TNF- α .

Wischmeyer *et al.*, 2003, e Singleton e Wischmeyer, em 2008, demonstraram que a glutamina reduz a liberação de TNF- α . Assim, no presente estudo, uma possível explicação seria a de que a diminuição do TNF- α pela Ala-Gln tenha interferido na lesão inicial necessária para desencadear a proteção. Com isso, podem ter sido anulados os possíveis benefícios do PCI remoto e da glutamina, resultando na ausência de proteção na associação dos dois pré-tratamentos.

Novos estudos são necessários a fim de elucidar os mecanismos envolvidos no aumento da lesão remota ao se associarem os dois pré-tratamentos. Talvez o entendimento das vias e dos mecanismos envolvidos com o TNF- α , ou talvez de outras citocinas, possa esclarecer o motivo desses achados no presente estudo.

6. CONCLUSÃO

6.1 GERAL

A associação Ala-Gln e PCI elevou os níveis mensurados de MPO pulmonar quando comparado com o pré-tratamento isolado, Ala-Gln ou PCI, tanto na fase de isquemia quanto na reperfusão, sugerindo agravamento de lesão pulmonar à distância na associação dos dois pré-tratamentos.

6.2 ESPECÍFICOS

A pré-administração da L-alanil glutamina (Ala-Gln) ou o condicionamento isquêmico (PCI), isoladamente, reduz a atividade pulmonar de mieloperoxidase (MPO) frente à lesão isquêmica. O mesmo não ocorre frente à lesão de isquemia e reperfusão (I/R), quando utilizado um ou outro procedimento.

A pré-administração de Ala-Gln reduz a atividade plasmáticas das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) na isquemia. O mesmo não ocorre com o PCI na isquemia.

Tanto a pré-administração de Ala-Gln quanto o PCI não modifica a atividade plasmáticas de glutathione reduzida (GSH) na isquemia.

A associação Ala-Gln e PCI eleva os níveis mensurados de MPO pulmonar quando comparada com o pré-tratamento isolado de Ala-Gln ou PCI, tanto na isquemia quanto na I/R.

A associação Ala-Gln e PCI aumenta a atividade plasmáticas de TBARS e reduz os níveis plasmáticos de GSH, frente à lesão isquêmica.

7. REFERÊNCIAS

AKBAS, H.; OZDEN, M.; KANKO, M.; MARAL, H.; BULBUL, S.; YAVUZ, S.; OZKER, E.; BERKI, T. Protective antioxidant effects of carverdilol in a rat model ischaemia-reperfusion injury. **J Int Med Res.** v. 33, p. 528-536, 2005.

AKGUN, S.; TEKELI, A.; ISBIR, S. C.; CIVELEK, A.; AK, K.; SIRVANCI, S.; ARBAK, S.; YAYLIM, I.; ARSAN, S. FK506 to prevent lung injury after hindlimb ischemia and reperfusion in a rat model: an electron microscopic study. **Surg Today.** v. 34, n. 8, p. 678-684, 2004.

ALVES, W. F.; GUIMARÃES, S. B.; VASCONCELOS, P. R. C.; VASCONCELOS, P. R. L. Repercussões da L-alanil-glutamina sobre as concentrações de lactato e lactato desidrogenase (LDH) em pacientes com isquemia crítica dos membros inferiores submetidos a revascularização distal. **Acta Cirúrgica Brasileira,** v. 18, p. 209-214, 2003

ALVES, W. F. **Efeitos da l-alanil-glutamina, sobre as concentrações de metabólitos e enzimas em pacientes com isquemia dos membros inferiores que se submeteram a revascularização distal.** Fortaleza, 2004, 136fl., Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2004.

ALVES M. A.; GUIMARÃES, S. B.; DIAS, D. A.; VASCONCELOS, P. R. C.; COELHO, V.P.M.; VASCONCELOS, P. R. L. Effects of L-alanyl-glutamine upon blood and kidney biochemical parameters in the rat hind limb modelo ischemia/reperfusion. **Acta Cirúrgica Brasileira,** v. 20, p. 445-449, 2005.

ANAYA-PRADO, R.; TOLEDO-PEREYRA, L. H.; LENTSCH, A. B.; WARD, P. A. Ischemia/reperfusion injury. **J Surg Res.** v.105, n. 2, p. 248-258, 2002.

ATAHAN, E.; ERGUN, Y.; KURUTAS, E. B.; CETINUS, E.; ERGUN, U. G. Ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle is attenuated by zinc aspartate. **J Surg Res.** v. 137, n. 1, p. 109-116, 2007.

BEZERRA FILHO, J. E. **Dosagem, in vivo, de metabólitos sanguíneos e tissulares de ratos submetidos à isquemia renal e à reperfusão durante a oferta de L-ananil-glutamina.** Fortaleza, 2004, 95fl., Tese (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2004.

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

BIRNBAUM, Y.; HALE, S. L.; KLONER, R. A. Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. **Circulation.**v. 96, n. 5, p.1641-1646, 1997.

BRADLEY, P.P.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**. v. 60, n. 3, p. 618-622, 1982.

ÇALIKOGLU, M.; TAMER, L.; SUCU, N; COSKUN, B.; ERCAN, B.; GUL, A.; CALIKOGLU, I.; KANIK, A. The effects of caffeic acid phenethyl ester on tissue damage in lung after hindlimb ischemia-reperfusion. **Pharmacological Research**, v. 48, p. 397-403, 2003.

CAMPOS A. B.; SILVA, L. F.; MARINHO, L. E.; QUEIROZ, D. A. F. CHAVES, C. R.; MARTINS, M. C.; VASCONCELOS, P. R. C.; VASCONCELOS, P. R. L. Efeitos da L-Alanil-Glutamina sobre a concentração in vivo de metabólitos da via glicolítica durante a isquemia-reperusão de intestino delgado em ratos Wistar. **ABCD – Arq Brás Cir Dig**, v. 15, n. 2, p. 63-66, 2002.

CHIRICO, S. High Performance Liquid Chromatography-based Thiobarbituric acid tests. **Methods Enzimology**., v. 233, p. 314-128, 1994.

CHIU, C-J.; MACARDLE, A. H.; BROWN, R; SCOTT, H. J.; GURD, F. N. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. **Arch. Surg.**, v. 101, p. 478-483, 1970.

COHEN, M.V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Ann Intern Med.**, v. 111, p. 918-931, 1989.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; PRESGRAVE, A. O. F; **Manual de Utilização de Animais/Fiocruz**, CEUA, Ministério da Saúde. Primeira edição, Rio de Janeiro, 2008.

CONN, E.E.; STUMPF, P.K. **Regulação metabólica**. In: Introdução a Bioquímica. São Paulo, Edit. Edgard Blücher Ltda, 1998, p. 462-480.

CORDEIRO, A. K.; BARACAT, F. F. **Anatomia do Sistema Linfático**. In: LINFOLOGIA, Fundação Byk-Prociencx, p. 7-27, 1983.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Robbins Pathologie Basis of Disease**. 7th edition. Philadelphia. 2005. p. 3-26.

DAEMEN, M. A.; DE VRIES, B.; BUURMAN, W. A. Apoptosis and inflammation in renal reperfusion injury. **Transplantation**. v.15, n. 73, p.1693-1700, 2002.

DENEKE SM, FANBURG BL. Regulation of cellular glutathione. **Am J Physiol**., v. 257,n. 4(Pt 1), p. L163-173, 1989.

DORIA FILHO, U. **Introdução à bioestatística: para simples mortais**. 3ª- edição. São Paulo, Negócio Editora Ltda, 1999, p. 115-118.

DRÖGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**. v. 82, n.1, p.47-95, 2002.

DURU, S. KOCA, U. OZTEKIN, S. OLGUNER, C. KAR, A. COKER, C. ULUKUS, C. TASCL, C. ELAR, Z. Antithrombin III pretreatment reduces neutrophil recruitment into the

lung and skeletal muscle tissues in the rat model of bilateral lower limb ischemia and reperfusion: a pilot study. **Acta Anaesthesiol Scand.** v.49, n. 8, p. 1142-1148, 2005.

ESME, H.; FIDAN, H.; KOKEN, T.; SOLAK, O. Effect of lung ischemia-reperfusion on oxidative stress parameters of remote tissues. **Eur J Cardiothorac Surg.** v. 29, p. 294-298, 2006.

FELTRE, R. **Química orgânica.**, São Paulo: Moderna, 3^a . Ed, v. 3, p. 179-207, 1998.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Ver. Ass. Méd. Brasil.**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FESTING, M. F. W. Suitability of the rat for different investigation. In: laboratory animals, mouse and rat. **Bethesda Fed Am Soc Exp Biol;** v.1, p. 237-238, 1979.

FLOYD, R.A. Role of oxygen free radical in carcinogenesis and brain ischemia. **FASEB J.**, v. 4, n. 2, p. 587-597, 1990.

GALLEANO, M.; PUNTARULO, S. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. **Biochim Biophys Acta;** v. 1271, n. 2-3, p. 321-326, 1995.

GHO, B.C.; SCHOEMAKER, R.G.; VAN DEN DOEL, M.A.; DUNCKER, D.J.; VERDOUW, P.D. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. **Circulation.** v. 1, 94(9), p. 2193-2200, 1996.

GRISOTTO, P.C., DOS SANTOS, A. C.; COUTINHO-NETTO, J.; CHERRI, J.; PICCINATO, C. E. Indicators of oxidative injury and alterations of cell membrane in the skeletal muscle of rats submitted to ischemia and reperfusion. **J Surg Res.** v. 92, n. 1, p. 1-6, 2000.

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

GUIMARÃES, S. B **Efeitos do pré-tratamento com Dimetilsulfóxido, Ácido lipóico ou Ternatina sobre o estresse oxidativo em ratos jovens submetidos à torção do cordão espermático.** Fortaleza, 2005, 127fl., Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radic Biol Med.** V. 18, n. 1, p. 125-126, 1995.

HARKIN, DW; D´SA, AAB; MCCALLION, K; HOPER, M; CAMPBELL, FC. Ischemic preconditioning before lower limb ischemia-reperfusion protects against acute lung injury. **J Vas Surg;** v. 35, p 1264-1273, 2002.

HEBEL, R.; STROMBERG, M.W. The circulation system. In: HebelR, Stromberg MW. **Anatomy of the laboratory rat.** Baltimore: Williams & Wilkins; 1976. p.91.

KAÇMAZ, A.; USER, E. Y.; SEHIRLI, O.; TILKI, M.; OZKAN, S.; SENER, G. Protective effect of melatonin against ischemia/reperfusion-induced oxidative remote organ injury in the rat. **Surg Today**. v. 35, p. 744-750.

KANKO, M.; MARAL, H.; AKBAS, H. M.; BULBUL, S.; OMAI, O.; YAVUZ, S.; BERKI, T. Protective effects of clopidogrel on oxidant damage in a rat model of acute ischemia. **Tohoku J. Exp. Med**. v. 205, p. 133-139.

KANORIA, S.; JALAM, R.; DAVIES, N. A.; SEIFALIAN, A. M.; WILLIAMS, R.; DAVISON, B. R. Remote ischaemic preconditioning of the hind limb reduces experimental liver warm ischaemia-reperfusion injury. **Br J Surg**. v. 93, n.6, p. 762-768, 2006.

KANORIA, S.; JALAN, R.; SEIFALIAN, A. M.; WILLIAMS, R.; DAVIDSON, B. R. Protocols and mechanism for remote ischemic preconditioning: a novel method for reducing ischemia reperfusion injury. **Transplantation**. v. 84, n. 4, p. 445-458, 2007.

KURTOGLU, T.; SACAR, M.; INAN, B. K.; DUVER, M. H.; GULER, A.; UCAK, A.; US, M. H.; YILMAZ, A. T. Erdosteine ameliorates lung injury induced by transient aortic occlusion in rats. **Cardiovasc J Afr**. v. 18, p. 367-370, 2007.

KWON, T.; WATTS, B. Malonaldehyde in aqueous solution and its role as a measure of lipid oxidation in foods. **Journal of food Science**., v. 29, p. 294-302, 1964.

KYRIAKIDES, C.; AUSTEN, W. G. JR; FAVUZZA, J.; MOORE, F. D.; HECHTMAN, H. B. Neutrophil mediated remote organ injury after lower torso ischemia and reperfusion is selectin and complement dependent. **J Trauma**. v. 48, n. 1, p. 32-38, 2000.

LABOW, B.I.; SOUBA, W.W. **Glutamine**. World J. Surg v. 24, p 1503-1513, 2000.

LAI, I.R.; CHANG, K.J.; CHEN, C.F; TSAI, H.W. Transient limb ischemia induces remote preconditioning in liver among rats: the protective role of heme oxygenase-1. **Transplantation**., v. 81, n. 9, p. 1311-1317, 2006.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L; COX, M.M. A glicólise e o catabolismo das hexoses. In: **Princípios da Bioquímica**. São Paulo, Sarvier, 2. ed., cap. 14, 2000(a), p.297-330.

LI, G.; LABRUTO, F.; SIRSIÖ, A.; CHEN, F.; VAAGE, J.; VALEN, G. Myocardial protection by remote preconditioning: the role of nuclear factor kappa-B p105 and inducible nitric oxide synthase. **Eur J Cardiothorac Surg**. v. 26, n.5, p. 968-973, 2004.

MARINHO, H.S.P.C. **Metabolismo do glutationo no fígado de rato normal e no fígado de rato hepatomizado**. TESE (DOUTORADO em bioquímica). Universidade de Lisboa; 1995, 115p.

MEISTER, A. Mechanism and regulation of the glutamine-dependent carbamyl phosphate synthetase of Escherichia coli. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.**, v. 62, p. 315-374, 1989.

MELO, N. A. Síndrome isquêmica aguda. **Angiologia** . Ed Guanabara Koogan S. A. cap. 7, p. 65-74, 1998.

MURPHY, C. G.; CHEN, G.; WINTER, D. C.; BOUCHIER-HAYES, D. J. Glutamine preconditioning protects against tourniquet-induced local and distant organ injury in a rodent ischemia-reperfusion model. **Acta Orthop**. V. 78, n. 4. p.559-566, 2007

NAMAZI, H. Decreasing the expression of LFA-1 and ICAM-1 as the major mechanism for the protective effect of glutamine on ischemia-reperfusion injury **Acta Orthop**. v. 79, n. 2, p. 308, 2008.

NEELY, J.R.; GROTYOHANN, L.W. Role of glycolytic products in damage to ischaemic myocardium. **Circ Res**. v. 55, p.816-824, 1984.

NEWSHOLME, P; LIMA, M. M. R.; PROCOPIO, J.; PITHON-CURI, T. C.; DOI, S. Q.; BAZOTTE, R. B.; CURI, R. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, n.2, p. 153-163, 2003.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.**, v. 95, p. 351, 1979.

OKUTAN, H.; SAVAS, C.; OZGUNER, F.; YONDEN, Z.; EREN, V. C.; DELIBAS, N. Lung injury after aortic occlusion-reperfusion in rats: the role of gadolinium chloride. **Tohoku J Exp. Med**. v. 203, p. 267-273, 2004.

OTAMIRI, T. Oxygen radicals, lipid peroxidation, and neutrophil infiltration after small intestinal ischemia and reperfusion. **Surgery**, v. 105, n. 5, p.593-597, 1989.

OZCAN, A. V.; SACAR, M.; AYBEK, H.; BIR, F.; DEMIR, S.; ONEM, G.; GOKSIN, I.; BALTALARLI, A. COLAKOGLU, N. The effects of iloprost and vitamin C on Kidney as a remote organ after ischemia/reperfusion of lower extremities. **J Surg Res**. v. 140, n. 1, p. 20-26, 2007.

PASUPATHY, S.; HOMER-VANNIASINKAM, S. Ischaemic preconditioning protects against ischaemia/reperfusion injury: emerging concepts. **Eur J Vasc Endovasc Surg.**, v. 29, n. 2, p. 106-115, 2005.

PEDOWITZ, R.A. Tourniquet-induced neuromuscular injury. A recent review of rabbit and clinical experiments. **Acta Orthop Scand Suppl**. v. 245, p-1-33, 1991.

PERALTA, C.; FERNANDEZ, L.; PANES, J.; PRATS, N.; SANS, M.; PIQUÉ, J. M.; GELPI, E.; ROSELLÓ-CATAFAU, J. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. **Hepatology**. v. 33, n. 1, p. 100-113, 2001.

PIMENTA, M.B.P.; AGUIAR-NASCIMENTO, J.E.A.; MARTINS, D.C.; SILVA, D.R.; BACELO, K.L.; BOCCHESI, I.C.; ZAFFANI, S.; ZAFFANI, E.; SILVEIRA, E.A.O.; CARMO, A.V.; FERREIRA, S.S.S. The intestinal tract as the major source of interleukin 6 production during abdominal aortic clamping and hind limb ischaemia-reperfusion injury. **Acta Cir Bras**, v. 22, n.1, p. 34-39, 2007.

PLITAS, G.; GAGNE, P.J.; MUHS, B.E.; IANUS, I.A.; SHAW, J.P.; BEUDJEKIAN, M.; DELGADO, Y.; JACOBOWITZ, G.; ROCKMAN, C.; SHAMAMIAN, P. Experimental hindlimb ischemia increases neutrophil-mediated matrix metalloproteinase activity: a potential mechanism for lung injury after limb ischemia. **J Am Coll Surg**. v. 196, n. 5, p. 761-767, 2003.

PREM, J. P.; EPPHGER, M.; LEMMON, G.; MILLER, S.; NOLAN, D.; PEOPLES, J. The role of glutamine in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in the rat hind limb model. **Am J Surg**. v. 178, n. 2, p. 147-150, 1999.

PRZYKLENK, K.; BAUER, B.; OVIZE, M.; KLONER, R.A.; WHITTAKER, P. Circulation. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. **Circulation** v. 87, n. 3, p.893-899, 1993.

REN, X.; WANG, Y.; JONES, W.K. TNF-alpha is required for late ischemic preconditioning but not for remote preconditioning of trauma. **J Surg Res**. v. 121, n.1, p.120-129, 2004.

RIEDEMANN, N.C.; WARD P.A. Complement in ischemia e reperfusion injury. **Am J Pathol**. v.162, p. 363-367, 2003.

ROSKOSKI JR., R. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

SAITA, Y; YOKOYAMA, K; NAKAMURA, K; ITOMAN, M. Protective effect of ischaemic preconditioning against ischaemia-induced reperfusion injury of skeletal muscle: how many preconditioning cycles are appropriate? **Br J Plast Surg**. v. 55, n. 3, p. 241-245, 2002.

SAITO, T.; KOMIYAMA, T.; ARAMOTO, H.; MIYATA, T.; SHIGEMATSU, H. Ischemic preconditioning improves oxygenation of exercising muscle in vivo. **J Surg Res**. V.120, n.1. p. 111-118, 2004

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SEIFERT, F. C.; BANKER, M.; LANE, B.; BAGGE, U.; ANAGNOSTOPOULOS, C. E. An evaluation of resting arterial ischemia models in the rat hind limb. **J Cardiovasc Surg (Torino)**, v. 26. n. 5. p. 502-508, 1985.

SENA, J. I. N. **L-ananil-glutamina, ômega-6 e ômega-3 na resposta metabólica e no estresse oxidativo em ratos submetidos ao trauma e à sepse**. Fortaleza, 2005, 159fl., Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2005.

SHAN, X.; AW, T.Y.; JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther**; v. 47, n. 1, p 61-71, 1990.

SILVA, M. G.; CASTRO A. A.; RAMOS E. A. G.; PEIXOTO, E.; MIRANDA JR, F.; PITTA, G. B. B.; COSTA R. F. B.; JULIANO, Y. Efeitos histológicos e bioquímicos séricos do alfa-tocoferol na lesão de isquemia/reperfusão em membro pélvico de ratos. **Acta Cir Bras**, v. 20.n. 5. p. 375-381, 2005.

SINGLETON, K.D.; SERKOVA, N.; BANERJEE, A.; MENG, X.; GAMBONI-ROBERTSON, F.; WISCHMEYER, P.E. Glutamine attenuates endotoxin-induced lung metabolic dysfunction: potential role of enhanced heat shock protein 70. **Nutrition**. v. 21, n. 2, p. 214-223, 2005.

SINGLETON, K.D.; WISCHMEYER, P.E. Antiinflammatory adaptation to hypoxia through adenosine-mediated cullin-1 deneddylation. **J Clin Invest**. v. 117, n. 3, p. 703-711, 2007.

SOUBA, W. W. Intestinal glutamine metabolism and nutrition. **J. Nutr. Biochem.**, v. 4, p. 2-9, 1993.

TEOH, N.; LECLERCQ, I.; PENA, A.D.; FARRELL G. Low-dose TNF-alpha protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in mice: implications for preconditioning **Hepatology**. v. 37, n. 1, p.118-128, 2003.

TORRES, J. M. S. **Efeitos da l-alanil-glutamia sobre as concentrações in vivo de metabólitos em ratos submetidos à isquemia do membro pélvico esquerdo seguida de reperfusão.** Fortaleza, 2002, 67fl., Tese (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2002.

TORRES, J. M. S.; GUIMARÃES, S. B.; CHAVES, C. R.; MARTINS, M. C.; VASCONCELOS, P. R. C.; VASCONCELOS, P. R. L. Efeitos metabólicos da l-alanil-glutamina em ratos submetidos à isquemia da pata traseira esquerda seguida de reperfusão. **Acta Cir Bras**, v. 18, n. 1, p. 39-44, 2003.

UCHIYAMA, M.; MIHARA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal Bioch.**, v. 86, p. 271-278, 1978.

VOLLMAR, J. Akuter Arterienverschluss. Rekonstruktive Chirurgie der Arterien. Georg **Thiem Verlag**, v. 3, p. 245-265, 1982.

WISCHMEYER, P.E.; KAHANA, M.; WOLFSON, R.; REN, H.; MUSCH, M. M.; CHANG, E.B. Glutamine induces heat shock protein and protects against endotoxin shock in the rat. **J Appl Physiol**. V. 90, n.6. p. 2403-2410, 2001.

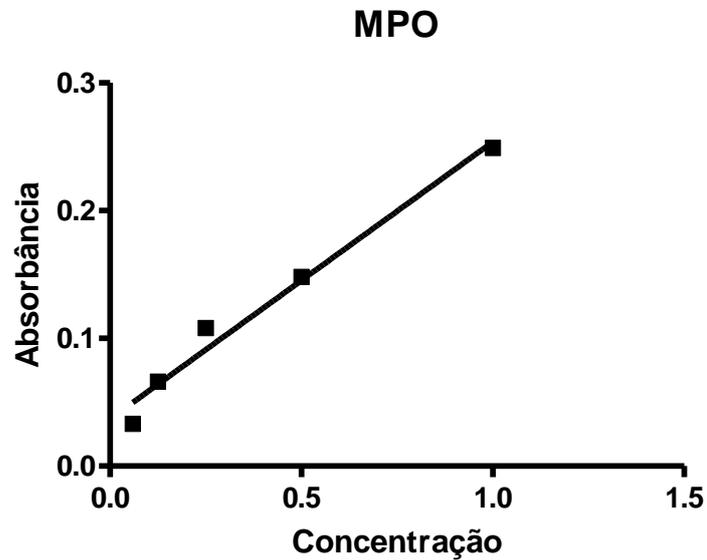
WISCHMEYER, P.E. Glutamine and shock protein expression. **Nutrition**. v. 18, n.3, p. 225-227, 2002.

WISCHMEYER, P.E.; RIEHM, J.; SINGLETON, K.D.; REN, H.; MUSCH, M.W.; KAHANA, M.; CHANG, E.B. Glutamine attenuates tumor necrosis factor-alpha release and enhances heat shock protein 72 in human peripheral blood mononuclear cells. **Nutrition**. v. 19, n.1, p.1-6, 2003.

WISCHMEYER, P.E. Glutamine: mode of action in critical illness. **Crit Care Med**. v. 31, n. 9, p. 541-544, 2007.

YASSIN, M.M.; HARKIN, D.W.; BARROS D`SA A.A.; HALLIDAY, M. I.; ROWLANDS, B.J. Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. **World J Surg**. v. 26, n. 1, p. 115-121, 2002.

APENDICE A – Curva Padrão para cálculo da atividade da Mieloperoxidase (MPO)



Best-fit values

Slope	0.2170 ± 0.01860
Y-intercept when X=0.0	0.03682 ± 0.009598
X-intercept when Y=0.0	-0,1697
1/slope	4,608

95% Confidence Intervals

Slope	0.1578 to 0.2762
Y-intercept when X=0.0	0.006281 to 0.06736
X-intercept when Y=0.0	-0.4049 to -0.02398

Goodness of Fit

r^2	0,9784
Sy.x	0,01420

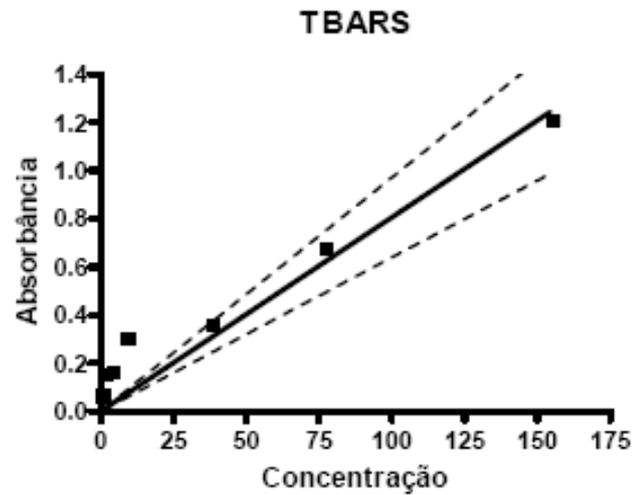
Is slope significantly non-zero?

F	136,1
DFn, DFd	1.000, 3.000
P value	0,0014
Deviation from zero?	Significant

Data

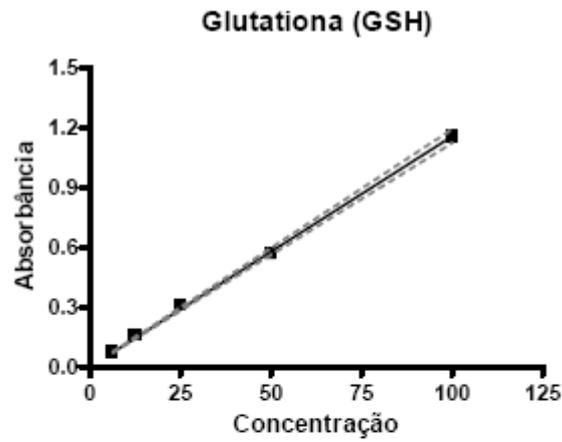
Number of X values	5
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	5
Number of missing values	0

APENDICE B – Curva Padrão para cálculo da atividade do Malonaldeído (MDA)



Absorbância	
Best-fit values	
Slope	0.008049 ± 0.0006774
Y-intercept when X=0.0	0,0000
X-intercept when Y=0.0	0,0000
1/slope	124,2
95% Confidence Intervals	
Slope	0.006392 to 0.009707
Goodness of Fit	
Sy.x	0,1212
Is slope significantly non-zero?	
t	11,88
DF	6,000
P value	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	7
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	7
Number of missing values	0

APENDICE C – Curva Padrão para cálculo da atividade da Glutathione (GSH)



Absorbância	
Best-fit values	
Slope	0.01156 ± 0.0001251
Y-intercept when X=0.0	0,0000
X-intercept when Y=0.0	0,0000
1/slope	86,50
95% Confidence Intervals	
Slope	0.01121 to 0.01191
Goodness of Fit	
Sy.x	0,01443
Is slope significantly non-zero?	
t	92,44
DF	4,000
P value	< 0.0001
Deviation from zero? Significant	
Data	
Number of X values	5
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	5
Number of missing values	0

APENDICE D – Dados brutos

Concentrações de MPO pulmonar (unidade /g de tecido fresco).

	SIMULADO	IS	PCI + IS	ALA-GLN + IS	PCI + ALA-GLN + IS
T1	0,071	0,402	0,3632	0,373	1,406
T1	0,126	0,402	0,2981	0	1,345
T1	0,156	0,49	0,3962	0	1,472
T1	0,224	0,439	0,2187	0,019	1,393
T1	0,133	0,429	0,3266	0	1,179
T1	0,212	0,522	0,2625	0,009	1,437

	SIMULADO	I/R	PCI + I/R	ALA-GLN + I/R	PCI + ALA-GLN + I/R
T2	0,099	0,789	0,641	1,021	1,24
T2	0,182	0,855	0,838	0,921	1,59
T2	0,114	0,868	0,606	0,959	1,341
T2	0,142	0,873	0,698	0,816	1,336
T2	0,355	0,676	1,03	0,868	1,174
T2	0,133	0,899	0,877	1,236	1,182

Concentrações de TBARS sanguíneo (μmol de MDA /ml).

	SIMULADO	IS	PCI + IS	ALA-GLN + IS	PCI + ALA-GLN + IS
T1	0,0092	0,01	0,011	0,004	0,0136
T1	0,0116	0,0064	0,01	0,006	0,0133
T1	0,004	0,0202	0,01	0,002	0,0128
T1	0,014	0,0059	0,01	0,005	0,0126
T1	0,015	0,0059	0,005	0,004	0,0125
T1		0,0165	0,011	0,003	0,0127

	SIMULADO	I/R	PCI + I/R	ALA-GLN + I/R	PCI + ALA-GLN + I/R
T2	0,0037	0,013	0,0161	0,0136	0,036
T2	0,004	0,022	0,0168	0,0179	0,006
T2	0,0068	0,013	0,0171	0,0213	0,023
T2	0,0067	0,015	0,0171	0,0102	0,014
T2	0,0032	0,037	0,0175	0,0175	0,007
T2	0,0042	0,017	0,0167	0,0187	0,009

Concentração de TBARS pulmonar (μmol de MDA /g tecido fresco).

	SIMULADO	IS	PCI + IS	ALA-GLN + IS	PCI + ALA-GLN + IS
T1	0,005	0,0062	0,007	0,0055	0,0057
T1	0,015	0,0064	0,007	0,0048	0,005
T1	0,015	0,0173	0,006	0,0141	0,0047
T1	0,005	0,0271	0,008	0,005	0,0044
T1	0,019	0,0062	0,007	0,005	0,0038
T1	0,008	0,0067	0,005	0,0053	0,0045
	SIMULADO	I/R	PCI + I/R	ALA-GLN + I/R	PCI + ALA-GLN + I/R
T2	0,0099	0,0071	0,0096	0,0033	0,0157
T2	0,0099	0,0084	0,0094	0,0104	0,0134
T2	0,0093	0,0069	0,0101	0,0109	0,0245
T2	0,0096	0,0052	0,0092	0,0085	0,0133
T2	0,0094	0,0033	0,0093	0,0069	0,0148
T2	0,0091	0,0057	0,015	0,0102	0,0161

Concentrações de GSH sanguínea (μmol /ml).

	SIMULADO	IS	PCI + IS	ALA-GLN + IS	PCI + ALA-GLN + IS
T1	71,327	11,573	40,667	13,193	8,99
T1	61,35	27,093	23,537	9,8	8,023
T1	37,433	25,493	22,243	9,96	8,343
T1	63,453	14,163	25,797	13,353	12,87
T1	7,053	11,16	25,473	10,607	13,983
T1	7,537	43,737	44,867	8,343	22,89
	SIMULADO	I/R	PCI + I/R	ALA-GLN + I/R	PCI + ALA-GLN + I/R
T2	20,303	26,443	28,87	1,047	30,507
T2	16,263	17,88	26,12	2,107	25,417
T2	14,81	18,363	26,767	2,883	35,417
T2	20,627	14,81	20,303	3,153	40,493
T2	22,243	14,97	23,213	2,513	37,483
T2	20,467	21,273	17,07	3,29	30,885

Concentração de GSH pulmonar ($\mu\text{mol} / \text{g}$ tecido fresco).

	SIMULADO	IS	PCI + IS	ALA-GLN + IS	PCI + ALA-GLN + IS
T1	13,51	44,867	45,19	8,507	23,05
T1	15,207	46,15	14,97	8,36	14,81
T1	16,753	54,24	15,791	9,153	15,133
T1	23,537	31,13	36,463	11,577	24,83
T1	21,273	32,917	12,387	11,74	26,443
T1	21,917	7,7	12,537	19,657	16,75
	SIMULADO	I/R	PCI + I/R	ALA-GLN + I/R	PCI + ALA-GLN + I/R
T2	20,143	23,05	17,733	58,603	51,067
T2	18,04	51,977	14,97	90,44	41,82
T2	18,687	47,19	16,103	91,893	37,75
T2	13,193	61,357	13,517	42,603	54,417
T2	13,517	65,07	13,84	41,327	47,45
T2	11,447	40,707	15,5	22,88	48,54

ANEXO A – Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) - Declaração



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 4009-8338 Fax (85) 4009-8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 43/05, sobre o projeto intitulado **“Efeitos da suplementação de glutamina sobre a resposta a isquemia e reperfusão de membros inferiores e inflamação pulmonar em modelo de clampeamento da aorta infrarenal em ratos”**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA em reunião realizada em 15 de dezembro de 2005.

Fortaleza, 16 de dezembro de 2005

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Gisela', written in a cursive style.

Profª. Dra. Gisela Costa Camarão
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA