

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

**DOSAGEM, *IN VIVO*, DE METABÓLITOS SANGÜÍNEOS
E TISSULARES DE RATOS SUBMETIDOS A ISQUEMIA
RENAL E A REPERFUSÃO DURANTE A OFERTA DE
L-ALANIL-GLUTAMINA**

JOÃO EVANGELISTA BEZERRA FILHO

Fortaleza

2004

João Evangelista Bezerra Filho

DOSAGEM, *IN VIVO*, DE METABÓLITOS SANGÜÍNEOS E
TISSULARES DE RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA RENAL E
A REPERFUSÃO DURANTE A OFERTA DE
L-ALANIL-GLUTAMINA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação como exigência para obtenção do
título de Mestre em Cirurgia, à Comissão
Julgadora do Programa de Mestrado do
Departamento de Cirurgia da Faculdade de
Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Orientador

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

Fortaleza

2004

João Evangelista Bezerra Filho

DOSAGEM, *IN VIVO*, DE METABÓLITOS SANGÜÍNEOS E
TISSULARES DE RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA RENAL E A
REPERFUSÃO DURANTE A OFERTA DE
L-ALANIL-GLUTAMINA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação como exigência para obtenção do título de Mestre em Cirurgia, à Comissão Julgadora do Programa de Mestrado do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Orientador Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

Aprovada em 17/12/2004

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos-Orientador

Prof. Dra. Helena Alves Carvalho Sampaio-UECE

Prof. Dr. Rodrigo Dornfeld Escalante-UECE

À memória de meus pais.

*Aos meus filhos
Rachel, João Evangelista e Paulo Jorge
e à minha esposa Zélia,
dedico esse esforço.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos, orientador deste trabalho, pelos proveitosos ensinamentos, impecável gentileza, paciência beneditina e estimulante confiança.

Aos Professores Doutores Sara Lúcia Cavalcante, Lúcio Flávio Gonzaga Silva e Luzmar Veras Rodrigues pela participação na Banca de Qualificação e pelas oportunas e generosas sugestões.

Aos Professores Doutores pela honrosa aceitação em participar da Banca Examinadora.

Aos Professores Nicolino Trompieri e Paulo César Silveira pela ajuda imprescindível na elaboração da análise estatística.

Ao Professor Sérgio Botelho Guimarães (Mestre em Cirurgia) pelo auxílio experiente e magnânimo na execução técnica desta dissertação.

Aos estudantes de Medicina Carolyne R.Chaves, Dario Augusto Queiroz e Paulo Roberto C. Vasconcelos pela dedicada participação na fase experimental deste trabalho.

Aos Professores do Departamento de Cirurgia que participaram do Curso de Pós-Graduação, pelas aulas ministradas.

À Professora Cira de Melo Jorge Barbosa e família, sem cujo estímulo e benevolente disponibilidade esse trabalho jamais teria sido concluído.

À Sra. Maria Luciene Vieira de Oliveira, secretária do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia pela dedicação, competência e carinho dispensados aos mestrandos.

Aos colegas de mestrado Antônio Borges Campos e João Martins pelo permanente incentivo e infalível apoio.

Ao Professor Newton Teófilo Gonçalves (in memoriam) pelo amor desmedido à Cultura e pelo muito que ensinou a quantos dele se aproximaram.

Aos meus inolvidáveis mestres Maristas.

Ao Sr. Francisco Evanir Gonçalves de Lima, técnico da Unidade de Farmacologia da Universidade Federal do Ceará pela presteza na preparação e execução dos ensaios laboratoriais.

Ao Sr. Bento Francisco de Oliveira, assistente técnico do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina, pelo desvelo com que atendeu às nossas solicitações.

“Não conheço sequer o caminho”.

Tobias 5-2

RESUMO

Dosagem *in vivo* de metabólitos sanguíneos e tissulares de ratos submetidos à isquemia renal e a reperfusão durante a oferta de L-alanil-glutamina

Durante a realização de transplantes renais e outras operações sobre os rins ocorrem os fenômenos de isquemia/reperfusão cujos efeitos nocivos colocam em risco o sucesso dessas intervenções.

Pesquisas têm sido feitas no sentido de controlar, ou ao menos diminuir, os efeitos indesejáveis da isquemia/reperfusão.

O objetivo desse estudo é avaliar o possível efeito da l-alanil-glutamina sobre a isquemia/reperfusão renal mediante a determinação, *in vivo*, das concentrações de glicose, piruvato, lactato e corpos cetônicos no sangue e no tecido renal submetido a isquemia/reperfusão.

Isquemia de 30 min. foi induzida em dois grupos de animais de experimentação (ratos Wistar). Em seguida, foram determinadas as alterações ocorridas no tempo pós-reperfusão (0 min., 5mi., 15 min., 30 min.) nas concentrações sanguíneas e renais de glicose, piruvato, lactato e corpos cetônicos.

Um grupo de 24 animais (6 para cada tempo) foi previamente tratado com l-alanil-glutamina administrada por via venosa e na dose de 0,75g /kg de peso.

Em grupo controle com igual número de animais administrou-se, também por via venosa, o mesmo volume de solução salina.

Os resultados apontam para aumento significativo na concentração sanguínea de lactato nos animais que receberam l-alanil-glutamina, logo após a isquemia (tempo 0 min.) e em todos os tempos após a reperfusão. Não foram constatadas alterações significantes nas concentrações de piruvato e de glicose. No entanto, foi observada redução significativa na concentração de corpos cetônicos.

Os resultados obtidos sugerem aumento da atividade glicolítica durante o período de reperfusão decorrente da oferta exógena de l-alanil-glutamina. Tal fato deve-se, provavelmente, à ativação do sistema carreador malato-aspartato, em razão da oferta de glutamato, através de seu precursor l-glutamina.

Descritores: rim (metabolismo) – isquemia/reperfusão – preservação celular – L-alanil-glutamina.

ABSTRACT

Effects of L-alanil glutamine pre-treatment on the concentrations of lactate, pyruvate, glucose and ketone bodies in the intestinal tissues and blood of rats subjected to normothermic intestinal ischemia, *in vivo*.

Renal transplantation and other operations give rise to kidney ischemia/ reperfusion injuries that may interfere with the final outcome.

The purpose of this study is to examine the effects of l-alanil-glutamine pre-treatment in rats subjected to renal ischemia/reperfusion.

Twenty-four rats were distributed in 4 subgroups of 6 animals. Half an hour following administration of l-alanil-glutamine (0,75 g/Kg) animals were subjected to kidney ischemia during 30 minutes. Kidney arterial blood samples were collected at the end of the ischemia and 5, 15 and 30 minutes later. Glucose pyruvate lactate and cetonic bodies *in vivo* concentrations were determined in all samples.

A second group of 24 animals received i.v.saline solution pre-treatment half an hour prior to the experiment.

Laboratory analysis revealed a significant increase in blood concentration of lactate in l-alanil –glutamine group and during reperfusion. The offer of l-alanil-glutamine cause no significant change on concentration of glucose and pyruvate. On the other hand it did induce to significant reduction of cetonemia in the animal group treated with l-alanil-glutamine as compared to that observed in animals from control group.

It is concluded that l-alanil –glutamine pre – treatment may enhance glycolysis during ischemia-reperfusion. Activation of malate-aspartate shuttle in glucose oxidative pathway due to increase availability of glutamate can explain these changes.

Key words: kidney (metabolism) – ischemia/reperfusion – cellular preservation – L-alanil-glutamine.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Concentração de piruvato no sangue	68
Tabela 2 –	Concentração de piruvato em rim não isquêmico	69
Tabela 3 –	Concentração de piruvato em rim isquêmico.....	70
Tabela 4 –	Concentração de piruvato – comparação entre rim não isquêmico <i>versus</i> rim isquêmico, com solução salina	71
Tabela 5 –	Concentração de piruvato – comparação entre rim não isquêmico <i>versus</i> rim isquêmico com L-Alanil-Glutamina.....	72
Tabela 6 –	Concentração de Lactato no sangue.....	73
Tabela 7 –	Concentração de Lactato em rim não isquêmico	75
Tabela 8 –	Concentração de Lactato em rim isquêmico	77
Tabela 9 –	Concentração de Lactato – comparação entre rim não isquêmico <i>versus</i> rim isquêmico com solução	78
Tabela 10 –	Concentração de Lactato – comparação entre rim não isquêmico <i>versus</i> rim isquêmico com L-Alanil-Glutamina.....	80
Tabela 11 –	Concentração de Glicose no sangue.....	81
Tabela 12 –	Concentração de Glicose em rim não isquêmico	83
Tabela 13 –	Concentração de Glicose em rim isquêmico.....	84
Tabela 14 –	Concentração de Glicose – comparação entre rim não isquêmico <i>versus</i> rim isquêmico com solução salina	86
Tabela 15 –	Concentração de Glicose – comparação entre rim não isquêmico <i>versus</i> rim isquêmico com L-Alanil-Glutamina.....	87
Tabela 16 –	Concentração de Acetoacetato no sangue.....	88
Tabela 17 –	Concentração de Acetoacetato em rim não isquêmico	89
Tabela 18 –	Concentração de Acetoacetato em rim isquêmico	90
Tabela 19 –	Concentração de Hidroxibutirato no sangue.....	92
Tabela 20 –	Concentração de Hidroxibutirato em rim não isquêmico	93
Tabela 21 –	Concentração de Hidroxibutirato em rim isquêmico	94
Tabela 22 –	Concentração de Corpos Cetônicos no sangue	95
Tabela 23 –	Concentração de Corpos Cetônicos em rim não isquêmico.....	97

Tabela 24 – Concentração de Corpos Cetônicos em rim isquêmico	98
Tabela 25 – Concentração de Corpos Cetônicos – comparação entre rim não isquêmico <i>versus</i> rim isquêmico com solução salina	99
Tabela 26 – Concentração de Corpos Cetônicos – comparação entre rim não isquêmico <i>versus</i> rim isquêmico com L-Alanil-Glutamina	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Concentração de piruvato no sangue.....	68
Figura 2 –	Concentração de piruvato em rim não isquêmico	69
Figura 3 –	Concentração de piruvato em rim isquêmico	70
Figura 4 –	Concentração de piruvato – comparação entre rim não isquêmico <i>versus</i> rim isquêmico, com solução salina.....	71
Figura 5 –	Concentração de piruvato – comparação entre rim não isquêmico <i>versus</i> rim isquêmico com L-Alanil-Glutamina	72
Figura 6 –	Concentração de Lactato no sangue	74
Figura 7 –	Concentração de Lactato em rim não isquêmico.....	75
Figura 8 –	Concentração de Lactato em rim isquêmico	77
Figura 9 –	Concentração de Lactato – comparação entre rim não isquêmico <i>versus</i> rim isquêmico com solução	78
Figura 10 –	Concentração de Lactato – comparação entre rim não isquêmico <i>versus</i> rim isquêmico com L-Alanil-Glutamina	80
Figura 11 –	Concentração de Glicose no sangue.....	82
Figura 12 –	Concentração de Glicose em rim não isquêmico	83
Figura 13 –	Concentração de Glicose em rim isquêmico	84
Figura 14 –	Concentração de Glicose – comparação entre rim não isquêmico <i>versus</i> rim isquêmico com solução salina.....	86
Figura 15 –	Concentração de Glicose – comparação entre rim não isquêmico <i>versus</i> rim isquêmico com L-Alanil-Glutamina	87
Figura 16 –	Concentração de Acetoacetato no sangue	88
Figura 17 –	Concentração de Acetoacetato em rim não isquêmico.....	90
Figura 18 –	Concentração de Acetoacetato em rim isquêmico.....	91
Figura 19 –	Concentração de Hidroxibutirato no sangue	92
Figura 20 –	Concentração de Hidroxibutirato em rim não isquêmico.....	93
Figura 21 –	Concentração de Hidroxibutirato em rim isquêmico.....	94
Figura 22 –	Concentração de Corpos Cetônicos no sangue.....	95

Figura 23 –	Concentração de Corpos Cetônicos em rim não isquêmico	97
Figura 24 –	Concentração de Corpos Cetônicos em rim isquêmico	98
Figura 25 –	Concentração de Corpos Cetônicos – comparação entre rim não isquêmico <i>versus</i> rim isquêmico com solução salina	99

LISTA DE FOTOS

Foto 1 –	Animal imobilizado e sob efeito anestésico	57
Foto 2 –	Acesso à cavidade abdominal através de incisão mediana a partir do processo xifóide	58
Foto 3 –	Rim de cor violácea após pinçamento do pedículo vascular	58
Foto 4 –	Retorno à cor normal do rim após liberação do pedículo vascular	59
Foto 5 –	Verificação da patência da artéria renal, pelo doppler	59

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE FOTOS	14
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A VIDA.....	2
1.2 A CÉLULA	7
1.3 O METABOLISMO.....	9
1.4 MEIO INTERNO.....	15
1.5 O RIM.....	17
1.6 LESÃO ISQUÊMICA	21
1.7 LESÃO POR REPERFUSÃO	22
1.8 GLUTAMINA	26
2 OBJETIVO	30
3 MATERIAL	31
3.1 AMOSTRA	31
4 MÉTODO	32
4.1 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO	32
4.2 TÉCNICA ANESTÉSICA.....	33
4.3 TÉCNICA OPERATÓRIA	34
4.4 SACRIFÍCIO DO ANIMAL (EUTANÁSIA).....	36
4.5 TÉCNICA LABORATORIAL.....	36

4.6	CÁLCULO DOS METABÓLITOS	42
4.7	TRATAMENTO ESTATÍSTICO	42
5	RESULTADOS	43
5.1	PIRUVATO.....	43
5.2	LACTATO	47
5.3	GLICOSE	55
5.4	ACETOACETATO	63
5.5	3-HIDROXIBUTIRATO.....	66
5.6	CORPOS CETÔNICOS.....	69
6	DISCUSSÃO.....	75
7	CONCLUSÕES	84
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
9	LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	97
10	ANEXOS.....	99
10.1	DROGAS E REAGENTES	99
10.2	SUBSTÂNCIAS BIOQUÍMICAS E ENZIMAS.....	99
10.3	APARELHAGEM.....	100
10.4	MATERIAIS DIVERSOS	100

1 INTRODUÇÃO

*“Não há seguramente melhor sabedoria
do que conhecer o princípio das coisas”*

*Francis Bacon
em “Ensaio”*

A Vida é o fenômeno culminante da Natureza e sua origem o problema mais assombroso da Biologia.

A Razão cedo percebeu a inexorabilidade da morte e a dura verdade da finitude da vida impôs à frágil e limitada criatura humana a angústia de contemplar o próprio fim.

Todavia, o Homem não declina de lutar contra a circunstância de pertencer a um Universo regido por leis que compelem ao decaimento e à imobilidade numa situação de entropia máxima e luta arduamente para compreender a Vida, decifrar as suas origens e deslindar os seus mecanismos, com a finalidade precípua de derrogar, ou ao menos protelar, a sanção inelutável das leis universais. Dessa forma, sobreviver é a mais profunda motivação do ser humano.

A unidade primordial da Vida é a célula. Portanto, preservar vida significa resguardar células.

A Biologia, a Bioquímica, a Biologia Molecular e a Medicina inscrevem-se no grupo das ciências que intentam compreender e prolongar a vida.

O desenvolvimento médico atingiu o estágio em que é possível extirpar, reparar ou substituir órgãos. Nos dois últimos procedimentos, células poderão ser privadas, ao menos temporariamente, de irrigação sangüínea e, por conseqüência, de oxigênio, o propulsor primeiro dos processos biológicos.

A interrupção transitória da oferta de oxigênio e sua posterior retomada têm repercussões biológicas severas que devem ser evitadas.

A presente dissertação trata da possibilidade de preservação de células renais submetidas à isquemia/reperfusão, em situações controladas, e visa a observar prováveis efeitos benéficos do dipeptídeo alanil-glutamina na atenuação das conseqüências nocivas da isquemia/reperfusão.

Para tal, procedeu-se à análise da literatura pertinente e realizou-se experimento científico, utilizando amostras vivas submetidas a condições padronizadas e uniformes.

Materiais biológicos foram estudados mediante testes bioquímicos consagrados, dentro do rigor científico, e nas condições estruturais e laboratoriais possíveis em nosso meio.

Os resultados alcançados foram tratados estatisticamente, dispostos em gráficos e tabelas, e criteriosamente discutidos. À luz dos dados obtidos, foram extratadas conclusões consideradas positivas.

A escolha do tema prendeu-se à relevância prática de minimizar os efeitos nocivos da isquemia/reperfusão em face dos procedimentos cirúrgicos hodiernos.

1.1 A vida

*“Convém admitir, desde logo,
que não sabemos como a vida começou”*

*Stanley Miller e Leslie Orgel
em “The Origins of Life on Earth”. (1974)*

Há três questões científicas fundamentais que permanecem sem resposta e constituem o que se costumou chamar de “o mistério das três origens”: as origens do Universo, da Vida e da Mente. E, ao que parece, a Natureza guarda ciosamente esses segredos.

A origem do Universo encanta o labor indefesso de astrônomos, astrofísicos e cosmólogos determinados a entender como tudo começou e como tudo, um dia, irá terminar. Decifrar como a atividade cerebral resulta no que se denomina “mente” inquieta os estudiosos das ciências cognitivas aplicados em disciplinas elusivas como “percepção”, “desenvolvimento”, “comportamento”, dispostos a elucidar o que se considera “a última fronteira das ciências da vida” (DAMÁSIO, 2002).

Por sua vez, a origem da Vida é o objeto de estudo de biólogos e bioquímicos motivados pelo desejo de compreender o mais profundamente possível o fenômeno supremo da Natureza. Recentemente a incursão de Erwin Schrödinger (prêmio Nobel de Física de 1933) nos campos da Biologia inaugurou nova perspectiva para o entendimento da matéria animada, qual seja o aspecto físico da célula viva. Seu livro “O que é Vida?” influenciou uma geração de pesquisadores (SCHRÖDINGER, 1956).

A Vida é o fenômeno mais complexo que conhecemos (DE DUVE, 1997) e o primeiro obstáculo advém do tentame de defini-la. Bichat, o genial autor do *Traité des Membranes* e da *Anatomie Générale*, ao pretender conceituá-la, foi compelido ao truísmo: “A vida é o conjunto de funções que resistem à morte” (BICHAT, 1989). Prudentemente, o renomado lexicógrafo M. Abercrombie eximiu-se de incluir a palavra “vida” entre os verbetes de seu consagrado *A Dictionary of Biology*, até a edição de 1961 (ABERCROMBIE, 1961). Entre nós, Bolsanello também a omitiu no alentado *Dicionário Brasileiro de Termos Biológicos* (BOLSANELLO, 1991). Os Enciclopedistas a definem nos termos de um movimento contínuo de substâncias fluidas e substâncias sólidas em todo o corpo animado: a esse duplo movimento contínuo e recíproco estão ligados o nascimento, a nutrição e o crescimento aos quais se seguem a velhice e a morte (DE MASI; PEPE, 2003). Prigogine a entende como “uma flutuação da matéria” (PRIGOGINE, 2002) enquanto Margulis e Sagan consideram-na “encapsulação aquosa do espaço/tempo delimitado por uma membrana (MARGULIS; SAGAN, 2002). Portanto, parece válida, ainda hoje, a afirmação do médico, historiador e dicionarista E. Bouchut: “Sabe-se o que produz a vida, mas ignora-se o que ela é. É a verdade” (BOUCHUT, 1862). Condiz com a Vida a espontânea observação de Santo Agostinho referente ao Tempo: “se não me perguntam o que é, eu sei; se a mim perguntam o que é, não sei”. Ao fim, concluímos ser impossível definir a Vida de modo completo e perfeito restando-nos analisá-la em suas manifestações.

O estudo da Vida, enquanto fenômeno físico, é o interesse precípua da Biologia (do grego *bios* = vida e *logos* = discurso, estudo) (RAMIZ GALVÃO, 1909), palavra já proposta por Karl Burdach, em 1800, e cunhada definitivamente em 1802 por três autores simultaneamente: Gottfried Trevisanus em *Biologie oder Physiologie der lebenden Natur*, Jean-Batiste Lamarck em *Hidrologie* e Lorenz Oken em *Die Zeugung* (FRANKLIN, 1949; ENTRALGO, 1975; AMABIS; MARTHO, 2002).

As experiências simples de Francesco Redi, realizadas em 1668, expressas no *Esperienze intorno alla gerazione degli insetti*, de Lazzaro Spallanzani dadas à publicidade nas *Osservazioni e sperienze intorno agli animalucci delle infusioni* (1767) e de Louis Pasteur, concluídas em 1862 e enunciadas na *Memoire sur les corpuscules organisés qui existent dans l’atmosphère*, feriram de morte as teorias sustentadoras da geração espontânea dos seres vivos. Já não se poderia mais crer em vermes e insetos formados completos do lodo nem em pássaros nascidos das frutas maduras (SINGER, 1959;

ENTRALGO, 1975). O vazio deixado pelo derruimento das velhas crenças foi preenchido por novas doutrinas. Vitalistas fiam-se numa força não redutível ao domínio físico-químico capaz de conferir qualidades vitais à matéria inerte. Essa “força vital” seria passada de um ser vivo a outro ser vivo. De outro lado, mecanicistas crêem firmemente que fenômenos naturais são suficientes para explicar todos os fatos observáveis, inclusive a vida. Vitalistas têm defensores estrênuos do porte de Aristóteles para quem a diferença entre matéria viva e não viva reside na presença de força imaterial, a psiqué, que conferiria à matéria inerte os poderes de auto-alimento, de crescimento independente e de decadência. Também Galeno quer que o princípio básico da vida seja um “espírito”, o pneuma, parte do Espírito Geral do Mundo incorporado no ato da respiração (SINGER, 1996). Em dias recentes, William Thomson (Lord Kelvin) que afirma: “a matéria morta não pode tornar-se viva sem estar sob a influência da matéria viva. Este parece um ensinamento científico tão certo como a lei da gravitação” (OPARIN, 1957). Mecanicistas dão crédito ao juízo de Demócrito, falando pela boca de Lucrécio: “nada há senão corpos e vazio” (matéria e espaço) (LUCRÉCIO, 1962) e esteiam-se no áspero falar materialista de René Descartes: “a vida não é senão um efeito superior das leis da mecânica”, apressando-se porém em ressaltar: “que por ser tão complexa e bem ordenada só pode ser feita pela mão de Deus” (DESCARTES, 1989). Até os dias atuais não se conseguiu a criação artificial da vida e se vitalismo *versus* mecanicismo já se constituía um problema na Grécia antiga, ainda o é, em nossos dias (BODENHEIMER, 1958).

Há concórdia em pelo menos um ponto: “a vida é única, não importando a multiplicidade dos organismos envolvidos” (BOUCHUT, 1862).

Nos dias atuais, os conhecimentos da Química, da Física e da Biologia aprofundaram-se até ao nível das moléculas e dos átomos. A confluência dessas ciências estabeleceu a conjunção de esforços, a integração de atitudes, a harmonização dos métodos que resultou na instituição da Biologia Molecular, designação cunhada em 1938 por Warren Weaver e divulgada por William Thomas Astbury (ENTRALGO, 1975; LEHNINGER, 2000; JUDSON, 1979), que estuda o fenômeno vital na minúcia da sua organização molecular (DE ROBERTIS, 1993).

Dentre todos os elementos químicos naturais somente uns poucos, como já notara Lavoisier, participam da composição dos seres vivos (MARTINS E SILVA, 1979). É admirável que carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, fósforo e enxofre respondam por 98% do peso seco dos seres vivos e que a água constitua aproximadamente 70% dos

organismos (VOET, 2000). Esses elementos demonstram notável tendência para formarem moléculas simples (monômeros) capazes de se agruparem em conjuntos moleculares volumosos e complexos (polímeros) detentores de propriedades físico-químicas diferentes das moléculas que os compõem (OPARIN, 1957). Quando diretamente envolvidos na estrutura dos seres vivos recebem a designação de biomoléculas, sendo sintetizados a partir dos mesmos compostos simples, a eles retornando quando degradadas (VOET, 2000). Em todas essas combinações químicas é imprescindível a participação do carbono, o que levou F. A. Kekulé a propor, em 1848, que a parte da Química que as estuda passasse a ser chamada de “Química dos Compostos de Carbono” (FELTRE, 1998).

Embora seja surpreendente a quantidade de substâncias que formam os seres vivos, todas resultam de poucas e bastantes simples reações químicas. Assim, três pares de reações predominam na química biológica: a condensação (alongamento) das cadeias de carbono e o seu contrário, a ruptura das ligações entre átomos de carbono de uma cadeia orgânica. Em segundo lugar, a polimerização (união entre moléculas orgânicas) e o seu oposto, a hidrólise. Finalmente a oxidação e sua reação correlata, a redução. Além disso, ocorre nas células o processo de transferência de íons, moléculas ou grupos químicos de uma molécula para outra. Um traço geral dessas reações é a participação direta dos elementos da água, podendo seus componentes juntar-se às moléculas orgânicas ou destacar-se delas. (OPARIN, 1956)

As moléculas biológicas classificam-se em quatro categorias principais: os glicídios (do grego *glykys* = doce), as proteínas (do grego *proteios* = primeiro, principal), os lipídios (do grego *lipos* = gordura) (PEPPER, 1949) e os nucleotídeos (DE ROBERTIS, 1993). Com esses “tijolos químicos” a Natureza erigiu o majestoso edifício da Vida. Emil Fischer cunhou o termo “glicose” em 1877 e N. Guibourt, em 1826, a palavra “glicídio”. A palavra “proteína” foi introduzida por Gerritt J. Mulder em 1838, em reconhecimento à primazia quantitativa e qualitativa desses componentes na totalidade dos organismos.

Todavia, biomoléculas não sobreviveriam dispersas em meio aquoso (MAYNARD-SMITH, 1994) o que tornou imperativa a construção de membrana protetora (bicamada fosfolipídica) que isolaria termodinamicamente o sistema. É o fechamento de uma membrana sob a forma de vesícula que representa a transição da “não-vida” para a vida (MOROWITZ, 1992). Assim, “a vida permaneceu em meio ao mundo e à matéria, mas separada dele por uma membrana translúcida e semipermeável” (MARGULIS e SAGAN, 2002). Aceita-se que a membrana é universal em toda a estrutura vital (LODISH, 2002). Uma vez abrigadas,

macromoléculas concentram-se, aglutinam-se e resistem à fragmentação. Desse modo, o envoltório membranoso enseja a formação de meio estável, de composição química própria e diversa do meio circundante (PEÑA, 1991). Está dado o passo decisivo para o surgimento da Vida e o ser vivo pode ser considerado como “um indivíduo separado do mundo por sua membrana”. (JACOB, 1983)

Experiências históricas conseguiram a simulação da evolução química da vida e apontaram, na Terra, o local provável de seu surgimento: poças de água tépida do mar ou de lagos ou a superfície de substrato argiloso. Todavia, o achado intrigante de moléculas orgânicas complexas no espaço estelar, em cometas e meteoritos, evoca Anaxágoras (500-426 a.C.) a ensinar que a vida está disseminada no Universo. Essa asserção encontra arrimo, atualmente, em Svante Arrhenius (prêmio Nobel de Química de 1903) e Francis Crick (prêmio Nobel de Medicina de 1962) (MARGULIS e SAGAN, 2002).

Existe vida na terra há 3,8 bilhões de anos (DE DUVE, 1997; EL-HANI; VIDEIRA, 2001) e colônias bacterianas vicejaram há 3,5 bilhões de anos, deixando fósseis celulares incrustados em rochas sedimentares (estromatólitos) de Hamelin Bay, na Austrália Ocidental (SCHOPF, 1983).

As bactérias, provavelmente, foram os primeiros seres vivos a colonizar a Terra, a utilizar o oxigênio e a se locomover no mar primevo. Todos os organismos que conhecemos, inclusive o homem, derivam da agregação e da evolução desses seres unicelulares (MARGULIS e SAGAN, 2002).

Variedade química copiosa (100.000 substâncias diferentes em uma única célula) (VOET, 2000), composição mutável (metabolismo), compartimentação e setorização funcional (citossol, núcleo e organelas), intercâmbio seletivo e ativo com o meio exterior e acúmulo de energia (funções das membranas), captação e utilização de moléculas simples obtidas do meio exterior (nutrição), aptidão para produzir-se a si mesma (autopoiese) (MATURANA, 2002), preservação de características e capacidade de evolução (hereditariedade) e a propriedade de gerar ordem e adiar o decaimento universal imposto pela segunda lei da termodinâmica (produção de entropia negativa), são capacitações evolutivas que balizaram o caminho da química pré-biótica na passagem para a organização biológica que culminará na formação da célula.

Considerando a Vida um fato físico-químico e a Ciência – quando provida de meios e de tempo – onipotente, é lícito esperar que o mistério da vida seja um dia plenamente elucidado.

1.2 A Célula

*“Com o meu microscópio eu claramente descobri
essas células ou poros preenchidas com sucos”*

*Robert Hooke
em “Micrographia” (1665)*

O processo evolutivo, agindo ao longo de quase 4 bilhões de anos, produziu em torno de 4 milhões de espécies todas obedecendo a um plano organizacional básico. Dessa forma, os organismos, por inteiro e independentemente do grau de complexidade, são formados do mesmo e pequeno grupo de elementos químicos. Os elementos constitutivos dos seres vivos são os mesmos encontrados no mundo inorgânico embora entre eles existam diferenças organizacionais fundamentais (DE ROBERTIS, 1993).

Assim, o universo inorgânico tende ao equilíbrio termodinâmico com distribuição aleatória de matéria e energia. Contrariamente, as estruturas orgânicas vivas demonstram elevado grau de organização e de função (ordem) obtidas às custas do ingresso e da saída de matéria e energia (JUNQUEIRA, 2000).

Além de contarem essencialmente com o mesmo repositório bioquímico, todos os viventes detêm idêntico código genético.

Para o exercício das prerrogativas vitais, os seres vivos organizam-se em células.

Notada pelos cientistas do século XVII, favorecidos pela invenção do microscópio, a célula (do latim *cella* = compartimento, espaço vazio, cubículo) (PEPPER, 1949) é a unidade biológica fundamental e a sede dos eventos físico-químicos peculiares à matéria viva. Uma única célula pode constituir um organismo completo (DE ROBERTIS, 1993). Robert Hooke, em 1665, cunhou o nome enquanto observava a estrutura da cortiça (FRANKLIN, 1949). Matthias Schleiden, perscrutando a origem, e Theodor Schwann, comprovando o atributo de

elemento basilar de animais e plantas, fundaram a Teoria Celular, aclaradora da organização dos seres vivos (SCHLEIDEN, 1838; SCHWANN, 1839). Rudolf Virchow afixou-a com o prestígio extraordinário de sua autoridade e confirmou-a com o sinete do axioma célebre: “*omnis cellula e cellula*” (VIRCHOW, 1868).

Os grandes microscopistas europeus do século XIX estudaram-na exaustivamente, esgotando os recursos da microscopia óptica e das técnicas histológicas vigentes, estabelecendo os fundamentos de sua estrutura, determinando a terminologia e assentando as bases da citologia moderna (do grego *kytos* = célula e *logos* = estudo) (PEPPER, 1949; HUGHES, 1989).

Então, J. E. Purkinje, em 1839, denominou “protoplasma” o componente mais abundante da célula, diferenciando-o do núcleo (DAWES, 1952) e Eduard Strasburger, em 1892, cunhou a palavra “citoplasma” para nominar o conjunto do citossol + organelas (HUGHES, 1989).

Felix Fontana já assinalara o núcleo celular em 1781 mas o estudo definitivo e a denominação atual devem-se a Robert Brown, em 1882, (HUGHES, 1989).

Rudolf Kölliker, em 1857, observou a primeira organela julgando-a uma “inclusão”. Richard Altman, em 1894, relacionou-a acertadamente às bactérias e à respiração celular cabendo a Carl Benda, em 1889, cunhar a palavra mitocôndria e desenvolver o primeiro método eficaz para corá-la (HUGHES, 1989; NORDENSKIÖLD, 1946; DE ROBERTIS, 1993).

Camilo Golgi, em 1889, usando corantes de prata, demonstrou a primeira organela complexa (o aparelho de Golgi) (DAWES, 1952).

J. L. Prevost e J. B. Dumas, em 1824, observaram as alterações estruturais peculiares à divisão celular (HUGHES, 1989) que foram definitivamente estudadas por Eduard Strasburger (células vegetais) e Walther Flemming (células animais) este último cunhando a palavra “cromatina” (do grego *chroma* = cor) (PEPPER, 1949; HUGHES, 1989) cabendo a Waldeyer, em 1881, cunhar a palavra “cromossomo” (do grego *chroma* = cor + *soma* = corpo) (PEPPER, 1949).

O botânico dinamarquês Wilhelm L. Johanssen cunhou a palavra “gene” (do grego *genos* = origem) (PEPPER, 1949) para nominar as unidades hereditárias situadas nos cromossomas (DAWES, 1952).

Todavia, numerosas estruturas sub-celulares tiveram que aguardar até 1931 quando o engenheiro alemão Ernst Ruska (1906-1988) desenvolveu o microscópio eletrônico com aumento de até 100.000 vezes, o que lhe valeu o prêmio Nobel de Física de 1986, revelando, por inteiro, os componentes celulares (JUNQUEIRA, 2000).

As técnicas histológicas desenvolveram-se enormemente contando os cientistas de hoje com refinados procedimentos histoquímicos e histo-imunoquímicos, fracionamento celular, criofratura, além da microscopia eletrônica, com contraste de fase, confocal e polarizada. Tal cópia de recursos impulsionou o estudo da célula até ao nível da observação de macromoléculas (JUNQUEIRA, 2000).

A moderna teoria celular estabeleceu, de modo inequívoco, quatro verdades que têm permanecido inabaláveis:

- A célula é a unidade morfológica e fisiológica de todos os organismos.
- As propriedades de um organismo são consequência das propriedades de suas células.
- As células originam-se exclusivamente de outras células.
- A célula é a menor unidade da vida.

(DE ROBERTIS, 1993).

Apesar de todos os avanços da ciência, a passagem da condição abiótica para a vida permanece incógnita e a célula ainda oculta zelosamente o seu enigma.

1.3 O Metabolismo

“O metabolismo recapitula a biogênese”

Harold Morowitz

em “Beginnings of Cellular Life” (1992)

O meio intracelular é o substrato para inúmeras e incessantes reações químicas, envolvendo a síntese de biomoléculas e a sua degradação em componentes mais simples. As primeiras são chamadas reações anabólicas enquanto a bio-degradação é nomeada reação catabólica. Ambas ocorrem principalmente às custas de sucessivos processos de oxidação (remoção de elétrons) e redução (adição de elétrons) que demandam a transferência de elétrons entre biomoléculas. Na maioria das vezes, o elétron translocado une-se a um próton resultando, na verdade, em transferência de íon H^+ (ALBERTS 2002). Os íons H^+ percorrem

várias moléculas numa série de reações que promovem a liberação de energia, com a produção final de CO₂ e H₂O. A essa seqüência chama-se “cadeia respiratória” ou “respiração celular” que se inicia com a transferência de elétrons do nicotinamida dinucleotídeo reduzido (NADH) até o oxigênio molecular numa rota que envolve, ao todo, mais de 60 diferentes proteínas (ALBERTS, 2002). As reações anabólicas (síntese) consomem energia enquanto as reações catabólicas promovem a sua liberação (RAW, 2001).

Ao conjunto dessas reações denomina-se “metabolismo” (do grego *metabolé* = mudança, troca) (RAMIZ GALVÃO, 1909).

Empregada primeiramente na Alemanha, em 1806, através da palavra correspondente germânica *Stoffwechsel*, já comparece na obra de Schwann (1839) em sua versão latinizada *metabolish*, passando ao uso corrente na França a partir de 1858 (*metabolisme*) (FRANKLIN, 1949; REY, 1992).

O estudo moderno do metabolismo teve início quando Lavoisier se propôs a esclarecer os fenômenos da combustão e geração do calor animal (NORDENSKIÖLD, 1946), cunhando a palavra “oxigênio” para designar o gás descoberto por Priestley e ainda inominado (PEPPER, 1949).

As reações biológicas são facilitadas pela ação de catalisadores protéicos chamados enzimas (do grego *en* = no e *zymos* = levedo) (PEPPER, 1949), palavra cunhada pelo fisiologista alemão W. Kühne, em 1848, enquanto estudava a digestão (LEE, 2000).

As enzimas são específicas sendo essa, talvez, a sua propriedade mais significativa. Em geral unidirecionais, atuam velozmente e em grandes volumes de substrato exigindo condições brandas de temperatura e pressão (RODWELL, 1998). Muitas enzimas catalisam uma única reação ou um conjunto de reações muito semelhantes que dificilmente ocorreriam sem a ação de um catalisador. Virtualmente cada uma das milhares de reações ocorridas nas células são catalisadas por uma enzima (DE DUVE, 1997).

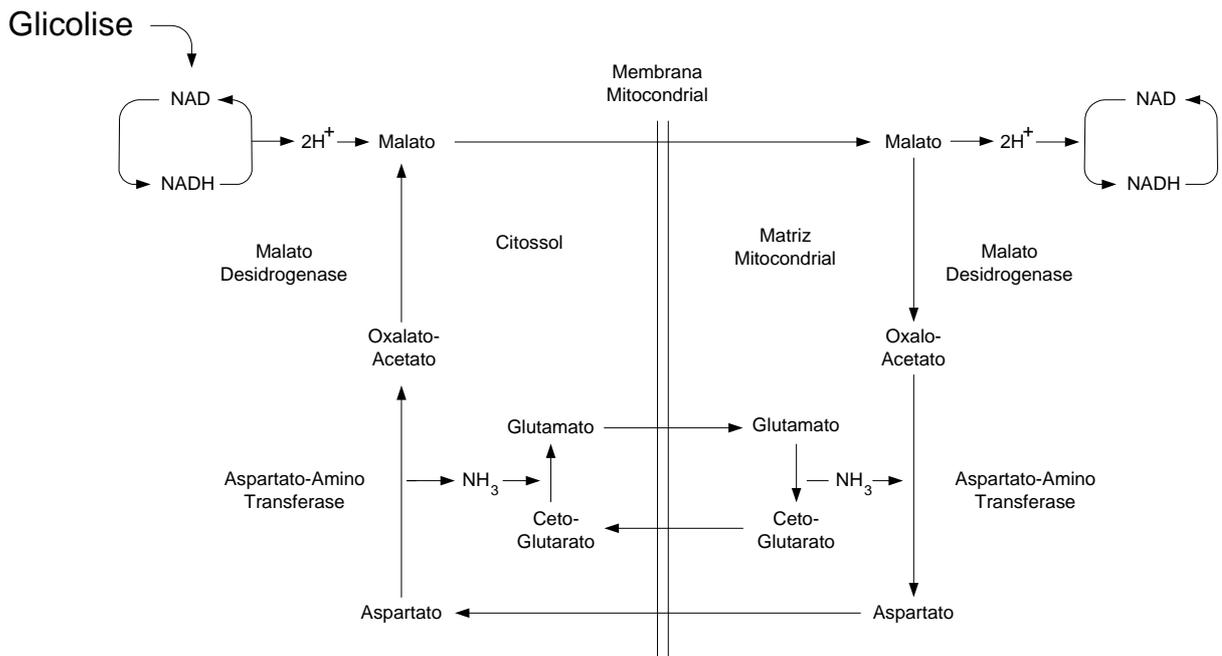
Por agir em cadeia, a ação enzimática enseja a criação e o direcionamento de rotas metabólicas irreversíveis em que a substância resultante de uma reação é o substrato da reação seguinte (RODWELL, 1998).

Algumas das mais importantes rotas metabólicas são circulares, situação em que determinada substância sofre sucessivas transformações químicas para, ao fim, retornar à forma inicial refazendo-se o ciclo, indefinidamente. A produção de energia ou o transporte de elétrons, íons ou grupos químicos são as principais características das rotas circulares de que

são exemplos o ciclo de Krebs e a rota carreadora circular malato-aspartato. Etapas importantes da respiração celular ocorrem na membrana interna da mitocôndria. A membrana mitocondrial externa, pela presença de uma proteína especial (porina) que faculta a ocorrência de canais trans-membrana, é permeável a moléculas pequenas e a íons. Contrariamente, a membrana mitocondrial interna é impérvia à maioria das moléculas e mesmo a prótons. Então, só atravessarão a membrana interna aquelas moléculas e íons para os quais houver carreadores protéicos específicos (LEHNINGER, 2000).

Certas etapas da respiração celular ocorrem no citossol enquanto outras sucedem na matriz mitocondrial. Portanto, componentes citossólicos precisam ser especificamente transportados para o interior da matriz mitocondrial enquanto outros serão levados para fora dela, para que o processo da respiração celular tenha continuidade. Por exemplo, adenosina difosfatada (ADP) e o fósforo inorgânico (Pi) são levados ao interior matricial enquanto a recém-formada adenosina trifosfatada (ATP) é carreada para fora. Todavia, a membrana mitocondrial não possui portador específico para o NADH produzido, no citossol, durante a glicólise. Então, somente os prótons do NADH passarão ao interior da mitocôndria com a finalidade de reduzir o NAD intramitocondrial, transformando-o em NADH (VOET, 2000). Essa passagem é efetuada pelo circuito (lançadeira) malato-aspartato presente no rim, fígado e coração de mamíferos (CAMPBELL, 2001). Nesse circuito, moléculas de malato transpõem a membrana mitocondrial interna conduzindo prótons do NADH citossólico até o interior da matriz mitocondrial. O malato cede os prótons carreados aos componentes da cadeia transportadora de elétrons, transforma-se em oxaloacetato e em aspartato que retorna ao citossol, em etapa irreversível da lançadeira (DEVLIN, 2000). De volta ao citossol, o aspartato regenera oxaloacetato que, ao aceitar prótons oriundos da glicólise, produzirá malato, fechando-se o ciclo.

As etapas de transformação de oxaloacetato a aspartato e de aspartato a malato incluem aminação e desaminação para as quais concorrem o glutamato transformando-se em α cetoglutarato e vice-versa, constituindo um ciclo dentro de outro ciclo.



As etapas da lançadeira são catalisadas por dois conjuntos de enzimas (translocases) citossólicas e mitocondriais que compreendem as malato-desidrogenases e as aspartato-aminotransferases (ROSKOSKI, 1997; DEVLIN, 2000).

Diversas enzimas que catalisam transferências de grupos e outras reações requerem a participação de outra molécula orgânica não proteica chamada co-enzima a que se liga e sem qual é inativa. Várias co-enzimas são vitaminas ou a elas metabolicamente relacionadas (RODWELL, 1998) e possuem componente inorgânico, na maioria das vezes um átomo de ferro, cobalto, molibdênio, cobre, zinco ou manganês (DE DUVE, 1997; CAMPBELL, 2001).

São conhecidas mais de duas mil reações metabólicas, cada uma delas catalisada por uma enzima específica (VOET, 2000).

A razão do metabolismo é a produção da energia necessária à formação, desenvolvimento e manutenção das estruturas celulares e a consecução das diversas funções biológicas (ALBERTS, 1999). Esse objetivo é alcançado pela obtenção de energia solar transformada ou pela degradação de nutrientes oriundos do meio ambiente.

Dois esquemas básicos demonstram as etapas fundamentais da utilização energética:



Os organismos adaptados a utilizar a luz solar como fonte energética chamam-se fototróficos, diferentemente dos que obtêm energia oxidando compostos químicos, por isso denominados quimiotróficos. Certos microorganismos quimiotróficos adquirem energia oxidando unicamente componentes inorgânicos da Natureza e, por tal, denominam-se quimiolitotróficos. No entanto, a maioria dos organismos e todos os animais utilizam substrato orgânico como fonte energética e por isso são nomeados quimioorganotróficos (MARZZOCO; TORRES, 1999). Todavia, incapazes de sintetizar todos os componentes de que necessitam, adquirem-nos de outros organismos. Tal dependência obriga a que se nutram de outros seres vivos, animais ou plantas.

A dura imposição de matar para viver comoveu Anton Leeuwenhoek, o inventor do microscópio, ao reconhecer, com um laivo de tristeza, que “a vida se nutre da vida; é cruel mas, ao que parece, Deus assim o quer”.

A etapa oxidativa geradora de energia se estabeleceu quando a célula desenvolveu a mitocôndria (PEÑA, 1991) talvez por incorporação simbiótica de uma bactéria aeróbica (MARGULIS; SAGAN, 2002).

A energia encontra-se armazenada nas ligações químicas das biomoléculas e as células a obtêm mediante oxidação gradual e controlada, pelo processo denominado “respiração celular” (ALBERTS, 1999) que se desenrola na membrana interna das mitocôndrias, como imaginado por Otto Warburg (prêmio Nobel de Química de 1931) no primeiro quarto do século XX (KEILIN, 1966) e demonstrado por Eugene Kennedy e Albert Lehninger, em 1948 (LEHNINGER, 2000).

A energia liberada na atividade celular obedece aos princípios da “energia livre” estabelecidos por J. Willard Gibbs (1839-1903), expressos na fórmula

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

em que ΔG é a energia livre, ΔH é a entalpia e ΔS a entropia do sistema compreendendo-se que ΔG representa a energia livre dos produtos menos a energia livre dos reagentes. Desse modo:

$$\Delta G < 0 \text{ (processo exergônico, exequível)}$$

$$\Delta G = 0 \text{ (processo isoergônico, equilíbrio)}$$

$$\Delta G > 0 \text{ (processo endergônico, inexecuível)}$$

(ROSKOSKI, 1997)

A energia acumula-se em moléculas especiais altamente difusíveis e que a retêm de um modo facilmente permutável, denominadas “carreadores ativados”. Por razões históricas, os carreadores são também chamados co-enzimas (ALBERTS, 1999).

Os principais carreadores ativados são a adenosina trifosfatada (ATP), descoberta por Karl Lohmann em 1928, o nicotinamida dinucleotídeo (NAD) e suas variantes reduzidas (NADH) e fosfatada (NADPH), o flavina dinucleotídeo (FAD), descobertos por Otto Warburg e colaboradores em 1931 (ENTRALGO, 1975), o acetil-coenzima A, descoberto por Fritz Lipmann, (LIPMANN, 1953), e os citocromos a, b e c, descobertos por C. A. McMunn, em 1842, e estudados, em profundidade, por Keilin em 1925 (KEILIN, 1966) que cunhou o nome atual, e a co-enzima Q, uma quinona lipossolúvel descoberta por Crane, em 1957, denominada ubiquinona em razão da mobilidade que a faculta percorrer livremente a membrana interna mitocondrial (CAMPBELL, 2001) e que é o único transportador de elétrons não adito a grupo prostético ligado a uma proteína (LODISH, 2002).

O ATP é o mais abundante e versátil carreador ativado e o principal combustível celular. Sua síntese ocorre, principalmente, durante a degradação da glicose (glicólise) numa etapa denominada “fosforilação oxidativa”, fenômeno que ocorre no interior das mitocôndrias, em que uma molécula de adenosina difosfatada (ADP) é transformada em ATP pelo acréscimo de um átomo de fósforo inorgânico (Pi) (MARTINS E SILVA, 1979). A enzima ATPase rompe a molécula de ATP liberando energia e originando ADP e fosfato inorgânico (Pi) (JUNQUEIRA, 2000).

A fosforilação oxidativa é a culminância do metabolismo energético nos organismos aeróbicos. Para ela convergem as etapas da degradação oxidativa do metabolismo dos carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos na fase final da respiração celular. Nesta ocasião elétrons fluem para o oxigênio em reação exergônica que provê a energia necessária à produção do ATP (LEHNINGER, 2000). O oxigênio é, portanto, o aceptor final dos elétrons da cadeia respiratória.

A glicólise, ocorrida no citossol, desemboca em rota metabólica circular descoberta, em 1937, por Hans Krebs (prêmio Nobel de Química de 1953) – o ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico – confluência dos metabolismos da glicose, ácidos graxos e, em parte, dos aminoácidos, que aí encontram sua destinação metabólica final. Daí dizer-se que as gorduras e as proteínas queimam-se no fogo dos açúcares.

O ciclo de Krebs gera elétrons de alta energia, incorporados ao NADH, que percorrendo a cadeia transportadora liberam a energia necessária à síntese do ATP. Esse processo (acoplamento químico-osmótico) ocorre na membrana interna das mitocôndrias e foi elucidado por Peter Mitchell, em 1961, valendo-lhe o prêmio Nobel de Química (RAW, 2001).

O ciclo de Krebs é considerado o centro do metabolismo celular (VOET, 2000). A degradação de uma molécula de glicose (glicólise), em condições aeróbicas, produzirá 38 moléculas de ATP. Entretanto, em condições anaeróbicas serão formadas somente duas moléculas de ATP. Evidencia-se a maior eficiência (16 vezes) do processo aeróbico (VOET, 2000).

NAD, FAD, ubiquinona e citocromos são os principais carreadores de elétrons.

Do ponto de vista termodinâmico, os organismos são sistemas abertos nos quais o metabolismo sustenta equilíbrio dinâmico em que o fluxo energético iniciado com a obtenção de nutrientes compensa-se com o consumo inerente às reações químicas e à dissipação sob a forma de calor (CAMPBELL, 2001). No entanto, o processo da vida não contraria a segunda lei da termodinâmica, pois a ordem imposta pela atividade vital é conseguida às custas de desordem provocada no Universo. O brilhante pensamento de Walter Cannon vem colmar este resumo das etapas principais do metabolismo: “Maior é ainda a nossa admiração se nos lembrarmos que o organismo se acha em constantes trocas com o mundo exterior e sua própria estrutura não é permanente, pois continuamente é destruída pelo desgaste da ação e ininterruptamente reconstruída pelos processos de restauração” (CANNON, 1946), confirmando a reflexão taoista, antiga de 2500 anos: “a vida é um contínuo vir – a – ser e todos os seres estão em um estado de fluxo” (MERTON, 1957).

1.4 Meio interno

“É preciso, para fundar a ciência biológica experimental, conceber também o meio interior”

Claude Bernard

em “Introduction a la Medicine Experimentale” (1865)

Já no recuado ano de 1865, o eminente fisiologista Claude Bernard (1813-1878) chamava a atenção para o fato de as células dos organismos superiores estarem imersas em meio líquido formado às custas dos meios circulantes e dos líquidos intraorgânicos. Designou-o – em oposição ao meio externo ambiental – de “meio interno” (*milieu interieur*), correspondendo ao que hoje compreendemos como os fluidos extracelular e intersticial.

Entendia que os estudos biológicos e fisiológicos “se baseiam no conhecimento das partículas mais íntimas e mais sutis que constituem os elementos orgânicos do corpo” e sabia que os vários constituintes orgânicos manifestam suas propriedades através de interações físico-químicas exercidas com esse meio. Estudou-o minuciosamente, pois “é preciso, de alguma maneira, decompor sucessivamente o organismo tal como se desmonta uma máquina para conhecer e estudar todos os mecanismos” (BERNARD, 1959).

Conforme observou Cannon, “acostumamo-nos a referir-nos, a nós próprios, como habitantes do ar quando, na realidade, as células do nosso organismo são habitantes da água” (CANNON, 1946).

Através do meio interno “que é um verdadeiro produto do organismo” (BERNARD, 1959), ocorrem as relações de permuta com o meio exterior. Essa função integradora leva às células o oxigênio, a água, os nutrientes e várias outras substâncias, recebendo os resíduos resultantes de sua atividade. O meio interno mantém-se notavelmente constante e esse equilíbrio é condição imprescindível ao bom desempenho fisiológico.

Para a constância do meio interno concorrem vários órgãos e sistemas orgânicos: o sistema circulatório, com o coração bombeando o sangue e os capilares filtrando plasma para o meio intersticial; os pulmões, propiciando o oxigênio que será ofertado às células e expelindo o gás carbônico resultante da atividade metabólica; o aparelho digestivo, provendo o aporte de nutrientes geradores da energia necessária ao funcionamento orgânico; os sistemas nervoso e endócrino, promovendo a integração interorgânica e finalmente, os rins, regulando o volume hídrico e a pressão osmótica, controlando os equilíbrios ácido-básico e eletrolítico e expurgando os resíduos metabólicos não voláteis. São os rins os órgãos primordiais na manutenção da constância do meio interior, exercendo, ainda, importantes funções endócrinas.

Para expressar tão delicado equilíbrio fisiológico Cannon, em 1926, cunhou a palavra **homeostase** que “significa uma condição que pode variar, mas que é relativamente constante” (CANNON, 1946).

Ao fim, é correta a asserção de Claude Bernard: “todos os mecanismos vitais, por mais variados que sejam, têm apenas uma finalidade: manter constantes as condições de vida no meio interno” (BERNARD, 1959).

Provavelmente, a composição do meio interno é semelhante à do mar primordial onde a vida se formou (DAVIES, 2002).

1.5 O Rim

“O que é o homem senão uma máquina acuradamente regulada e muito engenhosa cuja finalidade é transformar o vinho tinto de Shiraz em urina?”

*Isak Dinensen
em “Sete Novelas Fantásticas” (1979)*

Aristóteles afirmava que os rins não eram órgãos vitais e, até Galeno, acreditava-se que a urina era produzida na bexiga (ARISTÓTELES, 1956; SMITH, 1959).

A estrutura tubular renal foi observada pela primeira vez por Lorenzo Bellini, professor de Anatomia em Pisa, em 1662 (FRANKLIN, 1949).

Marcello Malpighi contemplou os glomérulos renais em 1666, tomou-os por glândulas, comparou-os a maçãs e chamou-os “corpúsculos” (ENTRALGO, 1975). Alexander Schumlansky, fisiologista russo radicado em França, cunhou o nome atual (do latim *glomus* = novelo) em seu livro *De structura renum*, de 1788 (PEPPER, 1949).

Em 1842, o médico inglês William Bowman percebeu a relação dos glomérulos com o sistema tubular renal e observou que o novelo glomerular está envolto por dilatação em forma de taça presente na extremidade fechada proximal dos túbulos renais (cápsula de Bowman). Cogitou que através dela filtraria a água que diluiria as substâncias

secretadas pelas células tubulares (PITTS, 1966): “Por que há um aparelho tão maravilhoso colocado na extremidade de cada túbulo urinífero senão para fornecer água a fim de auxiliar na separação e na solução dos produtos urinários provenientes do epitélio do tubo?” (BOWMAN, 1842). Dois anos depois, o fisiologista alemão Karl Ludwig teorizou que os glomérulos seriam filtros do plasma sanguíneo através dos quais escoaria a urina que seria concentrada nos túbulos. Seus trabalhos foram revisados e confirmados por Rudolf Heidenhain, surgindo a “teoria de Ludwig-Heidenhain” para a formação da urina. Em 1917 veio a lume, em Londres, a monografia de Arthur R. Cushny, que elucidou, de modo definitivo, o mecanismo da formação da urina inclusive os processos de ultrafiltração e excreção (CUSHNY, 1926; PITTS, 1966). A excreção renal foi irrefutavelmente demonstrada por E. K. Marshall, em 1924 (FRANKLIN, 1949). Todavia, a teoria de Bowman não era desarrazoada uma vez que existem peixes (*Opsanus tau*) com rins desprovidos de glomérulos, sendo a urina inteiramente produzida pelos túbulos (DAWES, 1952).

Diferentemente das demais vísceras, os rins (do latim *ren* = rim) (PEPPER, 1949), como as gônadas e a córtex adrenal, não se formam a partir do endoderma mas do mesoderma (CUSHNY, 1926) através de precursores segmentados denominados “tubos néfricos”. Desse modo “urina e reprodução sempre andaram juntas” (SMITH, 1959).

O rim é a principal via de excreção da água, o que deve ser feito sem a perda de sal. A conservação de sal é uma das mais primitivas, senão a mais primitiva, função do rim (SMITH, 1959). Assim, ele está estruturado para funcionar como sistema de filtração/reabsorção (CUSHNY, 1926) que atingiu o ápice quando os animais deixaram o mar, perdendo a pele e as brânquias como órgãos excretórios. A reabsorção tubular advém da necessidade de poupar água de sorte que os rins concentram a urina 8 vezes (SMITH, 1959).

A essas propriedades acrescentou-se a “excreção”, condição em que as células tubulares lançam substâncias por elas secretadas diretamente na luz tubular sem filtrá-las através dos glomérulos. A progressão funcional do rim propiciou aos vertebrados a estabilidade do meio interno necessária ao processo evolucionário (SMITH, 1959).

Os rins têm fundamentalmente duas funções: extrair do sangue resíduos não voláteis do metabolismo, eliminando-os através da urina (do grego *ouros* = urina) (PEPPER, 1949) e regular o meio interno (ROMER, 1951). Portanto são os responsáveis pelos ajustes de volume e de osmolaridade dos líquidos corporais além de regular os equilíbrios ácido-básico e

iônico. Desempenham ainda importante função endócrina, secretando hormônios como a renina e a eritropoietina (DAVIES, 2002).

Os rins são órgãos pares pesando em média 180g cada um, correspondendo a 0,5% do peso de um adulto de 70 quilos (COTRAN, 1996). Dotados de abundante irrigação sanguínea recebem 1/5 do débito cardíaco. Portanto, 1 litro de sangue perfunde os rins a cada minuto, 60 litros a cada hora e 1500 litros em um dia (SMITH, 1959). Tão copiosa oferta sanguínea flui através das artérias renais, subdividindo-se até chegar às arteríolas glomerulares aferentes que desembocam no novelo capilar dos glomérulos e drenam para as arteríolas eferentes. Destas emana profusa rede capilar que ocupa os interstícios tubulares e conflui para as veias renais. Animais primitivos possuíam circulação peritubular do tipo “porta” que se extinguiu deixando o traço do plexo pampiniforme que envolve epidídimo e parte do cordão espermático (SMITH, 1959).

Os rins são órgãos ricamente inervados (DAVIES, 2002). Recebem fibras pós-ganglionares provenientes do gânglio celiaco (inervação simpática), ramos nervosos derivados das redes neurais adrenal e aórtica além de ramos diretos dos nervos esplâncnicos. Essa rede neural mescla-se com filetes nervosos derivados dos nervos vagos (inervação parassimpática). Os numerosos ramos nervosos constituem plexo nervoso (plexo renal) que se distribui, em rede, ao longo dos vasos sanguíneos. As fibrilas nervosas chegam até ao nível dos capilares renais insinuando-se mesmo entre as células tubulares. A inervação esplâncnica é o principal agente vasomotor do rim e sua estimulação causa vasoconstricção. A vasoconstricção renal diminui o aporte sanguíneo aos glomérulos sendo seguida de redução ou cessação da produção de urina. Os nervos vagos não têm ação vasomotora renal e não há evidência de que afetem a secreção urinária (CUSHNY, 1926).

O nefro (do grego *nephros* = rim) (PEPPER, 1949) é a unidade funcional renal e compreende glomérulos e túbulos renais. Cada rim contém em torno de 1 milhão de nefros (DAVIES, 2002). Estima-se que a superfície do endotélio glomerular seja de 0,76 m² (aproximadamente a metade da superfície corporal de um adulto de 70 quilos) e que o comprimento total dos túbulos alcance 80 km. Os glomérulos vertem para os túbulos, a cada dia, 180 litros de filtrado plasmático 99% dos quais serão reabsorvidos pelas células tubulares. Observando que o volume extracelular de um adulto é, aproximadamente, de 11 litros, constatamos que todo o meio interno é filtrado 16 vezes pelos rins, diariamente (SMITH, 1959).

Rins cortados longitudinalmente revelam, à inspeção desarmada, duas camadas tissulares: uma externa (a córtex) e outra central (a medula). Os glomérulos situam-se unicamente na camada cortical. A córtex renal utiliza a via aeróbica para o metabolismo da glicose enquanto a medula é estritamente anaeróbica (DAVIES, 2002). Essa peculiaridade propicia a ocorrência de importante fato fisiológico, que é a resistência da medula renal às condições anaeróbicas.

Durante o processo de ultrafiltração glomerular apenas as moléculas de menor peso ultrapassam o endotélio glomerular e as camadas basal e celular da cápsula de Bowman. Desse modo, o filtrado glomerular é praticamente livre de proteínas (CUSHNY, 1926). A urina (1,8 litro/dia, em média) representa a fração de 1% do filtrado não reabsorvido pelos túbulos renais.

Igualmente a outros componentes da economia orgânica, os rins são suscetíveis aos efeitos nocivos da isquemia e aos danos da reperfusão.

A condição isquêmica pode ser imposta aos rins em situações cirúrgicas planejadas ou acidentárias. O transplante renal representa bem a primeira circunstância e o aneurisma aórtico abdominal roto exemplifica a segunda.

A isquemia, por prolongada ou por acometer rins já afetados, provocará a necrose anóxica das células tubulares (necrose tubular aguda) que resultará em insuficiência funcional aguda.

As conseqüências dessa situação manifestam-se através de graves desequilíbrios ácido-básico, osmolar, iônico, de volume hídrico e hormonal prejudiciais à homeostase, aduzindo grande morbidade e alta mortalidade.

Assim, são válidos os esforços que visam pesquisar substâncias que promovam a proteção renal e reforcem as medidas já em prática que pretendem a preservação de órgãos tão importantes.

1.6 Lesão isquêmica

“A vida da carne está no sangue”

Levitico 17, 11

Quatro componentes estruturais e funcionais celulares são particularmente sensíveis à hipóxia que se segue à isquemia:

1. a membrana celular, da qual depende principalmente o equilíbrio iônico e osmótico;
2. a respiração aeróbica, que compreende, entre outros eventos, a fosforilação oxidativa e a produção de ATP (adenosina-tri-fosfatada);
3. a síntese de proteínas estruturais e enzimáticas;
4. o componente genético (cromatina), do qual depende a reprodução celular (COTRAN, 1996; CONN, 1998).

Considerando a gravidade dos efeitos adversos produzidos, a lesão isquêmica pode ser classificada como reversível ou irreversível (COTRAN, 1996).

Na primeira condição, uma vez suprimida a isquemia e restaurada a perfusão, ocorrerá a recuperação celular com retorno à condição de homeostase. Na segunda, a reperfusão será incapaz de reverter os danos estabelecidos e os eventos se encaminharão para a morte celular.

O primeiro ponto atingido pela hipóxia é a respiração celular representada principalmente pela fosforilação oxidativa, atividade desempenhada pela membrana interna da mitocôndria. O comprometimento dessa importante função celular reduz ou anula a produção de adenosina trifosfatada (ATP). O ATP inscreve-se no grupo dos fosfatos energéticos de que a célula depende para a transferência da energia livre (energia de Gibbs) necessária ao desempenho dos processos metabólicos.

O impedimento na produção de ATP favorece o acúmulo de adenosina mono-fosfato (AMP), que será metabolizada em adenosina, inosina e hipoxantina. Por sua vez, esta estimula as enzimas fosfofrutoquinase e fosforilase, indutoras da glicólise anaeróbica (via metabólica alternativa) com a finalidade de manter ativas as fontes energéticas. Desta forma, o ATP será produzido através da utilização do glicogênio e do recurso da gliconeogênese. Como resultado, haverá rápido esgotamento das reservas de glicogênio. Da utilização da via

alternativa anaeróbica advém o acúmulo de ácido láctico com a conseqüente queda do pH intracelular (acidose láctica).

A depleção de ATP afeta sobretudo a membrana celular (OTAMIRI, 1989), causando aumento da permeabilidade e desequilíbrio dos gradientes coloido-osmóticos intracelular e extracelular favorecendo a saída do potássio intracelular e a passagem de sódio para o interior da célula. Em decorrência desse fato, ocorre ganho de soluto intracelular disso resultando edema celular (tumefação celular aguda), distensão do retículo endoplasmático, tumefação das mitocôndrias, descolamento dos ribossomos e surgimento de vesículas na superfície celular (COTRAN, 1996).

As alterações descritas serão reversíveis se houver a retomada da irrigação sangüínea e pronta re-oxigenação.

Persistindo o fenômeno isquêmico, surgirão outras, e mais graves, alterações celulares: vacuolização das mitocôndrias e lesão do citoesqueleto com o desprendimento da membrana celular.

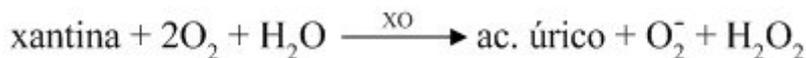
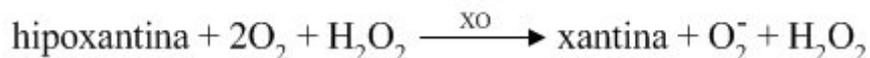
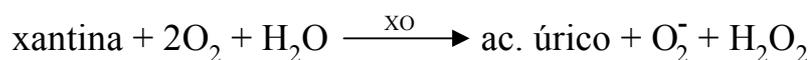
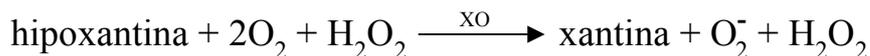
Este último fato torna a membrana celular hiper-permeável ensejando a perda continuada de proteínas, enzimas, co-enzimas e material cromatínico. Ocorre ainda a brusca passagem de cálcio ionizado para o interior da célula (influxo de cálcio) com ativação de várias enzimas (fosfolipases, proteases e endonucleases). Acumulam-se produtos de degradação dos lipídios (fosfolipídios) lesivos para a membrana celular, agravando o fenômeno da hiper-permeabilidade. O rompimento das membranas lisossômicas produz vazamento, para o citossol, de glicosidases, fosfatases, proteases e DNA-ases. A ativação dessas enzimas conduz à digestão dos componentes celulares, caracteriza a irreversibilidade das lesões e estabelece a morte celular (COTRAN, 1996; CHIU, 1970).

1.7 Lesão por reperfusão

Paradoxalmente, a retomada da circulação e da oxigenação tissulares não são isentas de efeitos lesivos, sabendo-se que a reperfusão causa mais lesão tissular do que a isquemia, isoladamente (ZIMMERMAN, 1992; MUSTAFA, 1995; GREKAS, 1996). Durante a reperfusão ocorre a formação excessiva de radicais livres de oxigênio (oxigênio com um elétron não pareado na camada externa) denominados produtos reativos de oxigênio, extremamente instáveis e reativos, capazes de intensa ação tóxica. Em condições de

homeostase, são resultantes do metabolismo normal, produzidos em pequena quantidade e prontamente inativados antes de causar danos significativos.

Os principais radicais livres são o anion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os íons oxidrila (OH^{\cdot}). Normalmente, são produtos da ação de enzimas (xantinoxidases) sobre o citossol, a membrana celular, as mitocôndrias e os lisossomos (GRISHAM, 1986).



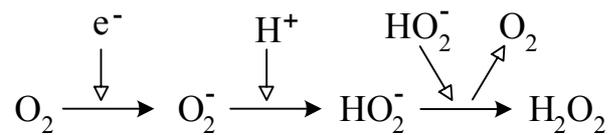
Durante a reperfusão os radicais livres são formados em larga escala e se originam principalmente nos polimorfonucleares que invadem a área isquêmica (PARKS, 1982; ZIMMERMAN, 1990; KUBES, 1992; NILSSON, 1994; VOLLMAR, 1995) causando possível disfunção plaquetar (KUBES, 1991). A geração de radicais tóxicos de oxigênio envolve a redução de oxigênio molecular a anion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) seguindo-se dismutação para H_2O_2 . Esses radicais de oxigênio são citotóxicos tanto diretamente quanto através da peroxidação dos lipídios (COTRAN, 1996; CICALESE, 1996).

O oxigênio molecular é deficiente de elétrons e, por isso, tende a atrair para si elétrons de outras substâncias. A reação do oxigênio com 1 elétron resulta na formação de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (ROSKOSKI, 1997).

O superóxido forma-se espontaneamente como resultado da reação do oxigênio com o íon ferroso (Fe^{++}), outros metais, metabólitos, drogas e toxinas ambientais. Resulta da oxidação da flavina contida em algumas enzimas (RODWELL, 1998).

Células submetidas a isquemia e a reperfusão são sítios de eleição para a produção de superóxido (ROSKOSKI, 1997).

A agregação de um próton à molécula de superóxido induz à formação do radical hidroperoxila (HO_2^{\cdot}) que, ao reagir com outra hidroperoxila, origina o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (STREYER, 1996).



O superóxido é reativo podendo modificar proteínas, ácidos nucleicos e lipídios da membrana celular, residindo nesse fato o seu efeito tóxico (ROSKOSKI, 1997).

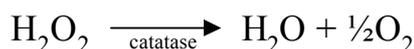
O organismo apresenta mecanismos defensivos contra a formação e ação do superóxido. Um deles é o sistema citocrômico que tem como uma de suas principais funções reter a molécula de oxigênio (O₂) até que ela se combine a 4 átomos de hidrogênio para assim formar água (ALBERTS, 1999).



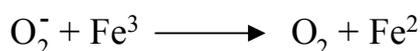
Outra defesa orgânica contra o superóxido está na ação de enzimas que promovem a reação dele com outras substâncias, resultando produtos inócuos. Uma dessas enzimas é a superóxidodismutase (SOD), descoberta em 1967 por J. McCord e I. Fridovitch (HALPERN, 1997) e encontrada nas variedades citossólica (contendo íons de cobre e zinco) e mitocondrial (encerrando, como as bactérias, íon manganês). Essa particularidade reforça a idéia da mitocôndria como bactéria aeróbica incorporada, numa relação simbiótica, a uma célula anaeróbica (DESHMUKH, 1997; MAYES, 1998).

Entende-se por dismutação a reação na qual duas moléculas idênticas são transformadas em substâncias diferentes. No caso, uma molécula de superóxido é oxidada e outra é reduzida pela ação catalítica da SOD. Ocorrerá a transformação de duas moléculas de superóxido e dois prótons em oxigênio molecular (oxidação) e peróxido de hidrogênio (redução) que, por sua vez, será transformado em oxigênio e água pela ação da catalase. A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra os radicais livres de oxigênio (VOET, 2000).

A catalase é uma hemoproteína que, como a hemoglobina, contém 4 grupos heme. É encontrada no sangue, medula óssea, rins e fígado (MAYES, 1998) e catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio.



O radical hidroxila (OH^\bullet) é formado pela interação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com átomos de ferro, nas duas etapas da reação de Fenton:

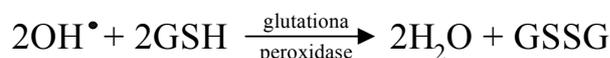


por meio da reação de Harber-Weiss:



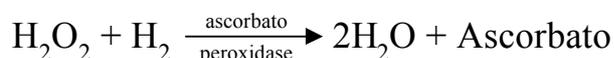
ou pela ação de radiações ionizantes (Rx, Raios CósMICOS) e de ondas eletromagnéticas (ROSKOSKI, 1997).

Peróxido de hidrogênio e hidroxila são desativados pela glutathione (GSH) (composto de enxofre, glicina, cisteína e glutamato) em reação mediada pela enzima citossólica glutathione-peroxidase que pode ter o selênio como grupo prostético.



Alguns tipos de glutathione-peroxidase necessitam do selênio para o exercício de sua atividade, fato que justificaria a ação antioxidante desse elemento (VOET, 2000).

O H_2O_2 também é inativado pela peroxidase numa reação que utiliza a vit.C (ascorbato) e o citocromo c como aceptadores de elétrons (HARPER, 1998).



com grupos polares sem carga, (MARTINS E SILVA, 1979; BAYNES, 2000; LEHNINGER, 2000).

Coube a Thierfelder e Sherwin, em 1914, elucidar as funções orgânicas da glutamina e a Krebs demonstrar a capacidade dos tecidos animais de sintetiza-la e degrada-la através de hidrólise (THIERFELDER e SHERWIN, 1914; KREBS, 1935).

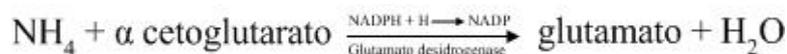
São chamados “essenciais” aqueles aminoácidos que não podem ser sintetizados pelo organismo ou que são sintetizados em quantidades inadequadas (velocidade de síntese inferior à demanda) devendo ser supridos obrigatoriamente a partir de fontes exógenas. Aminoácidos não essenciais são aqueles sintetizados endogenamente pelo organismo nas quantidades apropriadas, portanto dispensáveis na dieta diária.

A glutamina pertence ao grupo dos aminoácidos não essenciais uma vez que o organismo pode sintetiza-la “*de novo*”.

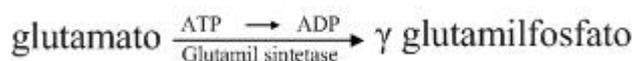
A biossíntese da glutamina ocorre principalmente no fígado (hepatócitos periportais) (CHAMPE, 1996; ALFACE, 1997) nos músculos esqueléticos, nos pulmões e no tecido adiposo (CURTHOYS, 1995) a partir do ácido α -cetoglutárico. A energia necessária a estas reações provém do NAD e do ATP (RODWELL, 1998).

A síntese da glutamina está vinculada à remoção da amônia que é tóxica em altas concentrações e deve ser incorporada a compostos biologicamente inócuos dos grupos amina ou amida (VOET, 2000).

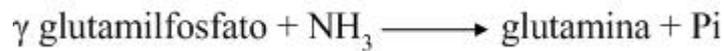
Assim, o amônio reage com o ácido α cetoglutárico originando glutamato numa reação mediada pela enzima glutamato desidrogenase, utilizando energia fornecida pelo NADPH+H.



O glutamato assim formado reagirá com o ATP, recebendo um grupo fosfato e formando o intermediário γ glutamilfosfato. Esta reação é catalisada pela glutamil sintetase.

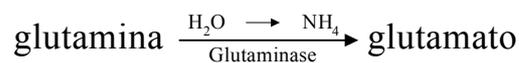


A amônia, presente no organismo, deslocará o grupo fosfato incorporando-se à molécula, originando a glutamina e liberando fosfato inorgânico (Pi). Não há catálise enzimática, nesta reação.

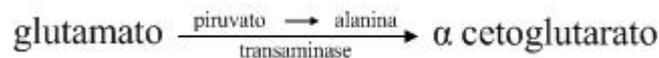


As enzimas da rota anabólica da glutamina estão presentes na mitocôndria (KOVACEVIC, 1983).

A rota catabólica percorre caminho inverso porém sob a ação catalítica de outras enzimas. A primeira fase do catabolismo consta da transformação da glutamina em glutamato catalisada pela glutaminase que é a única enzima da rota catabólica da glutamina sabidamente localizada na mitocôndria (KOVACEVIC, 1983).



O glutamato reverte em ácido α cetoglutárico numa reação catalisada pela transaminase e mediada pelo ácido pirúvico e a alanina



(VOET, 2000).

A glutaminase, enzima que cataboliza a glutamina, e a glutamato desidrogenase, enzima que participa de sua síntese, são localizadas na mitocôndria (KOVACEVIC, 1983). A glutaminase apresenta-se sob a forma de, pelo menos dois isoenzimas: as glutaminases hepática e renal. O rim é rico em glutaminase do tipo “renal” que aumenta quando o órgão é submetido a acidose (CURTHOYS, 1995).

Em sua forma livre a L-glutamina apresenta-se pouco solúvel em solução aquosa e é instável em temperaturas elevadas e em meios de pH baixo. Observada do ponto de vista metabólico pode, por conversão espontânea, dar origem a produtos tóxicos como o piroglutamato e a amônia. Entretanto o seu precursor L-alanil glutamina demonstra grande solubilidade e resistência a altas temperaturas, fatos que favorecem a estocagem prolongada e a esterilização pelo calor.

Quando introduzida no meio circulante a L-alanil glutamina é rapidamente hidrolizada liberando moléculas de alanina e glutamina (SOUBA, 1993).

O receio de administrar glutamina se dissipou quando WELBOURNE (1979) comprovou que sua oferta era acompanhada de elevações modestas da amonia sanguínea e desprovida de efeito adverso significante.

2 OBJETIVO

É objetivo deste estudo verificar a possível eficácia da L-alanil-glutamina em tornar os rins resistentes aos efeitos nocivos da isquemia/reperfusão mediante o estudo das concentrações sanguíneas e tissulares, *in vivo*, dos metabólitos glicose, piruvato, lactato e corpos cetônicos em ratos submetidos a isquemia do rim direito seguida de reperfusão.

3 MATERIAL

3.1 Amostra

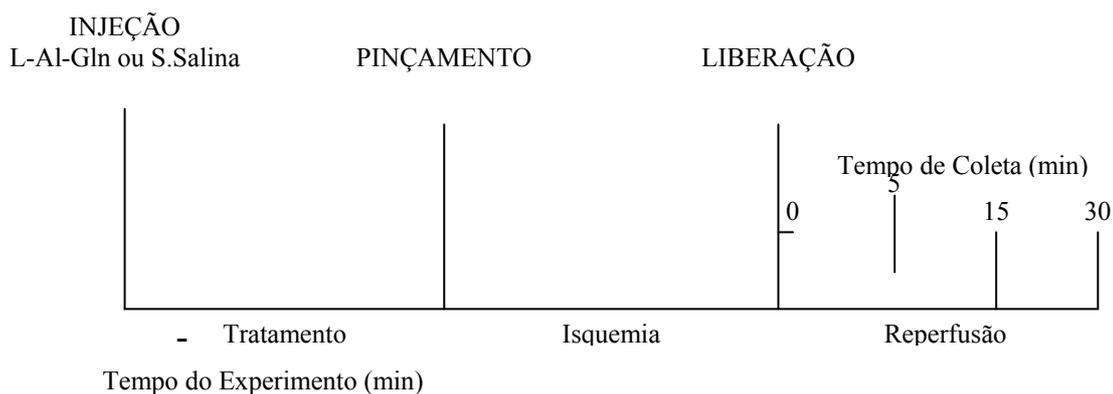
Foram empregados 48 ratos albinos (*Mammalia rodentia muridæ*) da linhagem Wistar, machos, com peso entre 300 e 350 gramas, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará e mantidos no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina (UFC) onde permaneceram confinados em gaiolas-padrão de polipropileno (40cm × 30cm × 15cm) forradas com maravalha e fechadas por grade de aço inoxidável, alojados em dependências com ventilação e iluminação controladas e obedecendo ao ritmo circadiano, recebendo água e ração apropriada, *ad libitum*, até 12 horas antes do início do experimento.

4 MÉTODO

“Nullius in verba”

4.1 Delineamento do experimento

O experimento delineou-se segundo o diagrama apresentado na figura abaixo.



Os animais foram distribuídos em 2 grupos: os que receberam injeção intravenosa de L-alanil-glutamina a 20% (Dipeptiven-Laboratório Fresenius Kabi) na dose de 0,75g / kg de peso corporal (grupo experimento) e aqueles outros que foram injetados com igual volume de solução de cloreto de sódio a 0,9% (grupo controle). O local escolhido para as injeções foi a veia cava inferior, no ponto de confluência das veias ilíacas.

Transcorridos precisamente 30 minutos da injeção da substância em estudo provocou-se a isquemia do Rim Direito (RD) mediante a aplicação de pinça vascular oclusiva (tipo bulldogue) sobre a totalidade do pedículo renal (tempo 0 min do experimento). A eficácia da oclusão foi certificada por inspeção visual e por verificação instrumental. Na primeira, constatava-se a ocorrência de escurecimento rápido e progressivo do rim direito com relação ao rim esquerdo, o qual mantinha a cor normal. Na segunda, atestava-se a cessação de fluxo arterial com o emprego de fluxômetro ultra-sônico Doppler. Destarte, submetia-se o rim direito aos efeitos da condição isquêmica que perdurava por 30 minutos, findos os quais a pinça oclusora era retirada e a perfusão restabelecida, expondo-se o rim à ação lesiva da reperusão (tempo 30 min do experimento). A comprovação da reperusão fazia-se, novamente, por critérios visual (retomada gradual da coloração normal do rim) e instrumental (constatação do fluxo arterial pelo fluxômetro ultra-sônico). O Rim Esquerdo (RE) não era submetido à isquemia.

Cada um dos dois grupos principais (experimento e controle) foram, então, redistribuídos em quatro subgrupos, de acordo com o tempo de espera para as coletas de material (rins e sangue arterial) destinado às dosagens laboratoriais pertinentes. As coletas foram iniciadas obedecendo ao seguinte cronograma: coleta em tempo zero, (ao término dos 30 minutos de isquemia normotérmica), em 5 minutos, em 15 minutos e em 30 minutos da reperfusão (tempo 60 min do experimento).

Os rins foram extirpados por secção dos pedículos, e o sangue arterial (2 ml) colhido por punção da aorta abdominal, no ponto de sua bifurcação.

4.2 Técnica anestésica

A técnica escolhida foi a da anestesia por inalação de vapores de éter dietílico sem intubação traqueal e sem o emprego de suporte ventilatório. A indução anestésica foi levada a efeito colocando o animal sob campânula contendo chumaço de algodão embebido em éter dietílico. Atingido o nível adequado de narcose o animal é retirado, colocado em decúbito dorsal e mantido em posição apropriada mediante a imobilização das patas.



Foto 1 – Animal imobilizado e sob efeito anestésico

A Anestesia foi mantida pela introdução intermitente das narinas do animal em tubo de plástico, de tamanho compatível, contendo chumaço embebido em éter dietílico.

O nível anestésico foi avaliado por parâmetros clínicos tais como a frequência respiratória, a profundidade e o vigor dos movimentos respiratórios, a alteração da frequência

cardíaca (observada pelo estetoscópio ultra-sônico Doppler), e a ocorrência de abalos musculares.

A anestesia foi sustentada uniformemente até o final do procedimento, que culmina com o sacrifício do animal.

4.3 Técnica operatória

Estando o animal sob narcose e posicionado sobre a mesa operatória procedeu-se à tricotomia da região abdominal e à limpeza da pele com éter dietílico. A seguir obtinha-se acesso à cavidade abdominal através de incisão mediana xifo-pubiana que foi mantida aberta pela aplicação de afastadores de Faraboeuf, delicados. As alças intestinais eram afastadas com compressas de gaze, obtendo-se o acesso à região retro-peritoneal com a exposição dos rins, da aorta abdominal e da veia cava inferior. Foi efetuada a dissecação de ambos os rins que restavam conectados unicamente aos pedículos vasculares e aos ureteres. O fluxo das artérias renais foi comprovado utilizando o fluxômetro ultra-sônico Doppler.

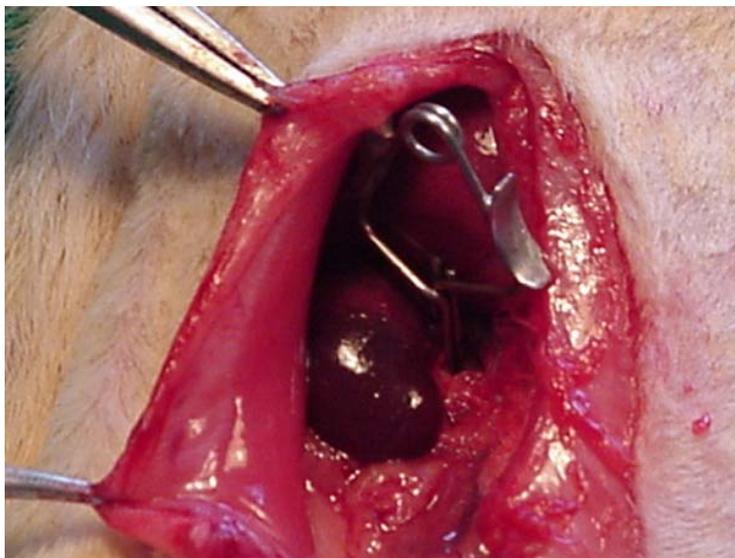


Foto 2 – Acesso à cavidade abdominal através de incisão mediana a partir do processo xifóide.

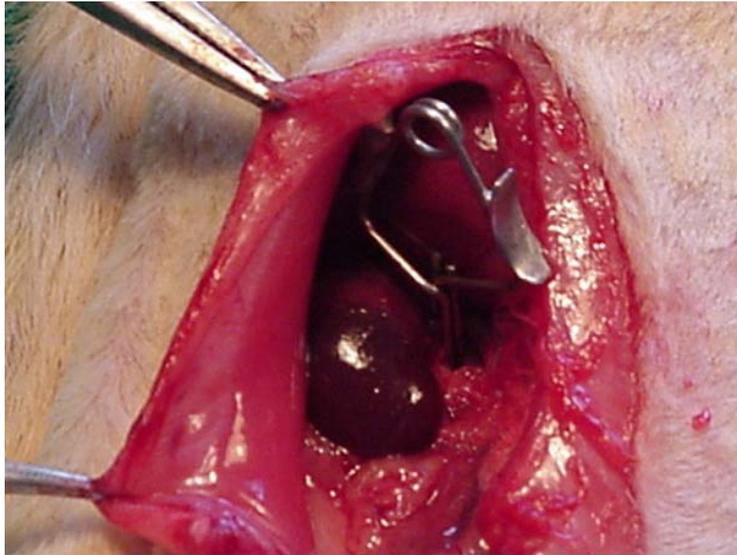


Foto 3 – Rim violáceo após pinçamento do pedículo vascular

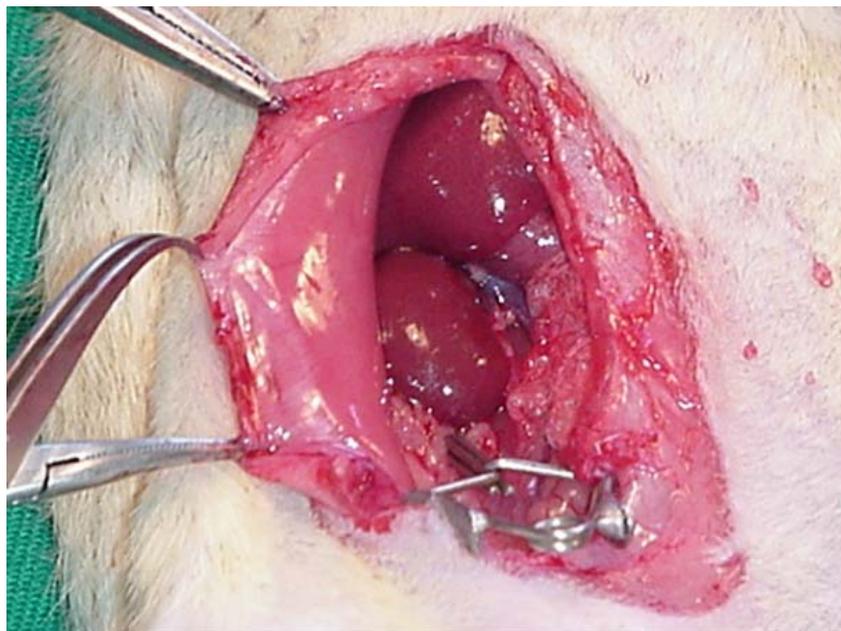


Foto 4 – Retorno à cor normal do rim após liberação do pedículo vascular



Foto 5 – Verificação da patencia da arteria renal pelo doppler

4.4 Sacrifício do animal (eutanásia)

A coleta do sangue arterial por punção aórtica, em geral provocava a morte do animal. Se tal não ocorresse, encerrada a etapa anterior e ainda sob anestesia, o animal era sacrificado por punção aórtica exsanguinante.

4.5 Técnica laboratorial

Uma vez extraídos, os rins eram imediatamente prensados e imersos em nitrogênio líquido, numa temperatura de -190°C , o que ocasiona a queda da temperatura tissular a -80°C , num tempo inferior a 0,1 segundo (NEWSHOLME e LEECH, 1983). A seguir, o material resultante era triturado em gral e pistilo de porcelana até se transformar em pó fino. Durante esse procedimento a baixa temperatura era mantida pelo acréscimo de nitrogênio líquido (WILLIAMSON, 1967). Os parênquimas renais pulverizados eram colocados em tubos de ensaio de 10 ml, individuais e devidamente identificados, contendo 5 ml de ácido perclórico 0,75 M e conservados em gelo.

A imersão do material pulverizado em solução ácida acarreta a rápida desnaturação das proteínas provocando a sua precipitação. Após centrifugação por 10 minutos a 2000 rpm, é possível recolher o líquido sobrenadante (extrato ácido) e desprezar o precipitado protéico.

O extrato ácido é colocado em tubos de ensaio de 10 ml, previamente pesados. Os tubos são repesados e, por subtração, obtemos um peso conhecido de extrato ácido.

A próxima etapa compreende a neutralização do extrato ácido. Um indicador universal de pH é acrescentado. Em seguida, é adicionada a solução de hidróxido de potássio a 20% até que o indicador acuse pH neutro. Os tubos são repesados e centrifugados, como do modo anterior. O líquido sobrenadante, agora extrato neutro, é recolhido e constitui o substrato onde os metabólitos são dosados por método espectrofotométrico.

Os metabólitos piruvato e acetoacetato, em razão de sua instabilidade, devem ser dosados logo após a neutralização. Os demais, se congelados a -20°C , podem ser dosados dentro de 15 dias.

No presente experimento foram dosados os seguintes metabólitos: piruvato, lactato, glicose, acetoacetato e 3-hidroxiacetato.

Os corpos cetônicos foram aferidos através da soma das concentrações de acetoacetato e 3-hidroxiacetato.

4.5.1 Princípios básicos de análise enzimática

O ensaio enzimático destinado a determinar substratos metabólicos fundamenta-se no princípio de uma reação enzimática específica onde a participação do substrato se completa com a redução de $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ ou oxidação de NADH/NADPH . Os nucleotídeos $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ absorvem luz a 260 nm e no estado reduzido (NADH/NADPH) tem uma absorção suplementar de, no máximo, 340 nm. Deste modo, é possível através de medida de densidade óptica a 340nm, acompanhar a conversão enzimática do substrato diretamente em um cubeta no espectrofotômetro. A densidade óptica aumenta ou diminui em 6,22 unidades com a produção ou consumo de um micromol de NADH/NADPH , indiferentemente se NAD^+ aceita H^+ ou se NADH doa H^+ .

Em uma reação enzimática específica, um micromol de substrato reage com um micromol de $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ (ou NADH/NADPH), e a alteração na densidade óptica traduzirá, rigorosamente, a quantidade de substrato consumida nessa reação. Em condições ótimas de ensaio, a conversão de substrato é praticamente completa e a diferença da densidade óptica

pode ser utilizada para o cálculo da concentração do referido substrato, multiplicando-se o resultado por um fator de diluição apropriado.

A especificidade de um ensaio enzimático depende da pureza da enzima; entretanto a precisão depende das condições ideais para a realização do ensaio. A sensibilidade do ensaio enzimático, esta é limitada pelo fato de que a conversão de $\text{NAD}^+/\text{NADPH}$ ou vice e versa deve ocorrer para que se produza a alteração mensurável da densidade óptica.

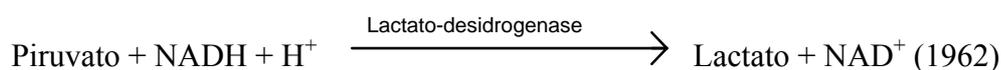
4.5.2 Determinação dos metabólitos

Os metabólitos no sangue da aorta e no tecido renal direito e esquerdo (RD e RE) foram determinados por meio de ensaio enzimático. Foram incluídos neste experimento os precursores da gliconeogênese (piruvato e lactato), os corpos cetônicos (acetoacetato e 3-hidroxiacetato) e a D-glicose.

- **Determinação do Piruvato e do Acetoacetato**

O piruvato e o acetoacetato apresentam condições de ensaio semelhantes, podendo ser medidos seqüencialmente na mesma amostra e na mesma cubeta, de acordo com a combinação de métodos descritos por HOHORST *et al.* (1959) e WILLIAMSON *et al.* (1962).

Seqüencia da reação:



O equilíbrio da primeira reação em pH 7,0 desvia-se para a direita, o que assegura a medida quantitativa dos níveis de piruvato, desde que a concentração de NADH não seja inferior a 0,01nM. Com o mesmo pH e com excesso de NADH compatível, pelo menos 98% do acetoacetato é reduzido para 3-hidroxiacetato-desidrogenase. Em conseqüência da baixa atividade da preparação de 3-hidroxiacetato-desidrogenase, a segunda reação ocorre com uma velocidade inferior a primeira.

Solução tampão para o ensaio:

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

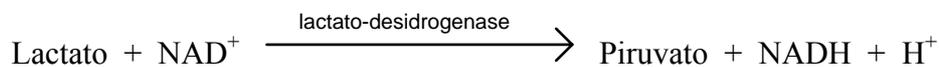
01ml de NAD⁺ 0,5%

Para cada ensaio foi preparado uma solução fresca. O volume total em cada cubeta constou 2ml (1ml de ácido perclórico e 1ml de solução tampão). A cubeta para controle continha igualmente 2ml (1ml de água destilada e 1ml de solução tampão do ensaio). A leitura de cada cubeta no espectrofotômetro ocorreu antes e 10(dez) minutos após a adição de 0,01ml de lactato-desidrogenase a 340nm. Em seguida foi adicionado 0,01ml de 3-hidroxi-butirato-desidrogenase em cada cubeta, que foram lidas, mais uma vez, após 35 e 45 minutos.

- **Determinação do L-(+)-lactato**

As concentrações de lactato foram determinadas no rim e sangue conforme o método de HOHORST (1963).

Seqüência da reação:



O equilíbrio da reação ocorre no lado do lactato e NAD⁺. Todavia, para assegurar a completa conversão do lactato, é necessário remover os produtos da reação. O piruvato reage com hidrato de hidrazina na solução tampão, formando piruvato de hidrazina e, além disso, oferta-se um excesso de NAD⁺ e de enzima para se garantir um rápido final à reação. A lactato-desidrogenase reage somente com o L-(+)-lactato, o que confere especificidade ao ensaio.

Solução tampão para o ensaio:

40 ml de Tris 0,2 M

05 ml de hidrato de hidrazina 100%

25 mg de EDTA

água destilada até completar 100 ml

O pH da solução foi ajustado com ácido hidrolórico 5M para 9,5. Esta solução pode ser estocada a 4 graus centígrados por até 15 dias. No início do ensaio, 1ml de NAD⁺ 1% foi adicionado a cada 10ml de solução tampão. Em cada cubeta o volume total foi de 2 ml (0,2 ml da amostra neutralizada + 0,8 ml de água destilada + 1ml de solução tampão contendo NAD⁺ 1%). Todas as cubetas foram lidas a 340nm e 35 e 45 minutos após a adição de 0,02 ml de lactato-desidrogenase.

- **Determinação da D-(-)-3-hidroxi butirato**

As concentrações deste metabólito no sangue e no tecido renal foram determinados de acordo com o método proposto por WILLIAMSON *et al.* (1962).

Seqüência da reação:



Obtém-se o equilíbrio da reação com pH 8,0 quando aproximadamente 40% do 3-hidroxi butirato é oxidado para acetoacetato. No entanto, a presença de hidrazina na solução tampão aprisiona o acetoacetato formado como uma hidrazina segundo a reação quantitativamente da esquerda para a direita.

Solução tampão para o ensaio:

70 ml de solução Tris 0,1M, pH 8,5

0,25 ml de hidrato de hidrazina a 100%

25mg de EDTA

água destilada até completar 100 ml

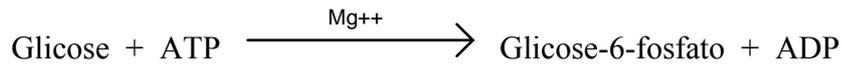
O pH da solução tampão do referido ensaio foi ajustado para 8,5 com ácido hidrolórico 5M. esta solução pode ser armazenada a 4 graus centígrados por até 15 dias. Antes do início do ensaio, adicionou-se 1ml de NAD⁺ 1% a 10ml da solução tampão. Cada cubeta ficou com 2ml do volume total (0,5 ml da amostra neutralizada + 0,5 ml de água destilada + 1ml de solução tampão com NAD⁺). As cubetas foram lidas a 340nm e 50 e 60 minutos após a adição de 0,01 ml da enzima 3-hidroxi butirato-desidrogenase.

- **Determinação da D-glicose**

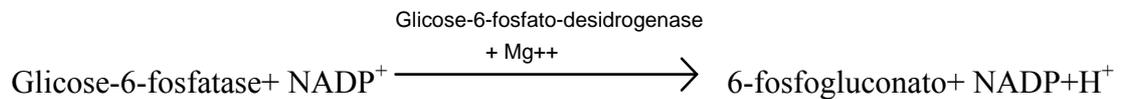
A glicose foi determinada seguindo o método descrito por SLEIN(1963).

Seqüência da reação:

a) Reação auxiliar



b) Reação indicadora



Com o pH 7,5 o equilíbrio para a reação indicadora desvia-se para a direita, o que assegura o término completo de ambas as reações, uma vez que a glicose-6-fosfatase formada na reação anterior é rapidamente utilizada na reação seguinte. Mesmo que a hexoquinase catalise a fosforilação de outros monossacarídeos, a especificidade do ensaio consiste no fato da glicose-6-fosfato-desidrogenase (G₆PD) só reagir com a glicose-6-fosfato, não o fazendo com outras hexoses e pentoses.

Solução tampão para o ensaio:

20 ml de tampão Tris 0,1M, pH 8,0

02 ml de cloreto de magnésio 0,1M

02 ml de ATP 0,01M

02 ml de NAD⁺ 1%

0,13 ml de G₆PD (1mg/ml)

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

4.6 Cálculo dos metabólitos

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

Em síntese:

A diferença de densidade óptica (DDO) é igual às alterações de absorbância da amostra na cubeta menos as alterações na absorbância na cubeta controle.

Uma vez que o coeficiente molar de extinção de NADH é $6,22\text{cm}^2/\text{micromol}$, a quantidade de substrato na cubeta é igual a: $(\text{DDO}/6,22) \times \text{volume total da cubeta}$. Este resultado deve ser multiplicado por um fator de diluição para cada amostra, resultando na concentração do substrato.

$\text{Micromol do metabólito/ml de sangue ou g de rim} + \text{HClO}_4/\text{peso de sangue ou rim} \times \text{pe (peso extrato neutro/peso extrato ácido)} \times (\text{volume total da cubeta/volume extrato neutro na cubeta}) \times (\text{DDO}/6,22)$.

4.7 Tratamento estatístico

Os resultados foram expressos como média \pm EPM com número de observações (n). O teste MANN-WHITNEY foi aplicado utilizando-se o programa Minitab versão 2000.

5 RESULTADOS

5.1 Piruvato

5.1.1 Concentração de piruvato no sangue (Tabela 01 e Figura 01)

A análise estatística das concentrações de piruvato no sangue de animais tratados com solução salina em relação aos animais tratados com L-Al-Gln não revelou alterações significantes entre os grupos estudados.

Tabela 01

Concentração de Piruvato no sangue ($\mu\text{mol} / \text{ml}$) em 6 animais

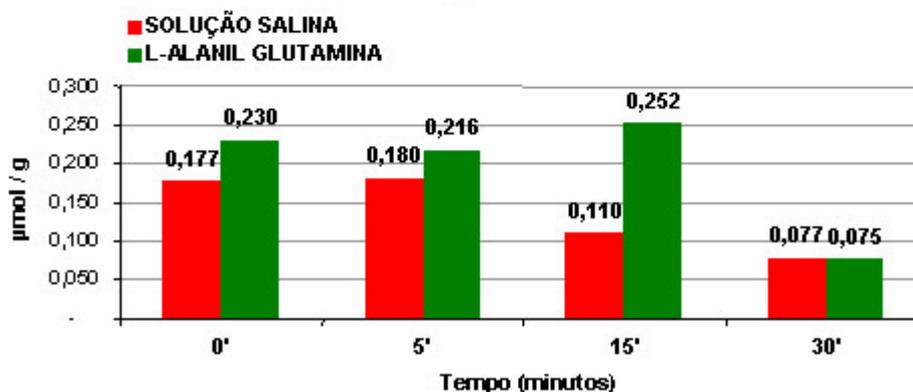
TRATAMENTO	TEMPO (MINUTOS)			
	0'	5'	15'	30'
SOLUÇÃO SALINA	0,177 \pm 0,024	0,180 \pm 0,037	0,110 \pm 0,024	0,077 \pm 0,031
L-ALANIL GLUTAMINA	0,230 \pm 0,028	0,216 \pm 0,024	0,252 \pm 0,110	0,075 \pm 0,025

Resultados expressos em média \pm E.P.M. Em 6 animais.

Teste de Mann-Whitney:

- ★ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo respectivo; estudado;
- ▲ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 0 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 5 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 15 min.

Figura 01



No entanto, nos animais tratados com L-Al-Gln, a concentração do piruvato mostrou alterações significantes nos tempos 0 min (0,230 $\mu\text{mol}/\text{ml}$) e 5 min (0,216 $\mu\text{mol}/\text{ml}$) com

relação ao tempo 30 min (0,075 $\mu\text{mol/ml}$), demonstrando queda do piruvato sangüíneo ao longo da reperfusão.

5.1.2 Concentração de piruvato em rins não isquêmicos tratados com solução salina e L-Al-Gln (Tabela 02 e Figura 02)

A concentração de piruvato em rins não isquêmicos tratados com solução salina e L-Al-Gln não revelou dados estatisticamente significantes.

Tabela 02

**Concentração de Piruvato em rim não isquêmico
($\mu\text{mol} / \text{g}$ tecido fresco) em 6 animais**

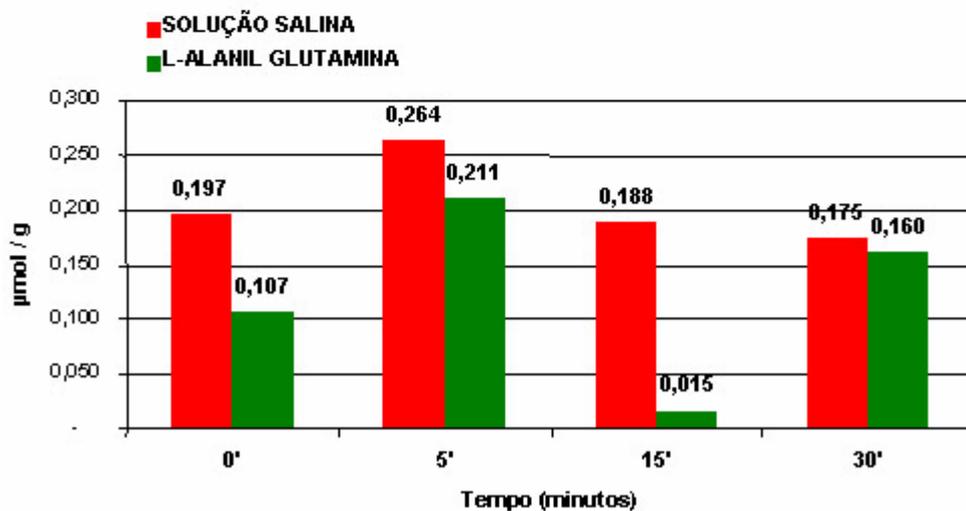
TRATAMENTO	TEMPO (MINUTOS)			
	0'	5'	15'	30'
SOLUÇÃO SALINA	0,197 \pm 0,062	0,264 \pm 0,037	0,188 \pm 0,048	0,175 \pm 0,058
L-ALANIL GLUTAMINA	0,107 \pm 0,038	0,211 \pm 0,045	0,015 \pm 0,023	0,160 \pm 0,028

Resultados expressos em média \pm E.P.M. Em 6 animais.

Teste de Mann-Whitney:

- ★ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo respectivo; estudado;
- ▲ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 0 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 5 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 15 min.

Figura 02



5.1.3 Concentração de piruvato em rins isquêmicos tratados com solução salina e L-Al-Gln (Tabela 03 e Figura 03)

A concentração de piruvato em rins isquêmicos tratados com solução salina e L-Al-Gln não mostrou dados significantes entre os 2 grupos.

Nos rins tratados com solução salina houve alteração significativa entre os tempos 0 min (0,081 $\mu\text{mol/g}$) e 5 min (0,312 $\mu\text{mol/g}$), demonstrativo de elevação significativa da concentração de piruvato.

Tabela 03
Concentração de Piruvato em rim isquêmico
($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco) em 6 animais

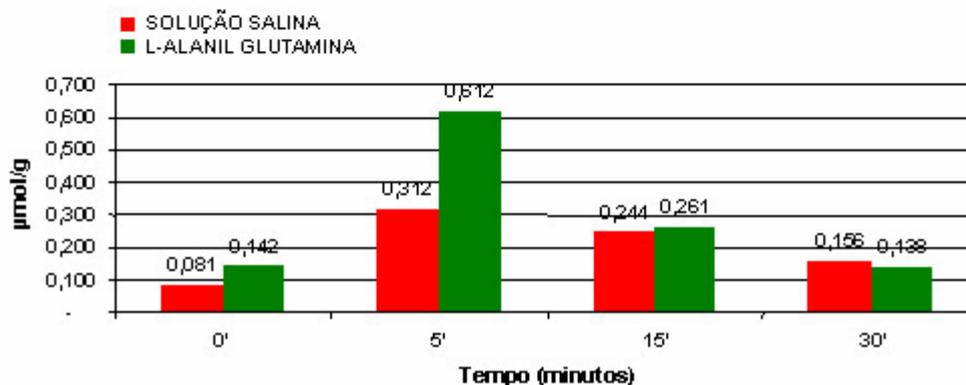
TRATAMENTO	TEMPO (MINUTOS)			
	0'	5'	15'	30'
SOLUÇÃO SALINA	0,081 \pm 0,035	0,312 \pm 0,043 \blacktriangle	0,244 \pm 0,062	0,156 \pm 0,015
L-ALANIL GLUTAMINA	0,142 \pm 0,035	0,612 \pm 0,040	0,261 \pm 0,042 \blacktriangle	0,138 \pm 0,042

Resultados expressos em média \pm E.P.M. Em 6 animais.

Teste de Mann-Whitney:

- \star $p < 0,05$ quando comparado ao tempo respectivo; estudado;
- \blacktriangle $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 0 min;
- \blacksquare $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 5 min;
- \bullet $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 15 min.

Figura 03



No entanto, nos rins tratados com L-Al-Gln houve modificação significativa entre os tempos 0 min (0,142 $\mu\text{mol/g}$) e 15 min (0,261 $\mu\text{mol/g}$), reveladora de aumento da concentração de piruvato ao longo do tempo de reperfusão.

5.1.4 Concentrações de piruvato em rins não isquêmicos *versus* rins isquêmicos tratados com solução salina (Tabela 04 e Figura 04)

A análise das concentrações de piruvato em rins não isquêmicos *versus* rins isquêmicos tratados com solução salina não demonstrou resultados significantes entre os grupos.

Tabela 04
Concentração de Piruvato ($\mu\text{mol} / \text{g}$ tecido fresco) em 6 animais
Comparação entre rim não isquêmico *versus* rim isquêmico
com Solução Salina

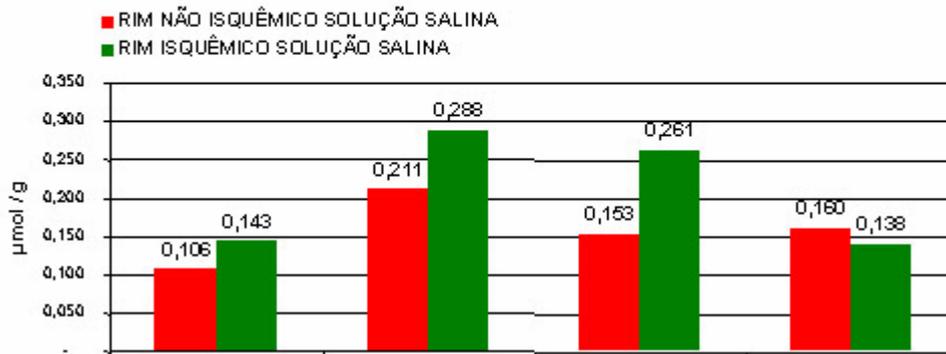
TRATAMENTO	TEMPO (MINUTOS)			
	0'	5'	15'	30'
RIM NÃO ISQUÊMICO SOLUÇÃO SALINA	0,106 \pm 0,038	0,211 \pm 0,045	0,153 \pm 0,023	0,160 \pm 0,028
RIM ISQUÊMICO SOLUÇÃO SALINA	0,143 \pm 0,035	0,288 \pm 0,041	0,261 \pm 0,041 \blacktriangle	0,138 \pm 0,041

Resultados expressos em média \pm E.P.M. Em 6 animais.

Teste de Mann-Whitney:

- ★ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo respectivo; estudado;
- \blacktriangle $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 0 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 5 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 15 min.

Figura 04



Porém, foi observada alteração significativa no grupo dos rins isquêmicos tratados com L-Al-Gln, com relação aos tempos 5 min (0,312 $\mu\text{mol/g}$) e 30 min (0,156 $\mu\text{mol/g}$), com nítida queda das concentrações de piruvato, ao longo do tempo de reperfusão.

5.1.5 Concentração de piruvato em rins não isquêmicos *versus* rins isquêmicos, tratados com L-Al-Gln. (Tabela 05 e Figura 05)

Tabela 05

**Concentração de Piruvato ($\mu\text{mol} / \text{g}$ tecido fresco) em 6 animais
Comparação entre rim não isquêmico *versus* rim isquêmico
com L-Alanil Glutamina**

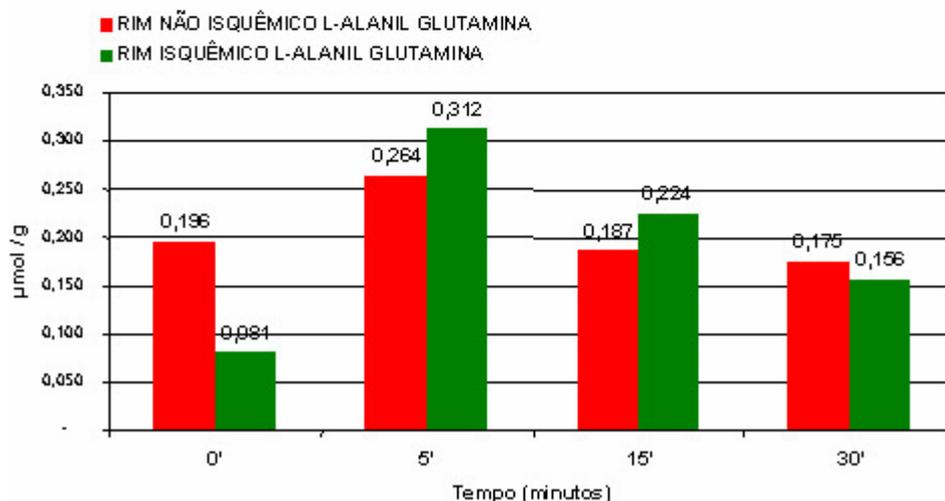
TRATAMENTO	TEMPO (MINUTOS)			
	0'	5'	15'	30'
RIM NÃO ISQUÊMICO L-ALANIL GLUTAMINA	0,196 + 0,062	0,264 + 0,037	0,187 + 0,048	0,175 + 0,058
RIM ISQUÊMICO L-ALANIL GLUTAMINA	0,081 + 0,035	0,312 + 0,043	0,224 + 0,062	0,156 + 0,015

Resultados expressos em média \pm E.P.M. Em 6 animais.

Teste de Mann-Whitney:

- ★ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo respectivo; estudado;
- ▲ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 0 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 5 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 15 min.

Figura 05



A análise estatística não mostrou alterações significantes entre os grupos estudados nem no grupo dos rins não isquêmicos. Porém, no grupo dos rins isquêmicos tratados com L-Al-Gln, houve modificações significantes entre os tempos 0 min (0,143 $\mu\text{mol/g}$) e 15 min (0,261 $\mu\text{mol/g}$), mostrando elevação na concentração de piruvato.

5.2 Lactato

5.2.1 Concentração de lactato no sangue de animais tratados com solução salina e L-Al-Gln (Tabela 06 e Figura 06)

A concentração de lactato no sangue de animais tratados com solução salina e L-Al-Gln demonstrou mudanças significantes entre os grupos nos tempos 0 min (1,522 $\mu\text{mol/ml}$, nos tratados com solução salina e 4,347 $\mu\text{mol/ml}$, nos animais tratados com L-Al-Gln), no tempo 15 min (2,060 $\mu\text{mol/ml}$ nos tratados com solução salina e 4,573 $\mu\text{mol/ml}$, nos animais tratados com L-Al-Gln) e no tempo de 30 min (2,442 $\mu\text{mol/ml}$, nos animais tratados com solução salina e 3,914 $\mu\text{mol/ml}$, nos animais tratados com L-Al-Gln), demonstrando aumento das concentrações de lactato, nos animais do grupo tratado com L-Al-Gln, em comparação aos animais tratados com solução salina.

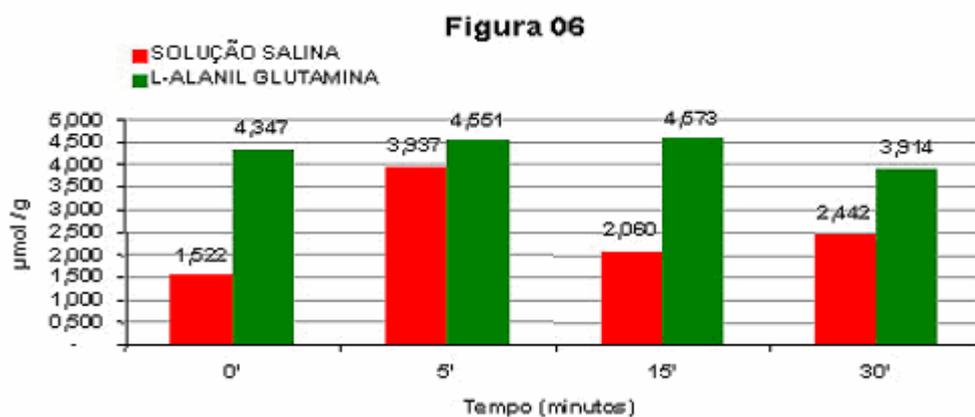
Tabela 06
Concentração de Lactato no sangue
($\mu\text{mol / ml}$) em 6 animais

TRATAMENTO	TEMPO (MINUTOS)			
	0'	5'	15'	30'
SOLUÇÃO SALINA	1,522 \pm 0,586	3,937 \pm 0,485 ▲	2,060 \pm 0,654	2,442 \pm 0,192 ▲ ■
L-ALANIL GLUTAMINA	4,347 \pm 0,230 ★	4,551 \pm 0,207	4,573 \pm 0,308 ★	3,914 \pm 0,508 ★

Resultados expressos em média \pm E.P.M. Em 6 animais.

Teste de Mann-Whitney:

- ★ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo respectivo; estudado;
- ▲ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 0 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 5 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 15 min.



Entre os animais tratados com Solução Salina houve alterações significantes entre os tempos 0 min (1,522 $\mu\text{mol/ml}$) e 5 min (3,937 $\mu\text{mol/ml}$), entre os tempos 0 min (1,522

$\mu\text{mol/ml}$) e 30 min (2,442 $\mu\text{mol/ml}$) e entre os tempos 5 min (3,937 $\mu\text{mol/ml}$) e 30 min (2,442 $\mu\text{mol/ml}$), revelando elevação inicial dos níveis de lactato, com queda moderada aos 30 min.

No grupo de animais tratados com L-Al-Gln não houve alterações significantes ao longo do tempo de reperfusão.

5.2.2 Concentração de lactato em rins não isquêmicos tratados com solução salina e com L-Al-Gln (Tabela 07 e Figura 07)

Houve modificações estatísticas significantes, entre os grupos, ao tempo 0 min de reperfusão (1,825 $\mu\text{mol/g}$ nos rins tratados com solução salina e 3,326 $\mu\text{mol/g}$ nos rins tratados com L-Al-Gln) e ao tempo de 30 min de reperfusão (1,096 $\mu\text{mol/g}$, nos rins tratados com solução salina e 2,239 $\mu\text{mol/g}$, nos rins tratados com L-Al-Gln), o que demonstra nítida elevação da concentração de lactato nos rins tratados com L-Al-Gln em relação aos rins tratados com Solução Salina.

Tabela 07
Concentração de Lactato em rim não isquêmico
($\mu\text{mol} / \text{g}$ tecido fresco) em 6 animais

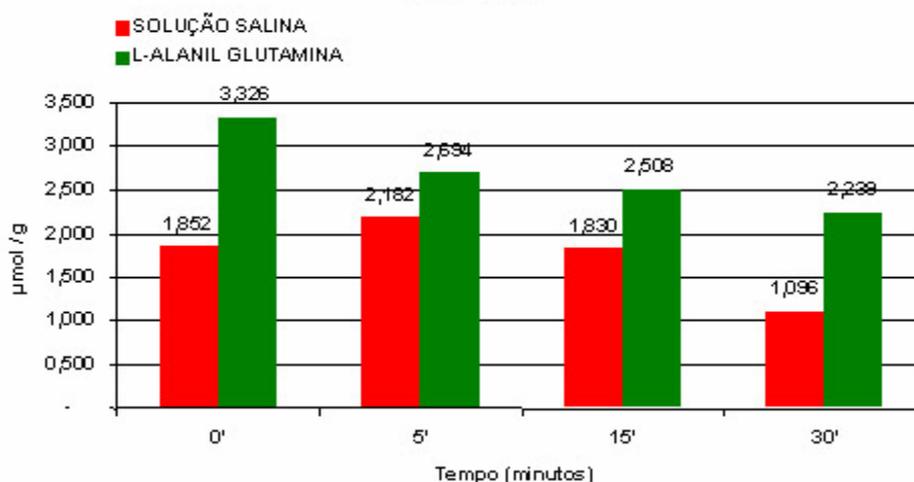
TRATAMENTO	TEMPO (MINUTOS)			
	0'	5'	15'	30'
SOLUÇÃO SALINA	1,852 + 0,135	2,182 + 0,339	1,830 + 0,329	1,096 + 0,170 ▲ ■
L-ALANIL GLUTAMINA	3,326 + 0,834 ★	2,694 + 0,145	2,508 + 0,249	2,239 + 0,349 ★

Resultados expressos em média \pm E.P.M. Em 6 animais.

Teste de Mann-Whitney:

- ★ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo respectivo; estudado;
- ▲ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 0 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 5 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 15 min.

Figura 07



Com relação aos rins tratados com solução salina, houve queda da concentração de lactato no tempo de 30 min (1,096 $\mu\text{mol} / \text{g}$) com relação aos tempos de 0 min (1,852 $\mu\text{mol} / \text{g}$) e de 5 min (2,182 $\mu\text{mol} / \text{g}$). Nos rins tratados com L-Al-Gln não foram detectadas alterações significantes, ao longo do tempo de reperfusão.

5.2.3 Concentrações de lactato em rins isquêmicos tratados com solução salina e com L-Al-Gln (Tabela 08 e Figura 08)

A análise das concentrações de lactato em rins isquêmicos tratados com solução salina e com L-Al-Gln revelou alterações estatisticamente significantes entre os 2 grupos no tempo de 15 min (1,325 $\mu\text{mol/g}$, nos rins tratados com solução salina e 3,321 $\mu\text{mol/g}$, nos tratados com L-Al-Gln) e no tempo de 30 min (1,401 $\mu\text{mol/g}$, nos rins tratados com solução salina e 3,294 $\mu\text{mol/g}$, nos rins tratados com L-Al-Gln) demonstrando, em ambos os casos, elevação das concentrações de lactato nos Rins tratados com L-Al-Gln.

No grupo dos rins tratados com solução salina houve queda significativa da concentração de lactato aos 15 min (1,325 $\mu\text{mol/g}$), quando comparado com o tempo 0 min (5,010 $\mu\text{mol/g}$) e 5 min (3,520 $\mu\text{mol/g}$).

No grupo tratado com L-Al-Gln, houve redução significativa da concentração no tempo de 15 min (3,321 $\mu\text{mol/g}$) com relação a 5 min (5,338 $\mu\text{mol/g}$), no tempo de 15 min (3,221 $\mu\text{mol/g}$) quando comparado ao tempo 0 min (6,118 $\mu\text{mol/g}$) e em 30 min (3,294 $\mu\text{mol/g}$) quando comparado ao tempo 0 min (6,118 $\mu\text{mol/g}$), percebendo-se nítida queda da concentração de lactato até os 15 min de reperfusão seguida de leve recuperação, aos 30 min.

Houve queda na concentração de lactato nos rins isquêmicos de ambos os grupos, durante o período de reperfusão. Isto parece devido à retomada da glicólise aeróbica, com o tempo, durante o período de reperfusão.

O tratamento com L-Alanil-glutamina induziu maiores concentrações de lactato aos 15 e aos 30 min, no período de reperfusão, em configuração com as concentrações de lactato em rins isquêmico não tratados.

Isto, provavelmente, deve-se à maior atividade da via glicolítica anaeróbica (medula renal), nos rins tratados com L-Alanil-glutamina, durante a reperfusão. A utilização da glutamina pela medula renal, rica em glutaminase, propiciou mais glutamato como substrato, no carreador malato-aspartato, favorecendo a maior atividade glicolítica encontrada.

Tabela 08
Concentração de Lactato em rim isquêmico
($\mu\text{mol} / \text{g}$ tecido fresco) em 6 animais

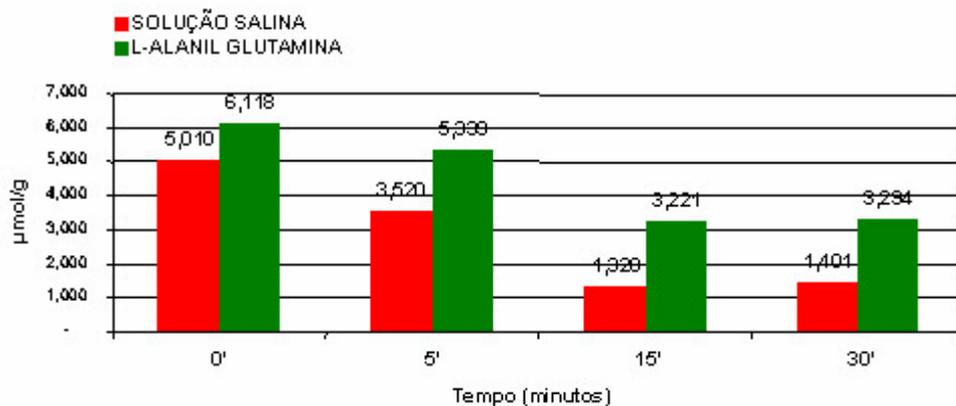
TRATAMENTO	TEMPO (MINUTOS)			
	0'	5'	15'	30'
SOLUÇÃO SALINA	5,010 \pm 0,099	3,520 \pm 0,041	1,320 \pm 0,045 ▲ ■	1,401 \pm 0,272
L-ALANIL GLUTAMINA	6,118 \pm 0,695	5,339 \pm 0,570	3,221 \pm 0,666 ■ ★	3,294 \pm 0,512 ▲ ● ★

Resultados expressos em média \pm E.P.M. Em 6 animais.

Teste de Mann-Whitney:

- ★ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo respectivo; estudado;
- ▲ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 0 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 5 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 15 min.

Figura 08



5.2.4 Concentrações de lactato em rins não isquêmicos *versus* isquêmicos tratados com solução salina (Tabela 09 e Figura 09)

A concentração de lactato comparativa entre rins não isquêmicos *versus* rins isquêmicos, quando tratados com solução salina, mostrou alteração estatisticamente significante entre os 2 grupos no tempo de 5 min (2,182 $\mu\text{mol/g}$ nos rins não isquêmicos e 3,519 $\mu\text{mol/g}$ nos rins isquêmicos).

No grupo de rim não isquêmico tratado com solução salina houve queda significante no tempo 30 min (1,096 $\mu\text{mol/g}$) com relação aos tempos 0 min (1,853 $\mu\text{mol/g}$) e 15 min (1,830 $\mu\text{mol/g}$).

Tabela 09

Concentração de Lactato ($\mu\text{mol} / \text{g}$ tecido fresco) em 6 animais
 Comparação entre rim não isquêmico versus rim isquêmico
 com Solução Salina

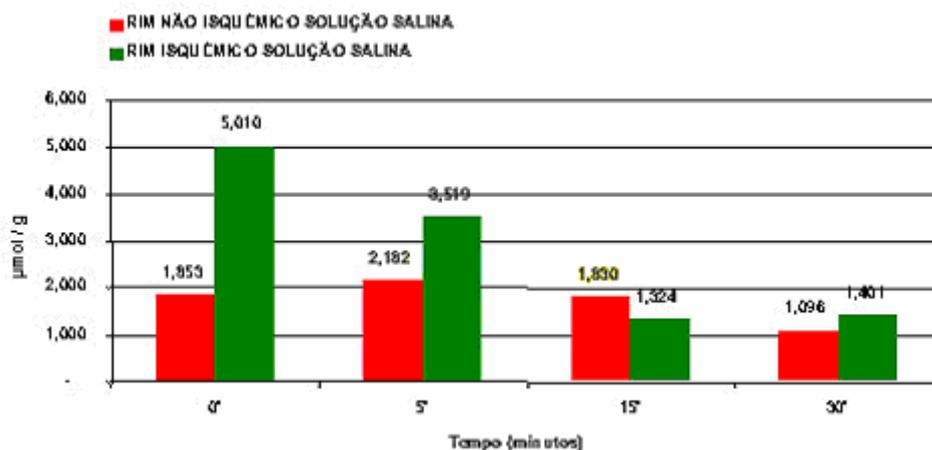
TRATAMENTO	TEMPO (MINUTOS)			
	0'	5'	15'	30'
RIM NÃO ISQUÊMICO SOLUÇÃO SALINA	1,853 \pm 0,136	2,182 \pm 0,338	1,830 \pm 0,328	1,096 \pm 0,169 ▲●
RIM ISQUÊMICO SOLUÇÃO SALINA	5,010 \pm 0,989	3,519 \pm 0,414 ★	1,324 \pm 0,452 ▲■	1,401 \pm 0,272 ●

Resultados expressos em média \pm E.P.M. Em 6 animais.

Teste de Mann-Whitney:

- ★ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo respectivo; estudado;
- ▲ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 0 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 5 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 15 min.

Figura 09



No grupo de rins isquêmicos tratado com L-Al-Gln houve queda significativa em 15 min (1,519 $\mu\text{mol/g}$) quando comparado aos tempos 0 min (5,010 $\mu\text{mol/g}$) e 5 min (3,519 $\mu\text{mol/g}$). No tempo 30 min (1,401 $\mu\text{mol/g}$) houve queda de concentração, estatisticamente significativa, com relação ao tempo 5 min (3,519 $\mu\text{mol/g}$).

No tecido renal não isquêmico houve decréscimo, no tempo de 30 min, na concentração de lactato, em relação ao tempo 0.

Em tecido renal isquêmico também houve diminuição na concentração de lactato no tempo 15 min de reperfusão, em relação a concentração aferida no tempo 0 min.

Em rins isquêmicos a isquemia induziu elevação nas concentrações de lactato, em tecido renal, no tempo 5 min de reperfusão em relação às concentrações de lactato no mesmo

tempo estudado. Isto pode refletir maior atividade glicolítica anaeróbica, no período de reperfusão imediata (5 min).

5.2.5 Concentração de lactato entre rins não isquêmicos *versus* rins isquêmicos tratados com L-Al-Gln (Tabela 10 e Figura 10)

Houve alterações significantes entre os 2 grupos, nos tempos 0 min (3,326 $\mu\text{mol/g}$ nos rins não isquêmicos e 6,117 $\mu\text{mol/g}$ nos rins isquêmicos) e 5 min (2,694 $\mu\text{mol/g}$ nos rins não isquêmicos e 5,338 $\mu\text{mol/g}$ nos rins isquêmicos), com notável elevação na concentração de lactato dos rins tratados com L-Al-Gln, nos tempos assinalados.

No grupo dos rins não isquêmicos não houve alterações significantes, ao longo do tempo de reperfusão.

No grupo dos rins isquêmicos foi notada queda da concentração em 15 min (3,222 $\mu\text{mol/g}$) com relação ao tempo 0 min (6,117 $\mu\text{mol/g}$) e em 30 min (3,294 $\mu\text{mol/g}$) com relação ao tempo 0 min (6,117 $\mu\text{mol/g}$).

A isquemia do rim, em animais tratados com L-Alanil-glutamina, induziu aumento na concentração de lactato (tempo 0 min) quando comparado a concentração de lactato no tecido renal não isquêmico, no mesmo tempo estudado. Isto pode representar maior atividade da glicólise anaeróbica resultante da isquemia (quebra do glicogênio renal).

Com relação a concentração de lactato, ocorreu comportamento semelhante, no período de reperfusão imediata (3 min). Teria havido maior glicólise, com produção de lactato, neste tempo estudado no tecido renal sujeito a isquemia/reperfusão, em relação ao tecido renal não isquêmico. Isto refletiria, também, maior atividade da glicólise anaeróbica (medula renal), neste tempo de reperfusão estudado.

Tabela 10

**Concentração de Lactato ($\mu\text{mol} / \text{g}$ tecido fresco) em 6 animais
Comparação entre rim não isquêmico versus rim isquêmico
com L-Alanil Glutamina**

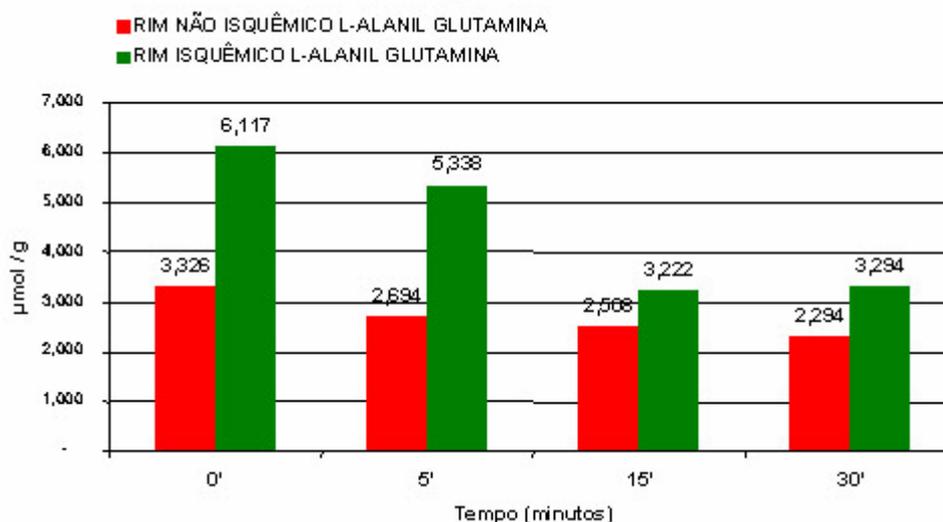
TRATAMENTO	TEMPO (MINUTOS)			
	0'	5'	15'	30'
RIM NÃO ISQUÊMICO L-ALANIL GLUTAMINA	3,326 \pm 0,835	2,694 \pm 0,146	2,508 \pm 0,250	2,294 \pm 0,348
RIM ISQUÊMICO L-ALANIL GLUTAMINA	6,117 \pm 0,695 ★	5,338 \pm 0,571 ★	3,222 \pm 0,666 ▲	3,294 \pm 0,513 ▲

Resultados expressos em média \pm E.P.M. Em 6 animais.

Teste de Mann-Whitney:

- ★ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo respectivo; estudado;
- ▲ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 0 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 5 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 15 min.

Figura 10



5.3 Glicose

5.3.1 Concentração da glicose no sangue em animais tratados com solução salina e com L-Al-Gln (Tabela 11 e Figura 11)

Não houve alterações significantes entre os 2 grupos.

Tabela 11
Concentração de Glicose no sangue
($\mu\text{mol} / \text{ml}$) em 6 animais

TRATAMENTO	TEMPO (MINUTOS)			
	0'	5'	15'	30'
SOLUÇÃO SALINA	5,792 \pm 0,341	6,651 \pm 0,357	5,008 \pm 0,822	8,866 \pm 0,657 ▲■●
L-ALANIL GLUTAMINA	5,064 \pm 0,115	6,775 \pm 0,570 ▲	5,845 \pm 0,307	7,561 \pm 0,648 ▲

Resultados expressos em média \pm E.P.M. Em 6 animais.

Teste de Mann-Whitney:

★ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo respectivo; estudado;

▲ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 0 min;

■ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 5 min;

● $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 15 min.

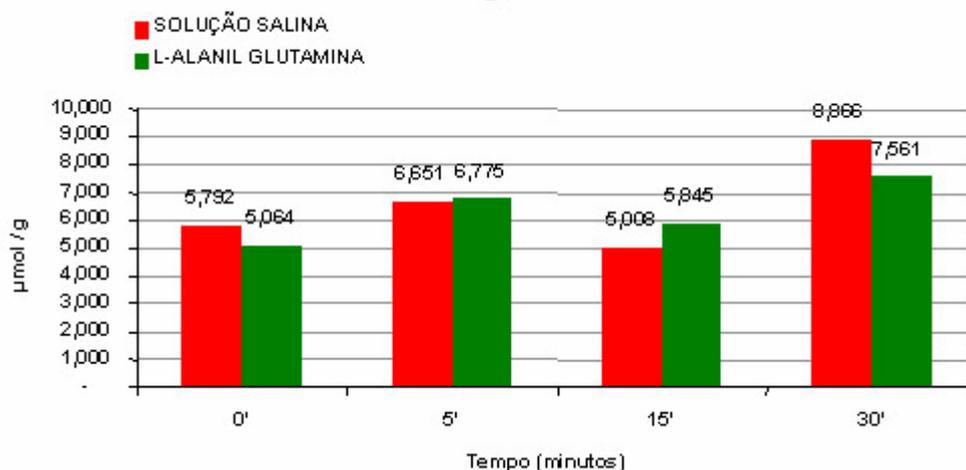
No grupo dos animais tratados com solução salina ocorreram alterações significantes, com elevação da glicose em 30 min (8,871 $\mu\text{mol}/\text{ml}$) em relação aos tempos 0 min (5,792 $\mu\text{mol}/\text{ml}$), 5 min (6,651 $\mu\text{mol}/\text{ml}$) e 15 min (5.008 $\mu\text{mol}/\text{ml}$), com nítida elevação da concentração da glicose, ao longo do tempo de reperfusão.

No grupo dos animais tratados com L-Al-Gln houve elevação em 5 min (6,775 $\mu\text{mol}/\text{ml}$) com relação ao tempo 0 min (5,064 $\mu\text{mol}/\text{ml}$), e no tempo 30 min (7,561 $\mu\text{mol}/\text{ml}$), com relação ao tempo 0 min (5,064 $\mu\text{mol}/\text{ml}$).

A isquemia/reperfusão induziu aumento da glicemia, no tempo 30 min após reperfusão, em animais tratados ou não com L-Alanil-glutamina, quando comparadas às glicemias no tempo 0.

Isto sugere maior liberação de glicose pelo fígado durante a reperfusão (30 min) ou desenvolvimento de resistência insulínica com a conseqüente diminuição na utilização da glicose, pelos tecidos periféricos (diabetes do estresse?). Outra explicação para o aumento da glicemia neste tempo estudado (30 min), seria a indução, por parte da isquemia/reperfusão, de uma maior atividade do ciclo de Cori.

Figura 11



5.3.2 Concentração de glicose em rins não isquêmicos tratados com solução salina e com L-Al-Gln (Tabela 12 e Figura 12)

Houve alteração significativa entre os 2 grupos no tempo 5 min (5,032 $\mu\text{mol/g}$, nos rins tratados com solução salina e 6,563 $\mu\text{mol/g}$, nos rins tratados com L-Al-Gln).

Outra explicação para o aumento da glicemia neste estudo (30 min) seria a indução, por parte da isquemia/reperfusão, de maior atividade do ciclo dos Cori.

Tabela 12

**Concentração de Glicose em rim não isquêmico
($\mu\text{mol} / \text{g}$ tecido fresco) em 6 animais**

TRATAMENTO	TEMPO (MINUTOS)			
	0'	5'	15'	30'
SOLUÇÃO SALINA	5,480 + 0,395	5,032 + 0,210	4,784 + 1,041	9,190 + 0,247 ▲■●
L-ALANIL GLUTAMINA	5,050 + 0,849	6,563 + 0,460 ★	5,404 + 0,395	7,261 + 0,862

Resultados expressos em média \pm E.P.M. Em 6 animais.

Teste de Mann-Whitney:

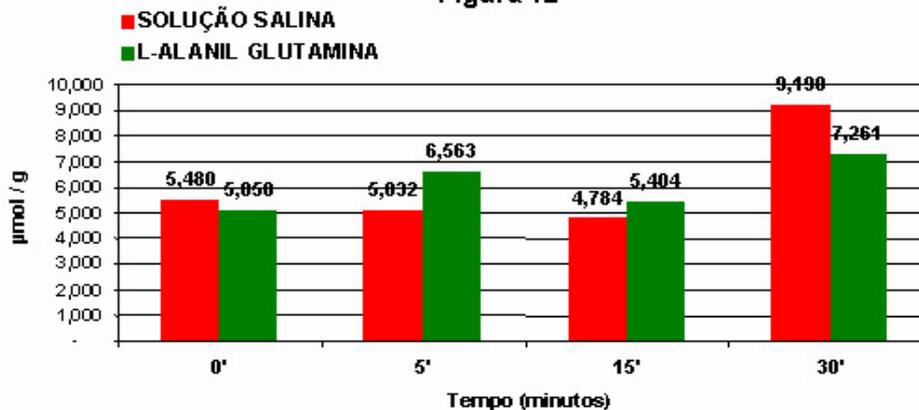
★ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo respectivo; estudado;

▲ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 0 min;

■ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 5 min;

● $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 15 min.

Figura 12



No grupo dos rins não isquêmicos tratados com solução salina houve alterações significantes no tempo 30 min (9,190 $\mu\text{mol} / \text{g}$) com relação aos tempos 0 min (5,480 $\mu\text{mol} / \text{g}$), 5 min (5,032 $\mu\text{mol} / \text{g}$) e 15 min (4,784 $\mu\text{mol} / \text{g}$), com marcada elevação da concentração de glicose. No grupo dos rins tratados com L-Al-Gln não houve alterações significantes, ao longo do tempo de reperusão.

Em rins não isquêmicos a L-alanil-glurtamina induziu discreto aumento na concentração renal de glicose, no tempo 5 min, o que sugere maior captação de glicose pelo tecido renal, naquele tempo estudado.

Em animais não tratados houve maior concentração de glicose no tempo 30 minutos.

Nos animais não sujeitos a isquemia renal e que receberam L-alanil-glutamina, esta elevação na concentração de glicose não se tornou evidente. Tal fato pode sugerir maior retenção de glicose pelos rins não isquêmicos de animais tratados com L-alanil-glutamina.

5.3.3 Concentração de glicose em rins isquêmicos tratados com solução salina e L-Al-Gln (Tabela 13 e Figura 13)

Não houve alterações significantes entre os 2 grupos.

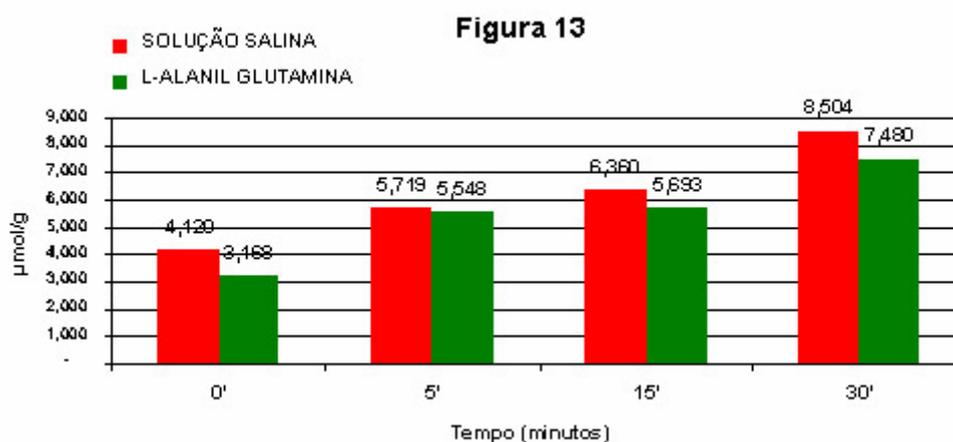
Tabela 13
Concentração de Glicose em rim isquêmico
($\mu\text{mol} / \text{g}$ tecido fresco) em 6 animais

TRATAMENTO	TEMPO (MINUTOS)			
	0'	5'	15'	30'
SOLUÇÃO SALINA	4,120 \pm 1,047	5,719 \pm 0,551	6,360 \pm 0,890	8,504 \pm 0,580 ▲■
L-ALANIL GLUTAMINA	3,168 \pm 0,697	5,548 \pm 1,330	5,693 \pm 0,130 ▲	7,480 \pm 0,910 ▲

Resultados expressos em média \pm E.P.M. Em 6 animais.

Teste de Mann-Whitney:

- ★ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo respectivo; estudado;
- ▲ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 0 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 5 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 15 min.



No grupo dos rins tratados com solução salina houve alteração significativa em 30 min (8,504 $\mu\text{mol/g}$) com relação aos tempos 0 min (4,120 $\mu\text{mol/g}$) e 5 min (5,719 $\mu\text{mol/g}$).

No grupo dos rins tratados com L-Al-Gln, mudanças significantes ocorreram em 15 min (5,693 $\mu\text{mol/g}$), com relação a 0 min (3,168 $\mu\text{mol/g}$) e em 30 min (7,480 $\mu\text{mol/g}$), com relação a 0 min (3,168 $\mu\text{mol/g}$), notando-se nítida elevação na concentração da glicose, em ambos os grupos.

A isquemia/reperfusão induziu aumentos na concentração de glicose no tecido renal de animais tratados ou não com L-alanil-glutamina, no tempo 30 min de reperfusão, quando comparados às concentrações de glicose no rim de animais no tempo 0 (isquemia).

Tais incrementos na concentração de glicose nos rins desses animais refletiram a maior disponibilidade de glicose neste tempo estudado (30 min), a julgar pelo aumento da glicemia no mesmo tempo, com conseqüente aumento na captação de glicose pelo rim.

5.3.4 Concentração de glicose em rins não isquêmicos *versus* rins isquêmicos tratados com solução salina (Tabela 14 e Figura 14)

A comparação entre a concentração de glicose em rins não isquêmicos e isquêmicos não mostrou alterações significantes.

O grupo de rins isquêmicos apresentou alterações significantes aos 30 min (8,524 $\mu\text{mol/g}$), quando comparado ao tempo 0 min. (4,120 $\mu\text{mol/g}$) e 5 min (5,719 $\mu\text{mol/g}$).

No grupo de rins não isquêmicos, houve alterações significantes aos 30min (9,190 $\mu\text{mol/g}$), com relação ao tempo 0 min (5,480 $\mu\text{mol/g}$), com relação ao tempo 5 min (5,033 $\mu\text{mol/g}$), e com relação ao tempo 15 min (4,790 $\mu\text{mol/g}$).

Tanto em animais portadores de rins não isquêmicos (grupo controle) quanto em animais do grupo experimento, houve aumento na concentração de glicose no tecido renal, no tempo 30 min. Tal fato sugere maior captação de glicose pelos rins, neste tempo estudado ocasião em que a oferta de glicose (glicemia mais elevada) era maior, em comparação aos demais tempos.

Tabela 14

**Concentração de Glicose ($\mu\text{mol} / \text{g}$ tecido fresco) em 6 animais
Comparação entre rim não isquêmico versus rim isquêmico
com Solução Salina**

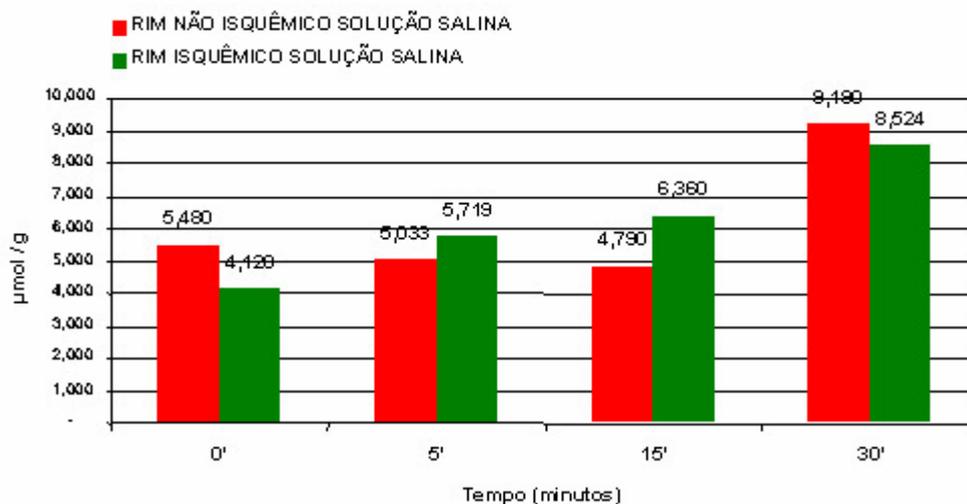
TRATAMENTO	TEMPO (MINUTOS)			
	0'	5'	15'	30'
RIM NÃO ISQUÊMICO SOLUÇÃO SALINA	5,480 \pm 0,395	5,033 \pm 0,210	4,790 \pm 1,040	9,190 \pm 0,248 ▲■●
RIM ISQUÊMICO SOLUÇÃO SALINA	4,120 \pm 1,050	5,719 \pm 0,551	6,360 \pm 0,889	8,524 \pm 0,579 ▲■

Resultados expressos em média \pm E.P.M. Em 6 animais.

Teste de Mann-Whitney:

- ★ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo respectivo; estudado;
- ▲ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 0 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 5 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 15 min.

Figura 14



5.3.5 Concentração de glicose em rins não isquêmicos *versus* rins isquêmicos tratados com L-Al-Gln (Tabela 15 e Figura 15)

Não houve ocorrência de alteração significativa, entre os grupos.

O grupo dos rins não isquêmicos não mostrou alterações significantes, no decorrer dos tempos de reperfusão.

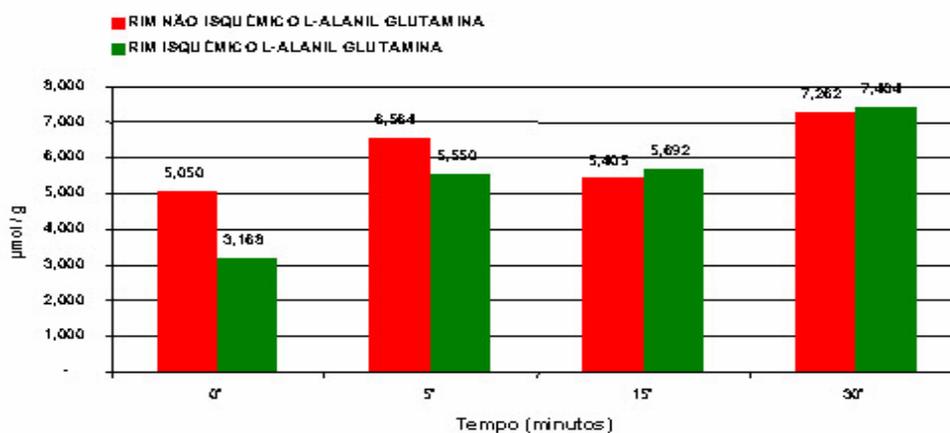
Tabela 15
Concentração de Glicose ($\mu\text{mol} / \text{g}$ tecido fresco) em 6 animais
Comparação entre rim não isquêmico versus rim isquêmico
com L-Alanil Glutamina

TRATAMENTO	TEMPO (MINUTOS)			
	0'	5'	15'	30'
RIM NÃO ISQUÊMICO L-ALANIL GLUTAMINA	5,050 \pm 0,848	6,564 \pm 0,460	5,405 \pm 0,395	7,262 \pm 0,863
RIM ISQUÊMICO L-ALANIL GLUTAMINA	3,168 \pm 0,697	5,550 \pm 1,330	5,692 \pm 0,131 \blacktriangle	7,404 \pm 0,871 \blacktriangle

Resultados expressos em média \pm E.P.M. Em 6 animais.
 Teste de Mann-Whitney:

- ★ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo respectivo; estudado;
- \blacktriangle $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 0 min;
- \blacksquare $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 5 min;
- \bullet $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 15 min.

Figura 15



O grupo dos rins isquêmicos mostrou alteração significativa no tempo 15 min (5,692 $\mu\text{mol/g}$) com relação ao tempo 0 min (3,168 $\mu\text{mol/g}$), e ao tempo de 30 min (7,404 $\mu\text{mol/g}$) com relação ao tempo 0 min (3,168 $\mu\text{mol/g}$). Percebeu-se uma nítida tendência para elevação da glicose, no grupo dos rins isquêmicos tratados com L-Al-Gln.

Em animais tratados com L-alanil-glutamina a isquemia/reperfusão induziu aumento nas concentrações de glicose 30 min após a lesão isquêmica, em relação as concentrações aferidas no tempo 0. Por outro, lado tal fato não ocorreu em rins não isquêmicos de animais tratados com L-alanil-glutamina. As concentrações de glicose no tecido renal permaneceram inalteradas, em todos os tempos estudados. Tal incremento nas concentrações de glicose em rins submetidos a isquemia/reperfusão, em animais recipientes de L-alanil-glutamina, sugere maior captação de glicose, pelos rins tratados.

5.4 Acetoacetato

5.4.1 Concentração de acetoacetato no sangue de amostras tratadas com solução salina e L-Al-Gln (Tabela 16 e Figura 16)

Não foi observada alteração significativa entre os dois grupos.

Tabela 16
Concentração de Acetoacetato no sangue
($\mu\text{mol} / \text{ml}$) em 6 animais

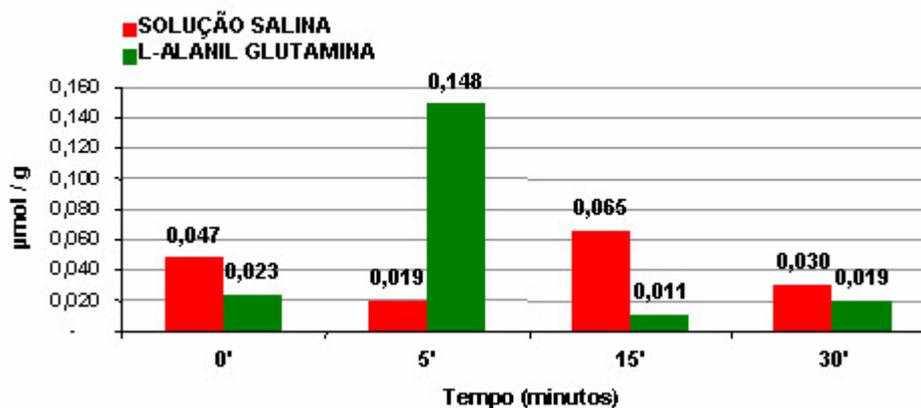
TRATAMENTO	TEMPO (MINUTOS)			
	0'	5'	15'	30'
SOLUÇÃO SALINA	0,047 \pm 0,047	0,019 \pm 0,038	0,065 \pm 0,051	0,030 \pm 0,096
L-ALANIL GLUTAMINA	0,023 \pm 0,020	0,148 \pm 0,130	0,011 \pm 0,074	0,019 \pm 0,011

Resultados expressos em média \pm E.P.M. Em 6 animais.

Teste de Mann-Whitney:

- ★ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo respectivo; estudado;
- ▲ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 0 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 5 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 15 min.

Figura 16



No grupo das amostras tratadas com solução salina houve modificação significativa no tempo 15 min (0,0655 $\mu\text{mol}/\text{ml}$), quando comparado ao tempo 5 min (0,019 $\mu\text{mol}/\text{ml}$), e alteração significativa no tempo 30 min (0,030 $\mu\text{mol}/\text{ml}$), quando comparado ao tempo 15 min (0,065 $\mu\text{mol}/\text{ml}$).

No grupo tratado com L-Al-Gln houve uma alteração significativa, no tempo 5 min (0,148 $\mu\text{mol}/\text{ml}$), quando comparado ao tempo 0 min (0,023 $\mu\text{mol}/\text{ml}$).

5.4.2 Concentração de acetoacetato em rins não isquêmicos tratados com solução salina e L-Al-Gln (Tabela 17 e Figura 17)

Não houve alteração entre os grupos.

Tabela 17
Concentração de Acetoacetato em rim não isquêmico
($\mu\text{mol} / \text{g}$ tecido fresco) em 6 animais

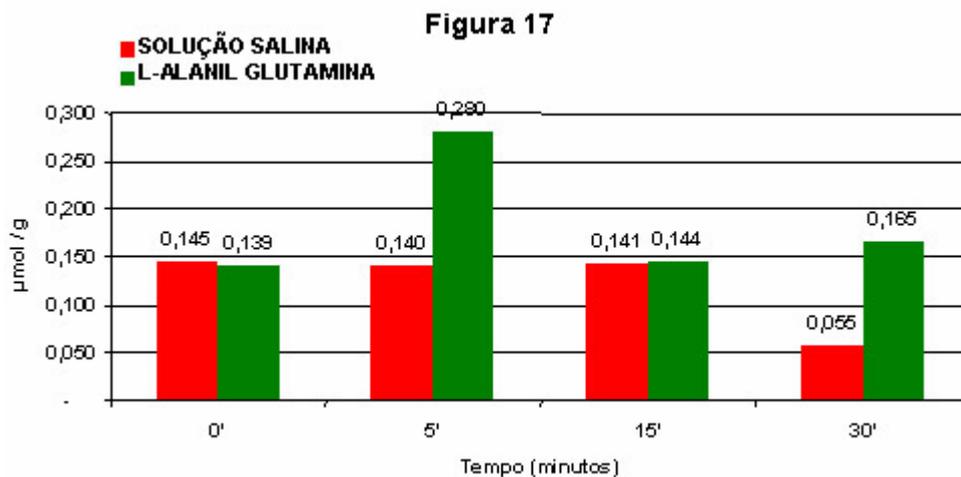
TRATAMENTO	TEMPO (MINUTOS)			
	0'	5'	15'	30'
SOLUÇÃO SALINA	0,145 \pm 0,033	0,140 \pm 0,093	0,141 \pm 0,018	0,055 \pm 0,011 ■●
L-ALANIL GLUTAMINA	0,139 \pm 0,026	0,280 \pm 0,105	0,144 \pm 0,035	0,165 \pm 0,049

Resultados expressos em média \pm E.P.M. Em 6 animais.

Teste de Mann-Whitney:

- ★ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo respectivo; estudado;
- ▲ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 0 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 5 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 15 min.

No grupo das amostras tratadas com solução salina houve alteração significante no tempo de 30 min (0,055 $\mu\text{mol/g}$), quando comparado ao tempo 0 min (0,145 $\mu\text{mol/g}$), e ao tempo 15 min (0,141 $\mu\text{mol/g}$). Não houve alteração significante no grupo das amostras tratadas com L-Al-Gln.



5.4.3 Concentração de acetoacetato em rins isquêmicos tratados com solução salina e L-Al-Gln (Tabela 18 e Figura 18)

Nos rins tratados com solução salina houve alteração significativa entre os grupos no tempo 15 min (0,119 $\mu\text{mol/g}$ e 0,164 $\mu\text{mol/g}$ nos rins tratados com L-Al-Gln). E alteração no tempo de 30 min (0,025 $\mu\text{mol/g}$ nos rins tratados com solução salina e 0,156 $\mu\text{mol/g}$ nos rins tratados com L-Al-Gln).

Tabela 18
Concentração de Acetoacetato em rim isquêmico
($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco) em 6 animais

TRATAMENTO	TEMPO (MINUTOS)			
	0'	5'	15'	30'
SOLUÇÃO SALINA	0,125 + 0,019	0,168 + 0,020	0,119 + 0,013	0,025 + 0,010 ▲■●
L-ALANIL GLUTAMINA	0,105 + 0,025	0,179 + 0,019 ▲	0,164 + 0,090 ▲★	0,156 + 0,041 ★

Resultados expressos em média \pm E.P.M. Em 6 animais.

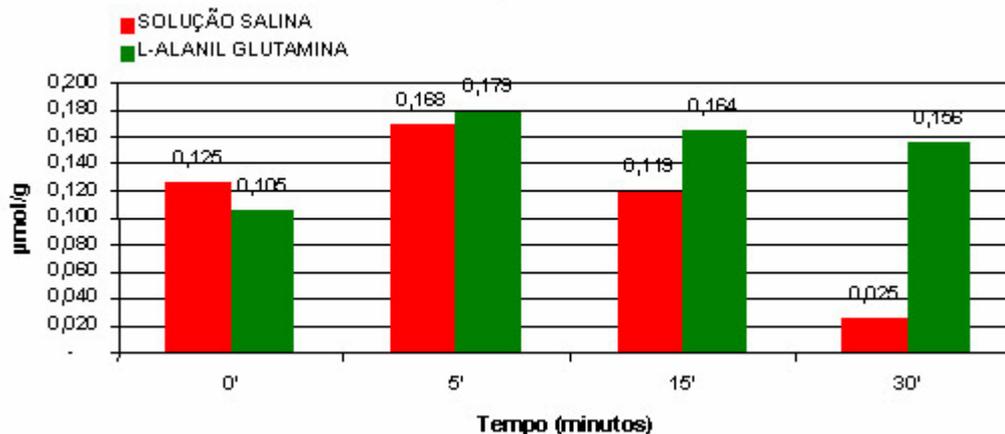
Teste de Mann-Whitney:

- ★ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo respectivo; estudado}
- ▲ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 0 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 5 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 15 min.

No grupo tratado com solução salina ocorreram alterações significantes no tempo 30 min (0,025 $\mu\text{mol/g}$), quando comparado ao tempo 0 min (0,125 $\mu\text{mol/g}$), ao tempo 5 min (0,168 $\mu\text{mol/g}$), e ao tempo 15 min (0,119 $\mu\text{mol/g}$).

No grupo das amostras tratadas com L-Al-Gln houve alteração significativa aos 5 min (0,179 $\mu\text{mol/g}$), com relação ao tempo 0 min (0,105 $\mu\text{mol/g}$), e no tempo de 15 min (0,164 $\mu\text{mol/g}$) com relação ao tempo 0 min (0,105 $\mu\text{mol/g}$).

Figura 18



5.5 3-Hidroxibutirato

5.5.1 Concentração de 3-hidroxibutirato no sangue de amostras tratadas com salina e L-Al-Gln (Tabela19 e Figura 19)

Houve uma alteração significativa entre os grupos no tempo 5 min (0,248 $\mu\text{mol/ml}$ nas amostras tratadas com salina e 0,085 nas amostras tratadas com L-Al-Gln).

Tabela 19
Concentração de Hidroxibutirato no sangue
($\mu\text{mol} / \text{ml}$) em 6 animais

TRATAMENTO	TEMPO (MINUTOS)			
	0'	5'	15'	30'
SOLUÇÃO SALINA	0,193 + 0,074	0,248 + 0,050	0,172+ 0,053	0,046 + 0,159
L-ALANIL GLUTAMINA	0,071 + 0,199	0,085 + 0,025	0,060+ 0,020	0,058 + 0,019

Resultados expressos em média \pm E.P.M. Em 6 animais.

Teste de Mann-Whitney:

★ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo respectivo; estudado);

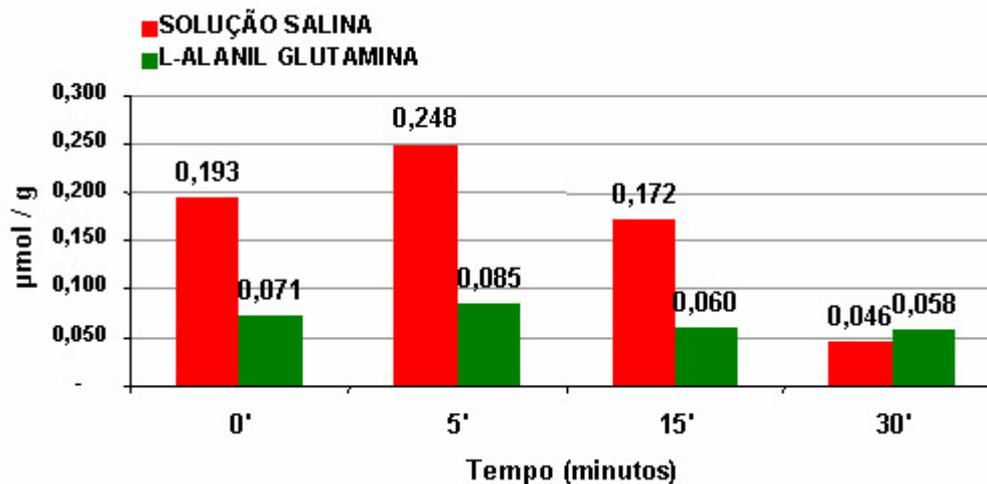
▲ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 0 min;

■ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 5 min;

● $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 15 min.

No grupo das amostras tratadas com solução salina foi observada alteração significativa ao tempo de 30min (0,046 $\mu\text{mol/ml}$), quando comparado ao tempo 5 min (0,248 $\mu\text{mol/ml}$), percebendo-se nítida queda ao tempo de 30 min. No grupo das amostras tratadas com L-Al-Gln, não houve alterações significantes.

Figura 19



5.5.2 Concentração de 3-hidroxibutirato em rins não isquêmicos tratados com solução salina e com L-Al-Gln (Tabela 20 e Figura 20)

Observaram-se alterações significativas entre os grupos, no tempo de 5 min (0,260 $\mu\text{mol/g}$, nos rins tratados com salina e 0,034 $\mu\text{mol/g}$, nos rins tratados com L-Al-Gln). No grupo tratado com salina houve alteração significativa no tempo de 30 min (0,054 $\mu\text{mol/g}$), quando comparado ao tempo 0 min (0,169 $\mu\text{mol/g}$). Não foi observada significância no grupo tratado com L-Al-Gln

Tabela 20
Concentração de Hidroxibutirato em rim não isquêmico
($\mu\text{mol} / \text{g}$ tecido fresco) em 6 animais

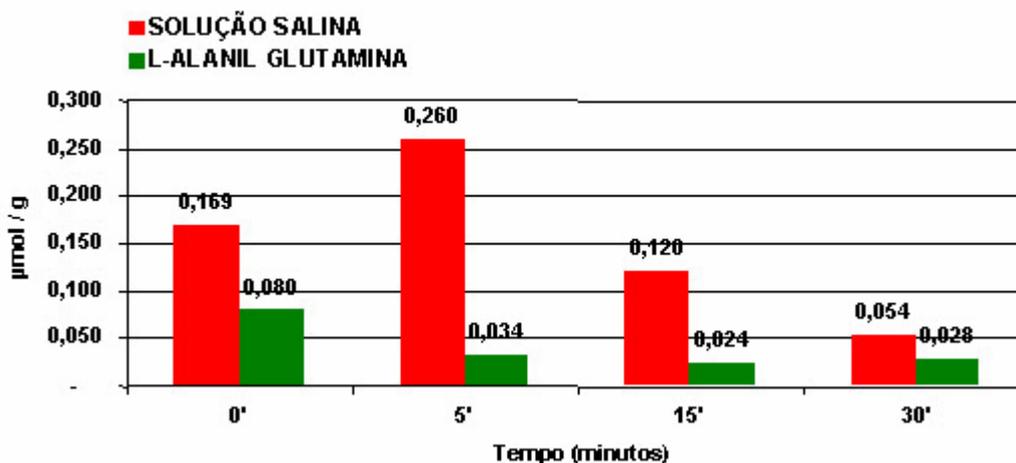
TRATAMENTO	TEMPO (MINUTOS)			
	0'	5'	15'	30'
SOLUÇÃO SALINA	0,169 \pm 0,045	0,260 \pm 0,069	0,120 \pm 0,060 ▲	0,054 \pm 0,047 ▲ ■
L-ALANIL GLUTAMINA	0,080 \pm 0,038	0,034 \pm 0,012 ★	0,024 \pm 0,015	0,028 \pm 0,118

Resultados expressos em média \pm E.P.M. Em 6 animais.

Teste de Mann-Whitney:

- ★ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo respectivo; estudado;
- ▲ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 0 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 5 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 15 min.

Figura 20



5.5.3 Concentração de 3-hidroxiacetato em rins isquêmicos tratados com solução salina e L-Al-Gln (Tabela 21 e Figura 21)

Houve uma significância entre os grupos, no tempo 5 min (0,234 $\mu\text{mol/g}$ nas amostras tratadas com solução salina e 0,024 $\mu\text{mol/g}$, nas amostras tratadas com L-Al-Gln).

No grupo das amostras tratadas com salina houve alteração significativa em 30 min

Tabela 21

**Concentração de Hidroxiacetato em rim isquêmico
($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco) em 6 animais**

TRATAMENTO	TEMPO (MINUTOS)			
	0'	5'	15'	30'
SOLUÇÃO SALINA	0,234 + 0,042	0,170 + 0,030	0,162 + 0,051	0,017 + 0,015 ▲■●
L-ALANIL GLUTAMINA	0,024 + 0,014 ★	0,115 + 0,048	0,058 + 0,020	0,061 + 0,024

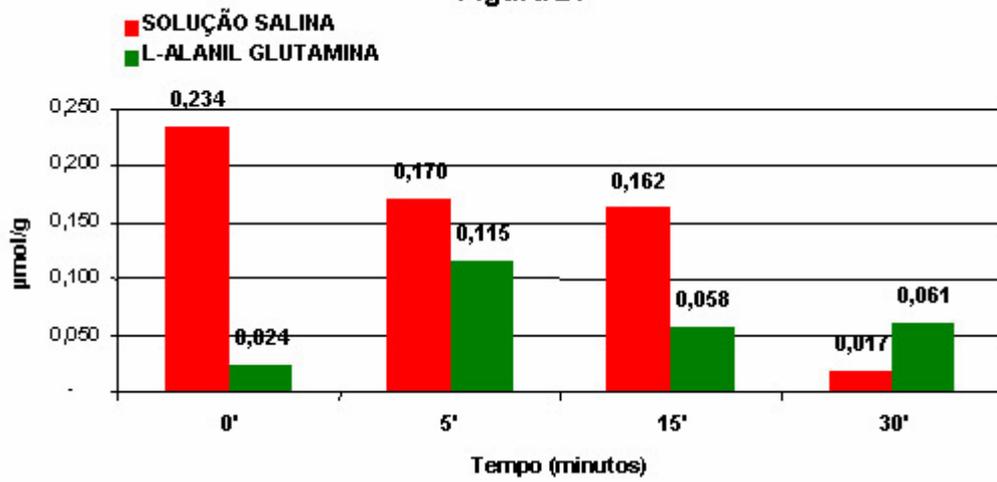
Resultados expressos em média \pm E.P.M. Em 6 animais.

Teste de Mann-Whitney:

- ★ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo respectivo; estudado;
- ▲ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 0 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 5 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 15 min.

(0,017 $\mu\text{mol/g}$) quando comparado ao tempo 0 min (0,234 $\mu\text{mol/g}$) e 5 min (0,170 $\mu\text{mol/g}$) e ao tempo 15 min (0,162 $\mu\text{mol/g}$), constatando-se nítida queda na concentração de 3-hidroxiacetato, durante o tempo de reperfusão. No grupo tratado com L-Al-Gln não houve alterações significantes.

Figura 21



5.6 Corpos cetônicos

5.6.1 Concentração de corpos cetônicos no sangue de amostras tratadas com solução salina e L-Al-Gln (Tabela 22 e Figura 22)

Tabela 22
Concentração de Corpos Cetônicos no sangue
($\mu\text{mol} / \text{ml}$) em 6 animais

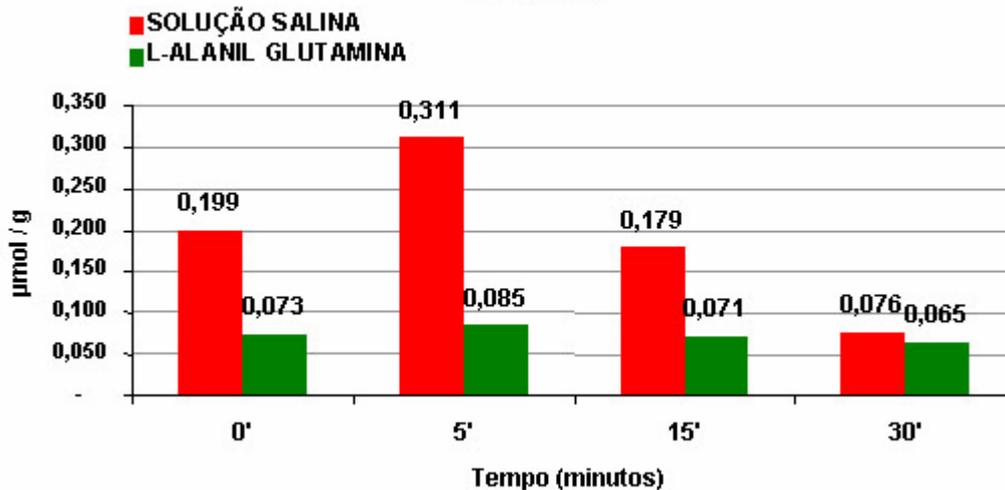
TRATAMENTO	TEMPO (MINUTOS)			
	0'	5'	15'	30'
SOLUÇÃO SALINA	0,199 \pm 0,079	0,311 \pm 0,070	0,179 \pm 0,051	0,076 \pm 0,090
L-ALANIL GLUTAMINA	0,073 \pm 0,020	0,085 \pm 0,025	0,071 \pm 0,019	0,065 \pm 0,018

Resultados expressos em média \pm E.P.M. Em 6 animais.

Teste de Mann-Whitney:

- ★ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo respectivo; estudado;
- ▲ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 0 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 5 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 15 min.

Figura 22



Não houve significantes entre os grupos.

Houve somente uma alteração significativa no grupo tratado com salina em 30 min (0,076 $\mu\text{mol}/\text{ml}$), quando comparado ao tempo 5 min (0,311 $\mu\text{mol}/\text{ml}$).

Nas amostras tratadas com L-Al-Gln, não houve alterações significantes.

O tratamento com L-alanil-glutamina não induziu alterações na cetonemia durante a isquemia ou reperfusão, quando comparada a cetonemia de animais não tratados. Ou seja, a disponibilidade de corpos cetônicos, para os tecidos, foi semelhante em animais tratados ou não tratados com L-alanil-glutamina.

5.6.2 Concentração de corpos cetônicos em rins não isquêmicos tratados com solução salina e L-Al-Gln (Tabela 23 e Figura 23)

Não houve alterações significativas entre os grupos. Nos grupos tratados com solução salina, houve alterações no tempo 30 min (0,103 $\mu\text{mol/g}$), com relação ao tempo 0 min (0,315 $\mu\text{mol/g}$), ao tempo 5 min (0,345 $\mu\text{mol/g}$), e ao tempo 15 min (0,297 $\mu\text{mol/g}$).

Não houve alterações nas concentrações dos corpos cetônicos nos rins não isquêmicos, em nenhum dos tempos estudados, em animais tratados ou não com L-alanil-glutamina.

Em animais não tratados com L-alanil-glutamina houve redução progressiva das concentrações de corpos cetônicos, nos tecidos renais, sugerindo menor captação deste metabólito pelo rim de animais não tratados. Por outro lado, o tratamento com L-alanil-glutamina preservou a capacidade de captar corpos cetônicos a julgar pela manutenção das concentrações deste metabólito, durante todos os tempos estudados.

Tabela 23
Concentração de Corpos Cetônicos em rim não isquêmico
($\mu\text{mol} / \text{g}$ tecido fresco) em 6 animais

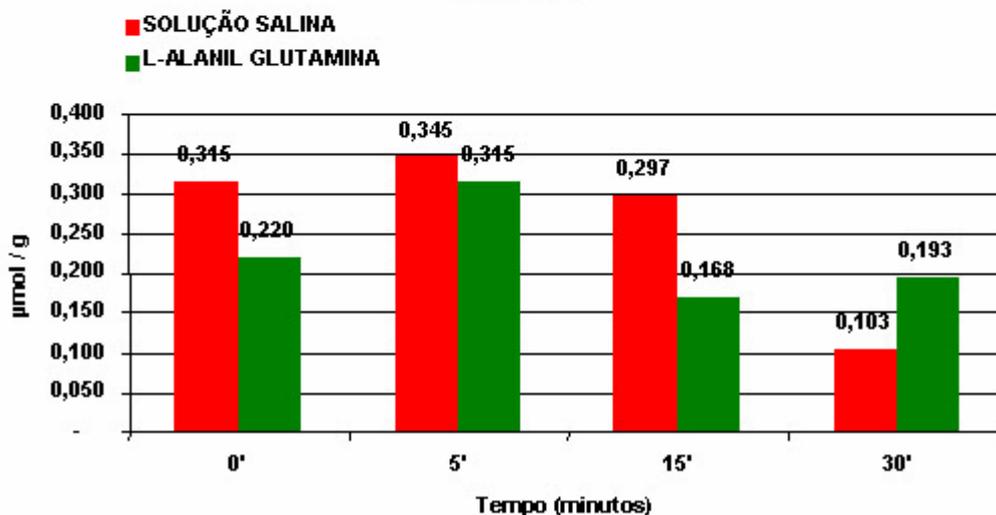
TRATAMENTO	TEMPO (MINUTOS)			
	0'	5'	15'	30'
SOLUÇÃO SALINA	0,315 + 0,061	0,345 + 0,069	0,297 + 0,071	0,103 + 0,050 ▲■●
L-ALANIL GLUTAMINA	0,220 + 0,050	0,315 + 0,108	0,168 + 0,027	0,193 + 0,051

Resultados expressos em média \pm E.P.M. Em 6 animais.

Teste de Mann-Whitney:

- ★ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo respectivo; estudado;
- ▲ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 0 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 5 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 15 min.

Figura 23



5.6.3 Concentração de corpos cetônicos em rins isquêmicos tratados com solução salina e L-Al-Gln (Tabela 24 e Figura 24)

Comparando-se os dados, observou-se alteração significativa entre os grupos, no tempo de 0 min (0,360 $\mu\text{mol/g}$, nas amostras tratadas com solução salina e 0,144 $\mu\text{mol/g}$, nas amostras tratadas com L-Al-Gln), e no tempo 30 min (0,042 $\mu\text{mol/g}$, nas amostras tratadas com solução salina e 0,217 $\mu\text{mol/g}$, nas amostras tratadas com L-Al-Gln).

Tabela 24
Concentração de Corpos Cetônicos em rim isquêmico
($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco) em 6 animais

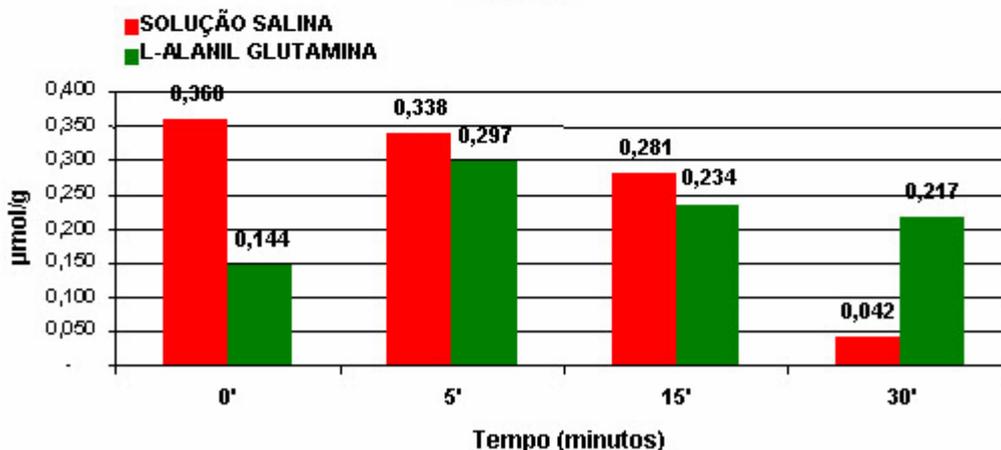
TRATAMENTO	TEMPO (MINUTOS)			
	0'	5'	15'	30'
SOLUÇÃO SALINA	0,360 + 0,050	0,338 + 0,032	0,281 + 0,053	0,042 + 0,022 ▲■●
L-ALANIL GLUTAMINA	0,144 + 0,032 ★	0,297 + 0,049 ▲	0,234 + 0,028	0,217 + 0,064 ★

Resultados expressos em média \pm E.P.M. Em 6 animais.

Teste de Mann-Whitney:

- ★ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo respectivo; estudado;
- ▲ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 0 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 5 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 15 min.

Figura 24



No grupo das amostras tratadas com solução salina foram observadas alterações significantes no tempo de 30 min (0,042 $\mu\text{mol/g}$), quando comparado ao tempo 0 min (0,360 $\mu\text{mol/g}$), ao tempo 5 min (0,338 $\mu\text{mol/g}$), e ao tempo 15 min (0,281 $\mu\text{mol/g}$).

O grupo das amostras tratadas com L-Al-Gln só apresentou alteração significativa no tempo de 5 min (0,297 $\mu\text{mol/g}$), com relação ao tempo 0 min (0,294 $\mu\text{mol/g}$).

5.6.4 Concentração de corpos cetônicos em rins não isquêmicos *versus* rins isquêmicos, tratados com solução salina (Tabela 25 e Figura 25)

Não houve alteração entre os grupos experimental e de controle.

Tabela 25

Concentração de Corpos Cetônicos ($\mu\text{mol / g}$ tecido fresco) em 6 animais Comparação entre rim não isquêmico *versus* rim isquêmico com Solução Salina

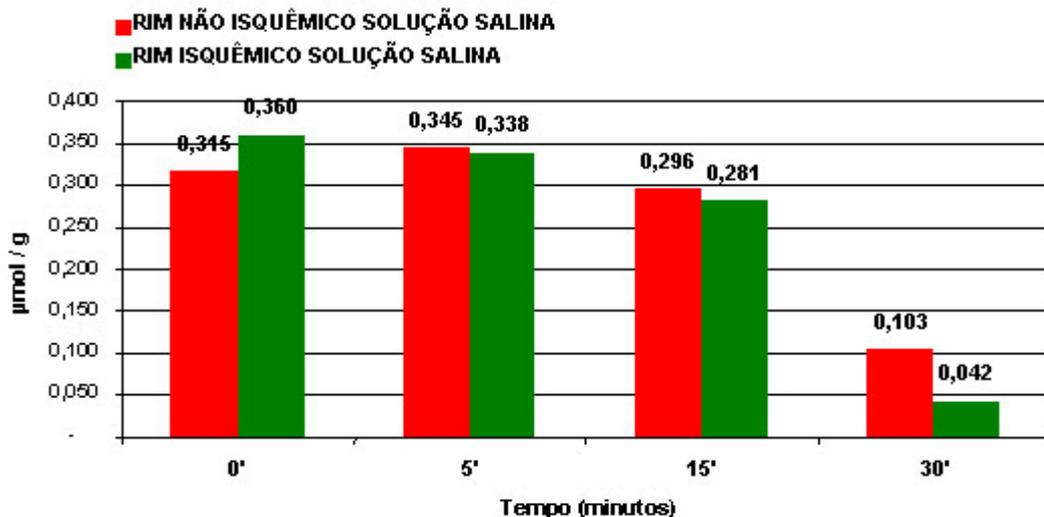
TRATAMENTO	TEMPO (MINUTOS)			
	0'	5'	15'	30'
RIM NÃO ISQUÊMICO SOLUÇÃO SALINA	0,315 \pm 0,061	0,345 \pm 0,259	0,296 \pm 0,071	0,103 \pm 0,050
RIM ISQUÊMICO SOLUÇÃO SALINA	0,360 \pm 0,050	0,338 \pm 0,033	0,281 \pm 0,053	0,042 \pm 0,022

Resultados expressos em média \pm E.P.M. Em 6 animais.

Teste de Mann-Whitney:

- ★ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo respectivo; estudado;
- ▲ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 0 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 5 min;
- $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 15 min.

Figura 25



No grupo dos rins não isquêmicos foi observada alteração significativa no tempo de 30 min (0,103 $\mu\text{mol/g}$) com relação ao tempo 0 min (0,315 $\mu\text{mol/g}$), com o tempo 5 min (0,345 $\mu\text{mol/g}$), e com o tempo 15 min (0,296 $\mu\text{mol/g}$), notando-se queda, ao longo do tempo de reperfusão.

No grupo dos rins isquêmicos notou-se alteração no tempo 30 min (0,042 $\mu\text{mol/g}$), com relação ao tempo 0 min (0,360 $\mu\text{mol/g}$), e ao tempo 5 min (0,338 $\mu\text{mol/g}$), ficando evidente drástica redução dos corpos cetônicos, ao longo do tempo de reperfusão.

A isquemia/reperfusão em animais não tratados com L-alanil-glutamina, não induziu alterações nas concentrações renais dos corpos cetônicos em nenhum dos tempos estudados, quando comparados as concentrações de rins não isquêmicos (grupo controle).

5.6.5 Concentração de corpos cetônicos em rins não isquêmicos *versus* rins isquêmicos, tratados com L-Al-Gln (Tabela 26 e Figura 26)

Só foi observada uma alteração significativa, no grupo de rins isquêmicos ao tempo de 5 min (0,296 $\mu\text{mol/g}$), quando comparado ao tempo 0 min (0,144 $\mu\text{mol/g}$).

Tabela 26
Concentração de Corpos Cetônicos ($\mu\text{mol} / \text{g}$ tecido fresco) em 6 animais Comparação entre rim não isquêmico versus rim isquêmico com L-Alanil Glutamina

TRATAMENTO	TEMPO (MINUTOS)			
	0'	5'	15'	30'
RIM NÃO ISQUÊMICO L-ALANIL GLUTAMINA	0,220 \pm 0,050	0,315 \pm 0,107	0,168 \pm 0,026	0,193 \pm 0,051
RIM ISQUÊMICO L-ALANIL GLUTAMINA	0,144 \pm 0,032	0,296 \pm 0,048 \blacktriangle	0,234 \pm 0,027	0,217 \pm 0,064

Resultados expressos em média \pm E.P.M. Em 6 anim ais.

Teste de Mann-Whitney:

- ★ $p < 0,05$ quando comparado ao tempo respectivo; estudado}
- \blacktriangle $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 0 min;
- \blacksquare $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 5 min;
- \bullet $p < 0,05$ quando comparado ao tempo de 15 min.

A isquemia/reperfusão, em animais tratados com L-alanil-glutamina, não induziu alterações nas concentrações dos corpos cetônicos, em tecido renal, quando comparados às concentrações determinadas no tecido renal de animais tratados com L-alanil-glutamina cujos rins não foram isquemiados.

6 DISCUSSÃO

Nos dias atuais o domínio da preservação celular seria avanço dos mais desejáveis. O progresso na técnica dos vários transplantes de órgãos e a multiplicidade de drogas e de indicações de quimioterapia são exemplos eloquentes de quão importante seria contarmos com células resistentes a agentes agressores. No caso particular do transplante renal os rins doados são submetidos a isquemia/reperfusão mais ou menos prolongada que limita o tempo de estocagem e transporte e que pode provocar necrose tubular aguda com a indesejável insuficiência renal pós-transplante. Dessa forma, é válida a pesquisa de substâncias (ou de técnicas) que exerçam efeito protetor sobre células submetidas a isquemia/reperfusão.

Recentemente a atenção dos pesquisadores tem se voltado para a glutamina e para as suas qualidades como agente protetor celular, sob várias circunstâncias clínicas tais como sepse, isquemia, quimioterapia, irradiação, agressão viral, etc. Os resultados tem se mostrado animadores e firmados nessas pesquisas decidimos usar a glutamina, através de seu precursor, L-alanil-glutamina, como possível agente protetor de células renais submetidas a isquemia/reperfusão.

A avaliação positiva da literatura que será discutida a seguir animou-nos em nosso intento.

A glutamina é o aminoácido mais abundante no organismo, está envolvido em mais processos metabólicos do que qualquer outro aminoácido (STUMVOLL, 1999) e corresponde a 25% dos aminoácidos livres (SOUBA, 1990), o que é consistente com a sua função de transportador de radicais químicos entre os tecidos e o fígado (CHAMPE, 1996; BAYNES, 2000; LEHNINGER, 2000). Desse modo a glutamina é a fonte do grupo amínico na formação de muitos produtos biossintéticos ao tempo em que é uma forma de reserva de amônia (VOET, 2000). No tecido muscular representa 60% de todos os aminoácidos (BERGSTROM, 1974). Todavia as concentrações plasmáticas de glutamina são pequenas, não refletindo as concentrações intracelulares nem servindo como parâmetro para a avaliação das alterações globais desse aminoácido (STEIN, 1954).

Aferições recentes atestam que a glutamina atinge concentrações de $4,3 \pm 0,6$ g/100g de músculo humano com reserva corporal total de aproximadamente 240g (FURST, 1983), sem aparente influência de sexo ou idade (KUHN, 1999).

A glutamina desempenha papel fundamental no metabolismo dos aminoácidos uma vez que o átomo de N aminídico da glutamina é precursor de ácido glutâmico, asparagina, triptofano, histidina (CONN e STUMPF, 1998). Em razão de sua biaminação, a glutamina atua como transportadora de Nitrogênio e no transporte intracelular do ácido glutâmico pois a membrana celular é francamente permeável à glutamina e pouco permeável ao ácido glutâmico (RODWDELL, 1998).

A glutamina oferece uma forma de armazenamento e transporte da amônia exercendo importante papel na sua depuração. É a principal responsável pela amoniogênese renal (RODWDELL, 1998; NEWSHOLME, 1983) e tem presença ativa no ciclo da uréia (VOET, 2000; RODWDELL, 1998), exercendo ainda papel fundamental nas gluconeogêneses renal e hepática (CURTHOYS, 1995). Os rins formam amônia a partir da glutamina pela ação da glutaminase renal (CHAMPE, 1996). Rins submetidos a isquemia apresentam queda acentuada dos níveis de glutamina com elevação dos níveis de amônia e glutamato, mostrando acentuação da rota catabólica com consumo da glutamina renal (HEMS, 1970). A glutamina é o substrato utilizado pelo rim na produção endógena de arginina, a partir da citrulina, esta derivando do metabolismo intestinal do glutamato (HALLEMESCH, 1999). É um dos elementos da síntese das hexosaminas (glicoproteínas, gangliosídios e glicosaminoglicanos) pois o nitrogênio do grupo amino desses polisacarídeos é fornecido pela glutamina através da transferência do grupo amida (CHAMPE, 1996; LEHNINGER, 2000). É partícipe da síntese de nucleotídeos como o NAD, condição em que o ácido nicotínico reage com o fosforribopirofosfato resultando desamido-NAD que ao receber um grupo amina proveniente da glutamina dá origem a uma molécula de NAD (VOET, 2000).

O diagrama abaixo ilustra algumas das principais interações da glutamina.



No tecido cerebral, o mecanismo principal para a destoxificação da amônia é a formação de glutamina. Após a infusão de amônia, os intermediários do ciclo do ácido cítrico são dirigidos para a síntese de ácido α -cetoglutárico e, subseqüentemente, de glutamina (RODWELL, 1998; CHAMPE, 1996). A glutamina participa, através do glutamato, da síntese do neurotransmissor GABA (ROSKOSKI, 1997; DEVLIN, 2000), uma vez que 26% a 38% do carbono do GABA provem da molécula do glutamato (BRADFORD, 1978).

A glutamina insere-se no ciclo do ácido cítrico através do ácido α -cetoglutárico em que pode converter-se pela ação da glutaminase.

É parcela constitutiva da glutatión juntamente com a cisteína e a glicina, contribuindo para o importante processo de destoxificação dos radicais livres oxidantes (COTRAN, 1996) e para o transporte de aminoácidos no nefro e no jejuno (ROSKOSKI, 1997).

É parte do complexo sistema carreador (lançadeira) malato-aspartato que promove a produção de NAD intra-mitocondrial (LEHNINGER, 2000).

Como substância partícipe de tantas ações metabólicas a glutamina apresenta a mesma ubiqüidade no plano clínico.

É necessária nos meios de cultura para que se obtenha o crescimento celular satisfatório (EAGLE, 1955; EAGLE et al 1955). Células tumorais em cultura aumentaram as taxas de proliferação na presença de glutamina e tiveram o crescimento inibido quando da adição de metionina sulfoximina (inibidor da glutamina-sintetase) ou quando a glutamina foi

substituída por seu análogo químico acivicina (COLQUHOUN, 1997). Tem ação comprovada sobre o sistema imune promovendo a multiplicação de linfócitos T, elevando a função desses linfócitos em pacientes cirúrgicos. Nesse caso a glutamina agiria como fornecedor de energia para células em rápido processo de multiplicação (O'RIORDAIN, 1994). A glutamina tem comprovada ação antimicrobiana, favorecendo a eliminação das bactérias (ZIEGLER, 1992). A dieta enteral enriquecida com glutamina favorece a remoção bacteriana em peritonites bacterianas protraídas (FURUKAWA, 1997) e favorece a síntese protéica tissular em ratos tratados com corticóides (BOZA, 2001). Estimula a produção de glutatona em linfócitos CD4 e CD8, além de ser importante na produção desses linfócitos, de plaquetas e macrófagos, prevenindo a sua queda após a ocorrência de cirurgia vascular de grande porte (GREIG, 1996). Contribui também para a manutenção de estado redox intracelular apropriado (CHANG, 1999). Sua administração, por via oral eleva em até 50% a produção intestinal de glutatona (CAO, 1998). A glutamina preservou os níveis de glutatona em intestinos de ratos submetidos a isquemia/reperfusão, o que diminui a peroxidação dos lipídios das membranas celulares (HARWARD, 1994).

Através da glutatona, a glutamina exerce efeito inibidor já verificado sobre a replicação do vírus responsável pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida -AIDS (KALEBIC, 1991). Em pacientes criticamente enfermos, sob estresse oxidativo, ocorre marcada redução da glutatona nos músculos esqueléticos o que resultará na incapacidade muscular de defender-se eficientemente dos radicais livres (HAMMARQVIST, 1997). As reservas de glutamina do músculo esquelético exercem importante papel na homeostase atuando como estoque lábil de nitrogênio que será mobilizado nessas situações de estresse (JEPSON, 1988). A dieta rica em glutamina reduz os efeitos da imuno-supressão induzida, melhorando o estado imune de ratos tratados com metotrexate (LIN, 1999). Ficou demonstrada a capacidade da alimentação enteral precoce em prevenir o hipermetabolismo e o catabolismo que ocorrem nos grandes queimados (MOCHIZUKI, 1984), sendo a glutamina a única a reverter os efeitos nocivos dos mediadores da sepse no metabolismo hepático de ratos neonatos, revertendo a inibição do consumo de oxigênio exercida pelo peróxido de hidrogênio. A glutamina agiria favorecendo a produção de glutatona (BABU, 2001).

A glutamina, e não a glicose, parece ser o principal nutriente das células do trato intestinal superior (FLEMING, 1997; McCAULEY, 1999) e preserva os níveis de glutatona intestinal durante o processo de isquemia/reperfusão (HARWARD, 1994). O intestino e as

células do sistema imune apresentam-se como as maiores consumidoras de glutamina (CURTHOYS, 1995). Há fortes indícios de que a administração terapêutica de glutamina facilita a recuperação do intestino delgado lesionado por incentivar a proliferação de enterócitos em processo mediado pela ornitina descarboxilase (ODC) (KANDIL, 1995), a glutamina atuando como fator trófico no íleo e nos cólons proximal e distal (SCHEPPACH, 1994). A glutamina associada ao hormônio do crescimento promove o aumento da celularidade do intestino delgado remanescente, em pacientes com síndrome do intestino curto, compensando a perda anatômica e melhorando a absorção de nutrientes (BYRNE, 1995). O acréscimo de glutamina a 2% nas soluções de perfusão UW protegeu segmentos de intestinos destinados a transplante das lesões decorrentes da isquemia fria e melhorou a função da mucosa entérica (SASAKI, 1997).

Estudos demonstraram que a glutamina protege o trato digestivo da ação lesiva de quimioterápicos (JACOBS, 1987; FOX, 1988), acelera o processo cicatricial de úlceras gástricas crônicas provocadas pela ingestão de ácido acetilsalicílico (OKABE, 1976), defende o intestino delgado da ação nociva da radiação (KLIMBERG, 1990) e oferece proteção contra a inflamação que acomete as bolsas ileais após a realização de anastomose íleo-anal (WISCHMEYER, 1993).

A glutamina mostrou-se eficaz em elevar as taxas de IgA, quando anexada à dieta de ratos (ALVERDY, 1990). Por outro lado, a administração de glutaminase em ratos, em quantidade capaz de reduzir significativamente os níveis sanguíneos de glutamina, produziu atrofia da mucosa entérica (McCAULEY, 1999) além de grave imunodepressão seguida de enterocolite necrotizante (BASKERVILLE, 1980).

Quando sob estresse ou em condições alimentares inadequadas, os intestinos passam a consumir a glutamina muscular em vez de glicose, para a produção de energia (RENNIE, 1986). A glutamina exerce marcante efeito cicatricial e antiinflamatório ao nível do trato gastrointestinal (WISCHMEYER, 1997), mantendo a integridade da mucosa entérica, evitando erosão e ulceração e exercendo marcada ação anti-translocação (HULST, 1993). Quando acrescentada a soluções de nutrição parenteral, evita a atrofia da mucosa entérica que usualmente acompanha essa forma de terapia (O'DWYER, 1989), fato também comprovado por Tremel (1994) e por Haque (1996).

A nutrição parenteral total complementada com glutamina preserva os estoques de glutamina hepática melhorando a sobrevivência de pacientes que receberam quimioterapia e de ratos após doses letais de paracetamol (HONG, 1992).

A atrofia pancreática acompanhada de degeneração gordurosa do fígado, que acomete pacientes submetidos à dieta elementar prolongada, é evitada pelo emprego de glutamina (HELTON, 1990).

A glutamina promove recuperação funcional e metabólica do coração de porcos submetidos a cardioplegia com cristalóides frios (KIMOSE, 1996). Há indicação de que o ácido glutâmico pode proteger o miocárdio isquêmico, ativando a rota anaeróbica de produção de ATP (BITTL, 1983), confirmando o que já fora observado em corações de ratos submetidos a isquemia e previamente tratados com soluções de aminoácidos que não continham glutamina (BOLLING, 1992). Por outro lado, observou-se a redução dos níveis de glutamina e diminuição na atividade do *shuttle* malato-aspartato, em miocárdios de ratos submetidos a hipóxia e sem oferta prévia de glutamina (RUMSEY, 1999). A infusão prévia de glutamina preveniu a queda do débito cardíaco e as alterações da reperfusão em casos de isquemia miocárdica provocada demonstrando ser um agente cardioprotetor e de recuperação miocárdica (KHOGALI, 1998). A glutamina favorece o acúmulo de glicogênio muscular, após exercícios físicos, provavelmente cedendo átomos de carbono para a formação do glicogênio (VARNIER, 1995).

As intervenções cirúrgicas de grande porte causam depleção importante na glutamina muscular e sua administração reverte o balanço nitrogenado negativo. A glutamina muscular funcionaria como reservatório que desempenha papel importante na homeostase, agindo como depósito lábil de nitrogênio (STEHLE, 1989). A glutamina apresenta efeito protetor para membros posteriores de ratos submetidos a isquemia/reperfusão talvez por bloquear o recrutamento de leucócitos, ao longo do tempo de reperfusão (PREM, 1999). Durante acidose metabólica há aumento na captação de glutamina pelo rim com formação de íons NH_4 e de bicarbonato, o que facilita a neutralização de radicais ácidos (CURTHOYS, 2001; STUMVOLL, 1999; GREKIN, 1986).

Cerca de 5% a 25% da glicose gerada na gliconeogênese do estado pós abortivo são sintetizados no rim a partir da glutamina e do lactato (CONJARD, 2001) com estimulação pelo glucagon e epinefrina (GERICH, 2000). A glutamina favoreceu a hidratação celular por sua ação protetora sobre a membrana, exercendo efeito anabólico (HÄUSSINGER, 1993). A

glutamina potencializa a ação citotóxica do TNF α induzindo à morte celular quando em condições de depleção da glutathione mitocondrial. Esses achados mostram que glutamina e TNF α causam alterações no estado redox da glutathione, ao nível da mitocôndria tumoral, ativando o mecanismo apoptótico de morte celular (OBRADOR, 2001). Em pacientes portadores de tumores malignos, o aumento da liberação de glutamina muscular em conjunção com um não-aumento do consumo renal, sugere sua captação por outros órgãos, provavelmente o tumor ou o fígado (CHEN, 1993).

Por ser sintetizada, “*de novo*”, no organismo a glutamina é rotulada como aminoácido não essencial. Todavia tem ocorrido mudança nesse ponto de vista no sentido de considerá-la aminoácido condicionalmente essencial, em situações de estresse e no paciente grave (LACEY, 1990).

Além da sua formação endógena, a glutamina chega ao organismo através de alimentos ricos em glúten (por exemplo, o trigo), observando-se concentração pósprandial bastante elevada (HALPERN, 1997). O glúten contém duas frações protéicas básicas: gliadina e glutenina. A glutamina é parte constituinte da fração gliadina. Quando em estado puro, a glutamina mostra-se bastante insolúvel (36g/l) e instável, não resistindo à esterilização pelo calor nem ao armazenamento prolongado. No entanto, quando associada a L-alanina resulta um dipeptídeo, a L-alanil-glutamina, que supera amplamente aqueles inconvenientes: a solubilidade atinge 368g/l, ocorre a resistência à esterilização pelo calor e passa a haver tolerância à estocagem prolongada.

Uma vez introduzida no organismo a L-alanil-glutamina sofre hidrólise, com imediata liberação de glutamina e de alanina.

Não tem sido demonstrada toxicidade associada à glutamina enquanto suplemento de nutrição parenteral, nem foram identificados metabólitos tóxicos decorrentes de seu uso. Nenhum efeito adverso foi observado após o seu emprego oral ou endovenoso (*bolus*) (ZIEGLER, 1996).

Por sua ubiquidade e multiplicidade de funções metabólicas a glutamina tornou-se o objeto de inúmeras pesquisas constituindo o fulcro dessa dissertação.

No presente estudo a L-alanil-glutamina a 20% (Dipeptiven – Laboratório Fresenius Kabi) foi o dipeptídeo escolhido como fonte de glutamina.

Por todo o exposto, são bem acolhidos os estudos que contemplam o melhor entendimento dos mecanismos da lesão isquêmica e de reperfusão e que buscam por

substâncias capazes de tornar os rins incólumes ou menos vulneráveis aos efeitos da isquemia e da reperfusão.

Várias substâncias têm sido testadas no sentido de inibir a invasão da área de isquemia/reperfusão por neutrófilos que são a principal fonte de radicais ativos de oxigênio (BROTTIER, 1990; TSIMOYIANNIS, 1993; WILLIAMS, 1993; ASTARIE-DEQUEKER, 1994; SAVAS, 1997; TETIK, 1999).

A glicólise é a sequência de reações que transforma uma molécula de glicose (6 carbonos) em duas moléculas de piruvato (3 carbonos) com a concomitante formação de ATP. Para cada molécula de glicose degradada são consumidas duas moléculas de ATP e são formadas quatro moléculas de ATP com um saldo energético positivo de duas moléculas de ATP.

Em condições aeróbicas o piruvato resultante da glicólise liberará, por oxidação, dióxido de carbono. Os dois átomos de carbono restantes formarão a molécula de acetato que se acoplará ao CoA originando o acetil-CoA que entrará no ciclo de Krebs onde será oxidado até dióxido de carbono e água. Em situação anaeróbica o piruvato não pode ser oxidado por falta de oxigênio e nesta condição será reduzido a lactato.

O NADH participa de etapas da glicólise aeróbica ocasião em que cede elétrons para o oxigênio convertendo-se em NAD, no processo da respiração mitocondrial.

Na condição anaeróbica não haverá a conversão do NADH em NAD por oxidação. Nestas circunstâncias o NADH não cederá elétrons para o oxigênio mas para o piruvato que será reduzido a lactato. O ácido láctico difunde-se através da membrana celular e, depois de transportado ao fígado pela circulação, poderá ser fonte de carbono para a ressíntese de glicose.

O circuito malato-aspartato possibilita a passagem de íons H para o interior da matriz mitocondrial com a finalidade de regenerar NADH mitocondrial que será utilizado na cadeia respiratória.

A oferta exógena de glutamato, tal como propomos neste trabalho, estimularia a lançadeira malato-aspartato favorecendo a conversão de NADH citossólico em NAD pela cessão de íons H ao NAD matricial, convertendo-o em NADH e assegurando a continuidade da cadeia respiratória.

Durante a isquemia de rins previamente tratados com L-alanil-glutamina observou-se aumento significativo dos níveis de lactato o que seria indicativo de manutenção e de estímulo da via glicolítica anaeróbica, de que o rim é rico.

A oferta exógena de glutamina como pré-tratamento de rins que serão submetidos a isquemia seria valioso coadjuvante na preservação desses órgãos, durante o processo isquêmico.

A opção pela glutamina como agente inibidor das lesões resultantes da isquemia/reperfusão fundamenta-se na suposição de que a oferta de glutamina favorecerá a ativação do circuito carreador malato-aspartato, mantendo-se a produção NADH intramitocondrial e a continuidade da cadeia respiratória.

Por abordar tão oportuno tema, justifica-se a contribuição deste trabalho em que é proposto o estudo, *in vivo*, das concentrações de metabólitos sanguíneos e tissulares (rins) de ratos submetidos à isquemia e à reperfusão em condições normotérmicas e durante a oferta de L-alanil-glutamina. É objetivo deste estudo verificar a eficácia da L-alanil-glutamina para tornar os rins resistentes aos efeitos nocivos da hipóxia produzida pela isquemia e das lesões resultantes da reperfusão.

7 CONCLUSÕES

Si fallor, sum.

Santo Agostinho

1. L-alanil-glutamina endovenosa não modifica a concentração tissular e sanguínea de glicose e piruvato de ratos Wistar submetidos a isquemia/reperfusão do rim direito.
2. L-alanil-glutamina endovenosa aumentou a concentração de lactato no sangue, nos rins isquêmico e não isquêmico e diminuiu a concentração de corpos cetônicos no rim isquêmico.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERCROMBIE, A ; HICKMAN, C. J. ; JOHNSON, M. L. **A dictionary of biology**. London: Penguin Books, 1961.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da biologia celular**. Porto Alegre: Artmed, 1999.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. New York: Garland, 2002.

ALFACE, J. L. S. Metabolismo dos aminoácidos. In: HALPERN, M. J. (Coord.) **Bioquímica**. Lisboa: Lidel, 1997.

ALVERDY, J. C. Effects of glutamine-supplement diets on immunology of the gut. **J. Parent. Enter. Nutr.**, v. 14, p. 1095-1135, 1990.

AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R. **Biologia das células**. São Paulo: Moderna, 2002.

ARISTÓTELES. **Les parties des animaux**. Paris: Societé d'Édition Les Belles Lettres, 1956. p. 90.

ASTARIE-DEQUEKER, C.; JOULIN, Y.; DEVYNCK, M-A. Inhibitory effect of trimetazidine on thrombin-induced aggregation and calcium entry into human platelets. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 23, n. 3, p. 401-407, 1994.

BABU, R.; EATON, S.; DRAKE, D. P.; SPITZ, L.; PIERRO, A. Glutamine and glutathione counteract the inhibitory effects of mediators of sepsis in neonatal hepatocytes. **J. Pediatr. Surg.**, v. 36, n. 2, p. 282-286, 2001.

BASKERVILLE, A.; HAMBLETON, P.; BEMBOUGH, J. E. Pathological features of glutaminase toxicity. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 61, p. 132-138, 1980.

BAYNES, J.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica médica**. São Paulo: Manole, 2000.

BERGSTRÖM, J.; FÜRST, P.; NOREE, L.-O.; VINNARS, E. Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. **J. Appl. Physiol.**, v. 36, n. 6, p. 693-697, 1974.

BERNARD, C. **Introdução à medicina experimental**. Lisboa: Editora Guimarães, 1959.

BERNARD, C. apud CANNON, W. B. **A sabedoria do corpo**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1946.

BICHAT, M. F. X. **Recherches physiologiques sur la vie et la mort**. Paris: Edicion Marabou, 1989.

BITTL, J. A.; SHINE, K. I. Protection of ischemic rabbit myocardium by glutamic acid. **Am. J. Physiol.**, v. 245, n. 3, p. H406-H412, 1983.

BODENHEIMER, F. S. **The history of biology: an introduction**. London: W. Dawson, 1948.

BOLLING, S. F.; CHILDS, K. F.; NING, X.- H. Amino acid substrate preloading and postischemic myocardial recovery. **J. Surg. Res.**, v. 53, n. 4, p. 342-348, 1992.

BOLSANELLO, A. **Dicionário brasileiro de termos biológicos**. Curitiba: Educacional Brasileira, 1991.

BOUCHUT, E. **La vie et ses attributs**. Paris: Baillière et Fils, 1862.

BOWMAN, W. apud CUSHNY, A. R. **The secretion of the urine**. 2nd. ed. London: Longmans Green, 1926.

BOZA, J. J.; TURINI, M.; MOËNNOZ, D.; MONTIGON, F.; VUICHOUD, J. GUEISSAZ, N.; GREMAUD, G.; POUTEAU, E.; PIGUET-WELSCH, C.; FINOT, P. A.; BALLÈVRE, O. Effect of glutamine supplementation of the diet on tissue protein synthesis rate of glucocorticoid-treated rats. **Nutrition**, v. 17, p. 35-40, 2001.

BRADFORD, H. F.; WARD, H. K.; THOMAS, A. J. Glutamine – a major substrate for nerve endings. **J. Neurochem.**, v. 30, p. 1453-1459, 1978.

BROTTIER, L.; BARAT, J. L.; COMBE, C.; BOUSSENS, B.; BONNET, J.; BRICAUD, H. Therapeutic value of a cardioprotective agent in patients with severe ischaemic cardiomyopathy. **Eur. Heart J.**, v. 11, p. 207-212, 1990.

BYRNE, T. A.; PERSINGER, R. L.; YOUNG, L. S.; ZIEGLER, T. R.; WILMORE, D. W. A new treatment for patients with short-bowel syndrome. Growth hormone, glutamine and a modified diet. **Ann. Surg.**, v. 222, n. 3, p. 243-254, 1995.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2001.

CANNON, W. B. **A sabedoria do corpo**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1946.

CAO, Y.; FENG, Z.; HOOS, A.; KLIMBERG, V. S. Glutamine enhances gut glutathione production. **J. Parenter. Enter. Nutr.**, v. 22, n. 4, p. 224-227, 1998.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, 1996.

CHANG, W. K.; YANG, K. D.; SHAIQ, M. F. Lymphocyte proliferation modulated by glutamine: involved in the endogenous redox reaction. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 117, p. 482-488, 1999.

CHEN, M. K.; ESPAT, N. J.; BLAND, K. I.; COPELAND, E. M.; SOUBA, W. W. Influence of progressive tumor growth on glutamine metabolism in skeletal muscle and kidney. **Ann. Surg.**, v. 217, n. 6, p. 655-667, 1993.

CHIU, C-J.; McARDLE, 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.

CICALESE, L.; CARACENI, P.; NALESNIK, M. A.; BORLE, A. B.; SCHRAUT, W. H. Oxygen free radical content and neutrophil infiltration are important determinants in mucosal injury after rat small bowel transplantation. **Transplantation**, v. 62, n. 2, p. 161-166, 1996.

COLQUHOUN, A.; NEWSHOLME, E. A. Aspects of glutamine metabolism in human tumour cells. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 41, n. 3, p.583-596, 1997.

CONJARD, A.; MARTIN, M.; GUITTON, J.; BAVEREL, G.; FERRIER, B. Gluconeogenesis from glutamine and lactate in the isolated human renal proximal tubule: longitudinal heterogeneity and lack of response to adrenaline. **Biochem. J.**, v. 360, p. 371-377, 2001.

CONN, E.; STUMPF, P. K. S. **Introdução à bioquímica**. São Paulo: Blücher, 1998.

COSTA, E. Termodinâmica dos sistemas biológicos. In: HALPERN, M. J. (Coord.) **Bioquímica**. Lisboa: Lidel, 1997.

COTRAN, R.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. **Robbins Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

CURTHOYS, N. P. Role of mitochondrial glutaminase in rat renal glutamine metabolism. **J. Nutr.**, v. 131, p. S2491-S2495, 2001.

CURTHOYS, N. P.; WATFORD, M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 15, p. 133-159, 1995.

CUSHNY, A. R. **The secretion of the urine**. 2. ed. London: Longmans Green, 1926.

DAMASIO, A. **O mistério da consciência**. São Paulo: Companhia das Letras, 2002.

DAVIES, A.; BLAKELY, A. G. H.; KIDD, C. **Fisiologia humana**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

DAWES, B. **A hundred years of biology**. London: Duckworth, 1952.

DE DUVE, C. **Poeira vital**. Rio de Janeiro: Campus, 1997.

DE MASI, D.; PEPE, D. **As palavras no tempo**. Rio de Janeiro: José Olympio, 2003.

DE ROBERTIS, E. D. P.; DE ROBERTIS JR., E. M. F. **Bases da biologia molecular e celular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993.

DESCARTES, R. **Discurso do método**. Brasília: Editora Universidade de Brasília; São Paulo: Atica, 1989.

DESHMUKH, D. R.; MIROCHNITCHENKO, O.; GHOLE, V. S.; AGNESE, D.; SHAH, P. C.; REDDELL, M.; BROLIN, R. E.; INOUE, M. Intestinal ischemia and reperfusion injury in transgenic mice overexpressing copper-zinc superoxide dismutase. **Am. J. Physiol.**, v. 273, n. 42, p. C1130-C1135, 1997.

DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: Blücher, 2000.

EAGLE, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. **Science**, v. 122, n. 3168, p. 501-504, 1955.

EAGLE, H.; OYAMA, V. I.; LEVY, M.; HORTON, C. L.; FLEISCHMAN, R. The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. **J. Biol. Chem.**, v. 218, p.607-617, 1955.

EL-HANI, C. N.; VIDEIRA, A. A. **O que é vida? Para entender a biologia do séc. XXI**. Rio de Janeiro: Relume Dumará, 2001.

ENGELS, F. **Dialética da natureza**.

ENTRALGO, P. L. *et alii*. **História universal da medicina**. Barcelona: Salvat, 1975.

FELTRE, R. **Química orgânica**. São Paulo: Moderna, 1998.

FLEMING, S. E.; ZAMBELL, K. L.; FITCH, M. D. Glucose and glutamine provide similar proportions of energy to mucosal cells of rat small intestine. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. G968-G978, 1997.

FOX, A. D.; KRIPKE, S. A.; DE PAULA, J.; BERMAN, J. M.; SETTLE, R. G.; ROMBEAU, J. L. Effects of glutamine-supplemented enteral diet on methotrexate-induced enterocolitis. **J. Parenter. Enter. Nutr.**, v. 12, n. 4, p. 325-331, 1988.

FRANKLIN, K. J. **A short history of physiology**. London: Staples, 1949.

FÜRST, P. Intracellular free aminoacids; their measurement and function. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 42, p. 451-462, 1983.

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

FURUKAWA, S.; SAITO, H.; INABA, T.; LIN, M.-T.; INOUE, T.; NAKA, S.; FUKATSU, K.; HASHIGUCHI, Y.; HAN, I; MATSUDA, T.; IKEDA, S.; MUTO, T. Glutamine-enriched enteral diet enhances bacterial clearance in protracted bacterial peritonitis regardless glutamine form. **J. Parenter. Enter. Nutr.**, v. 21, n. 4, p. 208-214, 1997.

GERICH, J. E.; MEYER, C.; STUMVOLL, M. W. Hormonal control of renal and systemic glutamine metabolism. **J. Nutr.**, v. 130, p. 995S-1001S, 2000.

GREIG, J. E.; KEAST, D.; GARCIA-WEBB, P.; CRAWFORD, P. Inter-relationships between glutamine and other biochemical and immunological changes after major vascular surgery. **Br. J. Biomed. Sci.**, v. 53, p. 116-121, 1996.

GREKAS, D.; DIOUDIS, C.; PAPAGEORGIOU, G.; ILIADIS, S.; ZILIDIS, C.; ALIVANIS, P.; DIMITRIADOU, A.; TOURKANTONIS, A. Lipid peroxidation after acute renal ischemia and reperfusion in rats: the effect of trimetazidine. **Renal Failure**, v. 18, n. 4, p. 545-552, 1996.

GREKIN, R. J. Cetoacidosis, hiperosmolar state and lactic acidosis. In: KOKKO, J. R.; TANNEN, R. L. **Fluids and electrolytes**. Philadelphia: Saunders, 1986.

GRISHAM, M. B.; HERNANDEZ, L. A.; GRANGER, D. N. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. **Am. J. Physiol.**, v. 251, n. 14, p. G567-G574, 1986.

HALLEMESCH, M. M.; COBBEN, D. C. P.; DEJONG, C. H. C.; SOETERS, P. B.; DEUTZ, N. E. P. Renal amino acid metabolism during endotoxemia in the rat. **J. Surg. Res.**, v. 92, n. 2, p. 193-200, 2000.

HALPERN, M. J. (Coord.) **Bioquímica**. Lisboa: Lidel, 1997.

HAMMARQVIST, F.; LUO, J.-L.; COTGREAVE, I. A.; ANDERSSON, K.; WERNERMAN, J. Skeletal muscle glutathione is depleted in critically ill patients. **Crit. Care Med.**, v. 25, n. 1, p. 78-84, 1997.

HAQUE, S. M. M.; CHEN, K.; USUI, N.; IIBOSHI, Y.; OKUYAMA, H.; MASUNARI, A.; CUI, L.; NEZU, R.; TAKAGI, Y.; OKADA, A. Alanil-glutamine dipeptide supplemented parenteral nutrition improves intestinal metabolism and prevents increased permeability in rats. **Ann. Surg.**, v. 223, n. 3, p. 334-341, 1996.

HARWARD, T. R. S.; COE, D.; SOUBA, W. W.; KLINGMAN, N.; SEEGER, J. M. Glutamine preserves gut glutathione levels during intestinal ischemia/reperfusion. **J. Surg. Res.**, v. 56, n. 4, p. 351-355, 1994.

HÄUSSINGER, D.; ROTH, E.; LANG, F.; GEROK, W. Cellular hydration state: an important determinant of protein catabolism in health and disease. **Lancet**, v. 341, p. 1330-1332, 22 May 1993.

HELTON, W. S.; SMITH, R. J.; ROUNDS, J.; WILMORE, D. W. Glutamine prevents pancreatic atrophy and fatty liver during elemental feeding. **J. Surg. Res.**, v. 48, p. 297-303, 1990.

HEMS, D. A.; BROSNAN, J. T. Effects of ischaemia on content of metabolites in rat liver and kidney *in vivo*. **Biochem. J.**, v. 120, p. 105-111, 1970.

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

HUGHES, A. **A history of cytology**. Ames: Iowa State University Press, 1989.

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

JACOB, F. **A lógica da vida**. Rio de Janeiro: Graal, 1983.

JACOBS, D. O.; EVANS, D. A.; O'DWYER, S. T.; SMITH, R. J.; WILMORE, D. W. Disparate effects of 5-fluorouracil on the ileum and colon of enterally fed rats with protection by dietary glutamine. **Surg. Forum**, v. 38, p. 45-47, 1987.

JEPSON, M. M.; BATES, P. C.; BROADBENT, P.; PELL, J. M.; MILLWARD, D. J. Relationship between glutamine concentration and protein synthesis in rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 255, n. 18, p. E166-E172, 1988.

JIAN, Z. M.; CAO, J. D.; ZHU, X. G.; ZHAO, W. X.; YU, J. C. ; MA, E. L.; WANG, X. R.; ZHU, M. W.; SHU, H.; LIU, Y. W. The impact of alanyl-glutamine on clinical safety, nitrogen balance, intestinal permeability and clinical outcome in postoperative patients: a randomized, double-blind, controlled study of 120 patients. **J. Parenter. Enter. Nutr.** v. 23, n. 5 Suppl. P. S62-S66, 1999.

JUDSON, H. F. **The eighth day of creation**. New York: Simon and Shuster, 1979.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia molecular e celular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

KALEBIC, T.; KINTER, A.; POLI, G.; ANDERSON, M. E.; MEISTER, A. Suppression of human immunodeficiency virus expression in chronically infected monocytic cells by glutathione, glutathione ester and N-acetylcysteine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 986-990, 1991.

KANDIL, H. M.; ARGENZIO, R. A.; CHEN, W.; BERSCHNEIDER, H. M.; STILES, A. D.; WESTWICK, J. K.; RIPPE, R. A.; BRENNER, D. A.; RHOADS, J. M. Glutamine and L-asparagine stimulate ODC activity and proliferation in a porcine jejunal enterocyte line. **Am. J. Physiol.**, v.269, n. 32, p. G591-G599, 1995.

KEILIN, D. **The history of cell respiration and cytochrome**. Cambridge: Cambridge University Press, 1966.

KHOGALI, S. E. O.; HARPER, A. A.; LYALL, J. A.; RENNIE, M. J. Effects of L-glutamine on post-ischaemic cardiac function: protection and rescue. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 30, p. 819-827, 1998.

KIMOSE, H.-H.; HELLIGSO, P.; RANDSBAECK, F.; KIM, Y.; BOTKER, H. E.; HASEN, S. B.; THOMASSEN, A. R.; NIELSEN, T. T. Improved recovery after cold crystalloid cardioplegia using low-dose glutamate enrichment during reperfusion after aortic unclamping; a study in isolated blood-perfused pig hearts. **Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 44, p. 118-125, 1996.

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

KOVACEVIC, Z.; MCGIVAN, J. D. Mitochondrial metabolism of glutamine and glutamate and its physiological significance. **Physiol. Rev.**, v. 63, n. 2, p. 547-605, 1983.

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

KUBES, P.; ARFORS, K. E.; GRANGER, D. N. Platelet-activating factor- induced mucosal dysfunction: role of oxidants and granulocytes. **Am. J. Physiol.** v. 260, n. 23 p. G965-G971, 1991.

KUBES, P.; HUNTER, J.; GRANGER, D. N. Ischemia/reperfusion-induced feline intestinal dysfunction: importance of granulocyte recruitment. **Gastroenterology**, v. 103, p. 807-812, 1992.

KUHN, K. S.; SCHUHMANN, K.; STEHLE, P.; DARMAUN, D.; FÜRST, P. Determination of glutamine in muscle protein facilitates accurate assessment of proteolysis and *de novo* synthesis-derived endogenous glutamine production. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 70, p. 484-489, 1999.

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

LEE, H. S. J. **The medical millenium**. New York: Parthenon, 2000.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2000.

LIN, C.-M.; ABCOUWER, S. F.; SOUBA, W. W. Effect of dietary glutamate on chemotherapy-induced immunosuppression. **Nutrition**, v. 15, n. 9, p. 687-696, 1999.

LIPMANN, F. apud CANTAROW, A.; SCHEPARTZ, A. **Biochemistry**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1954.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. **Biologia molecular e celular**. Rio de Janeiro: Revinter, 2002.

LUCRECIO, T. C. **Da natureza**. Rio de Janeiro: Globo, 1962.

- MARGULIS, L.; SAGAN, D. **O que é vida?** Rio de Janeiro: Zahar, 2002.
- MARTINS E SILVA, J. A.; GEADA, H. M.; FREIRE, A. M. **Introdução à bioquímica médica.** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1979.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B. A. **Bioquímica básica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- MATURANA, H. R.; VARELA, F. J. **A árvore do conhecimento.** São Paulo: Palas Athena, 2002.
- MAYES, P. A. Oxidações biológicas. In: MURRAY, R. K. *et alii*. **Harper: Bioquímica.** 8. ed. São Paulo: Ateneu, 1998.
- MAYNARD-SMITH, J. **Os problemas da biologia.** Lisboa: Gradiva, 1994.
- MCCAULEY, R.; KONG, S.-E.; HEEL, K.; HALL, J. C. The role of glutaminase in the small intestine. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 31, p.405-413, 1999.
- MERTON, T. A via de Chuang Tzu. Petrópolis: Vozes, 1957.
- MOCHIZUKI, H.; TROCKI, O.; DOMINIONI, L.; BRACKETT, K. A.; JOFFE, S. N.; ALEXANDER, J. W. Mechanism of prevention of postburn hypermetabolism and catabolism by early enteral feeding. **Ann. Surg.**, v. 200, n. 3, p. 297-309, 1984.
- MOROWITZ, H. J. apud MARGULIS, L.; SAGAN, D. **O que é vida?** Rio de Janeiro: Jorge Zahar, 2002.
- MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper: Bioquímica.** São Paulo: Ateneu, 1998.
- MUSTAFA, N. A.; YANDI, M.; ALBAYRAK, L.; YILDIZ, K. Effect of pentoxifylline on the ischemia-reperfusion injury of the intestine. **Int. Surg.**, v. 80, p. 152-155, 1995.
- NEWSHOLME, E. A.; LEECH, A. R. **Biochemistry for medical sciences.** Chichester: John Wiley, 1983.
- NILSSON, U. A.; SCHOENBERG, M. H.; ANEMAN, A.; POCH, B.; MAGADUM, S.; BEGER, H. G.; LUNDGREN, O. Free radicals and pathogenesis during ischemia and reperfusion of the cat small intestine. **Gastroenterology**, v. 106, p. 629-636, 1994.
- NORDENSKIÖLD, E. **The history of biology.** New York: Tudor, 1946.
- OBRADOR, E.; CARRETERO, J.; ESTEVE, J. M.; PELLICER, J. A.; PASCUAL, A.; PETSCHEN, I.; ESTRELA, J. M. Glutamine potentiates TNF- α -induced tumor cytotoxicity. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 31, n. 5, p. 642-650, 2001.

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

OKABE, S.; TAKEUCHI, K.; HONDA, K.; TAKAGI, K. Effects of acetylsalicylic acid (ASA) and ASA plus L-Glutamine on healing of chronic gastric ulcer in the rat. **Digestion**, v. 14, p. 85-88, 1976.

OPARIN, A. I. **A origem da vida**. Rio de Janeiro: Editorial Vitória, 1956.

OPARIN, A. I. **The origin of life on earth**. New York: Academic Press, 1957.

OPARIN, A. I.; FESSENKOV, V. P. **A vida no universo**. São Paulo: Fulgor, 1962.

O'RIORDAIN, M. G.; FEARON, K. C. H.; ROSS, J. A.; ROGERS, P.; FALCONER, J. S.; BARTOLO, D. C. C.; GARDEN, O. J.; CARTER, D. C. Glutamine-supplemented total parenteral nutrition enhances T-Lymphocyte response in surgical patients undergoing colorectal resection. **Ann. Surg.**, v. 220, n. 2, p. 212-221, 1994.

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

PARKS, D. A.; BULKLEY, G. B.; GRANGER, D. N.; HAMILTON, S. R.; McCORD, J. M. Ischemic injury in the cat small intestine: role of superoxide radicals. **Gastroenterology**, v. 82, p. 9-15, 1982.

PEÑA, A. **Las membranas de las células**. México: Fondo de Cultura Económica, 1991.

PEPPER, O. H. P. **Medical etymology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1949.

PITTS, R. F. **Physiology of the kidney and body fluids**. Chicago: Year Book Medical, 1966.

PREM, J. T.; EPPINGER, 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, p. 147-150, 1999.

PRIGOGINE, I. **Do ser ao devir**. São Paulo: FEU, 2002.

RAMIZ-GALVÃO, B. F. **Vocabulário etimológico, ortográfico e prosódico da palavras portuguesas derivadas da língua grega**. Rio de Janeiro: Francisco Alves, 1909.

RAW, I.; MENNUCCI, L.; KRASILCHIK, M. **A biologia e o homem**. São Paulo: EDUSP, 2001.

RENNIE, M. J.; MACLENNAN, P. A.; HUNDAL, H. S.; WERYK, B.; SMITH, K.; TAYLOR, P. M.; EGAN, C.; WATT, P. W. Skeletal muscle glutamine transport, intramuscular glutamine concentration and muscle protein turnover. **Metabolism**, v. 38, n. 8 suppl. 1, p. 47-51, 1989.

- REY, A. **Dictionnaire historique de la langue française**. Paris: Le Robert, 1992.
- RITTHAUSEN, H. apud FÜRST, P.; STEHLE, P. **Nutrição parenteral: Dipeptiven (alanil-glutamina a 20% IV)**. [s.l.]: Fresenius-Kabi, [s.d.]. Monografia científica.
- RODWELL, V. W. Biosíntese de aminoácidos nutricionalmente não essenciais. In: MURRAY, R. K. *et alii*. **Harper: Bioquímica**. 8. ed. São Paulo: Ateneu, 1998.
- ROMER, A. S. **The vertebrate body**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1951.
- ROSKOSKI JR., R. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
- RUMSEY, W. L.; ABBOTT, B.; BERTELSEN, D.; MALLAMACI, M.; HAGAN, K.; NELSON, D.; ERECINSKA, M. Adaptation to hypoxia alters energy metabolism in rat heart. **Am. J. Physiol.**, v. 276, p. H71-H80, 1999.
- SASAKI, K.; PARK, J. O.; BAIN, A.; REILLY, K. J.; ADAMSON, W. T.; KOIDE, S.; ZHANG, W.; ROMBEAU, J. L. Glutamine protects function and improves preservation of small bowel segments. **J. Surg. Res.**, v. 73, n. 1, p. 90-94, 1997.
- SAVAS, C.; ARAS, T.; ÇAKMAK, M.; BILGEHAN, A.; ATAOGU, O.; TURKOZKAN, N.; OZGUNER, F.; YUCESAN, S.; DINDAR, H. Pentoxifylline inhibits overflow and reduces intestinal reperfusion injury. **J. Ped. Surg.**, v. 32, n. 6, p. 905-910, 1997.
- SCHEPPACH, W.; LOGES, C.; BARTRAM, P.; CHRISTL, S. U.; RICHTER, F.; DUSEL, G.; STEHLE, P.; FUERST, P.; KASPER, H. Effect of free glutamine and alanyl-glutamine dipeptide on mucosal proliferation of human ileum and colon. **Gastroenterology**, v. 107, n. 2, p. 429-434, 1994.
- SCHLEIDEN, M. J. apud NORDENSKIÖLD, E. **The history of biology**. New York: Tudor, 1928.
- SCHOPF, J. W. apud VOET, T. D.; VOET, J. G.; PRATT, CH. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2000.
- SCHRÖDINGER, E. **What is life?** Garden City: Doubleday, 1956.
- SCHULTZE, E.; BOSSHARD, E. apud FÜRST, P.; STEHLE, P. **Nutrição parenteral: Dipeptiven (alanil-glutamina a 20% IV)**. [s.l.]: Fresenius-Kabi, [s.d.]. Monografia científica.
- SCHWANN, T. apud NORDENSKIÖLD, E. **The history of biology**. New York: Tudor, 1928.
- SINGER, C. **A history of biology**. London: Abelard-Schuman, 1959.
- SINGER, C. **Uma breve história da anatomia e fisiologia desde os gregos até Harvey**. Campinas: Editora UNICAMP, 1996.

SKINNER, H. A. **The origin of medical terms.** Baltimore: Williams & Wilkins, 1961.

SMITH, H. W. **From fish to philosopher.** Summit: CIBA, 1959.

SOUBA, W. W.; KLIMBERG, V. S.; HAUTAMAKI, R. Oral glutamine reduces bacterial translocation after abdominal radiation. **J. Surg. Res.**, v. 48, p. 1-5, 1990.

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

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

STEIN, W. H.; MOORE, S. The free amino acids of human blood plasma. **J. Biol. Chem.**, v. 211, p. 915-926, 1954.

STRYER, L. **Bioquímica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

STUMVOLL, M. W. Role of glutamine in human carbohydrate metabolism in kidney and other tissues. **Kidney Int.**, v. 55, n. 3, p. 778-792, 1999.

TETIK, C.; OZDEN, A.; ÇALLI, N.; BILGIHAN, A.; BOSTANCI, B.; YIS, O.; BAYRAMOGLU, H. Cytoprotective effect of trimetazidine on 60 minutes of intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. **Transpl. Int.**, v. 12, p. 108-112, 1999.

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

TREMEL, H.; KIENLE, B.; WEILEMANN, L. S.; STEHLE, P.; FÜRST, P. Glutamine dipeptide-supplemented parenteral nutrition maintains intestinal function in the critically ill. **Gastroenterology**, v. 107, n. 6, p. 1595-1601, 1994.

TSIMOYIANNIS, E. C.; MOUTESIDOU, K. J.; MOSCHOS, C. M.; KARAYIANNI, M.; KARKABOUNAS, S.; KOTOULAS, O. B. Trimetazidine for prevention of hepatic injury induced by ischaemia and reperfusion in rats. **Eur. J. Surg.**, v. 159, p. 89-93, 1993.

VARNIER, M.; LEESE, G. P.; THOMPSON, J.; RENNIE, M. J. Stimulatory effect of glutamine on glycogen accumulation in human skeletal muscle. **Am. J. Physiol.** v. 269, n. 32, p. E309-E315, 1995.

VIRCHOW, R. **La pathologie cellulaire.** Paris: J. Baillière, 1868.

VOET, T. D.; VOET, J. G.; PRATT, CH. **Fundamentos de bioquímica.** Porto Alegre: Artmed, 2000.

VOLLMAR, B.; GLASZ, J.; MENGER, M. D.; MESSMER, K. Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. **Surgery**, v. 17, n. 2, p. 195-200, 1995.

WILLIAMS, F. M.; TANDA, K.; KUS, M.; WILLIAMS, T. J. Trimetazidine inhibits neutrophil accumulation after myocardial ischaemia and reperfusion in rabbits. **J Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 22, n. 6, p. 828-833, 1993.

WILLIAMSON, D. H.; MELLANBY, J.; KREBS, H. A. Enzymic determination of the D-Beta-hydroxybutiric acid and acetoacetic acid in blood. **Biochem. J.**, v. 82, p. 90-96, 1962.

WISCHMEYER, P. E.; MUSCH, M. W.; MADONNA, M. B.; THISTED, R.; CHANG, E. B. Glutamine protects intestinal epithelial cells: role of inducible HSP70. **Am. J. Physiol.**, v. 272, n. 35, p. G879-G884, 1997.

WISCHMEYER, P.; PEMBERTON, H. J.; PHILLIPS, S. F. Chronic pouchitis after ileal pouch-anal anastomoses: response to butyrate and glutamine suppositories in a pilot study. **Mayo Clin. Proc.**, v. 68, p. 978-981, 1993.

ZIEGLER, T. R. Glutamine supplementation in catabolic illness. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 64, p. 645-647, 1996.

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

ZIMMERMAN, B. J.; GRANGER, D. N. Reperfusion injury. **Surg. Clin. North Am.**, v. 72, n. 1, p. 65-83, 1992.

ZIMMERMAN, B. J.; GRISHAM, M. B.; GRANGER, D. N. Role of oxidants in ischemia/reperfusion-induced granulocyte infiltration. **Am. J. Physiol.**, v. 258, n. 21, p. G185-G190, 1990.

9 LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ala – alanina

L-ala-gln – L-alanil-glutamina

ADP – adenosina difosfatada

AMP – adenosina monofosfatada

ATP – adenosina trifosfatada

cAMP – adenosina monofosfatada cíclica

Co-A – co-enzima A

acetil Co-A – acetil co-enzima A

Co-Q – co-enzima Q (ubiquinona)

Q – ubiquinona

ΔG – energia livre de Gibbs

ΔH – entalpia

ΔS – entropia

DNA – ácido desoxiribonucleico

RNA – ácido ribonucleico

FAD – flavina dinucleotídeo

Fe^{2+} – íon ferroso

Fe^{3+} – íon férrico

FMN – flavina mononucleotídeo

GABA – ácido γ aminobutírico

GLc – glicose

Gln – glutamina

GSH – glutationa

GSSH – glutationa dissulfeto

Hb – hemoglobina

NAD – nicotinamida dinucleotídeo (forma oxidada)

NADH – nicotinamida dinucleotídeo (forma reduzida)

NADP – nicotinamida dinucleotídeo fosfatado (forma oxidada)

NADPH – nicotinamida dinucleotídeo fosfatado (forma reduzida)

nt – nucleotídeo

Pi – fósforo inorgânico

SOD – superóxido dismutase

T – temperatura

10 ANEXOS

10.1 Drogas e Reagentes

- Solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%
- L-Alanil-glutamina a 20% (Dipeptiven)
(Laboratório Fresenius Kabi)
- Éter dietílico
- Ácido perclórico (HClO₄) a 20%
(Haloquímica Ind. e Com. Ltda. São Paulo-SP-Brasil)
- Cloreto de magnésio (Mg Cl₂. 6H₂O)
(Grupo Química Industrial Ltda. Rio de Janeiro-RJ-Brasil)
- EDTA (ácido etileno-diamínico-tetra-acético) (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂. 2H₂O)
- Fosfato dibásico (K₂ HPO₄)
(Reagen, Rio de Janeiro-RJ, Brasil)
- Fosfato de potássio monobásico (KH₂ PO₄)
(Reagen, Rio de Janeiro-RJ-Brasil)
- Hidrato de hidrazina (NH₂ NH₂.H₂O) a 80%
(Reagen, Rio de Janeiro-RJ-Brasil)
- TRIS (hidroximetilaminometano) (C₂H₁₁NO₃)
(Reagen, Rio de Janeiro-RJ-Brasil)

10.2 Substâncias bioquímicas e enzimas

- Adenosina-5-trifosfato
(Boehringer, Manheim – Alemanha)
- Glucose-6-fosfato desidrogenase de *Leuconostoc mesenteroides*.
(Boehringer, Manheim, Alemanha)
- Hexoquinase
(Boehringer, Manheim, Alemanha)
- Hidroxibutirato desidrogenase de *Rhodopseudomonas spheroides*
(Boehringer, Manheim, Alemanha)

- Lactatodehidrogenase
(Boehringer, Manheim, Alemanha)
- NAD⁺ (nicotinamida adenosina dinucleotídeo oxidado)
(Boehringer, Manheim, Alemanha)
- NADH (nicotinamida adenosina dinucleotídeo reduzido)
(Boehringer, Manheim, Alemanha)

10.3 Aparelhagem

- Balança analítica
(Mettler, Modelo H5, Suíça)
- Balança para animais (tara de 10 a 2000g)
(Mettler, Suíça)
- Centrífuga
(Eppendorf, São Paulo-SP-Brasil)
- Espectrofotômetro
(Beckman, modelo DV, Fullerton, Califórnia, com medidor de absorvância digital Modernization System, Gilford, Ohio, Estados Unidos da América)
- Medidor de pH
(Micronal, pH-metro B374)
- Fluxômetro ultrassônico - Doppler
(IMBRACRIOS, modelo EV 700, São Paulo-SP-Brasil)

10.4 Materiais diversos

- Cubetas para leitura sob luz ultravioleta
 - (American Hospital Supply Corporation - Estados Unidos da América)
- Indicador universal de pH
 - (Reagen, Rio de Janeiro-RJ-Brasil)
- Nitrogênio líquido
 - (White Martins, São Paulo- SP-Brasil)
- Tubos de ensaio de vidro, de 10ml

- Pipeta automática de 5 a 1000 microlitros
- Ponteiros descartáveis para pipeta automática
- Provetas
- Becher de 10 ml, de 50 ml e de 100 ml
- Gral e pistilo de porcelana
- Garrafa térmica de 3 litros para acondicionar nitrogênio líquido, no curso do experimento
- Pinça apreensora, utilizada no manuseio do material em meio ao nitrogênio líquido
- Seringas de plástico de 3 ml e agulhas hipodérmicas calibre 25/7
- GEL aquasonic - para uso com o fluxômetro Doppler
- Material cirúrgico: pinças hemostáticas (tipo “mosquito”), pinças anatômicas, tesouras, bisturi descartável, pinças vasculares oclusivas (tipo buldogue), afastadores, delicados de Faraboeuf
- Luvas de látex, de procedimentos
- Recipiente plástico com capacidade de 3 litros