

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

JOÃO PAULO DE VASCONCELOS LEITÃO

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM L-ALANIL-GLUTAMINA SOBRE O
ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS JOVENS SUBMETIDOS À TORÇÃO DO
CORDÃO ESPERMÁTICO**

**FORTALEZA
2007**

JOÃO PAULO DE VASCONCELOS LEITÃO

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM L-ALANIL-GLUTAMINA SOBRE O
ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS JOVENS SUBMETIDOS À TORÇÃO DO
CORDÃO ESPERMÁTICO**

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

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães.

JOÃO PAULO DE VASCONCELOS LEITÃO

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM L-ALANIL-GLUTAMINA SOBRE O
ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS JOVENS SUBMETIDOS À TORÇÃO DO
CORDÃO ESPERMÁTICO**

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

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães.

APROVADO EM 17/12/2007

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rodrigo Dornfeld Escalante-UECE

Prof. Dr. Paulo Roberto L. de Vasconcelos-UFC

Prof. Dr. Sergio Botelho Guimarães-Orientador-UFC

**FORTALEZA
2007**

A DEUS, que é a razão e o sentido de todo e qualquer ato praticado por mim.

Aos meus pais, Silvia e Cristiano, que durante toda vida dedicaram-se incondicionalmente a mim e ao meu projeto de vida, sendo os responsáveis diretos pela minha formação acadêmica e humana.

À minha esposa, Ninnyve, grande incentivadora da minha vida acadêmica, compreendendo muitas vezes minha ausência, sempre ao meu lado em todos os momentos.

À minha família, por toda amizade e amor que sempre me foi dispensado.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Doutor Sérgio Botelho Guimarães, por sua dedicação em todas as etapas desta pesquisa, desde sua elaboração, análise dos resultados, até a revisão crítica final, esclarecendo dúvidas e colaborando em todas as dificuldades enfrentadas neste caminho.

Ao Professor Doutor Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos, pela doação da L-Alanil-Glutamina utilizada no experimento, por todo o incentivo, sugestões e contribuições dadas neste estudo e por honrosamente participar da Banca de Defesa desta Dissertação. Ao Professor Doutor Rodrigo Dornfeld Escalante (UECE), pela honrosa participação na Banca de Defesa.

Aos Professores Doutores Luis Gonzaga Porto Pinheiro, Miguel Ângelo Nobre de Souza, João Aragão Ximenes Filho, pela participação na Banca de Qualificação e pelos generosos comentários que muito contribuíram para o aprimoramento deste manuscrito.

Aos brilhantes e incansáveis estudantes do curso de Medicina da Universidade Federal do Ceará Raquel Cavalcante de Vasconcelos, Vicente de Paulo Martins Coelho Júnior, Luiz Bruno Pereira Lima, Osamu de Sandes Kimura e Gerda Feitosa Nogueira pela participação na fase experimental deste estudo.

Às Senhoras Maria Luciene Vieira de Oliveira e Magda Maria Gomes Fontenele, secretárias do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, pela dedicação, competência, esforço e consideração a cada aluno do programa.

Ao Sr. Francisco Evanir Gonçalves de Lima, técnico da unidade de Farmacologia da Universidade Federal do Ceará pelos esclarecimentos técnicos e colaboração durante os ensaios laboratoriais e ao Sr. Bento Francisco de Oliveira, assistente técnico do Biotério do laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina (UFC), pelos cuidados aos animais utilizados na pesquisa alojados no biotério.

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”

Galileu Galilei

RESUMO

EFEITOS DO TRATAMENTO COM L-ALANIL-GLUTAMINA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS JOVENS SUBMETIDOS À TORÇÃO DO CORDÃO ESPERMÁTICO. JOÃO PAULO DE VASCONCELOS LEITÃO. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia. Orientador: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães.

O efeito da L-alanil-glutamina foi testado numa situação de estresse oxidativo induzida por um modelo experimental de isquemia/reperfusão testicular através de torção do cordão espermático. Oitenta e quatro ratos Wistar jovens foram distribuídos aleatoriamente em 6 grupos da seguinte forma: Grupo Salina 1h (GSa1) e Grupo Ala-Gln 1h (GAg1), tendo sido os animais submetidos à 1 hora de isquemia e 6 horas de reperfusão, tratados 30 minutos antes da torção, por via intravenosa, com solução salina e L-alanil-glutamina (0,75g/Kg) respectivamente; Grupo Salina 3h (GSa3) e Grupo Ala-Gln 3h (GAg3), tendo sido os animais submetidos a 3 horas de isquemia e 6 horas de reperfusão, tratados 30 minutos antes da torção, por via intravenosa, com solução salina ou L-alanil-glutamina (0,75g/Kg) respectivamente; cada grupo, constituído por 18 ratos, foi distribuído equitativamente, em 3 subgrupos (T-0, T-2, T-6), cada um com 6 animais, os quais representavam os tempos de coleta do testículo, sendo T-0 o tempo máximo de isquemia, T-2 após 2 horas de reperfusão e T-6 após 6 horas de reperfusão. Dois grupos simulados (Sham), cada um com 6 animais, mimetizava o procedimento de indução de isquemia por 1 ou 3 horas, seguido de um período de pós-trauma de 2 horas, sendo a coleta realizada neste momento. Foram determinadas as concentrações das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutathiona reduzida (GSH) nas amostras de tecido (testículo) obtidas nos diversos subgrupos. As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando-se o teste de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis com comparações temporais pelo teste de Dunn. A significância estatística foi com valores de $p < 0,05$. Houve aumento significativo das concentrações de GSH, no testículo dos ratos submetidos à 1 hora de isquemia seguida de 6 horas reperfusão, tratados com L-Ala-Gln em todos os tempos estudados, quando comparados ao grupo controle; nos animais submetidos à 3 horas de isquemia, demonstrou-se aumento significativo de GSH no tempo máximo de isquemia e após 6 horas de reperfusão. Houve redução significativa nas concentrações de TBARS, no testículo dos ratos submetidos à 3 horas de isquemia seguida de reperfusão, nos animais tratados L-Ala-Gln no tempo máximo de isquemia e após 2 horas de reperfusão. Estes resultados demonstram um efeito protetor que a glutamina exerce no testículo durante a isquemia/reperfusão, mostrando-se eficaz na manutenção dos níveis teciduais de GSH nos dois modelos de torção do cordão espermático, reduzindo a magnitude do estresse oxidativo e também reduzindo a peroxidação lipídica nos animais submetidos à 3 horas de isquemia, até a segunda hora de reperfusão.

DESCRITORES: Antioxidantes, Glutamina, Testículo, Ratos, Estresse oxidativo, Lipídeos da membrana celular – peroxidação, Malonaldeído, Glutathiona.

ABSTRACT

EFFECTS OF L-ALANIL-GLUTAMINE TREATMENT UPON OXIDATIVE STRESS IN YOUNG RATS SUBJECTED TO TORSION OF SPERMATIC CORD. JOÃO PAULO DE VASCONCELOS LEITÃO. (Essay Master). Post-Graduation Program (*Stricto Sensu*) in Surgery. Federal University of Ceará. Professor: Dr. Sérgio Botelho Guimarães.

The effect of L-alanyl-glutamine was tested in a situation of oxidative stress induced by torsion of the spermatic cord. Eighty four male young Wistar rats were distributed randomly in 6 groups: Saline group 1h (Gsa1) and Ala-Gln Group 1h (Gag1), animals of these groups were submitted to 1 hour of ischemia and 6 hours of reperfusion and were treated 30 minutes before the torsion, by intravenous way, with saline solution and L-alanyl-glutamine (0,75g/Kg) respectively; Saline group 3h (Gsa3) and Ala-Gln Group 3h (Gag3), animals of these groups were submitted to 3 hours of ischemia and 6 hours of reperfusion, had been treated, 30 minutes before the torsion, by intravenous way, with saline solution and L-alanyl-glutamine (0,75g/Kg) respectively; each group, consisting of 18 rats, was distributed equitable, in 3 sub-groups (T-0, T-2, T-6), each one with 6 animals, which represented the times that testis were collected, being T-0 the maximum time of ischemia, T-2 after 2 hours of reperfusion and T-6 after 6 hours of reperfusion. Two groups (Sham 1h and Sham 3h) were submitted to sham operation, being the testis collected two hours after simulated trauma. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and reduced glutathione levels were assayed in testis. Comparasion between groups were made using Mann-Whitney e Kruskal-Wallis tests, and temporal comparasions were made using Dunn test. P values of <0,05 were considered to indicate statistical significance. GSH concentration was significantly increased in testis of the rats submitted to 1 hour of ischemia, followed by 6 hours of reperfusion, treated with L-Ala-Gln in all the studied times, when compared with the control group; in the animals submitted to the 3 hours of ischemia, significant increase of GSH was demonstrated in the maximum time of ischemia and 6 hours of reperfusion time. Significant decrease of TBARS levels were seen in rats submitted to 3 hours of ischemia followed by reperfusion, treated with L-alanyl-glutamine, in maximum time of ischemia and after 6 hours of reperfusion. These results demonstrates that glutamine may play a role in the maintenance of the tecidual levels of GSH in two models of ischemia/reperfusion of the testis studied, by an antioxidant effect, and may promote cell membrane protection during the ischemia (3h)/reperfusion by decreasing lipid peroxidation.

KEY WORDS: Antioxidants, Glutamine, Testis, Rats, Oxidative stress, Cell membrane lipids – peroxidation, Malonaldehyde, Glutathione.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Distribuição dos grupos e subgrupos.....	15
FIGURA 2 – Desenho do estudo (modelos experimentais 1 e 2).....	17
FIGURA 3 – Desenho do estudo (modelo experimental simulado).....	18
FIGURA 4 – Desenho esquemático da torção e fixação do testículo.....	19
FIGURA 5 – Aspecto do testículo torção e isquemia por 3 horas.....	20
FIGURA 6 – Fluxograma do experimento.....	23
FIGURA 7 – Comparação de TBARS nos grupos GSa1h (T-2) x Sham 1h...	28
FIGURA 8 – Comparação de GSH nos grupos GSa1h (T-2) x Sham 1h.....	29
FIGURA 9 – Comparação de TBARS nos grupos GSa3h (T-2) x Sham 3h....	30
FIGURA 10 – Comparação de GSH nos grupos GSa3h (T-2) x Sham 1h.....	31
FIGURA 11 – Comparação de TBARS nos grupos GSa1h x Gag1h.....	32
FIGURA 12 – Comparação de TBARS nos grupos GSa3h x Gag3h.....	33
FIGURA 13 – Comparação de GSH nos grupos GSa1h x Gag1h.....	34
FIGURA 14 – Comparação de GSH nos grupos GSa3h x Gag3h.....	35
FIGURA 15 – Curva de GSH nos grupos GSa1h x Gag1h.....	53
FIGURA 16 – Curva de GSH nos grupos GSa3h x Gag3h.....	54
FIGURA 17 – Curva de TBARS nos grupos GSa3h x Gag3h.....	55
FIGURA 18 – Interconversão da GSH em GSSO.....	59
FIGURA 19 – Deaminação da glutamina com formação do glutamato.....	60
FIGURA 20 – Síntese da glutathiona.....	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Comparação de TBARS nos grupos GSa1h (T-2) x Sham 1h...	28
TABELA 2 – Comparação de GSH nos grupos GSa1h (T-2) x Sham 1h.....	29
TABELA 3 – Comparação de TBARS nos grupos GSa3h (T-2) x Sham 3h...	30
TABELA 4 – Comparação de GSH nos grupos GSa3h (T-2) x Sham 1h.....	31
TABELA 5 – Comparação de TBARS nos grupos GSa1h x Gag1h.....	32
TABELA 6 – Comparação de TBARS nos grupos GSa3h x Gag3h.....	33
TABELA 7 – Comparação de GSH nos grupos GSa1h x Gag1h.....	34
TABELA 8 – Comparação de GSH nos grupos GSa3h x Gag3h.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- (-CH₂-) – grupo metileno
Ala-Gln – alanil-glutamina
Cys – L-cisteína
ERMO – espécies reativas do metabolismo do oxigênio
GSa1 – Grupo Salina 1h
GSa3 – Grupo Salina 3h
GAg1 – Grupo Ala-Gln 1h
GAg3 – Grupo Ala-Gln 3h
Gln – glutamina
Glu – L-glutamato
Gly-Gln – glicil-glutamina
GO – glutaciona oxidase
GR – glutaciona redutase
GSH – glutaciona reduzida
GSH-Px – glutaciona peroxidase
GSSG – glutaciona oxidada
HO₂[·] – hidroperoxila
I/R – isquemia/reperfusão
L[·] – radical lipídico
L-Ala-Gln – L-alanil-L-glutamina
LO[·] – radical alcóxila
LOO[·] – radical peróxila
LOOH – hidroperóxidos lipídicos
MDA – dialdeído malônico
[·]O₂⁻ – radical superóxido
OH[·] – radical hidroxila
RLO – radical livre de oxigênio
SS – solução salina
TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
T0 – tempo máximo de isquemia
T2 – tempo correspondente a duas horas de reperfusão
T6 – tempo correspondente a seis horas de reperfusão

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	11
3 MÉTODO	12
3.1 Distribuição dos grupos.....	14
3.2 Desenho do estudo.....	17
3.3 Indução da isquemia e fixação do testículo.....	19
3.4 O estudo.....	20
3.4.1 Preparação das drogas utilizadas.....	24
3.4.2 Técnica laboratorial.....	24
3.4.2.1 Preparação dos espécimes (tecido testicular).....	24
3.4.2.2 Avaliação da peroxidação lipídica.....	24
3.4.2.3 Determinação da glutathiona (GSH) no tecido.....	26
3.5 Análise estatística.....	27
4 RESULTADOS	28
5 DISCUSSÃO	36
6 CONCLUSÃO	45
7 REFERÊNCIAS	46
APÊNDICES	
ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

A isquemia é definida como uma restrição do aporte sanguíneo a um determinado órgão, alterando o funcionamento de múltiplos sistemas intracelulares, levando desde alterações reversíveis à morte celular. As diversas alterações morfológicas e fisiológicas causadas pela isquemia têm sido exaustivamente estudadas em seres humanos e em modelos experimentais (CONTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1996).

As fisiologia e anatomia dos diferentes tecidos refletem as diferentes conseqüências metabólicas e funcionais da isquemia em cada um deles. Ela se faz presente na fisiopatologia de inúmeras doenças nos territórios mais diversos do organismo, tais como coração, cérebro, músculos esqueléticos, trato gastrointestinal, dentre outros (SEMENZA, 2000).

A torção do cordão espermático é a emergência urológica mais freqüente em jovens (GAUSCHE, 1996). Tem dois picos de incidência: um menor, no período neonatal, e um maior, durante a puberdade, apesar de poder ocorrer em qualquer idade, desde as primeiras semanas de vida intra-uterina (GIANNAKOPOULOS *et al.*, 1995) até a senilidade (GOMES *et al.*, 2003). A incidência é estimada em 1 em 4000 em homens com idade inferior a 25 anos (WILLIAMSON, 1976). Aproximadamente 65% dos casos ocorrem em indivíduos com idades compreendidas entre os 12 e 18 anos (EDELSBERG, 1988). A incidência aumentada durante a adolescência é secundária ao crescente peso dos testículos durante o desenvolvimento puberal (WILLIAMSON, 1976).

Até meados da década de 60, o tratamento cirúrgico resultava em perda de até 90% dos testículos torcidos (BAKER, 1964). Esses resultados poderiam, obviamente, ser melhorados com diagnóstico e tratamento precoce. Anderson e Williamson (1986) demonstraram ainda altos índices de perda, totalizando 44% dos casos, sendo 38% de testículos inviáveis na fase aguda e atrofia do órgão em 6% dos casos. No Brasil, Souto *et al.* (1999) verificaram índices de perda ainda maiores (50%) em 26 jovens atendidos num intervalo de 5 anos (1992 a 1997).

A torção do cordão espermático ainda pode ser uma causa importante de esterilidade entre os homens, sendo confirmada a produção anormal de espermatozoides até 12 anos após o evento isquêmico (ANDERSON; WILLIAMSON, 1986).

A torção do cordão espermático não promove precocemente uma obstrução total do fluxo sanguíneo. De início, ocorre obstrução da circulação venosa do testículo, impedindo a drenagem sanguínea da região, promovendo gradativamente um edema que potencializa o efeito estrangulador da torção, posteriormente bloqueando o fluxo arterial à gônada, resultando em isquemia com sua cascata de eventos metabólicos (SKOGLUND; McROBERTS; RADGE, 1970). A partir de então, ocorre substituição do metabolismo aeróbico pelo anaeróbico, que é ineficaz no suprimento das demandas energéticas teciduais, resultando num comprometimento dos processos biológicos que necessitam de energia (GRACE, 1994).

Se, por um lado, essa restauração do fluxo sanguíneo é, em geral, necessária para se recuperar a função celular normal, por outro lado, a re-introdução do sangue oxigenado nos tecidos isquêmicos pode desencadear lesões teciduais ainda mais intensas do que as provocadas pela isquemia "per se". Esse agravamento das lesões teciduais foi chamado de "paradoxo do oxigênio" (FRANCISCO NETO, 2005). McCord propôs que o mecanismo responsável por esse agravamento seria a geração de radicais livres de oxigênio conseqüente a re-introdução de oxigênio molecular (McCORD, 1985). Sabe-se que radicais livres são gerados na isquemia e reperfusão (FRANCISCO NETO, 2005) em um cenário de reações de óxido-redução (FERREIRA; MATSUBARA 1997).

Como ocorre em outros tecidos submetidos à isquemia/reperfusão, o testículo sofre com o componente isquêmico do evento, seguido de lesão adicional durante o período de reperfusão, sendo o dano celular provocado pelo somatório de efeitos deletérios de ambos os momentos (AKGÜR; KILINC; ATUG, 1993). A lesão isquêmica é provocada pela obstrução do fluxo sanguíneo arterial, rico em oxigênio, e a lesão de reperfusão instala-se após a correção cirúrgica e restabelecimento da circulação gonadal (AKGÜR; KILINC; ATUG, 1993). Isto decorre da formação das espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMO) quando o sangue oxigenado

chega ao testículo isquêmico, gerando o agravamento de um ambiente de estresse oxidativo (PRILLAMAN; TURNER, 1997).

Durante o período isquêmico ocorre dano ao tecido devido às alterações iônicas do cálcio e da proteólise. Entretanto, quando restabelecida a reperfusão sanguínea arterial e, por conseguinte, o suprimento de oxigênio aos tecidos, a oxidação da hipoxantina e xantina é processada pela xantina-oxidase e, conseqüentemente, altas proporções de radicais livres são formados. O mecanismo de formação dos radicais livres neste processo é explicado pelo fato da enzima xantina oxidase utilizar o oxigênio molecular (O_2) como um acceptor de elétrons e desta forma formaria o radical superóxido ($\cdot O_2^-$) (LEIFERT; JAHANGIRI; McMURCHIE, 1999).

Radical livre de oxigênio (RLO) refere-se a átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. É este não-emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas (FERREIRA; MATSUBARA 1997). O elétron livre, que caracteriza o radical livre, pode estar centrado em um átomo de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, carbono, enxofre ou átomos de metais de transição. Na natureza existem duas importantes substâncias que podem gerar radicais livres, o oxigênio no estado fundamental (O_2) e o óxido nítrico (NO) (ROVER JÚNIOR *et al.*, 2001). Na verdade, radical livre não é o termo ideal para designar os agentes reativos patogênicos, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada. Como em sua maioria são derivados do metabolismo do O_2 , são denominados "espécies reativas do metabolismo do oxigênio" (ERMO), (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

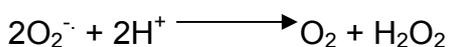
O oxigênio é um bi-radical (possui dois elétrons livres nos orbitais p antiligantes), portanto ele reage preferencialmente com moléculas de configuração eletrônica semelhante. Como a maioria das biomoléculas não são bi-radicais, possuindo grande número de ligações covalentes, o oxigênio fica impedido (por restrição de "spin") de reagir com as mesmas, evitando assim que alvos celulares importantes sejam lesados. No entanto, o oxigênio pode dar origem a diversas espécies reativas, seja por absorção de energia ou por transferência de elétrons. Na

forma de oxigênio singlete a restrição de "spin" desaparece, conferindo-lhe um maior poder oxidante (ROVER JÚNIOR *et al.*, 2001).

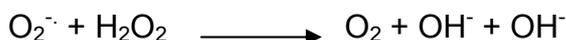
ERMO são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O₂ sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H₂O. Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido (O₂^{·-}), hidroperoxila (HO₂[·]), hidroxila (OH[·]) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (COHEN, 1989). O principal problema é que o H₂O₂ atravessa facilmente as membranas celulares e ao receber mais um elétron, normalmente proveniente do ferro ou do cobre, origina o radical hidroxila. Este último é, entre as espécies radicalares conhecidas, uma das mais reativas, pois necessita somente de mais um elétron para se estabilizar. Estas espécies reativas de oxigênio para se estabilizarem devem doar ou receber elétrons de uma ou outra molécula, tornando esta última uma espécie também radicalar e a consequência disto é a oxidação dos fosfolipídios de membranas celulares e subcelulares, do DNA, e das proteínas (ROVER JÚNIOR *et al.*, 2001).

Ao se estudarem os mecanismos de lesão oxidativa, progressivamente, tem sido fortalecida a hipótese de que a ação catalítica dos metais nas reações leva a estas lesões. O papel dos metais na formação *in vitro* das ERMO é confirmado pelas reações de Fenton e de Haber-Weiss (LEIFERT; JAHANGITI; MCMURCHIE, 1999). Embora o cobre possa também catalisar a reação de Haber-Weiss, o ferro é o metal pesado mais abundante no organismo e está biologicamente mais capacitado para catalisar as reações de oxidação de biomoléculas. Como pode ser observado a seguir, nas reações de Fenton e de Haber-Weiss são formados diferentes tipos de ERMO (FERREIRA; MATSUBARA, 1997):

Reação de Fenton:



Reação de Haber-Weiss:



Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERMO, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares (MELO FILHO; HOFFMAN; MENEGHINI, 1983). Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (SHAN; JONES, 1990). O estresse oxidativo tem sido relacionado a diversas patologias, tais como o câncer, doenças cardiovasculares e desordens neurológicas (AMORES-SÁNCHEZ; MEDINA, 1999). Assim como na formação das ERMO, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido aracdônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória. Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Mais de 95% do oxigênio consumido durante o metabolismo aeróbico é utilizado pela respiração celular na mitocôndria, para produção de energia, sendo os 5% restantes não sendo completamente oxidados em água, originando ERMO (CLARK, 2002).

A detecção da lipoperoxidação é uma das evidências mais usadas para dar suporte ao envolvimento de radicais livres em processos biológicos. É uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (GUTTERIDGE, 1995).

A reação de peroxidação lipídica numa membrana inicia-se quando uma espécie tem reatividade suficiente para promover o seqüestro do hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado de um grupo metileno (-CH₂-). Tal seqüestro pode ser realizado pelo OH[·] ou pelo LO[·] (radical alcóxila), com conseqüente formação do L[·]

(radical lipídico). Na fase de propagação, o $L\cdot$ reage rapidamente com o O_2 , resultando em $LOO\cdot$ (radical peroxila), que, por sua vez, seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, formando novamente o $L\cdot$ promovendo um encadeamento dessas reações. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais ($L\cdot$ e $LOO\cdot$) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até a destruição de si próprios (GUTTERIDGE, 1995).

A lipoperoxidação pode ser catalisada por íons ferro, por conversão de hidroperóxidos lipídicos ($LOOH$) em radicais altamente reativos (alcoxila, $LO\cdot$ e peroxila, $LOO\cdot$), que, por sua vez, iniciam nova cadeia de reações, denominada ramificação. Essas reações, que podem ser rápidas ou lentas, dependem da valência do ferro. O radical hidroxila ($OH\cdot$) é freqüentemente reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante da lipoperoxidação (GUTTERIDGE, 1995).

A concentração intracelular de espécies reativas de oxigênio é, em condições normais, extremamente baixa, pelo fato de existirem enzimas antioxidantes, que as removem ou impedem a sua formação. Estes radicais tendem a ser eliminados do organismo através das enzimas glutathione peroxidase, glutathione reductase, superóxido dismutase e catalase (MCCORD; FRIDOVICH, 1969). Enquanto há um equilíbrio entre os agentes oxidantes e as defesas antioxidantes, a homeostase fica mantida. Porém, se este balanço for rompido, quer por excessiva produção de ERO ou por redução das defesas antioxidantes, instala-se o “estresse oxidativo” (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), restando ao organismo três possibilidades: 1) adaptação por aumento dos sistemas antioxidantes; 2) dano tecidual pela ação dos radicais livres em seus diversos sítios de lesão; 3) morte celular por necrose ou apoptose (DRÖGE, 2002). Como mecanismo de defesa, os mecanismos antioxidantes atuam em duas diferentes linhas: linha detoxificadora, detoxificando o agente antes que ele cause lesão, constituída principalmente pela glutathione reductase, vitamina E, superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase; linha reparadora (repara um dano já instalado), constituída principalmente pelo ácido ascórbico e pelas enzimas glutathione reductase e glutathione peroxidase (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Existem antioxidantes provenientes da dieta ou elaborados sinteticamente, como a acetilcisteína, coenzima Q, flavonóides, alopurinol, probucol,

vitaminas C e E, betacaroteno, selênio, zinco, dentre outros (BONORDEN; PARIZA, 1994).

A glutathiona pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra lesões que resultam da exposição a diversos agentes, tais como íons ferro (GALLEANO; PUNTARULO, 1995), oxigênio hiperbárico, ozona, radiação e luz ultravioleta (DENEKE; FANBURG, 1989). A GSH (glutathiona reduzida) ao ser oxidada transforma-se em GSSG (glutathiona oxidada), tóxica ao meio intracelular. Os sistemas de defesa antioxidante são acionados, reduzindo a GSSG a sua forma inicial GSH através da ação da enzima glutathiona redutase. A relação ideal GSH/GSSG (100:1) é mantida graças a este mecanismo (MEISTER, 1989). O consumo de GSH, em condições fisiológicas, é mediado pela intensidade de sua utilização em processos de detoxificação. A exposição a agentes oxidantes provenientes do meio externo pode aumentar significativamente o consumo de GSH, resultando em queda temporária de seus níveis intracelulares. Porém, como existe a capacidade de regeneração das reservas de GSH em grande parte das células, a concentração intracelular desse tripeptídeo é rapidamente recuperada, pela maior síntese e pela redução da GSSG. A maioria das células tolera, sem maiores conseqüências, a redução de até 90% dos níveis de GSH (HALL, 1999).

Pesquisadores demonstraram que a destorção testicular após torção experimental com duração de até 2 horas, leva a um aumento significativo da peroxidação lipídica no tecido destorcido, sendo as lesões encontradas na gônada resultantes de uma somatória entre os efeitos da isquemia decorrente da diminuição do fluxo sanguíneo acrescidas das lesões causadas pela reperfusão do testículo (AKGÜR *et al.* 1993). Vários modelos de torção do cordão espermáticos foram idealizados na tentativa de reproduzir, experimentalmente, os distúrbios circulatórios que acontecem durante esta doença no homem. Os métodos mais utilizados foram a ligadura da artéria espermática, o pinçamento do cordão espermático e a torção do cordão espermático (GUIMARÃES, 2005).

A ligadura ou o pinçamento do cordão espermático determinam imediatamente bloqueio da circulação arterial e do retorno venoso, não simulando fidedignamente a situação que ocorre no ser humano (MERIMSKY; ROCK; KATZ, 1982; ORTOLANO; NASRALLAH, 1986). A torção do cordão espermático, executada através de duas voltas completas (720°) é modelo atualmente utilizado

pela maioria dos pesquisadores, sendo o que mimetiza com mais precisão a torção que acontece no homem (JANESCHEK *et al.*, 1988; RYAN; GOREY; FITZPATRICK, 1988; BLANK *et al.*, 1993; BECKER; TURNER, 1995; PALMER; PLZAK; CROMIE, 1997; DOKUCU *et al.*, 2000; GUIMARÃES; VASCONCELOS, 2002; SEUNG-JUNE *et al.*, 2004; GUIMARÃES, 2005).

A L-glutamina é um substrato energético para muitas células (MATÉS, 2002), além de ser precursor de nucleotídeos (BOZA, 200), glutamato (LIETH, 2001) e da síntese da glutathione (BABU, 2001). Ela tem um importante papel no transporte de nitrogênio entre diferentes tecidos, onde exerce diferentes funções fisiológicas (MATÉS, 2002). É o aminoácido livre mais abundante no músculo e no plasma humano, sendo também encontrada em concentrações relativamente elevadas em muitos tecidos (CREMIN; FLEMING, 1997). É essencial para o crescimento e a diferenciação celular, transporte de cadeia carbônica entre os órgãos e fornecimento de energia para células de rápida proliferação, como os enterócitos e as células do sistema imune. Além disso, atua como precursora da ureagênese e neoglicogênese hepática e de mediadores como o GABA e o glutamato (HALL, 1996).

A glutamina, um aminoácido neutro e gliconeogênico, é classicamente classificado como não-essencial, porém, pode se tornar indispensável em situações catabólicas, como trauma e sepse. Por essa razão, mais recentemente, diversos autores vêm considerando este aminoácido como condicionalmente essencial (NEWSHOLME, 2001).

As repercussões no organismo da depleção de glutamina vêm sendo objeto de muitos estudos, sobretudo no que se refere ao sistema imune e à susceptibilidade às infecções, já que sua metabolização pelas células imunológicas fornece substratos fundamentais para a formação de membranas celulares durante a atividade das células fagocitárias, síntese de citocinas (fator de necrose tumoral e interleucinas) e ânion superóxido. Assim, a fagocitose, a degranulação e a produção de citocinas por neutrófilos e macrófagos, estão intimamente relacionadas à disponibilidade de glutamina, de tal forma que situações de estresse podem induzir a imunossupressão (MURPHY, 1999; PACIFICO, 2005). A privação de glutamina induz à morte espontânea de neutrófilos (GUÉRIN, 2006), que pode explicar o aumento da incidência de infecções em pacientes críticos (LABOW; SOUBA, 2000). Ela protege células epiteliais intestinais contra apoptose induzida por citocinas,

sendo um mecanismo distinto da proteção contra estresse oxidativo mediado pela glutathione (EVANS, 2003).

O fenômeno de isquemia/reperfusão associada a tratamentos cirúrgicos gera radicais livres que podem produzir dano celular de diversas magnitudes (AMORES-SÁNCHEZ; MEDINA, 1999). Pode ser relevante o fato de que tanto a glutathione total como a reduzida diminuem após tratamentos cirúrgicos (LUO, 1996). Possivelmente, a deficiência de glutamina pode limitar a produção de proteínas na resposta inflamatória e a síntese da glutathione, comprometendo as defesas antioxidantes do organismo (PACIFICO, 2005). O interesse na suplementação desse aminoácido tem sido despertado pelos seus possíveis benefícios, principalmente pelo seu reconhecido papel na prevenção do estresse oxidativo (AMOREZ-SANCHES, 1999).

Os potenciais efeitos benéficos da suplementação da glutamina podem ser (KELLY, 2003):

- Aumentar a síntese de glutathione, potencializando as defesas antioxidantes.
- Manter a integridade da mucosa intestinal (fonte energética para enterócitos), evitando a translocação bacteriana.
- Aumentar a síntese de proteínas da resposta inflamatória, atenuando o processo inflamatório.
- Preservar a função imune, servindo de fonte energética para linfócitos e precursores de citocinas.

Diversos estudos demonstraram benefícios da glutamina em diferentes tecidos submetidos à isquemia. Alves (2003) mostrou que ocorre uma queda na concentração de lactato muscular e redução nas concentrações arteriais e venosas de LDH, em pacientes portadores de isquemia crítica de membros inferiores submetidos à revascularização, recipientes de L-alanil-glutamina, sugerindo maior utilização de piruvato para produção de energia no ciclo de Krebs do que sua conversão para lactato, com prevalência da glicólise aeróbica. Hong *et al.* (1999) demonstraram que a suplementação de glutamina, por sua capacidade antioxidante, preserva a glutathione hepática durante injúria aguda do fígado. Prem (1999) demonstrou redução de lesão em musculatura esquelética de ratos pré-tratados com

glutamina, em modelo experimental de isquemia/reperfusão. Segundo Howard *et al.* (1994), a glutamina manteve níveis de glutathione elevados na mucosa intestinal de ratos, promovendo menos peroxidação lipídica num modelo de isquemia/reperfusão do intestino.

A forma livre da glutamina (L-glutamina) possui pobre solubilidade em solução aquosa e baixa estabilidade em pH baixo e temperaturas elevadas. Do ponto de vista metabólico, pode sofrer conversão espontânea, formando o piroglutamato e amônia, produtos tóxicos ao organismo humano. Tais limitações têm levado a estudos que recomendam a administração deste aminoácido na forma de peptídeos, tais como a glicil-glutamina (Gly-Gln) ou a alanil-glutamina (Ala-Gln) que apresentam alta solubilidade em água e estabilidade durante os procedimentos de preparo, armazenamento e administração das soluções nutricionais (SOUBA *et al.*, 1993).

Nos últimos 20 anos, um grande número de pesquisadores tem buscado alternativas terapêuticas, reconhecendo que o tratamento cirúrgico isolado é incapaz de assegurar proteção total ao testículo diante das seqüelas lesivas que a torção do cordão espermático pode trazer. A busca por substâncias com atividade antioxidante eficaz na reversão ou diminuição do estresse oxidativo secundário à torção do cordão espermático tem sido exaustiva e sistemática. Inúmeras substâncias foram utilizadas, com resultados nem sempre satisfatórios, apesar da comprovada ação dessas substâncias em outros órgãos (GUIMARÃES, 2005).

Diversas pesquisas demonstraram o potencial efeito protetor da glutamina frente ao estresse oxidativo causado por reperfusão em tecidos previamente submetidos à isquemia. Esta pesquisa foi motivada tanto pela escassez de registros na literatura que avaliem o efeito antioxidante da L-Alanil-Glutamina em ratos submetidos à torção seguida de destorção do cordão espermático, como pela possibilidade de futura aplicação clínica desse dipeptídeo, trazendo perspectiva de um possível benefício adicional ao tratamento cirúrgico da torção testicular, melhorando o prognóstico funcional desse grupo de pacientes.

2 OBJETIVO

Estudar os efeitos da L-Alanil-Glutamina sobre o estresse oxidativo em ratos jovens submetidos à isquemia testicular induzida por torção unilateral do cordão espermático seguida de reperfusão, através da repercussão que este dipeptídeo pode causar nos níveis teciduais de glutathiona reduzida (GSH) e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

3 MÉTODO

O projeto de pesquisa foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA), da Universidade Federal do Ceará, em 17 de maio de 2006, sob o protocolo número 07/06, estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com as normas estabelecidas pelo *Council for International Organization of Medical Sciences (CIOMS)*.

Foram utilizados 84 ratos albinos (*Rattus norvegicus*: var. *albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*) da linhagem Wistar, machos, púberes, pesando entre 150 e 200g, peso médio 175g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, criados e mantidos sob condições ambientais e alimentícias semelhantes no Laboratório de Cirurgia Experimental (LABCEX) do Departamento da Faculdade de Medicina (UFC) antes do início do experimento cirúrgico.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, forradas com maravalhas e providas de grade metálica de aço inoxidável, distribuídos em grupos de 4 roedores em cada continente. Foram submetidos ao ciclo claro-escuro, tendo 12 horas cada turno, seguindo o ritmo circadiano, sendo alojados em ambiente refrigerado (25°C). A higienização foi realizada pelo técnico responsável, o qual oferecia ração comercial para ratos (Guabi Nutrilabor R, Mogiana Alimentos, São Paulo) e água potável *ad libitum* até 12 horas antes do experimento, quando se mantinha disponível apenas a oferta de água.

Os ratos foram adaptados nesse ambiente por um período de 14 dias, sendo previamente examinados antes da realização dos experimentos. Os procedimentos foram realizados em ambiente refrigerado, no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará.

Os 84 ratos foram distribuídos aleatoriamente em 6 grupos da seguinte forma:

- Grupo Salina 1h (GSa1): constituído por 18 ratos que foram submetidos à torção do cordão espermático e fixação do testículo direito, permanecendo durante 1 hora em isquemia testicular. Em seguida foi feita a coleta do testículo isquêmico ou realizada destorção, permitindo reperusão durante 2

ou 6 horas. Neste grupo os animais foram tratados com solução salina por via intravenosa 30 minutos antes do experimento.

- Grupo Ala-Gln 1h (GAg1): constituído por 18 ratos que foram submetidos à torção do cordão espermático e fixação do testículo direito, permanecendo durante 1 hora em isquemia testicular. Em seguida foi feita a coleta do testículo isquêmico ou realizada destorção, permitindo reperfusão durante 2 ou 6 horas. Neste grupo os animais foram tratados com L-alanil-glutamina (Dipeptiven ®) por via intravenosa 30 minutos antes do experimento.
- Grupo Salina 3h (GSa3): constituído por 18 ratos que foram submetidos à torção do cordão espermático e fixação do testículo direito, permanecendo durante 3 horas em isquemia testicular. Em seguida foi feita a coleta do testículo isquêmico ou realizada destorção, permitindo reperfusão durante 2 ou 6 horas. Neste grupo os animais foram tratados com solução salina por via intravenosa 30 minutos antes do experimento.
- Grupo Ala-Gln 3h (GAg3): constituído por 18 ratos que foram submetidos à torção do cordão espermático e fixação do testículo direito, permanecendo durante 3 horas em isquemia testicular. Em seguida foi feita a coleta do testículo isquêmico ou realizada destorção, permitindo reperfusão durante 2 ou 6 horas. Neste grupo os animais foram tratados com L-alanil-glutamina (Dipeptiven ®) por via intravenosa 30 minutos antes do experimento.
- Grupo Simulado 1h (Sham 1): constituído por 6 ratos que foram submetidos à torção do cordão espermático direito, seguida imediatamente de destorção. Decorrida 1 hora, foi realizada a exposição do testículo, sendo, logo após, feita observação por 2 horas. Neste grupo os animais foram tratados com solução salina por via intravenosa 30 minutos antes do experimento.
- Grupo Simulado 3h (Sham 2): constituído por 6 ratos que foram submetidos à torção do cordão espermático direito seguida imediatamente de destorção. Decorridas 3 horas, foi realizada a exposição do testículo, sendo, logo após,

feita observação por 2 horas. Neste grupo os animais foram tratados com solução salina por via intravenosa 30 minutos antes do experimento.

3.1 Distribuição dos Grupos:

Grupo Salina 1h (GSa1): (n = 18)

Torção durante 1 hora → Destorção.

Subgrupos:

- T0: coleta no tempo máximo de isquemia. (n = 6)
- T2: coleta após 2 horas de reperfusão. (n = 6)
- T6: coleta após 6 horas de reperfusão. (n = 6)

Grupo Ala-Gln 1h (GAg1): (n = 18)

Torção durante 1 hora → Destorção.

Subgrupos:

- T0: coleta no tempo máximo de isquemia. (n = 6)
- T2: coleta após 2 horas de reperfusão. (n = 6)
- T6: coleta após 6 horas de reperfusão. (n = 6)

Grupo Salina 3h (GSa3): (n = 18)

Torção durante 3 horas → Destorção.

Subgrupos:

- T0: coleta no tempo máximo de isquemia. (n = 6)
- T2: coleta após 2 horas de reperfusão. (n = 6)
- T6: coleta após 6 horas de reperfusão. (n = 6)

Grupo Ala-Gln 3h (GAg3): (n = 18)

Torção durante 3 horas → Destorção.

Subgrupos:

- T0: coleta no tempo máximo de isquemia. (n = 6)
- T2: coleta após 2 horas de reperfusão. (n = 6)
- T6: coleta após 6 horas de reperfusão. (n = 6)

Grupo Simulado 1h (Sham 1): (n = 6)

Torção/Destorção → 1 hora de observação → exposição do testículo → coleta após 2 horas.

Grupo Simulado 3h (Sham 2): (n = 6)

Torção/Destorção → 3 horas de observação → exposição do testículo → coleta após 2 horas.

A figura abaixo demonstra esquematicamente a distribuição dos animais nos grupo acima descritos, e os subgrupos com os correspondentes tempos de coleta das amostras estudadas.

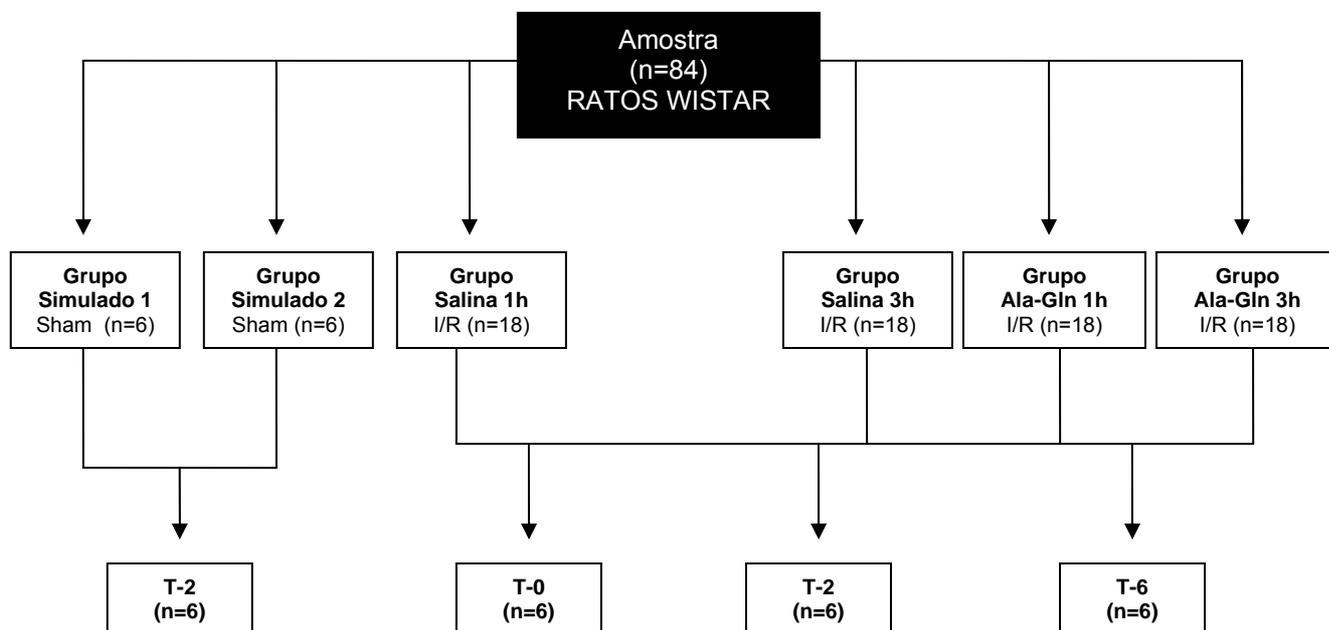


FIGURA 1- Distribuição dos grupos e subgrupos, denominados de acordo com o tipo de tratamento submetido aos animais e tempo de coleta das amostras.

O quadro 1, abaixo, demonstra as drogas, doses, diluentes e vias de administração utilizadas no experimento.

Grupos	N	Via	Concentração das soluções
Grupo Simulado 1h (SHAM 1)	6	i.v.	Solução salina 0,9% (SS) Aplicada em dose única 30 minutos antes do início do experimento. <i>Volume:</i> 2,0 mL
Grupo Simulado 3h (SHAM 2)	6	i.v.	Solução salina 0,9% (SS) Aplicada em dose única 30 minutos antes do início do experimento. <i>Volume:</i> 2,0 mL
Grupo Salina 1h (GSa1)	18	i.v.	Solução salina 0,9% (SS) Aplicada em dose única 30 minutos antes do início do experimento. <i>Volume:</i> 2,0 mL
Grupo Salina 3h (GSa3)	18	i.v.	Solução salina 0,9% (SS) Aplicada em dose única 30 minutos antes do início do experimento. <i>Volume:</i> 2,0 mL
Grupo Ala-Gln 1h (Gag1)	18	i.v.	N(2)-L-alanil-L-glutamina (L-Ala-Gln) Aplicada dose única de 0,75g/Kg, 30 minutos antes do início do experimento, completando-se o volume administrado com solução salina 0,9% para atingir um volume final de 2,0 mL.
Grupo Ala-Gln 3h (Gag3)	18	i.v.	N(2)-L-alanil-L-glutamina (L-Ala-Gln) Aplicada dose única de 0,75g/Kg, 30 minutos antes do início do experimento, completando-se o volume administrado com solução salina 0,9% para atingir um volume final de 2,0 mL.

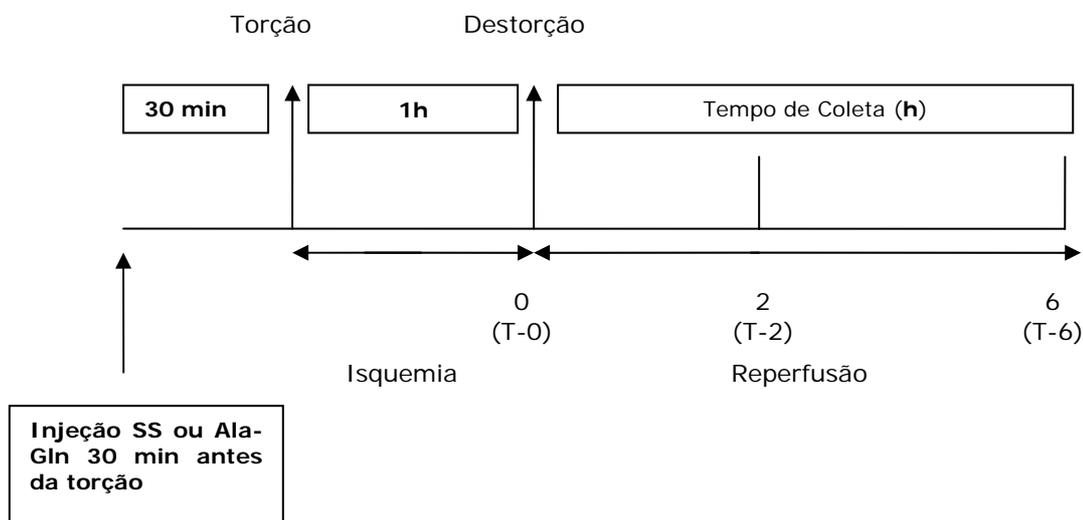
SS: Solução salina 0,9% - Fabricante: Química farmacêutica Gaspar Viana (Fortaleza – CE)

L-Ala-Gln: N(2)-L-alanil-L-glutamina – composição: (=8,20g L-alanina;13,46g L-glutamina)20 g; água para injeção q.s.p 100 mL - Fabricante: Frenesius Kabi Áustria GmbH Graz / Áustria, importado e distribuído por Frenesius Brasil Ltda.

QUADRO 1- Denominação dos grupos, doses e volumes administrados , via de administração e números de animais (N).

3.2 Desenho do estudo (Figura 2 e Figura 3)

Modelo experimental 1: (GSa1h; GAg1h)



Modelo experimental 2: (GSa3h; GAg3h)

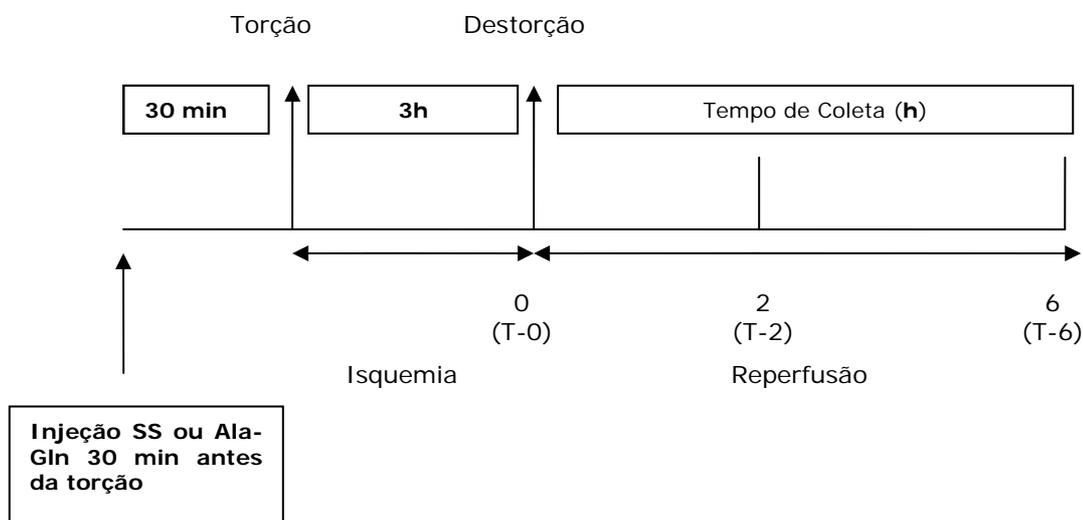


FIGURA 2- Desenho do estudo – Modelos experimentais 1 e 2: Aplicação intravenosa de Solução Salina 0,9% (SS) ou de L-alanil-glutamina (Ala-Gln) 30 minutos antes da torção testicular. Tempo de isquemia de 1 ou 3 horas, seguida de destorção. Coletas: 0h (tempo de isquemia máxima) (T-0), 2h (T-2) ou 6 horas (T-6) após destorção. Este modelo foi aplicado aos grupos GSa1, Gag1, GSa3 e Gag3 (grupos teste com seus respectivos controles).

Modelo experimental simulado: (SHAM 1; SHAM 2)

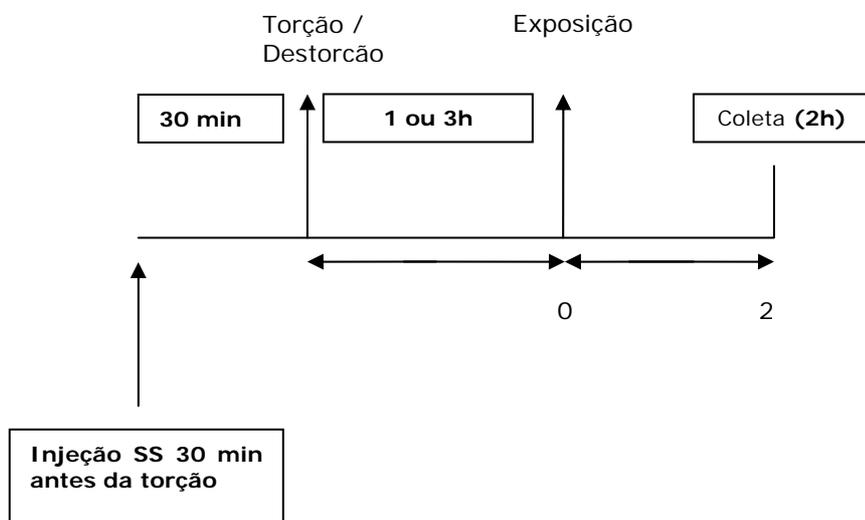


FIGURA 3- Desenho do estudo – Modelo experimental simulado: Aplicação intravenosa de Solução Salina 0,9% (SS) 30 minutos antes simulação da indução de isquemia (torção/destorção testicular). Tempo de isquemia simulada de 1 ou 3 horas, seguida de exposição do testículo. Coleta: 2h após a exposição. Este modelo foi aplicado aos grupos simulados (SHAM 1 e SHAM 2).

3.3 Indução da isquemia e fixação do testículo

A isquemia testicular foi obtida por torção do cordão espermático direito no sentido horário através de duas voltas completas (720°), seguida de fixação do testículo direito ao mesórquio para evitar destorção espontânea, segundo a técnica atraumática descrita por Ryan *et al* (1988). Nesta técnica, não há qualquer lesão cirúrgica do parênquima tecidual, sendo este modelo experimental de isquemia testicular, o que mais se assemelha ao que acontece na torção do cordão espermático em humanos.

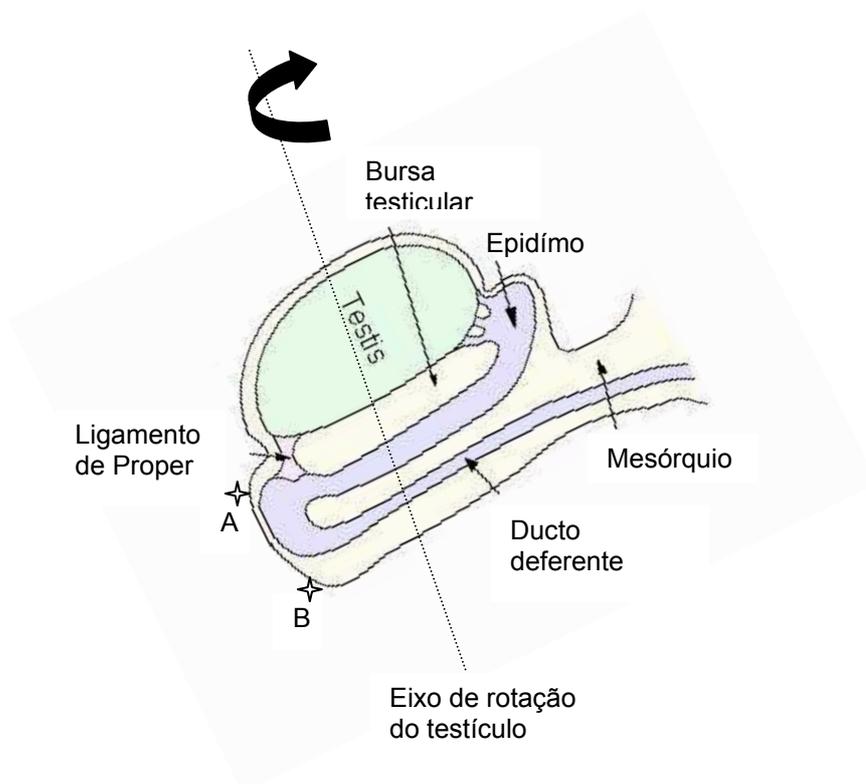


FIGURA 4- Desenho esquemático do modelo experimental minimamente traumático de torção do cordão espermático, obtida pela rotação no sentido horário de 2 voltas completas (720°) e fixação através da aproximação dos pontos A e B, que delimitam a borda livre do mesórquio. Testículo, epidídimo, bursa testicular ducto deferente, ligamento de Proper e mesórquio identificados na ilustração, ficando as demais estruturas anatômicas subentendidas.

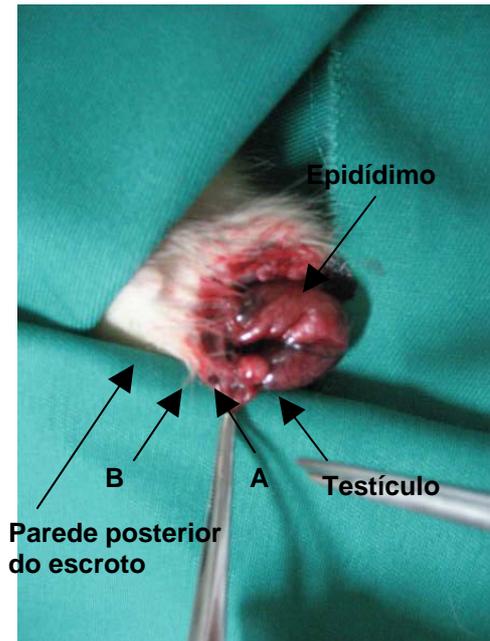


FIGURA 5- Fixação do testículo – representação dos pontos A e B (borda livre do mesórquio) aproximados, fixando o testículo submetido à rotação de 720°, segundo a técnica minimamente traumática (RYAN; GOREY; FITZPATRICK). O Ponto [A] localizado junto ao testículo e o ponto [B] situado junto à parede posterior do escroto. Pode-se observar o aspecto cianótico do testículo ingurgitado.

3.4 O estudo

Antes do início do experimento, os animais foram submetidos a jejum com oferta de água durante 12 horas. Cada rato foi examinado e pesado individualmente para o cálculo da dose de L-Alanil-Glutamina nos grupos teste e para o cálculo da dose de anestésico a ser administrada.

Os anestésicos usados no experimento foram o cloridrato de ketamina a 5% na apresentação 50mg/mL (Vetanarcol®), associado ao cloridrato de xilazina a 2% na apresentação 20mg/mL (Kensol®). As duas drogas eram misturadas numa mesma seringa e aplicadas por via intraperitoneal, sendo a ketamina na dose de 90 mg/Kg e a xilasina na dose de 10mg/Kg. O animal era, então, observado sobre uma bancada durante alguns segundos, até a obtenção de uma sedação e analgesia que permitisse o início do procedimento. Em seguida, era posicionado em decúbito dorsal e imobilizado sobre uma prancha de madeira revestida por uma lâmina de plástico fenólico, acoplada a um foco luminoso.

Durante o experimento, de acordo o nível de sensibilidade individual à anestesia, doses complementares consecutivas eram administradas, quando

necessárias, para assegurar uma manutenção adequada da sedação em plano cirúrgico, sendo o nível anestésico avaliado clinicamente, pela frequência de movimentos respiratórios e abalos musculares.

Os animais foram submetidos, após indução anestésica, à dissecação da veia femoral esquerda, para administração de solução salina ou L-alanil-glutamina trinta minutos antes da torção do cordão espermático, conforme o grupo o qual estava sendo feito o procedimento cirúrgico experimental.

Durante o experimento foram realizadas três intervenções cirúrgicas: a primeira tinha como objetivo a torção do cordão espermático para indução da isquemia e fixação do testículo nos grupos controle (Gsa1h e GSa3h) e grupos teste (GAg1h e GAg3h) ou o procedimento simulado (Grupo Sham 1 e Sham 2); a segunda visava restabelecer o fluxo sanguíneo ao testículo, permitindo a reperfusão do órgão ou coleta de material nos subgrupos T-0(Gsa1 e GSa3; GAg1 e GAg3), ou apenas sua exteriorização nos grupos simulados (Sham 1 e Sham 2); a terceira intervenção teve como objetivo a coleta do material para análise laboratorial (todos os grupos, tempos T-2 e T-6).

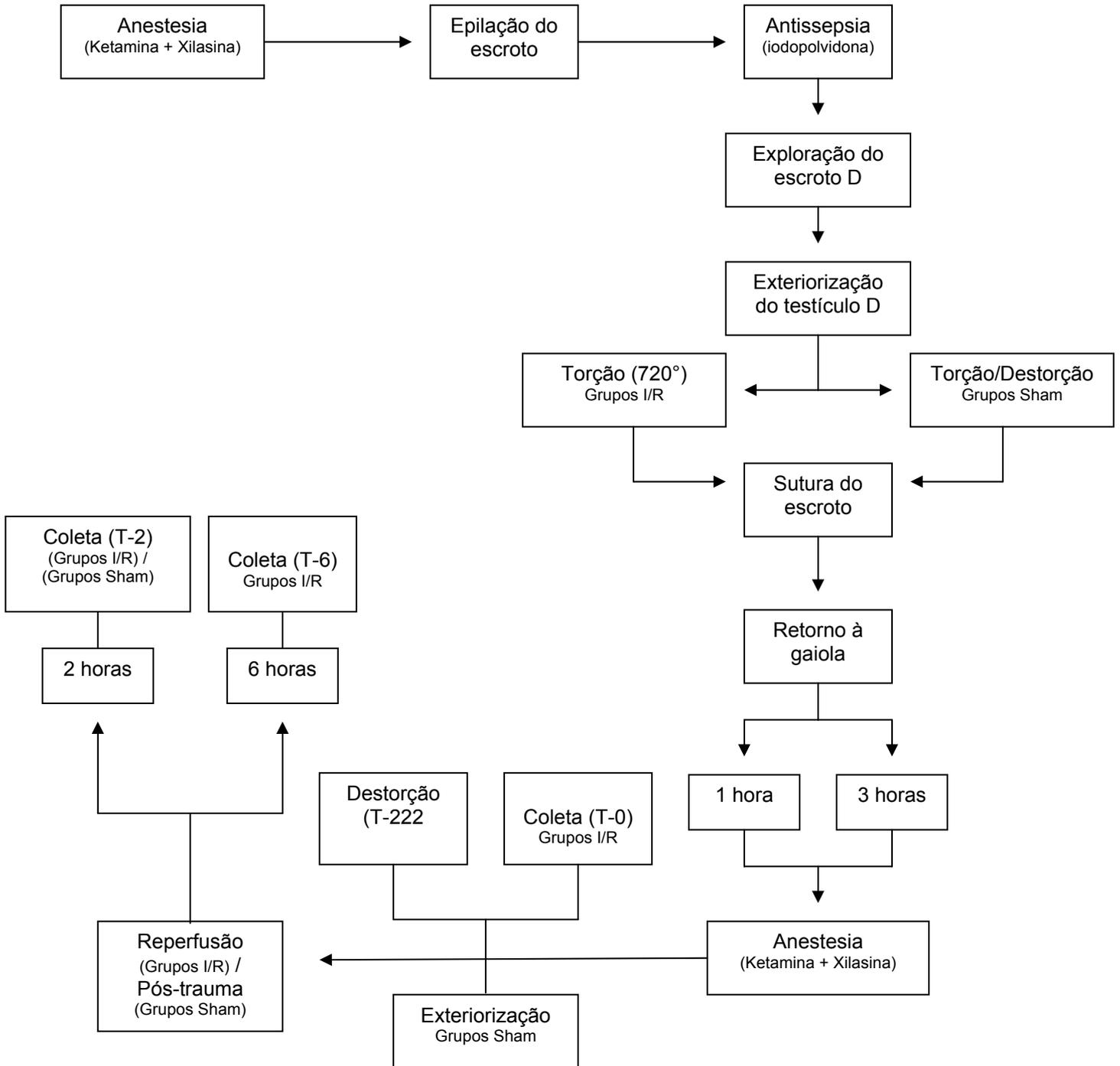
Todas as etapas do experimento, para permitir sua reprodutibilidade, estão detalhadamente descritas a seguir:

- a) indução da anestesia e colocação do animal em decúbito dorsal, com as patas dianteiras e traseiras fixadas à prancha por tiras de esparadrapo;
- b) epilação do escroto por tricotomia;
- c) antissepsia do escroto e região inguinal com solução de polivinilpirrolidona-iodo;
- d) exploração cirúrgica por acesso através de incisão longitudinal no escroto direito (2 a 3 cm de comprimento), liberação e divulsão delicada das fibras do músculo dartos;
- e) exteriorização do testículo direito por pequena abertura da túnica vaginal através de leve expressão, evitando-se tração por instrumento cirúrgico ou qualquer outro tipo de trauma;
- f) indução da isquemia do testículo por torção de 720° no sentido horário (duas voltas completas do cordão espermático em torno do seu eixo transversal), seguida de fixação da gônada ao mesórcio, com fio de seda 4-0, para evitar a destorção espontânea (Figuras 4 e 5); nos animais dos grupos Sham 1 e Sham 2, logo após completar-se a torção do cordão espermático, era

- imediatamente realizada a destorção, seguida da colocação de um fio de sutura (seda 4-0) no mesórquio, como descrito anteriormente, sem, no entanto, provocar qualquer tipo de ligadura ou trauma ao testículo;
- g) fechamento do escroto em um só plano com suturas contínuas, utilizando fio de nailon monofilamentar 5-0;
 - h) retorno do animal à gaiola para recuperação anestésica;
 - i) decorrida 1 ou 3 horas (de acordo com o grupo), o animal era submetido novamente à anestesia e após remoção das suturas do escroto e da sutura de fixação no mesórquio, era efetuada a destorção completa do cordão espermático; o testículo era então recolocado na cavidade escrotal, seguindo-se a sutura do escroto num só plano utilizando fio de nailon monofilamentar 5-0;
 - j) nos animais dos subgrupos T-0, sob anestesia, após a remoção das suturas do escroto, ao invés de ter sido realizada a destorção, procedia-se à exteriorização da gônada, um pinçamento do cordão espermático para evitar a reperfusão momentânea, sendo, a seguir, realizada a excisão testículo isquêmico para análise laboratorial;
 - k) nos animais dos grupos Sham 1 e 2, sob efeito anestésico, após a remoção das suturas do escroto, o testículo era exteriorizado por 30 segundos, o fio de sutura previamente colocado no mesórquio era retirado e a gônada recolocada na cavidade escrotal, seguindo-se a sutura da incisão num só plano, utilizando fio nailon monofilamentar 5-0;
 - l) os animais são recolocados dentro das gaiolas, após a destorção testicular, e permanecem durante o período de reperfusão da gônada;
 - m) decorridas 2 horas de reperfusão, os animais dos subgrupos T-2 e dos grupos Sham 1 e 2, sob anestesia, após a remoção das suturas do escroto, exteriorização da gônada e pinçamento do cordão, foram submetidos à excisão testículo reperfundido para análise laboratorial;
 - n) decorridas 6 horas de reperfusão, os animais dos subgrupos T-6, sob anestesia, após a remoção das suturas do escroto, exteriorização da gônada e pinçamento do cordão, foram submetidos à excisão testículo reperfundido para análise laboratorial;

o) após a coleta das amostras para análise, os animais eram mortos individualmente, sendo submetidos à overdose anestésica até parada completa dos sinais vitais;

O fluxograma abaixo ilustra todas as etapas do experimento:



Grupos I/R: Gsa1h, GSa3h, GAg1h e GAg3h.

Grupos Sham: Sham 1 e Sham 2.

FIGURA 6 – Fluxograma do experimento.

3.4.1 Preparação das drogas utilizadas

A solução salina utilizada no estudo foi produzida pela Química Farmacêutica Gaspar Viana (Fortaleza, CE), sendo administrado um volume padronizado de 2,0 mL .

A L-alanil-glutamina (Dipeptiven® - composição: (=8,20g L-alanina;13,46g L-glutamina)20 g; água para injeção q.s.p 100 mL) foi fabricada pela Frenesius Kabi Áustria GmbH Graz / Áustria, importada e distribuída por Frenesius Brasil Ltda. Portanto, o Dipeptiven® é uma solução de L-alanil-glutamina a 20%, ou seja, cada mL contém 0,2g , sendo aplicada dose única de 0,75g/Kg, 30 minutos antes do início do experimento, completando-se o volume administrado com solução salina 0,9% para atingir um volume final de 2,0 mL.

3.4.2 Técnica laboratorial

3.4.2.1 *Preparação dos espécimes (tecido testicular)*

Após a remoção do epidídimo, os testículos eram lavados com soro fisiológico gelado (4°C) para remoção dos resquícios de sangue, e imediatamente mergulhados em nitrogênio líquido a cerca de - 190°C. Após o congelamento, procedeu-se à fragmentação do material utilizando-se grau pistilo de porcelana. Os fragmentos. Em número variável (4 a 6), foram colocados em tubos de ensaio e armazenados a - 70°C, até sua utilização.

3.4.2.2 *Avaliação da peroxidação lipídica*

A técnica tem por objetivo quantificar o dialdeído malônico (MDA) formado na peroxidação lipídica. Procedeu-se, a seguir, a extração deste composto usando um solvente orgânico (n-butanol), determinando-se a concentração de MDA que será expressa como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Utilizou-se neste estudo, para quantificação do teor de TBARS no tecido (testículo) o teste de Uchiyama e Mihara (1978), semelhante ao acima descrito, onde a concentração de TBARS é expressa em $\mu\text{mol MDA/g}$ de tecido.

Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no testículo:

O MDA é capaz de reagir, sob aquecimento em meio ácido, com o ácido tiobarbitúrico originando um composto de cor rosa.

Reagentes:

Cloreto de potássio: 1,15%

Ácido tiobarbitúrico: 0,6%

Ácido fosfórico: 1%

N-Butanol

Procedimento:

O teor de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$ de tecido) foi quantificado pelo método de Uchiyama e Mihara (1978), freqüentemente utilizado para estimar a peroxidação lipídica. A amostra do tecido (testículo) a ser analisada foi congelada em nitrogênio líquido e estocada a -70°C imediatamente após a coleta e lavagem com soro fisiológico gelado (-4°C) para remover quaisquer vestígios de sangue. Após pesagem, a amostra de tecido foi homogenizada em KCl 1,15% gelado, resultando uma solução ácida com concentração a 10%. Retirou-se uma alíquota de 0,5mL de cada amostra, e acrescentou-se 1,0 mL da solução aquosa de TBA 0,6% e 3,0 mL da solução de ácido fosfórico (H_3PO_4 , 1%). A mistura foi colocada em banho fervente por 45 minutos, resfriada em banho de gelo, seguido da adição de 4,0 mL de N-butanol. Após dois minutos de agitação, a mistura foi centrifugada por dez minutos a 3.000 r.p.m. A absorbância da camada orgânica sobrenadante (fase butanólica) foi medida em espectrofotômetro Beckman DU-640 (Fullerton, Califórnia) a 520 nm e 535 nm.

A diferença entre os valores obtidos nas duas leituras foi utilizada para calcular a concentração de TBARS, usando a regressão linear a partir de uma curva padrão, adrede preparada. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol MDA/g}$ de tecido fresco.

3.4.2.3 Determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos (Glutathiona-GSH)

A determinação dos grupos SH é realizada pelo método de Sedlak e Lindsay (1968), baseado na reação do 5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB – reagente de Ellman) com o tiol livre, originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A medida do produto de reação formado é feita por leitura da absorbância a 412nm em espectrofotômetro Beckman DU-640 (Fullerton, Califórnia).

Drogas e reagentes

Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)

Ácido tricloroacético (ATC, 50%)

Tampão TRIS 0,4 M pH 8,9

5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) 0,5M

Metanol

Glutathiona (GSH, 1mg/mL)

Preparação dos reagentes:

Ácido tricloroacético 50% - diluído em água destilada

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

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

Reação



Procedimento

A amostra de testículo (500 mg) é pesada e homogeneizada em 5 mL de EDTA 0,02M gelado, com bastão de vidro e filtrado em lã de vidro. Retiram-se 4,0 mL do homogenado e mistura-se com 3,2 mL de água destilada e 0,8 mL de ácido tricloroacético 50%. O tubo é agitado e centrifugado a 3000 r.p.m. por 15 minutos. Retiram-se 2,0 mL do sobrenadante e acrescenta-se 4,0 mL de TRIS 0,4M (pH 8,9) e 1,0 mL de DTNB 0,01M; agita-se a mistura para homogeneização. Em seguida,

lêem-se as absorvâncias no espectrofotômetro à 412nm, 5 minutos após a adição do DTNB. A concentração final de GSH é obtida comparando-se o valor da absorvância com uma tabela padrão de GSH, previamente preparada.

3.5 Análise estatística

Para todas as variáveis, realizou-se uma análise descritiva dos dados, determinando-se as curvas de normalidade, aplicando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov e calculada a média amostral e o erro padrão da média (E.P.M). Tem-se:

$$E.P.M. = s/\sqrt{n}, \text{ onde } s \text{ é o desvio padrão amostral e } n \text{ o tamanho da amostra.}$$

Foi realizada comparação transversal dos valores de TBARS na amostra de tecido realizadas entre o grupo Sham 1 com o subgrupo T-2 do grupo Salina 1h para validação do modelo 1, utilizando o teste *t* de Student, após comprovação da normalidade da distribuição das variáveis pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (com cálculo do valor *P* pelo método de Dalal-Wilkinson-Liliiefor). As demais análises comparativas entre os subgrupos T-2 dos grupos controle com os animais do grupo sham para comprovação dos modelos 1 e 2 foram realizadas através do teste de Mann-Whitney. Ao serem comparados os grupos controle com os grupos que receberam L-alanil-glutamina, para avaliar seus efeitos na isquemia/reperfusão, foram usados os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis com comparações temporais pelo teste de Dunn.

Os cálculos estatísticos foram realizados com auxílio dos programas de análise estatística *GraphPad InStat*® versão 3.00 e *GraphPrism*® versão 4.00 para *Window*, *GraphPad Software, San Diego, Califórnia, U.S.A., www.graphpad.com*.

Os resultados foram apresentados sob a forma de tabelas e gráficos. A significância estatística foi fixada em 0,05% ($p < 0,05$), assinalando-se com o símbolo [*] os valores significantes nas comparações inter-grupais e com os símbolos [††] nas comparações das variações temporais entre os diversos subgrupos (T-0, T-2 e T-6) do mesmo grupo.

4. RESULTADOS

4.1 Validação dos modelos experimentais

4.1.1 Modelo 1: Isquemia: 1 h / Reperusão: 2 h (TBARS)

Alterações das concentrações teciduais de TBARS em ratos tratados com solução salina e submetidos ao procedimento cirúrgico simulado (*Sham*) comparados aos ratos tratados com solução salina e submetido à isquemia (1h) seguida de reperusão (2 h).

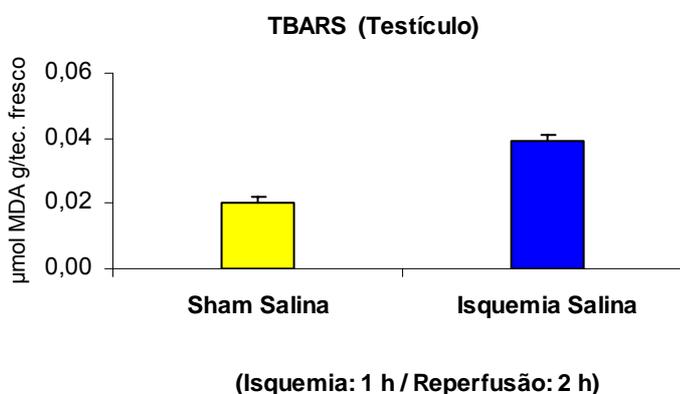
(Tabela 1, Figura 7)

Não se observaram alterações significantes nas concentrações de TBARS, no testículo dos ratos tratados com solução salina e submetidos ao procedimento cirúrgico simulado (*Sham*) comparados aos ratos tratados com solução salina e submetido à isquemia (1h) seguida de reperusão (2 h).

TABELA 1 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$ de tecido fresco) no testículo, comparando-se os grupos Salina + *Sham* (Simulado) e Salina + I/R submetidos ao procedimento cirúrgico simulado e à torção (isquemia – 1 h) e destorção (Reperusão- 2 h) do cordão espermático

TRATAMENTO (Sham /Isquemia: 1 h)	Tempo de reperusão/pós trauma: 2 h
Solução Salina + <i>Sham</i>	0,020 \pm 0,002
Solução salina + I/R	0,039 \pm 0,011

Teste t de Student em 6 ratos . (Média \pm E.P.M)



Teste t de Student em 6 ratos (Média \pm E.P.M).

FIGURA 7 - Barras representam as concentrações de TBARS, em ratos submetidos ao procedimento cirúrgico simulado ou a 1 h de isquemia e 2 horas de reperusão, comparando-se os grupos Sham Salina e Isquemia salina.

4.1 Validação dos modelos experimentais

4.1.2 Modelo 1: Isquemia: 1 h / Reperusão: 2 h (GSH)

Alterações das concentrações teciduais de GSH em ratos tratados com solução salina e submetidos ao procedimento cirúrgico simulado (*Sham*) comparados aos ratos tratados com solução salina e submetido à isquemia (1h) seguida de reperusão (2 h).

(Tabela 2, Figura 8).

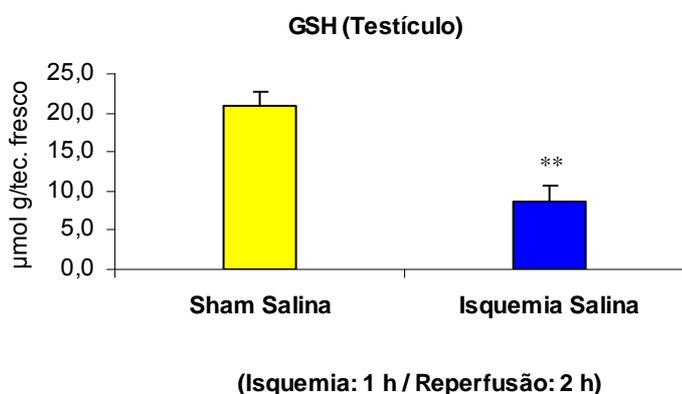
Observou-se redução significativa nas concentrações de GSH, no testículo dos ratos tratados com solução salina e submetido à isquemia (1h) seguida de reperusão (2 h) comparados aos ratos tratados com solução salina e submetidos ao procedimento cirúrgico simulado (*Sham*).

TABELA 2– Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco) no testículo, comparando-se os grupos Salina + *Sham* (Simulado) e Solução salina + I/R submetidos ao procedimento cirúrgico simulado e à torção (isquemia – 1 h) e destorção (Reperusão- 2 h) do cordão espermático

TRATAMENTO (Sham /Isquemia: 1 h)	Tempo de reperusão/pós trauma: 2 h
Solução Salina + <i>Sham</i>	$20,9 \pm 0,8$
Solução salina + I/R	$8,8 \pm 1,89^{**}$

Teste de Mann-Whitney em 6 ratos (Média \pm E.P.M).

** $p < 0,01$ comparado ao grupo simulado



Teste de Mann-Whitney em 6 ratos (Média \pm E.P.M).

** $p < 0,01$ comparado ao grupo simulado

FIGURA 8 - Barras representam as concentrações de GSH em ratos submetidos ao procedimento cirúrgico simulado ou a 1 h de isquemia e 2 horas de reperusão, comparando-se os grupos Sham Salina e Isquemia Salina.

4.1 Validação dos modelos experimentais

4.1.3 Modelo 2: Isquemia: 3 h / Reperusão: 2 h (TBARS)

Alterações das concentrações teciduais de TBARS em ratos tratados com solução salina e submetidos ao procedimento cirúrgico simulado (*Sham*) comparados aos ratos tratados com solução salina e submetido à isquemia (3h) seguida de reperusão (2 h).

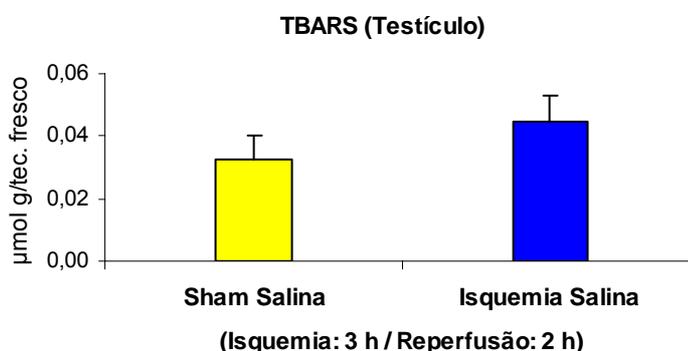
(Tabela 3, Figura 9).

Não se observaram alterações significantes nas concentrações de TBARS, no testículo dos ratos tratados com solução salina e submetidos ao procedimento cirúrgico simulado (*Sham*) comparados aos ratos tratados com solução salina e submetido à isquemia (3h) seguida de reperusão (2 h) .

TABELA 3 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$ de tecido fresco) no testículo, comparando-se os grupos Salina + *Sham* (Simulado) e Salina + I/R submetidos ao procedimento cirúrgico simulado e à torção (isquemia – 3 h) e destorção (Reperusão- 2h) do cordão espermático

TRATAMENTO (Sham /Isquemia: 3 h)	Tempo de reperusão/pós trauma: 2 h
Solução Salina + <i>Sham</i>	0,032 \pm 0,005
Solução salina + I/R	0,045 \pm 0,008

Teste de Mann-Whitney em 6 ratos (Média \pm E.P.M)



Teste de Mann-Whitney em 6 ratos (Média \pm E.P.M).

FIGURA 9 - Barras representam as concentrações de TBARS, em ratos submetidos ao procedimento cirúrgico simulado ou a 3 h de isquemia e 2 horas de reperusão, comparando-se os grupos Sham Salina e Isquemia Salina.

4.1.4 Modelo 2: Isquemia: 3 h / Reperusão: 2 h (GSH)

Alterações das concentrações teciduais de GSH em ratos tratados com solução salina e submetidos ao procedimento cirúrgico simulado (*Sham*) comparados aos ratos tratados com solução salina e submetido à isquemia (3h) seguida de reperusão (2 h).

(Tabela 4, Figura 10).

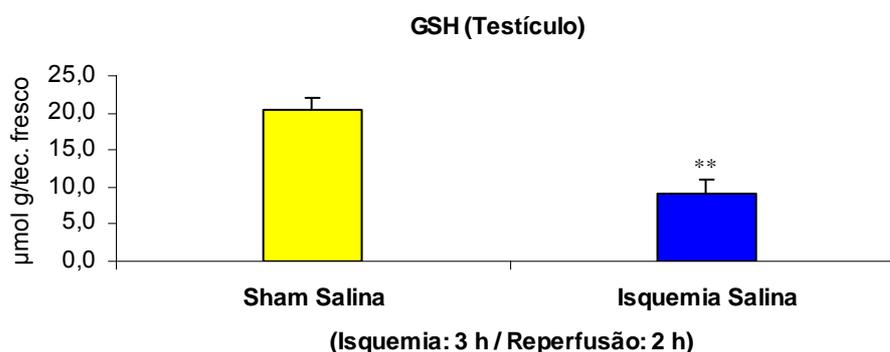
Observou-se redução significativa nas concentrações de GSH, no testículo dos ratos tratados com solução Salina e submetido à isquemia (3h) seguida de reperusão (2 h) comparados aos ratos tratados com solução salina e submetidos ao procedimento cirúrgico simulado (*Sham*)

TABELA 4– Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco) no testículo, comparando-se os grupos Salina + *Sham* (Simulado) e Solução salina + I/R submetidos ao procedimento cirúrgico simulado e à torção (isquemia – 3 h) e destorção (Reperusão- 2h) do cordão espermático

TRATAMENTO (Sham /Isquemia: 3 h)	Tempo de reperusão/pós trauma: 2 h
Solução Salina + <i>Sham</i>	20,3 \pm 2,39
Solução salina + I/R	9,15 \pm 1,79 **

Teste de Mann-Whitney em 6 ratos (Média \pm E.P.M)

** $p < 0,01$ comparado ao grupo simulado



Teste de Mann-Whitney em 6 ratos (Média \pm E.P.M)

** $p < 0,01$ comparado ao grupo simulado

FIGURA 10 - Barras representam as concentrações de GSH em ratos submetidos ao procedimento cirúrgico simulado ou a 3 h de isquemia e 2 horas de reperusão, comparando-se os grupos Sham Salina e Isquemia Salina.

4.2 Efeitos da L-Ala-Gln sobre a I/R

4.2.1 Modelo 1: Isquemia: 1 h / Reperusão: 6 h (TBARS)

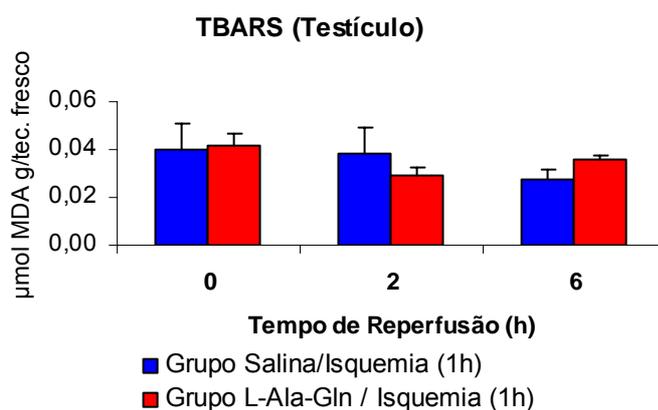
Alterações das concentrações teciduais de TBARS em ratos tratados com solução salina ou L-Ala-Gln e submetidos e submetidos à isquemia (1h) seguida de reperusão (6 h) no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperusão (T-2 e T-6). (Tabela 5, Figura 11)

Não se observaram alterações significantes nas concentrações de TBARS, no testículo dos ratos submetidos à isquemia (1h) seguida de reperusão (6h) e tratados com solução salina ou L-Ala-Gln em nenhum dos tempos estudados.

TABELA 5 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$ de tecido fresco) no testículo, comparando-se os grupos Salina e L-Ala-Gln submetidos à torção (isquemia – 1 h) e destorção (Reperusão- 6 h) no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperusão (T-2 e T-6).

TRATAMENTO	GRUPO	Tempo de reperusão (Horas)		
		0	2	6
Solução salina + I/R	Grupo Salina (1h)	0,040 \pm 0,011	0,039 \pm 0,011	0,028 \pm 0,004
L-Ala-Gln + I/R	Grupo L-Ala-Gln (1h)	0,042 \pm 0,005	0,029 \pm 0,004	0,036 \pm 0,001

Testes: Mann-Whitney e Kruskal-Wallis com comparações temporais pelo teste de Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm E.P.M)



Testes: Mann-Whitney e Kruskal-Wallis com comparações temporais pelo teste de Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm E.P.M)

FIGURA 11 - Barras representam as concentrações de TBARS, em ratos submetidos a 1 hora de isquemia e 6 horas de reperusão, comparando-se os grupos Salina e L-Ala-Gln no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperusão (T-2 e T-6).

4.2.2 Modelo 2: Isquemia: 3 h / Reperusão: 6 h (TBARS)

Alterações das concentrações teciduais de TBARS em ratos tratados com solução salina ou L-Ala-Gln e submetidos e submetidos à isquemia (3 h) seguida de reperusão (6 h) no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperusão (T-2 e T-6). (Tabela 6, Figura 12)

Houve redução significativa nas concentrações de TBARS, no testículo dos ratos submetidos à isquemia (3h) seguida de reperusão (6h) tratados L-Ala-Gln no tempo máximo de isquemia e após 2 horas de reperusão. Houve redução significativa concentrações teciduais de TBARS após 6 horas de reperusão, nos ratos tratados com solução salina, quando comparados às concentrações de TBARS no tempo máximo de isquemia.

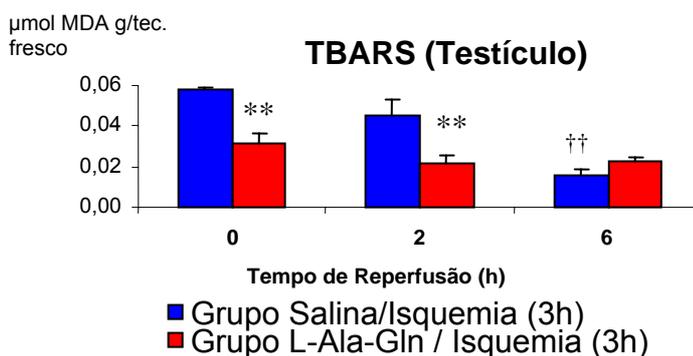
TABELA 6 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$ de tecido fresco) no testículo, comparando-se os grupos Salina e L-Ala-Gln submetidos à torção (isquemia – 1 h) e destorção (Reperusão- 6 h) no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperusão (T-2 e T-6).

TRATAMENTO	GRUPO	Tempo de reperusão (Horas)		
		0	2	6
Solução salina + I/R	Grupo Salina (3h)	0,058 \pm 0,001	0,045 \pm 0,008	0,016 \pm 0,003 ††
L-Ala-Gln + I/R	Grupo L-Ala-Gln (3h)	0,031 \pm 0,005 **	0,022 \pm 0,0034 *	0,022 \pm 0,003

Testes: Mann-Whitney e Kruskal-Wallis com comparações temporais pelo teste de Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm E.P.M)

** p<0.001 comparado ao respectivo controle

†† p<0.01 comparado ao Tempo T-0



Testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis com comparações temporais pelo teste de Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm E.P.M)

** p<0.001 comparado ao respectivo controle

†† p<0.001 comparado ao Tempo T-0

FIGURA 12 - Barras representam as concentrações de TBARS, em ratos submetidos a 1 hora de isquemia e 6 horas de reperusão, comparando-se os grupos Salina e L-Ala-Gln no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperusão (T-2 e T-6).

4.2.3 Modelo 1: Isquemia: 1 h / Reperusão: 6 h (GSH)

Alterações das concentrações teciduais de GSH em ratos tratados com solução salina ou L-Ala-Gln e submetidos e submetidos à isquemia (1h) seguida de reperusão (6 h) no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperusão (T-2 e T-6). (Tabela 7, Figura 13)

Houve aumento significativo das concentrações de GSH, no testículo dos ratos submetidos à isquemia (1h) seguida de reperusão (6h) e tratados com L-Ala-Gln em todos os tempos estudados.

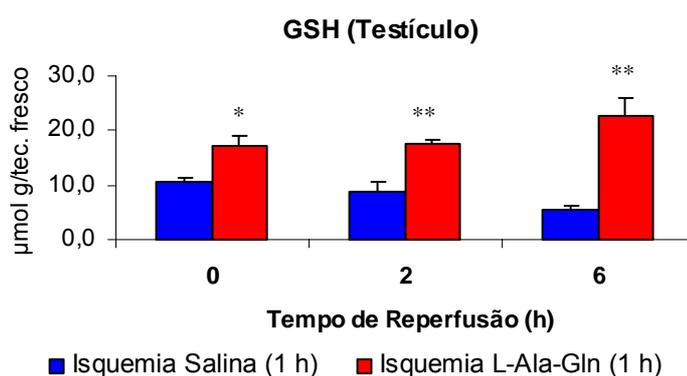
TABELA 7 – Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco) no testículo, comparando-se os grupos Salina e L-Ala-Gln submetidos à torção (isquemia – 1 h) e destorção (Reperusão- 6 h) no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperusão (T-2 e T-6).

TRATAMENTO	GRUPO	Tempo de reperusão (Horas)		
		0	2	6
Solução salina + I/R	Grupo Salina (1h)	10,72 \pm 0,64	8,80 \pm 1,89	5,35 \pm 0,86
L-Ala-Gln + I/R	Grupo L-Ala-Gln (1h)	17,11 \pm 1,88 *	17,49 \pm 0,69 **	22,78 \pm 3,13 **

Testes: Mann-Whitney e Kruskal-Wallis com comparações temporais pelo teste de Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm E.P.M)

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

** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle



Testes: Mann-Whitney e Kruskal-Wallis com comparações temporais pelo teste de Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm E.P.M)

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

** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle

FIGURA 13 - Barras representam as concentrações de GSH, em ratos submetidos a 1 hora de isquemia e 6 horas de reperusão, comparando-se os grupos Salina e L-Ala-Gln no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperusão (T-2 e T-6).

4.2.3 Modelo 2: Isquemia: 3 h / Reperusão: 6 h (GSH)

Alterações das concentrações teciduais de GSH em ratos tratados com solução salina ou L-Ala-Gln e submetidos e submetidos à isquemia (3h) seguida de reperusão (6 h) no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperusão (T-2 e T-6). (Tabela 8, Figura 14)

Houve aumento significativo das concentrações de GSH, no testículo dos ratos submetidos à isquemia (3h) seguida de reperusão (6h) e tratados com solução salina ou L-Ala-Gln no tempo máximo de isquemia (T-0) e após 6 horas de reperusão. Houve redução significativa das concentrações de GSH após 2 horas de reperusão nos ratos tratados com L-Ala-Gln comparado ao T-0.

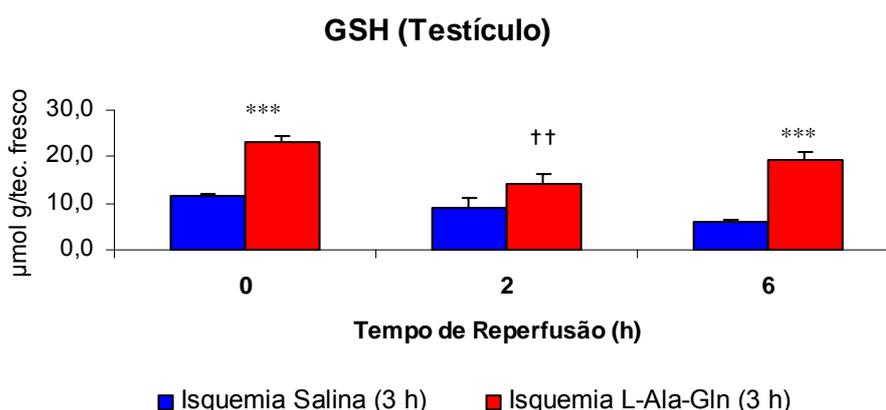
TABELA 8 – Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco) no testículo, comparando-se os grupos Salina e L-Ala-Gln submetidos à torção (isquemia – 3 h) e destorção (Reperusão- 6 h) no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperusão (T-2 e T-6).

TRATAMENTO	GRUPO	Tempo de reperusão (Horas)		
		0	2	6
Solução salina + I/R	Grupo Salina (3h)	11,50 \pm 0,50	9,15 \pm 1,79	5,87 \pm 0,71
L-Ala-Gln + I/R	Grupo L-Ala-Gln (3h)	23,28 \pm 1,16 ***	13,99 \pm 2,45 ††	19,10 \pm 1,93 ***

Testes: Mann-Whitney e Kruskal-Wallis com comparações temporais pelo teste de Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm E.P.M)

*** $p < 0.0001$ comparado ao respectivo controle

†† $p < 0.001$ comparado ao Tempo T-0



Testes: Mann-Whitney e Kruskal-Wallis com comparações temporais pelo teste de Dunn em 6 e 18 ratos (Média \pm E.P.M)

**** $p < 0.0001$ comparado ao respectivo controle

†† $p < 0.001$ comparado ao Tempo T-0

FIGURA 14 - Barras representam as concentrações de GSH, em ratos submetidos a 3 horas de isquemia e 6 horas de reperusão, comparando-se os grupos Salina e L-Ala-Gln no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperusão (T-2 e T-6).

4 DISCUSSÃO

O rato foi o animal escolhido para o experimento por ter sido utilizado em diversas outras pesquisas com modelos de isquemia/reperfusão do testículo, pela facilidade de manipulação, baixo custo de manutenção, resistência ao trauma cirúrgico e a infecções (FESTIN, 1979).

A Ketamina e xilasina foram utilizadas como anestésicos durante o experimento, já que são freqüentemente usados para induzir anestesia em animais, sendo adequada pela via intraperitoneal seu uso em ratos. Essa combinação proporciona um plano anestésico profundo, que permite a realização de procedimentos que exijam grande manipulação do animal (SUMITRA, 2004; RODRIGUES, 2006). A ketamina tem diversas importantes propriedades, como efeito analgésico e baixo potencial de indução de depressão cardiorrespiratória quando utilizada em doses habituais (REINKE, 1998). Ela pode ser convertida em compostos intermediários de radicais de livres sob condições oxidativas. Contudo, é importante ressaltar que os radicais nítróxido formados a partir da ketamina durante a anestesia, não culminam com repercussão toxicológica, não causando reações associadas à formação de radicais livres que causem dano tecidual, como, por exemplo, ao fígado ou ao rim (REINKE, 1998). A estabilidade dos radicais nítróxido oriundos da ketamina torna improvável o início de uma cascata secundária de reações mediadas por radicais livres, tornando sua relativa ausência de toxicidade previsível, ao contrário do halotano, anestésico inalatório que tem notada hepatotoxicidade mediada pela ação de espécies reativas do metabolismo do oxigênio (REINKE, 1998).

Neste estudo, o modelo experimental usado para induzir isquemia e reperfusão na gônada do animal foi descrito por Ryan *et al.* em 1988. Neste modelo, a torção do testículo é feita através da execução de duas voltas completas (720°) e fixação do ligamento mesorquial (sutura transmesorquial), permitindo um insulto vascular ideal, sem trauma parenquimatoso, assemelhando-se ao que acontece no quadro clínico encontrado em humanos. Inicialmente o retorno venoso é comprometido, e o edema progressivo gera um crescente aumento da tensão no tecido testicular e no cordão espermático. Após certo tempo, o fluxo arterial também sofre interrupção (RYAN; GOREY; FITZPATRICK, 1988).

A torção experimental de 360° é ineficaz do ponto de vista da produção de congestão venosa e estase arterial (RYAN; GOREY; FITZPATRICK, 1988). A fixação transparenquimal, apesar de produzir alterações semelhantes, gera lesões adicionais, causadas pelo trauma da passagem da agulha de sutura pelo parênquima, que podem invalidar os resultados do experimento (GUIMARÃES, 2005). Dixon et al. (1993) estudaram os efeitos da fixação transparenquimal do testículo, utilizando diferentes fios de sutura, evidenciando reação inflamatória em todos os casos.

Akugür *et al* (1994a) estudaram as alterações bioquímicas agudas no testículo do rato submetido à torção seguida de destorção do cordão espermático (720°), avaliando os níveis de TBARS após períodos crescentes de isquemia (3, 6, 12, 24 horas). Nos animais submetidos a 6, 12 e 24 horas de isquemia seguida de 2 horas de reperfusão, não houve aumento dos níveis de TBARS, por conseguinte, não sendo demonstrada lesão adicional durante o período de reperfusão, provavelmente pela grande intensidade do dano ao testículo provocado por períodos de isquemia mais prolongados (AKUGÜR, 1994a).

A lesão de reperfusão não ocorre após um período de isquemia maior que 6 horas, seguido de até 4 horas de reperfusão (AKUGÜR, 1994a). Períodos de isquemia maiores que 4 a 6 horas resultam em lesão tecidual permanente (RALITCHKOVA *et al*, 1990; BECKER e TURNER, 1995). Contudo, Anderson e Williamson (1988) consideram que o dano testicular permanente em humanos ocorre em períodos de isquemia que duram mais que 12 horas, recomendando a preservação do testículo em situações de intervalos de tempo inferiores a esse período.

No delineamento desta pesquisa, o período de reperfusão estipulado foi de 2 e 6 horas, já que segundo o estudo de Turan, Küçükaydin e Bekereciöglül (1996), a lipoperoxidação não é um fenômeno importante no testículo em períodos de reperfusão superiores a 6 horas, após 3 horas de isquemia.

No presente estudo, o período de isquemia estipulado em 1 hora foi baseado no estudo de Akugür *et al* (1994b), que testou o efeito do alopurinol sobre a gônada de ratos submetidos a tempos diversos de isquemia (1, 3 e 5 horas) obtida por torção de 720°, seguida de 2 horas de reperfusão. Os animais submetidos à 1 hora de torção testicular apresentaram níveis de TBARS estatisticamente inferiores aos submetidos ao mesmo tempo de isquemia seguida de 2 horas de reperfusão,

demonstrando que tal período de isquemia pode ser sucedido de lesão adicional após 2 horas de reperfusão.

O tempo de isquemia de 3 horas foi definido nesta pesquisa, observando o sucesso de alguns estudos tais como TURNER, 1985; RALITCHOVA *et al.*, 1990; TUNER, BROWN, 1993; AKGÜR *et al.*, 1994b; ABES *et al.*, ROMEO *et al.*, 1994; OZAKAN *et al.*, 2004 e GUIMARÃES, 2005.

A utilização da glutamina no estudo, já usada em diversas pesquisas que avaliaram situações de lesão tecidual induzida por isquemia e reperfusão em diversos órgãos, foi motivada pela maior necessidade da observação do seu efeito sobre o estresse oxidativo no testículo.

A forma livre da glutamina (L-glutamina) é pouco solúvel em meio aquoso e altamente instável em baixo pH e altas temperaturas. Portanto, frente a essas limitações, recomenda-se a administração deste aminoácido em sua forma precursora: glicil-glutamina (Gly-Gln) ou a alanil-glutamina (Ala-Gln) que apresentam alta solubilidade em água e estabilidade durante os procedimentos de preparo, armazenamento e administração das soluções nutricionais. A hidrólise acontece imediatamente quando o dipeptídeo (Alanil-glutamina) chega à corrente sanguínea, sendo liberada alanina e glutamina (SOUBA *et al.*, 1993).

Kohn e Liversedge, em 1944, introduziram o teste com o ácido tiobarbitúrico (TBA), que nos dias de hoje, ainda é um método bastante difundido quando se quer avaliar a peroxidação lipídica (CHIRICO, 1994). A quantificação substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) está descrita em trabalhos que as utilizaram para avaliar o grau de peroxidação lipídica em modelos experimentais de isquemia e reperfusão do testículo através da torção do cordão espermático (AKGÜR *et al.*, 1994; OZKAN *et al.*, 2004; WILHELM FILHO *et al.*, 2004; GUIMARÃES, 2005).

Os níveis intracelulares elevados de glutathione reduzida (GSH) estão associados com a resistência de um tecido ao estresse oxidativo. A ação deletéria dos radicais livres pode causar mudanças no estado redox da glutathione, aumentando a liberação da glutathione oxidada (dissulfeto) e diminuindo os níveis de glutathione reduzida. Assim, alguns estudos têm direcionado o interesse no monitoramento de glutathione em amostras biológicas com o propósito de estudar-se o efeito de drogas em tecidos submetidos ao estresse oxidativo (NAVARRO, 1999).

Um dos papéis do ciclo redox da glutathione e das enzimas que compõem seu metabolismo é o de manter os hidroperóxidos lipídicos em níveis controlados, para

evitar danos celulares provenientes do ataque desses radicais. Assim, os níveis de glutathiona podem fornecer importantes informações bioquímicas do balanço oxidante-antioxidante no organismo, podendo assim, a quantificação de glutathiona ser indicador dos níveis de processos de lipoperoxidação (ROVER JÚNIOR, 2001).

A validação do modelo de isquemia foi feita através de estudos estatísticos comparando-se os marcadores de lesão tecidual dos ratos dos grupos controle (grupo salina 1h e grupo salina 3h) com os ratos do grupo simulado (sham 1h e sham 3h). Foram medidas as concentrações de TBARS e GSH no homogenado de testículo dos animais. Os valores aferidos após decorrida isquemia e reperfusão dos grupos controle, foram comparados aos valores medidos nos animais submetidos ao procedimento simulado.

No presente estudo, nos grupos controle (pré-tratados com solução salina) submetidos a 1 ou 3 horas de isquemia e posteriormente a 2 horas de reperfusão, observaram-se níveis de GSH de $8,8 \pm 1,89 \mu\text{mol/g}$ e $9,15 \pm 1,79 \mu\text{mol/g}$ respectivamente. Nos grupos nos quais os animais foram submetidos a semelhantes procedimentos simulados, os níveis de GSH foram respectivamente $20,9 \pm 0,8 \mu\text{mol/g}$ e $20,3 \pm 2,39 \mu\text{mol/g}$. Analisando esses valores, pode-se demonstrar redução significativa dos níveis de GSH nos animais submetidos à isquemia/reperfusão quando comparados aos animais do grupo simulado (Tabela 2, Figura 8 e Tabela 4, Figura 10), comprovando que o modelo experimental produziu isquemia/reperfusão capaz de gerar redução do estresse oxidativo. Na figura 18 (Anexo 1) está ilustrada a atividade do sistema antioxidante no qual faz parte a glutathiona e as enzimas do seu ciclo metabólico.

Outro parâmetro utilizado para validação do modelo foi o estudo das concentrações de TBARS no testículo dos animais submetidos à operação simulada (grupos SHAM) e à isquemia/reperfusão (grupos controle). Nos grupos submetidos à isquemia (1 ou 3 horas) seguida de 2 horas de reperfusão, os valores de TBARS obtidos foram $0,039 \pm 0,011 \text{ MDA/g}$ para o grupo que sofreu 1 hora de isquemia e $0,045 \pm 0,008 \text{ MDA/g}$ para o grupo que sofreu 3 horas de isquemia. Nos respectivos grupos simulados, os valores de TBARS foram $0,020 \pm 0,002 \text{ MDA/g}$ e $0,032 \pm 0,005 \text{ MDA/g}$. Esses valores, ao serem comparados, não demonstram diferenças estatísticas, embora os grupos controle tenham uma tendência a maiores níveis de TBARS.

Wilhelm Filho et al. (2004) não evidenciaram alterações significativas de TBARS em relação aos níveis do grupo simulado, ao se comparar valores obtidos após 1 e 8 horas de torção testicular seguida de 1 hora de reperfusão. Contudo, após 24 horas de reperfusão, observou-se diferença nesses valores, com aumento significativo nos níveis de TBARS nos grupos submetido à isquemia/reperfusão. Isso demonstra que a peroxidação lipídica pode ocorrer num período de 1 a 24 horas de reperfusão, independente dos tempos de isquemia estudados (1 e 8 horas) (WILHELM FILHO et al, 2004). Askoy *et al.* (2007) demonstraram ocorrência de lipoperoxidação após 24 horas de reperfusão em animais previamente submetidos a 3 horas de isquemia testicular, ao ter como resultado aumento dos níveis de malonaldeído, quando comparados ao grupo simulado.

Aparentemente, numa operação simulada, a simples manipulação do testículo pode ser suficiente para desencadear uma produção de radicais livres suficientes para iniciação da peroxidação lipídica (GUIMARÃES, 2005).

Possivelmente, no presente estudo, essa tendência a níveis aumentos de TBARS nos grupos controle (subgrupos T-2) quando comparada aos respectivos grupos simulados poderia vir a ter diferença estatística em tempos mais tardios de reperfusão, já que a literatura descreve, segundo os trabalhos previamente citados, aumento na concentração de TBARS, portanto de lesão celular, em até 24 horas de reperfusão experimental do testículo.

Os animais receberam uma aplicação intravenosa duma solução de L-alanil-glutamina a 20%, na dose de 0,75g/Kg de peso, 30 minutos antes do início do trauma cirúrgico. Torres (2003) utilizou essa mesma dose da L-alanil-glutamina, também trinta minutos antes do trauma cirúrgico, para estudar seu efeito metabólico num modelo de isquemia/reperfusão do membro pélvico esquerdo de ratos, demonstrando que a droga estimula a maior utilização da glicose, via glicólise, pela ativação do ciclo lactato-malato.

A glutamina pode aumentar os níveis de GSH, reduzir os níveis de TBARS e reduzir a formação de radicais livres em cultura de células monomielocíticas U937 (WESSNER, 2003). Ela parece ser o melhor precursor da glutatona com valor terapêutico (AMORES-SÁNCHEZ, 1999). Hong et al. (1999) demonstraram que a suplementação de glutamina, por sua capacidade antioxidante, preserva a glutatona hepática durante injúria aguda do fígado. Prem (1999) demonstrou redução de lesão em musculatura esquelética de ratos pré-tratados com glutamina, em modelo

experimental de isquemia/reperfusão. Segundo Souba (1994), a glutamina manteve níveis de glutathione elevados na mucosa intestinal de ratos, promovendo menos peroxidação lipídica num modelo de isquemia/reperfusão do intestino.

No presente estudo, a quantificação da GSH tecidual nos animais pré-tratados com L-alanil-glutamina, mostrou que esta substância pode ter efeito protetor, reduzindo os efeitos da isquemia/reperfusão testicular induzida pela torção do cordão espermático, diminuindo, portanto o estresse oxidativo. Houve aumento significativo dos níveis de GSH em todos os tempos estudados (T-0, T-2 e T-6), quando comparado ao grupo controle, no modelo 1 (Tabela 7, Figura 13). No tempo de isquemia máxima, houve um aumento de 59,6% nos níveis de GSH ($10,72 \pm 0,64$ versus $17,11 \pm 1,88$) com $p < 0,01$. Na segunda hora de reperfusão, o aumento correspondeu a 98,7% ($8,80 \pm 1,89$ versus $17,49 \pm 0,69$) e após 6 horas de reperfusão o aumento da glutathione atingiu sua maior diferença em relação ao controle, correspondendo a 325,7% ($5,35 \pm 0,86$ versus $22,78 \pm 3,13$), com $p < 0,001$.

A curva de GSH variou de forma oposta nos animais que receberam L-alanil-glutamina, quando comparados aos que receberam solução salina (Figura 15, Apêndice 1). A curva descendente de GSH dos animais do grupo controle denota um consumo deste sistema antioxidante, pela ação oxidativa dos radicais livres durante a reperfusão. O comportamento ascendente da curva de GSH no grupo de ratos que receberam a L-alanil-glutamina se deve a uma possível ação protetora desse dipeptídeo no tecido testicular, num ambiente de estresse oxidativo, preservando os níveis de glutathione, otimizando este mecanismo de defesa.

No modelo 2, os níveis de GSH nos animais tratados com L-alanil-glutamina e solução salina (Tabela 8, Figura 14) se comportaram de maneira semelhante aos resultados encontrados no modelo 1. No tempo de isquemia máxima, houve um aumento de 102,4% nos níveis de GSH ($11,50 \pm 0,50$ versus $23,28 \pm 1,16$) com $p < 0,0001$. Na segunda hora de reperfusão, o aumento correspondeu a 52,8% ($9,15 \pm 1,79$ versus $13,99 \pm 2,45$). No grupo que recebeu L-alanil-glutamina, na segunda hora de reperfusão (T-2) houve redução significativa dos níveis de GSH ($p < 0,001$) comparado ao tempo máximo de isquemia (T-0). Isto, aparentemente, deve-se ao tempo mais prolongado de isquemia (3 horas), que pode ter gerado um maior grau de formação de radicais livres, por conseguinte, justificando a maior redução de glutathione durante a reperfusão nesse modelo. Após 6 horas de reperfusão, o aumento da glutathione atingiu sua maior diferença em relação ao controle,

correspondendo a 225,3% ($5,87 \pm 0,71$ versus $19,10 \pm 1,93$), com $p < 0,0001$). Os valores de GSH do grupo controle formam uma curva decrescente, demonstrando o consumo do sistema antioxidante da glutathiona durante a reperfusão. A curva do grupo teste, embora com maiores níveis de GSH, mostra-se decrescente devido ao consumo desse tripeptídeo até a segunda hora de reperfusão, quando, a partir desse momento, ela ascende, iniciando um processo de recuperação desse sistema antioxidante. (Figura 16, Apêndice 2).

O aumento da concentração intracelular de glutathiona pela glutamina parece reduzir a formação das espécies reativas de oxigênio e oferece proteção contra a apoptose (GUERIN, 2006).

A glutathiona, quantitativamente e qualitativamente, é uma das principais moléculas antioxidantes dos sistemas biológicos (DENNO, 1996). É um tripeptídeo (γ -glutamil-cisteinil-glicina) facilmente oxidável, já que a cisteína contém o radical sulfidril (-SH), apresentando, portanto, uma boa capacidade redutora. A glutamina está envolvida na síntese da glutathiona. Primeiramente a glutaminase mitocondrial converte a glutamina em L-glutamato (Glu), que, em seguida, retorna ao citosol (Figura 19, Anexo 2), onde se liga a L-cisteína (Cys) através da ação da enzima glutamato-cisteína ligase, formando a L- γ -glutamilcisteína (AMORES-SÁNCHEZ e MEDINA, 1999). A enzima glutathiona sintetase, finalmente, completa a síntese da glutathiona ao acrescentar a glicina à L- γ -glutamilcisteína (Figura 20, Anexo 3).

O glutamato derivado da glutamina também participa diretamente da captação celular de cistina através do contra-transportador X_c^- (SATO et al., 1999) (Figura 20, Anexo 3). A cistina é então reduzida a cisteína no citosol. Como a cisteína funciona como um substrato limitante para síntese da glutathiona, a glutamina indiretamente contribui para manutenção dos níveis de apropriados de glutathiona (SATO et al., 1998). Porém, sabe-se, que em situações de estresse metabólico onde a glutathiona é consumida, mesmo na presença de cisteína, a glutamina, por si só, funciona como fator limitante para produção de glutathiona no rim, fígado ou intestino (DENNO, 1996; HONG, 1992; SOUBA, 1994).

No modelo 1, não houve diferença significativa nas concentrações de TBARS entre os animais que receberam L-alanil-glutamina e solução salina (Tabela 5, Figura 11). O tempo de isquemia de 1 hora pode ter sido insuficiente para geração de lesão celular suficiente para desencadear aumentos significativos das

substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em tempos precoces de reperfusão (2 e 6 horas).

Já no modelo 2, houve uma redução nos níveis de TBARS no grupo pré-tratado com L-alanil-glutamina nos tempos T-0 e T-2, o que não foi observado no tempo T-6 (Tabela 6, Figura 12). No tempo máximo de isquemia houve uma redução de 46,5% nos níveis de TBARS do grupo que recebeu L-alanil-glutamina ($0,058 \pm 0,001$ *versus* $0,031 \pm 0,005$) com $p < 0,001$. Na segunda hora de reperfusão, foi atingida a maior diferença entre os grupos, com redução de 51,1% nos níveis de TBARS ($0,045 \pm 0,008$ *versus* $0,022 \pm 0,0034$) com $p < 0,001$. Após 6 horas de reperfusão, os níveis de TBARS não se mostraram estatisticamente diferente entre os grupos. Porém, no grupo controle, houve redução nos níveis de TBARS após 6 horas de reperfusão, ao compararem-se os valores com os do tempo máximo de isquemia. Os valores de TBARS no modelo 2 estão ilustrados graficamente na figura 17 (Apêndice 3).

Portanto, a L-alanil-glutamina exerceu efeito protetor, reduzindo a peroxidação lipídica, até a segunda hora de reperfusão, quando, a partir de então, no grupo controle, os níveis de TBARS tenderam a se aproximar da curva do grupo teste, não havendo mais diferenças entre os grupos ao final do período de reperfusão.

Os órgãos variam quanto à tolerância à isquemia. O Fígado é o órgão melhor dotado de capacidade antioxidante, seguido pelo sangue, coração e músculo (DI MEO; VENDITT; DE LEO, 1996). Segundo Akgür et al. (1994a) o testículo comporta-se de modo semelhante ao intestino, víscera capaz de evitar a lesão de reperfusão após curtos períodos de isquemia parcial. De acordo com Bergh et al. (1988), a relativa baixa temperatura e a baixa tensão de oxigênio no tecido testicular, possivelmente, podem contribuir para prevenção de lipoperoxidação induzida pela isquemia. Frente ao exposto, o comportamento dos níveis de TBARS após 6 horas de reperfusão nos animais do grupo controle do modelo 2, aparentemente, deve-se a capacidade de recuperação inerente ao testículo frente a uma situação de estresse induzida pela isquemia/reperfusão.

Está descrito na literatura o efeito protetor de algumas drogas sobre o metabolismo do testículo em modelos de isquemia/reperfusão. Akgür et al. (1994a) obteve sucesso ao estudar o efeito do alopurinol. Romeo et al. (2004) tiveram êxito ao testar um análogo da vitamina E, assim como Abasiyanik e Dagdonderen (2004) ao testar a melatonina. CAN et al. (2003) mostraram o efeito protetor do peptídeo

vasoativo intestinal na injúria de torção/destorção testicular. Guimarães (2005) demonstrou que o dimetilsulfóxido, o ácido α -lipóico e a ternatina aumentam a proteção antioxidante do testículo submetido à isquemia/reperfusão. Yang (2007) sugere que a indução da heme-oxigenase-1 atenua a injúria de isquemia/reperfusão do testículo, possivelmente através de um mecanismo antioxidante. Segundo Askoy *et al.* (2007), o pré-tratamento com dehidroepiandrosterona é capaz de reduzir alterações bioquímicas e histopatológicas induzidas pelo estresse oxidativo causado pela torção do testículo em ratos.

Os resultados desta pesquisa reforçam a hipótese de que a resposta ao estresse induzido por isquemia seguida de reperfusão são processos que geram radicais livres. No modelo 2, no qual os animais permaneceram durante 3 horas submetidos à isquemia testicular induzida pela torção do cordão espermático, na segunda hora de reperfusão, o grupo dos animais pré-tratados com L-alanil-glutamina apresentou níveis de GSH estatisticamente inferiores aos aferidos no tempo máximo de isquemia. Essa ocorrência de redução de GSH durante a reperfusão demonstra um aumento da produção radicais livres neste período. A L-alanil-glutamina mostrou-se eficaz na manutenção dos níveis teciduais de GSH nos dois modelos de isquemia/reperfusão do testículo, reduzindo a magnitude do estresse oxidativo possivelmente por ser um precursor de GSH. Pesquisas adicionais, utilizando outras doses e diferentes tempos de isquemia e reperfusão, estudando também alterações histopatológicas e funcionais são necessárias para melhor entendimento da ação desse nutracêutico frente a uma situação de isquemia/reperfusão do testículo, avaliando também a possibilidade de haver efeito antioxidante quando sua administração fosse realizada durante o período de isquemia, simulando uma situação clínica de torção do cordão espermático.

CONCLUSÃO

1) A L-alanil-glutamina foi capaz de exercer efeito protetor frente ao estresse oxidativo nos dois modelos estudados de isquemia/reperfusão testicular em ratos Wistar, aumentando os níveis de glutathiona reduzida em relação ao grupo controle, no tempo máximo de isquemia e no período de reperfusão em ambos os modelos estudados.

2) No modelo 2, o qual os animais foram submetidos à 3 horas de isquemia, a glutamina mostrou-se eficaz também na redução dos níveis de TBARS, ocasionando diminuição da lesão celular induzida pela peroxidação lipídica, no tempo de isquemia máxima e após 2 horas de reperfusão.

REFERÊNCIAS

ABASIYANIK, A.; DAGDONDEREN, L. Beneficial effects of melatonin compared with allopurinol in experimental testicular torsion. **J. Pediatr. Surg.**, v. 39, p. 1238-1241, 2004.

ABES, M.; SARIHAN, H.; DEGER, O.; UYDU, H. A. The effect of ATP-MbCl₂ on prevention of reperfusion injury after unilateral testicular torsion. **Eur. J. Pediatr. Surg.**, v. 11, n. 4, p. 255-258, 2001.

AKGÜR, F.M.; KILINC, K.; ATUG, T. Reperfusion injury following testicular torsion and detorsion in puberal rats. **Urol. Res.**, v. 21, n. 6, p. 389-393, 1993.

AKGÜR, F.M.; KILINC, K.; TANYEL, F.C.; BÜYÜKPAMUKCU, N.; HICSÖNMEZ, A. Ipsilateral and contralateral testicular biochemical acute changes after unilateral testicular torsion and detorsion. **Urology**, v. 44, n. 3, p. 413-418, 1994a.

AKGÜR, F.M.; KILINC, K.; AKTUG, T.; OLGUNER, M. The effect of allopurinol pretreatment before detorting testicular torsion. **J. Urol.**, v. 15, p. 1715-1717, 1994b.

ALVES, W.F.; GUIMARÃES, S.B.; VASCONCELOS, P.R.C.; VASCONCELOS, P.R.L. Repercussões da L-alanil-glutamina sobre as concentrações de lactato e lactato desidrogenase (LDH) em pacientes com isquemia crítica dos membros inferiores submetidos à revascularização distal. **Acta Cir. Bras.**, v. 18, n. 3, 2003.

AMORES-SÁNCHEZ, M.I.; MEDINA, M.A. Glutamine, as a precursor of glutathione, and oxidative stress. **Mol. Genet. Metab.**, v. 67, p. 100-105, 1999.

ANDERSON, J.B.; WILLIAMSON, R.C.N. The fate of human testis following unilateral torsion of the spermatic cord. **British J. Urol.**, v. 58, n. 6, p. 608-704, 1986.

AKSOY, H.; YAPANOGLU, T.; AKSOY, Y.; ÖZBEY, I.; TURHAN, H.; GURSAN, N. Dehydroepiandrosterone treatment attenuates reperfusion injury after testicular torsion and detorsion in rats. **J. Pediatr. Surg.**, v. 42, p. 1740-1744, 2007.

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.**, vol. 36, n. 2, p. 282-286, 2001.

BAKER, K.; RAPER, F.R. Torsion of the testis. **Br. J. Urol.**, vol. 36, p. 35-41, 1964.

BECKER JR., E. J.; TURNER, T.T. Endocrine and exocrine effects of testicular torsion in the prepubertal and adult rat. **J. Androl.**, v. 16, n. 4, p. 342-351, 1995.

BLANK, M.L.; O'NEILL, P.J.; STEIGMAN, C.K.; COBB, L.M.; WILDE, L.A.; HAVENSTEIN P.J.; CHAUDRY, I.H. Reperfusion injury following testicular torsion and detorsion in puberal rats. **Urol. Res.**, v. 21, n. 6, p. 389-393, 1993.

BONORDEN, W.R.; PARIZA, M.W. Antioxidant nutrients and protection from free radicals. In: KOTOSONIS, F. N.; MACKEY, M; HJELLE, J.(eds.). **Nutritional toxicology**. New York: Raven Press Ltd., 1994. p. 19-48.

BOZA, J.J.; MOENNOZ, D.; BOURNOT, C.E.; BLUM, S.; ZBINDEN, I.; FINOT, P.A.; BALLEVRE, O. Role of glutamine on the de novo purine nucleotide synthesis in Caco-2 cells. **Eur. J. Nutr.**, v. 39, n. 1, p. 38-46, 2000.

CAN, C.; TÖRE, F.; TUNÇEL, N.; UYSAL, O.; GÜRER, F.; AK, D.; TUNÇEL, M. Protective effect of vasoactive intestinal peptide on testicular torsion-destorsion injury: association with heparin-containing mast cells. **Urology**, v. 63, n. 1, p. 195-200, 2004.

CHIRICO, S. High performance liquid chromatography-based thiobarbituric acid tests. **Methods in Enzimology.**, v. 233, p. 314-318, 1994.

CLARK, S.F. The biochemistry of antioxidants revisited. **Nutr. Clin. Pract.**, v. 17, p. 5-17, 2002.

COHEN, M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Ann. Intern. Med.**, v. 111, n. 11, p. 918-931, 1989.

CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Lesão e morte celular. In: ROBBINS: **Patologia estrutural e funcional**. 5. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1996, p. 1 – 30.

CREMIN Jr, J.D.; FLEMING, S.E. Glycolysis is a source of pyruvate for transamination of glutamine amino nitrogen in jejunal epithelial cells. **Am. J. Physiol.**, v. 727, n. 3, p. G575-G588, 1997.

DENEKE, S.M.; FANBURG, B.L. Regulation of celular glutathione. **Am. J. Physiol.**, v. 257, n. 4 (Pt 1), p. L163-173, 1989.

DENNO, R.; ROUNDS, J.D.; FARIS, R.; HOLEJKO, L.B.; WILMORE, D.W. Glutamine-Enriched Total Parenteral Nutrition Enhances Plasma Glutathione in the Resting State. **J. Surg. Res.**, v. 61, p. 35-38, 1996.

DI MEO, S.; VENDITT, P.; De LEO, T. Tissue protection against oxidative stress. **Experientia**, v. 52, n. 8, p. 786-794, 1996.

DOKUCU, A.I.; OZTURK, H.; OZDEMIR, E.; KETANI, A.; BUYUKBAYRAM, H.; YUCESAN, S. The protective effects of nitric oxide on contralateral testis in prepubertal rats with unilateral testicular torsion. **BJU Int.**, v. 85, n. 6, p. 767-771, 2000.

DRÖDGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, v. 82, n. 1, p. 47-97, 2002.

EDELSBERG, J.S.; SURH, Y.S. The acute scrotum. **Emerg. Med. Clin. North. Am.**, v. 6, p. 521, 1988.

EVANS, M.E.; JONES, D.P.; ZIEGLER, T.R. Glutamine Prevents Cytokine-Induced Apoptosis in Human Colonic Epithelial Cells. **J. Nutr.**, v. 133, p. 3065-3071, 2003.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Méd. Bras.**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

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

FRANCISCO NETO, A.; SILVA, J.C.C.B.; FAGUNDES, D.J.; PERCÁRIO, S; NOVO, N.F.; JULIANO, Y.; MOREIRA NETO, A.A. Estudo das alterações oxidativas, da capacidade antioxidante total e do óxido nítrico, em ratos submetidos à isquemia e reperfusão de membros posteriores. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 2, p. 134-139, 2005.

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

GAUSHE, M. Genitourinary surgical emergencies. **Pediatr. Ann.**, v. 25, n. 8, p. 458-464, 1996.

GIANNAKOPOULOS, X.; ZIKOPOULOS, C.; NTOURNTOUFI, A.; ANDRONIKOU, S. Intrauterine unilateral torsion of the spermatic cord. **Minerva Urol. Nefrol.**, v. 47, n. 2, p. 95-96, 1995.

GOMEZ, G.I.; RUIZ, R.J.L.; SANZ, M.E.; CONDE, S.S.; BRIONES, M.G.; LINARES, Q.A.; GARCIA, N.R.; BURGOS, R.F.J.; ESCUDERO, B.A. Testicular torsion in geriatric patient. Review of the literature apropos of a case. **Actas Urol Esp.**, v. 27, n. 6, p. 465-467, 2003.

GRACE, P. A. Ischemia-reperfusion injury (review). **British J. Surg.**, v. 81, n. 5. p. 637-647, 1994.

GUÉRIN, P.J.; FURTAK, T.; ENG, K.; GAUTHIER, E.R. oxidative stress is not required for the induction of apoptosis upon glutamine starvation of Sp2/0-Ag14 hybridoma cells. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 85, p. 355-365, 2006.

GUIMARÃES, S.B.; VASCONCELOS, P.R.L. *In vivo* acute changes in ATP and glucose concentrations in ipsilateral testicles of prepubertal rat. **Acta Cir. Bras.**, v. 17, n. 2, p. 110-115, 2002.

GUIMARÃES, S. B. **Efeitos do pré-tratamento com dimetilsulfóxido, ácido lipóico ou ternatina sobre o estresse oxidativo em ratos jovens submetidos à torção do cordão espermático**. Dissertação (Doutorado em Cirurgia Experimental) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clin. Chem.**, v. 41, n. 12, p. 1819-1828, 1995.

HALL, J.C.; HELL, K.; McCAULEY, R. Glutamine (Reviews). **Br. J. Surg.** v. 83, n. 3, p. 305-312, 1996.

HALL, A.G. Glutathione and the regulation of cell death. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 457, p. 199-203, 1999.

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.

HOWARD, 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, p. 351-355, 1994.

JANESCHEK, G.; SCHRECKENBERG, F.; GRIMM, W; MARBERGER, M. Hemodynamic effects of experimental testicular torsion. **Urol. Res.**, v. 15, n. 5, p. 303-306, 1987.

KELLY, D.; WISCHMEYER, P.E. Role of L-glutamine in critical illness: new insights. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 6, n. 2, p. 217-222, 2003.

LABOW, B.I.; SOUBA, W.W. Glutamine. **World J. Surg.**, v. 24, n. 12, p. 1503-1513, 2000.

LEIFERT, W. R.; JAHANGIRI, A.; McMURCHIE, E. J. Antiarrhythmic fatty acids and antioxidants in animals and cell studies. **J. Nutr. Biochem.**, v. 10, p. 252-267, 1999.

LIETH, E.; LaNOUE, K.F.; BERKICH, D.A.; XE, B.; RATZ, M.; TAYLOUR, C.; HUTSON, S.M. Nitrogen shuttling between neurons and glial cells during glutamate synthesis. **J. Neurochem.**, v. 76, n. 6, p. 1712-1723, 2001.

LUO, J.L.; HAMMARQVIST, F.; ANDERSSON, K.; WERNERMAN, J. Skeletal muscle glutathione after surgical trauma. **Ann. Surg.**, v. 223, n. 4, p. 420-427, 1996.

MATÉS, J.M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; CASTRO, I.N.; ASENJO, M.; MÁRQUEZ, J. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. **Int. j. biochem. cell biol.**, v. 34, p. 439-458, 2002.

McCORD, J.M. Oxygen-derived free radicals in post-ischemia tissue injury. **N. Engl. J. Med.**, v. 312, n. 3, p. 159-163, 1985.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. The utility of superóxido dismutase in studying free radicals reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. **J. Biol. Chem.**, v. 244, n. 22, p. 6056-6063, 1969.

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

MELO FILHO, A.C.; HOFFMAN, M.E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochem. J.**, v. 218, p. 273-275, 1983.

MERIMSKY, E.; ROCK, M.; KATS, S. Assessment of fertility after testicular torsion: an experimental study. **Urol. Res.**, v. 10, p. 51-54, 1982.

MURPHY, C.; NEWSHOLME, P. Macrophage-mediated lysis of a beta-cell line, tumour necrosis factor-alpha release from bacillus Calmette-Guérin (BCG)-activated murine macrophages and interleukin-8 release from human monocytes are dependent on extracellular glutamine concentration and glutamine metabolism. **Clin. Sci.**, v. 96, n. 1, p. 89-97, 1999.

NAVARRO, J.; OBRADOR, E.; CARRETERO, J.; PETSCHEN, I.; PEREZ, J.A.P. Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth *in vivo*. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 26, n. 03/04, p. 410-418, 1999.

NEWSHOLME, P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of immune system in health, postinjury, surgery or infection? **J. Nutr.**, v. 131, n. 9, p. 2523S-2524S, 2001.

ORTOLANO, V.; NASRALLAH, P.F. Spermatic vessel ligation (Fowler-Stephens maneuver): experimental results with regard to fertility. **J. Urol.**, v. 136, n. 1 (Pt 2), p. 211-213, 1986.

OZKAN, K.U.; BORAN, Ç.; KILINC, M.; GARIPARDIC, M.; KURUTAS, E.B. The effect of zinc aspartate pretreatment on ischemia-reperfusion injury and early changes of blood and tissues antioxidant enzyme activities after unilateral testicular torsion-destorsion. **J. Pediatr. Surg.**, v. 35, n. 1, p. 101-103, 2000.

PACIFICO, S. L.; LEITE, H. P.; CARVALHO, W. B. A suplementação de glutamina é benéfica em crianças com doenças graves? **Rev. Nutr.**, vol.18, n.1, p.95-104, 2005.

PALMER, J.S.; PLZAK, L.F.; CROMIE, W.J. Comparison of blood flow and histological changes in rat models of testicular ischemia. **J. Urol.**, v. 158, n (3 Pt 2), p. 1138-1140, 1997.

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.

PRILLAMAN, H. M.;TURNER, T.T. Rescue of testicular function after acute experimental torsion. **J. Urol.**, v. 157, n. 1, p. 340-345, 1997.

RALITCHKOVA, L.; NANOV, Z.; GOTCHEV, D.; HINEV, A.; LIBALD, T.; WOLNIK, R. Experimental testicular torsion – early and late morphological and enzymohistochemical changes. **Z. Exp. Chir. Transplant. Kunstliche Organe**, v. 23, n. 3, p. 185-188, 1990.

REINKE, L.A.; KOTAKE, Y.; MOORE, D. R.; NANJI, A. A. Free radical formation during ketamine anesthesia in rats: a cautionary note. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 24, n. 06, p. 1002-1006, 1998.

RODRIGUES, S.F.; OLIVEIRA, M.A.; MARTINS, J.O.; SANNOMIYA, P.; TOSTES, R.C.; NIGRO, D.; CARVALHO, M.H.C.; FORTES, Z.B. Differential effects of chloral hydrate- and ketamine/xylazine-induced anesthesia by the s.c. route. **Life sci.**, v. 79, p. 1630-1637, 2006.

ROMEO, C.; ANTONUCCIO, P.; ESPOSITO, M.; MARINI, H.; IMPELLIZZERI, P.; TURIACO, N.; ALTAVILLA, D.; BITTO, A.; ZUCCARELLO, B.; SQUADRITO, F. Raxofelast, a hydrophilic vitamin e-like antioxidant, reduces testicular ischemia-reperfusion injury. **Urol. Res.**, v. 5, p. 367-371, 2004.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N.F.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathiona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

RYAN, P.C.; GOREY, T.F.; FITZPATRICK, J.M. Experimental testicular torsion: fixation without parenchymal trauma. **Eur. Urol.**, v. 14, n. 2, p. 141-144, 1988.

SATO, H.; TAMBA, M.; ISHII, T.; BANNAI, S. Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 274, v. 17, p. 11455–11458, 1999.

SATO, H.; KURIYAMA-MATSUMURA, K.; SIOW, R.C.; ISHII, T.; BANNAI, S.; MANN, G.E. Induction of cystine transport via system x-c and maintenance of intracellular glutathione levels in pancreatic acinar and islet cell lines. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 414, n. 1-2, p. 85-94, 1998.

SEMENZA, G.L. Tissue ischemia: pathophysiology and therapeutics. **J. Clin. Invest.**, v. 106, n. 7, p. 809-812, 2000.

SEUNG—JUNE, O.H.; KWAK, C.; BAEK, M.; KIM C-S.; SUK, K.; CHOI, H. Histologic and molecular changes in the ipsilateral and contralateral epididymes of the rat in response to unilateral testicular torsion followed by destorsion. **Fertil. Steril.**, v. 81, (SUPPL. 1), p. 882-887, 2004.

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

SKOGLUND, R.W.; McROBERTS, J.W.; RADGE, H. Torsion of spermatic cord: a review of the literature and analysis of 780 new cases. **J. Urol.**, v. 104, n. 4, p. 604-607, 1970.

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

SOUTO, C.A.V.; LEMOS, N.; LISBOA, J. F.; J.C.S; LEMOS, F.R.; LEMOS, R.R. Torsão do cordão espermático. Análise de 26 casos Atendidos em Dois Hospitais Universitários. **J. B. M.**, v. 77, n. 3, p. 24-28. 1999.

SUMITRA, M.; MANIKANDANA, P.; RAOB, K.V.K.; NAYEEMC, M.; MANOHARD, B. M.; PUVANAKRISHNAN, R. Cardiorespiratory effects of diazepam-ketamine, xylazine-ketamine and thiopentone anesthesia in male Wistar rats-A comparative analysis. **Life sci.**, v. 75, p. 1887-1896, 2004.

Torres, J.M.S.; Guimarães, S.B.; Vasconcelos P.R.L.; Martins, M.C.R.; Chaves, C.R.; Vasconcelos, P.R.C. Efeitos metabólicos da l-alanil-glutamina em ratos submetidos à isquemia da pata traseira esquerda seguida de reperfusão. **Acta Cir. Bras.**, vol.18, n.1, p. 01-14, 2003.

TURAN, C.; KÜÇÜKAYDIN, N.; BEKERECİÖĞLU, A.; KAZEZ, A.; DÖĞAN, P.; KÜÇÜKAYDIN, M. The effect of vitamin E on ipsilateral and contralateral testis following unilateral testicular torsion in rats. **Res. Exp. Med. (Berl)**, v. 196, n.4, p. 243-246, 1996.

TURNER, T.T. Acute experimental testicular torsion. No effect on the contralateral testis. **J. Androl.**, v. 6, n.1, p. 65-72, 1985.

TURNER, T.T.; BROWN, K.J. Spermatic cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow. **Biol. Reprod.**, v. 49, p. 401-401, 1993

UCHIYAMA, M.; MIHARA, M. Determination of malondialdehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. **Anal. Biochem.**, v. 86, n. 1, p. 271-278, 1978.

WESSNER, B.; STRASSER, E.-M.; SPITTLER, A.; ROTH, E. Effect of single and combined supply of glutamine, glycine, N-acetylcysteine, and R,S-a-lipoic acid on glutathione content of myelomonocytic cells. **Clin. Nutr.**, v. 22, n. 6, p. 515-522, 2003.

WILHELM FILHO, D.; TORRES, M.A.; BORDIN, A.L.B.; CREZCYNSKI-PASA, T.B.; BOVERIS, A. Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. **Mol. Aspects Med.**, v. 25, p. 199-210, 2004.

WILLIAMSON, R.C. Torsion of the testis and allied conditions. **Br J Surg.**, v. 63, p. 465, 1976.

YANG, S.; SHIH, H.J.; CHOW, Y.C.; TSAI, P.S.; WANG, T.Y.; WANG, P.S.; HUANG, C.J. The protective role of heme oxygenase-1 induction on testicular tissues after testicular torsion and detorsion. **J. Urol.**, v.177, n. 5, p. 1928-1933, 2007.

APÊNDICE 1

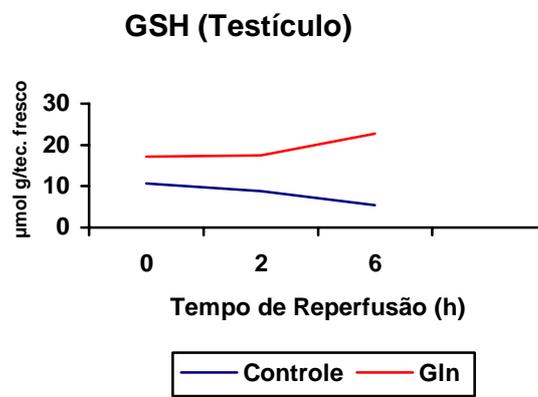


FIGURA 15 – As linhas representam as concentrações de GSH em ratos submetidos à 1 hora de isquemia e 6 horas de reperusão, comparando-se os grupos Salina e L-Ala-Gln no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperusão (T-2 e T-6). A curva descendente de GSH dos animais do grupo controle denota um consumo deste sistema antioxidante, possivelmente pela ação oxidativa dos radicais livres durante a reperusão. O comportamento ascendente da curva de GSH no grupo de ratos que receberam a L-alanil-glutamina se deve a uma possível ação protetora desse dipeptídeo no tecido testicular, num ambiente de estresse oxidativo, preservando os níveis de glutathiona.

APÊNDICE 2

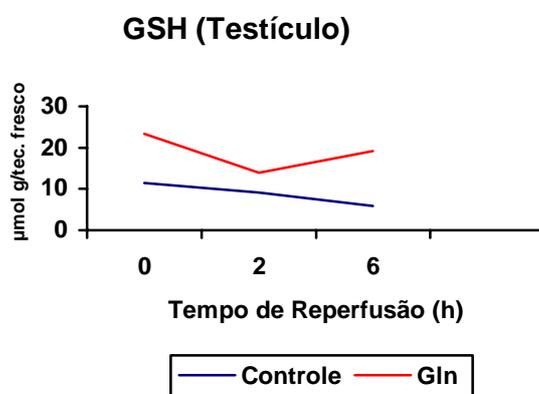


FIGURA 16 – As linhas representam as concentrações de GSH, em ratos submetidos a 3 horas de isquemia e 6 horas de reperusão, comparando-se os grupos Salina e L-Ala-Gln no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperusão (T-2 e T-6). A curva do grupo controle é decrescente, demonstrando o consumo do sistema antioxidante da glutathiona durante a reperusão. A curva do grupo teste, embora com maiores níveis de GSH, mostra-se decrescente devido à peroxidação lipídica até a segunda hora de reperusão, quando, a partir daí, ela ascende, iniciando um processo de recuperação.

APÊNDICE 3

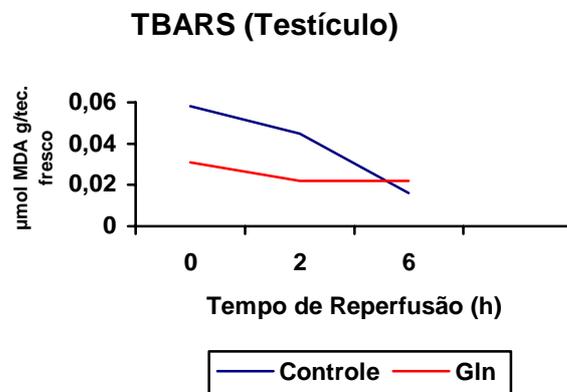


FIGURA 17 – As linhas representam as concentrações de TBARS nos ratos submetidos a 3 horas de isquemia e 6 horas de reperusão, comparando-se os grupos Salina e L-Ala-Gln no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperusão (T-2 e T-6). Observa-se o efeito protetor da L-Ala-Gln, reduzindo a peroxidação lipídica, até a segunda hora de reperusão, quando, a partir de então, no grupo controle, a curva de TBARS tendeu a se aproximar da curva do grupo teste, não havendo mais diferenças entre os grupos ao final do período de reperusão.

APÊNDICE 4 – DADOS BRUTOS (1)

CONCENTRAÇÕES DE **TBARS** ($\mu\text{mol MDA/g}$ tecido fresco) NO TESTÍCULO

Grupo Simulado 1h – SHAM 1h

TRATAMENTO: SOLUÇÃO SALINA

T-2
0,0121
0,0147
0,0317
0,0361
0,0100
0,0484

CONCENTRAÇÕES DE **TBARS** ($\mu\text{mol MDA/g}$ tecido fresco) NO TESTÍCULO

Grupo Simulado 3h – SHAM 3h

TRATAMENTO: SOLUÇÃO SALINA

T-2
0,0060
0,0057
0,0050
0,0181
0,0276
0,0285

CONCENTRAÇÕES DE **TBARS** ($\mu\text{mol MDA/g}$ tecido fresco) NO TESTÍCULO

Grupo Salina 1h – GSa1h (ISQUEMIA/REPERFUSÃO)

TRATAMENTO: SOLUÇÃO SALINA

T-0	T-2	T-6
0,034	0,013	0,017
0,025	0,010	0,014
0,072	0,035	0,031
0,076	0,034	0,032
0,014	0,077	0,036
0,018	0,062	0,037

CONCENTRAÇÕES DE **TBARS** ($\mu\text{mol MDA/g}$ tecido fresco) NO TESTÍCULO

Grupo Salina 3h – GSa3h (ISQUEMIA/REPERFUSÃO)

TRATAMENTO: SOLUÇÃO SALINA

T-0	T-2	T-6
0,061	0,050	0,008
0,062	0,060	0,008
0,057	0,058	0,018
0,058	0,060	0,019
0,054	0,021	0,021
0,054	0,021	0,021

APÊNDICE 5 – DADOS BRUTOS (2)

CONCENTRAÇÕES DE **TBARS** ($\mu\text{mol MDA/g}$ tecido fresco) NO TESTÍCULO
Grupo Ala-Gln 1h – GAg1
TRATAMENTO: L-ALANIL-GLUTAMINA

T-0	T-2	T-6
0,0274	0,0388	0,0367
0,0258	0,0400	0,0405
0,0486	0,0296	0,0335
0,0488	0,0282	0,0333
0,0501	0,0197	0,0346
0,0498	0,0174	0,0372

CONCENTRAÇÕES DE **TBARS** ($\mu\text{mol MDA/g}$ tecido fresco) NO TESTÍCULO
Grupo Ala-Gln 3h – GAg3
TRATAMENTO: L-ALANIL-GLUTAMINA

T-0	T-2	T-6
0,0151	0,0179	0,0350
0,0141	0,0205	0,0191
0,0379	0,0201	0,0181
0,0392	0,0375	0,0183
0,0408	0,0213	0,0185
0,0409	0,0152	0,0239

CONCENTRAÇÕES DE **GSH** ($\mu\text{mol MDA/g}$ tecido fresco) NO TESTÍCULO
Grupo Simulado 1h – SHAM 1h
TRATAMENTO: SOLUÇÃO SALINA

T-2
21,03
36,543
34,46
38,37
39,987
39,84

CONCENTRAÇÕES DE **GSH** ($\mu\text{mol MDA/g}$ tecido fresco) NO TESTÍCULO
Grupo Simulado 3h – SHAM 3h
TRATAMENTO: SOLUÇÃO SALINA

T-2
25,733
25,67
16,15
19,917
24,053
14,053

APÊNDICE 6 – DADOS BRUTOS (3)

CONCENTRAÇÕES DE **GSH** ($\mu\text{mol MDA/g}$ tecido fresco) NO TESTÍCULO
Grupo Salina 1h – GSa1h (ISQUEMIA/REPERFUSÃO)
TRATAMENTO: SOLUÇÃO SALINA

T-0	T-2	T-6
12,870	14,323	09,313
10,770	15,133	05,273
10,770	05,113	05,760
08,667	05,437	03,660
09,313	05,920	03,820
11,900	06,890	04,303

CONCENTRAÇÕES DE **GSH** ($\mu\text{mol MDA/g}$ tecido fresco) NO TESTÍCULO
Grupo Salina 3h – GSa3h (ISQUEMIA/REPERFUSÃO)
TRATAMENTO: SOLUÇÃO SALINA

T-0	T-2	T-6
09,313	09,467	03,660
11,577	09,313	04,303
11,093	05,273	05,273
12,387	11,253	06,567
11,900	15,940	07,537
12,707	03,660	07,860

CONCENTRAÇÕES DE **GSH** ($\mu\text{mol MDA/g}$ tecido fresco) NO TESTÍCULO
Grupo Ala-Gln 1h – GAg1
TRATAMENTO: L-ALANIL-GLUTAMINA

T-0	T-2	T-6
20,643	19,61	13,227
20,917	19,673	13,13
11,433	16,313	30,567
11,253	16,49	28,337
17,77	16,75	25,67
20,643	16,087	25,75

CONCENTRAÇÕES DE **GSH** ($\mu\text{mol MDA/g}$ tecido fresco) NO TESTÍCULO
Grupo Ala-Gln 3h – GAg3
TRATAMENTO: L-ALANIL-GLUTAMINA

T-0	T-2	T-6
20,047	12,967	20,173
20,077	13,177	20,077
26,413	21,113	13,55
26,43	21,13	13,227
23,423	7,813	23,633
23,293	7,747	23,957

ANEXO 1

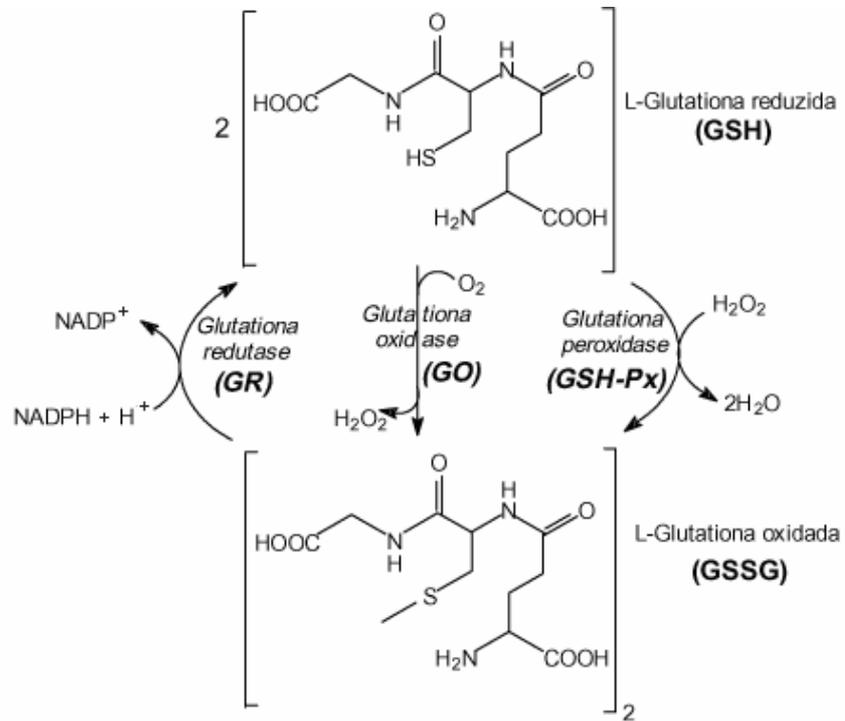


FIGURA18 – Interconversão da glutathiona na sua forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas GSH-Px, GO e GR (ROVER JÚNIOR, 2001).

ANEXO 2

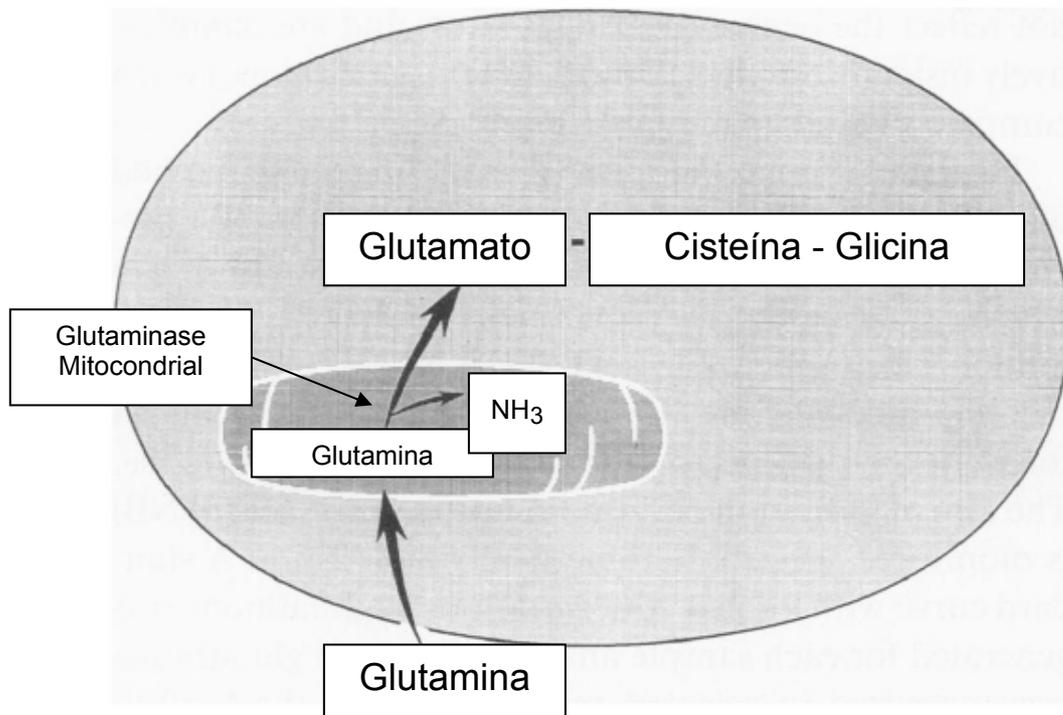


FIGURA 19 – Ação da glutaminase promovendo a deaminação da glutamina na mitocôndria, tendo como produto o L-glutamato, que, em seguida, retorna ao citosol para participar da síntese da glutathione (γ -glutamil-cisteinil-glicina) (HONG, 1992).

ANEXO 3

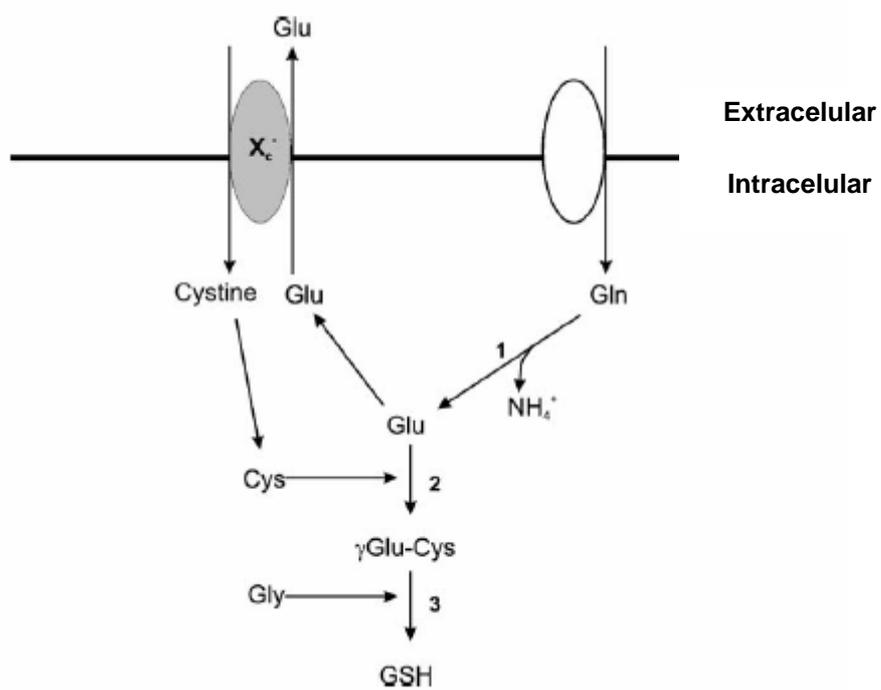


FIGURA 20 – Papel da glutamina (Gln) na síntese da glutationa (GSH): (1) glutaminase, (2) glutamato cisteína ligase, (3) GSH sintetase. X_c^- : transportador glutamato cistina (GUÉRIN, 2005).