



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

RAIMUNDO JOSÉ CUNHA ARAÚJO JÚNIOR

**ISQUEMIA HEPÁTICA EXPERIMENTAL E A AÇÃO
PRÉ-CONDICIONANTE DA L-ALANIL-GLUTAMINA**

Fortaleza-Ce
2010

RAIMUNDO JOSÉ CUNHA ARAÚJO JÚNIOR

**ISQUEMIA HEPÁTICA EXPERIMENTAL E A AÇÃO
PRÉ-CONDICIONANTE DA L-ALANIL-GLUTAMINA**

Dissertação de Mestrado como parte do requisito
para obtenção do título de mestre em cirurgia, do
Programa de Pós-graduação *Stricto sensu* da
Universidade Federal do Ceará

Orientador: Prof. Dr. José Huygens Parente Garcia

Fortaleza-Ce
2010

A689i Araújo Júnior, Raimundo José Cunha
Isquemia hepática experimental e a ação pré-condicionante da
L-Alanil-Glutamina / Raimundo José Cunha Araújo Júnior. –
Fortaleza, 2010.
f.73

Orientador: Prof. Dr. José Huygens Parente Garcia
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Fortaleza-Ce, 2010

1. Traumatismo por Reperusão 2. Apoptose 3. Glutamina
4. Fígado - cirurgia I. Garcia, José Huygens Parente (orient.) II.
Título

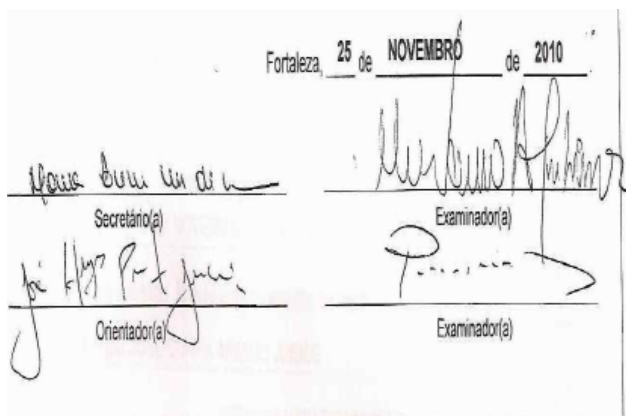
CDD: 617.5562

ISQUEMIA HEPÁTICA EXPERIMENTAL E A AÇÃO PRÉ-CONDICIONANTE DA L-ALANIL-GLUTAMINA

Dissertação submetida a Coordenação do Programa de pós-graduação Stricto sensu em Cirurgia, do Departamento de Cirurgia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Cirurgia

Aprovada em 25 de novembro de 2010

BANCA EXAMINADORA



Maria Luciene Vieira de Oliveira (secretária)

Prof. Dr. Marco Venícius Alves Lima ICC

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos UFC

Prof. Dr. José Huygens Parente Garcia (Orientador) UFC

DEDICATÓRIA

A meus Pais, **Prof. Ms. Raimundo José Cunha Araújo (UFPI)** e **Maria Cleide Fontenele Araújo**, pelo exemplo de vida. Meus eternos mestres;

A minha esposa **Vera Lúcia Rios Araújo**, minha namorada desde a faculdade de medicina, companheira de todas as horas e minha maior incentivadora para realizar o curso de mestrado;

Aos meus queridíssimos filhos: **Raimundo José Cunha Araujo Neto, Gerson Rios Araújo e Maria Clara Rios Araujo**, fonte de motivação e alegria em minha vida;

Aos meus irmãos **Prof. Dr. Gerson Albuquerque de Araujo Neto (UFPI)** e **Prof.Dr. John Fontenele Araújo (UFRN)**, exemplos de dedicação à docência.

A meu irmão **Flávio Fontenele Araújo**, médico Ortopedista, (*in memorium*), que sempre gostou de estudar.

AGRADECIMENTO

Ao **PROF.DR. JOSÉ HUYGENS PARENTE GARCIA**, Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, pela orientação durante o mestrado e pelo exemplo de atuação como médico, cirurgião, professor, pesquisador e pioneiro do transplante hepático em uma região do Brasil na qual as dificuldades justificariam aceitação e acomodação, mas para quem é determinado em realizar, serve como motivação na missão de melhorar a vida daqueles que acreditam que a medicina é uma profissão gloriosa e verdadeiramente nobre.

Ao **PROF. DR. PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS**, Professor associado e coordenador do Programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Cirurgia, do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará.

Aos membros da mesa de qualificação: **PROF. Dr. LUSMAR VERAS RODRIGUES**, **PROF. Dr. ANTONIO MELO ALDO FILHO** e **MSc. GUSTAVO REGO COELHO**, que com suas observações contribuíram muito para melhorar a presente dissertação.

A todo **CORPO DOCENTE** do Programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Cirurgia do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará.

As Secretárias do Programa de Pós-graduação em Cirurgia: **MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA** e **MAGDA GOMES FONTENELE**.

A **Faculdade de Saúde Ciências Humanas e Tecnológica do Piauí - NOVAFAPI**, e a todos do seu **Laboratório de Cirurgia Experimental**;

Ao **Hospital Aliança – CASAMATER** e **Hospital das Clínicas de Teresina**, de Teresina, Piauí, que cederam parte do material cirúrgico utilizado;

A **RAIMUNDO GERÔNIMO JUNIOR**, Médico Patologista, amigo, incentivador e colaborador no trabalho experimental que permitiu o uso de seu Laboratório (LAPAC) para a realização do estudo imunohistoquímico;

A **DANIEL LEITE DE SOUSA**, que me auxiliou na confecção dos gráficos e estudo estatístico;

A **CARLOS RENATO SALES BEZERRA** e **WALLIYNSON ALVES TOCANTINS DE SOUSA**, e a todos os colegas do curso de mestrado que caminharam juntos nessa jornada.

A **JOSÉ RODRIGUES DOS SANTOS, SÉRGIO ARAÚJO MACHADO, NICANOR BARRETO FILHO, PAULO HENRIQUE FERREIRA, MARIA DO SOCORRO COUTINHO, AVELAR ALVES DA SILVA** e **MIGUEL AUGUSTO ARCOVERDE**, médicos e amigos, que me incentivaram durante todo o período em que tive que me afastar das atividades didáticas e médico-cirúrgicas.

A **VALDECI RIBEIRO DE CARVALHO**, médico gastroenterologista e amigo fraterno, que incentivou de modo especial na minha busca pelo mestrado em cirurgia na UFC.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Indução da apoptose pela via receptores da morte e por disfunção mitocondrial. Pág.23;
- Figura 2 - Fórmula estrutural da Glutamina. Pág.24;
- Figura 3 – Importância da Glutamina e glutatona nas reações de transaminação e desaminação de aminoácidos e como precursoras de importantes substâncias metabólicas e da glicose através da neoglicogênese. Pág. 26;
- Figura 4 - Pinçamento do pedículo hepático com pinça de Bulldog 2cm. Pág. 31;
- Figura 5 - Tela com imagem de lâmina marcada com caspase 3, aumento de 200x. Pág. 33;
- Figura 6 - Gráfico com média e erro padrão da média da dosagem de alanina aminotransferase (ALT) nos grupos Isquemia /Reperusão (IR), Glutamina + Isquemia/ reperusão (GLN+IR) e Controle (punção). Pág. 35;
- Figura 7 - Gráfico com média e erro padrão da média da dosagem de desidrogenase láctica (DHL) nos grupos Isquemia/Reperusão (IR), Glutamina + Isquemia/ Reperusão (GLN+IR) e Controle (punção). Pág. 36;
- Figura 8 - Gráfico com média e erro padrão da média da porcentagem do número de células que expressaram a caspase-3 em 1000 células analisadas nos grupos Isquemia/Reperusão (IR), Glutamina + Isquemia/Reperusão (GLN+IR) e Controle (punção). Pág.37;
- Figura 9 - Imagem de Lâmina Imonihistoquímica do Grupo Controle (punção), Caspase-3, aumento 200x. Pág.38;
- Figura 10 - Imagem de Lâmina Imonihistoquímica Imunoistoquímica Caspase-3. Grupo Isquemia/Reperusão, aumento 200x. Pág. 39;
- Figura 11 - Imagem de Lâmina Imonihistoquímica Caspase-3, Grupo Glutamina + Isquemia/reperusão, aumento 200x. Pág.39.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dosagem de Alanina Aminotransferase (ALT). Pág.35;

Tabela 2 - Média e erro padrão da média da dosagem de alanina aminotransferase (ALT), nos grupos Isquemia /Reperusão (IR), Glutamina + Isquemia /Reperusão (GLN+IR) e Controle (C) (punção). Pág.35;

Tabela 3 - Dosagem de desidrogenase láctica (DHL). Pág.36;

Tabela 4 - Média e erro padrão da média da dosagem de desidrogenase láctica (DHL), nos grupos Isquemia /Reperusão (IR), Glutamina + Isquemia/ Reperusão (GLN+IR) e Controle (C) (punção). Pág.36;

Tabela 5 – Percentual de células marcadas para caspase - 3. Pág.37;

Tabela 6 - Média e erro padrão da média do percentual de células que expressaram a caspase - 3, nos grupos Isquemia/Reperusão (IR), Glutamina + Isquemia /Reperusão (GLN+IR) e Controle (C) (punção). Pág.37;

Tabela 7 - Média e erro padrão da média da dosagem de alanina aminotransferase (ALT), da dosagem de desidrogenase láctica (DHL) e percentual de células que expressaram a caspase - 3, nos grupos Isquemia/ Reperusão (IR), Glutamina + Isquemia/Reperusão (GLN+IR) e Controle (C) (punção). Pág.37.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADP/ATP: adenosina difosfato / adenosina trifosfato

ALT: alanina aminotransferase

apaf-1: *apoptosis activating factor* (fator ativador da apoptose)

AST: aspartato aminotransferase

CD4+ linfócito CD4

CD8+ linfócitos CD8

DHL: desidrogenase láctica

DNA: ácido desoxirribonucléico

ERO: espécies reativas de oxigênios

FADD: Fas associated death domain (cadeia de morte associada)

ffa-1: fator ativador da apoptose -1

GLN: Glutamina

Gly-GLN: Glicil-Glutamina

GSH: glutationa

H₂S: Sulfeto de hidrogênio

HSP 70: *hot shock protein 70* (proteína de choque quente 70)

ICC: Instituto do Câncer do Ceará

I/R: isquemia/reperfusão

L-GLN: L-Glutamina

MDA: Malondialdeído

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo ligada com hidrogênio

NOVAFAPI: Faculdade de Saúde Ciências Humanas e Tecnológica do Piauí

OCT: ornitina carbamil transferase

SDH: sorbitol desidrogenase

SOD: superóxido dismutase

TNF: *Tumoral Necrosing Factor* (fator de necrose tumoral)

TUNEL: *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (marcação terminal de deoxinucleotídeo transferase dUTP)

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UFC: Universidade Federal do Ceará

UFPI: Universidade Federal do Piauí

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

1 - INTRODUÇÃO	13
1.1 - Lesão de Isquemia /Reperusão	15
1.2 - Transaminases Hepáticas	17
1.3- Apoptose	18
1.4 - Mecanismos celulares da apoptose: Caspase	20
1.5 - Mecanismos de ativação das caspases	21
1.6 - Glutamina	24
1.7 - Metabolismo da glutamina	26
1.8 - L-alanil-glutamina	27
2 - OBJETIVOS	28
3 - MÉTODOS	29
3.1 - Delineamento do estudo	29
3.2 - Procedimento cirúrgico	30
3.3 - Coleta de amostras	30
3.4 - Método imunohistoquímico	32
3.5 - Critérios e avaliação imonihistoquímica	32
3.6 - Esquema do delineamento do experimento	34
4 - RESULTADOS	35
5 - DISCUSSÃO	40
6- CONCLUSÃO	49
7 - REFERÊNCIAS	50
ANEXOS	
APÊNDICES	

RESUMO

ISQUEMIA HEPÁTICA EXPERIMENTAL E A AÇÃO PRÉ-CONDICIONANTE DA L-ALANIL-GLUTAMINA. RAIMUNDO JOSÉ CUNHA ARAÚJO JUNIOR, Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação Stricto sensu. UFC. Orientador: Prof.Dr..José Huygens Parente Garcia

As estratégias para prevenir a lesão de isquemia reperfusão durante as cirurgias hepáticas incluem a oclusão intermitente do fluxo de sangue ao fígado ou a utilização de substâncias que poderiam causar um efeito protetor ou aumento da resistência do tecido hepático à isquemia. O presente estudo teve o objetivo de avaliar o efeito do uso da L-Alanil-Glutamina (GLN) em *Ratus norvegicus* submetidos à isquemia hepática normotérmica, através de provas bioquímicas e imunohistoquímicas. Utilizou-se 30 ratos machos, da variedade Wistar, com peso médio de 300 gramas, distribuídos em três grupos de 10 ratos cada: grupo Controle, Grupo Isquemia Reperfusão (IR) e grupo Glutamina + Isquemia Reperfusão (GLN+IR). O grupo IR recebeu solução salina 0,9% intra-peritoneal (IP), 2 horas antes de ser submetido laparotomia, e isquemia total por pinçamento da tríade portal por 30 minutos seguidos de reperfusão por 60 minutos; O grupo GLN + IR recebeu 0,75mg/Kg de glutamina IP 2 horas antes de isquemia total por 30 minutos, seguidos de reperfusão por 60 minutos. O grupo Controle foi submetido à punção peritoneal 2 horas antes da laparotomia, e de apenas manipulação da tríade portal, sem realizar pinçamento algum. O procedimento foi realizado sob anestesia (IP) com uma solução de cloridrato de ketamina, 80 mg/Kg + cloridrato xilazina, 10 mg/Kg. Ao final do período de reperfusão os animais foram relaparotomizados e colhido amostras de sangue para avaliação dos níveis de ALT e DHL, e amostras de tecido hepático para estudo imunohistoquímico com anticorpo para Caspase-3. A significância estatística foi calculada pelo teste ANOVA e pelo pós-teste de comparação de múltiplas médias de *Tukey* utilizando-se o *software GraphPad Prism*, versão 5.00. A média e erro padrão da dosagem de ALT, DHL, e do índice de células marcadas com Caspase-3 foi respectivamente para o grupo IR: 270,6±40,8; 2079,0±262,4 e 66,3±13,5; para o grupo GLN +IR: 127,9±31,17; 1019,0±187,9 e 36,6±12,0; para o grupo Controle: 83,3±5,5; 206,6±16,2 e 21,9±111,4. O pré-condicionamento com L-alanil-GLN IP reduziu significativamente os valores de ALT e DHL em *Ratus norvegicus*, submetidos à lesão de IR hepática, sugerindo hepatoproteção.

Palavras-Chave: Traumatismo por reperfusão, Fígado-cirurgia, Apoptose, glutamina,

ABSTRACT

EXPERIMENTAL HEPATIC ISCHEMIA AND PRECONDITIONING ACTION OF L-ALANIL-GLUTAMINE. RAIMUNDO JOSÉ CUNHA ARAÚJO JUNIOR, Thesis (Master). Post-graduation program (Stricto sensu). UFC. Prof.Dr.José Huygens Parente Garcia.

The strategies to prevent the hepatic ischemia/reperfusion injury after hepatic resections or transplantation include intermittent control of blood influx to the liver or the use of a substance that could cause a protective effect or increase of the resistance of the hepatic tissue to ischemia. The present study had the objective to evaluate the effect of the use of the L-Alanil-Glutamina in *Ratus norvegicus* submitted the normothermic hepatic ischemia on liver biochemists and imunohistochemistry, as well as evaluating apoptosis present in this experimental model. 30 male rats, with average weight of 300 grams, divided in three groups of 10 rats: Control group, Ischemia Reperfusion group and Glutamine group. Ischemia Reperfusion group received saline solution 0.9% intra-peritoneal (IP), 2 hours before being submitted to laparotomy, and total ischemia by clamping of portal triad for 30 minutes followed of reperfusion for 60 minutes; The Glutamine group received 0,75mg/Kg IP 2 hours before total ischemia for 30 minutes, followed by reperfusion for 60 minutes. Control group was submitted the peritoneal punction 2 hours before the laparotomy, and only manipulation of the biliary tree, without carrying through any clamping. The procedure was carried through under anesthesia (IP) with a solution of Ketamin chloridate , 80 mg/Kg + xilazin chloridate, 10 mg/Kg. To the end of the period of reperfusion the animals had been relaparotomized and blood collected for evaluation of the levels of ALT and DHL, and hepatic tissue samples for imunohistochemistry study with antibody for Caspase-3. The statistics significance was calculated by ANOVA and the post test of multiple comparison of Tukey, using the software GraphPad Prism, version 5.00. The average and error standard of the dosage of ALT, DHL, and of the index of cells marked with Caspase-3 was respectively for the Ischemia Reperfusion group: 270,6+40,8; 2079,0+262,4 and 66,3+13,5; for the Glutamine group: 127,9+31,17; 1019,0+187,9 and 36,6+12,0; for the Control group: 83,3+5,5; 206,6+16,2 and 21,9+111,4. The preconditioning with intraperitoneal L-alanil-glutamine significantly reduces the values of the biochemists markers, in *Ratus norvegicus* submitted to the hepatic ischemia-reperfusion injury, suggesting hepatic protection.

Key words: Reperfusion injury, Liver, surgery , Apoptosis, Glutamine

1 - INTRODUÇÃO

O fígado é a maior glândula do corpo humano. Uma usina poderosa. Na Grécia antiga a mitologia contava que Prometeu, um Titã, um semideus, foi castigado por Zeus a permanecer amarrado no Monte Cáucaso, acorrentado a uma rocha por ter ousado roubar dos deuses o fogo eterno e dá-lo aos homens. Esse castigo consistia em uma tortura diária, quando uma grande águia lhe bicava o fígado, porém à noite seu fígado voltava a se regenerar (POWER e RASKO, 2008).

Em 1908, PRINGLE descreveu a técnica de pinçamento da tríade portal para indução de isquemia hepática para coibir sangramentos hepáticos, e que desde então, tem sido muito utilizada nas cirurgias por trauma hepático e nas ressecções hepáticas segmentares ou amplas. Nos organismos submetidos à isquemia hepática, seguida de reperfusão, ocorre interação complexa entre alterações microvasculares, liberação de mediadores inflamatórios, radicais livres de oxigênio, ativação de neutrófilos, plaquetas, células de Kupffer e células endoteliais sinusoidais. A ativação destas células pode levar à liberação de fator de necrose tumoral (TNF – Tumoral Necrosing Factor), leucotrienos, tromboxanos, prostaglandinas, endotelinas, fator de ativação plaquetária, causando danos à membrana celular, membrana mitocondrial interna e endotélio levando a distúrbios na microcirculação hepática (COLLARD e GELMAN, 2001). Dependendo do tempo de isquemia e do momento da reperfusão, pode haver desde simples alterações bioquímicas até necrose celular. O pré-condicionamento isquêmico tem minimizado essas alterações, funcionando como possível método protetor das lesões hepatocelulares induzidas pelo binômio isquemia/reperfusão (MURRY et al. 1986; CLAVIEN et al, 2000; PACHECO et al., 2006).

As lesões decorrentes da isquemia hepática secundária às técnicas de ressecção e de transplante constituem um problema grave e ainda não totalmente solucionado. Esse conjunto de alterações é denominado de isquemia/reperfusão (I/R), e tem sido alvo de estudos de muitos pesquisadores. Em muitos centros existem grupos que se dedicam a linha de pesquisa específica para o estudo das lesões de I/R nos mais diversos órgãos, incluindo o fígado.

(SILVA et al., 2002; MIRANDA et al., 2004).

O restabelecimento do fluxo hepático é seguido de um agravamento da lesão já iniciada pela isquemia. A reperfusão resulta em dois efeitos principais: a perda da viabilidade do endotélio dos sinusóides e a ativação das células de Kupffer e dos neutrófilos. O melhor entendimento desse fenômeno permitirá alcançar melhores resultados, uma vez que sua ocorrência pode estar associada ao não funcionamento primário e disfunção do enxerto hepático no caso das cirurgias de transplante. O edema das células de Kupffer e endoteliais, a vasoconstrição, a infiltração de leucócitos e a agregação plaquetária nos sinusóides caracterizam a lesão de isquemia-reperfusão (SAIDI et al., 2007). Há um importante distúrbio da microcirculação, como aderências de leucócitos e plaquetas, com conseqüente diminuição do fluxo sanguíneo e perpetuação do processo de isquemia. Vasoconstrição, resultante do desequilíbrio entre o efeito do óxido nítrico e endotelinas agrava o distúrbio da microcirculação. A ativação das células de Kupffer e leucócitos provocam a liberação de radicais livres de oxigênio, além de outros mediadores pró-inflamatórios que provavelmente agravam a lesão do enxerto. A lesão do endotélio pode impedir a liberação do óxido nítrico, molécula bioativa que tem sua importância reconhecida e parece ter papel central na lesão de I/R do fígado (MIRANDA et al., 2004).

O conceito de isquemia está relacionado a restrição parcial ou total de sangue arterial a um determinado órgão ou tecido. A extensão das repercussões desta restrição depende do metabolismo do tecido atingido, da existência de circulação colateral efetiva e do tempo decorrido entre a restrição e a reperfusão (GRACE, 1994; MUHLBACHER et al., 1999; COTRAN et al., 2000). As conseqüências mais evidentes da isquemia estão associadas às alterações morfológicas e funcionais resultantes da necrose tecidual. No entanto, nas últimas décadas têm chamado a atenção certos aspectos da denominada morte celular programada (JONES, 1997; MASSBERG, 1998; HENGARTNER, 2000; LOCKSHIN e ZACHERI, 2002). As alterações provocadas pela falta de aporte sanguíneo desencadeiam processos metabólicos celulares que induzem a célula à sua autodestruição sem a ocorrência característica da reação inflamatória, conhecida como fenômeno de apoptose. A apoptose é uma forma de morte celular que ocorre em uma ampla variedade de doenças. Nas hepatopatias agudas ou crônicas tem sido associada aos eventos geradores de hepatite alcoólica, hepatite viral, hepatocarcinoma, colestase, doença de Wilson e na rejeição de transplantes (BARBINI e VEJA, 2002; KUENZLER et al, 2002).

A avaliação dos aspectos morfológicos da necrose e dos fenômenos metabólicos, imunohistoquímicos e genéticos associados a apoptose celular podem ser utilizados como indicadores da gravidade da lesão e da reversibilidade das alterações de tecidos submetidos à isquemia (CHAVES, 2005). As estratégias para prevenir a perda sanguínea durante as ressecções hepáticas incluem o controle total do influxo de sangue ao fígado (manobra de PRINGLE, 1908) ou a oclusão seletiva por pinçamento de pedículos dos segmentos hepáticos. Tendo se pesquisado também a utilização de várias substâncias, tais como a ciclosporina, lidocaína, ranitidina, metilprednisolona, verapamil e glutamina, que poderiam causar um efeito protetor ou aumento da resistência do tecido hepático à isquemia, diminuindo a lesão de I/R e seus conseqüentes efeitos deletérios (OKAJIMA et al., 2002; YAGMURDUR et al., 2002; ARII et al., 2003; CHEN et al., 2004; GARCIA et al., 2004; SAIDI et al., 2007; LUO et al., 2009).

A cirurgia hepática tem alcançado grande desenvolvimento. O transplante de fígado atualmente é o tratamento de escolha para pacientes com insuficiência hepática terminal e hepatite fulminante, alcançando índices de sucesso bastante aceitáveis. A sobrevida em um ano dos pacientes submetidos ao transplante de fígado era 50% em 1980. A partir de 1996, muitos centros apresentavam sobrevida anual de 85% e de aproximadamente 75% em cinco anos. O grupo de transplante de fígado do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará realizou em 2009, 82 transplantes com doador falecido, apresentando uma sobrevida atuarial de um ano de 87%. Esse procedimento implica em expor o enxerto obrigatoriamente a um período de isquemia, provocando lesões no órgão a ser transplantado. O tempo de isquemia fria começa na captação de múltiplos órgãos quando a aorta é ocluída e os órgãos são perfundidos com soluções resfriadas, terminando quando o enxerto é colocado no campo operatório. Em seguida, começa o tempo de isquemia quente que é concluído com as anastomoses vasculares e a reperfusão do enxerto (HADDAD, 2001).

1.1 - Lesão de Isquemia Reperfusão

Sabe-se que as conseqüências da isquemia, em diferentes tecidos, dependem de sua duração, e que muitas das lesões são desenvolvidas durante o estágio de reoxigenação decorrente da reperfusão tecidual (AALTO e RAIVIO, 1993; ZHANG et al., 1994; SZABO et al., 1996). As mitocôndrias são alvos importantes dos danos provocados pelos processos de

isquemia e reperfusão. Nelas ocorre diminuição das atividades da nicotinamida adenina dinucleotídeo ligada com hidrogênio desidrogenase (NADH), do carreador de adenosina difosfato / adenosina trifosfato (ADP/ATP) e da ATP sintetase, além do aumento na atividade da fosfolipase A2. Ocorre ainda, acentuado acúmulo de cálcio e aumento da geração de radicais livres pelas mitocôndrias (FARBER et al., 1981).

A associação destes eventos pode ser responsável pelas lesões e morte celular, decorrentes da reperfusão, possivelmente por um fenômeno de transição de permeabilidade da membrana mitocondrial interna (KONO et al., 1982). No sentido de se proteger o fígado das lesões de I/R vários tipos de proteção hepática têm sido utilizados, como uso de drogas (BRISOTTI et al., 2000), hipotermia (HANNOUN et al., 1996), pré-condicionamento isquêmico, isto é, indução de isquemia/reperfusão sucessivas por pinçamentos intermitentes do pedículo hepático por tempos diferentes (CHOUILLARD et al., 2010). Vários estudos experimentais têm demonstrado a eficácia de drogas no sentido de prevenir ou atenuar as lesões de I/R. Têm sido testadas a superóxido dismutase, catalase, manitol, alopurinol, vitamina E, N-acetilcisteína, compostos quelantes de ferro, inibidores da enzima conversora da angiotensina e antagonistas dos canais de cálcio (CERWENKA et al., 1999; COLLARD, 2001). Em estudos anteriores, observou-se que grupos de ratos submetidos a períodos de isquemia de 25 minutos, com 5 minutos de reperfusão em tempos sucessivos até completar 90 minutos, apresentaram valores da respiração mitocondrial significativamente menor do que o grupo onde o tempo de isquemia foi de 15 minutos, seguido de 15 minutos de reperfusão em 3 tempos sucessivos, completando 90 minutos (RODRIGUES et al., 1998). Nesse mesmo estudo, o período menor de isquemia, 15 minutos, pode ter atuado como pré-condicionamento isquêmico do fígado como também foi descrito por outros autores (BELGHITI et al., 1999; COLARD e GELMAN, 2001).

A desvantagem técnica da oclusão intermitente do pedículo hepático nas hepatectomias parciais é a possibilidade de sangramento durante os momentos de liberação do fluxo para reperfusão do fígado. O termo pré-condicionamento isquêmico foi introduzido na literatura por MURRY e colaboradores em 1986, e significa indução de um curto período de isquemia seguido por curto período de reperfusão antes de um período mais prolongado de isquemia. Este autor descreveu o efeito benéfico de curtos episódios de oclusão coronária seguidos também de curtos períodos de reperfusão no tamanho da área de infarto causado por isquemia sem pré-condicionamento. Resultados semelhantes foram descritos por outros

autores. O papel do pré-condicionamento isquêmico no aumento da tolerância à isquemia tem sido descrito em vários órgãos como coração, cérebro, medula espinhal, músculo esquelético, retina, rins, intestino, além de fígado. Entretanto, apesar de vários estudos, as causas do efeito protetor do pré-condicionamento isquêmico e seu real fundamento não estão ainda claramente estabelecidos (BULKLEY et al., 2000).

Alterações celulares induzidas pela isquemia- reperfusão:

1. Alteração do potencial de membrana
2. Alteração da distribuição de íons – aumento da relação Ca^{++} / Na^{+} intracelular
3. Edema celular
4. Desorganização do citoesqueleto de órgãos e tecidos
5. Diminuição da fosfocreatina
6. Acidose celular

1.2 - Transaminases Hepáticas

No fígado, a alanino-aminotransferase (ALT) está localizada somente no citoplasma celular, enquanto a aspartato-aminotransferase (AST) está tanto no citosol (20% da atividade total) e na mitocôndria (80% da atividade total) A magnitude da alteração da concentração das aminotransferases pode ser classificada em leve (<5 vezes o limite superior), moderada (entre 5 a 10 vezes o limite superior de referência) ou acentuada (> de 10 vezes o limite superior de referência). Clinicamente, os pacientes que apresentam valores alterados de forma acentuada tipicamente têm lesão hepática aguda. Todavia tem se alertado para o fato que a avaliação da intensidade do dano agudo, baseado na magnitude da elevação de enzimas hepáticas pode algumas vezes ser incompleta, pois pode haver uma faixa de variação incerta por sobreposição de causas. Além do mais, o grau de elevação varia no curso da lesão e depende do momento de quando se avalia o nível da enzima. Apesar destas ambigüidades, a magnitude da alteração nos níveis de aminotransferase, pode dar uma interpretação inicial para o diagnóstico diferencial de várias doenças e para avaliar o nível de dano sofrido pelo fígado (GIANNINI et al., 2005).

Níveis muito altos indicam lesão isquêmica ou tóxica. Nessas situações, o nível de AST usualmente tem um pico anterior aquele da ALT devido à distribuição intralobular

peculiar das enzimas. A Zona 3 dos ácinos é mais vulnerável tanto ao dano hipóxico (os hepatócitos são expostos a um meio já pobre em oxigênio) como ao dano tóxico (os hepatócitos são mais ricos em enzimas microssomais). Nas lesões isquêmicas os níveis de aminotransferases tendem a cair rapidamente depois do pico (GIANNINI et al., 2005).

A lesão hepática, crônica ou aguda pode resultar em elevações das transaminases. A AST e ALT são enzimas que catalizam a transferência de grupos alfa-amino do aspartato e alanina para o grupo alfa-ceto do ácido cetoglutático para gerar os ácidos, oxalacético e pirúvico, os quais são importantes contribuintes para o ciclo do ácido cítrico. Ambas aminotransferases são altamente concentradas no fígado. A AST está também difusamente representada no coração, músculo esquelético, rins, cérebro e hemácias, e a ALT tem baixas concentrações nos músculos esqueléticos, nos rins, e elevadas no parênquima hepático. Sendo que um aumento significativo na ALT é desse modo, mais específico de lesão hepática (GIANNINI et al., 2005).

A ativação das células de Kupffer e neutrófilos induzida pela isquemia e reperfusão pode ser intermediada pelo fator de ativação plaquetária (BOIN, 1997), propiciando a liberação de radicais livres de oxigênio, aumento do influxo de cálcio e redução de agentes antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutatona, aumentando a produção de malondialdeído (MDA). A ativação difosfolipases pode produzir graves danos aos lípidios de membrana e alterações da permeabilidade mitocondrial (FARBER et al., 1981).

1.3 - Apoptose

O termo apoptose (do grego *apó* = separação, *ptôsis* = queda), adotado pela primeira vez por KERR et al., na década de 70, designa forma fisiológica de morte celular que ocorre segundo programa genético que desencadeia processo de autodigestão controlada, em consonância com a remoção de células lesadas, senescentes ou imprestáveis, sem alteração do microambiente celular. Além de seu papel fisiológico que regula a população celular, controla os processos de desenvolvimento e morfogênese e limita as reações imunes, a apoptose representa importante mecanismo fisiopatológico de lesão tecidual (THOMPSON, 1999).

Os últimos anos presenciaram considerável avanço na compreensão dos mecanismos genéticos e moleculares envolvidos na regulação da apoptose, elucidando seu papel na fisiopatologia de afecções hepatobiliares como as doenças autoimunes, as hepatites virais agudas e crônicas, a carcinogênese, lesão pelo álcool e outras drogas, lesão de isquemia e reperfusão, rejeição do enxerto hepático e doenças pelo acúmulo de cobre (KERR et al., 1972; PATEL, 1998).

A morte celular, definida como perda irreversível da estrutura e funções vitais da célula, ocorre por dois processos morfologicamente distintos: necrose e apoptose. Sabe-se atualmente que os dois fenômenos contribuem para a morte celular nas doenças hepatobiliares e que a opção da célula por uma dessas formas de morte é influenciada pelo seu estado energético (reserva de ATP). Como processo ativo, a apoptose requer reservas de ATP (pelo menos nas fases iniciais), ao passo que a necrose se instala quando há depleção total do ATP (KERR et al., 1972).

A necrose se caracteriza pela perda da integridade da membrana plasmática quanto a sua permeabilidade. Diferentes alterações como isquemia, hipóxia, hipertermia, irradiação e metabólitos tóxicos podem levar à perda abrupta da integridade da membrana plasmática (citólise) e à alteração de seus gradientes eletroquímicos. A liberação dos constituintes intracelulares para o meio extracelular estimula a resposta inflamatória e amplia a lesão tecidual. O fenômeno de morte celular por necrose é facilmente reconhecido nos espécimes de biópsia hepática porque os restos celulares permanecem por longo período antes de serem removidos pelas células inflamatórias (PATEL, 2000).

A apoptose é um processo ativo cuja marca registrada é a autodigestão controlada dos constituintes celulares, devida à ativação de proteases endógenas e pode ser comparada metaforicamente a um "suicídio celular". A ativação dessas proteases compromete a integridade do citoesqueleto, provocando verdadeiro colapso da estrutura celular. Em resposta à contração do volume citoplasmático, a membrana celular forma bolhas e se altera o posicionamento de seus lipídios constituintes.

Em células indenes, a distribuição de fosfatidilserina se faz primariamente no folheto interno da membrana plasmática. Durante o processo de apoptose esse lipídio se expõe no folheto externo da membrana. O novo posicionamento da fosfatidilserina serve como

sinalizador para que células fagocíticas das proximidades englobem os fragmentos celulares e completem o processo de degradação. Durante a apoptose ocorrem alterações características no núcleo celular graças à ativação de endonucleases que degradam o DNA. Como resultado, o núcleo torna-se picnótico e a cromatina se condensa nas porções adjacentes à membrana nuclear. Finalmente, o núcleo entra em colapso e se fragmenta. Simultaneamente, as bolhas que se formam no citoplasma separam a célula em fragmentos circundados por membrana, contendo partes do núcleo e organelas intactas (corpos apoptóticos). Os restos celulares são fagocitados pelos macrófagos teciduais ou células adjacentes (THOMPSON, 1999).

Um dos aspectos que distingue a apoptose da necrose é, nesta, a preservação da integridade da membrana plasmática que evita a liberação dos constituintes celulares para o meio extracelular e, conseqüentemente, a quimiotaxia e a ativação de células fagocíticas. O fenômeno da apoptose é mais difícil de ser detectado nos espécimes de biopsia hepática, pois suas alterações morfológicas se processam rapidamente, entre 2 a 4 horas e os corpos apoptóticos são rapidamente removidos pelos macrófagos teciduais. Essas peculiaridades justificam a ausência característica de resposta inflamatória no tecido adjacente com preservação do microambiente celular (PESSAYRE et al., 1999, THOMPSON, 1999; PATEL, 2000). Em condições patológicas, o grande número de células que sofre apoptose pode suplantar a capacidade fagocitária do fígado. Nessas circunstâncias, os corpos apoptóticos não-fagocitados sofrem processo secundário de necrose, com resposta inflamatória. Portanto, nessas circunstâncias, a elevação dos níveis séricos de aminotransferases pode ser observada, refletindo tanto aumento da apoptose, como necrose hepatocelular (PATEL e GORES, 1998).

1.4 - Mecanismos celulares da apoptose: Caspases

A apoptose pode ser deflagrada por estímulos externos através de receptores específicos na superfície celular chamados receptores da morte ou por estímulos internos de estresse intracelular, tais como lesão do DNA ou alterações no ciclo celular ou nas vias metabólicas. Essas diferentes vias culminam com a ativação de proteases conhecidas como caspases, que jogam papel fundamental no processo de morte celular.

As caspases estão presentes no citosol sob a forma de pró-enzimas inativas, tornando-se ativas após clivagem proteolítica à altura de resíduos do ácido aspártico (THOMPSON, 1999). Pelo menos 14 membros dessa família já foram identificados nos mamíferos e estão

envolvidos no processo de inflamação e apoptose. Uma vez ativada, a maioria das caspases tem a habilidade de catalisar a ativação de múltiplos outros membros dessa família, resultando em amplificação da cascata proteolítica. Alguns membros, tais como a caspase-8, ocupam posição proximal na cascata proteolítica e agem como reguladores e iniciadores, enquanto outros como a caspase-3 são mais distais e agem como efetores da fragmentação celular (PATEL, 1998). Contrariamente às proteases armazenadas nos lisossomas ou ativadas no citosol pelo cálcio, que têm espectro amplo de substratos inespecíficos, as caspases têm substratos bem restritos, o que lhes assegura um processo de seletividade e especificidade no processo de proteólise. Tais substratos incluem proteínas envolvidas no reparo de danos e na replicação do DNA, no ciclo celular, na sinalização de transdução e na manutenção da integridade da estrutura celular. O ataque a todos esses alvos impede o reparo quando se rompe toda a estrutura do citoesqueleto e do núcleo, levando a desestruturação da célula (KERR et al., 1972; THOMPSON, 1999). Em muitos modelos de lesão hepática, a inibição das caspases freqüentemente impede a apoptose, o que as torna alvos atraentes para uma estratégia farmacológica, quando, na patogênese da doença, o processo de apoptose esteja envolvido.

1.5 - Mecanismos de ativação das caspases: receptores da morte e disfunção mitocondrial

Um dos mecanismos pelos quais a apoptose pode ser deflagrada é através dos receptores da morte presentes na superfície celular, que são ativados em resposta ao acoplamento de ligantes específicos. A maioria identificada dos receptores da morte é membro da superfamília de receptores para o fator de necrose tumoral (TNF) e é caracterizada por apresentar porção extracelular rica em cisteína e uma região citoplasmática, chamada cadeia da morte, essencial para transdução intracelular do sinal de morte. Entre esses receptores, um dos mais estudados e melhor caracterizados é o receptor *Fas* (CD95 ou APO-1), abundantemente expresso no fígado e cuja importância na fisiopatologia hepática e na homeostasia tem sido amplamente documentada em diversas observações (FAUBION e GORES, 1999). Quando o ligante-*Fas* se acopla ao receptor *Fas*, as moléculas individuais do receptor se trimerizam formando agregado de cadeias da morte. Este permite que as mesmas se liguem a uma proteína adaptadora presente no citosol, chamada cadeia da morte associada ao Fas ("*Fas-associated death domain*", FADD). A ligação desse complexo à pró-caspase-8 resulta na ativação dessa enzima por clivagem proteolítica. A caspase-8 pode então,

diretamente ou pela via mitocondrial, ativar a caspase-3 (caspase efetora) (Figura 1). O receptor-Fas é expresso em uma variedade de células, incluindo células epiteliais, hematopoiéticas e linfócitos B e T ativados. O padrão de expressão tecidual do ligante Fas é mais restrito. Sendo expresso nos linfócitos T maduros CD4+ e CD8+ e nas células "natural killer" ativadas. A expressão simultânea, de receptor-Fas e ligante-Fas em linfócitos maduros ativados, podem representar mecanismo de autolimitação da resposta imunológica (PATEL e GORES, 1995).

No fígado, o receptor-Fas é expresso nos hepatócitos, colangiócitos, células estelares ativadas e células de Kupffer. A ativação da caspase-8 via receptor-Fas é importante mecanismo iniciador da apoptose dos hepatócitos em condições fisiológicas e patológicas, sendo de extrema relevância na fisiopatologia de diversas doenças hepáticas (FAUBION 1999). Em condições normais, os hepatócitos expressam baixos níveis de receptores-Fas. Citocinas inflamatórias, tais como a interleucina-1, ou a presença de estresse oxidativo, que resulta na lesão de DNA e ativação do *p53*, podem aumentar a expressão dos receptores-Fas, tornando as células mais suscetíveis à apoptose pelo sistema Fas (KERR, 1972; FAUBION e GORES, 1999). Simultaneamente, o estresse oxidativo aumenta a expressão do ligante-Fas, o que pode levar a processo conhecido como "fratricídio", no qual hepatócitos vizinhos podem se destruir uns aos outros pela indução da apoptose (GALLE, 1995).

Recentemente, identificou-se uma expressão significativamente reduzida do receptor-Fas em formas agressivas de hepatocarcinoma, especialmente em tumores pouco diferenciados e que cursam com invasão da veia porta, ou extracapsulares. A perda da expressão do receptor-Fas em tais tumores, provavelmente reflete mecanismo de adaptação para evitar a morte das células tumorais pelo sistema imune (FAUBION, 1999). Além dos receptores da morte, a apoptose pode também ser deflagrada por sinais de estresse intracelular que resultem em disfunção mitocondrial, tais como lesão do DNA (via gene *p53*), alterações nas vias metabólicas (aumento do cálcio intracelular, redução do pH, estresse oxidativo), drogas, toxinas ou privação dos fatores de crescimento. Na presença de sinais de estresse intracelular ocorre a translocação de proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bid) do citosol para a mitocôndria. Essas proteínas são membros da família de proteínas *Bcl-2* que exercem importante função reguladora da apoptose. A translocação das proteínas próapoptóticas para a mitocôndria resulta na liberação para o citosol do citocromo-c, presente no espaço existente entre a membrana mitocondrial externa e interna. No citosol, o citocromo-c forma um

complexo com o fator ativador da apoptose-1 ("*apoptosis-activating factor 1, apaf-1*"), levando à ativação da caspase-9, que ativa caspases efetoras. Portanto, a ativação das caspases pode ser desencadeada via receptores da morte ou via disfunção mitocondrial, com liberação do citocromo-c (PAROLIN e REASON, 2001).

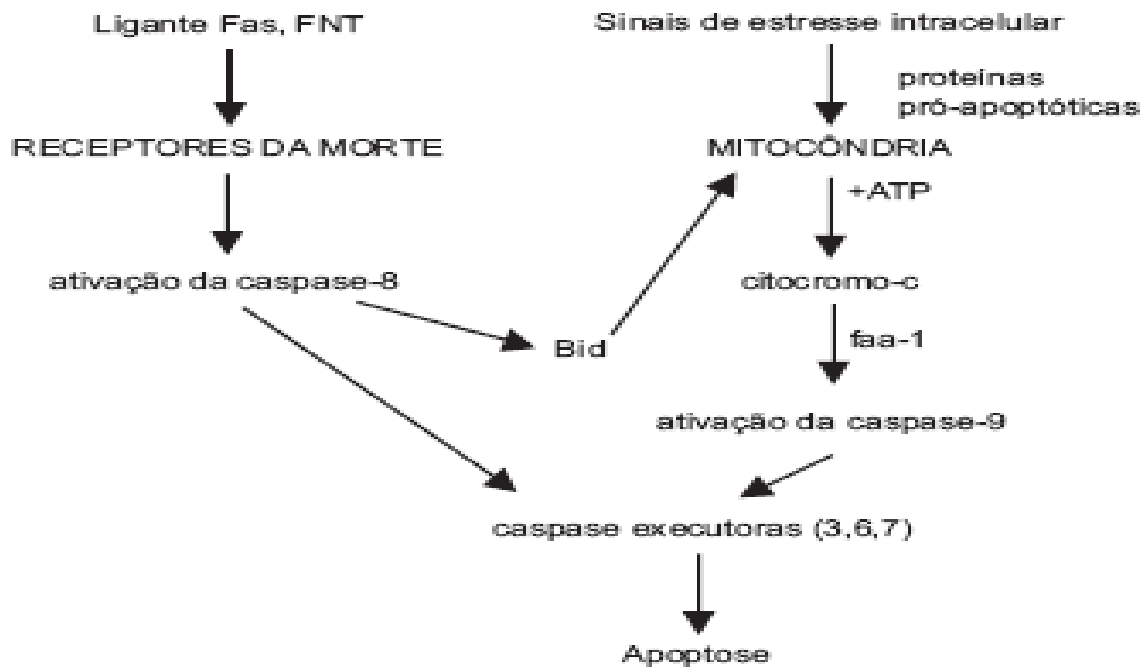


Figura 1 – Indução da apoptose pela via receptores da morte e por disfunção mitocondrial.

FNT = fator de necrose tumoral; faa-1 = fator ativador da apoptose 1. Adaptado de KAPLOWITZ, 2000

Considerando-se a complexidade que envolve a ocorrência da lesão de Isquemia/Reperusão, e seus efeitos sobre os resultados das cirurgias de grandes ressecções hepáticas e no transplante de fígado, fazem-se necessários mais estudos para uma maior compreensão desse problema.

1. 6 – Glutamina (GLN)

Foram SCHULTZE e BOSSHARD, que em 1833, descreveram e denominaram de

GLUTAMINA uma substância que foi extraída da beterraba, e que era formada de ácido glutâmico e amônia. Substância essa que na verdade era uma amida, e seu nome correto, segundo FELTRE, seria Glutamida (FELTRE, 1998), mas que o tempo, assim como o uso, acabaram por consagrar a denominação de Glutamina.

A fórmula empírica da glutamina é $C_5H_{10}O_3N_2$. E sua fórmula molecular é $C_5H_{10}O_3N_2$, e a fórmula estrutural pode ser vista na figura abaixo.

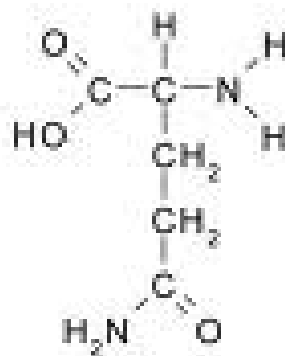


Figura 2 - Fórmula estrutural da Glutamina

A fórmula estrutural mostra que a glutamina é um ácido carboxílico biaminado, alinhando-se na categoria de aminoácidos com grupos polares sem carga (LEHNINGER, 2000).

Em 1935, KREBS, demonstrou a capacidade de síntese de glutamina e sua degradação por hidrólise em tecidos animais. A GLN é um aminoácido de características diferentes dos demais aminoácidos presentes nos humanos.

A GLN é um dos aminoácidos constituintes das proteínas e é o mais abundante no plasma e nos tecidos, principalmente no tecido muscular. Em humanos, a GLN representa cerca de 20% do total de aminoácidos livres do plasma, com concentrações que variam de 0,5 a 0,9mM. Normalmente, a GLN é considerada como um aminoácido não essencial porque pode ser sintetizado pelo organismo de acordo com as necessidades. Os músculos possuem o maior estoque de GLN. As células do cérebro e dos pulmões são produtores regulares de

GLN, enquanto as células do intestino e do sistema imunológico e do fígado podem tanto produzir como consumir este aminoácido (CURI et al., 1999).

Durante situações de estresse, como trauma e infecções, neoplasias ou exercícios extenuantes, pode haver mudanças consideráveis no fluxo da GLN, que nessas situações pode tornar-se um aminoácido essencial, quando sua disponibilidade se torna inferior à necessidade, exigindo um aporte externo. A GLN é largamente distribuída no organismo humano, sendo o aminoácido de maior concentração no sangue e tecidos sob a forma livre de L-glutamato, participando de vários processos metabólicos. KREBS em 1935 demonstrou que diferentes concentrações de enzimas são fundamentais para o metabolismo da GLN: Glutaminase (presente no fígado) e glutamina-sintetase presente no músculo esquelético (ALVES, 2005).

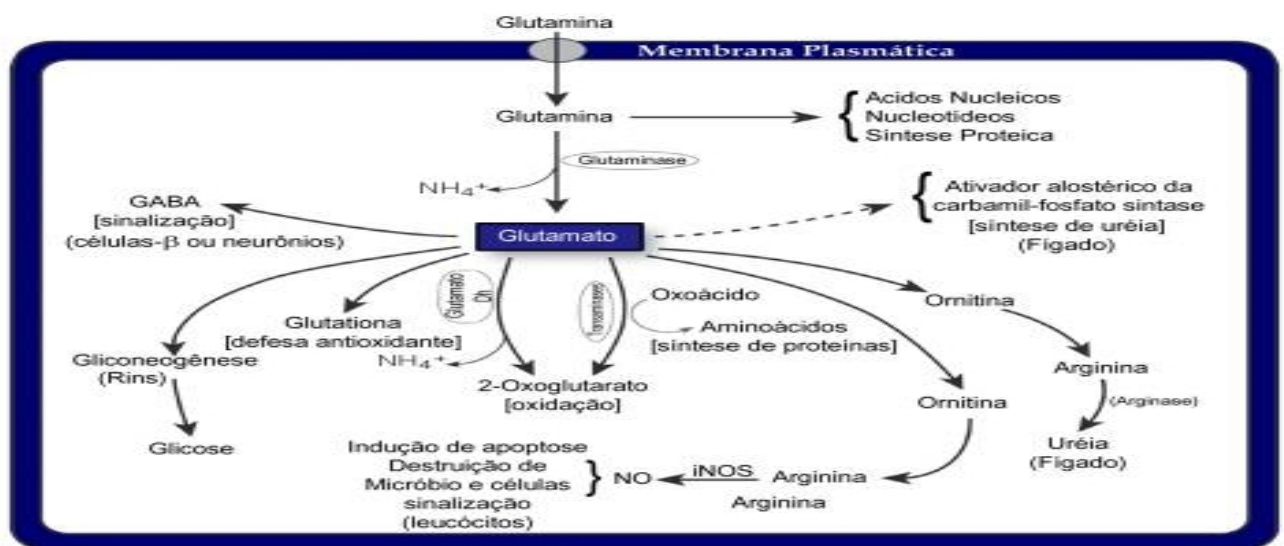


Figura 3 – Importância da Glutamina e glutathione nas reações de transaminação e desaminação de aminoácidos e como precursoras de importantes substâncias metabólicas e da glicose através da neoglicogênese (Fonte: NEWSHOME et al. 2003)

Sabe-se que a GLN, mais especificamente a L-GLN é importante como precursora, na síntese de peptídeos e proteínas, açúcares aminados, de purinas e pirimidina, de ácido nucléico e nucleotídeos, além de fornecer o Carbono para processos celulares oxidativos, sob

ação da glutaminase, presente em altas concentrações nas mitocôndrias principalmente no hepatócito (NEWSHOLME et al., 2003).

1.7 - Metabolismo da Glutamina no fígado

O fígado pode ser considerado uma grande central metabólica do organismo. O nitrogênio proveniente dos tecidos periféricos, notadamente dos músculos e dos pulmões, é prontamente ofertado aos órgãos centrais sob a forma de glutamina, alanina e aspartato, desde que a captação e o metabolismo da GLN no intestino se processem normalmente (YOUNG, 2001). E como as células periportais do fígado são ricas em glutaminase, a degradação da GLN desempenha um papel importante no controle dos níveis de amônia no sangue venoso, pois a síntese e a hidrólise da GLN são etapas intermediárias na formação da uréia. O Fígado utiliza a amônia sanguínea para formar GLN (HAUSSINGER, 1986).

1.8 - L-alanil-Glutamina

O uso de GLN tem algumas limitações decorrentes de suas características físico-químicas. A forma livre da glutamina (L-glutamina) possui pouca solubilidade em solução aquosa e baixa estabilidade em pH baixo e temperaturas elevadas. No organismo, a L-glutamina pode sofrer conversão espontânea formando piroglutamato e amônia, produtos tóxicos ao organismo humano (ALVES, 2005). Desse modo, a opção para o uso de aminoácido na forma de peptídeos, tais como a Glycyl-glutamina (Gly-GLN) ou a L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) que apresentam alta solubilidade em água e estabilidade durante os procedimentos de preparo, armazenamento e administração das soluções nutricionais, tem sido a opção de muitos pesquisadores (BEZERRA FILHO et al., 2002; TORRES et al., 2003; GUIMARÃES FILHO et al., 2004), pois esses compostos sofrem hidrólise e liberam moléculas de aminoácidos livres Alanina e Glutamina (ALVES, 2005).

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral:

Avaliar a ação da administração pré-operatória de L-Alanil-Glutamina e a sua possível ação protetora contra as lesões de isquemia/reperfusão em ratos submetidos à isquemia hepática.

2.2 - Objetivos específicos

1. Avaliar os efeitos da isquemia/reperfusão hepática sobre metabólitos ALT e DHL;
2. Avaliar se há efeito protetor da Glutamina como pré-condicionamento, sobre os marcadores bioquímicos ALT e DHL;
3. Avaliar se há efeito protetor sobre o índice de marcação de caspase – 3.

3 - MÉTODO

3.1 - Delineamento do estudo:

Foram utilizados 30 ratos albinos (*Rattus norvegicus*), machos, da variedade Wistar, com peso variando de 280 a 350 gramas (médio de 300 gramas), procedentes do Biotério da Faculdade NOVAFAPI, em Teresina, Piauí. Todos os animais foram mantidos em condições ambientais e convencionais, com controle de luminosidade e temperatura, ciclo de vigília sono. Recebendo dieta padrão do Biotério (*Labina*®) e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos em três grupos de 10 ratos cada: Grupo Isquemia/Reperusão (IR), Grupo Glutamina mais Isquemia /Reperusão (GLN + IR), e Grupo Controle (C). O procedimento cirúrgico foi sempre realizado no mesmo período do dia para evitar interferência do ciclo circadiano, no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade NOVAFAPI. E de acordo com as normas brasileiras de experimentação em animais.

O grupo IR recebeu injeção de solução salina 0,9% intraperitoneal (IP) 2 horas antes de ser realizada isquemia hepática através laparotomia e pinçamento total do pedículo hepático por uma pinça vascular tipo Bulldog e fechamento da cavidade abdominal com sutura contínua com fio mononylon 4-0 (Etichon®). Após um período 30 minutos de isquemia, os animais foram relaparotomizados e a pinça vascular retirada, restaurando-se o fluxo sanguíneo. Novamente os animais tiveram seu abdome fechado, permitindo a reperusão hepática por um período de 60 minutos ao final dos quais os animais novamente foram relaparotomizados para coleta de sangue através de punção cardíaca para dosagem de ALT e DHL e retirada do lobo hepático mediano para estudo histológico e imunohistoquímico pela marcação para caspase – 3.

O Grupo GLN + IR foi submetido à injeção intraperitoneal de solução de L-alanil-Glutamina 20% (DIPEPTIVEN ®), 0,75g/kg, 2 horas antes de ser realizada a isquemia hepática através do pinçamento total do pedículo hepático e fechamento da cavidade abdominal da mesma forma que foi feito para o Grupo IR. Após um período 30 minutos de isquemia, os animais foram relaparotomizados e a pinça vascular retirada, restaurando-se o fluxo sanguíneo, permitindo a reperusão hepática por um período de 60 minutos ao final dos

quais os animais novamente foram relaparotomizados para coleta de sangue e retirada do lobo hepático mediano para estudo e imunohistoquímico pela marcação para caspase – 3.

O Grupo C foi submetido apenas à punção abdominal 2 horas antes de uma laparotomia e manipulação do pedículo hepático. Suturado e relaparomizado após 30 minutos e mais uma vez manipulado o pedículo, seguindo-se a um período de 60 minutos, a fim dos quais os animais foram relaparotomizados, colhido amostra de sangue e fragmentos de tecido hepático, de modo semelhante aos outros dois grupos.

3.2 - Procedimento cirúrgico:

Os ratos foram submetidos a jejum de 12 horas na noite anterior ao experimento. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia intraperitoneal (IP) com uma solução de cloridrato de ketamina, 80mg/Kg (Cristália, Itapira, SP) + cloridrato xilazina, 10 mg/Kg (Bayer S.A., São Paulo, SP). Em seguida realizou-se, seguindo técnica asséptica, laparotomia mediana. O pedículo hepático, composto pela veia porta, artéria hepática e via biliar, foi isolado, sendo posteriormente ocluído com pinça vascular do tipo *Bulldog* (Figura 4). A oclusão completa da tríade portal no local proposto foi confirmada no trans-operatório pela presença da palidez importante no parênquima hepático. Após os 30 minutos de pinçamento da tríade portal, que corresponde ao tempo de isquemia, os ratos foram novamente anestesiados e a ferida operatória abdominal reaberta. Sendo mais uma vez confirmada a eficácia da oclusão vascular pela isquemia do fígado. A pinça vascular foi retirada, observando-se a reperfusão do tecido isquêmico por um período de 60 minutos. Dessa forma, os animais permaneceram vivos, submetidos à isquemia, permitindo o estudo das alterações metabólicas induzidas pela isquemia e reperfusão. Os animais dos grupos IR e GLN+IR foram submetidos a 60 minutos de reperfusão hepática normotérmica.

3.3 - Coleta de amostras:

Após serem anestesiados e relaparotomizados, os ratos de ambos os grupos tiveram sangue colhido através de punção cardíaca (1ml), para análise de ALT e DHL (teste enzimático). Em seguida o lobo mediano do fígado foi removido, e imediatamente colocado num frasco em formaldeído tamponado 10%, Para serem avaliados em exame imunohistoquímico para marcação por anticorpo para Caspase-3. O exame

imunohistoquímico foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica LAPAC, em Teresina, Piauí, credenciado pela Sociedade Brasileira de Patologia.

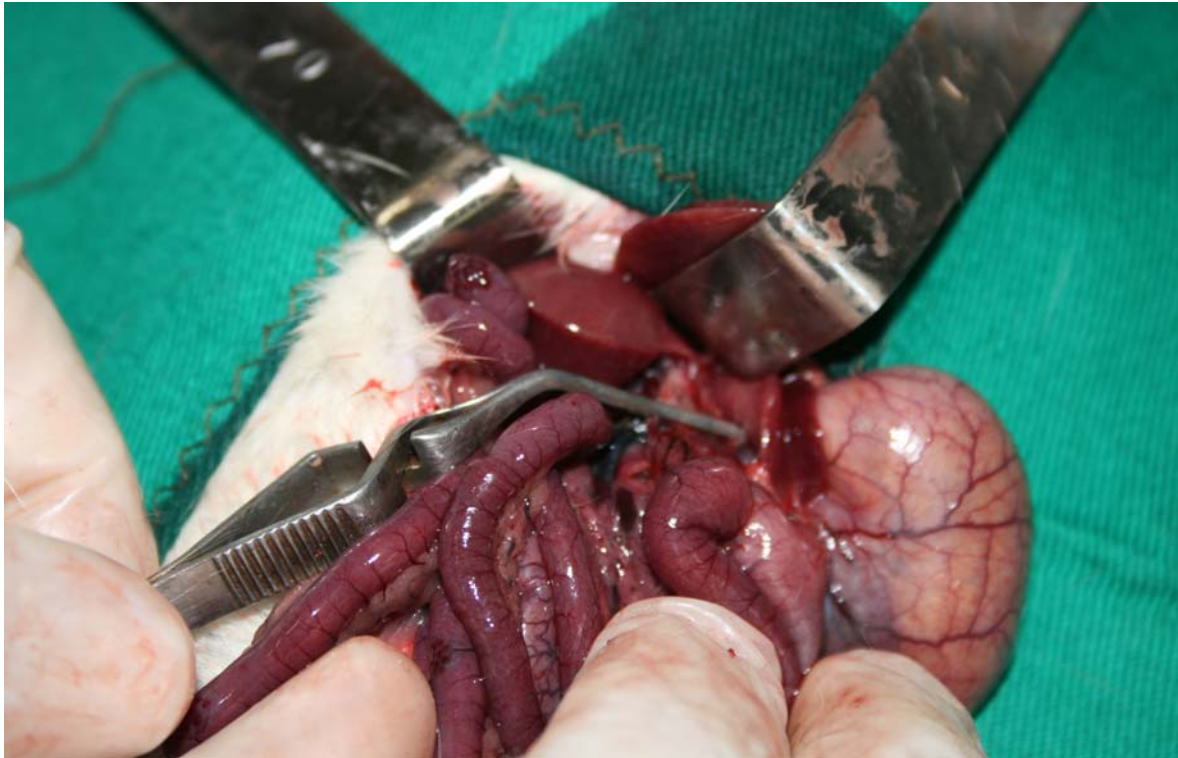


Figura 4 - Pinçamento do pedículo hepático de *Rattus norvegicus*, do grupo IR. com uma pinça de Buldog de 2cm. Laboratório de Cirurgia experimental da Faculdade Novafapi, Teresina-PI.

3.4 - Método imunohistoquímico

Os tecidos fixados em formalina foram cortados com 5 μ m de espessura e montados em lâminas de vidro previamente preparadas com o adesivo poli-D-lisina (Sigma Chemical Corporation, p-7886, Saint Louis, MO, EUA). Utilizou-se o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB) modificado (10). O LSAB (LSAB KIT, K0690, Dako Corporation, Carpinteria, Califórnia EUA) corresponde a uma técnica de avidina-biotina em que o anticorpo secundário biotilado reage com várias moléculas de estreptavidina conjugada a peroxidase. A recuperação antigênica foi feita pelo calor úmido, com a utilização de panela de pressão, como descrito a seguir:

- Desparafinização xilol por cinco minutos (três banhos);
- Hidratação em álcool etílico absoluto (quatro banhos) e lavagem com solução salina tamponada (SST) em pH 7,4 por cinco minutos;
- Tratamento com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3%, diluído em SST por cinco minutos, para bloqueio a peroxidase endógena.
- Recuperação de epitopos pelo calor úmido (SST de citrato em pH 6,4 por três minutos em panela de pressão segundo modificação;
- Incubação com anticorpo monoclonal anti-Caspase-3 , Clone 3CSP03 (Diagnostic Biosystems, Califórnia, EUA), na diluição de 1:500, em média por três horas;
- Incubação por 15 minutos com complexo ligação-imunoglobulinas biotiniladas anticoelho, anticamundongo e anticarneiro pré-diluídas em SST;
- Tratamento dos cortes para visualização da reação com solução de 3,3-tetraidrocloreto de diaminobenzidina (DAB) na concentração de 1mg/ml de solução tampão de Tris e solução de H₂O₂, por cinco minutos. Os cortes foram então contracorados com hematoxilina de Harris por 20 segundos;
- Desidratação em banhos de álcool etílico absoluto (cinco banhos) e xilol (três banhos);
- Montagem das lâminas com bálsamo e lamínula .

Todos os passos da reação imunohistoquímica foram realizados à temperatura ambiente, com exceção da etapa da recuperação antigênica realizada na panela de pressão. Entre cada passo da reação, antes do uso de DAB, as laminas foram lavadas várias vezes com SST (pH 7,4), e após o uso de DAB as lavagens foram feitas com água comum.

3.5 - Critérios de avaliação imunohistoquímica

O programa de computador Axiovision Rel 42.-Zeiss permitiu a captura de imagens de campos com a marcação das células coradas em marrom (expressão imunohistoquímica da caspase 3), sua contagem em vinte campos aleatórios, cálculo de sua porcentagem em relação às células não coradas em marrom (células sem expressão imunohistoquímica da caspase 3) e apresentação dessas medidas em média e desvio-padrão. O índice de apoptose foi calculado

considerando a porcentagem de células apoptóticas marcadas em cada 1000 células contadas em vinte campos aleatórios. (CHAVES, 2005).

Os resultados tiveram a significância estatística avaliada pelo teste de variância ANOVA, e pelo pós-teste de comparação múltipla médias de *Tukey*, utilizando-se o software *GraphPad Prism*, versão 5.00. em um computador pessoal Notebook IS1253 (CPU Intel T2080@1.75GHz).



Figura 5 - Tela com imagem de lâmina marcada com caspase 3, aumento de 200x, de Rato do grupo Controle. Captura de imagem com programa de computador Axiovision Rel 42.- Zeiss Laboratório de Patologia – LAPAC, Teresina-PI.

4 - RESULTADOS

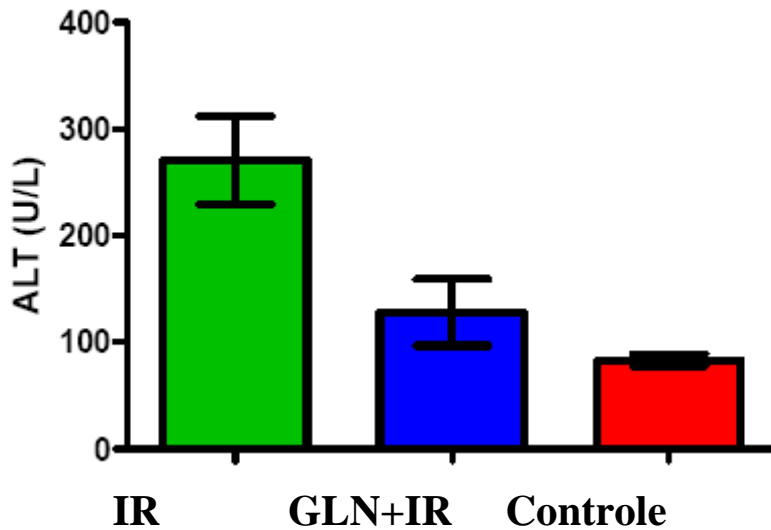


Figura 6 – Gráfico com média e erro padrão da média da dosagem de alanina aminotransferase (ALT) nos grupos Isquemia/Reperusão (IR), Glutamina + Isquemia/reperusão (GLN+IR) e Controle (punção).

Tabela 1 - Teste de Comparação Múltipla de Tukey/Dosagem de Alanina Aminotransferase (ALT)

Grupos	P < 0.05
IR vs Controle	p=0,0002*
IR vs GLN+IR	p=0,0124*
GLN+IR vs Controle	p=0,09937

IR: Isquemia/reperusão; GLN: glutamina

Tabela 2 - Média e erro padrão da média da dosagem de alanina aminotransferase (ALT), nos grupos Isquemia /Reperusão (IR), Glutamina + Isquemia /Reperusão (GLN+IR) e Controle (C) (punção).

Grupos	ALT (U/L)
Controle (n=10)	83,3±5,5
IR (n=10)	270,6±40,8
GLN+IR (n=10)	127,9±31,17

IR: Isquemia/reperusão;
GLN: glutamina

IR: isquemia/reperusão; GLN: glutamina

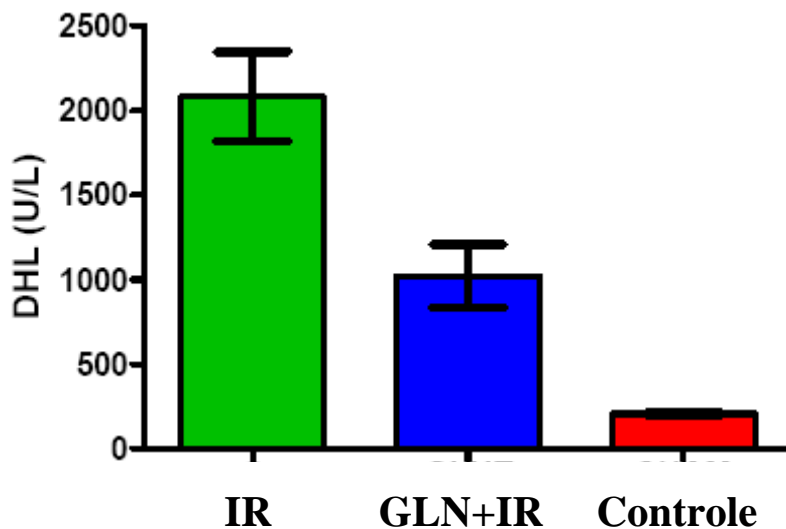


Figura 7 - Gráfico com média e erro padrão da média da dosagem de desidrogenase láctica (DHL) nos grupos Isquemia/Reperusão (IR), Glutamina + Isquemia/ Reperusão (GLN+IR) e Controle (punção).

Tabela 3 - Teste de Comparação Múltipla eTukey / Dosagem de desidrogenase láctica (DHL)

Grupos	P < 0.05
IR vs Controle	p<0,0001*
IR vs GLN+IR	p=0,0041*
GLN+IR vs Controle	p=0,0004*

IR: isquemia/reperfusão; GLN: glutamina

Tabela 4 - Média e erro padrão da média da dosagem de desidrogenase láctica (DHL), nos grupos Isquemia /Reperfusão (IR), Glutamina + Isquemia/ Reperfusão (GLN+IR) e Controle (C) (punção).

Grupos	DHL (U/L)
Controle (n=10)	206,6±16,2
IR (n=10)	2079,0±262,4
GLN+IR (n=10)	1019,0±187,9

IR: isquemia/reperfusão; GLN: glutamina

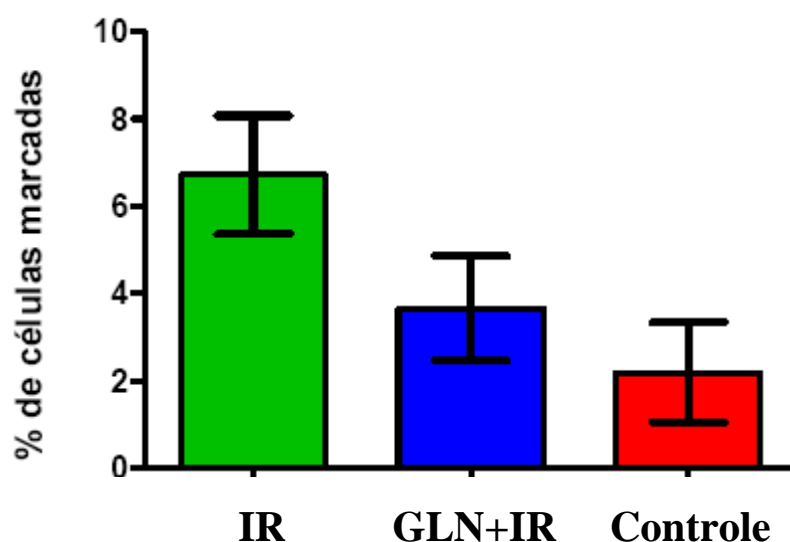


Figura 8 - Gráfico com média e erro padrão da média da porcentagem do número de células que expressaram a caspase 3 em 1000 células analisadas (Índice de Apoptose), nos grupos Isquemia/Reperfusão (IR), Glutamina + Isquemia/Reperfusão (GLN+IR) e Controle.

Tabela 5 - Teste de Comparação Múltipla de Tukey / Percentual de células marcadas para caspase 3

Grupos	P < 0.05
IR vs Controle	p=0,0198*
IR vs GLN+IR	p=0,1758
GLN+IR vs Controle	p=0,1074

IR: isquemia/reperfusão; GLN: glutamina

Tabela 6 - Média e erro padrão da média do número de células que expressaram a caspase- 3 (índice de Apoptose), nos grupos Isquemia/Reperfusão (IR), Glutamina + Isquemia /Reperfusão (GLN+IR) e Controle (C) (punção).

Grupos	Percentual de células com caspase 3
IR (n=10)	6,63±1,35
GLN+IR (n=10)	3,66±1,20
Controle (n=10)	2,19±1,14

IR: isquemia/reperfusão; GLN: glutamina

Tabela 7 - Média e erro padrão da média da dosagem de alanina aminotransferase (ALT), da dosagem de desidrogenase láctica (DHL) e do número de células que expressaram a caspase- 3 (Índice de Apoptose), nos grupos Isquemia/ Reperfusão (IR), Glutamina + Isquemia/Reperfusão (GLN+IR) e Controle (C) (punção).

Grupos	ALT (U/L)	DHL (U/L)	% células com caspase 3
Controle (n=10)	83,3±5,5	206,6±16,2	2,19±1,14
IR (n=10)	270,6±40,8	2079,0±262,4	6,63±1,35
GLN+IR (n=10)	127,9±31,17	1019,0±187,9	3,66±1,20

IR: isquemia/reperfusão; GLN: glutamina

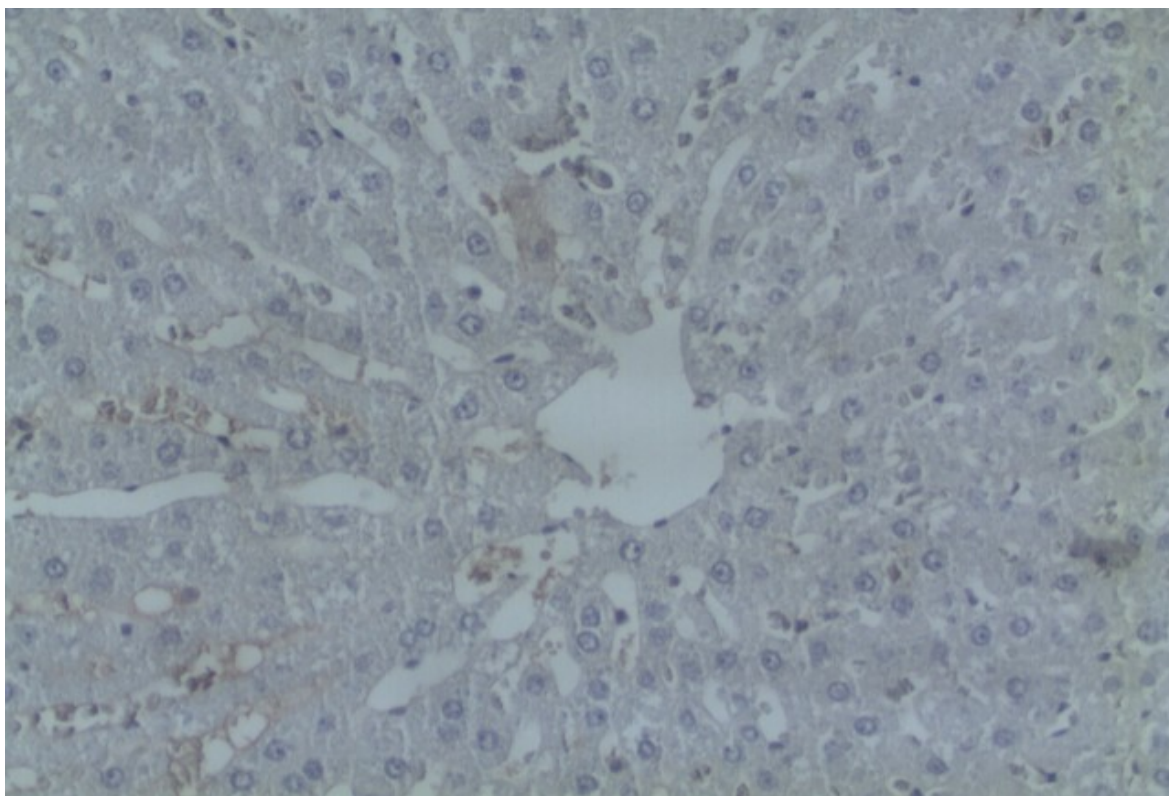


Figura 9 - Imagem de Lâmina Imunohistoquímica do Grupo Controle (punção), Caspase 3, aumento 200x.

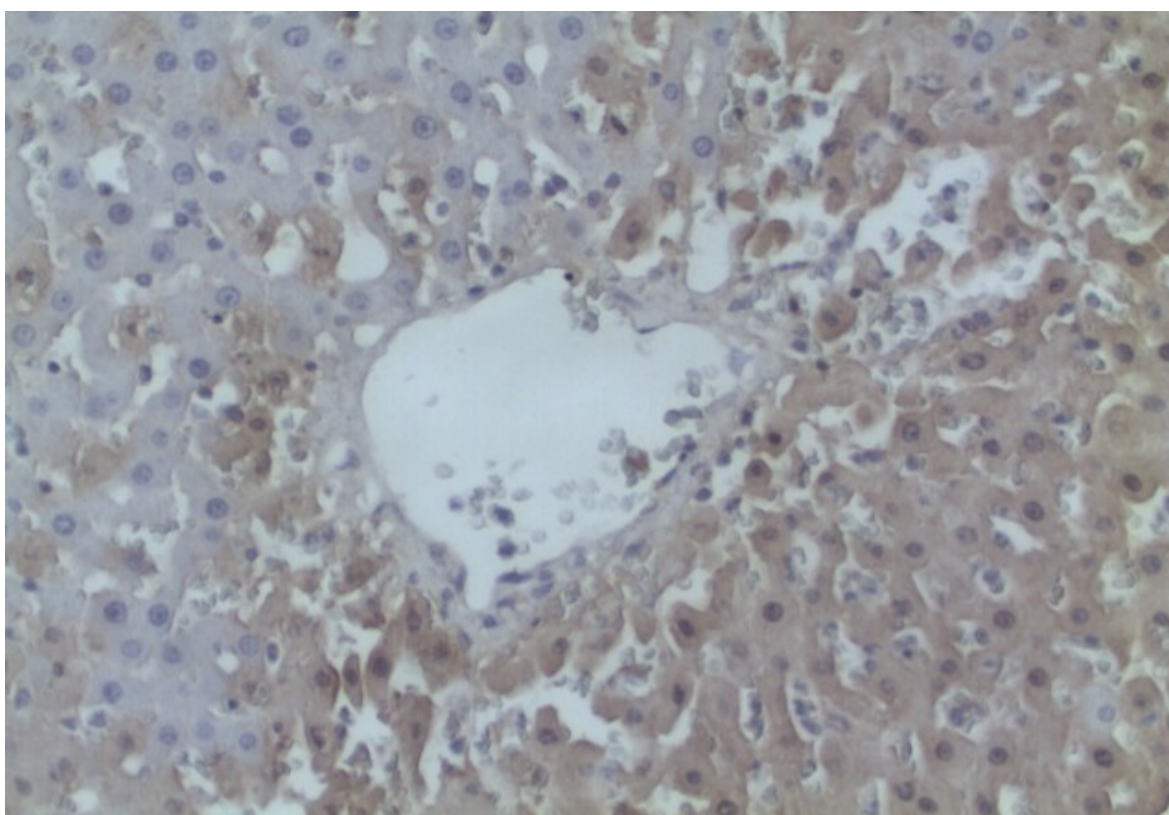


Figura 10 - Imagem de Lâmina Imunohistoquímica Caspase-3 Grupo Isquemia/Reperusão, aumento 200x.

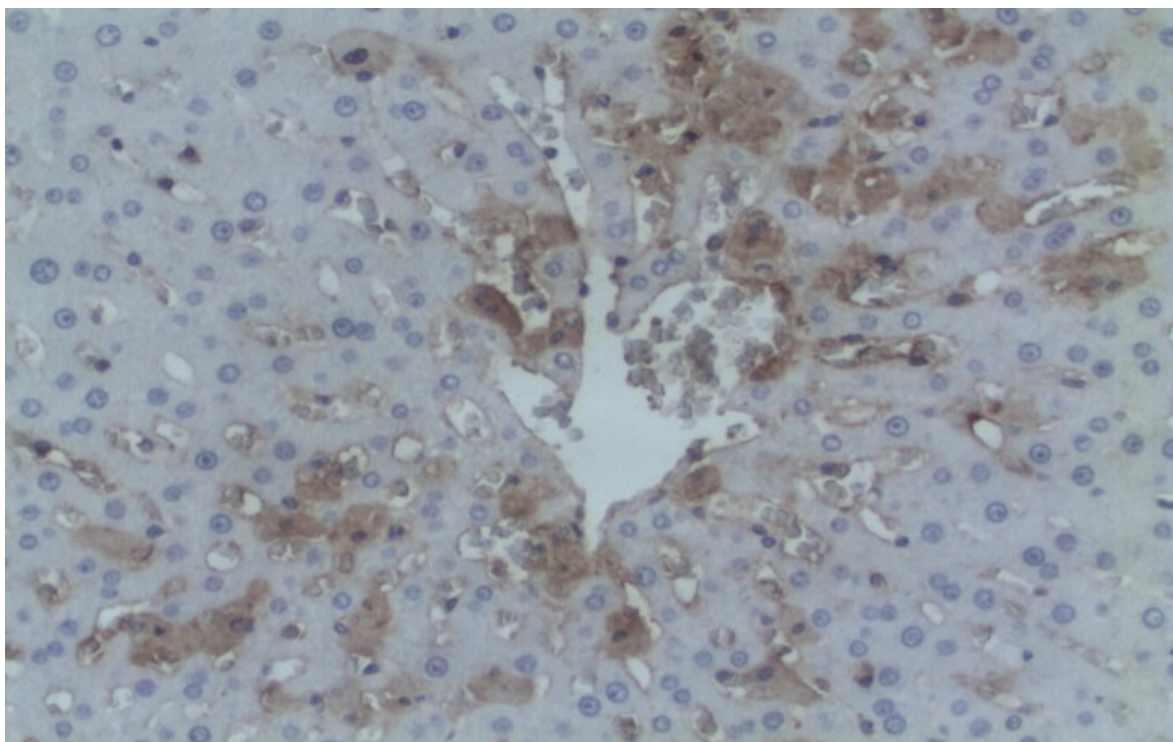


Figura 11 - Imagem de Lâmina Imunohistoquímica Caspase-3, Grupo Glutamina + Isquemia/reperfusão, aumento 200x.

5 - DISCUSSÃO

O desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas para atenuar a lesão de I/R no fígado, tem sido importante para que melhores resultados clínicos finais sejam alcançados nas ressecções hepáticas e no transplante hepático. Fatores relacionados com a lesão de I/R usualmente incluem espécies de radicais livres, sobrecarga de cálcio intracelular, citocinas inflamatórias e infiltração de neutrófilos (DELVA et al., 1989; PANNEN, 2002). Todavia, o mecanismo completo dessa lesão não foi ainda completamente elucidado. Há vários modelos para estudar esse fenômeno. Na literatura, encontram-se modelos que adotam isquemia parcial ou isquemia total. Este último encontra a estase esplâncnica como um fator de mortalidade importante. Embora esta técnica se comporte como uma maneira segura, muita controvérsia ainda existe sobre o tempo total de tolerância hepática à isquemia. Deste modo, tem se realizado estudos, não somente para avaliar o tempo máximo que o tecido hepático pode suportar o pinçamento da tríade portal, mas também, para avaliar os efeitos da manobra quando executada de maneira intermitente. Modelos diferentes *in vivo* e *in vitro* tem sido usados para estabelecer processos de lesão de I/R hepática, como no modelo de transplante de fígado, a isquemia quente parcial ou modelo de I/R fria, e o modelo de I/R total (HASSELGREN, 1987). No presente estudo, optou-se pelo modelo de isquemia total devido à facilidade técnica e por se considerar que esse modelo representa a situação encontrada durante o transplante hepático e nas grandes ressecções hepáticas.

A escolha do modelo animal utilizado, o rato, deve-se à facilidade de obtenção, ao amplo conhecimento da fisiologia, a resistência às infecções e baixa mortalidade, ao baixo custo e a manutenção do mesmo modelo utilizado em outros estudos da linha de pesquisa de I/R como proposto por QUIREZE et al, em 2006. Entretanto, este animal apresenta algumas diferenças anatômicas em relação ao fígado humano, tais como ausência da vesícula biliar e a multilobulação do órgão. A lesão de I/R com pinçamento seletivo do pedículo hepático ou da tríade portal encontra-se bem estabelecida em ratos, assim como, o padrão bioquímico, histológico e imunohistoquímico, com a existência de anticorpos disponíveis e de fácil acesso (JIA et al, 2006; SOUZA, 2007). Já em humanos, diversos autores preconizam que o tempo de isquemia do órgão, se contínuo, não deverá exceder 60 minutos e, o procedimento intermitente deverá ser adotado quando o período para correção das lesões superar este valor (MONTAVANI et al., 2002). SEBÉ e cols., em 2000, estudaram os efeitos de diferentes

tempos de isquemia no fígado de ratos, distribuídos de acordo com o tempo de isquemia, que variou de zero a 30 minutos, fazendo pinçamento do hilo hepático. As alterações bioquímicas foram significativamente maiores nos grupos isquêmicos quando comparadas ao controle. Estes autores concluíram que com 20 minutos já se inicia lesão em organelas dos hepatócitos e que aos 30 minutos esta lesão é mais acentuada. No presente estudo não ocorreu mortalidade, demonstrando que esse é um modelo seguro. Além disso, as alterações encontradas nos valores das enzimas hepáticas ALT e DHL confirmam sua aplicabilidade no estudo da lesão de I/R (GONCE et al., 1995; TURNAGE et al., 1996; MAN et al., 1999; MONTAVANI et al., 2002).

A isquemia parcial e seletiva de apenas alguns lobos em modelos de ratos tem sido um modelo utilizado por vários autores. O pinçamento do lobo lateral esquerdo e mediano representa uma isquemia hepática em torno de 70%, sendo considerado por vários autores que apenas 30% de parênquima sejam suficientes para manutenção dos animais vivos (VOLLMAR et al., 1994; RHODEN, 2000; GARCIA et al., 2004; SAIDI et al., 2007; SZIJÁRTÓ et al., 2007; LIANG et al., 2008). Mas, é um método que exige uma abordagem cirúrgica mais difícil de obter-se uma uniformidade, quando associado à ressecção dos lobos que não foram submetidos a isquemia, para o estudo do período de reperfusão, como proposto no estudo de GARCIA et al. em 2004, ou o pinçamento seletivo como estudado por SZIJÁRTÓ et al., em 2007, não representam completamente a situação como a vista em grande ressecção por tumores e no trauma hepático, ou ainda no transplante hepático. O que não é visto no modelo de pinçamento total da tríade portal.

NEVES et al. em 2006, compararam a lesão hepatocelular ocasionada pelo emprego do pré-condicionamento isquêmico e de duas outras modalidades de clampeamento da tríade portal: clampeamento contínuo e intermitente em ratos, mostrando que a forma contínua provoca maior dano hepatocelular. Este resultado é corroborado com a idéia de que o modelo de isquemia contínua mostra-se eficaz para o estudo desse tipo de fenômeno. O que pode ser visto no presente estudo (Figuras 6 e 7).

SEABRA em dissertação de mestrado UFMG (SEABRA, 2008) estudou I/R hepática em coelhos de forma intermitente e contínua avaliando diferentes tempos de isquemia que variavam de 30 a 60 minutos de isquemia e avaliando o efeito da reperfusão, mostrando não haver diferença no índice de apoptose entre os dois modos de pinçamento. No presente

estudo, optou-se pelo tempo de isquemia de 30 minutos, que como demonstrado anteriormente, já ocasiona muitas alterações representativas da lesão de I/R medidas em vários tempos de reperfusão. Além do que, já ficou demonstrado que um tempo maior que 45 minutos de isquemia não seria suportado pelo rato (FAMER et al., 2000; SEBÉ et al., 2000; JIA et al., 2006). Nos períodos menores que trinta minutos, os achados foram pouco significantes, enquanto que nos períodos superiores a 100 minutos, as repercussões hemodinâmicas e o dano tecidual aumentavam o índice de mortalidade dos animais em função da estase esplâncnica (RHOLDEN et al., 2000; ISOKAZI et al., 1992; BARON e MURIEL, 1999).

As dosagens séricas de transaminases e DHL são parâmetros considerados clássicos de lesão dos hepatócitos e são usadas praticamente em todos os trabalhos que têm como objetivo o estudo da lesão de isquemia e reperfusão, pois são de fácil reprodução e de baixo custo. Em grande número de trabalhos, os animais são submetidos desde poucos até 120 minutos de isquemia por períodos de reperfusão que variam de minutos até vários dias, com os mais variados objetivos. Ratos submetidos de 30 a 45 minutos de isquemia, passam a apresentar aumentos significativos das transaminases, já aos 15 minutos de reperfusão e aos 60 minutos chegam a apresentar valores de até 30 vezes maiores que os valores basais (ZHANG et al., 1997). Após 60 ou 90 minutos de isquemia apresentam maior aumento das transaminases, entre 1 e 3 horas de reperfusão. Demonstrou-se com os resultados obtidos no presente estudo que essas alterações já se estabelecem bem aos de 30 minutos de isquemia. Além disso, essas enzimas são efetivamente as mais utilizadas na prática clínica para o acompanhamento dos pacientes, com suspeita ou diagnóstico desse tipo de lesão (MIRANDA et al., 2005), justificando-se assim sua aplicabilidade como marcador bioquímico da lesão de I/R.

Avaliando-se os resultados encontrados no presente estudo ver-se que quanto à dosagem de ALT e DHL, comparando-se o grupo Controle com o grupo I/R, obteve-se uma diferença extremamente significativa para ambas as enzimas. Já, comparando-se o grupo Controle com o da GLN + IR a diferença foi significativa para ALT, e extremamente significativa para DHL. Esses dados confirmam que esse modelo de isquemia e reperfusão associa-se à lesão hepática de modo significativo.

A comparação dos valores de ALT e DHL entre o Grupo IR e o Grupo GLN + IR,

evidencia uma diminuição dos seus níveis séricos nos ratos pré-tratados com GLN, duas horas antes da isquemia. Isso demonstra que a GLN parece ter conferido proteção à lesão de I/R hepática no modelo de Isquemia hepática total por 30 minutos, seguida de um período de reperfusão de 60 minutos.

HIRANO et al. em 2006, em um estudo do efeito da I/R hepática sobre o efeito de seqüestro de neutrófilos em rins de ratos, usaram uma manobra de PRINGLE de apenas 15 minutos como modo de pinçamento hepático. Neste estudo, a concentração sérica da ALT, assim como da DHL foram selecionadas como marcadores de lesão celular. Apesar de existirem muitas opções entre as substâncias utilizadas para qualificar e quantificar a lesão isquêmica do hepatócito optou-se pela dosagem de AST, ALT e LDH pela facilidade de execução e pela grande freqüência com que são utilizadas sejam isoladamente ou acompanhadas de outros métodos de avaliação, presentes em vários estudos (ZHANG et al, 1994; ASLAN et al, 2001; WANG et al., 2001; IWASAKI et al., 2002; SHINODA et al., 2002; TEOH et al., 2002; SILVA et al., 2006).

A GLN é um nutriente essencial durante doenças e lesões graves, tendo um papel vital no metabolismo tissular. A administração de GLN antes da lesão de I/R experimental tem mostrado um efeito protetor no tecido intestinal (BLIKSLAGER et al., 1999), e cardíaco (WISCHMEYER et al., 2008;). O presente estudo indica que ela também protege o tecido hepático quando administrada previamente á lesão de I/R, funcionando assim como um pré-condicionamento nutracêutico. Uma vez que, nutracêutico é um alimento ou parte de um alimento que proporciona benefícios médicos e de saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento da doença. Os nutracêuticos podem ser classificados como fibras dietéticas, ácidos graxos poliinsaturados, proteínas, peptídios, aminoácidos ou cetoácidos, minerais, vitaminas antioxidantes e outros antioxidantes (glutamina, glutathione, selênio) (ANDLAUER & FÜRST, 2002).

Em alguns experimentos, verifica-se morte celular principalmente por necrose (MURRY, 1986), enquanto em experimentos de fase tardia predomina a apoptose, processo no qual não ocorre lise da membrana celular. Em alguns desses estudos, ocorreu redução da AST e, principalmente da ALT, com a modulação por pré-condicionamento isquêmico e farmacológico com a N-acetil-cisteína. PERALTA et al. em 2002, em 90 minutos de

isquemia e 24 horas de reperfusão, obtiveram uma diferença significativa com o pré-condicionamento isquêmico, na dosagem da ALT e AST, mas também nesse estudo foi verificada uma redução das transaminases quando comparadas ao tempo de reperfusão de seis horas (JIA et al., 2006; SILVA et al., 2002; SILVA et al., 2006; SZIJÁRTÓ et al., 2007; ARAB et al., 2009; SCHUSTER et al., 2009) . A dosagem da ALT usada no presente estudo foi adequada para mostrar a existência de dano hepático no tempo de 30 minutos de isquemia hepática, uma vez que obtivemos resultados significantes quando comparados os valores de transaminases do grupo Controle (Figura 6).

Foi descrito também que a apoptose é um importante modo de morte celular na lesão de I/R, e que essa apoptose é regulada por genes. Estudos em animais demonstram que a depleção de GSH, aumenta a apoptose em colangiócitos (FAUBION e GORES, 1999; HADDAD e KUKAN, 2001; PAROLINI e REASON, 2001). Com um possível mecanismo que seja parcialmente relacionado à preservação do conteúdo de GSH, NOH et al., em 2006, testaram se a GLN em pré-tratamento, reduz a lesão I/R em ratos e encontraram que não houve redução desse tipo de lesão quando 70% do fígado foi exposto a isquemia por 75 minutos seguidos de 24 horas de reperfusão quente. Esses autores associaram a falta de proteção do pré-tratamento com GLN com uma ausência de uma regulação e formação da proteína de choque HSP 70 (NOH et al., 2006)

A GSH é um importante antioxidante que protege os tecidos contra a lesão por radicais livres. A GLN aumenta as defesas e pode ser importante na síntese de GSH. Estudos demonstraram que agentes tóxicos ao fígado como o acetaminofeno causam depleção hepática de GSH e levam a necrose hepática. Em 1992, demonstrou-se que a suplementação de GLN aumentaria os estoques de GSH hepática e diminuiria tanto a lesão como a morte após overdose com acetaminofeno em ratos Wistar (HONG et al., 1992).

A lesão de I/R leva a produção de radicais livres de oxigênio com influência nos estoques de GSH. SZIJÁRTÓ et al. em 2007, investigaram o efeito da GLN no pré-tratamento sobre a microcirculação hepática, supondo que a GLN tenha um efeito protetor contra radicais livres. Eles concluíram que o efeito benéfico esperado da GLN no pré-tratamento não melhorou significativamente a microcirculação hepática, e sugeriram que doses maiores poderiam melhorar esses efeitos.

A GLN por si só não possui qualquer propriedade antioxidante. Dessa forma, o pré-tratamento com GLN pode ser efetivo via produção de GSH. Há também indicação que ela possa ter um importante papel na promoção da regeneração e na microcirculação hepática como ficou demonstrado pela monitorização do fluxo sanguíneo por fluxometria não invasiva com Doppler (SZIJÁRTÓ et al. 2007), evidenciando que a melhoria na homeostase redox poderia influenciar a microcirculação hepática e proteger a fígado da lesão de I/R. Nesse estudo a GLN foi administrada numa dose de 400mg/Kg (Dipeptide®) em uma infusão venosa na velocidade de 0,5ml/h (com duração de 3 horas) antes da I/R hepática, que foi segmentar (lobo mediano e lanteal esquerdo) e o período de isquemia foi de 60 minutos. Os lobos não isquemiados foram ressecados logo antes de se iniciar a reperfusão apenas dos lobos anteriormente isquemiados, e as amostras de sangue e tecido hepático foram obtidas após 6 horas de reperfusão. Um período de reperfusão 6 vezes maior que o do presente estudo. Os resultados de Szijartó et AL. mostaram níveis de AST e ALT significativamente maiores nos grupos que recebeu pré-tratamento com GLN e no que recebeu apenas solução fisiológica 0,9% antes da I/R, quando comparados ao grupo *Sham*. Mas quando comparou-se os grupos pré-tratados com GLN e solução fisiológica, obteve-se níveis significativamente menores dessas enzimas no grupo pré-tratado com GLN. Resultado esse semelhante ao obtido no presente estudo. Em outros estudos, os resultados da imunohistoquímica demonstraram que pré-tratamento com GLN diminuiu o número de células em necrose e aumentou as em apoptose (GOOSSENS et al., 1996; OBRADOR et al., 2001; SZIJÁRTÓ et al., 2007). Este resultado foi diferente do presente experimento, que mostrou uma redução no número de células e, por conseguinte, no índice de apoptose, embora de modo não significativo. Como mencionado anteriormente, NOH et al. em 2006, não encontraram benefício na prevenção da lesão isquêmica. Mas no modelo utilizado por esses autores o tempo de isquemia foi superior em 15 minutos ao utilizado no presente estudo, e o tempo de reperfusão de 24 horas também é bastante superior, já estando na fase tardia da lesão I/R. Outro estudo sugeriu que o pré-tratamento com GLN dar uma tolerância significativa a lesão de IR, atribuindo esse efeito ao aumento no conteúdo de GSH e na regulação da expressão das proteínas Bcl-2 e Bax no tecido hepático (JIA et al., 2006).

Os resultados do estudo de JIA et al. 2006, indicam que depois de 30 minutos de isquemia, a função e morfologia hepática são prejudicadas e que o pré-tratamento com GLN poderia conferir proteção contra o dano do fígado (JIA et al., 2006). O exato mecanismo do efeito protetor da GLN contra a lesão de I/R de órgãos e tecidos ainda não é completamente

entendido. A GLN protege contra a lesão de I/R, coração e músculo esquelético preservando o conteúdo de GSH em seus tecidos (PREM et al., 1999; LIANG et al., 2008). A GSH é um antioxidante endógeno importante que protege contra as lesões dos radicais livres de oxigênio, e a administração intravenosa de GSH durante a reperfusão de fígado isquêmico pode prevenir a lesão de reperfusão em ratos (SHAUER et al., 2004). O pré-tratamento com GLN pode obviamente aumentar o conteúdo de GSH no tecido hepático de ratos, indicando que a GLN pode proteger contra a lesão de I/R hepática pela manutenção de um conteúdo relativamente alto de GSH no tecido e aliviando as lesões celulares oxidantes (HONG et al., 1992). Além disso, o pré-tratamento com GLN pode também proteger contra a IR hepática pela participação no metabolismo energético, aumentando o metabolismo energético celular, protegendo a estrutura e função mitocondrial e diminuindo a produção de radicais livres de oxigênio, levando a um menor consumo de GSH do tecido hepático. Na inibição completa da atividade da α -cetoglutarato desidrogenase no ciclo do ácido cítrico, tem sido observada células privadas de GLN expostas a hiperóxia, em que a GLN poderia proteger a desidrogenase α -cetoglutarato da inativação sob estresse oxidativo e aumentar os níveis de ATP celulares (AHMAD et al., 1992). A GLN poderia estimular a síntese de glicogênio e aumentar o seu estoque nos hepatócitos, reforçando a resistência hepática contra lesões oxidantes (WANG et al., 2001). Para XIA 1997, a GLN aumenta a atividade da SOD no tecido hepático depois do estresse.

Um mediador crucial da lesão de IR é o oxigênio derivado de radicais livres (MA et al. 2008), particularmente o peróxido de hidrogênio, uma fonte de oxigênio derivado de radicais livres depois da hipóxia que pode induzir o TNF por uma ativação da cinase ativada pelo mitogene p38 (LUTZ et al., 2010). Além do mais, ocorre um número de respostas metabólicas adaptativas intracelulares, entre as quais temos o aumento da concentração intracelular de Ca^{++} com geração de complexos cálcio-piruvato e a formação de ácido úrico. Os complexos de fosfato de cálcio e o ácido úrico pertencem a um grupo dos assim chamados complexos de sinal de perigo (fragmentos de DNA, fragmentos de membrana celular, proteína de choque quente (HSP), etc.), que se ligam aos complexos de proteínas intracelulares chamadas de “inflamassomas” (MARTINON et al. 2002). Os “inflamassomas” incluem diferentes moléculas adaptadoras que medeiam um aumento na produção de secreção de interleucina-1 (MOYNAGH, 2003). Além da formação de complexos de fosfato de cálcio, o aumento na concentração intracelular de cálcio também aumenta a ativação de fosfolipases como também de proteases. Essas últimas incluem as cinases-s que quebram

proteínas e as caspases as quais executam a apoptose (LUTZ et al., 2010).

Para diminuir a severidade da lesão de I/R, várias estratégias terapêuticas são avaliadas no momento. Uma delas é a inibição da apoptose pela diminuição do metabolismo celular usando CO - monóxido de carbono e H₂S – sulfeto de hidrogênio (WEI et al. 2010). Uma segunda estratégia seria inibir a sobrecarga mitocondrial de cálcio (NICOUUD et al. 2007) e assim bloquear a sinalização da execução mitocondrial da apoptose (ANDERSON et al., 2004). Uma terceira estratégia é o uso de antioxidantes que diretamente atuam numa contra-regulação dos efeitos das EROs (ACQUAVIVA et al.,2009), o que indiretamente pode ter sido o efeito da GLN como pré-condicionamento , como foi utilizada no presente estudo, considerando-se que a GLN administrada como pré-tratamento pode ter aumentado a GSH e assim funcionar indiretamente como antioxidante.

A falta de oxigênio para os hepatócitos durante a isquemia causa desenergização da mitocôndria, depleção de ATP, e alterações na homeostasia dos íons hidrogênio, sódio e cálcio, que ativam enzimas hidrolíticas e disfunção da regulação do volume celular e das células dos sinusóides endoteliais, acarretando edema das células de Kupffer (PERALTA et al.,2007).

Enquanto a I/R pode causar necrose hepática, muitos estudos mostraram que a morte celular programada ou apoptose é a causa de morte celular durante a reperfusão do fígado depois de um longo tempo de isquemia. Contudo, o papel do apoptose como a causa principal de lesão e o nível de mudanças morfológicas induzidas por este tipo de morte celular não foi ainda determinado detalhadamente (ARAB et al., 2009).

Estudos em animais demonstram que a depleção de GSH, aumenta a apoptose em colangiócitos (FERNANDEZ et al., 2003). Com um possível mecanismo que seja parcialmente relacionado à preservação do conteúdo de GSH, NOH et al. em 2006, testaram se a GLN em pré-tratamento reduz a lesão isquemia-reperfusão em ratos e encontraram que não houve redução desse tipo de lesão quando 70% do fígado foram expostos a isquemia por 75 minutos seguidos de 24 minutos de reperfusão quente.

Os principais alvos da lesão de I/R hepática são os hepatócitos e células dos sinusóides endoteliais. Estes dois tipos de células apresentam respostas diferentes à isquemia:

os hepatócitos são mais sensíveis a isquemia quente e os sinusóides à isquemia fria (BILZER, 2000). A apoptose tem sido apontada como o destino das células que sofrem a lesão de I/R (SASAKI et al. 1996). Dos vários estudos que apontam a apoptose como resultado da I/R nos hepatócitos e nos sinusóides, utilizam os ensaios do tipo TUNEL (CLAVIEN et al. 1998; CLAVIEN et al., 1999, BILZER et al., 2003), mas a sua utilização tem sido questionada, pois esse método de avaliação é falho em distinguir entre apoptose e necrose (SCHULTE-HERMANN et al., 1995). E a ativação das caspases, tem sido usada, para demonstrar a ocorrência de apoptose na I/R hepática (RENTSCH et al., 2001). Na verdade, o uso de inibidores da pan-caspase mostrou proteger tanto os hepatócitos como os sinusóides da lesão de I/R (NATORI et al. 2003; CURSIO et al., 1999). Por outro lado, os estudos de JAESCHKE em 2002, contradizem a visão que a maioria das células hepáticas apresenta apoptose em resposta a I/R, acreditando que a necrose é a principal forma de morte celular nesta situação. Foi postulada a existência de uma via intracelular comum, a qual pode levar tanto a apoptose como à necrose (BANGA, 2005; RUDIGE, 2003). E um novo termo foi cunhado, a necroapoptose, para descrever um processo que se inicia como um sinal comum de morte e que culmina tanto com lise celular (morte celular por necrose) ou morte celular programada (apoptose), dependendo dos fatores tais como a queda dos níveis de trifosfato de adenosina celular (LEMASTERS, 1999; JAESCHKE, 2003; ROSELLO-CATAFAU, 2007).

A avaliação através do Índice de apoptose obtido pelo percentual de células marcadas com o anticorpo para Caspase-3 no estudo imunohistoquímico, mostrou diferença estatística ($p=0,019$) quando comparados os Grupos Controle e I/R, evidenciando que a apoptose de fato é componente da lesão de Isquemia/Reperfusão hepática. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e GLN + IR (p de 0,1074), sugerindo que o pré-condicionamento com a GLN poderia proteger o fígado de rato submetido à lesão de isquemia/reperfusão no modelo estudado. Mas, quando comparadas, as médias do Grupo IR com as GLN+IR, também não se demonstrou uma diferença significativa ($p=0,1758$). Isso mostra que esse método não foi sensível para identificar a ação da GLN, talvez pelo fato do elevado desvio de erro padrão da média do número de células que expressaram a caspase-3, pelo número de animais em cada grupo estudado, ou ainda pelo tempo de isquemia avaliada de apenas 60 minutos.

Evidências de apoptose durante a isquemia/reperfusão hepática estão presentes em vários estudos, que mostram que de 50% a 70% de células endoteliais e 40% a 50% de

hepatócitos apresentam apoptose durante a reperfusão (SASAKI et al., 1996; CALVIEN et al., 1998; CALVIEN et al., 1999; CURSIO et al., 1999), assim como também uma alta porcentagem de apoptose tem sido identificada em enxertos hepáticos humanos (HENIN et al., 1997). Nesses estudos, a quantificação de apoptose tem sido avaliada nos ensaio do tipo TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*), encadeamento de DNA e ativação de Caspase-3 (JAESCHKE et al., 2001). Para complementar a evidência da relevância da apoptose durante a reperfusão, estudos demonstraram que inibidores da caspase-3 ou pela maior expressão do gene Bcl-2 (que tem atividade anti-apoptose) pode ser obtida uma atenuação da lesão hepática de IR (BILBAO et al., 1999; WAHI et al., 2008).

6 - CONCLUSÃO

A lesão de I/R hepática, ocasionada pelo pinçamento da tríade portal por 30 minutos e reperfusão por 60 minutos, provoca elevações significantes nos níveis séricos de ALT e DHL, em *Rattus norvegicus*.

O pré-condicionamento nutracêutico com L-alanil-glutamina reduziu significativamente os valores de ALT e DHL em *Rattus norvegicus*, submetidos à lesão I/R hepática, sugerindo hepatoproteção.

O pré-condicionamento nutracêutico com L-alanil-glutamina não reduziu significativamente o índice de apoptose em *Rattus norvegicus*, submetidos à lesão I/R hepática.

7 - REFERÊNCIAS:

AALTO, T.K.; RAIVIO, K.O.; Nucleotide depletion due to reactive oxygen metabolites in endothelial cells: effects of antioxidants. *Pediatric Res*; 34:572-76. 1993.

AHMAD S, WHITE, C.W., CHANG L.Y.; SCHNEIDER, B.K.; ALLEN, C.B.; Glutamine protects mitochondrial structure and function in oxygen toxicity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 280:L779-L791. 2001.

ALVERDY, J.A.; AOYS, E.; WEISS-CARRINGTON, P.; BURKE, D.A.; The effect of glutamine-enriched TPN on gut immune cellularity. *J Surg Res*; 52: 34-38, 1992.

ALVES, M.A.; Efeitos da L-alanil-glutamina sobre as concentrações in vivo de metabólitos em ratos submetidos à isquemia do membro pélvico esquerdo seguido de reperfusão. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

ACQUAVIVA, R. et alli. Beneficial effects of rutin and L-arginine coadministration in a rat model of liver ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296: G664–G670, 2009.

ANDLAUER, W.; FÜRST, P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Research International*. v. 35, p. 171-176, 2002.

ARII, S et alli; Current progress in the understanding of and therapeutic strategies for ischemia and reperfusion injury of the liver. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.*; 10:189-194. 2003.

ASLAN, A.; KARAGUZEL, G.; CELIK, M.; UYSAL, N.; YUCEL, G.; MELIKOGLU, M.; Pentoxifylline contributes to the hepatic cytoprotective process in rats undergoing hepatic ischemia and reperfusion injury. *Eur Surg Res.*; 33(4):285-90. 2001.

BANGA, N.R. et alli. Ischemic preconditioning in transplantation and major resection of the liver. *Br. J. Surg.*, 92:528-38. Review. 2005.

BARBINI, L.; VEJA, F.; Apoptosis and liver diseases. *Acta Bioquim Clin Latinoam.*;36(4):611-31. 2002.

BARON, V, MURIEL, P.; Role of glutathione, lipid peroxidation and antioxidants on acute bile-duct obstruction in the rat. *Bioch Bioph Acta.*; 1472:173-80. 1999.

BELGHITI, J.; NOUN, R.; MALAFOSSE, R. Continuous versus intermittent portal triad

clamping for liver resection. A controlled study. *Ann Surg*; 229:369-75. 1999.

BEZERRA FILHO, J.E.; et alli.. Effects of L-alanyl-glutamine on in vivo kidney and blood concentrations of glucose, pyruvate and lactate in rats subjected to unilateral renal ischemia and reperfusion. *Rev. Bras. Nutr. Clin.* V.17, nr 4, p. 122-125, 2002.

BILZER, M.; GERBES, A.L. Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *J Hepatol*; **32**: 508-515, 2000.

BLIKSLAGER, A.T., RHOADS, J.M.; BRISTOL, D.G.; ROBERTS, M.C.; ARGENZIO, R.A.; Glutamine and transforming growth factor-alpha stimulate extracellular regulated kinases and enhance recovery of villous surface area in porcine ischemic-injured intestine. *Surgery*; 125: 186-194, 1999.

BILBAO G., CONTRERAS J.L., ECKHOFF, D.E., MIKHEEVA, G., KRASNYKH, V., DOUGLAS, J.T., THOMSD, F.T., THOMAS, J.M, CURIEL, D.T.; *Reduction of ischemia-reperfusion injury of the liver by in vivo adenovirus-mediated gene transfer of the antiapoptotic Bcl-2 gene. Ann Surg 230: 185–193, 1999.*

BOIN, I.F.S.F.; Atuação do WEB 2086 como inibidor da ação do fator de ativação plaquetária (PAF) em ratos wistar submetidos a isquemia hepática seletiva normotérmica e reperfusão. Tese de doutorado UNICAMP, p-110. 1997.

BRADFORD, B.U.; MAROTTO, M.; LEMASTERS, J.J.; THURMAN, R.G.. New, simple models to evaluate zone-specific damage due to hypoxia in the perfused rat liver: time course and effect of nutritional state. *J Pharmacol Exp Ther*; **236**: 263-268, 1986.

BRASS, C.A.; ROBERTS, T.G. Hepatic free radical production after cold storage: Kupffer cell-dependent and -independent mechanisms in rats. *Gastroenterology*; **108**: 1167-1175, 1995.

BRISOTTI, J.L.; PICINATO, M.A.N.C.; FRANCO, C.F.F.. Efeito da deferoxamina na isquemia e reperfusão do fígado remanescente após ressecção hepática parcial. *Acta Cir Bras*; 14:39-42. 2000.

BULKLEY, G.B. . Preconditioning for protection from ischemia injury: Discriminating cause from the effect from epiphenomenon. *Ann Surg*;232:163-5. 2000.

CELLI, A. et alli; Glutathione depletion is associated with decreased Bcl-2 expression and increased apoptosis in cholangiocytes. *AM. J. Physiol.*;; 275:G749-G757. 1998.

CENTURION, S.A.R.; Avaliação da função mitocondrial do fígado submetido a isquemia parcial com pré-condicionamento e sem pré-condicionamento isquêmico. Tese de Doutorado

FMRPUSP, 2002.

CERWENKA, H, KHOSCHSORUR, G, BACHER, H, WERKGARTNER, G, EL-SHABRAWI, A, QUEHENBERGER, F, RABL, H, MISCINGER, H.J.. Normothermic liver ischemia and antioxidant treatment during hepatic resections. *Free Radic Res.* Jun;30(6):463-9, 1999.

CHANG, W.K.; YANG, K.D; CHUANG, H.; JIA-TSONG, J; SHAIQ, M.F.; Glutamine Protects Activated Human T Cells from Apoptosis by Up-Regulating Glutathione and Bcl-2 Levels; *Clinical Immunology*; Volume 104, Issue 2, , Pages 151-160. August 2002.

CHAVES, J. C.; ESTUDO MORFOLÓGICO DO FÍGADO DE RATOS NA ISQUEMIA-REPERFUSÃO SOB OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA– São Paulo. xvi, 61f Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação. Universidade Federal de São Paulo. , 2005.

CHEN, M. et alli ; Protective effects of lidocaine injected into the hepatoduodenal ligament on warm ischemia-reperfusion injury to the rat liver. *Chinese Medical Journal*, 117(2):275-279. 2004.

CHIAPPA, A., MAKUUCHI, M.; ZBAR, A.P.; BIELLA, F.; VEZZONI, A.; POZZI, S.; ANDREONI, B.; Comparison of continuous versus intermittent hepatic pedicle clamping in an experimental model. *Hepatology*;48(41):1416-20. 2001.

CHOUILLARD, E.K. et alli: Vascular clamping in liver surgery: physiology, indications and techniques. *Annals of Surgical Innovation and Research* 2010 4:2.

CLAVIEN, P.A.; YADAV, S.; SINDRAM, D.; Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg*; 232:155-62. 2000.

COLARD, CD, GELMAN S. Pathophysiology, Clinical manifestations and prevention of ischemia – reperfusion injury. *Anesthesiology*; 94:1-11. 2001.

COLLETTI L.M.; REMICK D.G.; BURTCH, G.D.; KUNKEL, S.L., STRIETER, R.M., CAMPBELL, D.A. Jr. Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest*; 85: 1936-1943, 1990.

CONTRAN, RS; KUMAR, V; COLLINS, T. Lesão e morte celular: lesão de isquemia e reperfusão. In: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Patologia estrutural e funcional*. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; p.1-26. 2000.

CROCKETT, E. T. et alli; Protection of early phase hepatic ischemia-reperfusion injury by cholinergic agonists. *BMC Clinical Pathology*, 6(3): 2006.

CURI, R., et alli . Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. *Braz. J. Med. Res.* 32: 15-21, 1999.

CURTI, C, et alli ;. Estudo da fosforilação oxidativa. In: Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia. Robe Editorial, SAP Paulo; p.149-58. 1998.

DAEMEN, M, DE VRIES, B., BUURMAN, W.A.; Apoptosis and inflammation in renal reperfusion injury. *Transplantation*; 73:1693-700. 2002.

DAI, CL, XIA, Z.L., KUME, M., YAMAMOTO, Y., YAMAGAMI, K., OZAKI, N., YAMAOKA, Y.; Heat shock protein 72 normothermic ischemia, and the impact of congested portal blood reperfusion on rat liver. *World J Gastroenterol*; 7: 415-418, 2001.

DELVA, E et alli ; Vascular occlusions for liver resections: operative management and tolerance to hepatic ischemia -142 cases. *Ann Surg*; 209:211-8. 1989.

ERDOGAN, O., YILDIZ S., BASARAN, A., DEMIRBAS, A., YELSIKAYA, A.; Effect of verapamil infusion on hepatic ischemia reperfusion injury. *Pol J Pharmacol*; 53(2):137-41. 2001.

FARBER, JL, CHIEN, K.R., MITTNNACHT, S. Jr. The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *Am.L Path*; 102:271-81. 1981.

FARMER, D.G. et alli. Current status of ischemia and reperfusion injury in the liver. *Transplant Rev*; 14(2):106-26. 2000.

FAUBION, W.A, GORES, G.J. Death receptors in liver biology and pathobiology. *Hepatology*;29:1-4. 1999.

FELTER, R, Química orgânica, São Paulo, Moderna, 3ª. Ed. Vol. 3, p 179-207, São Paulo. 1998.

FERNADEZ, L. et alli ; Role of ischemic preconditioning and the portosystemic shunt in the prevention of liver and lung damage after reat liver transplantation. *Transplantation*; 76:282-289. 2003.

FERRI, M, GABRIEL, S; GAVELLI A; FRANCONERI, P; HUGUET, C. Bacterial translocation during portal clamping for liver resection. A clinical study. *Arch Surg*; 132: 162-165, 1997.

GALLE, PR, HOFMAN WJ, WALCZAK H, SCHALLER H, OTTO G, STREMMEL W, KRAMMER PH, RUNKEL L. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med*;182:1223-30. 1995.

GANTNER, F, LEIST M, JILG S, GERMANN PG, FREUDENBERG MA, TIEGS G. Tumor necrosis factor-induced hepatic DNA fragmentation as an early marker of T cell-dependent liver injury in mice. *Gastroenterology*; 109: 166-176, 1995.

GARCIA, J.H.P et alli; Alterações metabólicas induzidas por isquemia hepática normotérmica experimental e o efeito hepatoprotetor da ciclosporina; *Arq. Gastroenterol.* Vol 41, Nr 1:54-58. jan/mar. 2004.

GIANNINI, EG. TESTA, R, SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians, (*CMAJ* –; 172.(3),367. Feb, 1, 2005.

GONCE, ME, BRACKETT, DJ; SQUIRES, RA; GIBSON, DD; BALLA, AK; LERNER, MR; McCAY, PB, PENNINGTON, LR. Development of circulatory and metabolic shock following transient portal triad occlusion. *J Surg Res*;59:534–43. 1995.

GOOSENS, V, GROOTEN, J; FIERS, W. The oxidative metabolism of glutamine. A modulator of reactive oxygen intermediated mediated cytotoxicity of tumor necrosis factor in L929 fibrosarcoma cells. *J Biol Chem*;271:192–6. 1996.

GOTO, M, TAKEI, Y; KAWANO, S; NAGANO, K; TSUJI, S; MASUDA, E, NISHIMURA, Y, OKUMURA, S, KASHIWAGI T, FUSAMOTO, H; and KAMADA, T. Endothelin-1 involved in the pathogenesis of ischemia/reperfusion liver injury by hepatic microcirculatory disturbances. *Hepatology* 19: 675-681, 1994.

GRACE, PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg*;81:637-47. 1994.

GUIMARÃES FILHO, A. et al; Efeitos metabólicos da oferta endovenosa de L-alanil-glutamina no sangue e fígado de ratos submetidos a hepatectomia parcial; *Ver. Brás. Nutr. Clin.*, V.19, nr 2, p.54-58, 2004.

HADDAD, P.S.; KUKAN, M.; *Liver transplantation*, vol. 7, nr 5. P.381-400, 2001.

HANNOUN, L., DELRIVIERE L, GIBBS P. Major extended liver resection in diseased livers using hypothermic protection: preliminary results from the first 12 patients treated with this new technique. *J Am Coll Surg*;183:597-605. 1996.

HASSELGREN, P.O. - Prevention and treatment of ischemia of the liver. *Surg Gynecol Obstet*; 164:187-96. 1987.

HAUSSINGER, H.J. Regulation of hepatic ammonia metabolism: the intercellular cycle. *Adv. Enzyme regulat.* 25: 159-180, 1986.

HENGARTNER, M.O.; The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000;407:770-6.

HIRANO, E.S.; MANTOVANI, M.; MORANDIN, R.C.; BRITO, J.; PAVANI, L.; *Acta Cir. Bras.* vol.21 no.1 São Paulo Jan./Feb. 2006.

HERNADEZ, L.A., GRISHAM, M.B., TWOHIG, B., ARFORS K.E., HARLAN, J.M., GRANGER, D.N.; Role of neutrophils in ischemiareperfusion-induced microvascular injury. *Am J Physiol*; **253**: H699-H703, 1987.

HONG RW, ROUNDS, JD; HELTON, WS; ROBINSON, MK; WILMORE, DW. Glutamine preserves liver glutathione after lethal hepatic injury. *Ann Surg*; 215: 114-119. 1992.

IKEDA, S., KUDSK, K.A., LE, T., ZARZAUR, B.L., JONHSON, C.D.; Glutamine improves impaired cellular exudation and polymorphonuclear neutrophil phagocytosis induced by total parenteral nutrition after glycogen-induced murine peritonitis. *Shock*; 19: 50-54, 2003.

INGLOTT-SERRACINO, F. et alli; Hepatic ischemia-reperfusion injury. *The American Journal of Surgery*, 181: 160-166. 2001.

ISOKAZI, H. et alli; Bismuth H. Experimental study of the protective effect of intermittent hepatic pedicle clamping in the rat. *Br J Surg* . 79:310-13. 1992.

IU, S., HARVEY, P.R.C., MAKOWKA, L.; Markers of allograft viability in the rat. Relations hip between transplantation viability and liver function in the isolated perfused rat liver. *Transplantation*;45:562-9. 1987.

IWASAKI, Y., et alli; Protective effect of ischemic preconditioning against intermittent warmischemia-induced liver injury. *J Surg Res.*;107(1):82-92. 2002.

JAESCHKE, H. et al.; Superoxide generation by Kupffer cells and priming of neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Free Radic ResCommun*; 15: 277-284, 1991.

JAESCHKE, H.; Mechanisms of inflammatory liver injury: adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils. *Toxicol Appl Pharmacol*; **139**: 213-226, 1996.

JAESCHKE, H.; Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*; **5**: 402-408, 1998.

JAESCHKE, H.. Reperfusion injury after warm ischemia or cold storage of the liver: role of apoptotic cell death. *Transplant. Proc.*; 34:2656-8, 2002.

JAESCHKE, H.; Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *AM. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 284:G15-G25, 2003.

JAESCHKE, H.; Mechanisms of liver injury. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *AM. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290, G1083-G1088. 2006.

JIA, C. et al.; Alanyl-glutamine dipeptide inhibits hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *World J gastroenterol.* Vol 12, nr 9, p 1373-1378. march 7, 2006.

JONES, B.A., GORES, G.J.; Physiology and pathology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas and intestine. *Am J Physiol.* 273:1174-88. 1997.

KAPLOWITZ, N.; Cell death at the millennium. Implications for liver diseases. *ClinLiver Dis* 4:1-23. 2000.

KERR, J.F.R., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.R.; Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*;26:18. 1972.

KIM, Y. et al.; Evaluation of a protease inhibitor in the prevention of ischemia and reperfusion injury in hepatectomy under intermittent Pringle maneuver. *The American Journal of Surgery*, 191: 72-76. 2006.

KIMURA, N., MURAOKA, R., HORIUCHI, T., TABO, T., UCHINAMI, M., YOKOMACHI, J., DOI, K.; Intermittent hepatic pedicle clamping reduces liver and lung injury. *J Surg Res.* 78(1):11-7. 1998.

KOMATSU, H., KOO, A., GHADISHAH, E., ZENG, H., KUHLENKAMP, J.F., INOUE, M., GUTH, P.H., KAPLOWITZ, N. Neutrophil accumulation in ischemic reperfused rat liver: evidence for a role for superoxide free radicals. *Am J Physiol* 262: G669-G676, 1992.

KONO, Y., OSAWA, K, TANAKA, J.; Significance of mitochondrial enhancement in restoring hepatic energy charge after revascularization of isolated ischemic liver. *Transplantation*; 33:150-5. 1982.

KREBS, H.A. Metabolism of amino acids. IV The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia and the enzymatic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *Bioch. J.*, Vol 29, p1951, 1935.

KUENZLER, K.A., ARTHUR, L.G., SCHWARTZ, MZ. A possible mechanism for prevention of intestinal programmed cell death after ischemia-reperfusion injury by hepatocyte growth factor pretreatment. *J Pediatric Surg*;37(12):1696-9. 2002.

LANGDALE, L.A., FLAHERTY, L.C., LIGGITT, H.D., HARLAN, J.M., RICE,C.L., WINN, R.K.. Neutrophils contribute to hepatic ischemiareperfusion injury by a CD18-independent mechanism. *JLeukoc Biol*; **53**: 511-517, 1993.

LEHNINGER, A.L. NELSON, D.L.; COX, M.M.; A glicólise e o catabolismo das hexososes. IN *Princípios da Bioquímica*. São Paulo, Savier, 2 ed. Cap 14, p 297-330, 2000.

LEI, D.X., PENG, C.H., PENG, S.Y., JIANG, X.C., WU, Y.L., SHEN, H.W.. Safe upper limit of intermittent hepatic inflow occlusion for liver resection in cirrhotic rats. *World J Gastroenterol*. 7(5):713-7. 2001.

LENTSCH, A.B., KATO, A., YOSHIDOME, H, McMASTERS, K.M., EDWARDS, M.J.. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* **32**: 169-173, 2000.

LIANG, T. et alli; Protective effect pf glutathione against liver warm ischemia-reperfusion injury in rats is associated with regulation of p-selectin and neutrophil infiltration. *The anatomical record*, 291:1016-1022 (2008).

LI, J., LANGKAMP-HENKEN, B., SUZUKI, K., STAHLGREN, L.H.; Glutamine prevents parenteral nutrition-induced increases in intestinal permeability. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*; 18: 303-307, 1994.

LIU, D.L., JEPPSSON, B., HAKANSSON, C.H., ODSELIUS, R. Multiplesystem organ damage resulting from prolonged hepatic inflow interruption. *Arch Surg*; 131: 442-447, 1996.

LOCKSHIN, R.A. e ZACHERI, Z. Caspase-independent cell death. *Curr Op Cell Biol*;14:727-33. 2002.

LUO, Y.H.; LI,Z.D; LIU, L.X. e DONG, G.H.; Pretreatment with erythropoietin reduces hepatic ischemia-reperfusion injury; *Hepatobiliary Pancreat Dis. Int.*; Vol.8, Nr.3, June 15, 2009.

MA, A; QI, S.; CHEN, H.: Antioxidant therapy for prevention of inflammation, ischemic reperfusion injuries and allograft rejection. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008, 6:20-43.

MAN, K et alli; Tolerance of the liver to intermittent Pringle maneuver in hepatectomy for liver tumors. *Arch Surg*;134:533-9. 1999.

MANHART, N. et alli; Oral feeding with glutamine prevents lymphocyte and glutathione depletion of Peyer's patches in endotoxemic mice. *Ann Surg*; 234: 92–97. 2001.

MARTINO, F., BURNS, K., TSCCHOPP, J.: The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 2002, 10:417-426.

MASSBERG, S., MESSNER, K.; The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc.*;30:4217-23. 1998.

MASSIP-SALCEDO, M., ROSELLÓ-CATAFAU, J., PRIETO, J., AVILA, M.A., PERALTA, C.; Therresponse of the hepatocyte to ischemia. *Liver Int*; 27: 6-16, 2007.

MIRANDA, L.E.C., VIARO, F., CENEVIVA, R., ÉVORA, P.R.B.. A atividade respiratória mitocondrial é um bom parâmetro para a lesão por isquemia e reperfusão hepática? v. 42 – no.2, *Arq Gastroenterol*– abr./jun. 2005.

MIRANDA, L. E. et alli; As bases experimentais da lesão por isquemia e reperfusão do fígado. Revisão, *Acta Cir. Bras.* Vol 19 (1):3-12. 2004.

MONTOVANI, M. et alli; Isquemia e reperfusão hepática total associada ao estado de choque hemorrágico controlado: efeitos no seqüestro de neutrófilos no pulmão do rato. *Acta Cir. Bras.* Jan/fev. 2002.

MOYNAGH, P.N.: Toll-like receptor signalling pathways as key targets for mediating the anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids. *J Endocrinol* 2003, 179:139-144

MUHLBACHER, F., LANGER, F., MITTERMAYER, C.; Preservation solutions for transplantation. *Transplant Proc.* 31:2069-70. 1999.

MURPHY, C. G. et alli; Glutamine preconditioning protects against tourniquet-induced local and distant organ injury in a rodent ischemia-reperfusion model. *Acta Orthopaedica*, 78 (4):559-566. 2007.

MURRY, C.E., JENNING, R.B., REIMER, K.A.: Preconditioning with ischemia: a delay in lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*; 74:1124-36, 1986.

NEWSHOLME, P.; LIMA, M.M.R.; PROCOPIO, J.. PITHON-CURI, T.C.; DOI, S.Q.; BAZOTTE, R.B.; CURI, R.; Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Braz.J.Med.Bio.Res.*, v.36, nr.2, p153-163, 2003.

NOH, J. et alli; Glutamine does not protect against hepatic warm ischemia/reperfusion injury in rats. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 10(2):234-239, 2006.

OBRADOR, E., CARRETERO, J., ESTEVE, J.M., PELLICER, J.A., PASCUAL, A., PETSCHEN, I., et al.; Glutamine potentiates TNF-alpha-induced tumor cytotoxicity. *Free Radic Biol Med*;31:642–50. 2001.

OKAJIMA, K. et alli; Ranitidine reduces ischemia/reperfusion-induced liver injury in rats by inhibiting neutrophil activation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301 (3):1157-1165. 2002.

OSHIMI, Y., MIYAZAKI, S.; Fas antigen-mediated DNA fragmentation and apoptotic morphologic changes are regulated by elevated cytosolic Ca²⁺ level. *J Immunol*; 54: 599-609, 1995

PACHECO, E. G. et alli; Effect of liver ischemic preconditioning in cirrhotic rats submitted to hepatic ischemic/reperfusion injury. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 21(1):24-28, 2006.

PANNEN, B.H.J.; New insights into the regulation of hepatic blood flow after ischemia and reperfusion – Review article; *Anesth Analog*, 94:1448-57, 2002.

PAROLIN, M.B.; REASON, I.J.M.; Apoptose como mecanismo de lesão das doenças hepatobiliares; *Arq. Gastroenterol.*; v.38, nr.2, abr-jun. 2001.

PATEL, T. GORES, G.; Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology*, s5:1725-41. 1995.

PATEL, T., GORES, G.J.. Apoptosis in liver transplantation: a mechanism contributing to immune modulation, preservation injury, neoplasia, and viral disease. *Liver Transplant Surg* 4:42-50. 1998.

PATEL, T.; Apoptosis in hepatic pathophysiology. *Clin Liver Dis*;4:295-317. 2000.

PEDERSEN, P.L. et alli; Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver-derived tissues. *Meth Cell Biol*; 20:411-81. 1978.

PERALTA, C. et alli; Ischemic preconditioning: a defense mechanism against the reactive oxygen species generated after hepatic ischemia reperfusion. *Transpl*; 73(8):1203-1211. 2002.

PESSAYRE, D., HAOUZI, D., FAU, D, ROBIN, M.A., MANSOURI, A., BERSON, A.; Withdrawal of life support, altruistic suicide, fratricidal killing and euthanasia by

- lymphocytes: different forms of drug-induced hepatic apoptosis. *J Hepatol*;31:760-70. 1999.
- POWER, C e RASKO, J; "Whither Prometheus' Liver? Greek Myth and the Science of Regeneration". *Annals of Internal Medicine* 149(6): 421-426(2008).
- PREM, J.T. et al.; The role of glutamine in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in the rat hind limb model. *Am J Surg*;178(2):147-50. Aug1999.
- PRINGLE, J.H.. Notes of the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. *Ann Surg*;48:541. 1908.
- QUIREZE, C Jr et alli; Ischemic preconditioning prevents apoptotic cell death and necrosis in early and intermediate phases of liver ischemia-reperfusion injury in rats. *J Invest Surg*; 19:229-2362006.
- REGAN, S.E., BROAD, M., BYFORD, A.M., LANKFORD, A.R., CERNIWAY, R.J., MAYO, M.W., MATHERNE, G.P.. A₁ adenosine receptor overexpression attenuates ischemia-reperfusion induced apoptosis and caspase 3 activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.;284(3):H859-66. 2003.
- RHODEN, E. et alli;Análise das alterações histopatológicas dos figado de ratos pré-tratados com alopurinol e submetidos à isquemia:reperfusão hepática; *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões — Vol. 27 – no 6 — 373-77; 2000.*
- RODRIGUES, C.M.P. et alli; A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J. Clin. Invest.*; 101:2790-9; 1998.
- ROSELLO-CATAFAU, J.; MASSIP-SALCEDO, M.; PRIETO, J; AVILA,M.A.; PERALTA, C.. The response of the hepatocyte to ischemia. *Liver International*; 6-16, 2007.
- ROTH, E., OEHLER, R., MANHART, N., EXNER, R., WESSNER., B, STRASSER, E.; Regulative potential of glutamine—relation to glutathione metabolism. *Nutrition*;18:217–21. 2002.
- RUDIGER, H.A.; GRAF, R; CLAVIEN, P.A.. Liver ischemia: apoptosis as a central mechanism of injury. *J. Invest. Surg.* 16:149-59, 2003.
- RYMSA, B., WANG, J.F.,; O₂- release by activated Kupffer cells upon hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol*; 261: G602-G607, 1991.
- SAIDI, R.F. et alli; The effect of methylprednisolone on warm ischemia-reperfusion injury in the liver. *The American Journal of Surgery*, 193:345-348. 2007.

SARANTOS, P., OCKERT, K., SOUSBA, W.W.; Endotoxin stimulates lymphocyte glutaminase expression. *Arch Surg*; 128: 920-924. 1993.

SCHEPPACH, W., LOGES, C., BARTRAM, .P, CHRISTL, S.U., RICHETR, F., DUSEL, G., STEHLE, P., FUERST, P., KASPER, H. Effect of free glutamine and alanyl-glutamine dipeptide on mucosal proliferation of the human ileum and colon. *Gastroenterology*; 107: 429-434. 1994.

SCHUSTER, A. et alli; Protective effects of glutamine dipeptide and α -tocopherol against ischemia–reperfusion injury in the isolated rat liver; *Clinical Nutrition*, (28) 331–337, (2009).

SÉBE, A.A., et alli; Efeitos de diferentes tempos de isquemia no fígado de ratos; *Acta Cir. Bras.* vol.15 suppl.1 São Paulo 2000.

SHAUER, R.J. et al.; Intravenous administration of glutathione protects parenchymal and non-parenchymal liver cells against reperfusion injury following rat liverransplantation; *World J Gastroenterol*;10(6):864-870. 2004.

SHINODA, M. et alli; Tumor necrosis factor suppression and microcirculatory disturbance amelioration in ischemia/reperfusion injury of rat liver after ischemic preconditioning. *J Gastroenterol Hepatol.* 17(11):1211-9. 2002.

SILVA et alli; Avaliação bioquímica dos efeitos do pré-condicionamento isquêmico após isquemia reperfusão hepática em ratos; *Rev. Col. Bras. Cir.* Vol. 33 - Nº 6, Nov. / Dez. 2006

SILVA, F.N.; Isquemia hepática normotérmica: redução da lesão celular através do uso de clampeamento pedicular intermitente – estudo experimental em ratos [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2000.

SILVA JUNIOR, O. et alli ; Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico; *Acta Cirúrgica Brasileira - Vol 17 (Suplemento 3) 2002.*

SOUZA, M. A. G. de; Avaliação morfológica e imunohistoquímica tardia do fígado e do pulmão após lesão de isquemia e reperfusão hepática seletiva com modulação pelo condicionamento isquêmico ou pela *N*-acetilcisteína xx, 61f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação. São Paulo, 2007.

SUN, .K, LIU, Z.S., SUN, Q.; Role of mitochondria in cell apoptosis during hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effect of ischemic postconditioning. *World J Gastroenterol*; 10: 1934-1938, 2004.

SUZUKI, S., TOLEDO-PEREYRA, L.H., RODRIGUEZ, .F.J.; Role of neutrophils during the first 24 hours after liver ischemia and reperfusion injury. *Transplant Proc*; 26: 3695-3700, 1994.

SZABO, C., ZINGARELLI, B., SASZMAN, A.L.. Role of poly- ADP ribosyltransferase activation in the vascular contractile and energetic failure elicited by exogenous and endogenous nitric oxide and peroxynitrite. *Circ. Res.*; 78:1051-63, 1996.

SZIJARTÓ, A.; Short-term alanyl-glutamine dipeptide pretreatment in liver ischemia–reperfusion model: Effects on microcirculation and antioxidant status in rats, Volume 26, Issue 5, P. 640-648, October 2007.

TEOH, N., DELA PENA, A., FARELL, G.; Hepatic ischemic preconditioning in mice is associated with activation of NF-kappaB, p38 kinase, and cell cycle entry. *Hepatology*. 36(1):94-102. 2002.

THOMPSON, C.B.; Apoptosis. In: PAUL, W.E., editor. *Fundamental immunology*. 4. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; p.813-29. 1999.

TORRES, J.M.S. et alli; Efeitos metabólicos da L-alanil-glutamina em ratos submetidos à isquemia da pata traseira esquerda, seguida de reperfusão. *Acta Cir. Brás.*; V.18; ne.1; p.39-44, 2003.

TURNAGE, R.H., KEDSKY, K.M., MYERS, S.I., GUICE, K.S., OLDHAM, K.T.; Hepatic hypoperfusion after intestinal reperfusion. *Surgery*;119:151–60. 1996.

VAILLANT, J.C., BORIE, D.C., HANNOUN, L.; Hepatectomy with hypothermic perfusion of the liver. *Hepato Gastroenterol*;445:381-8. 1998.

VAN AS, A.B., LOTZ, Z., TYLER, M., KAKN, D.; Reperfusion injury associated with portal venous and hepatic arterial perfusion in liver transplantation. *Transplantation*; 74: 158-163, 2002.

VAN LEEUWEN, P.A., HONG, R.W., ROUNDS, J.D., RODRICK, M.L., WILMORE, D.; Hepatic failure and coma after liver resection is reversed by manipulation of gut contents: the role of endotoxin. *Surgery*; 110:169-174. discussion 174-175, 1991.

VOLLMAR, B. et alli ; Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion; *Hepatic Reperfusion Injury* 1429; *AJP*, v.145; nr.6.; December, 1994.

WAHI, A.K. et alli; Calcium antagonist prevents calcium flux induced necrosis and apoptosis in ischemic reperfusion of rat liver; *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2008 / 23 (4) 356-360.

WANG, X. et alli ; Bacterial translocation after major hepatectomy in patients and rats. *Arch Surg*; 127:1101-1106. 1992.

WANG, X.D. et alli; Bacterial translocation, intestinal ultrastructure and cell membrane permeability early after major liver resection in the rat. *Br J Surg*; 81: 579-584, 1994.

WANG, Y, TIAN, F.Z, TANG, L.J., HUANG, D.R., LI, X.J., YIN, Z.L.; Effects of glycogen on rabbit donor liver during ischemia-reperfusion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001; 9: 255-259

WANG, M. et alli; Prednisolone suppresses ischemia-reperfusion injury of the rat liver by reducing cytokine production and calpain mu activation. *J Hepatol.* 34(2):278-83. 2001.

WERNERMAN, J.; LUO, J. L.; HAMMARQVIST, F. Glutathione status in critically-ill patients: possibility of modulation by antioxidants; *Proceedings of the Nutrition Society*, 58:677-680. 1999.

WISCHMEYER, P.E.; Glutamine: role in critical illness and ongoing clinical trials; *Current opinion in gastroenterology*, 24:190-197, 2008.

XIA, J.Z., WU, Z.H.; Metabolism of glutamine-dipeptide supplemented TPN decreasing injuries of liver and intestine in intraperitoneal chemotherapy rats. *Parenteral Enteral Nutrition*; 4: 78-82, 1997.

XU, W.H., YE, Q.F. e XIA,S.S.; Apoptoses and proliferation of intrahepatic bile duct after ischemia-reperfusion injury. *Hepatobiliary Pancreat Dis. Int, Voç.3, Nr.3* –p6428. August 15 2004.

YAGMURDUR, M.C. et alli; Effects of lafa tocopherol and verapamil on liver and small bowel following mesenteric ischemia-reperfusion. *Turk. J. Gastroenterol.* 13(1): 40-46. 2002.

YASUHARA, M.; L-glutamine-induced heme oxygenase-1 protects small intestine from warm ischemia and reperfusion injury in the rat. *Hokkaido Igaku Zasshi*; 76: 21-34, 2001.

YOUNG, V.R.; AJAMI, A.M.. Glutamine: the emperor or his clothes? *J.Nutrition*, V.131, p. 2449-2459, 2001.

ZHANG, J., DAWASON, V.L., DALSON, T.M.; Nitric oxide activation of poly (ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science*;263:687-9. 1994.

ZHANG, J.X., WU, H.S., WWANG, H., ZHANG, J.H., WANG, Y., ZHENG, Q.C.. Protection against hepatic ischemia/reperfusion injury via downregulation of toll-like receptor 2 expression by inhibition of Kupffer cell function. *World J Gastroenterol*; 11: 4423-4426, 2005.

ZHANG, J. et alli; Nitric oxide activation of poly-ADP(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science*; 263:687-9. 1994.

ZHANG, S.J, ZHU, C.J., ZHAO, Y.F., LI, J., GUO, W.Z.; Different ischemic preconditioning for rat liver graft: protection and mechanism. *Hepatobiliary Pancreatic Dis Int.*;2(4):509-12. 2003.

ZHANG, Y., ZHANG, B., PAN, R.; Protective effect of ischemic preconditioning on liver. *Chin J Traumatol*;4(2):123-5, 2001.

ANEXOS

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC



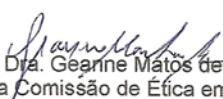
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 37/08, sobre o projeto intitulado: **"ISQUEMIA HEPÁTICA EXPERIMENTAL E A AÇÃO DA L-ALANIL-GLUTAMINA"**, de responsabilidade de RAIMUNDO JOSÉ CUNHA ARAÚJO JUNIOR, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 30 de setembro de 2008.

Fortaleza, 30 de setembro de 2008.


Prof. Dra. Geanine Matos de Andrade Cunha
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

Anexo B – Parecer da Comissão de Ética de Pesquisa em Animais da Faculdade NOVAFAPI em Teresina, Piauí



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/NOVAFAPI

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins, que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade NOVAFAPI (CEP/NOVAFAPI), após análise do projeto de pesquisa **ISQUEMIA REPERFUSÃO HEPÁTICA EM Rattus norvegicus E AÇÃO DA L-ALANIL-GLUTAMINA** processo Nº. 0004/10, verificou que o mesmo atende o disposto na Lei 11.794/2008 e aos Princípios Éticos da Experimentação Animal preconizado pelo CONCEA, e emite parecer favorável a realização do mesmo.

Teresina, 04 de maio de 2010.


Francisca Teresinha COSTA MATOS
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

APÊDICES

Apêndice 1 – Tabela com valores de dosagens bioquímica de ALT e DHL em *Ratus norvegicus* do Grupo Controle (Laparotomia e manipulação pedículo hepático)

Rato	ALT(U/L)	DHL(U/L)
1	51	238
2	82	269
3	96	182
4	109	156
5	101	157
6	93	173
7	85	311
8	77	177
9	73	197
10	66	206

Laboratório de Cirurgia experimental da Faculdade Novafapi, Teresina-PI.

Apêndice 2 – Tabela com valores de dosagens bioquímica de ALT e DHL em *Ratus norvegicus* do Grupo Isquemia/Reperusão (*Injeção intraperitoneal pré-operatória de solução fisiológica 0,9%, 2 horas antes de Laparotomia e isquemia total do pedículo hepático por 30 minutos, seguida de reperusão por 60 minutos*)

Rato	ALT (U/L)	DHL(U/L)
1	387	2941
2	374	2760
3	401	2794
4	152	1482
5	201	2118
6	160	1180
7	386	2677
8	406	2853
9	129	988
10	110	1009

Apêndice 4 - Tabela valores de dosagens bioquímicas de ALT e DHL em *Ratus norvegicus* do Grupo Glutamina mais Isquemia/Reperusão (Injeção intraperitoneal pré-operatória de Glutamina 2%, 2 horas antes de Laparotomia e isquemia total do pedículo hepático por 30 minutos, seguida de reperusão por 60 minutos)

Rato	ALT(U/L)	DHL(U/L)
1	307	2133
2	250	1662
3	42	891
4	59	1112
5	73	500
6	142	942
7	89	533
8	42	425
9	48	431
10	227	1556

Apêndice 5 – Tabela com número de células marcadas com anticorpo para Caspase - 3.

GRUPO GLUTAMINA MAIS ISQUEMIA/ REPERFUSÃO

Rato 1	Glutamina	112
Rato 2	Glutamina	45
Rato 3	Glutamina	57
Rato 4	Glutamina	11
Rato5	Glutamina	0
Rato 6	Glutamina	4
Rato 7	Glutamina	9
Rato 8	Glutamina	67
Rato 9	Glutamina	0
Rato 10	Glutamina	61

Laboratório de Cirurgia experimental da Faculdade Novafapi, Teresina-PI.

Apêndice 6 – Tabela com número de células marcadas com anticorpo para Caspase - 3.

GRUPO ISQUEMIA/ REPERFUSÃO(SOLUÇÃO SALINA 0,9%)

Rato 1	IR	40
Rato 2	IR	115
Rato 3	IR	117
Rato 4	IR	64
Rato 5	IR	65
Rato 6	IR	34
Rato 7	IR	127
Rato 8	IR	85
Rato 9	IR	11
Rato 10	IR	14

Laboratório de Cirurgia experimental da Faculdade Novafapi, Teresina-PI.

Apêndice 7 – Tabela com número de células marcadas com anticorpo para caspase - 3.

GRUPO CONTROLE (SIMULAÇÃO DO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO)

Rato 1	Controle	0
Rato 2	Controle	77
Rato 3	Controle	0
Rato 4	Controle	3
Rato 5	Controle	91
Rato 6	Controle	0
Rato 7	Controle	48
Rato 8	Controle	0
Rato 9	Controle	0
Rato 10	Controle	0

Laboratório de Cirurgia experimental da Faculdade Novafapi, Teresina-PI.

Apêndice 8 - Microscópio óptico NIKON Eclipse E200 com Moticam 1000 1.3MP



Microscópio óptico NIKON Eclipse E200 com Moticam 1000 1.3MP. Captura de imagem com Moticam 1000, 1.3MP Live resolution. Usado para captura de imagens das lâminas. *Software Motic Images Plus 2.0.* Laboratório de Patologia – LAPAC, Teresina PI