

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

ANDRÉ DE OLIVEIRA PORTO

**ORNITINA CETOGLUTARATO NA ISQUEMIA-REPERFUSÃO EM
MEMBRO PÉLVICO DE RATOS**

**FORTALEZA
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANDRÉ DE OLIVEIRA PORTO

ORNITINA CETOGLUTARATO NA ISQUEMIA-REPERFUSÃO EM MEMBRO
PÉLVICO DE RATOS

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Cirurgia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial, para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

FORTALEZA
2007

Ficha Catalográfica

P881e Porto, André de Oliveira

Ornitina-cetogluturato na isquemia-reperusão em membro pélvico de ratos/ André de Oliveira Porto. 2007. 119 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2007.

1. Isquemia. 2. Reperusão. 3. Glutamina. 4. Ornitina. 5. Cetogluturato. 6. Rato. 7. Músculo. 8. Membro Pélvico. 9. Modelos Animais. I. Vasconcelos, Paulo Roberto Leitão de (Orient.). II. Título.

CDD 616.131

ANDRÉ DE OLIVEIRA PORTO

ORNITINA-CETOGLUTARATO NA ISQUEMIA-REPERFUSÃO EM MEMBRO
PÉLVICO DE RATOS

Dissertação apresentada à coordenação do curso de pós-graduação em cirurgia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial, para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Helena Alves de Carvalho Sampaio
Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. Ronaldo Albuquerque Ribeiro
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará-UFC

À Érika.

*Pelo amor, dedicação e por sua infatigável
presença ao meu lado.*

Aos meus filhos Augusto e Letícia.

*Por minhas freqüentes viagens para a
realização desta dissertação.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS, Coordenador do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Agradecimentos sinceros pela gentileza, dedicação e amizade no transcorrer desta pesquisa.

Ao Professor MARCIANO LIMA SAMPAIO, Coordenador da Clínica Médica - UFC pelo incentivo no início desta pesquisa.

Ao Professor Doutor BERNARD ANDREASSIAN, Chefe do Serviço de Cirurgia Vasculardo Centro Cardiológico do Norte, Sant Denis – França, Professor de Cirurgia da Faculdade de Medicina, Universidade Paris V - França, pelo apoio no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Doutor JEAN-BAPTISTE MICHEL, pesquisador do Instituto Nacional da Saúde e da Pesquisa Médica da França, pesquisador em “isquemia-reperfusão” e criador de modelos de isquemia em ratos, por sua gentileza e conhecimentos transmitidos.

Ao Doutor LUC CYNOBER, Pesquisador do Laboratório de Bioquímica do Hôtel-Dieu – Hospitais de Paris e do Laboratório de Biologia da Nutrição da Faculdade de Farmácia da Universidade Paris V - França, autor de múltiplos estudos sobre “aminoácidos anabólicos”, pela cordialidade e conhecimentos transmitidos.

Aos Professores Doutores LUSMAR VERAS RODRIGUES, SÉRGIO BOTELHO GUIMARÃES e LÚCIO FLÁVIO GONZAGA SILVA, Professores do Mestrado em Cirurgia, pelo exemplo de dedicação aos alunos.

Aos Professores do Departamento de Cirurgia, de outros Departamentos, bem como de outros Centros, que participaram do Curso de Pós-Graduação, pelas aulas ministradas.

Aos estudantes de medicina, DANIEL AGUIAR DIAS, VICENTE DE PAULO MARTINS COELHO JÚNIOR, MARCELO PINHO PESSOA DE VASCONCELOS e

RAQUEL CAVALCANTE DE VASCONCELOS que participaram com responsabilidade, técnica e dedicação na realização deste estudo.

À Sra. MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA e à Sra. MAGDA MARIA GOMES FONTENELI, secretárias, pela dedicação, competência e carinho, acima de suas atribuições, desde minha chegada ao departamento.

Ao Sr. FRANCISCO EVANIR GONÇALVES DE LIMA, pela fundamental participação na preparação e execução dos testes laboratoriais.

À Srta. MARIA FRANCIANA ALVES, secretária, por sua dedicação, paciência e excepcional esforço nestes dois anos de idas e vindas, nunca programadas.

Toda a nossa ciência, comparada com a realidade é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.

Albert Einstein (1879-1955)

RESUMO

ORNITINA CETOGLUTARATO NA ISQUEMIA-REPERFUSÃO EM MEMBRO PÉLVICO DE RATOS. Autor: André de Oliveira Porto. Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

Objetivo - Investigar os efeitos da ornitina α -cetoglutarato (OKG) no sangue e músculo gastrocnêmio de ratos submetidos à isquemia-reperfusão do membro pélvico. **Método** - Quarenta e dois ratos foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: Sham (S), Isquemia (I) e Isquemia-reperfusão (R). Estes grupos foram distribuídos em subgrupos de acordo com o tempo e com o composto utilizado na gavagem. Todos os animais receberam gavagem de caseinato de cálcio ou OKG em dose única, noventa minutos antes da primeira laparotomia exploradora (LE). Os subgrupos S receberam apenas caseinato, os subgrupos I e R receberam caseinato ou OKG na mesma dose, de 5g/kg de peso. As amostras foram colhidas em três momentos: imediatamente após a LE; após 6h da LE com isquemia (6h de isquemia) e sem isquemia e após 6,5h da LE com isquemia-reperfusão (0,5h de reperfusão) e sem isquemia-reperfusão. Para análise dos resultados foram utilizados: média, desvio padrão e teste de normalidade de Korogorov-Smirnov. Caso os resultados fossem normalizáveis, aplicou-se o teste ANOVA para avaliação de diferença significativa, no caso dos resultados não serem normalizáveis utilizou-se o teste de Kurskal-Wallis com o mesmo fim. Em todos os testes fixou-se em 0,05 ou 5%, a significância estatística. **Resultados** - No grupo S, nos metabólitos plasmáticos, após 6h e 6,5h da LE, quando comparados ao momento da LE (0h), houve aumento de: CPK 6h [141,83 \pm 47,88 *versus* 67,17 \pm 21,58 – p<0,004], CPK 6,5h [180,67 \pm 70,19 *versus* 67,17 \pm 21,58 – p<0,001]; LDH 6h [248,96 \pm 80,62 *versus* 74,40 \pm 33,84 – p<0,001]. Nos metabólitos musculares houve aumento de: lactato 6,5h [3,52 \pm 1,27 *versus* 1,57 \pm 0,76 – p<0,008]. Houve redução de: piruvato 6h [0,035 \pm 0,024 *versus* 0,087 \pm 0,041 – p<0,004]. No grupo I foram observadas, para o subgrupo submetido à isquemia + caseinato em relação ao sham, no plasma, elevações em: CPK [635,17 \pm 231,71 *versus* 141,83 \pm 47,88 – p<0,001], LDH [551,16 \pm 142,63 *versus* 248,96 \pm 80,62 – p<0,002], piruvato [0,390 \pm 0,069 *versus* 0,061 \pm 0,045 – p<0,001]. No músculo houve elevação de: piruvato [0,127 \pm 0,044 *versus* 0,035 \pm 0,024 – p<0,002], lactato [8,158 \pm 0,717 *versus* 2,737 \pm 0,499 – p<0,001] e TBARS [0,012 \pm 0,004 *versus* 0,002 \pm 0,001 – p<0,001]. Neste mesmo grupo comparando-se o subgrupo isquemia + OKG ao subgrupo sham encontrou-se, no plasma, elevação em: CPK [868,17 \pm 308,30 *versus* 141,83 \pm 47,88 – p<0,001], glutaciona [19,545 \pm 2,088 *versus* 6,432 \pm 1,062 – p<0,001] e no músculo elevação da glutaciona [101,85 \pm 16,45 *versus* 14,73 \pm 0,87 p<0,001]. Ainda no grupo I, foi observado, para o subgrupo isquemia + OKG *versus* isquemia + caseinato, no plasma, queda em: LDH [296,26 \pm 93,62 *versus* 551,16 \pm 142,62 – p<0,004], glicose [104,16 \pm 20,81 *versus* 160,33 \pm 27,47 – p<0,001], piruvato [0,046 \pm 0,012 *versus* 0,390 \pm 0,069 – p<0,001], e elevação de glutaciona [19,54 \pm 2,08 *versus* 5,52 \pm 0,92 – p<0,001]. No músculo foi evidenciada diminuição do piruvato [0,047 \pm 0,031 *versus* 0,127 \pm 0,045 – p<0,004], lactato [2,47 \pm 0,74 *versus* 8,15 \pm 0,71 – p<0,001], TBARS [0,004 \pm 0,004 *versus* 0,012 \pm 0,004 – p<0,013] e elevação glutaciona [101,85 \pm 16,45 *versus* 14,44 \pm 2,09 – p<0,001]. No grupo R, foi observada, quando comparado o subgrupo reperfusão + caseinato ao Sham, no plasma, elevação de: CPK [606,33 \pm 79,84 *versus* 180,66 \pm 70,19 – p<0,001], No músculo elevação do piruvato [0,065 \pm 0,027 *versus* 0,030 \pm 0,033 – p<0,047] e lactato [7,16 \pm 2,33 *versus* 3,52 \pm 1,27 – p<0,013] além de queda na G6PDH [0,462 \pm 0,22 *versus* 0,207 \pm 0,22 p<0,04] . No grupo R quando comparado o subgrupo reperfusão + OKG ao subgrupo Sham, no plasma, foi evidenciado aumento em: CPK [558,00 \pm 102,83 *versus* 180,66 \pm 70,19 – p<0,001] e glicose [232,16 \pm 59,76 *versus* 118,16 \pm 24,22 – p<0,001]. No músculo houve diminuição de G6PDH [0,182 \pm 0,22 *versus* 0,462 \pm 0,22]. Ainda no grupo R quando comparado o subgrupo reperfusão + OKG ao reperfusão + caseinato, no plasma, houve elevação da glicose [232,16 \pm 59,76 *versus* 158,00 \pm 24,20 – p<0,013]. No músculo foi notada queda no lactato [3,63 \pm 1,16 *versus* 7,16 \pm 2,33 – p<0,008] e elevação da glutaciona [63,18 \pm 18,98 *versus* 16,17 \pm 1,96 – p<0,001]. **Conclusões** - O trauma cirúrgico desencadeou alterações significativas em alguns metabólitos estudados. O modelo de isquemia-reperfusão demonstrou efetividade. A OKG, em dose única por gavagem, demonstrou ações pró-glicolíticas aeróbica a nível muscular e sistêmico; proteção contra lesão da célula muscular, e efeito antioxidante muscular e sistêmico durante a lesão de isquemia quanto após lesão de isquemia/reperfusão.

Palavras-chave: Isquemia. Reperfusão. Glutamina. Ornitina. Cetoglutarato. Rato. Músculo. Membro Pélvico. Modelos Animais.

ABSTRACT

ORNITHINE KETOGLUTARATE AND ISCHEMIA-REPERFUSION IN RAT HIND LIMB MODEL.

Author: André de Oliveira Porto. Professor: Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

Purpose - To investigate the effects of the ornithine α -ketoglutarate (OKG) upon metabolites in vivo concentrations in whole blood and gastrocnemius muscle tissue of rats submitted to ischemia-reperfusion of the pelvic limb. **Methods** - Forty two rats were randomly distributed into three groups: Sham (S), Ischemia (I) and Ischemia-reperfusion (R). These groups were redistributed into subgroups, according to time and to the substance used in the gavage. All animals received via gavage calcium caseinate or OKG as a single dose, ninety minutes before the first laparotomy (L). The subgroup S received only caseinate, whereas subgroups I and R received caseinate or OKG, at the same dose of 5g/kg body weight. Samples were collected at three moments: immediately after L; after 6h with ischemia (ischemia of 6h) or without ischemia; and after 6,5h of L with ischemia-reperfusion (reperfusion of 0,5h) or without ischemia-reperfusion. Data expressed as: mean \pm standard deviation, normality test of Korogorov-Smirnov. In case of the results went normalized, the test ANOVA was applied for evaluation significant difference, in case of the results was not normalized, the test of Kurskal-Wallis was used. Significant variations were considered when $p < 0,05$. **Results** - In S group, at the plasmatic samples, after six hours (6h) or six hours and thirty minutes (6,5h) of L, when compared versus at the moment of L (0h), there was increase of: CPK 6h [141,83 \pm 47,88 versus 67,17 \pm 21,58 - $p < 0,004$], CPK 6,5h [180,67 \pm 70,19 versus 67,17 \pm 21,58 - $p < 0,001$]; LDH 6h [248,96 \pm 80,62 versus 74,40 \pm 33,84 - $p < 0,001$]. In muscular samples there was increase of: lactate 6,5h [3,52 \pm 1,27 versus 1,57 \pm 0,76 - $p < 0,008$]; there were reductions of: pyruvate 6h [0,035 \pm 0,024 versus 0,087 \pm 0,041 - $p < 0,004$]. In group I it was observed, for the subgroup submitted to ischemia + caseinate in relation to sham, in plasma, elevations of: CPK [635,17 \pm 231,71 versus 141,83 \pm 47,88 - $p < 0,001$], DHL [551,16 \pm 142,63 versus 248,96 \pm 80,62 - $p < 0,002$], pyruvate [0,390 \pm 0,069 versus 0,061 \pm 0,045 - $p < 0,001$]. In muscle there were elevations of: pyruvate [0,127 \pm 0,044 versus 0,035 \pm 0,024 - $p < 0,002$], lactate [8,15 \pm 0,71 versus 2,73 \pm 0,49 - $p < 0,001$] and TBARS [0,012 \pm 0,004 versus 0,002 \pm 0,001 - $p < 0,001$]. In this same group when comparing subgroup ischemia + OKG versus subgroup sham there were, in the plasma, elevations of: CPK [868,17 \pm 308,30 versus 141,83 \pm 47,88 - $p < 0,001$], glutathione [19,54 \pm 2,08 versus 6,43 \pm 1,06 - $p < 0,001$]. In muscle there was elevation of glutathione [101,851 \pm 16,457 versus 14,737 \pm 0,874 $p < 0,001$]. Still in the I group, it was observed, when subgroup ischemia + OKG was compared to ischemia + caseinate, in the plasma, a decrease of: LDH [296,26 \pm 93,62 versus 551,16 \pm 142,62 - $p < 0,004$], glucose [104,16 \pm 20,81 versus 160,33 \pm 27,47 - $p < 0,001$], pyruvate [0,046 \pm 0,012 versus 0,390 \pm 0,069 - $p < 0,001$] and an elevation of glutathione [19,54 \pm 2,08 versus 5,52 \pm 0,92 - $p < 0,001$]. In muscle there were decreases of pyruvate [0,047 \pm 0,031 versus 0,127 \pm 0,045 - $p < 0,004$], lactate [2,47 \pm 0,74 versus 8,15 \pm 0,71 - $p < 0,001$], TBARS [0,004 \pm 0,004 versus 0,012 \pm 0,004 - $p < 0,013$]. It was observed elevation of glutathione [101,85 \pm 16,45 versus 14,44 \pm 2,09 - $p < 0,001$]. In R group, it was observed, when comparing subgroup reperfusion + caseinate versus sham at the plasma, elevations of: CPK [606,33 \pm 79,84 versus 180,66 \pm 70,19 - $p < 0,001$]. In muscle it was observed elevations of lactate [7,16 \pm 2,33 versus 3,52 \pm 1,27 - $p < 0,013$] and decrease of G6PDH [0,462 \pm 0,22 versus 0,207 \pm 0,22 $p < 0,04$]. In R group, when comparing subgroup reperfusion + OKG to subgroup sham, at the plasma, it was evidenced increase of: CPK [558,00 \pm 102,83 versus 180,66 \pm 70,19 - $p < 0,001$], glucose [232,16 \pm 59,76 versus 118,16 \pm 24,22 - $p < 0,001$]. In muscle there was observed decrease of G6PDH [0,182 \pm 0,22 versus 0,462 \pm 0,22]. Still in the group R when comparing the subgroup reperfusion + OKG versus the subgroup reperfusion + caseinate, at the plasma, there were elevations of glucose [232,16 \pm 59,76 versus 158,00 \pm 24,20 - $p < 0,013$]. In muscle it was noticed a decrease of lactate [3,63 \pm 1,16 versus 7,16 \pm 2,33 - $p < 0,008$] and elevation of glutathione [63,18 \pm 18,98 versus 16,17 \pm 1,96 - $p < 0,001$]. **Conclusions** - Surgical trauma promoted significant alterations in some studied samples. The ischemia-reperfusion model demonstrated to be effective. OKG, as a single dose for gavage demonstrated pro glycolytic aerobic effect. Muscular and systemic protection against muscle cell lesion was also observed as well as an antioxidant effect at the end of ischemia and after ischemia-reperfusion injury.

Key-words: Ischemia. Reperfusion. Glutamine. Ornithine. Ketoglutarate. Rat. Hind Limb.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentração de CPK (ui/l) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham de 6 e 6,5h ao subgrupo 0h.....	65
Tabela 2	Concentração de LDH (ui/l) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham de 6 e 6,5h ao subgrupo 0h.....	66
Tabela 3	Concentração da glicose (mg/dl) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham de 6 e 6,5h ao subgrupo 0h.....	67
Tabela 4	Concentração da glicose (mg/dl) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham de 6 e 6,5h ao subgrupo 0h.....	68
Tabela 5	Concentração do piruvato (μmol /ml) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h	69
Tabela 6	Concentração do piruvato (μmol /g) no tecido, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h.....	70
Tabela 7	Concentração do lactato (μmol /ml) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h.....	71
Tabela 8	Concentração do lactato (μmol /g) no tecido, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h.....	72
Tabela 9	Concentração do TBARS (μmol /ml) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h	73
Tabela 10	Concentração do TBARS (μmol /g) no tecido, comparando-se os subgrupos Sham 6e 6,5h ao subgrupo 0h.....	74
Tabela 11	Concentração da glutationa (μmol /ml) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h	75
Tabela 12	Concentração da glutationa (μmol /g) no tecido, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h.....	76
Tabela 13	Concentração da CPK (ui/l) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6, IC 6 e α 6.....	78
Tabela 14	Concentração da LDH (ui/l) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6, IC 6 e α 6	79
Tabela 15	Concentração da glicose (mg/dl) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6, IC 6 e α 6.....	80
Tabela 16	Concentração da G6PDH (μmol /g) no tecido, analisando-se os subgrupos S 6, IC 6 e α 6.....	81
Tabela 17	Concentração da piruvato (μmol /ml) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6, IC 6 e α 6.....	82
Tabela 18	Concentração da piruvato (μmol /g) no tecido, analisando-se os subgrupos S 6, IC 6 e α 6.....	83
Tabela 19	Concentração do lactato (μmol /ml) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6, IC 6 e α 6.....	84
Tabela 20	Concentração do lactato (μmol /g) no tecido, analisando-se os subgrupos S 6, IC 6 e α 6.....	85
Tabela 21	Concentração do TBARS (μmol /ml) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6, IC 6 e α 6.....	86
Tabela 22	Concentração do TBARS (μmol /g) no tecido, analisando-se os subgrupos S 6, IC 6 e α 6.....	87
Tabela 23	Concentração da glutationa (μmol /ml) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6, IC 6 e α 6.....	88
Tabela 24	Concentração da glutationa (μmol /g) no tecido, analisando-se os subgrupos S 6, IC 6 e α 6.....	89

Tabela 25	Concentração da CPK (ui/l) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6,5, RC 6,5 e R α 6,5.....	90
Tabela 26	Concentração da LDH (ui/l) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6,5, RC 6,5 e R α 6,5.....	91
Tabela 27	Concentração da glicose (mg/dl) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6,5, RC 6,5 e R α 6,5.....	92
Tabela 28	Concentração da G6PDH (μ mol/g) no tecido, analisando-se os subgrupos S 6,5, RC 6,5 e R α 6,5.....	93
Tabela 29	Concentração da piruvato (μ mol/ml) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6,5, RC 6,5 e R α 6,5.....	94
Tabela 30	Concentração do piruvato (μ mol/g) no tecido, analisando-se os subgrupos S 6,5, RC 6,5 e R α 6,5.....	95
Tabela 31	Concentração do lactato (μ mol/ml) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6,5, RC 6,5 e R α 6,5.....	96
Tabela 32	Concentração do lactato (μ mol/g) no tecido, analisando-se os subgrupos S 6,5, RC 6,5 e R α 6,5.....	97
Tabela 33	Concentração do TBARS (μ mol/ml) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6,5, RC 6,5 e R α 6,5.....	98
Tabela 34	Concentração das TBARS (μ mol/g) no tecido, analisando-se os subgrupos S 6,5, RC 6,5 e R α 6,5.....	99
Tabela 35	Tração da glutationa (μ mol/ml) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6,5, RC 6,5 e R α 6,5.....	100
Tabela 36	Concentração da glutationa (μ mol/g) no tecido, analisando-se os subgrupos S 6,5, RC 6,5 e R α 6,5.....	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Eventos bioquímicos, interação de neutrófilos ativados com o endotélio e mecanismos de lesão na isquemia e reperfusão...	23
Figura 2	Eventos bioquímicos da isquemia e reperfusão, ativação de neutrófilos e mecanismos de lesão.....	24
Figura 3	Representação esquemática da peroxidação lipídica dos ácidos graxos da membrana celular.....	25
Figura 4	Esquema resumido das vias de atuação direta e indireta dos radicais livres.....	26
Figura 5	Metabolização da glicose.....	28
Figura 6	Glutamina.....	30
Figura 7	Arginina.....	33
Figura 8	Relações metabólicas da arginina.....	35
Figura 9	Ornitina.....	36
Figura 10	Relações metabólicas da ornitina.....	37
Figura 11	Glutamina.....	38
Figura 12	Relação metabólica da glutamina.....	40
Figura 13	Glutamato.....	41
Figura 14	Relações metabólicas do glutamato.....	42
Figura 15	Alfa-cetoglutarato.....	43
Figura 16	Relações metabólicas do α -cetoglutarato.....	45
Figura 17	Lançadeira malato-aspartato.....	48
Figura 18	Relações metabólicas da ornitina α -cetoglutarato.....	49
Figura 19	Desenho esquemático do modelo de pinçamento arterial.....	56
Figura 20	Concentração de CPK (ui/l) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h. S 0: subgrupo Sham 0h. S 6: subgrupo Sham 6h. S 6,5: subgrupo Sham 6,5h.....	66
Figura 21	Concentração de LDH (ui/l) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h. S 0: subgrupo Sham 0h.S 6: subgrupo Sham 6h. S 6,5: subgrupo Sham 6,5h.....	67
Figura 22	Concentração da glicose (mg/dl) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h. S 0: subgrupo Sham 0h. S 6: subgrupo Sham 6h. S 6,5: subgrupo Sham 6,5h.....	68
Figura 23	Concentração da G6PDH (μ mol/g) no tecido, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h. S 0: subgrupo Sham 0h.S 6: subgrupo Sham 6h. S 6,5: subgrupo Sham 6,5h.....	69
Figura 24	Concentração do piruvato (μ mol /ml) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h. S 0: subgrupo Sham 0h.S 6: subgrupo Sham 6h. S 6,5: subgrupo Sham 6,5h.....	70
Figura 25	Concentração do piruvato (μ mol/g) no tecido, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h. S 0: subgrupo Sham 0h. S 6: subgrupo Sham 6h. S 6,5: subgrupo Sham 6,5h.....	71

Figura 26	Concentração do lactato ($\mu\text{mol /ml}$) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h. S 0: subgrupo Sham 0h. S 6: subgrupo Sham 6h. S 6,5: subgrupo Sham 6,5h.....	72
Figura 27	Concentração do lactato ($\mu\text{mol /g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h S 0: subgrupo Sham 0h. S 6: subgrupo Sham 6h. S 6,5: subgrupo Sham 6,5h.....	73
Figura 28	Concentração do TBARS ($\mu\text{mol /ml}$) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h. S 0: subgrupo Sham 0h. S 6: subgrupo Sham 6h. S 6,5: subgrupo Sham 6,5h.....	74
Figura 29	Concentração do TBARS ($\mu\text{mol /g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h. S 0: subgrupo Sham 0h. S 6: subgrupo Sham 6h. S 6,5: subgrupo Sham 6,5h.....	75
Figura 30	Concentração da glutationa ($\mu\text{mol /ml}$) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h. S 0: subgrupo Sham 0h. S 6: subgrupo Sham 6h. S 6,5: subgrupo Sham 6,5h.....	76
Figura 31	Concentração da glutationa ($\mu\text{mol /g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h. S 0: subgrupo Sham 0h. S 6: subgrupo Sham 6h. S 6,5: subgrupo Sham 6,5h.....	77
Figura 32	Concentração da CPK (ui/l) no plasma, comparando-se os subgrupos S 6 X IC 6; S 6 X I α 6 e IC 6 X I α 6 – S 6: subgrupo Sham 6h. IC 6: subgrupo isquemia 6h + caseinato. I α 6: subgrupo isquemia 6h + OKG.....	78
Figura 33	Concentração da LDH (ui/l) no plasma, comparando-se os subgrupos S 6 X IC 6; S 6 X I α 6 e IC 6 X I α 6 – S 6: subgrupo Sham 6h. IC 6: subgrupo isquemia 6h + caseinato. I α 6: subgrupo isquemia 6h + OKG.....	79
Figura 34	Concentração da glicose (mg/dl) no plasma, comparando-se os subgrupos S 6 X IC 6; S 6 X I α 6 e IC 6 X I α 6 – S 6: subgrupo Sham 6h. IC 6: subgrupo isquemia 6h + caseinato. I α 6: subgrupo isquemia 6h + OKG.....	80
Figura 35	Concentração da G6PDH ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos S 6 X IC 6; S 6 X I α 6 e IC 6 X I α 6 – S 6: subgrupo Sham 6h. IC 6: subgrupo isquemia 6h + caseinato. I α 6: subgrupo isquemia 6h + OKG.....	81
Figura 36	Concentração do piruvato ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, comparando-se os subgrupos S 6 X IC 6; S 6 X I α 6 e IC 6 X I α 6 – S 6: subgrupo Sham 6h. IC 6: subgrupo isquemia 6h + caseinato. I α 6: subgrupo isquemia 6h + OKG.....	82
Figura 37	Concentração do piruvato ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos S 6 X IC 6; S 6 X I α 6 e IC 6 X I α 6 – S 6: subgrupo Sham 6h. IC 6: subgrupo isquemia 6h + caseinato. I α 6: subgrupo isquemia 6h + OKG.....	83
Figura 38	Concentração do lactato ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, comparando-se os subgrupos S 6 X IC 6; S 6 X I α 6 e IC 6 X I α 6 – S 6: subgrupo Sham 6h. IC 6: subgrupo isquemia 6h + caseinato. I α 6: subgrupo isquemia 6h + OKG.....	84
Figura 39	Concentração do lactato ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos S 6 X IC 6; S 6 X I α 6 e IC 6 X I α 6 – S 6: subgrupo Sham 6h. IC 6: subgrupo isquemia 6h + caseinato. I α 6: subgrupo isquemia 6h + OKG.....	85

Figura 40	Concentração do TBARS ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, comparando-se os subgrupos S 6 X IC 6; S 6 X I α 6 e IC 6 X I α 6 – S 6: subgrupo Sham 6h.IC 6: subgrupo isquemia 6h + caseinato. I α 6: subgrupo isquemia 6h + OKG.....	86
Figura 41	Concentração do TBARS ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos S 6 X IC 6; S 6 X I α 6 e IC 6 X I α 6 – S 6: subgrupo Sham 6h.IC 6: subgrupo isquemia 6h + caseinato. I α 6: subgrupo isquemia 6h + OKG.....	87
Figura 42	Concentração da glutationa ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, comparando-se os subgrupos S 6 X IC 6; S 6 X I α 6 e IC 6 X I α 6 – S 6: subgrupo Sham 6h.IC 6: subgrupo isquemia 6h + caseinato. I α 6: subgrupo isquemia 6h + OKG.....	88
Figura 43	Concentração da glutationa ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos S 6 X IC 6; S 6 X I α 6 e IC 6 X I α 6 – S 6: subgrupo Sham 6h.IC 6: subgrupo isquemia 6h + caseinato. I α 6: subgrupo isquemia 6h + OKG.....	89
Figura 44	Concentração da CPK (ui/l) no plasma, comparando-se os subgrupos S 6,5 X RC 6,5, S 6,5 e R α 6,5 e RC 6,5 X R α 6,5. Onde S 6,5: subgrupo Sham 6,5h + caseinato. RC 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + caseinato. Subgrupo R α 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + OKG.....	90
Figura 45	Concentração da LDH (ui/l) no plasma, comparando-se os subgrupos S 6,5 X RC 6,5, S 6,5 e R α 6,5 e RC 6,5 X R α 6,5. Onde S 6,5: subgrupo Sham 6,5h + caseinato. RC 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + caseinato. Subgrupo R α 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + OKG.....	91
Figura 46	Concentração da glicose (mg/dl) no plasma, comparando-se os subgrupos S 6,5 X RC 6,5, S 6,5 e R α 6,5 e RC 6,5 X R α 6,5. Onde S 6,5: subgrupo Sham 6,5h + caseinato. RC 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + caseinato. Subgrupo R α 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + OKG.....	92
Figura 47	Concentração da G6PDH ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos S 6,5 X RC 6,5, S 6,5 e R α 6,5 e RC 6,5 X R α 6,5. Onde S 6,5: subgrupo Sham 6,5h + caseinato. RC 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + caseinato. Subgrupo R α 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + OKG.....	93
Figura 48	Concentração do piruvato ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, comparando-se os subgrupos S 6,5 X RC 6,5, S 6,5 e R α 6,5 e RC 6,5 X R α 6,5. Onde S 6,5: subgrupo Sham 6,5h + caseinato. RC 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + caseinato. Subgrupo R α 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + OKG.....	94
Figura 49	Concentração do piruvato ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos S 6,5 X RC 6,5, S 6,5 e R α 6,5 e RC 6,5 X R α 6,5. Onde S 6,5: subgrupo Sham 6,5h + caseinato. RC 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + caseinato. Subgrupo R α 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + OKG.....	95

Figura 50	Concentração do lactato ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, comparando-se os subgrupos S 6,5 X RC 6,5, S 6,5 e R α 6,5 e RC 6,5 X R α 6,5. Onde S 6,5: subgrupo Sham 6,5h + caseinato. RC 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + caseinato. Subgrupo R α 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + OKG.....	96
Figura 51	Concentração do lactato ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos S 6,5 X RC 6,5, S 6,5 e R α 6,5 e RC 6,5 X R α 6,5. Onde S 6,5: subgrupo Sham 6,5h + caseinato. RC 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + caseinato. Subgrupo R α 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + OKG.....	97
Figura 52	Concentração do TBARS ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, comparando-se os subgrupos S 6,5 X RC 6,5, S 6,5 e R α 6,5 e RC 6,5 X R α 6,5. Onde S 6,5: subgrupo Sham 6,5h + caseinato. RC 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + caseinato. Subgrupo R α 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + OKG.....	98
Figura 53	Concentração do TBARS ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos S 6,5 X RC 6,5, S 6,5 e R α 6,5 e RC 6,5 X R α 6,5. Onde S 6,5: subgrupo Sham 6,5h + caseinato. RC 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + caseinato. Subgrupo R α 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + OKG.....	99
Figura 54	Concentração da glutathiona ($\mu\text{mol/ml}$) no tecido, comparando-se os subgrupos S 6,5 X RC 6,5, S 6,5 e R α 6,5 e RC 6,5 X R α 6,5. Onde S 6,5: subgrupo Sham 6,5h + caseinato. RC 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + caseinato. Subgrupo R α 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + OKG.....	100
Figura 55	Concentração da glutathiona ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos S 6,5 X RC 6,5, S 6,5 e R α 6,5 e RC 6,5 X R α 6,5. Onde S 6,5: subgrupo Sham 6,5h + caseinato. RC 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + caseinato. Subgrupo R α 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + OKG.....	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-PG	6-fosfogluconato
ADN	Ácido desoxirribonucléico
ADP	Adenosina difosfatada
ARN	Ácido ribonucléico
ATP	Adenosina difosfatada
CO ₂	Dióxido de carbono
CPK	Creatina fosfoquinase
DP	Erro padrão
g	Gramma
G-6-PDH	Glicose-6-fosfato-desidrogenase
GS	Glutaciona reduzida
GS·	Glutaciona reduzida com radical livre
GSH	Glutaciona
GSSG	Glutaciona oxidada
H ⁺	Íon hidrogênio
H ₂ O	Protóxido de hidrogênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCO ₃ ⁻	Íon bicarbonato
HK	Hexoquinase
l	Litro
LDH	Desidrogenase láctica
LE	Laparotomia exploradora
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada (forma reduzida)
NH ₃	Amônia
NH ₄	Amônia
NH ₄ ⁺	Íon amônio
O ⁻	Oxigênio univalente
OAA	Oclusão
OH ⁻	Radical hidroxila
OKG	Ornitina α-cetoglutarato
p	Significância estatística
pH	Grau de acidez ou alcalinidade de um solução
Pi	Fósforo inorgânico
R·	Radical livre
ROH	Radical hidroxilado
ROOH	Radical hidroperóxido
T-BARS	Ácido tiobarbitúrico
UFC	Universidade Federal do Ceará
ui	Unidades
Vit. E	Vitamina E; tocoferol
Vit. E·	Vitamina E com radical livre
α KG	alfa-cetoglutarato
μmol	Micromol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	OBJETIVO.....	50
2.1	Objetivo geral.....	50
2.2	Objetivo específico.....	50
3	MÉTODOS.....	51
3.1	Tipo de estudo.....	51
3.2	Local.....	51
3.3	Amostra.....	51
3.4	Grupos experimentais.....	51
3.5	Cronograma do procedimento cirúrgico por grupos.....	52
3.5.1	Grupo SHAM.....	52
3.5.2	Grupo isquemia.....	53
3.5.3	Grupo isquemia-reperfusão.....	53
3.5.4	Descrição do cronograma.....	53
3.6	Modelo experimental – procedimento cirúrgico.....	54
3.6.1	Pré-operatório.....	54
3.6.2	Anestesia.....	54
3.6.3	Operação.....	54
3.6.4	Procedimento cirúrgico.....	55
3.7	Análises enzimáticas	57
3.7.1	Tratamento das amostras musculares.....	57
3.7.2	Princípios básicos de análise enzimática.....	58
3.7.3	Dosagem da creatina fosfoquinase.....	58
3.7.4	Dosagem da desidrogenase láctica.....	59
3.7.5	Dosagem da glicose.....	60
3.7.6	Dosagem da concentração das Substâncias Reagentes do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	60
3.7.7	Dosagem da concentração de glutationa.....	61
3.7.8	Dosagem da concentração de lactato.....	62
3.7.9	Dosagem da concentração de piruvato.....	63
3.8	Estatística.....	64
4	RESULTADOS.....	65
4.1	Efeitos do procedimento cirúrgico sobre os parâmetros metabólicos do grupo SHAM.....	65
4.1.1	CPK plasmática.....	65
4.1.2	LDH plasmática.....	66
4.1.3	Glicose plasmática.....	67
4.1.4	G6PDH tecidual.....	68
4.1.5	Piruvato plasmático.....	69
4.1.6	Piruvato tecidual.....	70
4.1.7	Lactato plasmático.....	71
4.1.8	Lactato tecidual.....	72
4.1.9	TBARS plasmático.....	73
4.1.10	TBARS teciduais.....	74

4.1.11	Glutaciona plasmática.....	75
4.1.12	Glutaciona tecidual.....	76
4.2	Efeitos da reperfusão sobre os parâmetros metabólicos da isquemia.....	77
4.2.1	CPK plasmática.....	77
4.2.2	LDH plasmática.....	78
4.2.3	Glicose plasmática.....	80
4.2.4	G6PDH tecidual.....	81
4.2.5	Piruvato plasmático.....	82
4.2.6	Piruvato tecidual.....	83
4.2.7	Lactato plasmático.....	84
4.2.8	Lactato tecidual.....	85
4.2.9	TBARS plasmáticas.....	86
4.2.10	TBARS teciduais.....	87
4.2.11	Glutaciona plasmática.....	88
4.2.12	Glutaciona tecidual.....	89
4.3	Efeitos da isquemia e da isquemia pré-tratada com OKG sobre os parâmetros metabólicos estudados.....	90
4.3.1	CPK plasmática.....	90
4.3.2	LDH plasmática.....	91
4.3.3	Glicose plasmática.....	92
4.3.4	G6PDH tecidual.....	93
4.3.5	Piruvato plasmático.....	94
4.3.6	Piruvato tecidual.....	95
4.3.7	Lactato plasmático.....	96
4.3.8	Lactato tecidual.....	97
4.3.9	TBARS plasmático.....	98
4.3.10	TBARS tecidual.....	99
4.3.11	Glutaciona plasmática.....	100
4.3.12	Glutaciona tecidual.....	101
5	DISCUSSÃO.....	102
6	CONCLUSÕES.....	110
	REFERÊNCIAS.....	111
	APÊNDICE.....	117
	ANEXO.....	118

1 INTRODUÇÃO

A oclusão arterial aguda (OAA) é a mais comum urgência vascular, com elevada incidência de morbi-mortalidade. Estima-se que a incidência da OAA não traumática seja em torno de 17/100.000 habitantes, e esse número tende a elevar-se devido ao aumento da longevidade da população e ao aumento da prevalência da doença aterosclerótica. (DAVIES *et al.*, 1997).

A oclusão súbita de uma artéria leva a desequilíbrio circulatório do território por ela irrigado, resultando em isquemia de intensidade variável. A falha no diagnóstico médico e o retardo no tratamento, ou a inadequação do mesmo, dão início a uma seqüência que pode resultar em perda de órgão, membro, alterações funcionais importantes e, não raramente, morte do paciente.(HAIMOVICI, 1960).

Haimovici (1960,1989) estudando casos de tromboembolismo arterial observou que a reperfusão muscular pode desencadear alterações metabólicas tão ou mais graves que a própria isquemia. Estas alterações compõem uma síndrome metabólica, dita mionefropática, que ocorre em 36,7% dos casos em que o êmbolo está alojado na aorta abdominal; em 9,5% dos casos em que o êmbolo está alojado na artéria ilíaca comum e em 6,3% dos casos em que o êmbolo está alojado na artéria femoral. Desta feita concluiu que quanto maior a massa muscular envolvida, maior tendência a ocorrer o desenvolvimento da síndrome.

Modelos experimentais em animais foram desenvolvidos como objetivo de melhor estudar a fisiopatologia da isquemia-reperfusão, bem como para o teste de condutas terapêuticas.

Vários destes modelos experimentais de isquemia e reperfusão do músculo esquelético estão descritos na literatura: músculo grácil de cães (KUZON JUNIOR, *et al.*, 1986), músculo cremáster de ratos (SUVAL *et al.*, 1987), músculo da pata traseira do cão (IANA; LAUGHLIN, 1974), músculo membro pélvico isolado do rato (SEXTON; KORTIUS; LAUGHIN, 1990), e modelo do torniquete aplicado à raiz do membro pélvico de rato.(ELY *et al.*, 2000).

Nestes modelos, foram avaliados músculos de características metabólicas diferentes, ou seja, músculos aeróbicos de contração lenta e anaeróbicos de contração rápida, os quais, submetidos à isquemia e reperfusão, apresentaram resultados conflitantes em relação à resistência, embora essas lesões pudessem ser

agravadas pela reperfusão, independentemente das características metabólicas do músculo.

A oclusão de uma artéria em ratos, desencadeia de imediato, intenso vasoespasmó distal, as vezes associado à trombose secundária proximal e distal. Em função da estase e perda da função endotelial, uma eventual trombose secundária pode se estender e ocluir a circulação colateral, agravando a isquemia. Paralelamente, pode ocorrer trombose venosa profunda, em decorrência do fluxo venoso lento e da hipóxia, o que piora a perfusão tecidual.(HAMMERSEN, 1989).

A intensidade da isquemia dependerá do nível da oclusão, da circulação colateral e do grau de demanda de oxigênio dos tecidos envolvidos. Nesse sentido, o tempo de isquemia é um fator crucial na determinação da intensidade das lesões e na viabilidade do membro.(MAFFEI, 2002).

Blaisdell (2002) diz que o mais preciso modelo para a obtenção de isquemia muscular é o de reimplante de membro em rato, e o tempo crítico de tolerância tecidual varia de quatro horas a quatro dias em normotermia. O tecido muscular resiste, em média, a quatro horas, o nervo periférico a oito horas, o tecido adiposo a treze horas, a pele a vinte e quatro horas e os ossos a noventa e seis horas aproximadamente.

É particularmente difícil dizer quando o músculo morre, devido às mudanças macro e microscópicas serem mínimas por muitas horas após a morte do tecido muscular. Técnicas espectrofotométricas podem permitir tal documentação. O estudo de Belkin *et al.* (1988) induzindo isquemia pelo modelo do torniquete em ratos e através de análise espectrofotométrica, comprovou lesão de células musculares após três horas de isquemia. Seguidas quatro e cinco horas a injúria tornou-se ainda mais grave, até que após seis horas lesão era grave com menos de 3% de controle da atividade funcional.

No início do período de isquemia, as alterações bioquímicas das funções celulares básicas são reversíveis, no entanto, quando essa isquemia se prolonga, outra seqüência de reações ocorre como conseqüência da falência energética da célula.(BELKIN *et al.*,1988; PERRY, 1988).

Em até 2 horas de isquemia, o metabolismo anaeróbio prevalece, levando ao aumento do lactato e fosfato inorgânico e à redução do pH, do trifosfato de adenosina (ATP) e da creatina em 40% do normal. Após 3 horas de isquemia, os

níveis de ATP reduzem-se drasticamente e há piora da acidose. (LEHNINGER *et al.*, 2002).

Acredita-se que a reperfusão muscular feita até esse período (em até 3 horas de isquemia) seja capaz de restabelecer os níveis de ATP, sem gerar lesões teciduais. O intervalo de tempo para que esgotem os estoques de ATP é impreciso, mas está demonstrado que períodos de isquemia superiores a 5 horas, geralmente, produzem lesões irreversíveis. (FERRARI, 2001; PERRY; SHIRES III; ALBERT, 1984).

A respiração aeróbica celular, denominada fosforilação oxidativa é o primeiro ponto de ataque da isquemia e hipóxia. A equação da respiração normal pode ser resumida da seguinte forma (LEHNINGER *et al.*, 2002):



Quando a tensão de oxigênio dentro das células diminui, ocorre interrupção da fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, cessa a geração de ATP. Para manter sua atividade, a célula passa a fazer a glicólise anaeróbica, gerando 3 moléculas de ATP por unidade glicosil do glicogênio com subseqüente geração de lactato. Esse glicogênio é rapidamente depletado. (IMER, 1983).

O ATP pode ser gerado, também anaerobicamente a partir do fosfato de creatina, pela ação da enzima creatina fosfoquinase (CPK). Nessas condições anaeróbicas existe no músculo esquelético acúmulo de ácido láctico e fosfatos inorgânicos com conseqüente queda no pH intracelular. (LEHNINGER *et al.*, 2002).

Pela falta de ATP existe aumento do sódio intracelular e aumento do potássio extracelular levando a edema celular, com subseqüente ruptura dos lisossomos, liberação das proteases e digestão dos componentes celulares (OCK; MAJNO, 1969). Estas lesões celulares no músculo, apresentarão diferentes intensidades conforme o tipo de fibra muscular. (LINDSAY *et al.*, 1990).

As fibras musculares podem ser de dois tipos básicos, com diferenças em sua vulnerabilidade à isquemia. Os termos fibra branca e vermelha classificam-nas em relação à concentração de mioglobina, a maior parte dos músculos contém fibras de ambos os tipos. Entretanto certas fibras musculares como as do compartimento anterior da perna são tipo I ou vermelhas de contração lenta, contrariamente às do compartimento posterior, brancas de contração rápida ou tipo II. As fibras de tipo I apresentam metabolismo predominante de oxidação de triglicerídios e são mais

sensíveis à isquemia, enquanto as de tipo II usam o metabolismo anaeróbico do glicogênio como fonte de energia.(LINDSAY *et al.*, 1990).

Apesar de essencial para minorar o dano da isquemia, a reperfusão de um músculo esquelético pode induzir infiltração neutrofílica, formação de edema intersticial, compressão e disfunção microvascular, até necrose muscular. (GUTE *et al.*, 1998).

A reperfusão de um tecido com sangue normoxêmico induz as alterações fisiopatológicas supracitadas, porém numa reperfusão com sangue anoxêmico não produz mudanças significativas no tecido e a introdução limitada do oxigênio molecular durante a primeira hora de reperfusão diminui significativamente a extensão da necrose muscular.(EARSE; HUMPHREY; CHAIN, 1973; WRIGHT *et al.*, 1988).

Estas observações são consistentes com a visão de que eventos citotóxicos iniciados no começo da reperfusão envolvem a formação de metabólitos altamente reativos do oxigênio molecular, sendo os mais importantes o oxigênio univalente ($O^{\cdot -}$) e a hidroxila ($OH^{\cdot -}$). (McCORD, 1985; YOKOYAMA *et al.*,1990; ARKS; GRANGER,1983).

Existe uma ampla variedade de fontes biológicas potenciais para metabólitos citotóxicos do oxigênio: a enzima xantina oxidase, a ativação de leucócitos, a cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, o metabolismo do ácido aracdônico e a autooxidação da catecolamina. Destas a xantina oxidase e a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase leucocitária têm recebido mais atenção nas pesquisas de isquemia-reperfusão.(YOKOYAMA *et al.*,1990; ARKS; GRANGER ,1983; ADAMBI; SKALAK, 2000; DA SILVEIRA; YOSHIDA, 2004).

Em situações fisiológicas, a NADPH é a aceptora final de elétrons na cadeia respiratória, onde se terá a água como produto final e a participação da enzima xantina desidrogenase catalisando essa reação.(DA SILVEIRA; YOSHIDA, 2004).

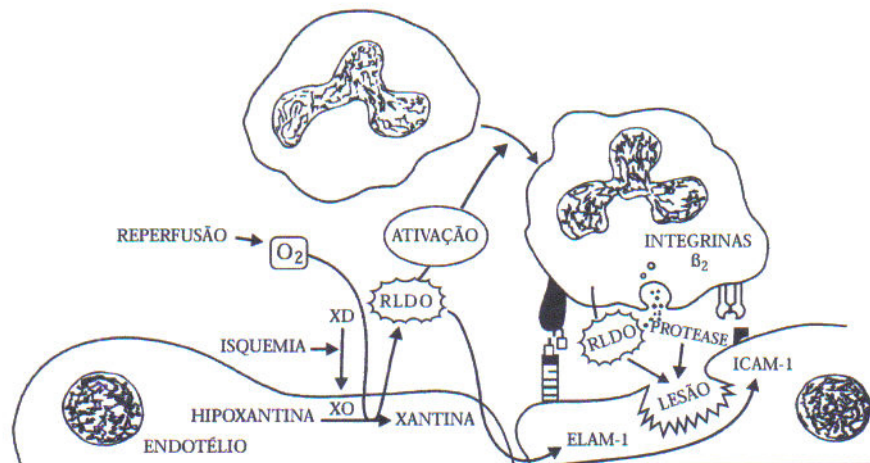


Figura 1 - Eventos bioquímicos, interação de neutrófilos ativados com o endotélio e mecanismos de lesão na isquemia e reperfusão

Fonte: Da Silveira e Yoshida (2004)

Nos tecidos pós-isquemia, há o acúmulo da enzima xantina oxidase, essa enzima utiliza o oxigênio molecular, disponível após a reperfusão, como aceptor final de elétrons. Nessa reação, há produção de moléculas de oxigênio univalente, que é uma forma química extremamente instável. A partir do oxigênio univalente, por meio de reações químicas secundárias, são produzidos os radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroxila; esses, por sua vez, são os principais radicais livres responsáveis por iniciar a peroxidação lipídica (Figura 3), culminando com a desintegração das membranas e conseqüente ruptura e morte celular.(PERRY, 1988; FERRARI, 2001; PERRY; SHIRES III; ALBERT, 1984; GUTE *et al.*, 1998).

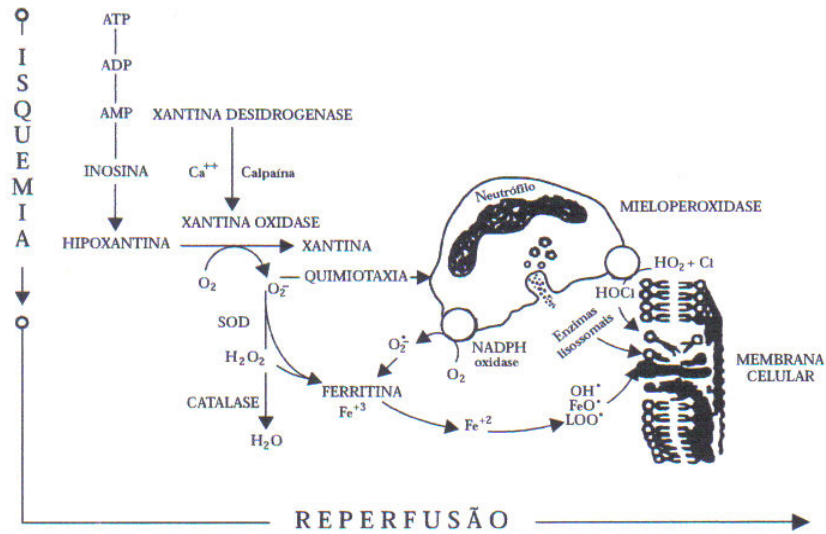


Figura 2 - Eventos bioquímicos da isquemia e reperfusão, ativação de neutrófilos e mecanismos de lesão
 Fonte: Da Silveira e Yoshida (2004)

O radical OH^\bullet parece ser um dos principais envolvidos na reação de peroxidação lipídica, dada a sua capacidade de redução de átomos de hidrogênio das cadeias laterais de aminoácidos. (LINDSAY *et al.*, 1990; GUTE *et al.*, 1998).

A peroxidação lipídica é considerada como um dos principais mecanismos de lesão celular em organismos submetidos a estresse oxidativo. Os lipídios das membranas contêm uma grande quantidade de cadeias laterais de ácidos graxos polinsaturados. Sob certas condições, esses ácidos graxos podem sofrer oxidação e formar peróxidos de lipídios. Os radicais livres formados durante o processo de isquemia e reperfusão, reagem com as membranas celulares fosfolípídicas, iniciando uma série de reações denominadas peroxidação lipídica (SUVAL *et al.*, 1987; FERRARI, 2001; EARSE; HUMPHREY; CHAIN, 1973), mostradas na figura 3.

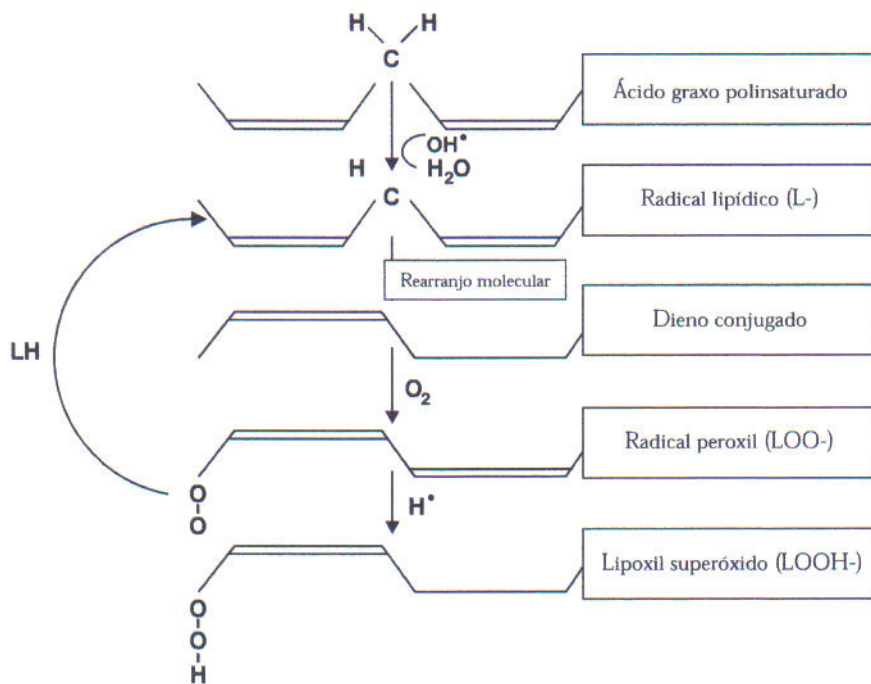


Figura 3 - Representação esquemática da peroxidação lipídica dos ácidos graxos da membrana celular

Fonte: Da Silveira e Yoshida (2004)

Nota: O radical livre OH^\bullet retira um hidrogênio do ácido graxo, dando origem ao radical lipídico. Este, por ser instável, sofre um rearranjo molecular e forma um dieno conjugado, o qual pode reagir com uma molécula de oxigênio e formar um radical peróxido. O radical peróxido retira um hidrogênio do ácido graxo, dando origem a uma reação em cadeia.

Quando o fluxo sanguíneo é restaurado, essas substâncias, a acidose, a hiperpotassemia e/ou neutrófilos podem lesar diretamente o trato gastro-intestinal, pulmões, coração e o rim. (DAVIES *et al.*, 1997; IANA; LAUGHLIN, 1974).

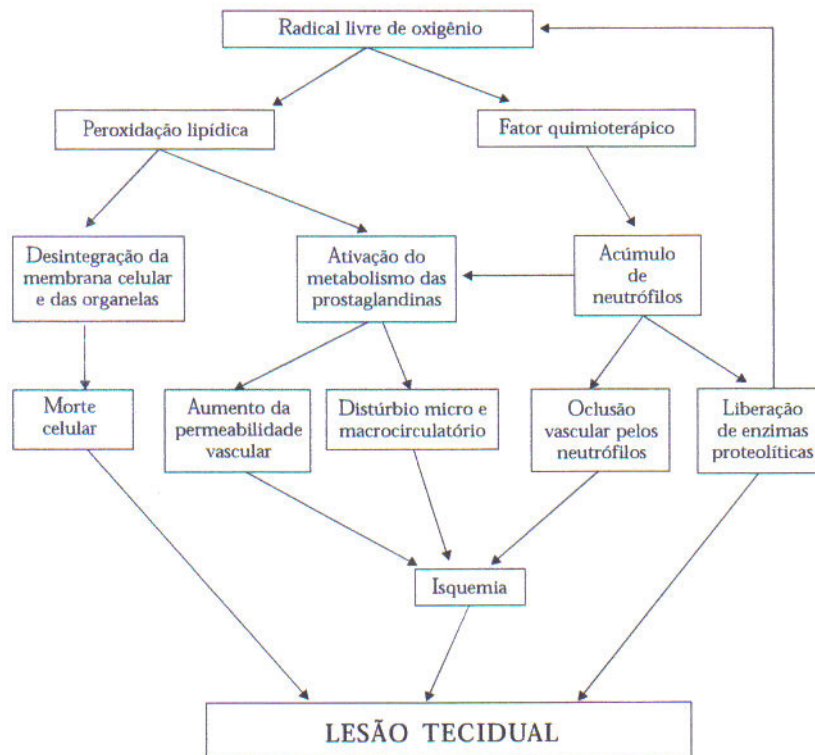


Figura 4 - Esquema resumido das vias de atuação direta e indireta dos radicais livres
 Fonte: Da Silveira e Yoshida (2004)

Os sistemas biológicos oferecem condições favoráveis para ocorrência de reações de caráter oxidativo, devido à existência de lipídios insaturados, nas membranas celulares, e pela abundância de reações oxidativas que ocorrem durante o metabolismo normal. (LEHNINGER *et al.*, 2002; FERRARI, 2001; PERRY; SHIRES III; ALBERT, 1984).

A susceptibilidade de uma célula ou de um tecido ao estresse oxidativo depende de um grande número de fatores que incluem a disponibilidade de antioxidantes e a capacidade de inativação ou eliminação dos produtos oxidados formados. (LEHNINGER *et al.*, 2002; FERRARI, 2001; PERRY; SHIRES III; ALBERT, 1984).

O estresse oxidativo tem sido definido como um distúrbio no estado de equilíbrio, no sistema de pró-oxidantes e antioxidantes, nas células intactas. Esta definição implica no fato de que a célula deve ter um sistema onde exista um equilíbrio entre a produção e a eliminação de espécies reativas de oxigênio durante o metabolismo aeróbico, normal. Quando existe maior ocorrência de eventos oxidativos, o sistema pende para o lado pró-oxidativo, o que pode afetar os níveis de

antioxidantes como a glutathiona, tendo, como resultado final, o dano oxidativo em lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. A continuação deste processo pode levar à morte celular.(JORDÃO JUNIOR *et al.*, 1998).

A eficácia do sistema antioxidante depende muito de qual o tipo de molécula é a geradora do estresse oxidativo e da localização intracelular ou extracelular dessa molécula. Como exemplo, sabe-se que o dano à membrana celular pode ser mais eficazmente prevenido pela glutathiona, que reage com radicais peroxila e hidroxila, do que pelos carotenóides, que atuam reagindo com o oxigênio univalente. (JORDÃO JUNIOR *et al.*, 1998).

Visando quantificar a lesão tecidual estudos histológicos e bioquímicos têm sido realizados e múltiplas substâncias vem sendo pesquisadas como marcadores bioquímicos de isquemia e reperfusão.

A glicose tem seis átomos de carbono e sua metabolização aeróbica resulta em duas moléculas de piruvato, cada uma com três átomos de carbono. Ocorre em uma seqüência de dez passos (a via glicolítica); os cinco primeiros constituem a chamada “fase preparatória”. Nesta fase o tecido investe energia, dois ATP por molécula de glicose, para a transformação da glicose em gliceraldeído-3-fosfato. O ganho energético da glicólise advém na segunda fase dita “de pagamento” com a transformação do gliceraldeído-3-fosfato em duas moléculas de piruvato e com o rendimento de quatro moléculas de ATP para cada gliceraldeído-3-fosfato.(LEHNINGER *et al.*, 2002).

Sob condições aeróbicas o piruvato é oxidado com perda de seu grupo carboxila, sob a forma de CO₂ e liberação do grupo acetila da acetil-coenzima A. Esta última é totalmente oxidada até CO₂ pelo ciclo do ácido tricarboxílico ou de Krebs. A segunda rota para o metabolismo do piruvato é sua redução a lactato (forma dissociada do ácido láctico) através da chamada via da fermentação do ácido láctico, que ocorre sob condições anaeróbicas (LEHNINGER *et al.*, 2002), como apresentado na figura 5.

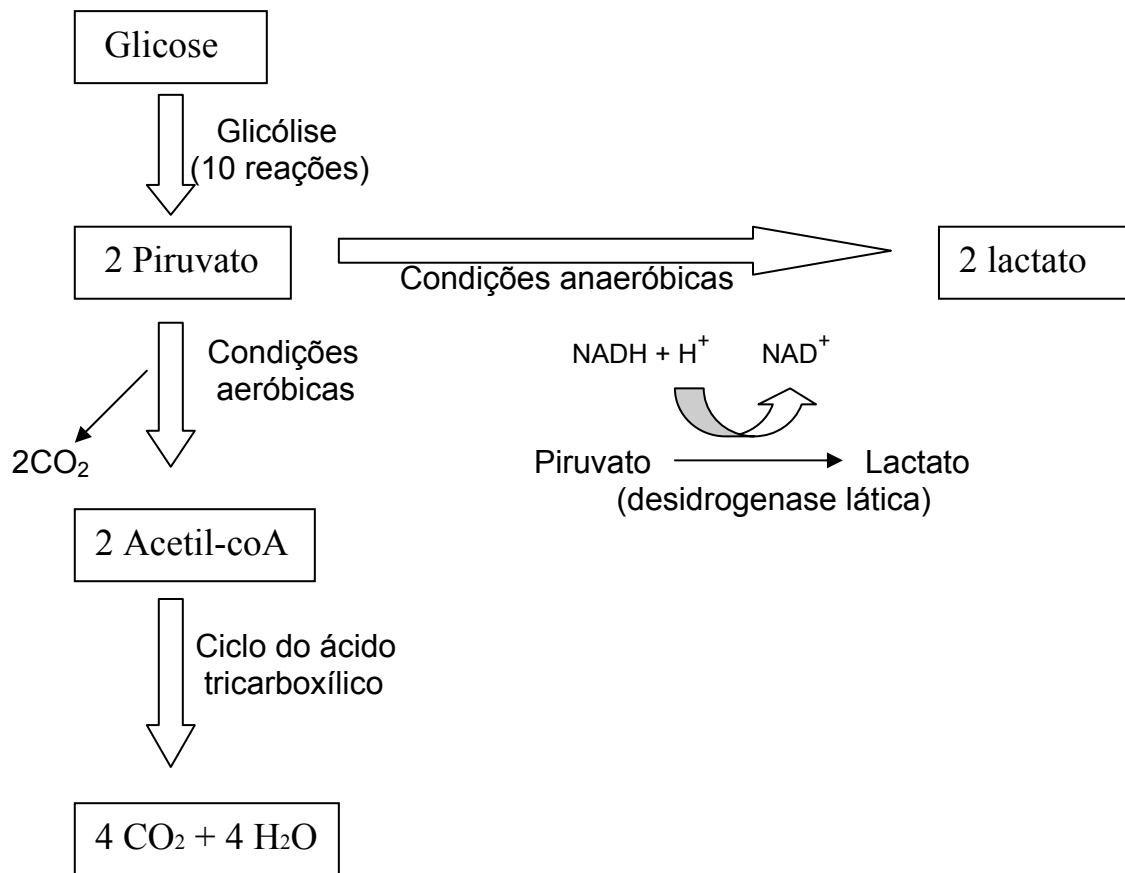


Figura 5 - Metabolização da glicose

Em anaerobiose o NADH gerado pela glicólise não pode ser reoxidado pelo O₂. A incapacidade de regenerar o NADH em NAD⁺ deixaria a célula sem receptor de elétrons para a oxidação do gliceraldeído-3-fosfato e as reações liberadoras de energia da glicose cessariam. O NADH precisa, portanto ser regenerado por outra via, a via da fermentação do ácido láctico, onde uma molécula de glicose é convertida em duas de lactato em presença da desidrogenase láctica (LDH) com a geração de duas moléculas de ATP e uma de NAD⁺. (LEHNINGER *et al.*, 2002).

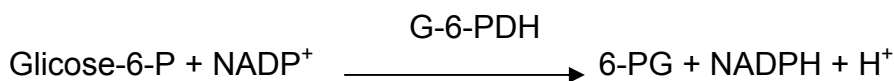
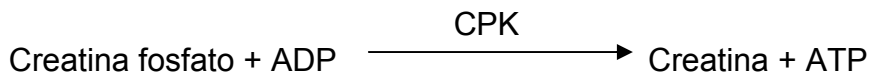
A célula muscular estoca glicogênio e fosfocreatina, esta última serve de fonte de fosfatos de alta energia para a síntese de ATP, enquanto a glicogenólise e glicólise estão estimuladas. Nesta célula existem moléculas com ligações de alta energia, como o fosfoenolpiruvato, que podem transferir seu componente de alta energia para outros compostos, objetivando a formação de ATP. (DEVLIN, 1997).

Inicialmente o fosfoenolpiruvato em presença de piruvato-quinase adiciona fosfato ao ADP que passa a ATP, esta reação, porém, consome 7,5kcal/mol e tem o piruvato como subproduto. Já na reação mediada pela creatino-fosfoquinase (CPK)

a creatina fosfato passa a creatina com a adição de um radical fosfato ao ADP, agora ATP e com consumo de 1,5kcal/mol. Outra reação com estas mesmas características é a conversão de glicose-6-fosfato à glicose em presença da enzima glicose-6-fosfatodesidrogenase, com consumo de 3,3kcal/mol e geração de ATP. (DEVLIN, 1997).

A CPK catalisa a reação entre creatina fosfato e adenosina difosfato (ADP) formando creatina e adenosina trifosfato (ATP).

Em seqüência, a glicose é fosforilada pelo ATP sob a ação da hexoquinase (HK) formando glicose-6-fosfato, que é oxidada a 6-fosfogluconato (6-PG) pela glicose-6-fosfato-desidrogenase (G-6-PDH) na presença de NADP^+ . Uma quantidade equimolar de NADP^+ é reduzida a NADPH.



O radical livre O^- gera OH^- e este último inicia a peroxidação das membranas celulares. Após múltiplas reações o produto final é o dialdeído malônico, sua dosagem mostra então o efeito oxidante destes radicais. O ácido tiobarbitúrico e as substâncias formadoras do ácido tiobarbitúrico (T-BARS), componentes da cadeia geradora do dialdeído malônico têm sido usados para quantificar laboratorialmente a isquemia.(SARDINHA, 1994).

Desde que o impacto biológico adverso dos radicais livres esteja estabelecido, existe, por conseqüência, a necessidade de bloquear seus efeitos deletérios. Múltiplos compostos podem atuar como antioxidantes, destes destaca-se a glutatona, com significativa ação antioxidante.(JORDÃO JUNIOR *et al.*, 1998).

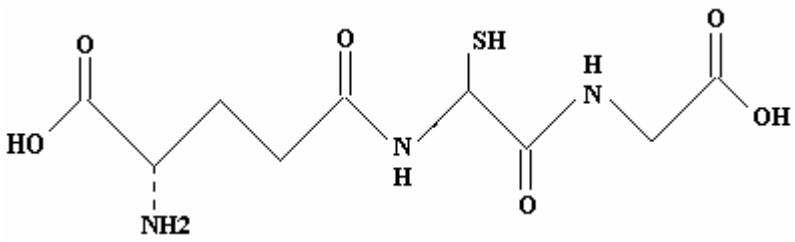
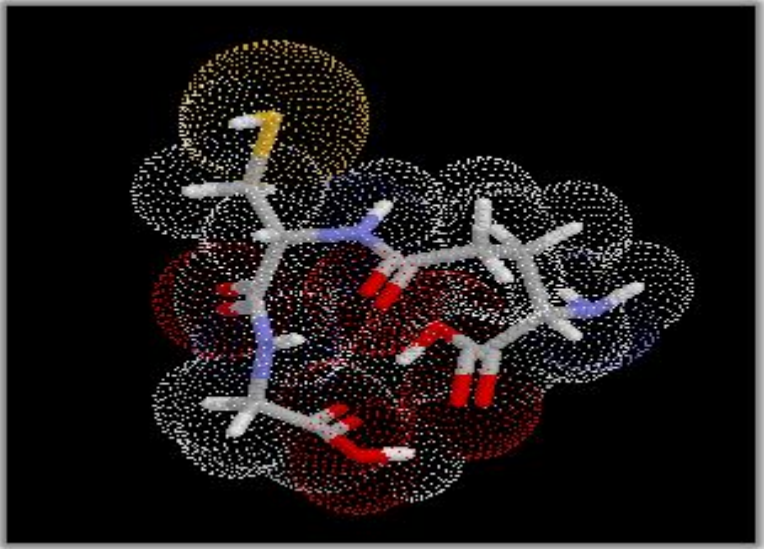
Nomenclatura	Glutationa
Símbolo	GSH
Nome químico	L-g-glutamil-L-cistenilglicina
Fórmula molecular	$C_{10}H_{17}N_3O_6S$
Estrutura Linear	
Estrutura Tridimensional	 <p>www.acetylcysteine.org/glutathione.htm</p>

Figura 6 - Glutationa

A glutationa , mostrada na figura 6, (GSH) é um tripeptídeo, contendo cisteína e é o tiol não protéico mais abundante nas células dos mamíferos.

Concentrações baixas de GSH têm sido reportadas em algumas doenças, como a AIDS, e estão associadas a um maior risco de estresse oxidativo e da ocorrência de infecções oportunistas. Este decréscimo da GSH pode refletir o aumento na produção de antioxidantes, num grau que excederia a capacidade de detoxificação da GSH.(BRAY; TAYLOR, 1993; MEISTER, 1995).

Quimicamente é um tripeptídeo composto por ácido glutâmico, cisteína e glicina e, por isso, é também conhecida por L-gama-glutamil-L-cisteinil-glicina. É curioso salientar que entre os dois primeiros resíduos de aminoácidos estabelece-se

uma ligação do tipo gama, fundamental para que não ocorra a degradação da glutathiona por parte de peptidases intracelulares.(KRETZSHMAR, 1996).

O núcleo do resíduo cistenilglicina da glutathiona está envolvido na sua função como antioxidante, mais especificamente como um redutor intracelular, sendo capaz, por exemplo, de reagir com um elétron não pareado de um radical livre, formando um radical GS·, que produz, por dimerização, o GSSG (glutathiona oxidada). O GSSG é, então, reduzido pela glutathiona-redutase, regenerando o GSH, num processo à custa do NADPH (KRETZSHMAR, 1996). A glutathiona-redutase, que regenera o GSH tem o NADPH como substrato.(KRETZSHMAR, 1996).

O fígado sintetiza a GSH, mas a GSH ingerida pode ser absorvida intacta no intestino delgado, sendo transportada, aumentando o GSH plasmático. A disponibilidade limitada do NADPH pode levar a aumento do GSSG e deixar as células mais sensíveis ao dano oxidativo.(SHAN; AW; JONES, 1990).

O processo pelo qual a glutathiona detoxifica hidroperóxidos é o seguinte:



A glutathiona (GSH) atua de maneira importante na proteção celular contra mudanças no quadro oxidativo. Entre as funções da GSH, na proteção contra a peroxidação lipídica, podem ocorrer três reações. Primeiro, a GSH é usada como substrato pela glutathiona-peroxidase, na eliminação de peróxidos.(JORDÃO JUNIOR *et al.*, 1998).

Segundo, a GSH reduz a forma oxidada da vitamina C, que assim pode atuar, mantendo a vitamina E na sua forma reduzida e funcional. Finalmente, a GSH-transferase pode detoxificar, através da glutathiona-S, aldeídos reativos (como o dialdeído malônico) que são gerados durante a peroxidação lipídica. Se, de fato, grande parte da ação da GSH é obtida pela indução de suas enzimas, é necessária a manutenção do nível de GSH para suportar a ação funcional destas enzimas (JONES *et al.*, 1995), variações nos níveis de glutathiona afetam diretamente a síntese de proteínas e de DNA. Oxidação ou depleção de GSH pode diminuir, ainda, a síntese protéica.

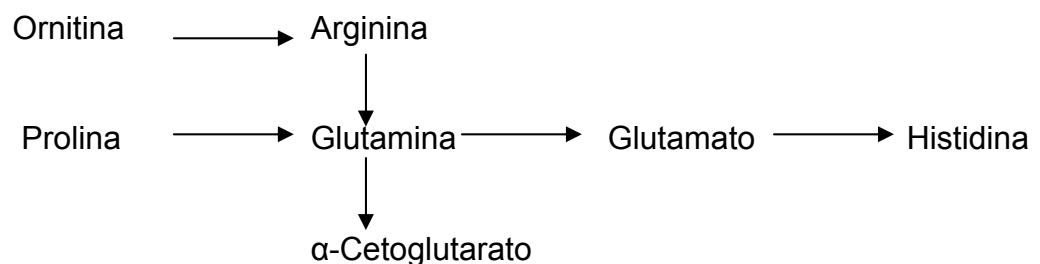
A GSH pode ser perdida de modo irreversível em situações de estresse oxidativo muito intenso, permanecendo na forma oxidada e não sendo novamente reduzida.(DE BANDT; CYNOBER, 1998).

Além dos antioxidantes já citados outras substâncias têm sido pesquisadas para uso como moduladores da resposta ao estresse oxidativo, destacam-se neste uso alguns aminoácidos com propriedades anabólicas.(DE BANDT; CYNOBER, 1998).

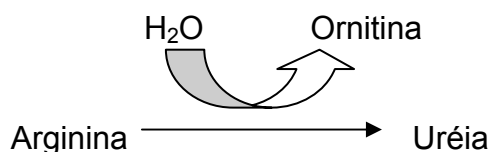
Além da importância nutricional da suplementação de aminoácidos, alguns estudos experimentais e clínicos, enfatizaram o papel de aminoácidos específicos como potenciais moduladores da resposta metabólica ao estresse. O interesse neste caso repousa sobre a quantidade de aminoácidos e a necessidade orgânica em situações críticas, além das propriedades anticatabólicas, ou anabólicas de alguns aminoácidos.(DE BANDT; CYNOBER, 1998).

De acordo com as vias bioquímicas e o estudo do balanço nitrogenado em indivíduos normais, foi formada a clássica distinção entre aminoácidos essenciais e não essenciais. Esta distinção não levou em conta, porém, o efeito da mudança nas prioridades do metabolismo do nitrogênio em situações de estresse, ou das propriedades farmacológicas de alguns aminoácidos, ou ainda as alterações relatadas em importantes funções metabólicas quando da diminuição de sua utilização pelo organismo.(DE BANDT; CYNOBER, 1998). O resultado final de um desequilíbrio do balanço anabolismo-catabolismo, com supremacia do segundo, pode ser parcialmente revertido com a administração exógena de aminoácidos, porém em doses muito maiores do que as nutracêuticas.(BASILE-FILHO *et al.*, 2001).

Durante a década de 80, estudos demonstraram propriedades anabólicas ou anticatabólicas para diversos aminoácidos, sozinhos ou em combinação, isto inclui aminoácidos de cadeias ramificadas como a arginina, a ornitina e, especialmente, a glutamina e seus produtos de transaminação: α -cetogluturato e glutamato. Todos esses aminoácidos mantêm estreita relação através de vias metabólicas de degradação, conforme o esquema abaixo.(LEHNINGER *et al.*, 2002).



A arginina e ornitina são intercambiáveis através do ciclo da uréia, suas principais características farmacológicas serão descritas a seguir.



Nomenclatura	Arginina
Símbolo	Arg ou R
Nome químico	Ácido (S)-2-Amino-5-guanidinovalérico
Classificação	Aminoácido polar básico
Estrutura Linear	<chem>NC(=O)NCCNC(=O)O</chem>
Estrutura Tridimensional	 www.search.com/reference/arginine

Figura 7 - Arginina

A arginina, mostrada na figura 7, é considerada não essencial para concluir o balanço nitrogenado positivo em humanos adultos saudáveis. É sabido que em certas circunstâncias como a imaturidade, a arginina torna-se essencial. Principalmente sintetizada a partir da citrulina no rim, a síntese da arginina tem sido demonstrada também como amplamente dependente da produção de citrulina no intestino, este último um subproduto do metabolismo da glutamina.(CYNOBER; LE BOUCHER; VASSON, 1995).

Uma relação direta tem sido demonstrada entre a disponibilidade de glutamina e a capacidade do intestino sintetizar citrulina e a subsequente produção renal de arginina (HOUDIJK *et al.*, 1994; WAKABAYASHI *et al.*, 1995). A arginina

apresenta interessantes propriedades farmacológicas que podem ser usadas em situações clínicas. Trabalhos experimentais têm demonstrado significativos efeitos da arginina no metabolismo do nitrogênio e na função imunológica. Isto pode ser explicado devido à potente atividade secretagoga deste aminoácido em várias glândulas endócrinas, particularmente afetando o hormônio do crescimento e a secreção de insulina. Devido ao seu papel como precursor da prolina e da poliamina, via ornitina, este aminoácido participa como substrato na síntese do óxido nítrico, participa da cadeia de formação do ácido clavulínico através do N-2-carboxietil arginina.(CYNOBER; LE BOUCHER; VASSON, 1995; HOUDIJK *et al.*, 1994; WAKABAYASHI *et al.*, 1995).

Estudos iniciais na cicatrização de feridas em roedores demonstraram que a suplementação dietética da arginina aumenta significativamente a síntese do colágeno e a força tensional da cicatriz (SEIFTER *et al.*, 1978). Finalmente, a importância da arginina na manutenção da troficidade intestinal pode ser mencionada. Por um lado um aumento no metabolismo da arginina, induzido pelo cortisol, resultando em prolina e poliamidas pôde ser demonstrado como um importante fato na adaptação dos enterócitos ao desmame.(FLYNN; WU, 1997).

As principais relações metabólicas da arginina estão evidenciadas na figura 8.

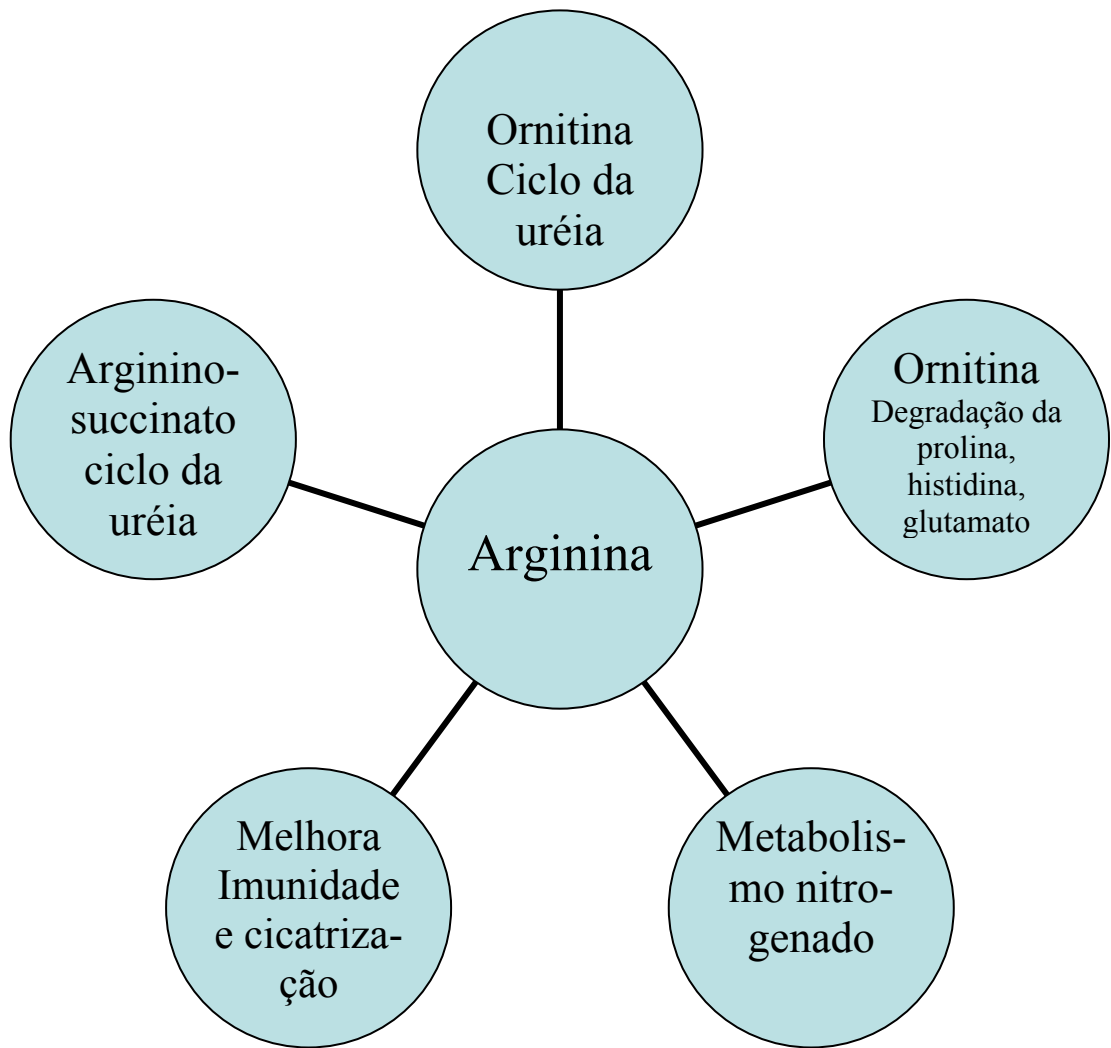


Figura 8 - Relações metabólicas da arginina

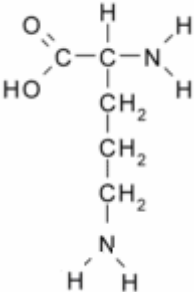
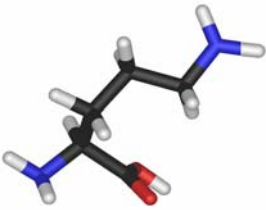
Nomenclatura	Ornitina
Símbolo	Org
Nome químico	Ácido (S)-2,5-Diaminopentanóico
Classificação	Aminoácido polar básico
Estrutura Linear	 <p>The linear structure shows the chemical formula of Ornithine. It consists of a central carbon atom bonded to a hydrogen atom (H) above, a carboxyl group (HO-C=O) to the left, and a nitrogen atom (N) to the right. The nitrogen atom is bonded to two hydrogen atoms (H). Below the central carbon is a chain of three methylene groups (CH₂-CH₂-CH₂), with a terminal nitrogen atom (N) bonded to two hydrogen atoms (H) at the bottom.</p>
Estrutura Tridimensional	 <p>A 3D ball-and-stick model of Ornithine. Carbon atoms are represented by grey spheres, hydrogen atoms by white spheres, oxygen atoms by red spheres, and nitrogen atoms by blue spheres. The model shows the spatial arrangement of the atoms in the molecule.</p> <p>www.search.com/reference/ornithine</p>

Figura 9 - Ornitina

A ornitina, mostrada na figura 9, intimamente associada à arginina no ciclo da uréia, apresenta-se simultaneamente como seu precursor e seu metabólito. A alta concentração de argininase no fígado, às vezes, impede a efetiva produção de arginina hepática.

O metabolismo da ornitina pode levar à citrulina e esta, ao final, pode ser usada na produção renal de arginina (CASTILLO *et al.*, 1995). A ornitina é um intermediário obrigatório na síntese de vários componentes da arginina, incluindo prolina e poliaminas, moléculas-chave na síntese do colágeno e proliferação celular. Participa ainda da formação dos alcalóides putressina e D-ornitina.(RAUL *et al.*, 1995).

As principais ações metabólicas da ornitina estão explicitadas na figura 10.

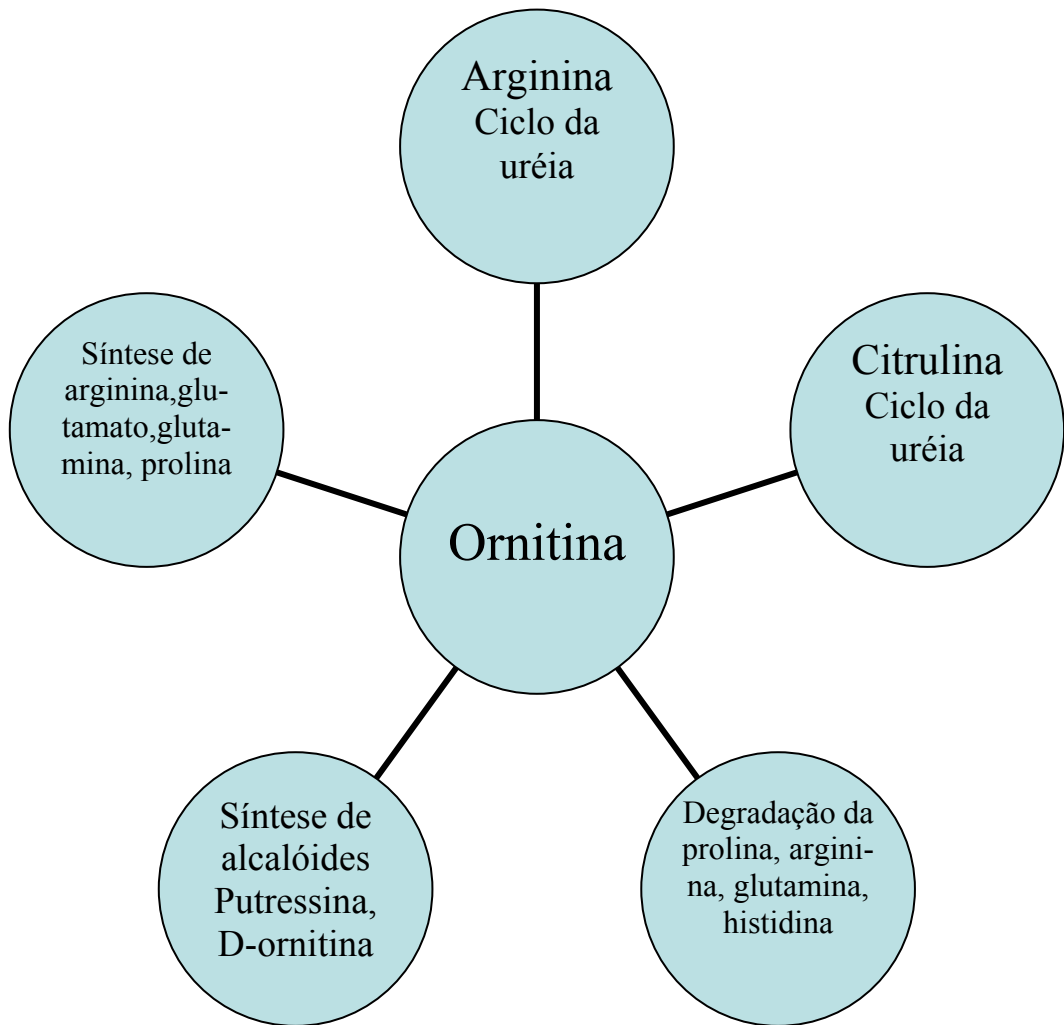
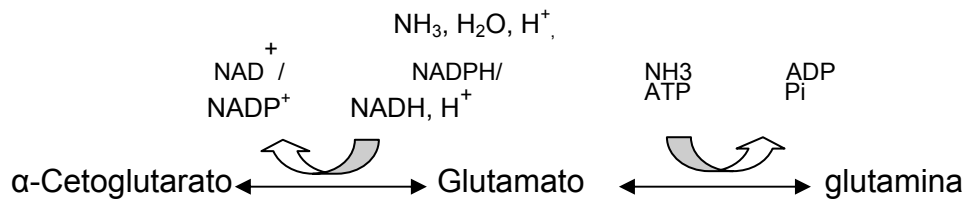
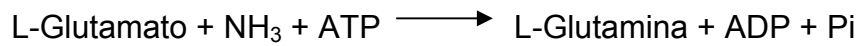
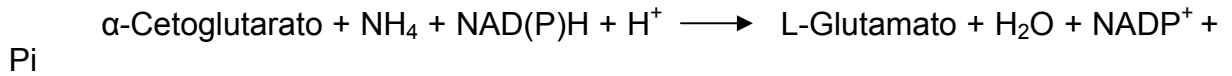


Figura 10 - Relações metabólicas da ornitina

A Glutamina, glutamato e o α -cetoglutarato convertem-se mutuamente através das vias de interconversão para transporte do grupamento amina:



Nomenclatura	Glutamina
Símbolo	Gln ou Q
Nome químico	Ácido 2-aminoglutarâmico
Classificação	Aminoácido polar neutro
Estrutura Linear	
Estrutura Tridimensional	<p style="text-align: center;">www.search.com/reference/glutamine</p>

Figura 11 - Glutamina

Originalmente reconhecida como não essencial, a glutamina, mostrada na figura 11, pode ser extensivamente sintetizada pelo organismo e é um dos mais abundantes aminoácidos livres nos tecidos orgânicos.

Em anos recentes esta visão “não essencial” tem sido questionada por estudos experimentais e clínicos; os quais demonstraram significativa tolerância em tecidos que continham glutamina durante situações de estresse, corroborando com a correlação entre queda da concentração muscular da glutamina e diminuição do percentual de síntese proteica.(NEWSHOMLE, 2001; CYNOBER, 1995).

A glutamina (Gln) tem funções metabólicas específicas e importantes, e é considerada um aminoácido condicionalmente essencial: quando há condições inflamatórias, como infecção ou ferimento ou no caso de quadros de doença com catabolismo (NEWSHOMLE, 2001). É o aminoácido livre mais abundante na circulação e nos espaços intracelulares, além de ser um precursor da síntese de aminoácidos, nucleotídeos, ácidos nucléicos, açúcares aminados, proteínas e muitas outras moléculas biologicamente importantes.(CYNOBER, 1995). Figura 12.

A glutamina é importante na gliconeogênese, síntese de uréia, homeostase do pH, neurotransmissão e diferenciação e crescimento celular. A glutamina é o principal substrato energético de células de proliferação rápida, como enterócitos intestinais e linfócitos ativados (CYNOBER, 1995), este aminoácido aumenta a resposta linfocítica à estimulação de mitógenos e alivia a bacteremia e a endotoxemia.(NEWSHOMLE, 2001).

A glutamina é uma amida, portanto seu nome correto é glutamida, porém devido ao tempo em que é empregado, o termo glutamina continua em uso corrente.(FELTRE, 1998).

Durante a isquemia-reperfusão intestinal a glutamina estimula o transporte de aminoácidos, possivelmente como resultado do aumento da glutatona intracelular e da síntese de DNA.(WASA *et al.*, 2005).

Múltiplos estudos experimentais têm demonstrado que durante um aumento do balanço nitrogenado, a presença de glutamina no tecido muscular previne ou atenua um balanço negativo (LEHNINGER *et al.*, 2002, IMER, 1983; OCK; MAJNO, 1969). O exato mecanismo que envolve este efeito anabólico permanece, entretanto, sem elucidação.

É notório o efeito inibitório de aminoácidos específicos semelhantes a glutamina na proteólise hepática e seu papel na regulação dos fluxos iônicos é também há muito conhecido (McCORD, 1985). Seu papel na variação do volume celular e como segundo mensageiro nesses efeitos acima citados, apenas recentemente foi identificado.

Estudos realizados Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da UFC evidenciaram a ação pró-glicolítica anaeróbica da glutamina em ratos (GUIMARÃES FILHO *et al.*, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2002; BEZERRA FILHO *et al.*, 2002; ALVES *et al.*, 2005) e pró-glicolítica aeróbica em humanos (ALVES *et al.*, 2003). As principais relações metabólicas da glutamina estão evidenciadas na figura 12.

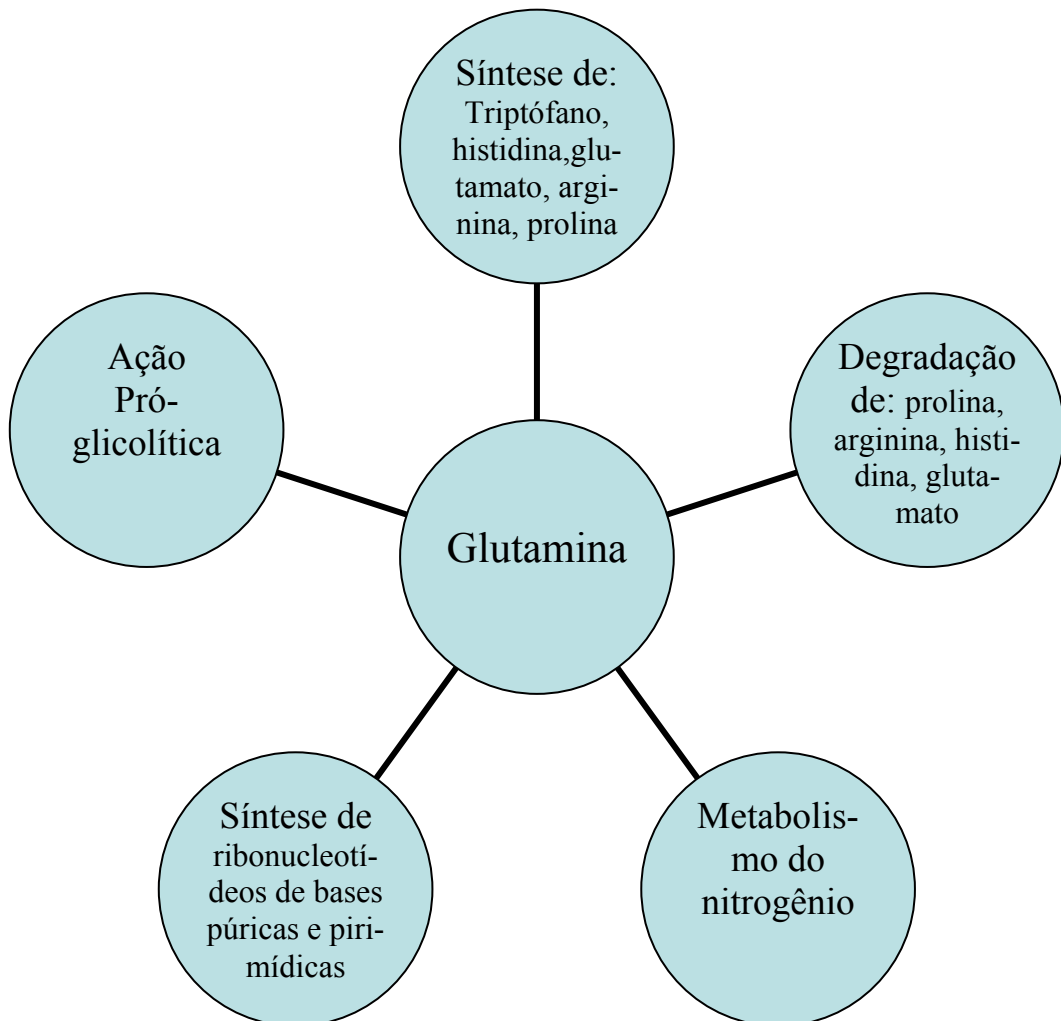


Figura 12 - Relação metabólica da glutamina

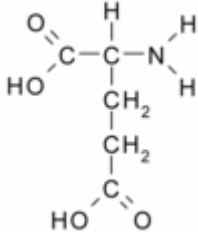
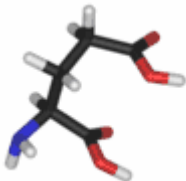
Nomenclatura	Ácido glutâmico ou glutamato
Símbolo	Glu ou E
Nome químico	Ácido 2-aminoglutárico
Classificação	Aminoácido polar ácido
Estrutura Linear	
Estrutura Tridimensional	 www.search.com/reference/glutamate

Figura 13 - Glutamato

O glutamato, mostrado na figura 13, especialmente o derivado da dieta, pode facilmente substituir a glutamina em diversos dos seus papéis metabólicos, incluindo a geração de energia e a síntese de aminoácidos, figura 14. Do ponto de vista estritamente metabólico, a glutamina e o glutamato são intercambiáveis como importante substrato para o sistema celular da mucosa.(CYNOBER, 1995).

O glutamato é o produto da transaminação do α -cetoglutarato, participando então na produção de metabolitos como o piruvato ou o oxaloacetato, que participam em vias metabólicas como a gliconeogênese, a glicólise ou o ciclo dos ácidos tricarboxílicos. (LEHNINGER *et al.*, 2002):

alanina + α -cetoglutarato \rightleftharpoons piruvato + glutamato

aspartato + α -cetoglutarato \rightleftharpoons oxaloacetato + glutamato

Glutamato exógeno, por razões ainda não completamente elucidadas, não é um bom substituto para a glutamina. Foi demonstrado que em pacientes sépticos, os quais receberam glutamato, este, foi rapidamente metabolizado, não levou ao aumento da glutamina no plasma e não favoreceu a retenção de nitrogênio. Em

pacientes saudáveis após administração oral de glutamato, este foi largamente catabolizado no leito esplâncnico levando apenas a pequenos aumentos na concentração sérica da glutamina.(CYNOBER, 1995).

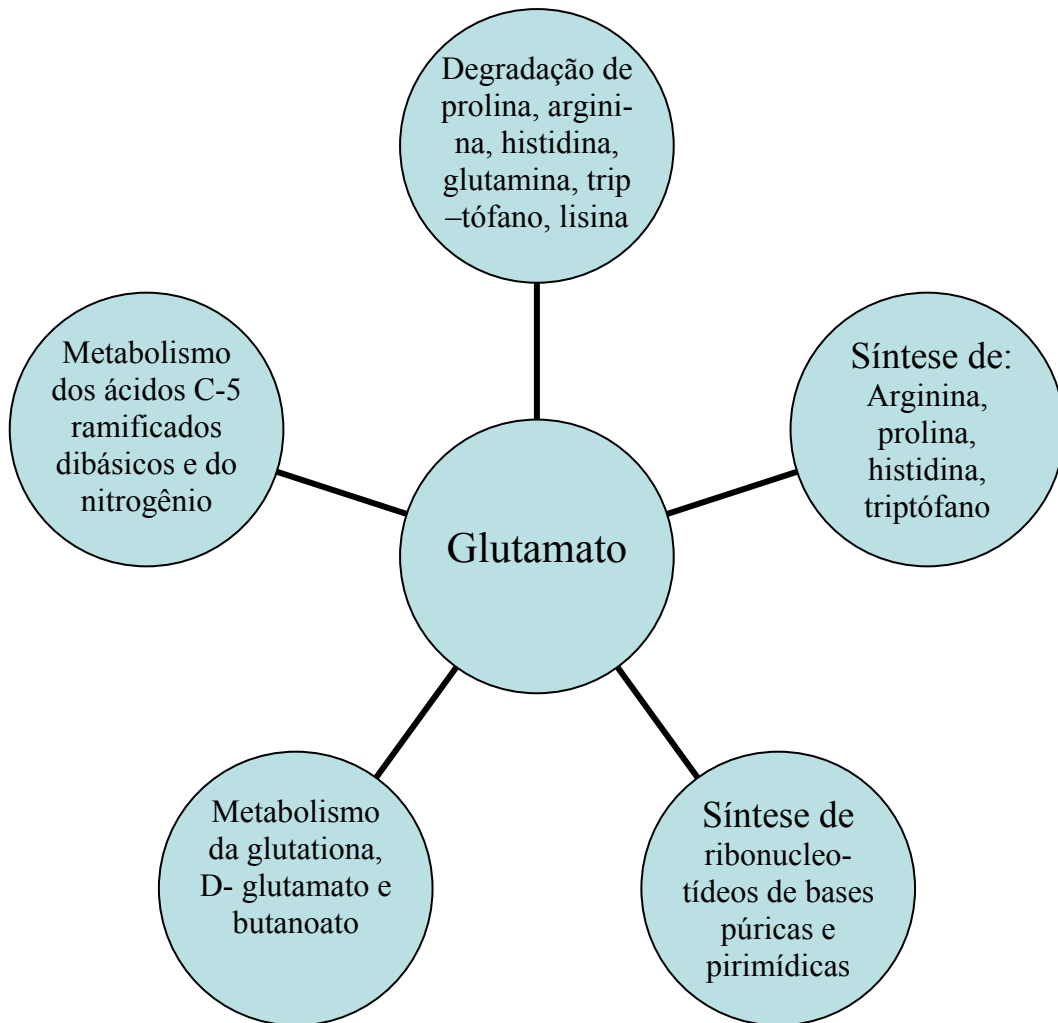


Figura 14 - Relações metabólicas do glutamato

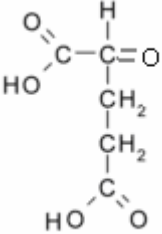
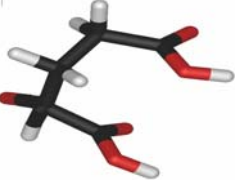
Nomenclatura	Ácido alfa-cetoglutárico
Símbolo	A-KG
Nome químico	Ácido 2-cetoglutárico
Classificação	Aminoácido polar ácido
Estrutura Linear	
Estrutura Tridimensional	

Figura 15 - Alfa-cetoglutarato

Teoricamente dois componentes podem ser pensados como precursores da glutamina: o alfa-cetoglutarato (AKG), mostrado na figura 15, e o glutamato, porém a maioria dos estudos demonstra que o glutamato não atua como a glutamina. Em contrapartida o AKG puro ou sob a forma de sal ornitina tem demonstrado potência anaeróbica em situações de estresse.(CYNOBER, 1995; DURANTON *et al.*, 1998).

Aminoácidos musculares diminuem de concentração em lesões agudas e, como já mencionado, isto é provavelmente devido a alterações no potencial de membrana com a diminuição do gradiente de sódio. Estudos experimentais mostraram que o α -cetoglutarato pode, parcialmente, prevenir a perda muscular de glutamina em situações de estresse (CYNOBER, 1995), atuando como intermediário da “lançadeira malato aspartato” (LEHNINGER *et al.*, 2002), este processo será melhor discutido no item Ornitina α -cetoglutarato.

O transporte do AKG é descrito como sódio-dependente no fígado, porém é sódio-independente nos fibroblastos.(CYNOBER, 1995).

O AKG pode estar envolvido no equilíbrio ácido-básico através do metabolismo renal e hepático. No fígado, o AKG encontra-se principalmente no

tecido perivenoso. Durante a acidose, a inibição da glutaminase periportal e da síntese de uréia pode diminuir a utilização de bicarbonato (HCO_3^-) e aumentar na chegada de amônia às células perivenosas. Nesta situação o AKG é intensivamente usado para a síntese da glutamina. (STOLL; HAUSSINGER, 1989; DE BANDT *et al.*, 1995).

No rim, a administração de AKG em cães em estado catabólico reduz a queda da glutamina e aumenta a produção de glutamato por este órgão (ROTH *et al.*, 1991). Na perfusão isolada dos rins de ratos com acidose foi sugerido (WELBOURNE, 1993) que, na presença de glutamina, o AKG induz a redução da produção de NH_4^+ em 80% com um aumento de cinco vezes na produção de HCO_3^- . O AKG também melhora a filtração glomerular e a reabsorção de HCO_3^- . (WELBOURNE, 1993).

No intestino este aminoácido é ativamente absorvido pela mucosa e sua utilização intestinal aumenta rapidamente após a infusão intrajejunal (ROTH MERTEN *et al.*, 1990; WINKLER *et al.*, 1993). As principais relações metabólicas do α -cetogluturato são mostradas na figura 16.

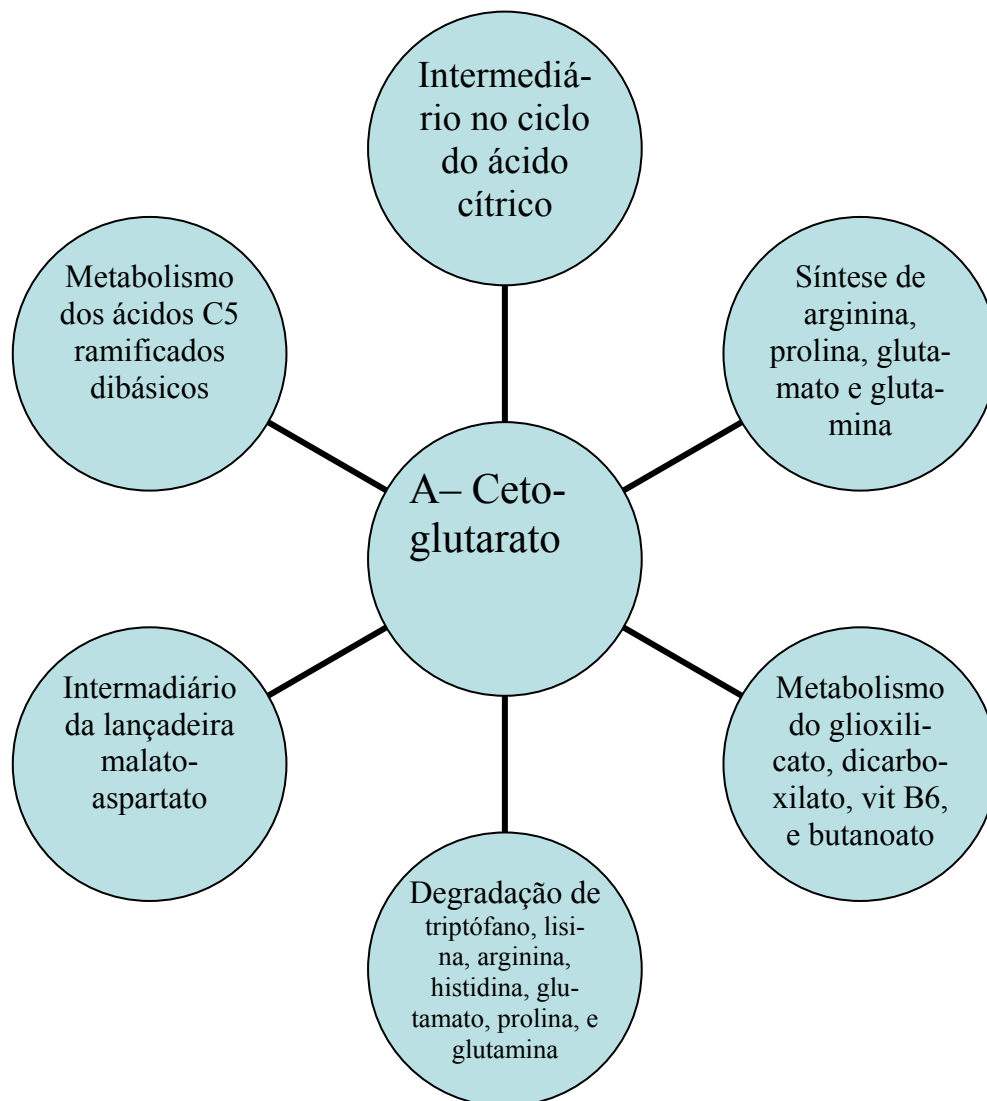


Figura 16 - Relações metabólicas do α -cetoglutarato

A partir do estudo de Trémolières, Scheggia e Flament (1972) demonstrando a melhora no nível nutricional em pacientes cirróticos que receberam OKG, numerosos estudos experimentais e clínicos têm demonstrado o efeito anabólico deste fármaco em situações de estresse (CYNOBER, 1995). O α KG é um precursor da glutamina e como este encontra-se associado à duas moléculas de ornitina no OKG, todos os efeitos metabólicos da ornitina e do α -cetoglutarato têm sido relacionados, além de interações específicas da OKG.

A administração de doses farmacológicas de OKG em ratos, com queimaduras, controla a redução muscular de glutamina (LE BOUCHER *et al.*, 1997) ao contrário da administração direta de glutamina. Em situações de catabolismo o estado de hidratação do músculo depende da distribuição iônica através da

membrana. A OKG consegue penetrar à membrana celular mesmo em situações de edema celular e redução do gradiente de sódio desta membrana. Ao contrário, a glutamina não atravessa facilmente a membrana nestas condições.(CYNOBER, 1995; DURANTON *et al.*, 1998).

Ornitina α -cetoglutarato, mais que um precursor da glutamina e arginina pode também substituir a glutamina em várias vias metabólicas como: a geração de base pelo rim, produção de energia ou gliconeogênese e produção direta de glutamina. Tanto o α KG quanto o OKG aumentam a concentração portal de glutamina, presumivelmente através da diminuição do consumo de glutamina pelos enterócitos. (WINKLER *et al.*, 1993).

Estudo publicado por Raul *et al.* (2005) demonstrou que após três dias de jejum, ratos renutridos com OKG (1g/kgdia) apresentaram hiperplasia nas vilosidades, aumento das hidrolases no bordo em escova estes efeitos dependem da síntese de poliamina. A OKG também tem demonstrado aumento na troficidade intestinal após transplante de intestino delgado ou ressecção extensa (CZERNICHOW *et al.*, 1997; DE OCA *et al.*, 1997). Ainda mais, a ornitina compartilha com a arginina a capacidade de estimular a secreção de hormônio do crescimento e insulina.

O estudo publicado por Le Boucher *et al.* (1997) utilizando modelo de rato com queimadura, demonstrou que apesar de diferentes sais do α KG apresentarem algum aumento na concentração de glutamina, a maior concentração de glutamina foi observada no plasma, músculo e fígado após a administração de OKG.

O crescimento de cultura de fibroblastos foi mais significativo quando em presença de OKG do que quando encubados apenas com α KG ou ornitina individualmente. Este efeito foi bloqueado por difluorometil-ornitina, um inibidor da ornitina de descarboxilase, indicando que a síntese de poliaminas está envolvida (CYNOBER, 1995). Estudo publicado por Roch-Arveiller *et al.* (1997) demonstrou que a administração de OKG em ratos com queimadura, previne a diminuição da função dos leucócitos polimorfonucleares induzida pela queimadura. Este efeito pode estar relacionado a secreção de hormônio do crescimento e da geração de óxido nítrico da arginina, derivada da ornitina.(ROCH-ARVEILLER *et al.*, 1997).

Quando em associação com a ornitina, existe uma maior formação de glutamina e outros aminoácidos do que quando em administração individual, esta

última forma de administração leva a um aumento apenas do glutamato no plasma. (CYNOBER, 1995).

Quaisquer que possam ser os mecanismos envolvidos, o α KG e a OKG (ornitina cetogluturato) podem modular o hipercatabolismo protéico em situações de estresse. Sua administração está associada com: redução do “turnover” protéico; diminuição do catabolismo miofibrilar protéico; atenuação da queda da síntese protéica; atenuação da queda da glutamina muscular. (CYNOBER, 1995; DURANTON *et al.*, 1998).

Os elétrons do NADH que são obtidos em vias oxidativas citosólicas - como a cadeia glicolítica, por exemplo, entram na mitocôndria através de um sistema de transporte conhecido como a “lançadeira malato/aspartato”. (LEHNINGER *et al.*, 2002).

Lançadeiras são estruturas químicas que atuam no transporte de metabólitos entre a mitocôndria e o citosol. Através deste processo, o oxaloacetato é reduzido a malato no citosol, este atravessa a membrana mitocondrial para ser reoxidado a oxaloacetato com redução do NAD, agora na matriz mitocondrial (figura 17). O processo ocorre com gasto de energia.

A lançadeira malato-aspartato (figura 17) é o principal mecanismo para a regulação da concentração citoplasmática de NADH, interferindo diretamente na síntese de lactato e atividade do ciclo de Krebs. A transaminação de aspartato no citoplasma, gerando oxaloacetato e glutamato, permite a re-oxidação de NADH e o subsequente transporte de íons H^+ à mitocôndria para produção de energia. (LEHNINGER *et al.*, 2002).

No citoplasma, oxaloacetato é reduzido pelo NADH gerando malato e NAD^+ . Malato é permutado por α -cetogluturato, através da membrana mitocondrial e no interior da mitocôndria é oxidado, gerando oxaloacetato e NADH. Glutamato citoplasmático, resultante da transaminação do aspartato, permeia a membrana mitocondrial e reage com oxaloacetato mitocondrial, gerando aspartato e α -cetogluturato, reiniciando o ciclo de reações. (LEHNINGER *et al.*, 2002).



Figura 17 - Lançadeira malato-aspartato

Nota: Figura gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

Resumidamente os mecanismos de ação são: atua diretamente gerando glutamina em tecidos-alvo; atua como intermediário obrigatório entre a glutamina e o ciclo de Krebs; utilização direta como substituto (sparing) para células glutamina-dependentes; na geração de chaves metabólicas com efeitos positivos sobre o metabolismo (CYNOBER, 1995; DURANTON *et al.*, 1998), como visto na figura 18.

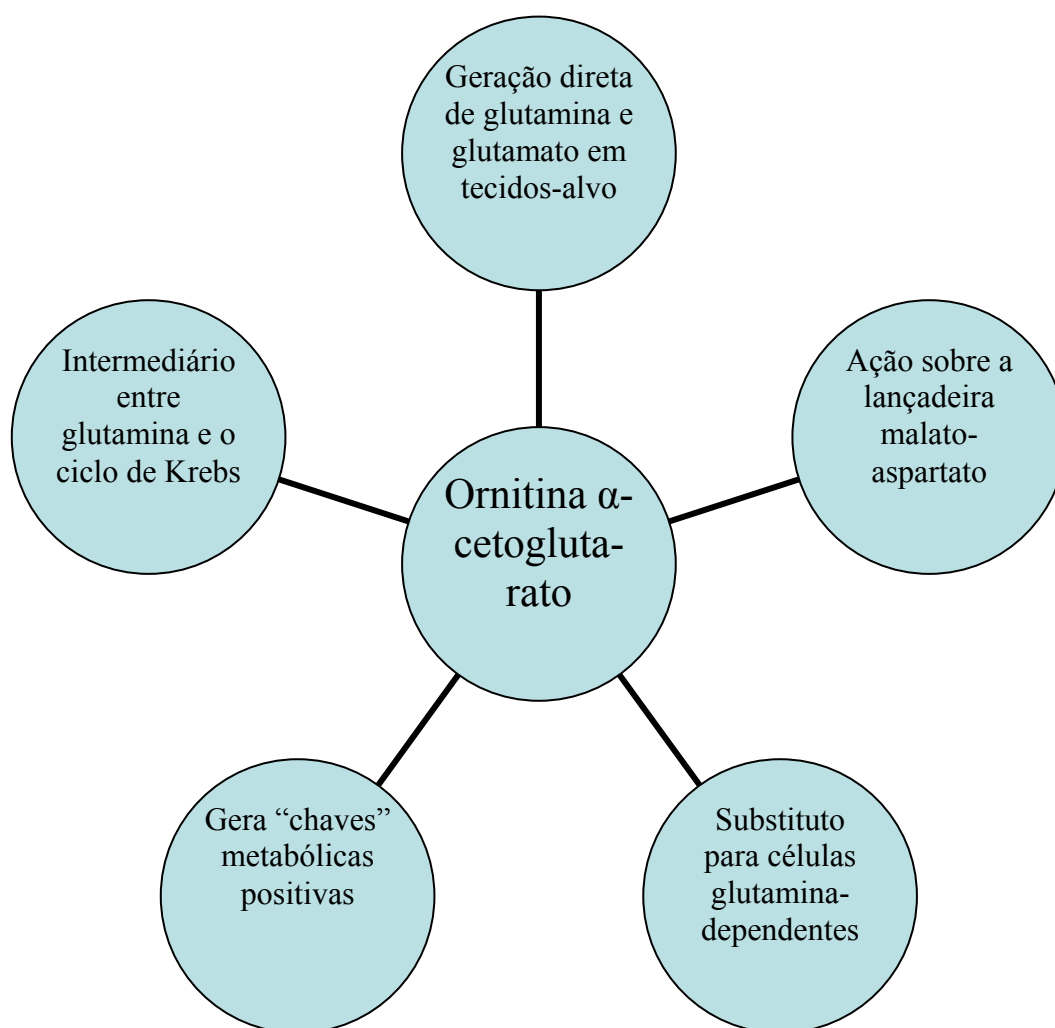


Figura 18 - Relações metabólicas da ornitina α -cetoglutarato

As preparações farmacológicas da OKG podem ser para administração oral ou venosa. Como essa última é atualmente de difícil obtenção, alguns autores em trabalhos experimentais, optaram por preparações orais administradas por gavagem ou na dieta dos animais. (LUYT *et al.*, 2003; DURANTON *et al.*, 1998; SHUSTER *et al.*, *in press*).

Seguindo a linha de pesquisa do uso de glutamina e precursores em isquemia-reperfusão, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da UFC, sob a coordenação do Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos e tomando por base os significativos efeitos da OKG na isquemia-reperfusão intestinal. Aventou-se a possibilidade de uma ação em modelos de isquemia muscular, até o momento sem estudos publicados. Estes fatos, aliados à fácil administração deste composto, motivaram a realização deste estudo.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a ação da ornitina α -cetogluturato (OKG) na isquemia-reperfusão de membro pélvico de ratos.

2.2 Objetivos específicos

Analisar o efeito do procedimento cirúrgico sobre parâmetros metabólicos na ausência de isquemia.

Analisar o efeito da isquemia e desta seguida de perfusão sobre parâmetros metabólicos, além de, como a OKG alterou estes parâmetros na isquemia-reperfusão.

3 MÉTODO

3.1 Tipo de estudo

Experimental em ratos. A pesquisa foi realizada de acordo com as normas internacionais para pesquisas biomédicas em animais e de acordo com a lei federal 6.638 de 8 de maio de 1979. Aprovação no Comitê de Ética no anexo **A**.

3.2 Local

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Cirurgia Experimental e os animais procedentes do Biotério do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará. No referido biotério os animais foram mantidos em gaiolas de acrílico com dimensões de 40 x 30 x 25 cm (máximo de 5 animais por gaiola). Ração balanceada, água '*ad libitum*', com luz das 06h00min às 18h00min e escuridão de 18h00min as 06h00min, temperatura ambiente e higienização diária.

3.3 Amostra

Foram utilizados 42 ratos (*rattus norvegicus albinus*), da linhagem OUTB Wistar, com peso entre 220 e 280g, idade entre 90 e 120 dias.

3.4 Grupos experimentais

Os 42 ratos foram distribuídos em três grupos principais:

Grupo "Sham" (S), grupo isquemia (I) e grupo isquemia-reperusão (R).

Cada um destes grupos é composto por subgrupos de seis animais, os quais foram submetidos apenas à laparotomia exploradora – grupo S, à isquemia por pinçamento arterial – Grupo I, e à isquemia seguida por um tempo de reperusão – grupo R.

Estes subgrupos variaram ainda no fato de terem sido submetidos à administração, por gavagem, do tripeptídeo de teste OKG, designado com a letra α ou uma mistura protéica de controle, caseinato de cálcio, designado com a letra “C”.

A representação abreviada do nome de cada subgrupo traz na primeira letra o grupo ao qual pertence, na segunda, a droga administrada por gavagem e os números mostram o tempo em horas entre a primeira laparotomia e a coleta do material para análise bioquímica.

Os subgrupos foram assim organizados:

No grupo Sham (S) todos os subgrupos usaram caseinato de cálcio (5g/kg) em 2,0ml de água destilada, apresentando os seguintes subgrupos: Subgrupo S 0; Subgrupo S 6 e Subgrupo S 6,5.

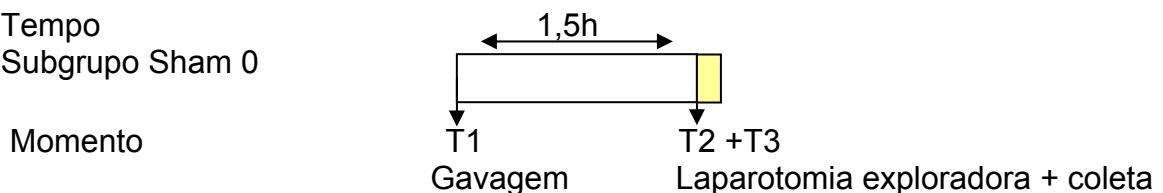
O grupo I, apresenta os seguintes subgrupos: subgrupo controle de isquemia (IC 6) que usou caseinato de cálcio (5g/kg) em 2,0ml de água destilada e subgrupo teste de isquemia (I α 6) que usou OKG 5g/kg em 2,0ml de água destilada.

O Grupo R, apresenta os seguintes subgrupos: subgrupo controle de reperfusão (RC 6,5) que usou caseinato de cálcio (5g/kg) em 2,0ml de AD e subgrupo teste de reperfusão (R α 6,5) usou OKG (5g/kg) em 2,0ml de água destilada.

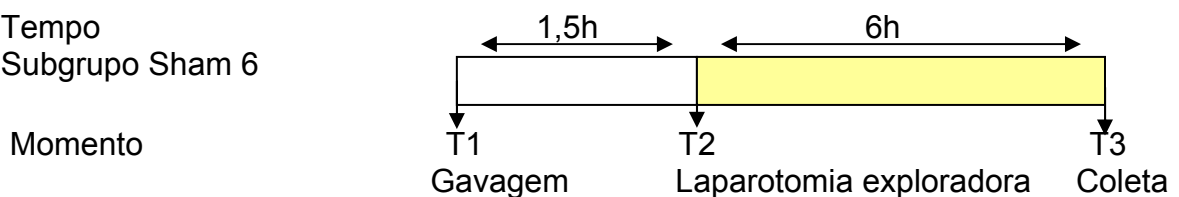
3.5 Cronogramas do procedimento cirúrgico por grupos

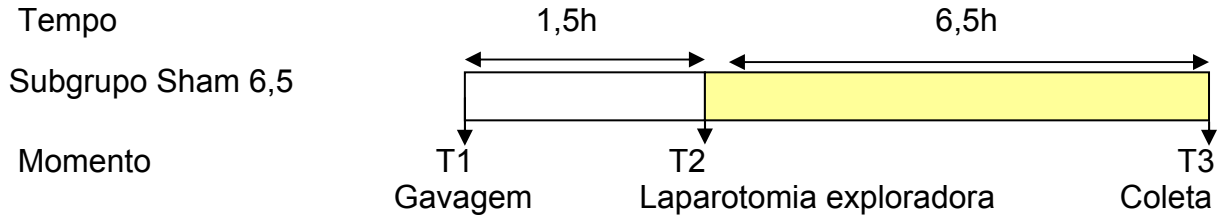
3.5.1 Grupo Sham

Tempo
Subgrupo Sham 0

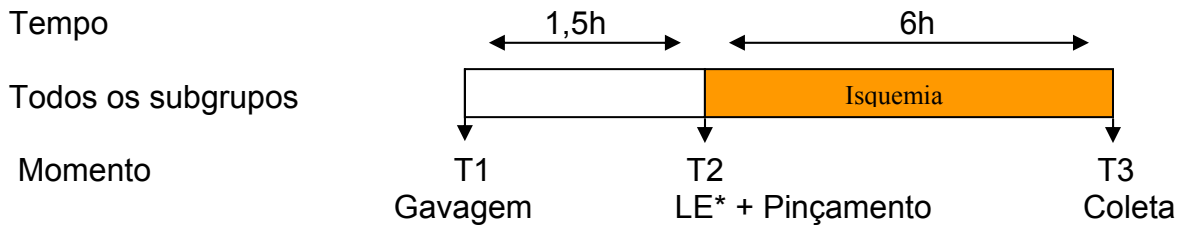


Tempo
Subgrupo Sham 6



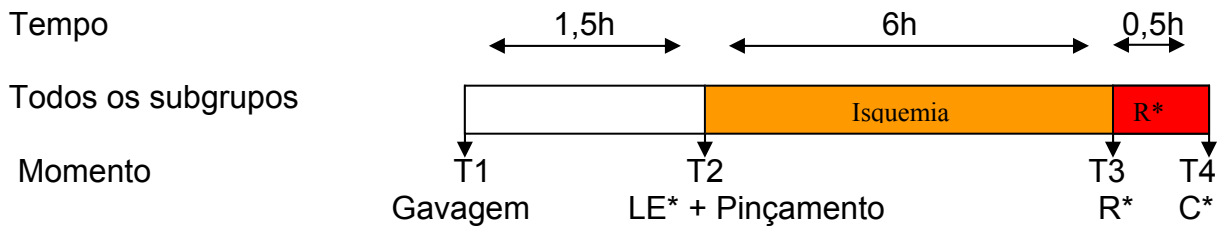


3.5.2 Grupo isquemia



LE* - Laparotomia exploradora

3.5.3 Grupo isquemia-reperfusão



LE* - Laparotomia exploradora

R* - Retirada da pinça e reperfusão

C* - Coleta

3.5.4 Descrição do cronograma

T1 –Foram feitas as administrações da OKG ou do caseinato de cálcio por gavagem para todos os grupos.

T2 – 1,5h após a gavagem procedeu-se a laparotomia exploradora (LE) + sutura da cavidade para o grupo S ou LE + pinçamento arterial + síntese da parede abdominal, para os grupos I e R .

T3 – Para os grupos S e I procedeu-se a coleta de materiais.

T3 – Apenas para o grupo de reperfusão (R), retirada das pinças vasculares.

T4 - Para o grupo de reperfusão (R) procedeu-se a coleta dos materiais.

Processo de coleta:

Imediatamente após a LE e dissecação vascular para o subgrupo S 0. Seguido pelo sacrifício do animal; após seis horas da primeira LE para o subgrupo S 6 e após 6,5 horas da primeira LE para o grupo S 6,5.

Após 6 horas de isquemia com novas laparotomias exploradoras para os subgrupos IC e Ia. Nestes subgrupos as pinças foram retiradas apenas após as coletas dos materiais e sacrifício dos animais.

Para os subgrupos de reperfusão (RC, R α), após 30 minutos desta, foram realizadas as coletas dos materiais, seguidas pelo sacrifício dos animais.

3.6 Modelo experimental do procedimento cirúrgico

3.6.1 Pré-operatório

Antes do experimento os animais foram submetidos a jejum de alimentos sólidos por 12 horas.

Foram pesados e sorteados para determinar a qual grupo cada animal irá pertencer.

3.6.2 Randomização

Foi realizada através de sorteio com distribuição dos animais nos nove grupos, contendo 6 animais em cada grupo. No laboratório os examinadores não tiveram conhecimento de qual grupo eram provenientes as amostras séricas e teciduais a serem estudadas.

3.6.3 Anestesia

Os animais foram anestesiados com éter dietílico por inalação. Os ratos eram considerados anestesiados após estarem em sono profundo, sem reação a

estímulos mecânicos, com a perda dos reflexos de retorno à posição de vigília, flexão do membro após estímulo doloroso e do reflexo palpebral.

3.6.4 Procedimento cirúrgico

Os animais foram fixados por tiras à prancha em decúbito dorsal por meio de fitas adesivas nos quatro membros, os quais eram mantidos em extensão durante o procedimento.

Foram realizadas as laparotomias exploradoras com dissecação da aorta infra-renal, artérias ilíacas comuns bilateralmente, artéria ilíaca interna direita, artéria ilíaca externa direita e artéria circunflexa ilíaca.

Os pinçamentos arteriais foram realizados de acordo com o procedimento de Luyt *et al.* (2003) modificado, conforme descrito a seguir, tendo em vista que o simples pinçamento ilíaco não fornece uma isquemia crítica em ratos.

Em cada animal foi pinçada a artéria aorta acima da bifurcação com “microbuldog”, a seguir procedemos às ligaduras da artéria ilíaca interna direita e artéria circunflexa ilíaca em suas origens com fio de Prolene 6-0, em seguida, foi feito o pinçamento da artéria ilíaca externa em seu terço distal com “microbuldog”, mostrado na **figura 19**. Ao final, a artéria ilíaca direita ficou sem seus maiores ramos funcionantes.

Posteriormente foi realizada a sutura da cavidade abdominal em plano único, em seguida o animal foi manejado de acordo com o cronograma do procedimento cirúrgico para seu grupo.

A confirmação clínica da isquemia foi obtida através da presença concomitante dos seguintes sinais: ausência de sinal Doppler da a. femoral direita, cianose e frialdade do membro pélvico direito e flexão deste membro.

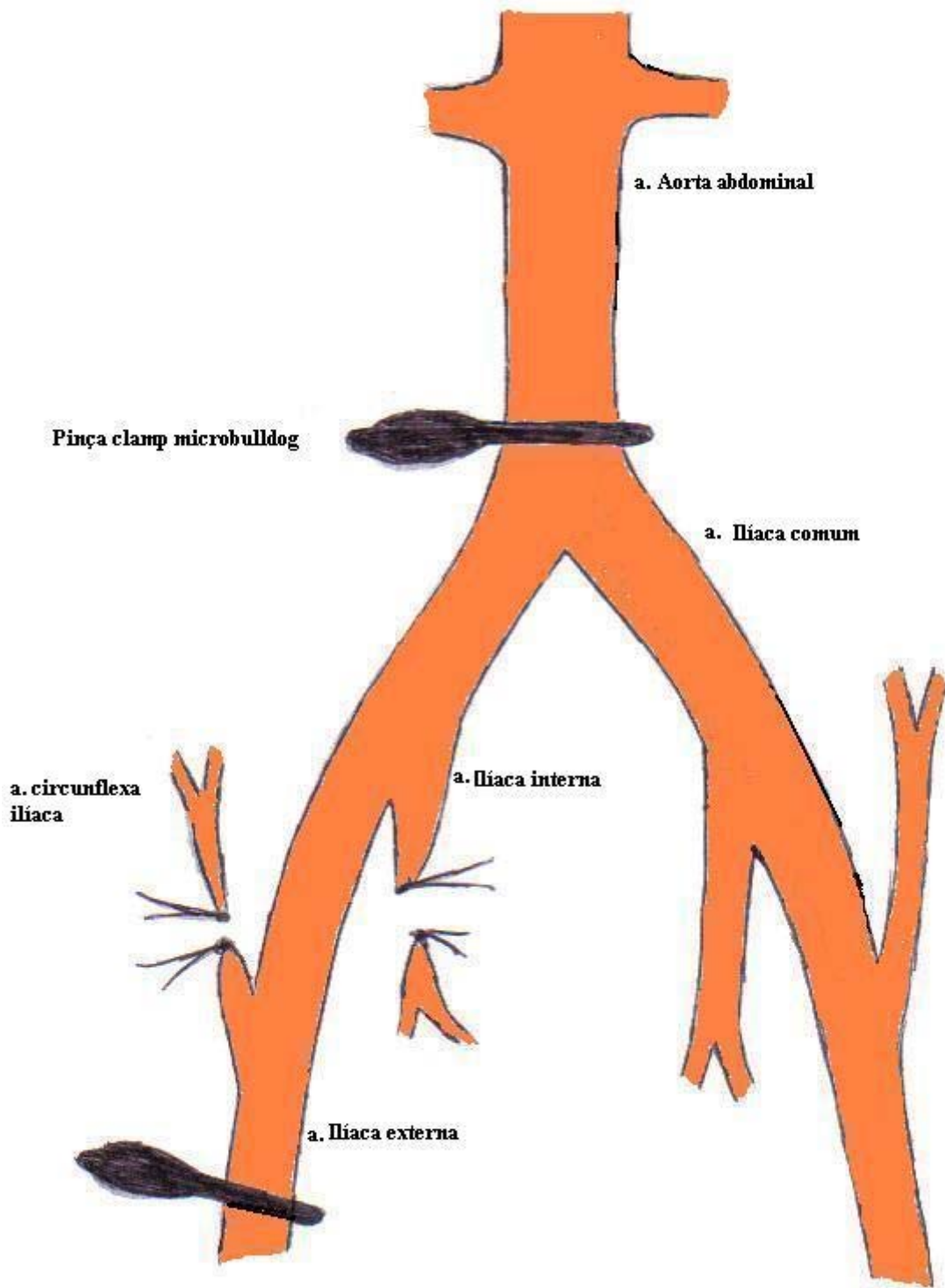


Figura 19 - Desenho esquemático do modelo de pinçamento arterial

3.7 Análises laboratoriais

Dosagens plasmáticas: T-BARS, glutationa, creatinofosfoquinase (CPK), desidrogenase láctica (LDH), glicose, lactato, piruvato.

Dosagens musculares do gastrocnêmio direito: T-BARS, glutationa, G6PDH, lactato e piruvato.

3.7.1 Tratamento das amostras musculares

Uma vez obtidas as amostras musculares estas eram imediatamente prensadas e imersas em nitrogênio líquido, numa temperatura de -190°C , o que ocasiona a queda da temperatura tissular a -80°C , em um tempo inferior a 0,1 segundo. A seguir, o material resultante era triturado em gral e pistilo de porcelana até se transformar em pó fino. Durante esse procedimento, a baixa temperatura era mantida pelo acréscimo de nitrogênio líquido. Os tecidos pulverizados eram colocados em tubos de ensaio de 10ml, individuais e devidamente identificados, contendo 5ml de ácido perclórico 0,75M e conservados em gelo.

A imersão do material pulverizado em solução ácida acarreta a rápida desnaturação das proteínas, provocando a sua precipitação. Após centrifugação por 10 minutos a 2000 rpm, era recolhido o líquido sobrenadante (extrato ácido) e desprezado o precipitado protéico. O extrato ácido é colocado em tubos de ensaio de 10ml, previamente pesados. Os tubos são repesados e, por subtração, obtém-se um peso conhecido de extrato ácido.

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

3.7.2 Princípios básicos de análise enzimática

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

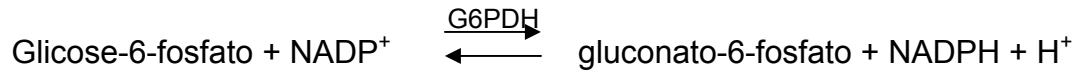
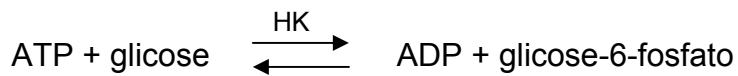
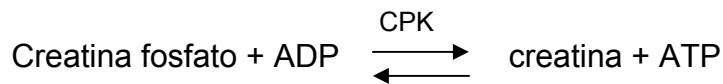
Em uma reação enzimática específica, um micromol de substrato reage com um micromol de $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ (ou NADH/NADPH), e a alteração na densidade óptica traduzirá, rigorosamente, a quantidade de substrato consumida nessa reação.

Em condições ótimas de ensaio, a conversão de substrato é praticamente completa e a diferença da densidade óptica pode ser utilizada para o cálculo da concentração do referido substrato, multiplicando-se o resultado por um fator de diluição apropriado.

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

3.7.3 Dosagem da creatina fosfoquinase

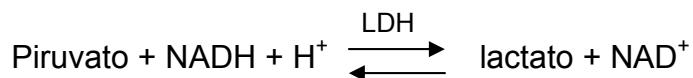
A CPK foi determinada através do método padrão otimizado. A determinação desta enzima ocorre segundo as reações:



Método de análise: Leitura em espectro fotômetro: comprimento de onda – Hg 365nm, 340nm ou Hg 334nm, em cubeta de 1cm à temperatura de 25°C, 30 °C ou 37 °C. Deixado o reagente de uso na temperatura desejada, mantendo-a constante ($\pm 0,5$ °C) durante a realização do teste. Homogeneizado e incubado na temperatura desejada por 5 min. Lida a absorbância e ao mesmo tempo acionado o cronômetro. Ler a absorbância após exatamente 1, 2 e 3min. Finalmente usando as leituras das absorbâncias, calculada a média da variação da absorbância por minuto. Calculada a atividade da CPK na amostra pela multiplicação desta média por um fator de conversão de unidades internacionais.

3.7.4 Dosagem da desidrogenase láctica

A LDH foi determinada, usando a redução do piruvato pelo NADH que é catalisada pela desidrogenase láctica (LDH), segundo a reação:



Método de análise: Termostatar o reagente na temperatura desejada, mantendo-a constante ($\pm 0,5$ °C) durante a execução do teste. Leitura em espectro fotômetro: comprimento de onda – Hg 365nm, 340nm ou Hg 334nm, em cubeta de 1cm à temperatura de 25°C, 30 °C ou 37 °C durante a realização do teste.

Homogeneizada e incubada na temperatura desejada por 5 min. Lida a absorbância e ao mesmo tempo acionado o cronômetro. Lida a absorbância após exatamente 1, 2 e 3min. Finalmente usando as leituras das absorbâncias, calculada a média da variação da absorbância por minuto. Calculada a atividade da CPK na

amostra pela multiplicação desta média por um fator de conversão de unidades internacionais.

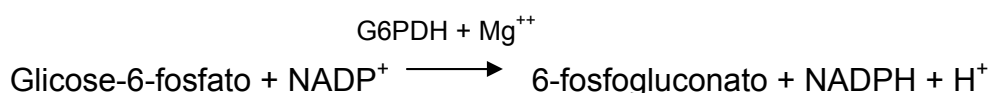
3.7.5 Dosagem da glicose

A D-glicose foi determinada seguindo o método descrito abaixo:

(a) Reação auxiliar



(b) Reação indicadora



Com o pH=7,5 o equilíbrio da reação indicadora é desviado para a direita, garantindo o término completo de ambas as reações, já que a Glicose-6-fosfato formada na reação auxiliar anterior é de imediato utilizada na reação seguinte. Cabe observar que, mesmo sabendo que a hexoquinase catalisa a fosforilação de vários outros monossacarídeos, a especificidade do ensaio repousa no fato de que a glicose-6-fosfato-desidrogenase só reage com a Glicose-6-fosfato, não o fazendo com outras hexoses e pentoses. A solução-tampão para o ensaio, renovada para cada ensaio, foi composta de 20 mL de tampão TRIS 0,1M, pH=8,0; 2 ml de Cloreto de Magnésio 0,1M ; 2 ml de ATP 0,01M; 2 mL de NAD⁺ 1% e 0,13 ml de Glicose-6-fosfato-desidrogenase (1mg/ml). Cada cubeta tinha 0,1ml da amostra neutralizada + 0,9ml de água destilada + 1 ml da solução-tampão totalizando 2ml e a cubeta-controle também com 2ml (água destilada e solução-tampão em volumes iguais). Todas as cubetas foram lidas a 340nm antes e nos tempos 10 e 15 minutos após a adição de 0,01 ml de hexoquinase. A medida é dada em □mol/ml de sangue.

3.7.6 Dosagem da concentração das Substâncias Reagentes do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada através da reação com ácido tiobarbitúrico.

A técnica tem por objetivo quantificar o dialdeído malônico (MDA) formado na peroxidação lipídica. Esse composto, quando extraído da solução por um solvente orgânico (n-butanol), tem sua concentração determinada e expressa como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esta técnica é de fácil execução, baixo custo e pode ser empregada para determinação das “TBARS” em diferentes materiais biológicos, especialmente em tecidos.

Com esse fim, 5 ml de sangue foram colhidos e submetidos a processo de centrifugação, sendo o plasma imediatamente congelado em nitrogênio líquido a -70°C .

Posteriormente, a amostra foi levada à temperatura ambiente, retiraram-se 100 μL de plasma e adicionou-se 4 ml de KCl gelado a 1,15%, de forma que a amostra ficasse homogênea, resultando em uma solução ácida concentrada. Retrou-se uma alíquota de 0,5 ml da amostra e acrescentou-se 1ml da solução aquosa de TBA a 0,6% e 3ml da solução de ácido fosfórico (H_3PO_4) a 1%. A mistura foi colocada em banho fervente pois o MDA é capaz de reagir, sob aquecimento em meio ácido, com o ácido tiobarbitúrico originando composto de cor rosa. Adicionou-se então, 4 ml de n-butanol. Após isso, a mistura foi agitada por 2 minutos e então centrifugada por 10 min a 3000 rpm.

A absorbância da fase sobrenadante foi medida em espectrofotômetro Beckman (520 nm a 535 nm), mensurando-se a concentração plasmática das Substâncias Reagentes do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em unidade de nmol MDA/ml plasma.

3.7.7 Dosagem da concentração de glutathiona

A determinação da concentração de glutathiona baseia-se na reação do 2-ácido nitrobenzóico com o tiol livre, originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A medida do produto de formação da reação é feita em espectrofotômetro de Beckman, por leitura da absorbância a 412 nm.

Utiliza-se como reagentes:

- Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)
- Ácido tricloracético a 50% (ATC,50%)
- Tampão TRIS 0,4 M, pH 8,9
- 2-ácido nitrobenzóico (DTNB) 0,5 M
- Metanol
- Glutaciona (GSH, 1mg/ml)

Após a amostra ser submetida a processo de centrifugação, o plasma é imediatamente congelado em nitrogênio líquido a -70°C . Posteriormente, com o plasma tendo sido levado à temperatura ambiente, retiraram-se 100 μL e realizou-se a homogeneização em 5 ml de EDTA 0,02M. Retiraram-se 4 ml do homogenato e mistura-se com 3,2 ml de água destilada e 0,8ml de ácido tricloracético a 50%. O tubo é agitado e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Retiraram-se 2 ml do sobrenadante e acrescentam-se 4ml de TRIS 0,4 M (pH 8,9) e 0,1 ml de DTNB 0,01M. Agita-se a mistura para homogeneização e em seguida lêem-se as absorbâncias no espectrofotômetro à 412 nm. A concentração final de glutaciona, em $\mu\text{mol/ml}$, é obtida comparando-se o valor da absorbância com uma tabela padrão.

3.7.8 Dosagem da concentração de lactato

Para dosagem da concentração de lactato, utilizou-se uma solução tampão, contendo:

- 40 ml de TRIS 0,2M
- 5 ml de hidróxido de hidrazina 100%
- 25 ml de EDTA

Completa-se a mistura com água destilada, para atingir um volume de 100 ml e ajusta-se o pH da solução para 9,5, com ácido clorídrico 5 M. Em cada 10 ml da solução tampão foi adicionado 1ml de NAD^+ a 1%.

Sabendo-se que determinação de substratos metabólicos é baseado no princípio de uma reação enzimática específica em que a participação do substrato é completada com a redução de $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ ou oxidação de NADH/NADPH . Os

nucleotídeos purina (NAD^+ , NADP^+) absorvem luz a 260 nm, e, no estado reduzido (NADH , NADPH), têm uma absorção adicional de no máximo 340nm. Portanto, através de medida de densidade óptica a 340 nm, a conversão enzimática do substrato pode ser acompanhada, diretamente, em uma cubeta no espectrofotômetro. Independentemente se NAD^+ aceita H^+ ou se NADH doa H^+ , a densidade óptica aumenta ou diminui em 6,22 unidades com a produção ou consumo de 01 μmol de NADH/NADPH .

Sabendo-se que em uma reação enzimática específica, um μmol de substrato reage com um μmol de $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ (ou NADH/NADPH), a mudança na densidade óptica refletirá, rigorosamente, a quantidade de substrato consumida pela reação. Sendo as condições do ensaio ótimas, a conversão do substrato é praticamente completa e a diferença da densidade óptica pode ser usada para calcular a concentração do substrato no sangue, multiplicando-se por um fator de diluição apropriado.

3.7.9 Dosagem da concentração de piruvato

Após coleta de sangue heparinizado ter sido realizada da linha arterial, 2 ml de sangue foram colocados em um tubo de ensaio, com capacidade para 10 ml, contendo 5 ml de ácido perclórico a 5% e imerso em gelo no interior de um recipiente de isopor. A imersão neste ácido provoca inativação e precipitação rápida das proteínas para que possam ser removidas por centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação desprezou-se o precipitado e colocou-se o sobrenadante (extrato ácido) em tubos de ensaio de vidro de 10 ml, previamente pesados. Os tubos foram novamente pesados. Obteve-se desta maneira um volume ácido. A seguir, duas gotas de um indicador de pH universal foram adicionadas ao volume ácido juntamente com uma solução de hidróxido de potássio a 20% até que o pH ficasse entre 7,0 e 8,0. Os tubos foram então mais uma vez pesados e centrifugados a 2000 rpm durante 10 minutos. Novamente se transferiu para outro tubo de ensaio o sobrenadante, agora extrato neutro, que foi utilizado para análise dos metabólitos por método espectrofotométrico. A dosagem do piruvato feita logo após a neutralização e as concentrações expressas em $\mu\text{mol/ml}$.

3.8 Estatística

Para análise dos resultados foram utilizados: média, desvio padrão e teste de normalidade de Korogorov-Smirnov. Caso os resultados fossem normalizáveis, aplicou-se o teste ANOVA para avaliação de diferença significativa, no caso dos resultados não serem normalizáveis utilizou-se o teste de Kurskal-Wallis com o mesmo fim. Em todos os testes fixou-se em 0,05 ou 5%, o nível de rejeição da hipótese de nulidade.

4 RESULTADOS

As descrições serão feitas através da apresentação das comparações entre os subgrupos, essas serão mostradas individualmente ou conjuntamente em um mesmo gráfico ou tabela. Neste último caso, as duas comparações serão mostradas em conjunto para facilitar a compreensão da evolução temporal do estudo.

4.1 Efeitos do procedimento cirúrgico sobre os parâmetros metabólicos do grupo SHAM

4.1.1 CPK plasmática

Comparação entre o subgrupo Sham 0 e os subgrupos Sham 6 e 6,5. Todos os subgrupos receberam caseinato de cálcio por gavagem.

A CPK plasmática demonstrou, seis horas após a laparotomia exploradora (LE) e sutura da parede abdominal, elevação e manteve-se significativamente elevada às 6,5h do procedimento inicial.

Tabela 1 – Concentração de CPK (ui/l) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham de 6 e 6,5h ao subgrupo 0h

Subgrupo	Média		Desvio padrão
Sham 0h	67,167	±	21,581
Sham 6h	141,833	±	47,880
Sham 6,5h	180,667	±	70,193

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

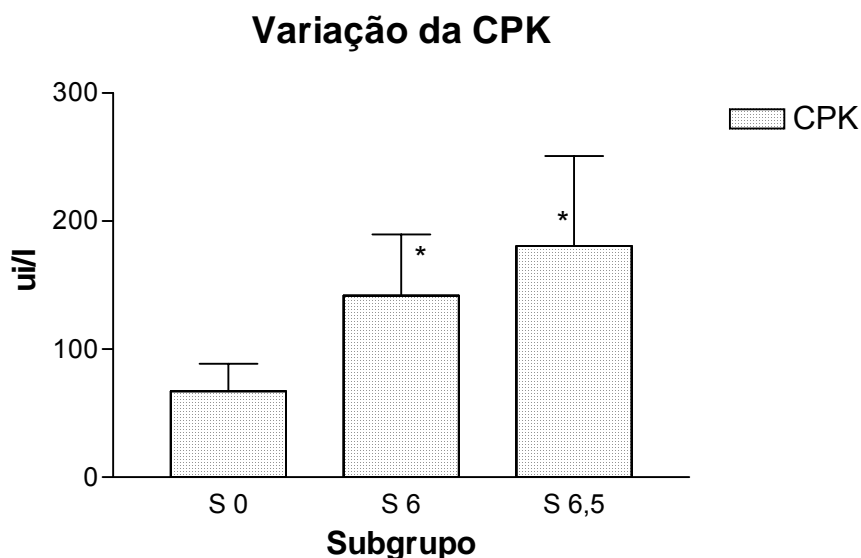


Figura 20 - Concentração de CPK (ui/l) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h. S 0: subgrupo Sham 0h. S 6: subgrupo Sham 6h. S 6,5: subgrupo Sham 6,5h

Nota: Teste ANOVA. $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 0

4.1.2 LDH plasmática

Comparação entre o subgrupo Sham 0 e os subgrupos Sham 6 e 6,5. Todos os subgrupos receberam caseinato de cálcio por gavagem.

A LDH plasmática evoluiu, seis horas após a LE com elevação significativa, retornando após para valores não diferentes dos iniciais.

Tabela 2 – Concentração de LDH (ui/l) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham de 6 e 6,5h ao subgrupo 0h

Subgrupo	Média		Desvio padrão
Sham 0h	74,400	±	33,839
Sham 6h	248,960	±	80,621
Sham 6,5h	306,710	±	245,738

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

Varição da DHL no plasma

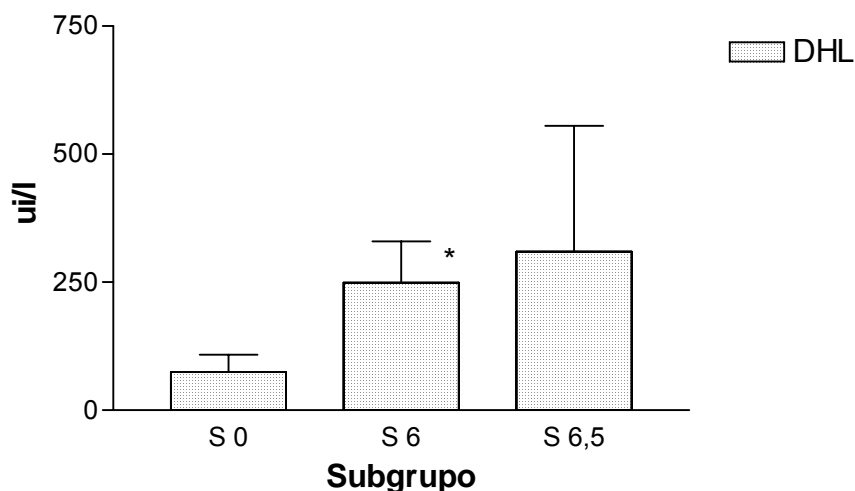


Figura 21 - Concentração de LDH (ui/l) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h. S 0: subgrupo Sham 0h. S 6: subgrupo Sham 6h. S 6,5: subgrupo Sham 6,5h

Nota: Teste ANOVA. $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 0

4.1.3 Glicose plasmática

Comparação entre o subgrupo Sham 0 e os subgrupos Sham 6 e 6,5. Todos os subgrupos receberam caseinato de cálcio por gavagem.

A glicose plasmática, neste subgrupo, não demonstrou variações significantes em relação ao valor inicial.

Tabela 3 – Concentração da glicose (mg/dl) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham de 6 e 6,5h ao subgrupo 0h

Subgrupo	Média	Desvio padrão
Sham 0h	102,833 ±	17,949
Sham 6h	127,333 ±	40,648
Sham 6,5h	118,167 ±	24,227

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

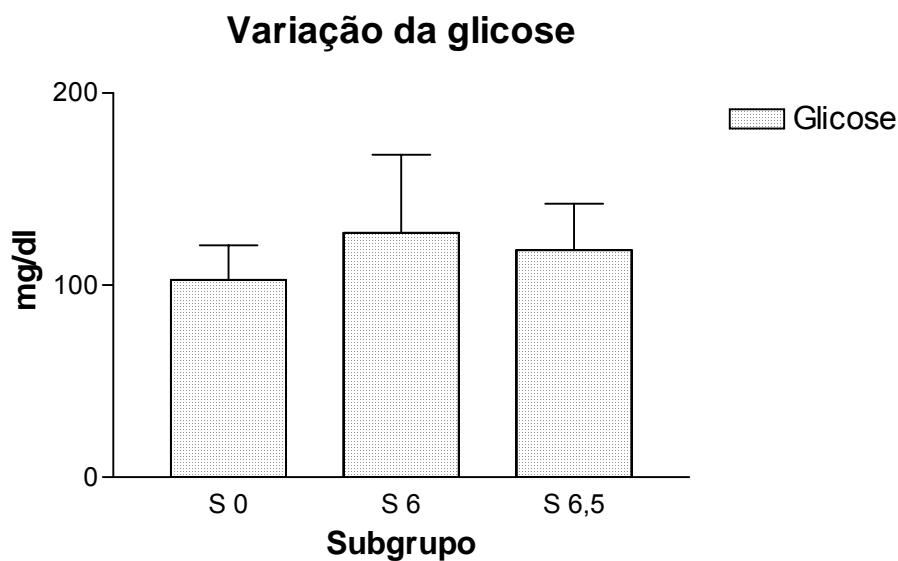


Figura 22 - Concentração da glicose (mg/dl) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h. S 0: subgrupo Sham 0h. S 6: subgrupo Sham 6h. S 6,5: subgrupo Sham 6,5h

Nota: Teste ANOVA. $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 0

4.1.4 G6PDH tecidual

Comparação entre o subgrupo Sham 0 e os subgrupos Sham 6 e 6,5. Todos os subgrupos receberam caseinato de cálcio por gavagem.

A G6PDH muscular, não apresentou variações significativas às seis horas, o que foi mantido após 6,5h.

Tabela 4 – Concentração da G6PDH ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos Sham de 6 e 6,5h ao subgrupo 0h

Subgrupo	Média		Desvio padrão
Sham 0h	0,422	±	0,233
Sham 6h	0,422	±	0,237
Sham 6,5h	0,462	±	0,223

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

Variação da G6PDH no tecido

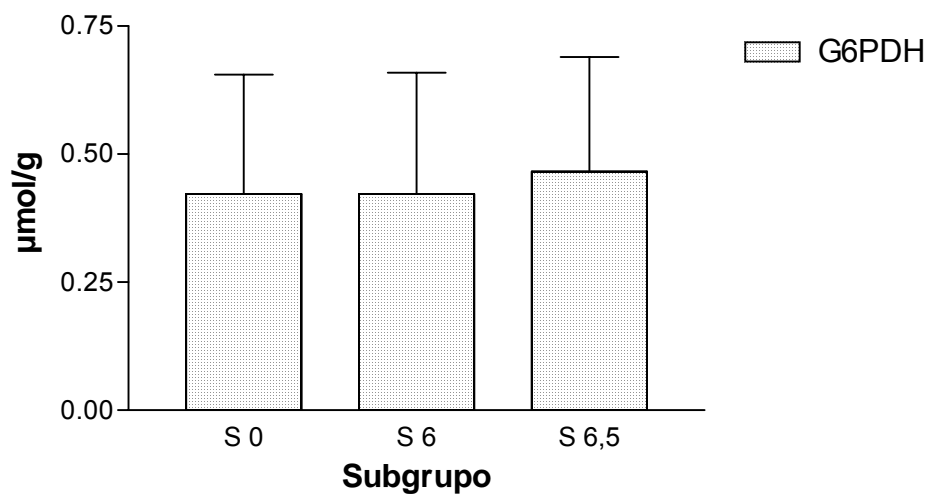


Figura 23 - Concentração da G6PDH ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h. S 0: subgrupo Sham 0h. S 6: subgrupo Sham 6h. S 6,5: subgrupo Sham 6,5h

Nota: Teste ANOVA. $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 0

4.1.5 Piruvato plasmático

Comparação entre o subgrupo Sham 0 e os subgrupos Sham 6 e 6,5. Todos os subgrupos receberam caseinato de cálcio por gavagem.

O piruvato plasmático comportou-se sem variações de significância estatística após a LE.

Tabela 5 – Concentração do piruvato ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h

Subgrupo	Média		Desvio padrão
Sham 0h	0,101	±	0,066
Sham 6h	0,061	±	0,045
Sham 6,5h	0,101	±	0,003

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

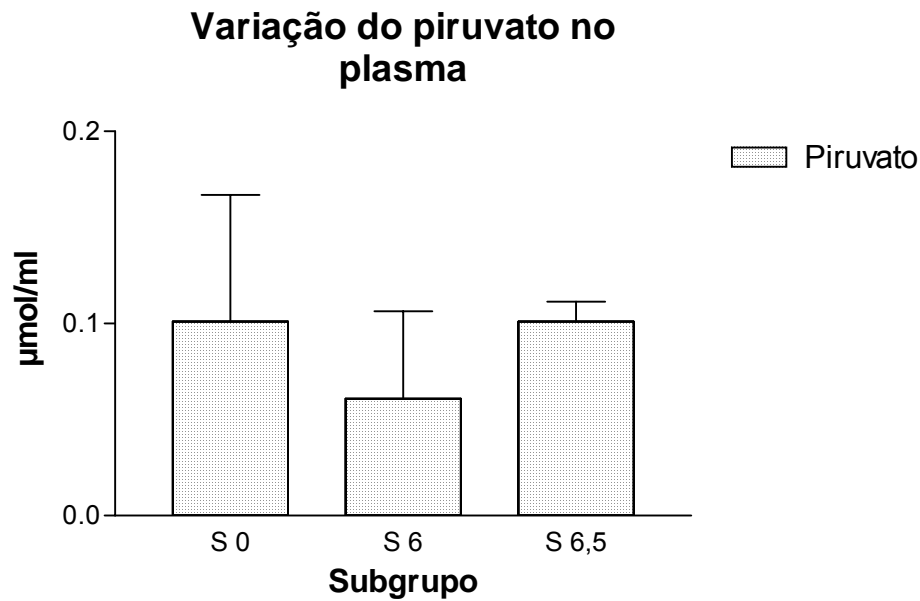


Figura 24 - Concentração do piruvato ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h. S 0: subgrupo Sham 0h. S 6: subgrupo Sham 6h. S 6,5: subgrupo Sham 6,5h

Nota: Teste ANOVA. $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 0

4.1.6 Piruvato tecidual

Comparação entre o subgrupo Sham 0 e os subgrupos Sham 6 e 6,5. Todos os subgrupos receberam caseinato de cálcio por gavagem.

O piruvato tecidual comportou-se com queda significativa em relação aos valores basais após 6h da laparotomia.

Tabela 6 – Concentração do piruvato ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h

Subgrupo	Média		Desvio padrão
Sham 0h	0,087	±	0,040
Sham 6h	0,035	±	0,024
Sham 6,5h	0,030	±	0,033

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

Varição do piruvato no tecido

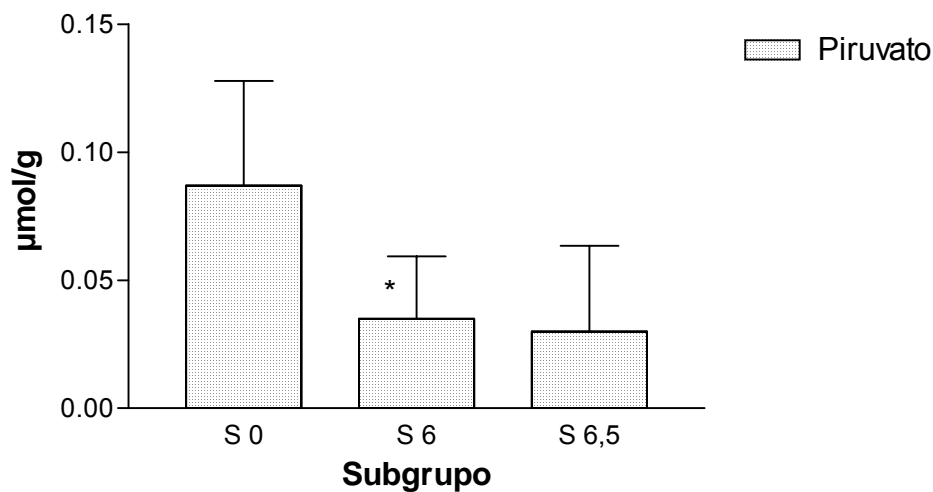


Figura 25 - Concentração do piruvato ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h. S 0: subgrupo Sham 0h. S 6: subgrupo Sham 6h. S 6,5: subgrupo Sham 6,5h

Nota: ANOVA. $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 0

4.1.7 Lactato plasmático

Comparação entre o subgrupo Sham 0 e os subgrupos Sham 6 e 6,5. Todos os subgrupos receberam caseinato de cálcio por gavagem.

O lactato plasmático apresentou manutenção dos valores próximos aos iniciais nos três subgrupos.

Tabela 7 – Concentração do lactato ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h

Subgrupo	Média	Desvio padrão
Sham 0h	2,718	\pm 0,960
Sham 6h	2,288	\pm 1,100
Sham 6,5h	2,338	\pm 0,878

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

Varição do lactato no plasma

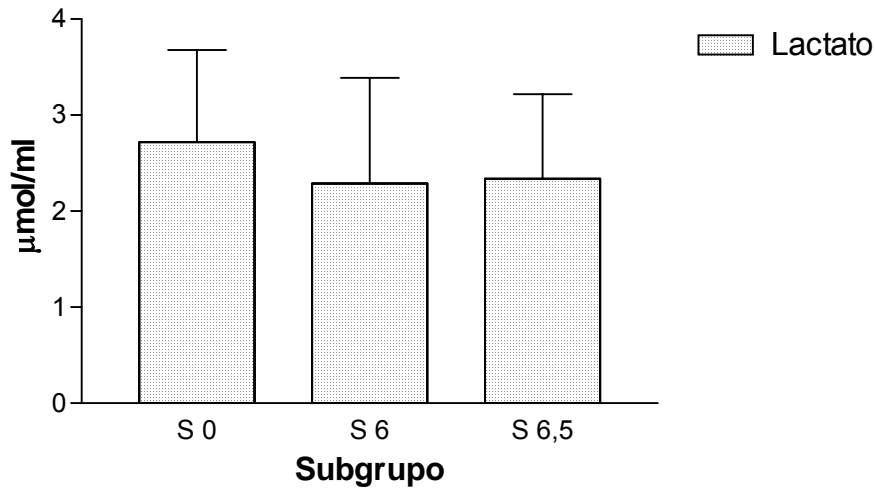


Figura 26 - Concentração do lactato ($\mu\text{mol /ml}$) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h. S 0: subgrupo Sham 0h. S 6: subgrupo Sham 6h. S 6,5: subgrupo Sham 6,5h

Nota: Teste de Kruskal-Wallis. $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 0

4.1.8 Lactato tecidual

Comparação entre o subgrupo Sham 0 e os subgrupos Sham 6 e 6,5. Todos os subgrupos receberam caseinato de cálcio por gavagem.

O lactato tecidual apresentou significativa elevação às seis horas do procedimento inicial.

Tabela 8 – Concentração do lactato ($\mu\text{mol /g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h

Subgrupo	Média	Desvio padrão
Sham 0h	1,572	\pm 0,757
Sham 6h	2,737	\pm 0,498
Sham 6,5h	3,523	\pm 1,274

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

Variação do lactato no tecido

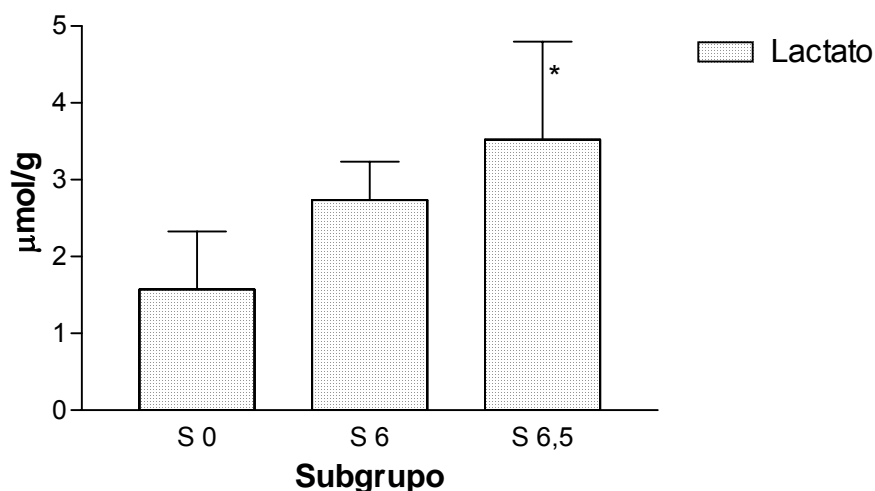


Figura 27 - Concentração do lactato ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h S 0: subgrupo Sham 0h. S 6: subgrupo Sham 6h. S 6,5: subgrupo Sham 6,5h

Nota: Teste ANOVA. $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 0

4.1.9 TBARS plasmático

Comparação entre o subgrupo Sham 0 e os subgrupos Sham 6 e 6,5. Todos os subgrupos receberam caseinato de cálcio por gavagem.

O TBARS plasmático não apresentou qualquer alteração significativa em seus valores.

Tabela 9 – Concentração do TBARS ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h

Subgrupo	Média	desvio padrão
Sham 0h	0,003	\pm 0,003
Sham 6h	0,002	\pm 0,002
Sham 6,5h	0,002	\pm 0,002

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

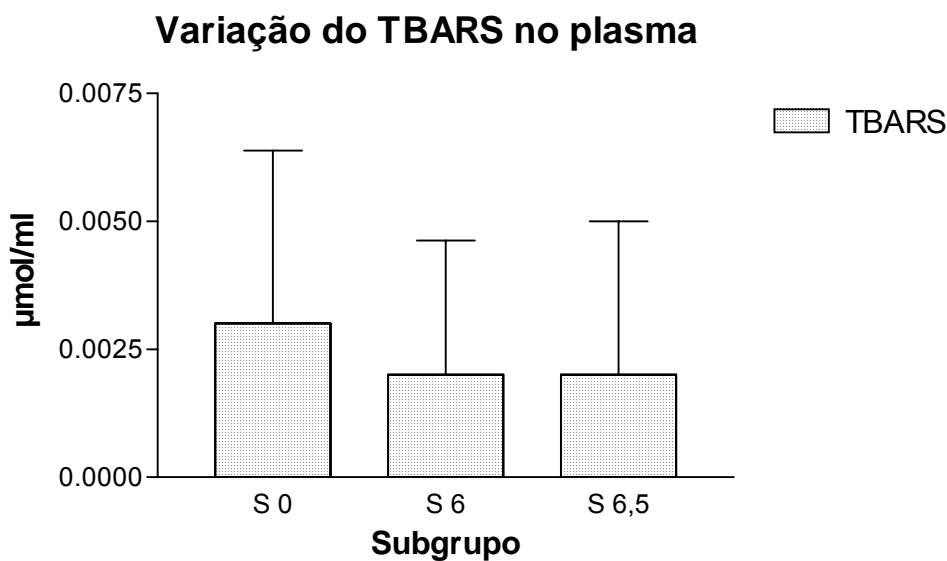


Figura 28 - Concentração do TBARS ($\mu\text{mol}/\text{ml}$) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h. S 0: subgrupo Sham 0h. S 6: subgrupo Sham 6h. S 6,5: subgrupo Sham 6,5h

Nota: Teste ANOVA. $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 0

4.1.10 TBARS tecidual

Comparação entre o subgrupo Sham 0 e os subgrupos Sham 6 e 6,5. Todos os subgrupos receberam caseinato de cálcio por gavagem.

O TBARS tecidual não apresentou alterações significantes.

Tabela 10 – Concentração do TBARS ($\mu\text{mol}/\text{g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos Sham 6e 6,5h ao subgrupo 0h

Subgrupo	Média		Desvio padrão
Sham 0h	0,006	±	0,001
Sham 6h	0,002	±	0,001
Sham 6,5h	0,006	±	0,003

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

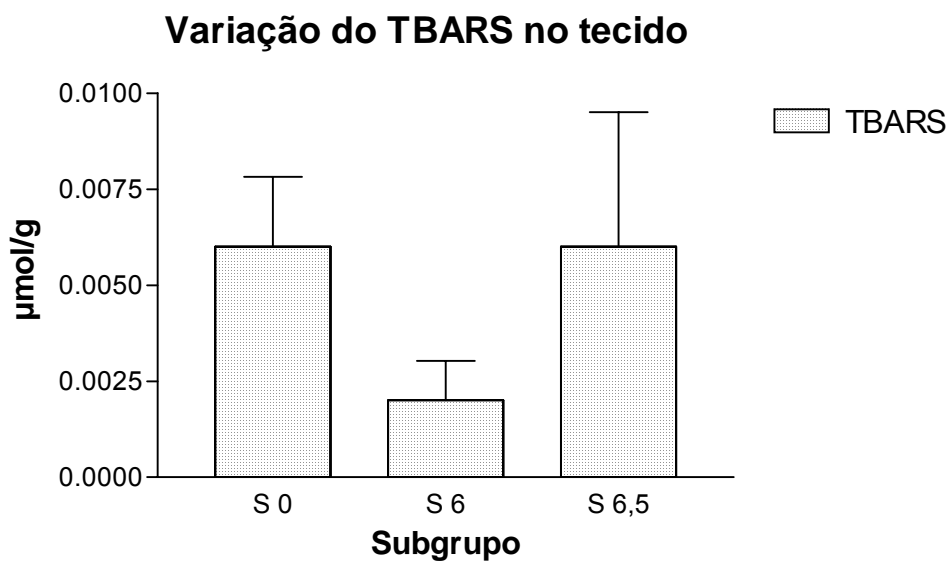


Figura 29 - Concentração do TBARS ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h. S 0: subgrupo Sham 0h. S 6: subgrupo Sham 6h. S 6,5: subgrupo Sham 6,5h

Nota: Teste ANOVA. $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 0

4.1.11 Glutaciona plasmática

Comparação entre o subgrupo Sham 0 e os subgrupos Sham 6 e 6,5. Todos os subgrupos receberam caseinato de cálcio por gavagem.

A glutaciona plasmática apresentou elevação significativa após seis horas do procedimento.

Tabela 11 – Concentração da glutaciona ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h

Subgrupo	Média		Desvio padrão
Sham 0h	5,829	±	1,520
Sham 6h	6,432	±	1,062
Sham 6,5h	9,661	±	5,458

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

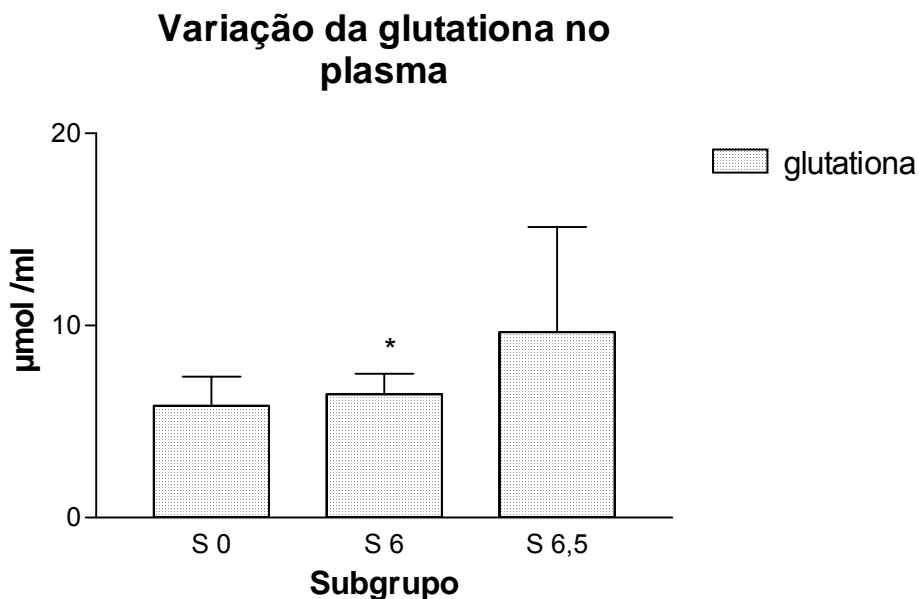


Figura 30 - Concentração da glutaciona ($\mu\text{mol /ml}$) no plasma, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h. S 0: subgrupo Sham 0h. S 6: subgrupo Sham 6h. S 6,5: subgrupo Sham 6,5h

Nota: Teste ANOVA. $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 0

4.1.12 Glutaciona tecidual

Comparação entre o subgrupo Sham 0 e os subgrupos Sham 6 e 6,5. Todos os subgrupos receberam caseinato de cálcio por gavagem.

A glutaciona tecidual não apresentou, variações significativas nos tempos de 6 e 6,5h.

Tabela 12 – Concentração da glutaciona ($\mu\text{mol /g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h

Subgrupo	Média	Desvio padrão
Sham 0h	16,204	\pm 3,883
Sham 6h	14,737	\pm 0,873
Sham 6,5h	15,457	\pm 2,270

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

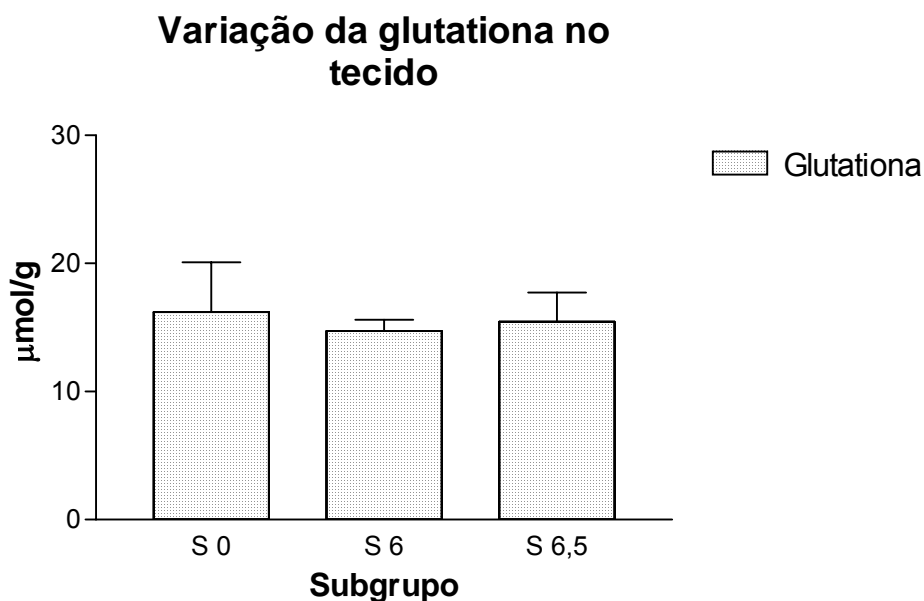


Figura 31 - Concentração da glutathiona ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos Sham 6 e 6,5h ao subgrupo 0h. S 0: subgrupo Sham 0h. S 6: subgrupo Sham 6h. S 6,5: subgrupo Sham 6,5h

Nota: Teste ANOVA. $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 0

4.2 Efeitos da isquemia e da isquemia pré-tratada com OKG sobre os parâmetros metabólicos estudados

4.2.1 CPK plasmática

A primeira comparação será entre os subgrupos S 6 e IC 6; a segunda comparação será entre os subgrupos S 6 e Ia 6; a terceira comparação será entre os grupos S 6 e Ia 6.

A CPK variou após 6h de isquemia com elevação significativa do subgrupo controle submetido à isquemia de 6h (IC 6) em relação ao subgrupo sem isquemia (S 6).

O subgrupo de teste OKG (Ia 6) mostrou-se significativamente mais elevado que o S 6 e o IC 6.

Tabela 13 – Concentração da CPK (ui/l) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6, IC 6 e I α 6

Subgrupo	Média	Desvio padrão
Sham 6h	141,833 \pm	47,880
Isquemia + caseinato 6h	635,167 \pm	231,707
Isquemia + OKG 6h	868,167 \pm	308,298

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

Varição da CPK plasmática na isquemia

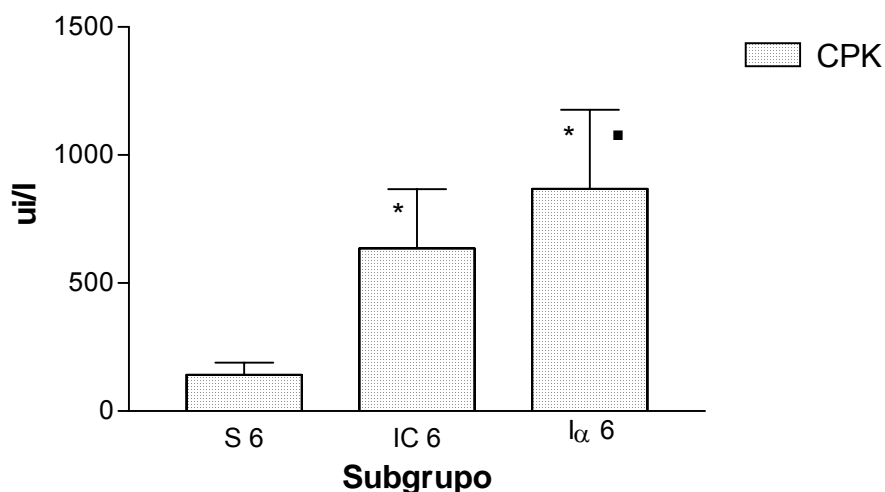


Figura 32 - Concentração da CPK (ui/l) no plasma, comparando-se os subgrupos S 6 X IC 6; S 6 X I α 6 e IC 6 X I α 6 – S 6: subgrupo Sham 6h. IC 6: subgrupo isquemia 6h + caseinato. I α 6: subgrupo isquemia 6h + OKG

Nota: Teste ANOVA. $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 6, ■ diferença significativa do I α 6 em relação ao IC 6

4.2.2 LDH plasmática

A primeira comparação será entre os subgrupos S 6 e IC 6; a segunda comparação será entre os subgrupos IC 6 e I α 6; a terceira comparação será entre os grupos S 6 e I α 6.

A LDH apresentou elevação significativa de seus níveis após 6h de isquemia e queda significativa de seus níveis no subgrupo que utilizou a OKG, este último não apresentou variação significativa em relação ao S 6.

Tabela 14 – Concentração da LDH (ui/l) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6, IC 6 e I α 6

Subgrupo	Média		Desvio padrão
Sham 6h	248,960	±	80,621
Isquemia + caseinato 6h	551,162	±	142,627
Isquemia + OKG 6h	296,267	±	93,619

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

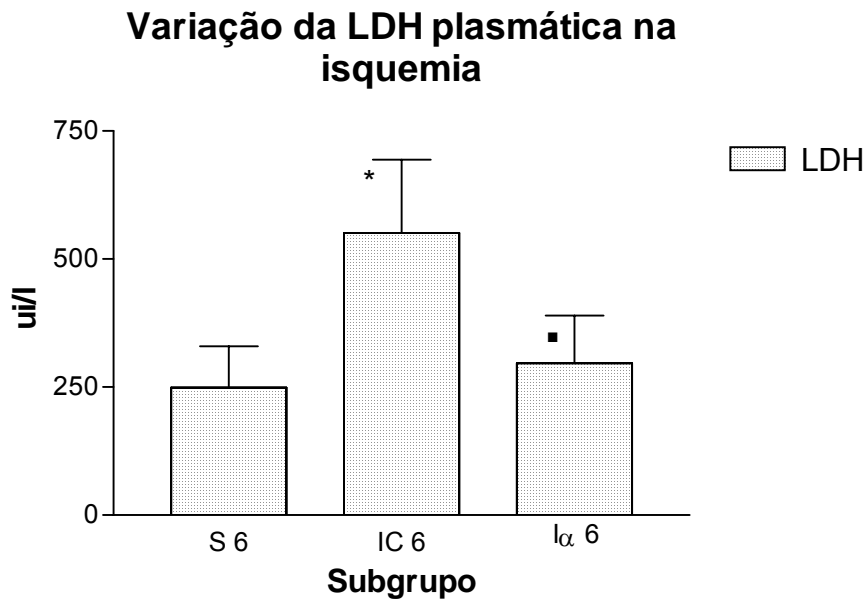


Figura 33 - Concentração da LDH (ui/l) no plasma, comparando-se os subgrupos S 6 X IC 6; S 6 X I α 6 e IC 6 X I α 6 – S 6: subgrupo Sham 6h. IC 6: subgrupo isquemia 6h + caseinato. I α 6: subgrupo isquemia 6h + OKG

Nota: Teste de ANOVA. $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 6, ■ diferença significativa do I α 6 em relação ao IC 6

4.2.3 Glicose plasmática

A primeira comparação será entre os subgrupos S 6 e IC 6; a segunda comparação será entre os subgrupos IC 6 e I α 6; a terceira comparação será entre os grupos S 6 e I α 6.

A glicose plasmática não apresentou variação significativa de seus níveis após 6h de isquemia, mostrando queda significativa quando foi utilizada a droga teste (OKG), quando comparada ao IC 6; não tendo havido variação significativa do I α 6 em relação ao S 6.

Tabela 15 – Concentração da glicose (mg/dl) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6, IC 6 e I α 6

Subgrupo	Média		Desvio padrão
Sham 6h	127,333	±	40,648
Isquemia + caseinato 6h	160,333	±	27,478
Isquemia + OKG 6h	104,167	±	20,817

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

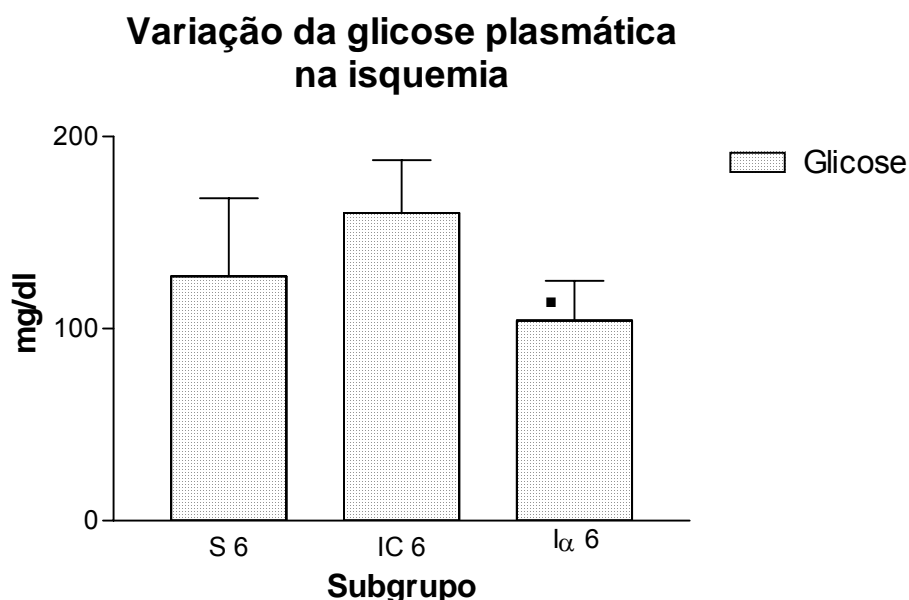


Figura 34 - Concentração da glicose (mg/dl) no plasma, comparando-se os subgrupos S 6 X IC 6; S 6 X I α 6 e IC 6 X I α 6 – S 6: subgrupo Sham 6h. IC 6: subgrupo isquemia 6h + caseinato. I α 6: subgrupo isquemia 6h + OKG

Nota: Teste ANOVA. $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 6, \blacksquare diferença significativa do I α 6 em relação ao IC 6

4.2.4 G6PDH tecidual

A primeira comparação será entre os subgrupos S 6 e IC 6; a segunda comparação será entre os subgrupos IC 6 e I α 6; a terceira comparação será entre os grupos S 6 e I α 6.

A G6PDH não apresentou variações significantes.

Tabela 16 – Concentração da G6PDH ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, analisando-se os subgrupos S 6, IC 6 e I α 6

Subgrupo	Média	Desvio padrão
Sham 6h	0,4220	\pm 0,237
Isquemia + caseinato 6h	0,2200	\pm 0,092
Isquemia + OKG 6h	0,4617	\pm 0,223

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

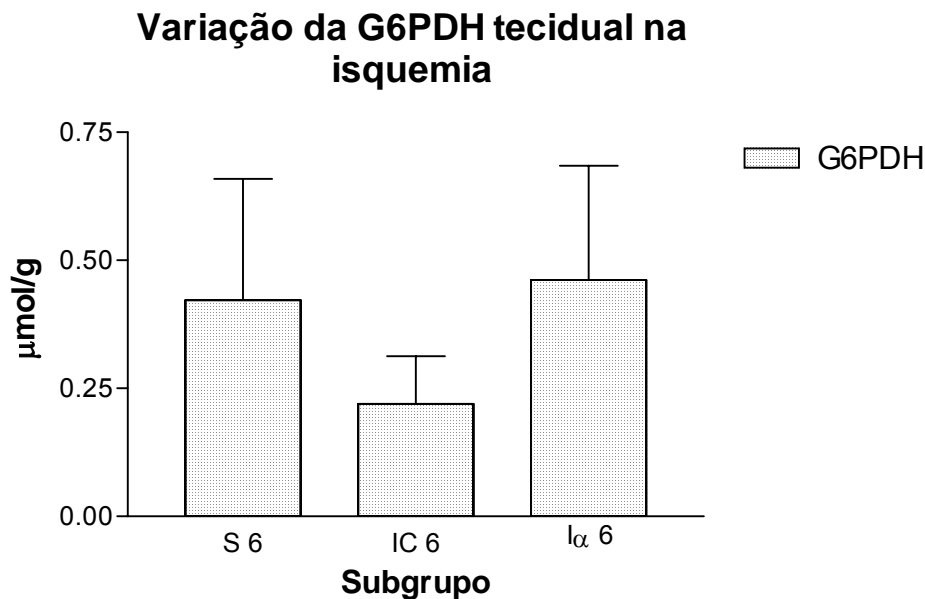


Figura 35 - Concentração da G6PDH ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos S 6 X IC 6; S 6 X I α 6 e IC 6 X I α 6 – S 6: subgrupo Sham 6h. IC 6: subgrupo isquemia 6h + caseinato. I α 6: subgrupo isquemia 6h + OKG
Nota: Teste ANOVA. $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 6, \square diferença significativa do I α 6 em relação ao IC 6

4.2.5 Piruvato plasmático

A primeira comparação será entre os subgrupos S 6 e IC 6; a segunda comparação será entre os subgrupos IC 6 e I α 6; a terceira comparação será entre os grupos S 6 e I α 6.

O piruvato plasmático apresentou elevação significativa dos seus níveis no subgrupo controle submetido à isquemia e redução de seus níveis para valores próximos aos basais nos subgrupos que utilizou a OKG, não tendo havido variação significativa do I α 6 em relação ao S 6.

Tabela 17 – Concentração da piruvato ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6, IC 6 e I α 6

Subgrupo	Média		Desvio padrão
Sham 6h	0,061	±	0,045
Isquemia + caseinato 6h	0,390	±	0,069
Isquemia + OKG 6h	0,046	±	0,011

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

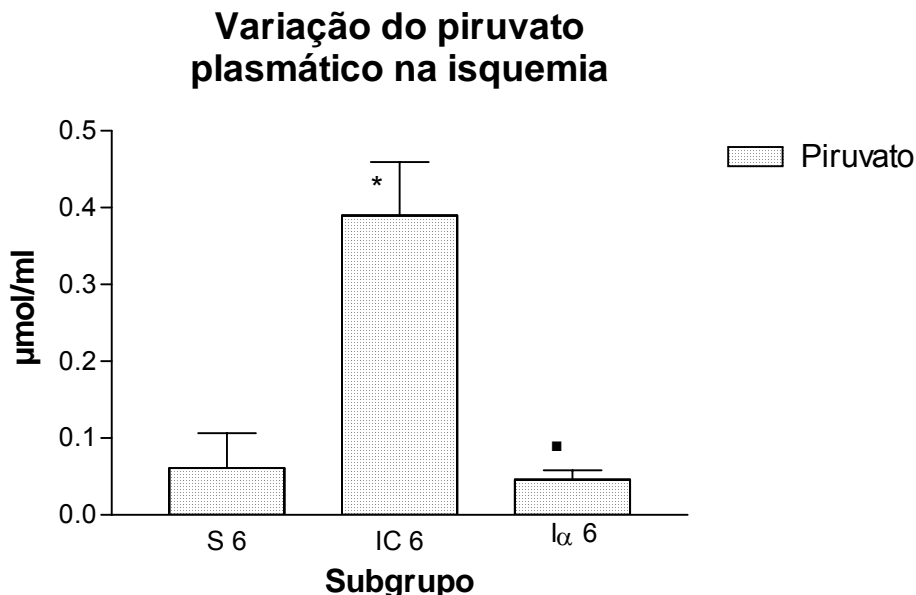


Figura 36 - Concentração do piruvato ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, comparando-se os subgrupos S 6 X IC 6; S 6 X I α 6 e IC 6 X I α 6 – S 6: subgrupo Sham 6h. IC 6: subgrupo isquemia 6h + caseinato. I α 6: subgrupo isquemia 6h + OKG

Nota: Teste ANOVA. $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 6, ■ diferença significativa do I α 6 em relação ao IC 6

4.2.6 Piruvato tecidual

A primeira comparação será entre os subgrupos S 6 e IC 6; a segunda comparação será entre os subgrupos IC 6 e I α 6; a terceira comparação será entre os grupos S 6 e I α 6.

O piruvato tecidual apresentou elevação significativa dos seus níveis no subgrupo controle submetido à isquemia e redução de seus níveis para valores próximos aos basais nos subgrupos que utilizou a OKG, não tendo havido variação significativa do I α 6 em relação ao S 6.

Tabela 18 – Concentração da piruvato ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, analisando-se os subgrupos S 6, IC 6 e I α 6

Subgrupo	Média		Desvio padrão
Sham 6h	0,035	±	0,024
Isquemia + caseinato 6h	0,127	±	0,044
Isquemia + OKG 6h	0,047	±	0,031

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

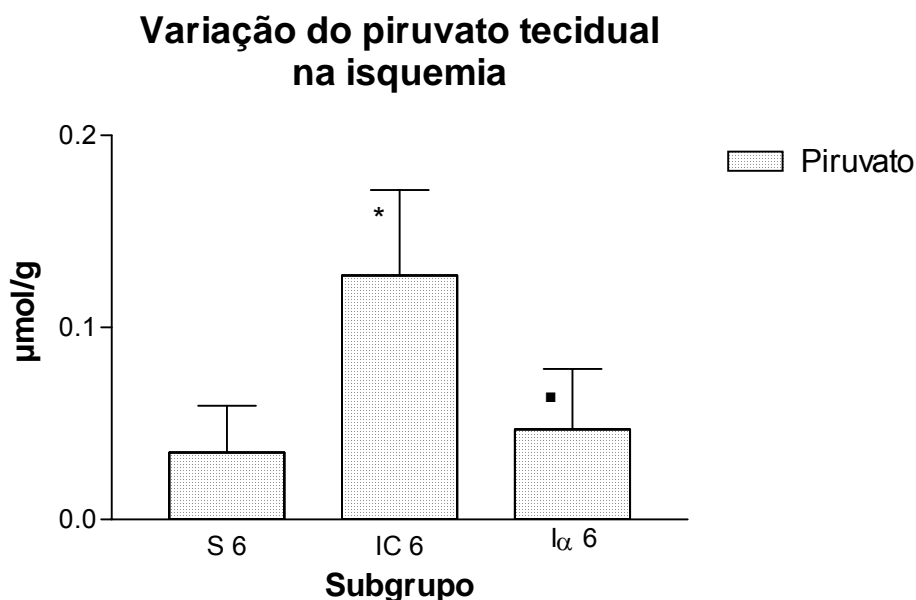


Figura 37 - Concentração do piruvato ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos S 6 X IC 6; S 6 X I α 6 e IC 6 X I α 6 – S 6: subgrupo Sham 6h. IC 6: subgrupo isquemia 6h + caseinato. I α 6: subgrupo isquemia 6h + OKG

Nota: Teste ANOVA. $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 6, ▪ diferença significativa do I α 6 em relação ao IC 6

4.2.7 Lactato plasmático

A primeira comparação será entre os subgrupos S 6 e IC 6; a segunda comparação será entre os subgrupos IC 6 e I α 6; a terceira comparação será entre os grupos S 6 e I α 6.

O lactato plasmático não apresentou variações significantes.

Tabela 19 – Concentração da lactato ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6, IC 6 e I α 6

Subgrupo	Média	Desvio padrão
Sham 6h	2,288	\pm 1,100
Isquemia + caseinato 6h	3,918	\pm 1,937
Isquemia + OKG 6h	6,100	\pm 3,351

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

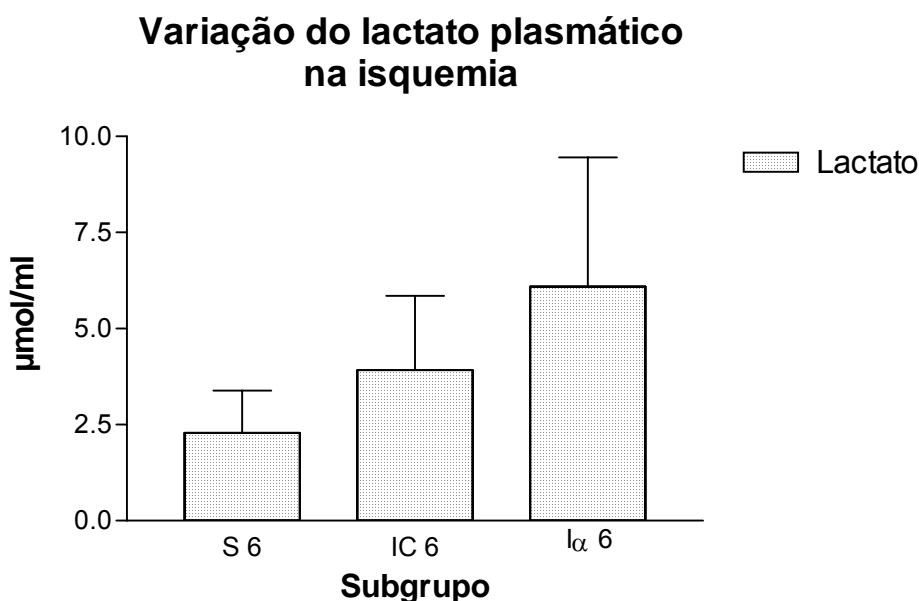


Figura 38 - Concentração do lactato ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, comparando-se os subgrupos S 6 X IC 6; S 6 X I α 6 e IC 6 X I α 6 – S 6: subgrupo Sham 6h. IC 6: subgrupo isquemia 6h + caseinato. I α 6: subgrupo isquemia 6h + OKG

Nota: Teste de Kruskal-Wallis. $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 6, ■ diferença significativa do I α 6 em relação ao IC 6

4.2.8 Lactato tecidual

A primeira comparação será entre os subgrupos S 6 e IC 6; a segunda comparação será entre os subgrupos IC 6 e I α 6; a terceira comparação será entre os grupos S 6 e I α 6.

O lactato tecidual, por sua vez, elevou **significativamente** sua concentração no subgrupo controle submetido à isquemia IC 6 e reduziu esses valores para nível próximo ao basal no subgrupo que utilizou a OKG (I α 6). O subgrupo I α 6 não apresentou variação significativa em relação ao S 6.

Tabela 20 – Concentração da lactato ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, analisando-se os subgrupos S 6, IC 6 e I α 6

Subgrupo	Média		Desvio padrão
Sham 6h	2,737	±	0,498
Isquemia + caseinato 6h	8,158	±	0,716
Isquemia + OKG 6h	2,478	±	0,746

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

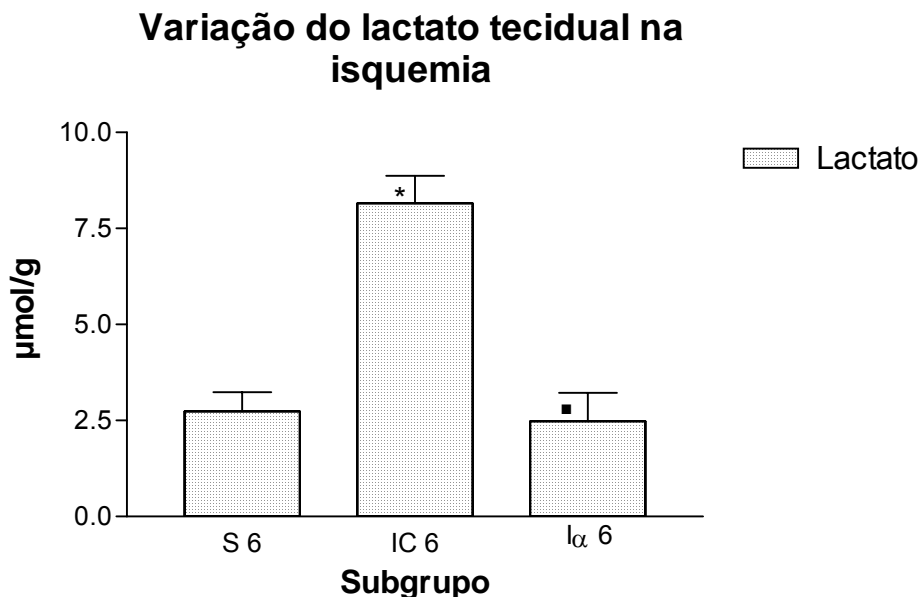


Figura 39 - Concentração do lactato ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos S 6 X IC 6; S 6 X I α 6 e IC 6 X I α 6 – S 6: subgrupo Sham 6h. IC 6: subgrupo isquemia 6h + caseinato. I α 6: subgrupo isquemia 6h + OKG

Nota: Teste ANOVA. $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 6, \blacksquare diferença significativa do I α 6 em relação ao IC 6

4.2.9 TBARS plasmático

A primeira comparação será entre os subgrupos S 6 e IC 6; a segunda comparação será entre os subgrupos IC 6 e I α 6; a terceira comparação será entre os grupos S 6 e I α 6.

O TBARS plasmático não apresentou variações significantes.

Tabela 21 – Concentração do TBARS ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6, IC 6 e I α 6

Subgrupo	Média		Desvio padrão
Sham 6h	0,002	±	0,002
Isquemia + caseinato 6h	0,005	±	0,002
Isquemia + OKG 6h	0,002	±	0,001

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

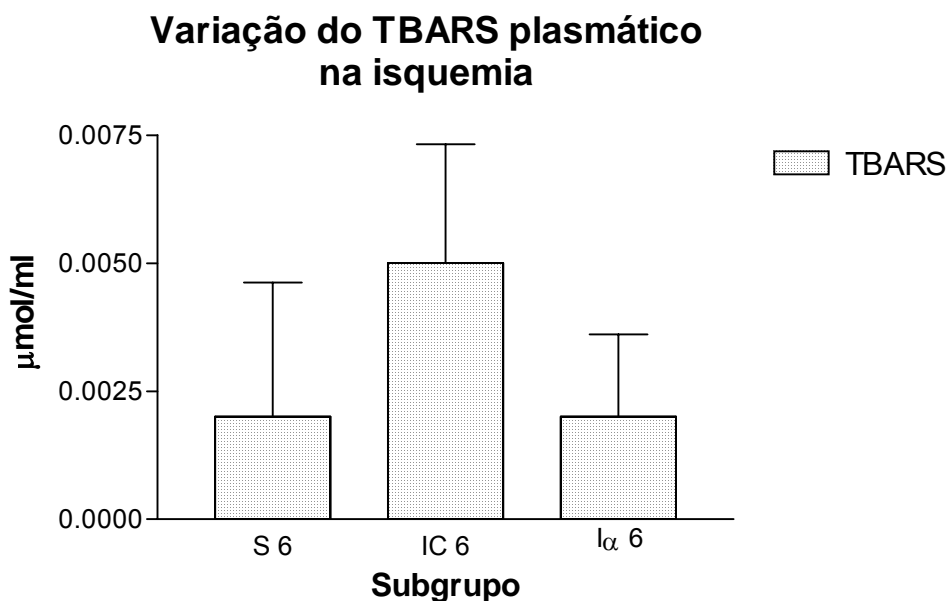


Figura 40 - Concentração do TBARS ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, comparando-se os subgrupos S 6 X IC 6; S 6 X I α 6 e IC 6 X I α 6 – S 6: subgrupo Sham 6h. IC 6: subgrupo isquemia 6h + caseinato. I α 6: subgrupo isquemia 6h + OKG

Nota: Teste ANOVA. $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 6, ■ diferença significativa do I α 6 em relação ao IC 6

4.2.10 TBARS tecidual

A primeira comparação será entre os subgrupos S 6 e IC 6; a segunda comparação será entre os subgrupos IC 6 e I α 6; a terceira comparação será entre os grupos S 6 e I α 6.

O TBARS tecidual por sua vez, elevou significativamente sua concentração no subgrupo controle submetido à isquemia e reduziu-a para valor próximo ao basal no subgrupo que utilizou a OKG. O subgrupo I α 6 não apresentou variação significativa em relação ao S 6.

Tabela 22 – Concentração do TBARS ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, analisando-se os subgrupos S 6, IC 6 e I α 6

Subgrupo	Média		Desvio padrão
Sham 6h	0,002	±	0,001
Isquemia + caseinato 6h	0,012	±	0,003
Isquemia + OKG 6h	0,004	±	0,004

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

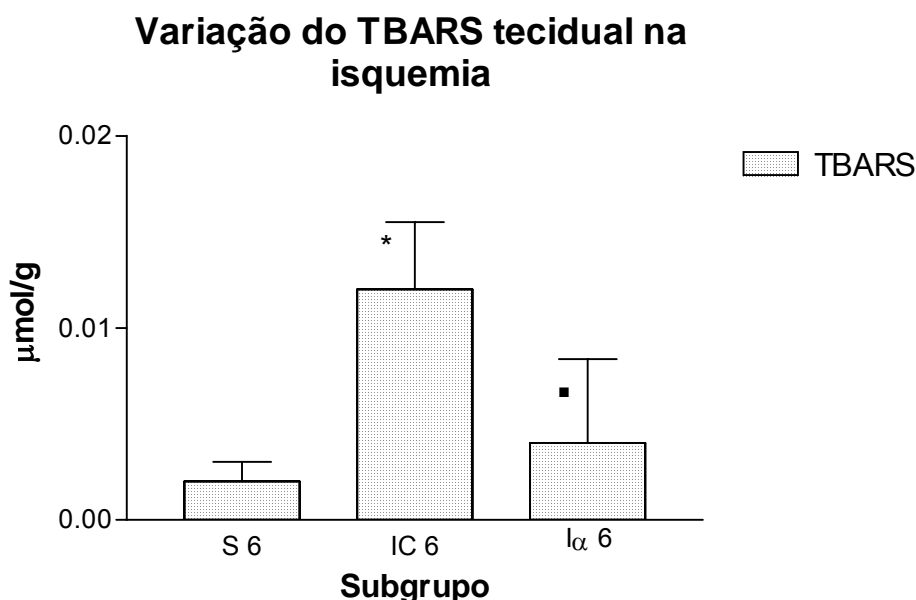


Figura 41 - Concentração do TBARS ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos S 6 X IC 6; S 6 X I α 6 e IC 6 X I α 6 – S 6: subgrupo Sham 6h. IC 6: subgrupo isquemia 6h + caseinato. I α 6: subgrupo isquemia 6h + OKG

Nota: Teste ANOVA. $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 6, ▪ diferença significativa do I α 6 em relação ao IC 6

4.2.11 Glutathiona plasmática

A primeira comparação será entre os subgrupos S 6 e IC 6; a segunda comparação será entre os subgrupos IC 6 e I α 6; a terceira comparação será entre os grupos S 6 e I α 6.

A glutathiona plasmática elevou significativamente sua concentração no subgrupo que utilizou a OKG, tanto em relação ao IC 6, quanto ao S 6.

Tabela 23 – Concentração da glutathiona ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6, IC 6 e I α 6

Subgrupo	Média	Desvio padrão
Sham 6h	6,432	\pm 1,062
Isquemia + caseinato 6h	5,521	\pm 0,926
Isquemia + OKG 6h	19,545	\pm 2,088

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

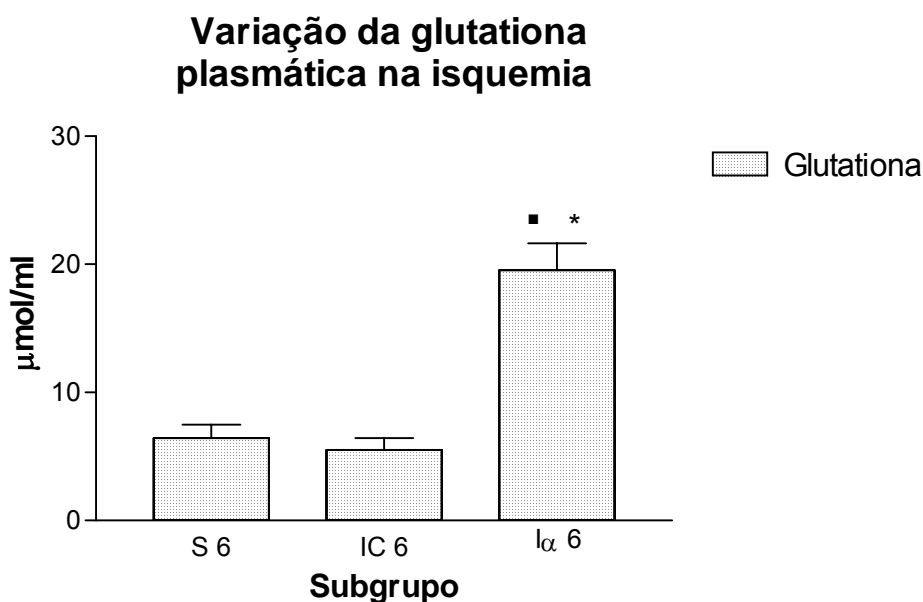


Figura 42 - Concentração da glutathiona ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, comparando-se os subgrupos S 6 X IC 6; S 6 X I α 6 e IC 6 X I α 6 – S 6: subgrupo Sham 6h. IC 6: subgrupo isquemia 6h + caseinato. I α 6: subgrupo isquemia 6h + OKG
Nota: Teste ANOVA. $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 6, ■ diferença significativa do I α 6 em relação ao IC 6

4.2.12 Glutathiona tecidual

A primeira comparação será entre os subgrupos S 6 e IC 6; a segunda comparação será entre os subgrupos IC 6 e I α 6; a terceira comparação será entre os grupos S 6 e I α 6.

A glutathiona tecidual não apresentou variação significativa entre o subgrupo controle de isquemia (IC 6) e o subgrupo sem isquemia (S 6), porém elevação significativa no subgrupo que utilizou a OKG em relação aos demais.

Tabela 24 – Concentração da glutathiona ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, analisando-se os subgrupos S 6, IC 6 e I α 6

Subgrupo	Média	Desvio padrão
Sham 6h	14,737 \pm	0,873
Isquemia + caseinato 6h	14,443 \pm	2,092
Isquemia + OKG 6h	101,851 \pm	16,457

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

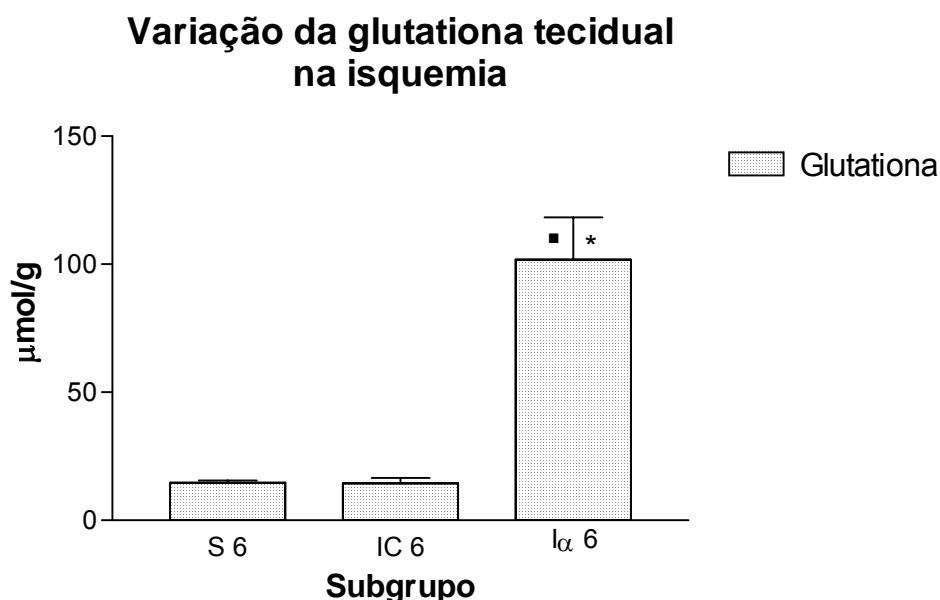


Figura 43 - Concentração da glutathiona ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos S 6 X IC 6; S 6 X I α 6 e IC 6 X I α 6 – S 6: subgrupo Sham 6h. IC 6: subgrupo isquemia 6h + caseinato. I α 6: subgrupo isquemia 6h + OKG

Nota: Teste ANOVA. $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 6, ■ diferença significativa do I α 6 em relação ao IC 6

4.3 Efeitos da isquemia-reperfusão e da isquemia-reperfusão pré-tratada com OKG sobre os parâmetros metabólicos estudados

4.3.1 CPK plasmática

A primeira comparação será entre os subgrupos S 6,5 e RC 6,5; a segunda comparação será entre os subgrupos RC 6,5 e R α 6,5; a terceira comparação será entre os grupos S 6,5 e R α 6,5.

Houve elevação significativa na concentração de CPK plasmática tanto do subgrupo RC 6,5, quanto do R α 6,5, em relação ao subgrupo S 6,5. Os subgrupos RC 6,5 e R α 6,5 não variaram significativamente entre si.

Tabela 25 – Concentração da CPK (ui/l) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6,5, RC 6,5 e R α 6,5

Subgrupo	Média	Desvio padrão
Sham 6,5h	180,667	± 70,193
Reperfusão + caseinato 6,5h	606,333	± 79,846
Reperfusão + OKG 6,5h	558,000	± 102,833

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

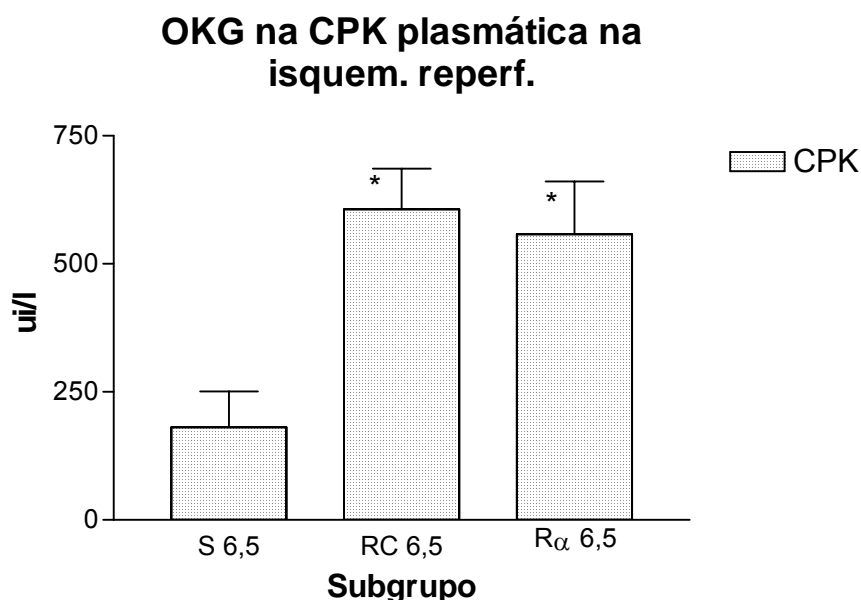


Figura 44 - Concentração da CPK (ui/l) no plasma, comparando-se os subgrupos S 6,5 X RC 6,5, S 6,5 e R α 6,5 e RC 6,5 X R α 6,5. Onde S 6,5: subgrupo Sham 6,5h + caseinato. RC 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + caseinato. Subgrupo R α 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + OKG

Nota: Teste ANOVA em subgrupos de 6 ratos, $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 6,5, • diferença significativa do RC 6,5 em relação ao R α 6,5

4.3.2 LDH plasmática

A primeira comparação será entre os subgrupos S 6,5 e RC 6,5; a segunda comparação será entre os subgrupos RC 6,5 e R α 6,5; a terceira comparação será entre os grupos S 6,5 e I α 6,5.

Os subgrupos não variaram entre si.

Tabela 26 – Concentração da LDH (ui/l) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6,5, RC 6,5 e R α 6,5

Subgrupo	Média		Desvio padrão
Sham 6,5h	309,710	±	245,738
Reperusão + caseinato 6,5h	517,000	±	183,589
Reperusão + OKG 6,5h	602,000	±	224,033

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

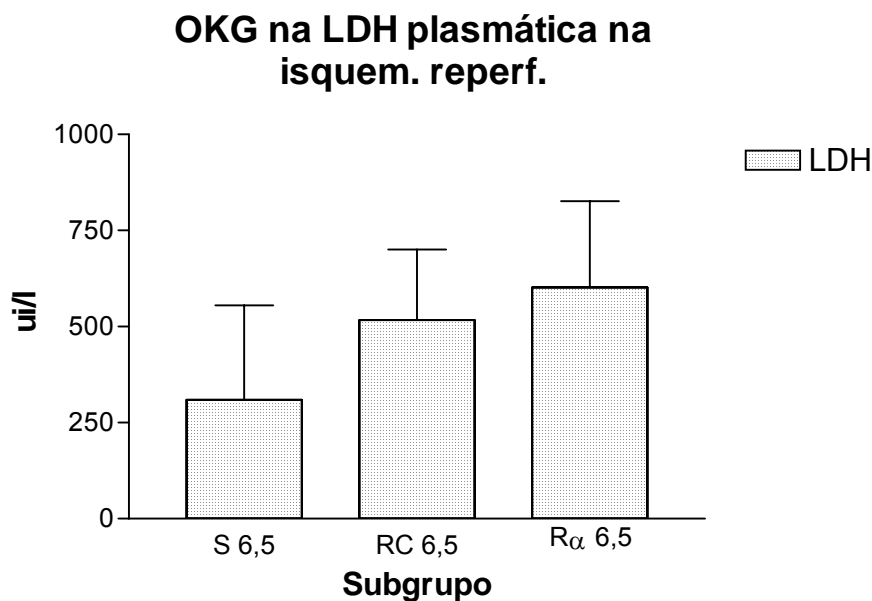


Figura 45 - Concentração da LDH (ui/l) no plasma, comparando-se os subgrupos S 6,5 X RC 6,5, S 6,5 e R α 6,5 e RC 6,5 X R α 6,5. Onde S 6,5: subgrupo Sham 6,5h + caseinato. RC 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + caseinato. Subgrupo R α 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + OKG

Nota: Teste ANOVA em subgrupos de 6 ratos, $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 6,5, diferença significativa do RC 6,5 em relação ao R α 6,5

4.3.3 Glicose plasmática

A primeira comparação será entre os subgrupos S 6,5 e RC 6,5; a segunda comparação será entre os subgrupos RC 6,5 e R α 6,5; a terceira comparação será entre os grupos S 6,5 e R α 6,5.

Houve elevação significativa nos níveis de glicose plasmática, para o subgrupo que usou OKG (R α 6,5) em relação ao S 6,5. Houve, ainda, elevação significativa da concentração de glicose do R α 6,5 em relação ao RC 6,5.

Tabela 27 – Concentração da glicose (mg/dl) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6,5, RC 6,5 e R α 6,5

Subgrupo	Média	Desvio padrão
Sham 6,5h	118,167	± 24,227
Reperusão + caseinato 6,5h	158,000	± 24,207
Reperusão + OKG 6,5h	232,167	± 59,760

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

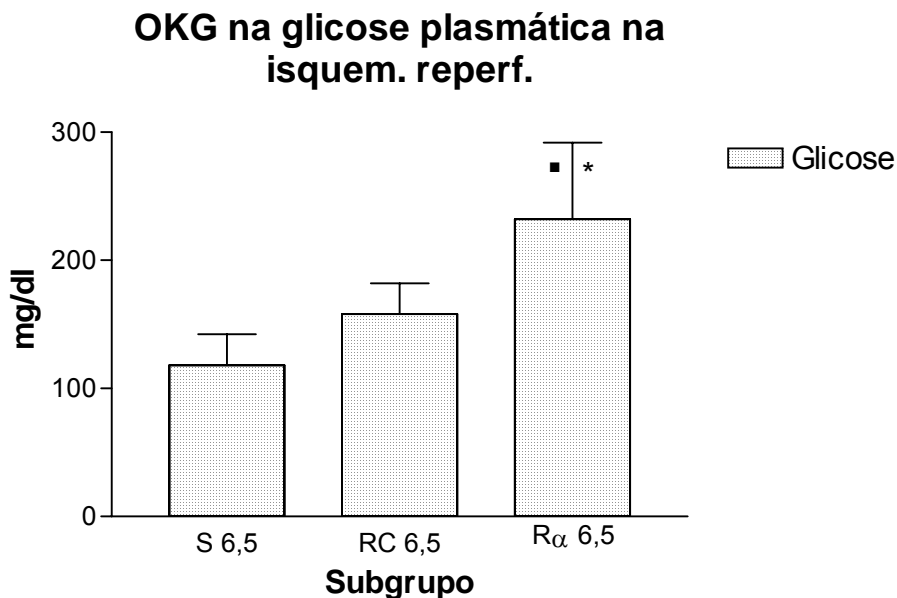


Figura 46 - Concentração da glicose (mg/dl) no plasma, comparando-se os subgrupos S 6,5 X RC 6,5, S 6,5 e R α 6,5 e RC 6,5 X R α 6,5. Onde S 6,5: subgrupo Sham 6,5h + caseinato. RC 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + caseinato. Subgrupo R α 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + OKG

Nota: Teste ANOVA em subgrupos de 6 ratos, $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 6,5, ▀ diferença significativa do RC 6,5 em relação ao R α 6,5

4.3.4 G6PDH tecidual

A primeira comparação será entre os subgrupos S 6,5 e RC 6,5; a segunda comparação será entre os subgrupos RC 6,5 e R α 6,5; a terceira comparação será entre os grupos S 6,5 e R α 6,5.

Houve significativa queda nos níveis de G6PDH dos subgrupos RC 6,5 e R α 6,5 em relação ao S 6,5.

Tabela 28 – Concentração da G6PDH ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, analisando-se os subgrupos S 6,5, RC 6,5 e R α 6,5

Subgrupo	Média	Desvio padrão
Sham 6,5h	0,462 \pm	0,223
Reperusão + caseinato 6,5h	0,207 \pm	0,223
Reperusão + OKG 6,5h	0,182 \pm	0,227

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

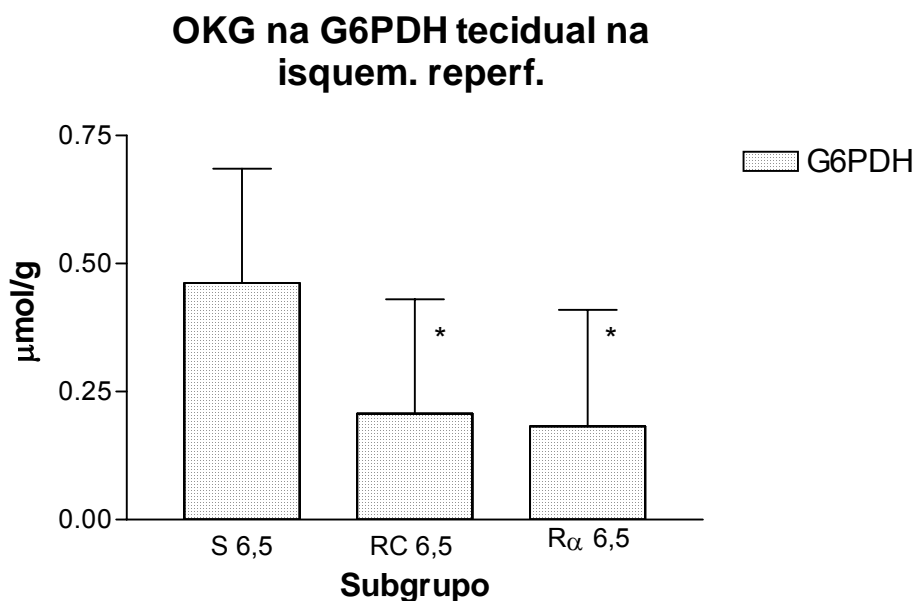


Figura 47 - Concentração da G6PDH ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos S 6,5 X RC 6,5, S 6,5 e R α 6,5 e RC 6,5 X R α 6,5. Onde S 6,5: subgrupo Sham 6,5h + caseinato. RC 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + caseinato. Subgrupo R α 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + OKG
Nota: Teste ANOVA em subgrupos de 6 ratos, $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 6,5, • diferença significativa do RC 6,5 em relação ao R α 6,5

4.3.5 Piruvato plasmático

A primeira comparação será entre os subgrupos S 6,5 e RC 6,5; a segunda comparação será entre os subgrupos RC 6,5 e R α 6,5; a terceira comparação será entre os grupos S 6,5 e R α 6,5.

Os três subgrupos não apresentaram variações significante entre si.

Tabela 29 – Concentração da piruvato ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6,5, RC 6,5 e R α 6,5

Subgrupo	Média		Desvio padrão
Sham 6,5h	0,1010	±	0,003118
Reperusão + caseinato 6,5h	0,1137	±	0,053991
Reperusão + OKG 6,5h	0,0945	±	0,108527

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

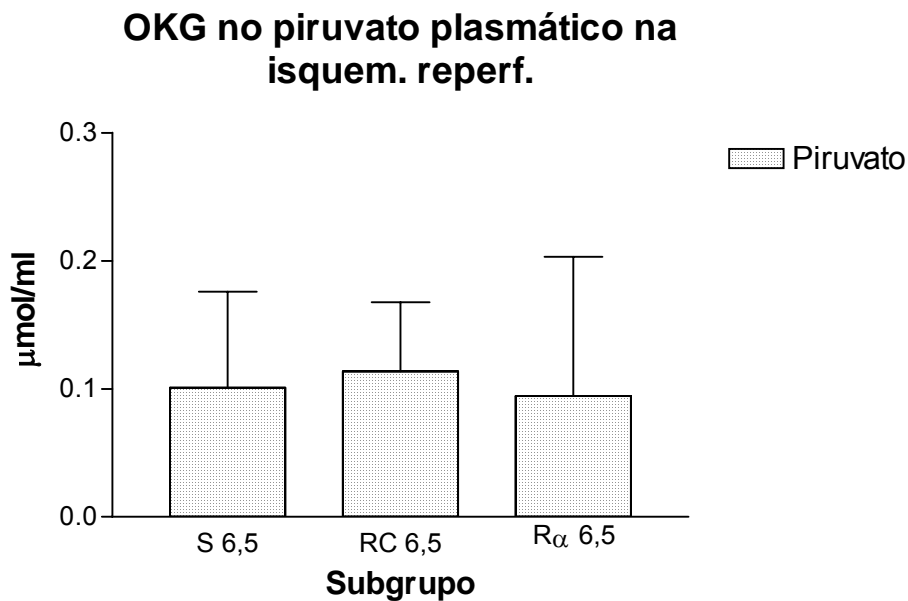


Figura 48 - Concentração do piruvato ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, comparando-se os subgrupos S 6,5 X RC 6,5, S 6,5 e R α 6,5 e RC 6,5 X R α 6,5. Onde S 6,5: subgrupo Sham 6,5h + caseinato. RC 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + caseinato. Subgrupo R α 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + OKG
Nota: Teste ANOVA em subgrupos de 6 ratos, $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 6,5, • diferença significativa do RC 6,5 em relação ao R α 6,5

4.3.6 Piruvato tecidual

A primeira comparação será entre os subgrupos S 6,5 e RC 6,5; a segunda comparação será entre os subgrupos RC 6,5 e R α 6,5; a terceira comparação será entre os grupos S 6,5 e R α 6,5.

Os três subgrupos não variaram significativamente entre si.

Tabela 30 – Concentração do piruvato ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, analisando-se os subgrupos S 6,5, RC 6,5 e R α 6,5

Subgrupo	Média	Desvio padrão
Sham 6,5h	0,0300 \pm	0,033
Reperusão + caseinato 6,5h	0,0650 \pm	0,026
Reperusão + OKG 6,5h	0,0517 \pm	0,014

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

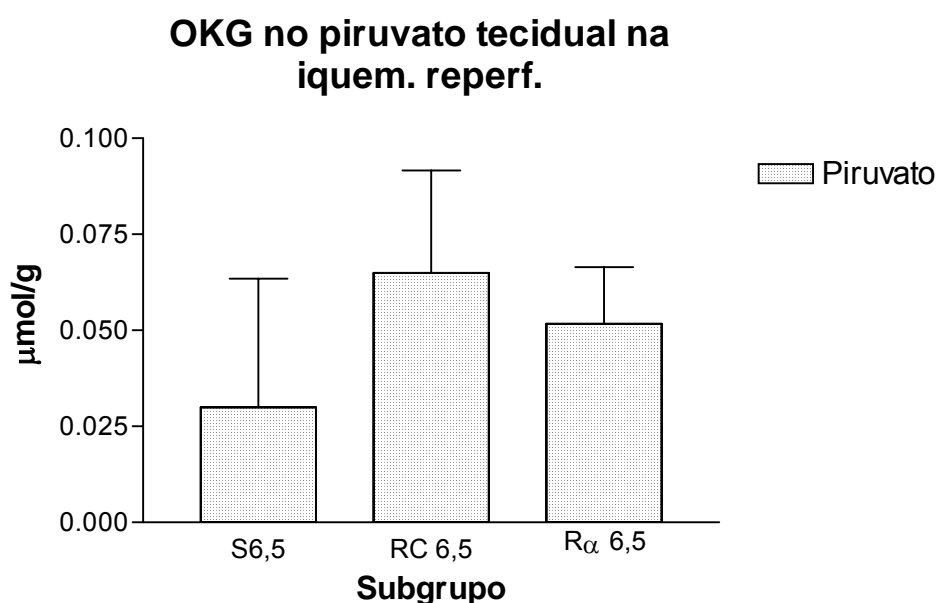


Figura 49 - Concentração do piruvato ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos S 6,5 X RC 6,5, S 6,5 e R α 6,5 e RC 6,5 X R α 6,5. Onde S 6,5: subgrupo Sham 6,5h + caseinato. RC 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + caseinato. Subgrupo R α 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + OKG
Nota: Teste ANOVA em subgrupos de 6 ratos, $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 6,5, ■ diferença significativa do RC 6,5 em relação ao R α 6,5

4.3.7 Lactato plasmático

A primeira comparação será entre os subgrupos S 6,5 e RC 6,5; a segunda comparação será entre os subgrupos RC 6,5 e R α 6,5; a terceira comparação será entre os grupos S 6,5 e R α 6,5.

Os três subgrupos não apresentaram variações significantes entre si.

Tabela 31 – Concentração do lactato ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6,5, RC 6,5 e R α 6,5

Subgrupo	Média	Desvio padrão
Sham 6,5h	2,3380	\pm 0,878
Reperusão + caseinato 6,5h	2,3200	\pm 0,543
Reperusão + OKG 6,5h	2,2167	\pm 0,564

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

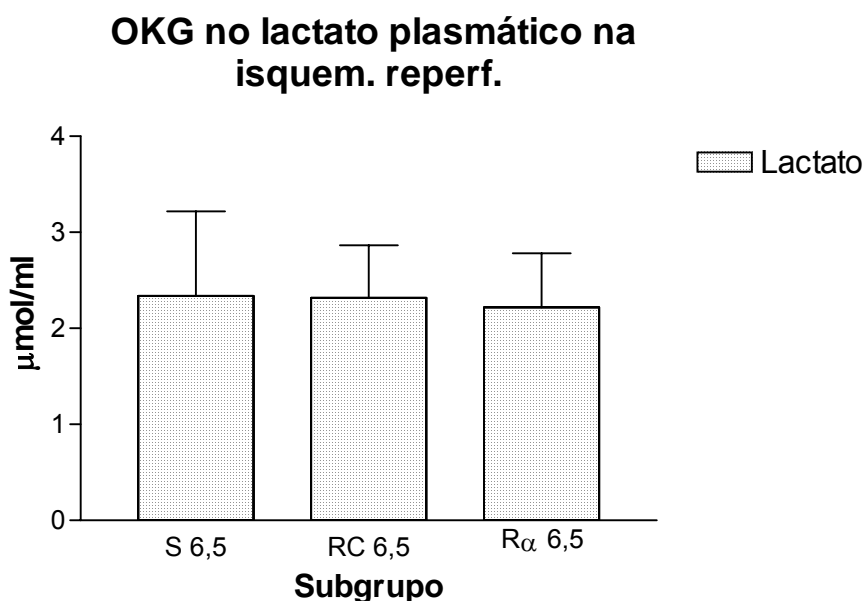


Figura 50 - Concentração do lactato ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, comparando-se os subgrupos S 6,5 X RC 6,5, S 6,5 e R α 6,5 e RC 6,5 X R α 6,5. Onde S 6,5: subgrupo Sham 6,5h + caseinato. RC 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + caseinato. Subgrupo R α 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + OKG
Nota: Teste de Kruskal-Wallis em subgrupos de 6 ratos, $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 6,5, ■ diferença significativa do RC 6,5 em relação ao R α 6,5

4.3.8 Lactato tecidual

A primeira comparação será entre os subgrupos S 6,5 e RC 6,5; a segunda comparação será entre os subgrupos RC 6,5 e R α 6,5; a terceira comparação será entre os grupos S 6,5 e R α 6,5.

Houve alteração significativa na concentração de lactato tecidual após 6h de isquemia e meia hora de reperfusão do subgrupo RC 6,5 em relação ao S 6,5; para o subgrupo que usou OKG (R α 6,5), houve queda significativa dos níveis de lactato tecidual em relação ao RC 6,5. O R α 6,5 não variou significativamente em relação ao S 6,5.

Tabela 32 – Concentração do lactato ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, analisando-se os subgrupos S 6,5, RC 6,5 e R α 6,5

Subgrupo	Média	Desvio padrão
Sham 6,5h	3,523	\pm 1,274
Reperfusão + caseinato 6,5h	7,165	\pm 2,329
Reperfusão + OKG 6,5h	3,636	\pm 1,168

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

OKG no lactato tecidual na isquem. reperf.

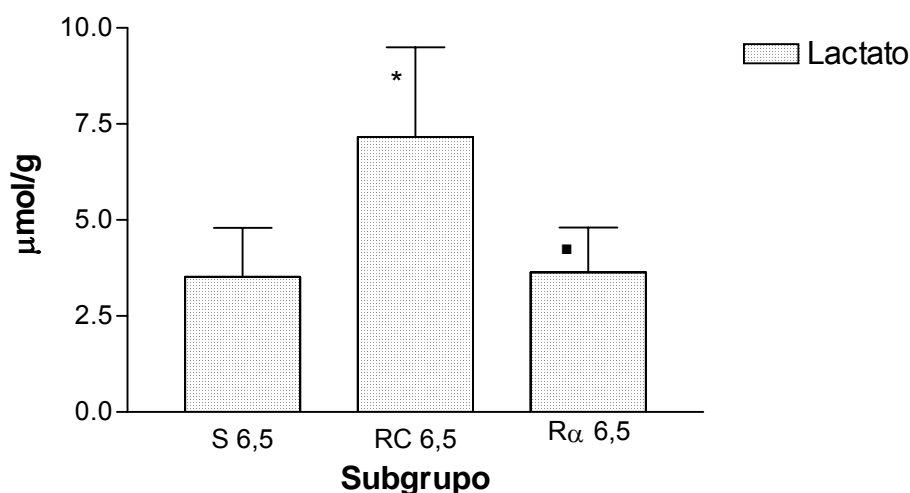


Figura 51 - Concentração do lactato ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos S 6,5 X RC 6,5, S 6,5 e R α 6,5 e RC 6,5 X R α 6,5. Onde S 6,5: subgrupo Sham 6,5h + caseinato. RC 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + caseinato. Subgrupo R α 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + OKG

Nota: Teste ANOVA em subgrupos de 6 ratos, $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 6,5, ▪ diferença significativa do RC 6,5 em relação ao R α 6,5

4.3.9 TBARS plasmático

A primeira comparação será entre os subgrupos S 6,5 e RC 6,5; a segunda comparação será entre os subgrupos RC 6,5 e R α 6,5; a terceira comparação será entre os grupos S 6,5 e R α 6,5.

Os três subgrupos não apresentaram variações significantes entre si.

Tabela 33 – Concentração do TBARS ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6,5, RC 6,5 e R α 6,5

Subgrupo	Média		Desvio padrão
Sham 6,5h	0,0020	±	0,002
Reperusão + caseinato 6,5h	0,0056	±	0,004
Reperusão + OKG 6,5h	0,0029	±	0,001

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

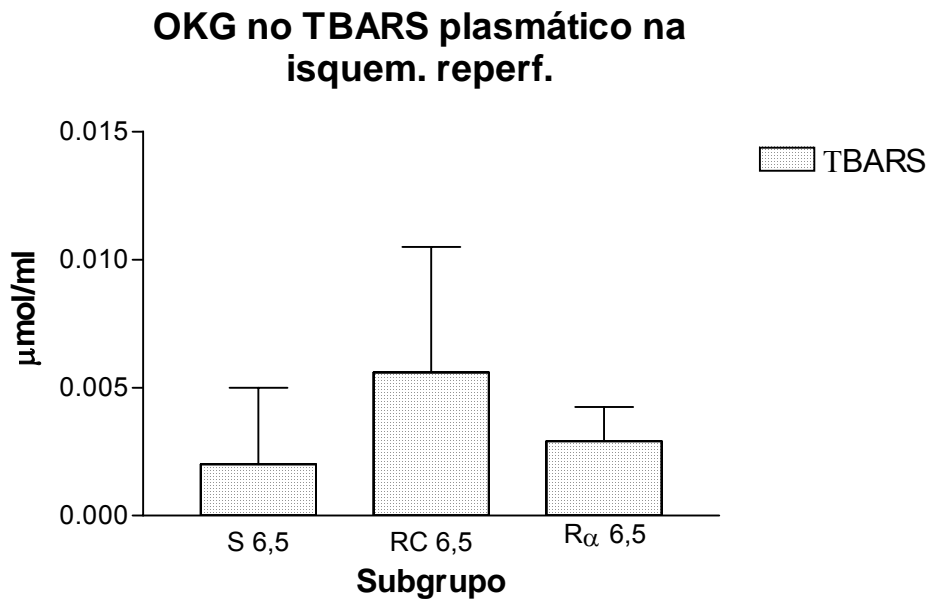


Figura 52 - Concentração do TBARS ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, comparando-se os subgrupos S 6,5 X RC 6,5, S 6,5 e R α 6,5 e RC 6,5 X R α 6,5. Onde S 6,5: subgrupo Sham 6,5h + caseinato. RC 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + caseinato. Subgrupo R α 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + OKG

Nota: Teste ANOVA em subgrupos de 6 ratos, $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 6,5, • diferença significativa do RC 6,5 em relação ao R α 6,5

4.3.10 TBARS tecidual

A primeira comparação será entre os subgrupos S 6,5 e RC 6,5; a segunda comparação será entre os subgrupos RC 6,5 e R α 6,5; a terceira comparação será entre os grupos S 6,5 e R α 6,5.

Os três subgrupos não apresentaram variações significantes entre si.

Tabela 34 – Concentração das TBARS ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, analisando-se os subgrupos S 6,5, RC 6,5 e R α 6,5

Subgrupo	Média	Desvio padrão
Sham 6,5h	0,0060	\pm 0,003
Reperusão + caseinato 6,5h	0,0041	\pm 0,001
Reperusão + OKG 6,5h	0,0029	\pm 0,002

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

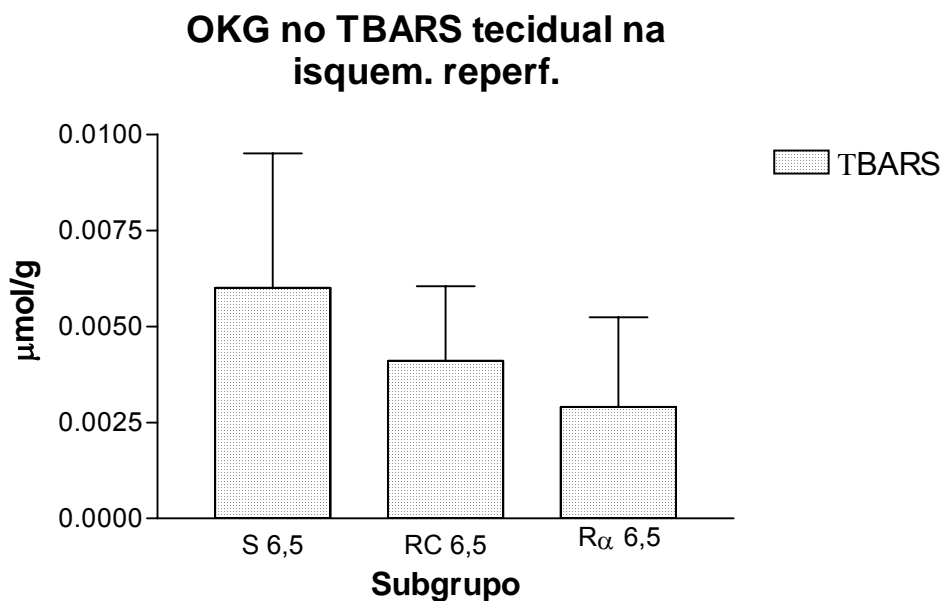


Figura 53 - Concentração do TBARS ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos S 6,5 X RC 6,5, S 6,5 e R α 6,5 e RC 6,5 X R α 6,5. Onde S 6,5: subgrupo Sham 6,5h + caseinato. RC 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + caseinato. Subgrupo R α 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + OKG

Nota: Teste ANOVA em subgrupos de 6 ratos, $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 6,5, ■ diferença significativa do RC 6,5 em relação ao R α 6,5

4.3.11 Glutathiona plasmática

A primeira comparação será entre os subgrupos S 6,5 e RC 6,5; a segunda comparação será entre os subgrupos RC 6,5 e R α 6,5; a terceira comparação será entre os grupos S 6,5 e R α 6,5.

Os três subgrupos não apresentaram variações significantes entre si.

Tabela 35 - Tração da glutathiona ($\mu\text{mol/ml}$) no plasma, analisando-se os subgrupos S 6,5, RC 6,5 e R α 6,5

Subgrupo	Média	Desvio padrão
Sham 6,5h	9,6610	\pm 5,458
Reperusão + caseinato 6,5h	13,5307	\pm 1,884
Reperusão + OKG 6,5h	11,6183	\pm 1,990

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

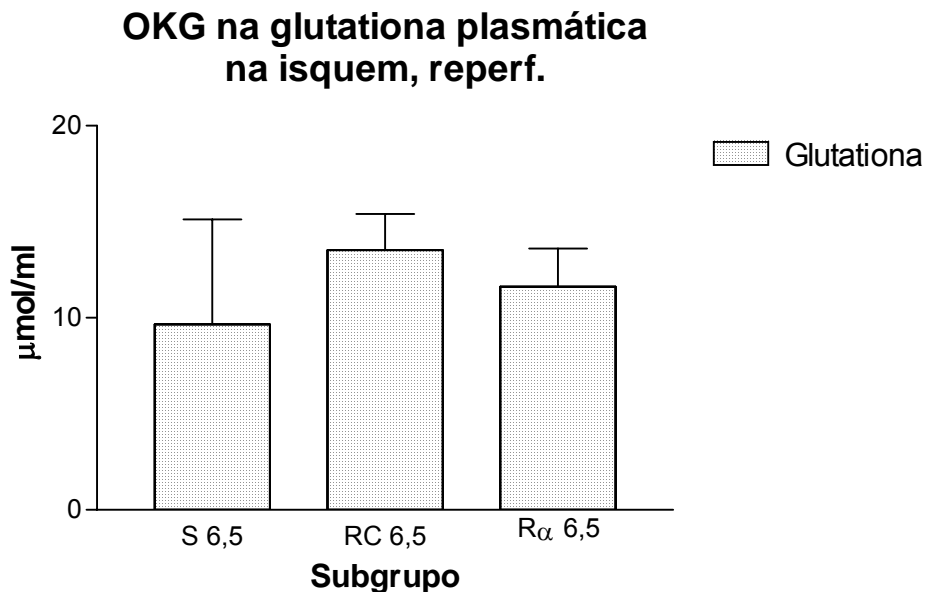


Figura 54 - Concentração da glutathiona ($\mu\text{mol/ml}$) no tecido, comparando-se os subgrupos S 6,5 X RC 6,5, S 6,5 e R α 6,5 e RC 6,5 X R α 6,5. Onde S 6,5: subgrupo Sham 6,5h + caseinato. RC 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + caseinato. Subgrupo R α 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + OKG

Nota: Teste ANOVA em subgrupos de 6 ratos, $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 6,5, • diferença significativa do RC 6,5 em relação ao R α 6,5

4.3.12 Glutathiona tecidual

A primeira comparação será entre os subgrupos S 6,5 e RC 6,5; a segunda comparação será entre os subgrupos RC 6,5 e R α 6,5; a terceira comparação será entre os grupos S 6,5 e R α 6,5.

Houve elevação significativa nos níveis teciduais de glutathiona, no subgrupo que recebeu a OKG, em relação aos demais subgrupos.

Tabela 36 – Concentração da glutathiona ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, analisando-se os subgrupos S 6,5, RC 6,5 e R α 6,5

Subgrupo	Média	Desvio padrão
Sham 6,5h	15,4570	\pm 2,270
Reperusão + caseinato 6,5h	16,1728	\pm 1,964
Reperusão + OKG 6,5h	63,1822	\pm 18,989

Média e desvio padrão para subgrupos de 6 ratos

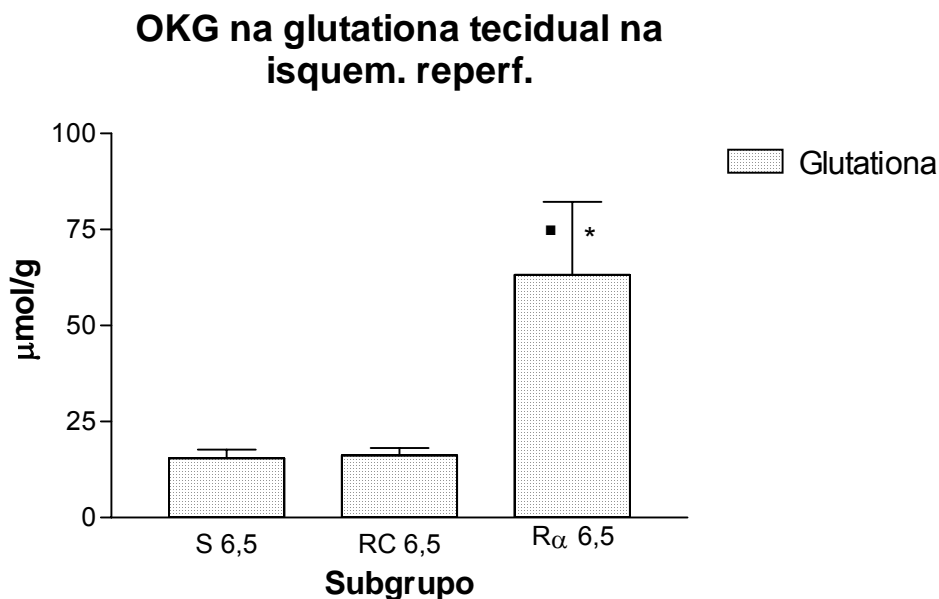


Figura 55 - Concentração da glutathiona ($\mu\text{mol/g}$) no tecido, comparando-se os subgrupos S 6,5 X RC 6,5, S 6,5 e R α 6,5 e RC 6,5 X R α 6,5. Onde S 6,5: subgrupo Sham 6,5h + caseinato. RC 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + caseinato. Subgrupo R α 6,5: subgrupo isquemia 6h com revascularização de 0,5h + OKG

Nota: Teste ANOVA em subgrupos de 6 ratos, $p < 0,05$. * Diferença significativa em relação ao S 6,5, ■ diferença significativa do RC 6,5 em relação ao R α 6,5

5 DISCUSSÃO

As lesões provocadas pela isquemia e reperfusão tecidual representam um grave e freqüente problema de saúde, seu diagnóstico é relativamente fácil, o tratamento, porém, permanece sem uniformização nos diferentes serviços. Esta variação de condutas deriva do fato de não haver estudos comparativos entre as condutas ou uma droga de eleição que demonstre efetividade, fácil manuseio posológico, baixo custo e poucas reações adversas. (DA SILVEIRA; YOSHIDA, 2004).

O presente estudo testa a OKG na isquemia e na reperfusão de membro pélvico de ratos "*rattus norvegicus albinus*", da linhagem OUTB Wistar.

Foi utilizado o rato Wistar, devido tratar-se de um mamífero de baixo custo de aquisição e manutenção, de fácil manuseio e elevada resistência ao trauma cirúrgico e à infecção. Este animal foi utilizado em múltiplos estudos experimentais de isquemia e reperfusão.

Existem na literatura numerosos cronogramas de modelos experimentais para a isquemia e reperfusão, não existindo, porém, um cronograma de pinçamento arterial e reperfusão eleito por vários autores. A maioria dos trabalhos apresenta seu cronograma e modelo de isquemia diferente dos demais. O cronograma deste estudo com pinçamento arterial de 6h foi derivado da análise das principais publicações sobre isquemia-reperfusão de membros em ratos.

Como explicitado acima, vários são os modelos experimentais para a obtenção da isquemia. Devido a anatomia vascular do rato e ao grande número de colaterais arteriais entre a aorta e as ilíacas, do mesmo modo entre ilíacas e femorais, torna-se difícil a obtenção da isquemia por pinçamento de uma única artéria. Se por um lado o modelo do garrote no membro causa total oclusão arterial de um membro, por outro causa também a oclusão venosa, o que difere na fisiopatologia da isquemia arterial pura com o sistema venoso pérvio.

Classicamente o melhor modelo de isquemia é o do transplante do membro com anastomose arterial e venosa, este modelo no entanto apresenta grande dificuldade técnica e perda sanguínea durante sua execução. Um excelente modelo foi desenvolvido por Luyt *et al.*(2003) e baseava-se na retirada total da artéria ilíaca associada à embolização com microesferas da artéria ilíaca interna *ipisi-lateral*. O

elevado custo deste modelo e a impossibilidade de reperfusão desencorajam sua realização.

No presente estudo, o modelo foi uma adaptação daquele de Luyt *et al.* (2003) tendo sido realizado um duplo pinçamento arterial (aórtico e ilíaco distal) e ligadura dos principais ramos ilíacos. Procurou-se obter a exclusão temporária da a. ilíaca direita, mantendo-se a ilíaca esquerda como receptora do fluxo sanguíneo colateral da aorta.

O composto de aminoácidos de teste, ornitina α -cetogluturato, tem sido usado clinicamente em pacientes com desnutrição, cirrose hepática e queimaduras graves. Em procedimentos experimentais, já foi utilizado em modelos de isquemia-reperfusão intestinal e hepática. A partir destes estudos aventou-se a possibilidade de seu uso em isquemia e reperfusão da musculatura estriada esquelética. Os animais de controle receberam um composto protéico, o caseinato de cálcio, com o objetivo de demonstrar que aminoácidos específicos induzem ações positivas sobre o metabolismo e não qualquer composto de aminoácidos.

Serão discutidos a seguir os resultados obtidos com o procedimento cirúrgico, no plasma e no músculo. Após estes o efeitos da isquemia, seguidos pelos efeitos da isquemia-reperfusão, ambos no plasma e músculo.

Efeitos do procedimento cirúrgico sobre os parâmetros metabólitos plasmáticos do grupo Sham, ou seja, como o trauma cirúrgico da laparotomia exploradora inicial afetou o metabolismo dos animais em função do tempo, em 0, 6 e 6,5h.

A fase inicial de resposta orgânica a uma agressão é marcada pelo aumento da disponibilização e consumo de energia (hipermetabolismo). Para suprimir esse aumento do metabolismo, ocorre a mobilização de substrato de energia a partir de fontes orgânicas (músculo esquelético e gordura principalmente), num processo mediado por hormônios, denominado catabolismo pós-trauma. (FERRAZ; FERRAZ, 2005).

- Metabólitos plasmáticos

O procedimento cirúrgico executado no grupo Sham levou a variações significantes nas concentrações de alguns metabólitos.

A CPK apresentou significativa elevação às 6 e 6,5h, em relação ao tempo 0h. A enzima creatino-fosfoquinase aumentou sua concentração, possivelmente devido à necessidade de geração de ATP a partir de fosfocreatina como resposta ao trauma cirúrgico. A creatina é obtida na dieta das carnes vermelhas e peixes, entre 90 e 95% da creatina corporal é encontrada no músculo esquelético, 1/3 na forma livre e 2/3 na forma de creatina fosfato. A creatina fosfato tem por função armazenamento e produção imediata de energia, em presença da CPK, quando existe aumento da demanda; o que correlaciona a elevação da CPK ao trauma, isquemia e reperfusão muscular. (HARRIS; SÖDERLUND; HULTMAN, 1992; ELY *et al.*, 2000; MOTTA, 2000).

A LDH, assim como a CPK, apresentou elevação significativa na sua concentração após 6h. A enzima desidrogenase láctica, participa da glicólise anaeróbica e elevou-se em resposta ao trauma cirúrgico, o que vem de encontro ao estudo de Ely *et al.* (2000), onde a LDH não foi considerada como um parâmetro útil na avaliação de dano muscular esquelético no pós-operatório de ratos. A elevação da LDH foi, entretanto, associada por Motta (2000) ao trauma, lesões musculares e exercícios físicos intensos, todas situações onde ocorre aumento na demanda e aumento do metabolismo anaeróbico da glicose.

Os demais metabólitos não apresentaram alterações significantes no plasma, possivelmente devido a magnitude do trauma.

- Metabólitos teciduais

No músculo, o piruvato apresentou significativa queda no tempo 6h, devido ao fato do metabolismo muscular aeróbico estar preservado e a resposta metabólica ao trauma induzir o aumento do metabolismo. (FERRAZ; FERRAZ, 2005). O piruvato teve seu metabolismo aumentado para produção de energia, fato bem demonstrado no estudo de Basile-Filho *et al.* (2001).

O lactato tecidual apresentou elevação significativa às 6,5h, este fato deve-se ao aumento do metabolismo anaeróbico muscular estimulado pela resposta ao trauma cirúrgico, fato também coincidente com o estudo de Basile-Filho *et al.* (2001) e coincidente, também, com o aumento da LDH plasmática no presente estudo. O aumento do lactato e LDH demonstra claramente um efeito pró-glicolítico anaeróbico desencadeado pelo trauma cirúrgico.

Os demais metabólitos musculares não apresentaram variações significantes no tecido muscular possivelmente devido a magnitude do trauma.

O segundo agrupamento de comparações diz respeito aos **efeitos da isquemia e da isquemia pré-tratada com OKG sobre os metabólitos plasmáticos e teciduais:**

- Metabólitos plasmáticos

As concentrações de CPK apresentaram elevação significativa no grupo submetido à isquemia em relação ao grupo submetido apenas ao trauma cirúrgico. A CPK foi significativamente aumentada com uso da OKG tanto em relação ao grupo Sham, quanto em relação ao grupo controle de isquemia.

Estes fatos evidenciam: primeiro, a efetividade do modelo de isquemia, onde a CPK é considerada um bom parâmetro para a avaliação de isquemia muscular, coincidindo com os estudos de Ely *et al.* (2000) e de Motta (2000). Por outro lado a OKG levou a um aumento na concentração de CPK em relação ao grupo controle de isquemia, para o qual não encontrou-se correlação na literatura.

A LDH evoluiu com elevação significativa no grupo submetido à isquemia, quando comparado ao seu correspondente Sham, e queda até valores próximos aos basais no grupo que recebeu a OKG. Esta enzima eleva-se na glicólise anaeróbica, na via da fermentação do ácido láctico (MOTTA, 2000), sua queda no subgrupo pré-tratado com OKG, reflete uma ação da OKG: o aumento do metabolismo aeróbico sistêmico da glicose, provavelmente através da estimulação da lançadeira malato-aspartato, sistemicamente (figura 17). Nota-se, então, a ação pró-glicolítica aeróbica sistêmica da OKG, coincidindo com os resultados obtidos por Alves *et al.*(ano), em humanos. Estes autores publicaram estudo utilizando a L-alanil glutamina em pacientes submetidos à revascularização de membros acometidos por isquemia crônica, onde foi descrito o efeito pró-glicolítico aeróbico deste precursor da glutamina.

A glicose plasmática não apresentou elevação significativa na sua concentração sérica na isquemia, porém foi evidenciada uma significativa queda no grupo tratado por OKG. Evidenciando, assim como na LDH, um efeito pró-glicolítico sistêmico da OKG, em conformidade com o estudo publicado por Alves *et al.*(ano) Possivelmente a maior oferta de glutamina a partir da OKG desencadeou a ativação

da lançadeira malato-aspartato, com conseqüente elevação da concentração de NAD⁺ no citosol, levando a maior conversão de glicose a piruvato nos tecidos periféricos, caracterizando aumento da glicólise aeróbica sistêmica.

O piruvato plasmático assim como a LDH, elevou-se significativamente na isquemia e reduziu-se significativamente como uso da OKG. Este efeito pode ser imputado à sobra de piruvato no músculo isquêmico, este piruvato seria levado à circulação sistêmica devido à permanência de colaterais arteriais produzindo, finalmente, sua elevação no grupo isquemia com caseinato. Houve uma maior metabolização aeróbica sistêmica deste, induzida pela OKG. Mais uma vez confirmando o efeito pró-glicolítico sistêmico e a efetividade do modelo de isquemia.

A glutatona plasmática apresentou um aumento significativo nas concentrações no grupo submetido à isquemia com OKG em relação tanto ao grupo Sham, quanto ao grupo isquemia com caseinato. Este comportamento deve-se possivelmente ao aumento na síntese hepática da glutatona a partir do aumento na glutamina, um dos precursores da glutatona, induzido pela OKG. O α -cetoglutarato presente no composto OKG pode substituir a glutamina em várias vias metabólicas: na produção renal de bases, na produção de energia ou gliconeogênese e ser usada para a síntese de glutamina. (CYNOBER, 1995). A glutatona apresenta função antioxidante, mais especificamente como redutor intracelular, sendo capaz de reagir com um elétron não pareado de um radical livre, reduzindo este radical (reação descrita em detalhes na Introdução). A glutatona, então, atua de maneira importante na proteção celular contra mudanças no quadro oxidativo, sobretudo na detoxificação de hidroperóxidos. (JORDÃO JUNIOR *et al.*, 1998). O aumento na concentração plasmática de glutatona caracteriza o efeito protetor celular sistêmico da OKG.

- Metabólitos teciduais

O piruvato tecidual comportou-se com aumento significativo no subgrupo isquemia + caseinato, possivelmente por parada da metabolização da glicose em piruvato e apresentou queda significativa no subgrupo que recebeu OKG. Estes dados vêm ao encontro do estudo de Alves *et al.* (ano) que, utilizando a L-alanil glutamina, encontrou um aumento na utilização do piruvato em músculo isquêmico, para a produção de energia no ciclo de Krebs ao invés de sua conversão a lactato,

com prevalência da glicólise aeróbica. Corroborando as, já citadas, efetividade do modelo e ação pró-glicolítica aeróbica da OKG, neste caso a ação foi tecidual.

O lactato tecidual apresentou elevação significativa no subgrupo IC 6, devido à glicólise anaeróbica e no subgrupo I α 6 demonstrou uma significativa queda provavelmente secundária a uma permanência de colaterais arteriais os quais levaram algum oxigênio para queima aeróbica do piruvato (estimulada pela OKG), evitando a formação de lactato e reforçando a ação pró-glicolítica aeróbica.

As TBARS teciduais apresentaram elevação significativa no subgrupo submetido à isquemia e que usou o caseinato e queda para um valor próximo ao inicial no subgrupo ao qual foi administrada a OKG, demonstrando inicialmente a efetividade do modelo de isquemia e no segundo momento o efeito citoprotetor tecidual da OKG. A proteção de membrana celular é obtida pelo somatório dos efeitos metabólicos pró-glicolíticos da OKG, aumentando a produção de energia no músculo isquêmico e pela ação direta da glutathione, descrita a seguir.

A glutathione tecidual apresentou elevação significativa apenas no subgrupo que recebeu OKG, tanto em relação ao IC 6 quanto ao S 6, devido a um possível aumento na síntese de glutamina induzida pela OKG, levando à proteção antioxidante no músculo isquêmico.

Variação dos metabólitos plasmáticos e teciduais na reperfusão pré-tratada com OKG:

- Metabólitos plasmáticos

Esta comparação colocou, inicialmente o subgrupo S 6,5 contra o subgrupo RC 6,5. Este primeiro subgrupo submetido apenas à LE e o segundo submetido à LE seguida de isquemia de 6h com subsequente reperfusão de 0,5h.

A CPK elevou-se devido às lesões de isquemia e reperfusão musculares, manteve-se elevada. Neste caso a OKG não demonstrou ação sobre o metabolismo da creatinina fosfato.

No grupo que recebeu OKG a glicose elevou-se tanto em relação ao controle quanto em relação ao grupo caseinato quanto em relação ao grupo Sham. Este comportamento deve-se ao fato do aumento da mobilização da glicose e da intolerância à glicose desencadeada pela lesão de isquemia-reperfusão.(FERRAZ; FERRAZ, 2005).

Após a reperfusão a metabolização do piruvato a lactato diminui de importância, com isso a LDH, o piruvato e o lactato mantêm concentrações próximas às iniciais. Surpreendentemente a glutathione não apresentou elevação significativa no plasma, talvez por aumento do consumo no músculo lesado.

- Metabólitos teciduais

Foram comparados no tecido os subgrupos S 6,5 contra RC 6,5, ambos fizeram uso de caseinato, o primeiro, porém, foi submetido apenas à LE, e o segundo à LE seguida de isquemia e reperfusão. Houve elevação significativa de piruvato e lactato teciduais; queda na G6PDH e manutenção nos níveis de glutathione e TBARS no tecido.

A queda significativa da tanto no subgrupo RC 6,5 quanto no Rα 6,5 demonstra que o trauma de reperfusão foi intenso o suficiente para bloquear o início da via glicolítica (fase preparatória), onde atua a G6PDH e a OKG não conseguiu reverter esta queda na glicólise. Este fato coincide com estudos clássicos, como os de Haimovici, onde é exposto que a lesão de reperfusão pode ser mais grave quando comparada à lesão isquêmica.

O lactato no músculo apresentou elevação significativa no grupo do caseinato e retorno aos valores basais no grupo da OKG, mostrando, assim como na isquemia a ação pró-glicolítica aeróbica que levou à homeostase.

As TBARS teciduais não apresentaram elevação significativa no tecido talvez pelo efeito de “lavagem” executado pelos trinta minutos de reperfusão, tampouco queda com o uso da OKG possivelmente pela maior magnitude da lesão de reperfusão.

A glutathione tecidual apresentou elevação significativa de suas concentrações no grupo que recebeu OKG, tanto em relação ao grupo Sham quanto ao grupo caseinato refletindo a maior síntese de glutathione a partir de glutamina, essa última possivelmente proveniente da OKG comprovando a ação antioxidante tecidual, da mesma forma como foi descrito para a isquemia.

O papel chave da lançadeira malato-aspartato, sugerido neste estudo como mecanismo de ação para o efeito pró-glicolítico da OKG, poderia ser melhor evidenciado através da dosagem da enzima malato-desidrogenase no mesmo modelo.

No presente estudo as doses administradas foram bem acima de doses nutracêuticas, questiona-se qual seria a dose ideal para prevenção de lesões de isquemia e reperfusão em ratos e, finalmente, considerando o composto de teste ser utilizado clinicamente para suporte nutricional em humanos, como utilizá-lo em isquemia e reperfusão de pacientes?

6 CONCLUSÕES

1. O trauma cirúrgico da laparotomia exploradora desencadeou alterações metabólicas significativas;

2. O modelo de isquemia-reperfusão demonstrou efetividade;

3. A OKG, em dose única por gavagem, demonstrou ações pró-glicolíticas aeróbica muscular e sistêmica; proteção contra lesão da célula muscular, e efeito antioxidante muscular e sistêmico durante tanto a lesão de isquemia quanto após lesão de isquemia-reperfusão.

REFERÊNCIAS

- ADAMBI, A.; SKALAK, T. C. Role of leukocytes and tissue-derived oxidants in short-term skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 278, p. H435-H443, 2000.
- ALVES, M. A.; GUIMARÃES, S. B.; DIAS, D. A.; VASCONCELOS, P. R. C.; COELHO, V. P. M.; VASCONCELOS, P. R. L. Effects of L-alanyl-glutamine upon the blood and Kidney biochemical parameters in the rat hind limb model of ischemia/reperfusion. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 6, p. 445-449, 2005.
- ALVES, W. F.; GUIMARÃES, S. B.; VASCONCELOS, P. R. C.; VASCONCELOS, P. R. L. Repercussões da L-alanil-glutamina sobre as concentrações de lactato e lactato desidrogenase (LDH) em pacientes com isquemia crítica dos membros inferiores submetidos a revascularização distal. **Acta Cir. Bras.**, v. 18, n. 3, p. 209-215, 2003.
- ARKS, D. A.; GRANGER, D. N. Ischemia-induced vascular changes: role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals. 1983. **Am. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 245, p. G285-G289, 1983.
- BASILE-FILHO, A.; SUEN, V. M. A.; MARTINS, M. A.; COLETTI, F. A.; MARSON, F. Monitorização da resposta orgânica ao trauma e à sepse. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 34, p. 5-17, 2001.
- BELKIN, M.; BROWN, R. D.; WRIGHT, J. G.; LAMORTE, W. W.; HOBSON, R. W. A new quantitative spectrophotometric assay of ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. **Am. J. Surg.**, v. 156, n. 2, p. 83-86, Aug. 1988.
- BEYERSDORF, F.; MATHEIS, G.; KRÜGER, S.; HANSELMANN, A.; FREISLEBEN, H. G.; ZIMMER, G.; SATTER, P. Avoiding reperfusion injury after limb revascularization: experimental observations and recommendations for clinical application. **J. Vasc. Surg.**, v. 9, n. 6, p. 757-766, June 1989.
- BEZERRA FILHO, J. E.; GUIMARÃES, S. B.; CHAVES, C. R.; QUEIROZ, D. A. F.; VASCONCELOS, P. R. C.; VASCONCELOS, P. R. L. Effects of L-alanyl-glutamine on in vivo Kidney and blood concentrations of glucose, pyruvate and lactate in rats subjected to unilateral renal ischemia and reperfusion. **Rev. Bras. Nutr. Clin.**, v. 17, n. 4, p. 122-125, 2002.
- BLAISDELL, W. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. **Cardiovasc. Surg.**, v. 10, n. 6, p. 620-630, 2002.
- BRAY, T. M.; TAYLOR, C. G. Tissue glutathione, nutrition and oxidative stress. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 71, p. 746-751, 1993.

CASTILLO, L.; SANCHEZ, M.; VOGT, J.; CHAPMAN, T. E.; DEROJAS-WALKER, T. X.; TANNENBAUM, S. R. Plasma arginine, citrulline, and ornithine kinetics in adults, with observations on nitric oxide synthesis. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 268, p. E360-E367, 1995.

CYNOBER, L. A. Amino acid metabolism and therapy in health and nutritional disease. In:_____. **The metabolic fate of glutamine in clinical nutrition**. Boca Raton: CRC, 1995. p. 385-395.

CYNOBER, L.; LE BOUCHER, J.; VASSON, M. P. Arginine metabolism in mammals. **J. Nutr. Biochem.**, v. 6, p. 402-413, 1995.

CZERNICHOW, B.; NSI-EMVO, E.; GALLUSER, M.; GOSSÉ, F.; RAUL, F. Enteral supplementation with ornithine [alpha]-ketoglutarate improves the early adaptive response to resection. **Gut**, v. 40, p. 67-72, 1997.

DA SILVEIRA, M.; YOSHIDA, W. B. Isquemia e reperfusão em músculo esquelético. **J. Vasc. Br.**, v. 3, n. 4, p. 367-378, 2004.

DAVIES, B.; BRAITHWAITE, B. D.; BIRCH, P. A.; POSKITT, K. R.; HEATHER, B. P.; EARNSHAW, J. J. Acute leg ischemia in Gloucestershire. **Br. J. Surg.**, v. 84, n. 4, p. 504-508, Apr. 1997.

DE BANDT, J. P.; CYNOBER, L. A. Amino acids with anabolics properties. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 1, n. 3, p. 263-272, 1998.

DE BANDT, J. P.; CYNOBER, L.; LIM, S. K.; COUDRAY-LUCAS, C.; POUPON, R.; GIBOUDEAU, J. Metabolism of ornithine, alpha-ketoglutarate and arginine in isolated perfused rat liver. **Br. J. Nutr.**, v. 73, p. 227-239, 1995.

DE OCA, J.; BETTONICA, C.; CUADRADO, S.; VALLET, J.; MARTIN, E.; GARCIA, A. Effect of oral supplementation of ornithine-[alpha]-ketoglutarate on the intestinal barrier after orthotopic small bowel transplantation. **Transplantation**, v. 63, p. 436-439, 1997.

DEVLIN, T. M. **Textbook of biochemistry with clinical correlations**. 4th ed. New York: Wiley & Sons, 1997.

DURANTON, B.; SCHLEIFFER, R.; GOSSE, F.; RAUL, F. Preventive administration of ornithine alpha-ketoglutarate improves intestinal mucosal repair after transient ischemia in rats. **Critic. Care Med.**, v. 26, n. 1, p. 120-125, Jan. 1998.

EARSE, D. J.; HUMPHREY, S. M.; CHAIN, E. B. Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 5, n. 4, p. 395-407, 1973.

ELY, J. F.; WEBSTER, R. S.; PAVELECINI, M.; LUCAS, M. Alterações enzimáticas decorrentes da isquemia muscular esquelética em ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 15, n. 3, p. 163-168, 2000.

FELTRE, R. **Química orgânica**. 3. ed. São Paulo: Moderna, 1998. v. 3.

FERRARI, R. Pathophysiological vs biochemical ischaemia: a key to transition from reversible to irreversible damage. **Eur. Heart J.**, v. 3, suppl., p. C2- C10, 2001.

FERRAZ, A. A. B.; FERRAZ, E. M. (Org.). **Bases da técnica cirúrgica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

FLYNN, N. E.; WU, G. Enhanced metabolism of arginine and glutamine in enterocytes of cortisol-treated pigs. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 272, p. G474-G480, 1997.

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

GUTE, D. C.; ISHIDA, T.; YARIMIZU, K.; KORTHUIS, R. J. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 179, n. ½, p. 169-187, Feb. 1998.

HAIMOVICI, H. Arterial embolism with acute massive ischemic myopathy and myoglobinuria. **Surgery**, v. 47, p. 739-747, 1960.

HAIMOVICI, H. Metabolic complications of acute arterial occlusion and related conditions. Role of free radicals (myonephropathic metabolic syndrome). In: _____. **Vascular surgery: principles and techniques**. 3rd. ed. Norwalk, Conn.: Appleton & Lange, 1989. p. 386-409.

HAMMERSEN, F. The ultrastructure of microvessels and their contents following ischemia and reperfusion. **Prog. Appl. Physiol.**, v. 13, p. 1-26, 1989.

HARRIS, R. C.; SÖDERLUND, K.; HULTMAN, E. Elevation of creatine in resting and exercised muscle of normal subjects by creatine supplementation. **Clin. Sci. (Lond)**, v. 83, n. 3, p. 367-374, Sept. 1992.

HOUDIJK, A. P. J.; VAN LEEUWEN, P. A. M.; TEERLINK, T.; FLINKERBUSH, E. L.; BOERMEESTER, M. A.; SAUERWEIN, H. P.; WESDORP, R. I. C. Glutamine-enriched enteral diet increases renal arginine production. **J. Parenter. Enter. Nutr.**, v. 18, p. 422-426, 1994.

IANA, J. N.; LAUGHLIN, H. M. Effect of ischemia on capillary pressure and equivalent pore radius in capillaries of the isolated dog hind limb. **Circ. Res.**, v. 35, p. 77-101, 1974.

IMER, K. A. Patobiology of acute myocardial ischemia: metabolic functional and ultra structural studies. **Am. J. Cardiol.**, v. 52, p. 72a-81a, 1983.

JONES, D. P.; KAGAN, V. E.; AUST, S. D.; REED, D. J.; Omaye, S. T. Impact of nutrients on cellular lipid peroxidation and antioxidant defense system. **Fundam. Appl. Toxicol.**, v. 26, n. 1, p. 1-7, June 1995.

JORDÃO JUNIOR, A. A.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES, M. S. M.; VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 343-349, jul./set. 1998.

KRETZSHMAR, M. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 48, p. 439-446, 1996.

KUZON JUNIOR, W. M.; WALKER, P. M.; MICKLE, D. A.; HARRIS, K. A.; PYNN, B. R.; MCKEE, N. H. A isolated skeletal muscle model suitable for acute ischemia and reperfusion injury. **J. Surg. Res.**, v. 41, p. 28-37, 1986.

LE BOUCHER, J.; COUDRAY-LUCAS, C.; LASNIER, E.; JARDEL, A.; EKINDJIAN, O. G.; CYNOBER, L. A. Enteral administration of ornithine [alpha]-ketoglutarate or arginine [alpha]-ketoglutarate: a comparative study of their effects on glutamine pools in burn-injured rats. **Crit. Care Med.**, v. 25, p. 293-298, 1997.

LEHNINGER, A. L. A glicose e o catabolismo das hexoses. In: _____. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 297-326.

LINDSAY, T.; LIAUW, S.; ROMASCHIN, A. D.; WALKER, P. M. The effect of ischemia/reperfusion on adenine nucleotide metabolism and xantine oxidase production in skeletal muscle. **J. Vasc. Surg.**, v. 12, n. 1, p. 8-15, 1990.

LUYT, C. E.; MEDDAHI-PELLE, A.; HO-TIN-NOE, B.; COLLIEC-JOUAULT, S.; GUEZENNEC, J.; LOUEDEC, L.; PRATS, H.; JACOB, M. P.; OSBORNE-PELLEGRIN, M.; LETOURNEUR, D.; MICHEL, J. B. Low-molecular-weight fucoidan promotes therapeutic revascularization in a rat model of critical hindlimb ischemia. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 305, n. 1, p. 24-30, Apr. 2003.

MAFFEI, F. H. A.; LASTÓRIA, S.; YOSHIDA, W. B.; ROLLO, H. A. **Doenças vasculares periféricas**. 3. ed. São Paulo: Medsi, 2002.

MCCORD, I. M. Oxygen derived free radicals in post ischemic tissue injury. **N. Engl. J. Med.**, v. 12, p. 159-163, 1985.

MEISTER, A. Glutathione metabolism. **Methods Enzymol.**, v. 251, p. 3-7, 1995.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica: princípios e interpretações**. Porto Alegre: Editora Médica Missau, 2000.

NEWSHOMLE, P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of immune system in health postinjury, surgery or infection? **J. Nutrition**, v. 131, p. 2615-2622, 2001.

OCK, P. E.; MAJNO, G. M. Vascular responses to experimental tourniquet ischemia. **Surg. Gynecol. Obstet.**, v. 129, p. 309-318, 1969.

PERRY, M. O. Compartment syndromes and reperfusion injury. **Surg. Clin. North Am.**, v. 68, p. 853-864, 1988.

PERRY, M. O.; SHIRES III, G. T.; ALBERT, S. A. Cellular changes with graded limb ischemia and reperfusion. **J. Vasc. Surg.**, v. 1, n. 5, p. 36-40, 1984.

RAUL, F.; GOSSÉ, F.; GALLUSER, M.; HASSELMANN, M.; SEILER, N. Functional and metabolic changes in intestinal mucosa of rats after enteral administration of ornithine [alpha]-ketoglutarate salt. **J. Parenter. Enter. Nutr.**, v. 19, p. 145-150, 1995.

ROCH-ARVEILLER, M.; TISSOT, M.; COUDRAY-LUCAS, C.; FONTAGNE, J.; Le BOUCHER, J.; GIROUD, J. P.; CYNOBER, L. Immunomodulatory effects of ornithine [alpha]-ketoglutarate in rats with burn injuries. **Arch. Surg.**, v. 131, n. 7, p. 718-723, July 1996.

ROTH MERTEN, A.; KARNER, J.; WINKLER, S.; VALENTINI, L.; SHAUPP, K.; ROTH, E. Influence of [alpha]-ketoglutarate infusion on glutamate and glutamine metabolism. **Clin. Nutr.**, v. 9, p. 46-47, 1990.

ROTH, E.; KARNER, J.; ROTH MERTEN, A.; WINKLER, L.; VALENTINI, L.; SHAUPP, K. Effect of [alpha]-ketoglutarate infusion on organ balances of glutamine and glutamate in anaesthetized dogs in catabolic state. **Clin. Sci.**, v. 80, p. 625-631, 1991.

SARDINHA, W. E. **Isquemia e reperfusão da musculatura esquelética em ratos: inibição das lesões lipoperóxidativas mediadas por radicais livres pela deferoxamina.** 1994. Tese (Doutorado) – Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1994.

SEIFTER, E.; RETTURA, G.; BARBUL, A.; LEVENSON, S. M. Arginine: an essential amino acid for injured rats. **Surgery**, v. 84, p. 224-230, 1978.

SEXTON, W. L.; KORTIUS, R. J.; LAUGHIN, M. H. Ischemia: reperfusion in isolated rat hindquarters. **J. Appl. Physiol.**, v. 68, p. 387-392, 1990.

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

SHUSTER, H.; BLANC, M.; GENTHON, C.; THÉRON, P.; BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; LE TOURNEAU, A.; DE BANDT, J.; CYNOBER, L. Does dietary ornithine α ketoglutarate supplementation protect the liver against ischemia-reperfusion injury? **Clin. Nutr.**, v. 24, n. 3, p. 375-384. *in press*.

STOLL, B.; HAUSSINGER, D. Functional hepatocyte heterogeneity. **Eur. J. Biochem.**, v. 181, p. 709-716, 1989.

SUVAL, W. D.; DURAN, W. N.; BORIC, M. P.; HOBSON, R. W.; BERENDSEN, P. B.; RITTER, A. B. Microvascular transport and endothelial cell alterations preceding skeletal muscle damage in ischemia and reperfusion injury. **Am. J. Surg.**, v. 154, p. 211-218, 1987.

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

TRÉMOLIÈRES, J.; SCHEGGIA, E.; FLAMENT, C. L. Effects de l'alpha-caétooglutarate d'ornithinesur le bilan azoté e sur la vitesse d'oxidation de l'aéthanol. **Cah. Nutr. Diet**, v. 7, p. 2-7, 1972.

UHLIG, S.; WENDEL, A. The physiological consequences of glutathione variations. **Life Sci.**, v. 51, p. 1083-1094, 1992.

VASCONCELOS, P. R. L.; SILVA, L. F. G.; MARINHO, L. E.; CAMPOS, A. B. ; MARTINS, M. C. R.; VASCONCELOS, P. R. C.; QUEIROZ, D. A. F.; CHAVES, C. R. Efeitos da L-alanil-glutamina sobre a concentração in vivo de metabólitos da via glicolítica durante a isquemia-reperfusão de intestino delgado de ratos Wistar. **ABCD Arq. Bras. Cir. Dig.**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 63-66, 2002.

WAKABAYASHI, Y.; YAMADA, E.; YOSHIDA, T.; TAKAHASHI, N. Effect of intestinal resection and arginine-free diet on rat physiology. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 269, p. G313-G318, 1995.

WALKER, P. M.; LINDSAY, T. F.; LABBLE, R.; MICKLE, D. A.; ROMASHIN, A. D. Salvage of skeletal muscle with free radical Savengers. **J. Vasc. Surg.**, v. 5, p. 68-75, 1997.

WASA, M.; SOH, H.; SHIMIZU, Y.; FUKUZAWA, M. Glutamine stimulates amino acid transport during ischemia-reperfusion in human intestinal epithelial cells. **J. Surg. Res.**, v. 123, n. 1, p. 75-81, Jan. 2005.

WELBOURNE, T. C. Alpha-ketoglutarate, ornithine and growth hormone displace glutamine dependent ammoniagenesis and enhance renal base generation and function. **Clin. Nutr.**, v. 12, p. 49-50, 1993.

WINKLER, S.; HÉLZENBEIN, T.; KARNER, J.; ROTH, E. Kinetics of organ specific metabolism of a bolus injection into the jejunum of glutamine, [alpha]-ketoglutarate, ornithine, and ornithine [alpha]-ketoglutarate. **Clin. Nutr.**, v. 12, p. 56-57, 1993.

WRIGHT, J. G.; FOX, D.; KERR, J. C.; VALERI, C. R.; HOBSON, R. W. Rate of reperfusion blood flow modulates reperfusion injury in skeletal muscle. **J. Surg. Res.**, v. 44, n. 6, p. 754-763, 1988.

YOKOYAMA, Y.; BECKMAN, J. S.; BECKMAN, T. K.; WHEAT, J. K.; CASH, T. G.; FREEMAN, B. A.; PARKS, D. A. Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. **Am. Physiol.**, v. 258, n. 4, pt. 1, p. G564-G570, Apr. 1990.

APÊNDICE A - PROTOCOLO

ATO OPERATÓRIO

Identificação:	Subgrupo:
Peso:	Anestesia:

Descrição do ato operatório

Início do pinçamento:	Término:	ΔT
Início da reperfusão:	Término:	ΔT

Intercorrências:
Observações:

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA

ANEXO B – MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

1. Drogas e soluções reagentes

- Solução salina (solução de NaCl a 0,9%)
- Ornitina α -cetoglutarat solúvel - Cétornan® 5g laboratório Chiesi AS - R\$ 50,00 a caixa com 10 envelopes de 5g
- Heparina (Roche – 1ml = 5000u)
- Éter dietílico
- Ácido clorídrico (HCl)
(Reagen, Rio de Janeiro – RJ, Brasil)
- Ácido perclórico 20% (HClO₄)
(Haloquímica Ind. e Com. Ltda, São Paulo – SP, Brasil)
- Cloreto de magnésio (MgCl₂ . 6H₂O)
(Grupo Química Industrial Ltda, Rio de Janeiro – RJ, Brasil)
- EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético)
(C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂ . 2H₂O)
- Fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄)
(Reagen, Rio de Janeiro – RJ, Brasil)
- Fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄)
(Reagen, Rio de Janeiro – RJ, Brasil)
- Hidrato de hidrazina 80% (NH₂NH₂ . H₂O)
(Reagen, Rio de Janeiro – RJ, Brasil)
- TRIS (Hidroximetil) Aminometano (C₄H₁₁NO₃)
(Reagen, Rio de Janeiro – RJ, Brasil)

2. Bioquímicos e enzimas

- Adenosina-5-trifosfato
(Boehringer Mannheim - Germany)
- Glucose-6-phosphato-dehydrogenase de Leuconostoc mesenteroides
(Boehringer Mannheim - Germany)
117 117
- Hexoquinase
(Boehringer Mannheim - Germany)
- Hydroxyburat-dehydrogenase de Rhodopseudomonas spheroides
(Boehringer Mannheim - Germany)
- Lactat-dehydrogenase
(Boehringer Mannheim - Germany)
- NAD (C₂₁H₂₇N₇O₁₄P₂₃H₂O)
(Boehringer Mannheim - Germany)

3. Aparelhagem

- Balança analítica (modelo H5, Mettler, Suíça)
- Balança para analítica (tara de 0 a 2000g, Mettler P3. USA)
- Centrífuga Eppendorf
- Espectrofotômetro (modelo DU, Beckman, Fullerton, CA, USA) com medidor de absorvância digital e outros acessórios
(Modernization System, Gilford, Oberlin, Ohio, USA)

- Medidor de pH micronal (pH - metro B374)
- Estetoscópio (fluxômetro) ultrassônico - Doppler
IMBRACRIOS - EU 700 - Ind. Bras.

4. Diversos

- Cubetas para leitura ultravioleta
(American Hospital Supply Corporation - USA)
- Indicador de pH universal
(Reagen, Rio de Janeiro - RJ, Brasil)
- Nitrogênio líquido
(White Martins, São Paulo – SP, Brasil)
- Tubos de ensaio de vidro de 10ml
- Pipeta automática de 5 a 1000 microlitros
- Ponteiros descartáveis para pipeta automática
- Provetas
- Becher de 10,50 e 100ml (Pyrex)
118 118
- Gral e pistilo de porcelana
- Garrafa térmica de 3 litros para acondicionar nitrogênio líquido durante o experimento
- Pinça apreendedora (para manusear o tecido muscular juntamente com o nitrogênio líquido)
- Seringas de 3ml e agulhas 30g $\frac{1}{2}$
- Gel (Aquasonic – para uso de fluxômetro Doppler, junto ao vaso arterial)
- Material cirúrgico: pinças diversas, bisturi, tesouras, fios de sutura pinças vasculares oclusivas (tipo buldogue)
- Luvas de procedimento (Blowtex, USA)
- Gazes e algodão
- Recipiente de plástico, tipo campânula

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)