

Alberto Bicudo Salomão

**O USO ENTERAL DE GLUTAMINA DURANTE ISQUEMIA-
REPERFUSÃO HEPÁTICA DIMINUI OS NÍVEIS DE
MALONDIALDEÍDO, ASPARTATO AMINOTRANSFERASE E
MANTÉM A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DO PLASMA
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal do Mato Grosso — Faculdade de
Ciências Médicas para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências da Saúde.**

**Cuiabá-MT
2007**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Alberto Bicudo Salomão

**O USO ENTERAL DE GLUTAMINA DURANTE ISQUEMIA-
REPERFUSÃO HEPÁTICA DIMINUI OS NÍVEIS DE
MALONDIALDEÍDO, ASPARTATO AMINOTRANSFERASE E
MANTÉM A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DO PLASMA
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
do Mato Grosso — Faculdade de Ciências
Médicas para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo de Aguiar-Nascimento

Cuiabá-MT
2007

Folha de Aprovação:

Alberto Bicudo Salomão.

**O USO ENTERAL DE GLUTAMINA DURANTE ISQUEMIA-
REPERFUSÃO HEPÁTICA DIMINUI OS NÍVEIS DE
MALONDIALDEÍDO, ASPARTATO AMINOTRANSFERASE E
MANTÉM A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DO PLASMA**

ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

Formaram parte da Banca Examinadora desta Dissertação:

Dr. Antonio Carlos Ligoeki Campos.

Professor Titular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Dr. Cervantes Caporossi.

Professor Adjunto da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT).

Dr. José Eduardo de Aguiar Nascimento (orientador).

Professor Titular da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT).

Cuiabá-MT, 13 de Agosto de 2007.

**Universidade Federal de Mato Grosso
Faculdade de Ciências Médicas
Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Diretor da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Federal do Mato Grosso:**

Prof. Dr. Domingos Tabajara de Oliveira Martins.

**Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal do Mato Grosso:**

Prof. Dr. Anselmo Verlangieri Carmo.

In memoriam

Aos meus avós Celso Bicudo (Zuto), Ana (Donana) e Alberto Salomão (Índio) pelos exemplos de vida com os quais procuro guiar meus passos.

Ao meu tio Benones Paula Souza pela confiança em todos os momentos e constante aprendizado através de sua vida pautada na seriedade e disciplina.

Ao meu primo Flávio de Lima Salomão, que sempre fará parte de todas as minhas vitórias.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Fernando e Cilce, e à minha avó Jovelina Salomão, pelo amor, carinho e compreensão que fizeram meus sonhos possíveis.

À minha filha Camila Blanche, razão maior do meu viver.

À minha esposa Graciela, pessoa muito especial que sempre me deu estímulo, apoio e carinho.

Agradecimentos

À DEUS, força suprema do universo, presença constante na minha vida, pelo auxílio nas minhas escolhas, pelo conforto nas horas difíceis, por permitir ter sempre ao meu lado leais companheiros do mundo material e espiritual, com os quais sempre posso contar nessa caminhada rumo ao progresso.

Ao Prof. Dr. José Eduardo de Aguiar-Nascimento, orientador deste trabalho, por seu apoio e dedicação; por quem sinto muita admiração e respeito, sempre disposto a me ensinar sem medir tempo.

À Universidade Federal do Mato Grosso, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. Paulo Speller, e à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal do Mato Grosso, na pessoa do Prof. Dr. Domingos Tabajara de Oliveira Martins, diretor da faculdade, que tornaram possível a realização deste trabalho.

Ao Hospital Universitário Júlio Müller, na pessoa do Prof. José Carlos Amaral, Diretor Superintendente, pelo constante apoio ao crescimento profissional de seu corpo clínico, fornecimento de grande parte do material de laboratório e de consumo em sala cirúrgica, empregada na execução da parte experimental deste trabalho.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Mato Grosso, na pessoa do Prof. Dr. Anselmo Verlangieri Carmo, coordenador do curso, pela acolhida e oportunidade.

Ao Departamento de Clínica Cirúrgica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal do Mato Grosso, na pessoa do Prof. Ms. José de Souza Neves, chefe do departamento, pelo apoio sempre bem-vindo.

Ao Prof. Dr. Sandro Percário, exemplo de professor, dedicação à ciência, e senso de humanidade, compartilhando de maneira tão nobre seus conhecimentos, guiando-me nos primeiros passos no complexo estudo das espécies reativas de oxigênio.

À todos os professores, funcionários e amigos da Faculdade de Medicina da Universidade de Gurupi-TO (Fundação UNIRG), em especial aos técnicos do Núcleo de Pesquisa em Saúde Comunitária (NUPESC), pela gentileza na recepção, cordialidade em todos os momentos e pronto serviço durante todas as etapas do processamento de materiais e dosagens referentes ao estresse oxidativo.

Ao Prof. Dr. Cervantes Caporossi, meu importante apoio e exemplo no campo da cirurgia.

Ao Prof. Dr. Pedro Luís Reis Crotti, pelo constante incentivo, orientação, participando ativamente desde os primeiros momentos deste trabalho.

Ao Prof. Ms, João Bosco de Almeida Duarte, pela disposição constante em ajudar na confecção deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cor Jesus Fernandes, professor e mestre de todas as horas ao longo de minha formação, grande incentivador de todos os momentos, prestativo, paciente, apoiando técnica e logisticamente este estudo, abrindo-me as portas do laboratório de investigação da UFMT, sem quem certamente este trabalho não seria possível.

Ao Prof. Dr. Francisco José Dutra Souto, sinônimo de educador, pelos incontáveis ensinamentos ao longo do curso médico e durante a pós-graduação, facilitando sobremaneira através de sua clareza de raciocínio o estudo da epidemiologia e da bio-estatística.

Ao Prof. Eduardo De Lamonica Freire, homem de sólidos princípios éticos, referência no Departamento de Clínica Cirúrgica da Faculdade de Ciências Médicas da UFMT, por ter sido ao longo dos anos meu grande exemplo e ideal como professor.

Ao colega de curso, Prof. Ms. Márcio Benedito Palma Pimenta, pelo incentivo e salutar convívio nessa jornada.

Ao colega e amigo Victor Sano Garcia, companheiro de todas as horas, pelo incentivo e colaboração deveras preciosa com a qual pude contar ao longo deste trabalho e na vida profissional.

Ao colega e amigo Valter Togezean Gouvea Jr, pelo apoio profissional e sincera amizade.

Às acadêmicas de medicina Nicole R. Marques, Claudia C. G. O. Dias e Andréa Martins Vieira Friaça, pela dedicada e valorosa colaboração no desenvolvimento dos experimentos inerentes a este trabalho.

Ao laboratório Exame em Cuiabá-MT, pela sua valorosa contribuição cedendo uma de suas centrífugas para processamento de material biológico desse estudo, e pela realização das dosagens bioquímicas realizadas neste trabalho.

Ao Sr. Valter Gonçalves da Silva, técnico do Laboratório de Investigação da UFMT, pelos cuidados relacionados ao nosso bem-estar e com os animais durante a realização deste experimento.

Ao Povo e ao Governo Brasileiro e do Estado de Mato Grosso, em especial ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de Mato Grosso (FAPEMAT), por todo apoio que têm dado ao desenvolvimento da ciência e formação de cientistas no Brasil.

A todos os meus amigos, familiares e àqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desta dissertação, meu agradecimento.

SUMÁRIO.

Folha de aprovação.	I
Dedicatória.	IV
Agradecimentos.	V
SUMÁRIO.	1
LISTA DE ABREVIATURAS.	4
LISTA DE TABELAS.	6
LISTA DE FIGURAS.	7
RESUMO.	9
ABSTRACT.	10
INTRODUÇÃO.	11
Aspectos históricos da cirurgia hepática.	11
A lesão por isquemia e reperfusão (I/R).	16
<i>Conceito.</i>	16
<i>Fisiopatologia.</i>	17
<i>Espécies reativas de oxigênio e sua formação na lesão por I/R.</i>	19
<i>Mecanismos de defesa antioxidante.</i>	22
<i>Marcadores sorológicos da lesão oxidativa induzida por I/R & Marcadores da defesa antioxidante.</i>	25
I/R hepática.	28
<i>Modelos experimentais de I/R hepática.</i>	29
<i>Estudo das repercussões intestinais da isquemia e reperfusão hepática.</i>	32
<i>Marcadores sorológicos do dano isquêmico hepático.</i>	32
<i>Lactato: Marcador sorológico de anaerobiose.</i>	34
Imunonutrientes	35
Glutamina	36
<i>Papel da GLN nas lesões por I/R intestinal e hepática.</i>	40

JUSTIFICATIVA.	42
OBJETIVOS.	45
Objetivo Geral.	45
Objetivos Específicos.	45
MATERIAL E MÉTODO.	46
Desenho do estudo.	46
Animais.	47
Randomização e grupos.	47
Soluções utilizadas para aplicação enteral.	48
Técnicas anestésica e operatória.	48
<i>Anestesia.</i>	48
<i>Material cirúrgico.</i>	49
<i>Operação.</i>	49
Colheita de amostra de sangue e sacrifício.	56
Dosagens bioquímicas: ALT, AST, LDH e Ácido Lático.	57
Mensuração da agressão oxidativa produzida por ROS: Dosagem do Malondialdeído (MDA).	57
Mensuração da atividade antioxidante total (CAT) do plasma: Dosagem da capacidade antioxidante em equivalência ao Trolox (TEAC).	57
<i>Fundamentos do método e reagentes utilizados.</i>	57
<i>Sensibilidade do método.</i>	59
<i>Interferências.</i>	59
Análise estatística.	60
RESULTADOS.	61
Dosagens bioquímicas: ALT, AST, LDH e Ácido Lático.	61
Dosagem do MDA.	62
Dosagem da capacidade antioxidante total em equivalência ao trolox (TEAC).	63

DISCUSSÃO.	65
CONCLUSÃO.	76
APÊNDICE 1.	77
<i>Materials.</i>	77
<i>Preparo dos reagentes.</i>	78
<i>Preparo final dos controles e amostras.</i>	81
<i>Leitura em Espectrofotômetro.</i>	82
<i>Cálculo do valor de MDA da amostra.</i>	83
APÊNDICE 2.	84
<i>Preparo de reagentes.</i>	84
<i>Rotina de dosagem.</i>	86
ANEXO 1.	91
ANEXO 2.	92
ANEXO 3.	93
ANEXO 4.	94
REFERÊNCIAS.	95

LISTA DE ABREVIATURAS.

AAT: atividade antioxidante total.

AATc: atividade antioxidante total corrigida.

ABTS: sal diamônio do ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico).

ADP: do inglês, *adenosine diphosphate* (difosfato de adenosina).

AIN-1993: do inglês, *American Institute of Nutrition* – 1993, dieta padrão para roedores preconizada pelo Instituto Americano de Nutrição.

ALT: do inglês, *alanine aminotransferase* (alanina transaminase).

AMP: do inglês, *adenosine monophosphate* (monofosfato de adenosina).

AST: do inglês, *aspartate aminotransferase* (aspartato aminotransferase).

ATP: do inglês, *adenosine triphosphate* (trifosfato de adenosina).

C5a: anafilotoxina C5a, proteína inflamatória encontrada produzida por ativação do sistema complemento.

CAT: capacidade antioxidante total.

CD11: glicoproteína de superfície CD11, molécula de adesão leucocitária (β 2-integrina).

CD18: glicoproteína de superfície CD18, molécula de adesão leucocitária (β 2-integrina).

CME: Centro de Materiais Esterilizados.

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

DNA: do inglês, *desoxiribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico).

FAP: fator de ativação plaquetário.

FCM: Faculdade de Ciências Médicas.

GALT: do inglês, *gut-associated lymphoid tissue* (tecido linfóide associado ao intestino).

GLN: glutamina.

GSH: glutationa.

GSHpx: enzima glutationa peroxidase.

GSHrd: enzima glutationa redutase.

HPLC: do inglês, *high performance liquid chromatography* (cromatografia líquida de alta performance).

I/R: isquemia e reperfusão.

ICAM-1: do inglês, *intercellular adhesion molecule*, proteína de adesão da superfície do endotélio e de monócitos.

IF-gama: interferon gama.

IL1: interleucina 1.

IL-2: interleucina 2.

iNOS: enzima óxido nítrico sintase induzida.

LDH: do inglês, *lactate dehydrogenase* (enzima desidrogenase láctica).

LPO: lipoperoxidação ou peroxidação lipídica.

LPS: lipopolissacarídeos.

LTB4: leucotrieno B4.

MDA: malondialdeído.

NAD: do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide* (nicotinamida adenina dinucleotídeo).

NO: óxido nítrico.

PBS: do inglês, *phosphate buffer saline* (tampão fosfato salino).

PGE2: prostaglandina E2.

PUFAs: do inglês, *polyunsaturated fatty acids* (ácidos graxos poli-insaturados).

ROS: do inglês, *reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio).

SHAM: do inglês, *sham surgery* (cirurgia simulada).

SD: do inglês, *standard deviation* (desvio padrão).

SOD: enzima superóxido dismutase.

TBA: do inglês, *tiobarbituric acid* (ácido tiobarbitúrico).

TBARS: do inglês, *tiobarbituric acid reactive substances* (substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico).

TEAC: do inglês, *trolox equivalent antioxidant capacity* (capacidade antioxidante em equivalência ao trolox).

TNF-alfa: do inglês, *tumoral necrosis factor* (fator de necrose tumoral alfa).

UFMT: Universidade Federal do Mato Grosso.

VCAM-1: do inglês, *vascular cell adhesion molecule*, proteína de adesão da superfície do endotélio.

ômega -3: ácido graxo ômega 3.

ômega -6: ácido graxo ômega 6 .

LISTA DE TABELAS.

	Página
Tabela 1 - Principais parâmetros fisiológicos do modelo experimental murino.	31
Tabela 2 - Mortalidade associada à hiperlactacidemia em pacientes apresentando choque séptico.	35
Tabela 3 - Efeitos da glutamina em animais de experimentação.	37
Tabela 4 - Efeitos clínicos benéficos observados em seres humanos após terapia nutricional com suplementação de L- glutamina(Gln), alanil- glutamina (Ala -Gln).	39
Tabela 5 - Distribuição dos animais de experimentação em função dos grupos de estudo (N=30).	47
Tabela 6 - Diluições do trolox para construção da curva padrão.	87

LISTA DE FIGURAS.

	Página
Figura 1 - Ilustração presente em “Fabrica” de Vesalius (1543), mostrando o fígado rebatido, destacando-se sua divisão anatômica e o sistema venoso portal.	12
Figura 2 - Lobos e segmentos hepáticos baseados na distribuição intra-hepática dos ductos biliares e vasos sangüíneos. A – vista anterior, B – vista inferior. Terminologia proposta por Couinaud.	14
Figura 3 - Interação neutrófilo-endotélio e a produção de espécies reativas de oxigênio.	18
Figura 4 - Redução tetravalente do oxigênio no interior da mitocôndria.	20
Figura 5 - Produção de espécies reativas de oxigênio na injúria de isquemia-reperfusão, segundo o mecanismo proposto por Granger e cols.	21
Figura 6 - Peroxidação lipídica da membrana e formação de hidroperóxidos.	26
Figura 7 - Características hepato-biliares do modelo experimental murino.	31
Figura 8 - Ligadura ocluindo-se a luz intestinal ao nível do íleo terminal, próximo à transição íleo-cecal.	51
Figura 9 - Método de mensuração do comprimento intestinal.	51
Figura 10 - Ligaduras ocluindo-se a luz intestinal: distal (d), próximo a transição íleo-cecal e proximal (p), a 20cm da ligadura distal.	52
Figura 11 - Ilustração do segmento de alça intestinal fechada confeccionado cirurgicamente.	52
Figura 12 - Injeção na luz intestinal de L-alanil- glutamina (grupo glutamina) ou água destilada (grupo controle) com o uso de agulha 13x45 acoplada a seringa de 1ml.	53
Figura 13 - Dissecção da tríade portal (veia porta, artéria hepática e ducto biliar) ao nível do ligamento hepato-duodenal do animal.	53
Figura 14 - Clampeamento da tríade portal. Início do período de isquemia.	54
Figura 15 - Aspecto das alças intestinais e mesentério durante o período de isquemia.	54
Figura 16 - Aspecto das alças intestinais e mesentério durante o período de perfusão.	54
Figura 17 - Modo de acondicionamento dos animais durante o período de isquemia	55

e reperfusão (casulo de I-R).

- Figura 18** - Detalhe do acondicionamento dos animais durante o período de isquemia e reperfusão. Proteção contra hipotermia mantendo-se a temperatura local em torno de 36-37°C e contra a desidratação visceral. **55**
- Figura 19** - Modo de armazenamento do plasma dos animais em frascos resistentes a baixa temperatura, acoplados a haste para congelamento em nitrogênio líquido. **56**
- Figura 20** - Efeitos do trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrameticromono-2-carboxílico) na supressão da absorbância a 734nm do radical cátion ABTS^{•+}, em função do tempo, a 25°C. **58**
- Figura 21** - Curva de dose-resposta da concentração final do trolox em função da absorbância a 734nm. Condições: 2970µl ABTS^{•+}, 30 µl trolox, temperatura 25°C, tempo de reação: 5 minutos. Laboratório de Investigação, FCM-UFMT, Cuiabá-MT. **59**
- Figura 22** - Dosagem sérica de ALT (alanina transaminase) e AST (aspartato aminotransferase) nos três grupos. * = p<0,001 vs Sham, † = p<0,001 vs Glutamina. **61**
- Figura 23** - Dosagem sérica de LDH (desidrogenase láctica) e ácido láctico nos diferentes grupos estudados. * = p < 0,001 vs Sham. **62**
- Figura 24** - Valores plasmáticos do Malondialdeído (MDA), nos diferentes grupos estudados. * = p<0,001 vs Sham, † = p<0,05 vs Glutamina. **63**
- Fura 25** - Valores da Capacidade Antioxidante total do plasma nos diferentes grupos estudados. * = p<0,05 vs Controle. **64**
- Figura 26** - Curva padrão da atividade antioxidante total do trolox (AATc) em função de sua concentração final em mM/l. Condições: 2970µl ABTS^{•+}, 30µl trolox, temperatura 25°C, tempo de reação: 5 minutos. Laboratório de Investigação, FCM-UFMT, Cuiabá-MT. **88**

RESUMO.

Salomão, AB. **Benefícios no estresse oxidativo do uso enteral de glutamina durante isquemia e reperfusão hepática.** Cuiabá, 2007. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Federal de Mato Grosso.

Introdução: Ao conjunto de alterações decorrentes da privação e do restabelecimento do suprimento de oxigênio a órgãos e tecidos dá-se o nome lesão ou injúria de isquemia e reperfusão. Acredita-se que o afluxo de oxigênio nos tecidos isquêmicos leve à uma série de alterações bioquímicas, inflamatórias e celulares mediadas, em uma etapa inicial, pela formação de espécies reativas de oxigênio. Ao vencer a ação de mecanismos naturais de defesa anti-oxidante, desencadeiam-se fenômenos oxidativos auto-alimentáveis levando ao dano tecidual, fenômeno conhecido por estresse oxidativo. Os estudo das substâncias com propriedades antioxidantes constitui um desafio. A glutamina é fundamental para a produção de glutatona em nível intestinal. O sistema glutatona constitui o mais importante mecanismo fisiológico de defesa contra o estresse oxidativo. **Objetivo:** Investigar o efeito da infusão enteral de glutamina na lesão oxidativa produzida por isquemia total seguida de reperfusão do fígado de ratos. **Método:** Trinta ratos Wistar machos foram submetidos a laparotomia e confecção de uma alça fechada de 20 cm de comprimento envolvendo o intestino delgado distal seguido do clampeamento do hilo hepático por 20 minutos e reperfusão por 5 minutos. Na alça fechada foi injetada glutamina (grupo glutamina; n=10) ou água destilada (grupo controle; n=10). Em dez animais (grupo sham) não foi realizado clampeamento hilar. Coletou-se sangue para dosagem de marcadores sorológicos de lesão isquêmica (transaminases, enzima desidrogenase láctica e lactato) e do estresse oxidativo (malondialdeído e capacidade antioxidante total). **Resultados:** O nível sérico de alanina transaminase foi significamente maior ($p<0,001$) nos grupos controle (767 [279-867] U/l) e glutamina (548 [417-698] U/l), em relação ao grupo sham (120 [81-187] U/l). Os valores de aspartato aminotransferase estavam significamente maiores ($p<0,001$) nos ratos controles (929 [860-962] U/l) que nos do grupo glutamina (603 [386-776] U/l) e do grupo sham (149 [111-223] U/l). A dosagem de aspartato aminotransferase no grupo glutamina foi significamente maior que a encontrada no grupo sham ($p<0,001$). A dosagem da desidrogenase láctica foi significamente maior ($p<0,001$) nos grupos controle e glutamina em relação ao grupo sham (controle = 6352 [6051-6728] U/l, glutamina = 5408 [810-7437] U/l e sham = 1261 [867-3111] U/l). O mesmo ocorreu em relação à dosagem de lactato, que estava significamente maior ($p<0,001$) nos grupos controle (6,44 [5,25-8,79] U/l) e glutamina (6,78 [5,69-8,31] U/l) em relação ao grupo sham (2,04 [1,23-3,06] U/l). Os níveis do malondialdeído foram maiores no grupo controle (2037 [1498-5285] nmol/ml) em relação aos grupos glutamina (1543 [1208-2533] nmol/ml, $p=0,01$) e sham (1287 [1141-1610] nmol/ml, $p<0,001$). A dosagem do malondialdeído foi significamente maior ($p<0,001$) no grupo glutamina que no grupo sham. A capacidade antioxidante total foi significamente maior ($p<0,05$) nos grupos glutamina e sham, relação ao grupo controle (glutamina = $1,61\pm 0,07$; sham = $1,55\pm 0,06$; e controle = $1,44\pm 0,08$). **Conclusão:** O uso enteral de glutamina durante a isquemia-reperfusão do fígado em ratos diminui a expressão enzimática sérica associada a dano hepático, reduz o dano oxidativo e melhora a capacidade antioxidante total .

UNITERMOS: *Fígado; Traumatismo por reperfusão; Glutamina; Estresse oxidativo; Ratos.*

ABSTRACT.

Salomão, AB. **Beneficial effects in oxidative stress of enteral glutamine during hepatic ischaemia-reperfusion.** Cuiabá, 2007. 117p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Federal de Mato Grosso.

Introduction: The damage caused by the restoration of blood supply to a previously ischemic tissue is named ischaemia-reperfusion injury. The absence of oxygen and nutrients from blood creates a condition in which the restoration of circulation results in both inflammation and oxidative damage. White blood cells carried to the area by the newly returning blood release various reactive oxygen species. An imbalance between the increasing production of reactive oxygen species and the biological system ability to readily detoxify these reactive radicals causes oxidative stress. Glutamine is necessary for the function of immunocompetent cells, and enhances the immunity of the intestinal mucosa. It is the precursor to glutathione, one of the most important endogenous antioxidant molecule. **Objective:** To evaluate the effects of intraluminal injection of glutamine on oxidative damage in an experimental model of ischemia-reperfusion of the liver. **Method:** Thirty Wistar rats underwent laparotomy to perform a 20cm blind sac of small bowel and occlusion of the hepatic hilus for 20 minutes followed by reperfusion for 5 minutes. Into the gut sac it was injected glutamine (glutamine group, n=10) or distilled water (control group, n=10). Ten other animals (sham group) underwent laparotomy without hilar occlusion. Blood samples were collected for malondialdehyde, trolox equivalent antioxidant capacity, alanine transaminase, aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase and lactate assays. **Results:** Alanine transaminase was significantly greater ($p<0,001$) in the control group (767 [279-867] U/l) and glutamine group (548 [417-698] U/l), than sham group (120 [81-187] U/l). Aspartate aminotransferase was significantly greater ($p<0,001$) in controls (929 [860-962] U/l) than in glutamine group (603 [386-776] U/l) and sham group (149 [111-223] U/l). Aspartate aminotransferase in the glutamine group was significantly greater than sham group ($p<0,001$). Lactate dehydrogenase was significantly greater ($p<0,001$) in both control and glutamine groups than sham group (control = 6352 [6051-6728] U/l, glutamine = 5408 [810-7437] U/l and sham = 1261 [867-3111] U/l). The same occurred with lactate levels that was significantly greater ($p<0,001$) in both control (6,44 [5,25-8,79] U/l) and glutamine groups (6,78 [5,69-8,31] U/l) than sham group (2,04 [1,23-3,06] U/l). The malondialdehyde was significantly greater in the control group (2037 [1498-5285] nmol/ml) than both glutamine (1543 [1208-2533] nmol/ml, $p=0,01$) and sham groups (1287 [1141-1610] nmol/ml, $p<0,001$). Malondialdehyde serum levels were significantly greater ($p<0,001$) in glutamine group than sham group. The total antioxidant capacity was significantly greater ($p<0,05$) in both glutamine group and sham groups than in control group (glutamine = $1,61\pm 0,07$; sham = $1,55\pm 0,06$; control = $1,44\pm 0,08$). **Conclusion:** The enteral use of glutamine during hepatic ischemia-reperfusion in rats diminishes the enzymatic serum expression associated with liver damage, reduces oxidative damage, and enhances serum antioxidant capacity.

KEY-WORDS: *Liver; Reperfusion Injury; Glutamine; Oxidative Stress; Rats.*

INTRODUÇÃO.

Aspectos históricos da cirurgia hepática.

Desde a Antigüidade o fígado é um órgão que desperta o interesse do homem. Relatos assírios e babilônicos (2000-3000 AC) descrevem o uso da hepatoscopia como método de adivinhação, conforme a citação bíblica¹: “porque o rei da Babilônia parará nas encruzilhadas, no cimo dos dois caminhos para fazer adivinhações: aguçará as suas flechas, consultará os Terafins, observando através do fígado.” (Ezequiel 21:21). Na mitologia greco-romana encontramos referências a aspectos inerentes a sua anatomia e peculiar fisiologia. Na Ilíada e na Odisséia (cerca de 800 A.C.), Homero descreve o fígado como um órgão vital, pois quando ferido leva à morte². Ainda na mitologia, Prometheus (titã, filho de Jápeto e Ásia, irmão de Atlas, Epimeteu e Menoécio), por ter roubado o fogo divino de Zeus para dá-lo aos homens (que assim puderam evoluir e distinguir-se dos outros animais), foi condenado a permanecer durante 30.000 anos acorrentado no cimo do monte Cáucaso. Ali, todos os dias uma águia ia comer-lhe o fígado. Sendo Prometheus um imortal, seu fígado ao regenerar-se propiciava constante alimento à ave, prolongando assim sua tortura³. Tal relato, ainda que em tempos remotos, ilustra o conhecimento do princípio da regeneração hepática.

Descrições mais consistentes do ponto de vista técnico surgem apenas com Galeno (130-200 DC), os quais dominaram a literatura existente até em torno do século XV⁴. Segundo este anatomista, o fígado geraria o sangue a partir da alimentação proveniente do estômago e dos intestinos. Do fígado, o sangue seria levado pela veia cava ao ventrículo direito do coração e de lá, nutriria os pulmões e o resto do corpo. Conceitos mais claros, e aceitos até os nossos dias, enfocando a existência da circulação portal (Figura 1) surgiram com Vesalius, em 1543⁵.



Figura 1: Ilustração presente em “Fabrica” de Vesalius (1543), mostrando o fígado rebatido, destacando-se sua divisão anatômica e o sistema venoso portal ⁵.

Os primórdios da cirurgia do fígado encontram-se na recomendação de Hipócrates para a incisão e drenagem de abscessos hepáticos⁶ e na realização, por Celsus, de desbridamento de lesões hepáticas em feridos de guerra. Durante séculos o fígado foi considerado um órgão misterioso, com anatomia complexa, número imenso de funções e capacidade extraordinária de se regenerar. Ambroise Paré, notável cirurgião militar, advertia já por volta de 1500, sobre os riscos de sangramento relacionados ao trauma hepático. Relatos de pequenas ressecções hepáticas no trauma (em particular por lesões penetrantes) permeiam o século XVII e XVIII⁴. O século XIX é marcado por grandes avanços em cirurgia. Crawford Long em 1842 e William Morton em 1846 iniciaram a era da anestesia com o uso do éter inalatório. Observações realizadas por Ignaz Semmelweis, posteriormente solidificadas com os ensinamentos de Joseph Lister, inauguraram a época do cuidado asséptico na realização de

operações e tratamento de feridas, transformando a prática cirúrgica⁷. No final do século surgem descrições das primeiras ressecções eletivas: mastectomia radical (1880), gastrectomia (1881), nefrectomia (1881), colecistectomia (1882), anastomose colônica (1883) e excisões pancreáticas (1884)⁴. A cirurgia experimental hepática avança no estudo dos mecanismos de regeneração e reserva funcional do fígado. Destacam-se os trabalhos em modelos animais publicados por Tillmans (1879), apud Sandblom⁵, e posteriormente por Gluck (1883), apud McClusky e cols⁴. Por fim, em 18 de janeiro de 1887, Carl Langenbuch realiza a ressecção de um tumor hepático em um paciente do sexo feminino de 30 anos de idade⁷: trata-se do primeiro relato na literatura médica de uma ressecção hepática eletiva realizada com sucesso⁴.

A história da cirurgia hepática em suas origens é marcada por uma dura luta contra o sangramento, especialmente contra a hemorragia maciça, considerada o seu maior risco, sendo o prognóstico operatório essencialmente dependente do volume da perda de sangue. No século XX, precisamente em 1908, Pringle⁸ publica o relato de sua experiência no tratamento de oito pacientes, vítimas de hemorragia oriunda de traumatismo hepático. Desses, quatro foram submetidos a laparotomia, uma refutou o tratamento operatório e três morreram antes mesmo que um procedimento cirúrgico pudesse ser indicado. Para os pacientes operados, Pringle teve a idéia de controlar o sangramento excessivo temporariamente pela realização de uma manobra digital ocluindo a tríade portal (manobra de Pringle). A isquemia hepática, pela compressão das estruturas vasculares do hilo hepático (veia porta e artéria hepática) passa, a partir de então, a ocupar um papel de destaque no controle de hemorragias e, conseqüentemente, na diminuição das complicações inerentes à cirurgia do fígado. Somaram-se aos trabalhos de Pringle os estudos anatômicos de Rex (1888), apud Blumgart⁹, e Cantlie¹⁰ (1898) acerca da anatomia cirúrgica do fígado. Cantlie concluiu que em humanos, os lobos hepáticos direito e esquerdo são de tamanho semelhantes e divididos por um plano imaginário que cruza o fígado a partir da bifurcação da veia porta, no nível do leito da vesícula biliar, em direção à veia cava inferior¹⁰. Esse relato é o primeiro a quebrar o conceito previamente aceito acerca da divisão do fígado em lobos direito e esquerdo ao nível do ligamento falciforme⁴. Graças a isso, essa linha de simetria ao nível do plano que divide o fígado conforme preconizado por Rex e Cantlie é, nos dias atuais, frequentemente chamada de linha de Rex-Cantlie. Esses estudos serviram de base para que posteriormente fossem realizadas as primeiras hepatectomias parciais com ligadura de pedículos portais e, por conseguinte, com menor sangramento¹¹.

Uma nova era da cirurgia hepática teve assim início, com o controle vascular do fígado e o estudo mais acurado de sua anatomia interna. Uma série de trabalhos foram publicados até a segunda guerra mundial, confirmando os achados de Cantlie do final do século XIX⁴. Em 1953, já no período pós-guerra, os anatomistas e cirurgiões tinham claramente determinado que a distribuição dos ductos biliares, artéria hepática e pedículos portais era segmentar no interior do fígado. Mas o que dizer das veias hepáticas? Essa questão foi respondida por Claude Couinaud¹² em 1954. A era moderna da cirurgia hepática teve início com os seus estudos, que estabeleceram uma perfeita correlação anátomo-cirúrgica, em função da distribuição dos pedículos portais e das veias hepáticas, descrevendo a segmentação hepática¹³. Em sua publicação, de modo profundamente técnico, dividiu o fígado em oito segmentos, que passaram à ser a base das ressecções hepáticas que a seguiram (Figura 2).

Paralelamente aos avanços no conhecimento na anatomia interna do fígado, cresciam os estudos sobre a função hepática e o aprimoramento das técnicas operatórias de abordagem do órgão. Em artigo datado de 1959, Quattlebaum¹⁴ listou quatro passos importantes que deveriam ser utilizados durante grandes ressecções hepáticas: adequada exposição do órgão, oclusão vascular das estruturas envolvidas com o(s) segmento(s) a ser(em) ressecado(s), completa mobilização do fígado e uso de instrumental especial, sem corte, para divisão do parênquima. Tais postulados são historicamente um marco no que tange os grandes modelos de ressecções até os dias atuais: apenas a revisão de tais conceitos nos faz entender a sua fundamental importância⁴. Mas, o grande passo seguinte estava por ser dado, no início da década de 60.

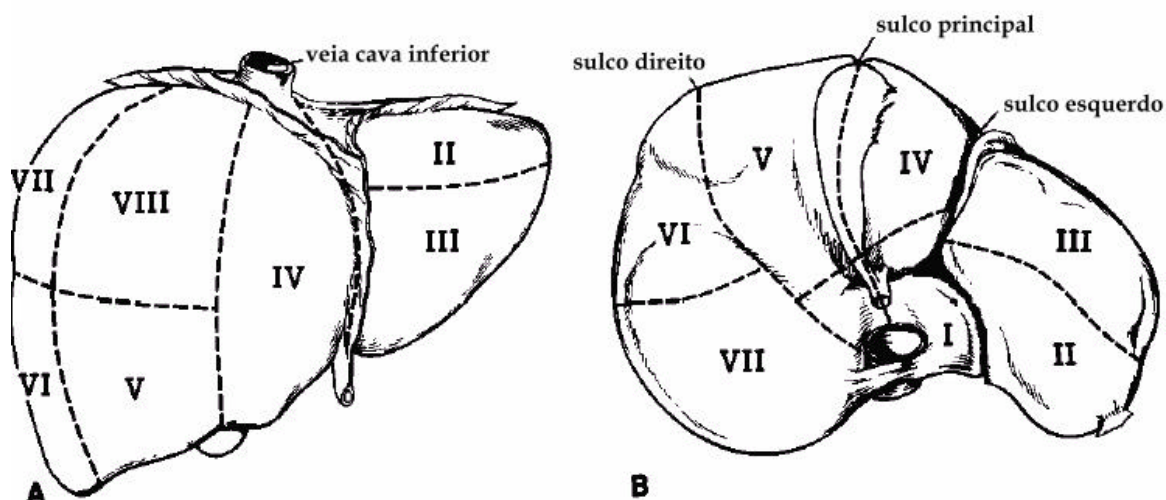


Figura 2: Lobos e segmentos hepáticos baseados na distribuição intra-hepática dos ductos biliares e vasos sanguíneos. A – vista anterior, B – vista inferior. Terminologia proposta por Couinaud¹².

Até o ano de 1955, jamais fora mencionada a possibilidade de realização de um transplante de fígado. Nesse ano, Welch¹⁵ publica um estudo experimental apresentando um modelo de transplante heterotópico de fígado em cães. Ao longo dos próximos anos outros estudos experimentais surgiram enfatizando as questões técnicas e as possibilidades de rejeição, até então colocadas como um grande empecilho para a realização do transplante hepático. Em 1960, Starzl¹⁶ e Moore¹⁷ publicaram relatos acerca do transplante ortotópico do fígado em cães, à partir dos trabalhos originais de Cannon, apud Foster¹¹, quatro anos antes. As experiências continuaram por mais três anos com transplantes em cães e porcos. O primeiro transplante ortotópico de fígado em humanos foi realizado por Starzl, em 1º de março de 1963, na Universidade de Colorado, Denver (EUA), ao qual seguiram-se outros quatro, nos sete meses subsequentes, todos sem sucesso. Em setembro de 1963 e em janeiro de 1964, outras tentativas de transplantes em humanos foram realizadas, em Boston e em Paris, respectivamente, também sem sucesso⁴. Seguiram-se outros insucessos, até que em 23 de julho de 1967 ocorreu o primeiro transplante ortotópico de fígado bem sucedido em humanos. Tratou-se de uma criança de um ano e meio de idade que sobreviveu por treze meses, morrendo em consequência de metástases de carcinoma hepatocelular pelo qual fora transplantada¹⁸. Observações clínicas e estudos experimentais subsequentes permitiram ligar o sucesso do procedimento a fatores relacionados a adequada preservação de órgãos doados, melhoria da técnica cirúrgica com o uso das derivações venosas que drenassem os leitos esplâncnicos e sistêmicos durante a fase anepática e resolução das dificuldades técnicas em termos de reconstrução da via biliar e anastomoses vasculares¹⁹. Com o advento de novas drogas imunossupressoras, em especial a introdução da ciclosporina, sobreveio uma melhoria significativa na sobrevida e na qualidade de vida pós-transplante¹⁹. Nos dias atuais o transplante de fígado vem sendo amplamente realizado, não obstante seus desafios e dificuldades técnicas dia-a-dia superadas. Constitui cada vez mais, conforme palavras de Paul McMaster²⁰: “um dos poucos atos na prática médica clínica ou cirúrgica que transforma um paciente seriamente debilitado em um ser completamente reabilitado.”

Os novos rumos da cirurgia hepática apontam para o uso da vídeo-cirurgia. A primeira hepatectomia anatômica regrada por vídeo-laparoscopia foi publicada em 1996 por Azagra e cols²¹. É, portanto, um procedimento muito recente, mas que tem sido utilizado com maior frequência nos últimos anos²². Limitações incluem dificuldades na realização de manobras quase sempre necessárias durante a cirurgia do fígado, como a sua ampla mobilização e exposição, controle dos pedículos vasculares, palpação minuciosa e ultra-sonografia intra-

operatória. Além disso, fatores como a transecção do parênquima, o potencial de hemorragia intra-operatória e o risco de embolia gasosa tornam os procedimentos laparoscópicos tema controverso²³. Não obstante, os avanços nesse campo indicam que esse método deverá cada vez mais fazer parte do arsenal terapêutico do cirurgião de fígado²².

A lesão por isquemia e reperfusão (I/R).

Conceito.

A palavra “isquemia” tem sua origem no grego “*ischaimos*” (deter) e “*haima*” (sangue). Caracteriza-se por fluxo de sangue oxigenado insuficiente para manter as funções normais teciduais levando à diminuição de nutrientes e retardo na retirada de metabólitos²⁴. As conseqüências da isquemia são bastantes variáveis e, de maneira geral, dependem do nível da oclusão sanguínea, da circulação colateral e do grau de demanda de oxigênio dos tecidos envolvidos²⁵. Em diversas situações na prática clínica a isquemia representa um papel fundamental no desencadeamento dos eventos fisiopatológicos que, se não revertidos a tempo, resultam em dano celular irreversível.

A reperfusão, com restabelecimento do fluxo sanguíneo de modo a prover uma concentração de oxigênio em níveis adequados para os tecidos isquêmicos torna-se, portanto, um pré-requisito fundamental. Paradoxalmente, isso pode ser responsável por lesões, tanto ao nível do sítio isquêmico, como em locais distantes, ainda mais graves que as da isquemia *per se*²⁶. Na isquemia, há acúmulo de uma série de metabólitos tóxicos, os quais ganham a circulação sistêmica durante o período de reperfusão²⁷. Clinicamente, as evidências desse processo são o desenvolvimento de acidose metabólica com hipercalemia cursando em muitos casos, como observado em tecidos musculares, com mioglobulinemia, mioglobulinúria, insuficiência renal, além de alterações da resposta pressórica e formação de edema pulmonar não cardiogênico²⁸. Ao conjunto de alterações decorrentes da privação e do restabelecimento do suprimento de oxigênio a órgãos e tecidos denomina-se o nome lesão ou injúria de isquemia e reperfusão (I/R)²⁶.

Fisiopatologia.

Muito se tem estudado acerca dos mecanismos biomoleculares relacionados à injúria de I/R. Acredita-se que o afluxo de oxigênio nos tecidos isquêmicos leve a uma série de alterações bioquímicas, inflamatórias e celulares mediadas, em uma etapa inicial, pela formação de radicais livres de oxigênio²⁹. Define-se radical livre como qualquer átomo ou molécula que tenha em sua órbita mais externa um ou mais elétrons não pareados³⁰. Isso lhes confere propriedades paramagnéticas, elevada capacidade em doar ou receber elétrons, tornando-os potenciais desestabilizadores moleculares³¹. Ao vencer a ação de mecanismos de defesa naturais a eles direcionados, os radicais livres desencadeiam fenômenos oxidativos auto-alimentáveis, levando ao dano celular, fenômeno conhecido por estresse oxidativo³².

As lesões assim produzidas servem como um estímulo à partir do qual incia-se a reação inflamatória. Mediadores humorais levam à quimiotaxia de neutrófilos³³ aos sítios de lesão. Estes passam a interagir com o endotélio vascular local, através da ação de integrinas leucocitárias (em especial proteínas da classe CD11/CD18) moduladas pelo leucotrieno-B4 (LTB4), componentes do complemento (C5a) e pelo fator de ativação plaquetária (FAP), além de proteínas de adesão endotelial, destacando-se imunoglobulinas da classe ICAM-1 e VCAM-1 e selectinas (ELAM-1/GMP-140), estas por sua vez, moduladas pelo fator de necrose tumoral²⁶. Com a interação neutrófilo-endotélio dá-se um incremento na produção de radicais livres. Enzimas proteolíticas como a colagenase, elastase e mieloperoxidase passam a ser liberadas pelo neutrófilo. Esta última ocupa um papel importante, catalisando a reação entre peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e íon cloreto (Cl⁻), para a formação do radical hipoclorito (HOCl), potente agente oxidante³⁴ (figura 3).

O neutrófilo ativado estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias. Destacam-se a interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), metabólitos do ácido aracdônico (leucotrieno B4 e tromboxano A2) e o fator de necrose tumoral³⁵. Com a amplificação da resposta inflamatória, outras linhagens celulares passam a ser recrutadas, dentre estas, os mastócitos. Da sua degranulação são originadas diversas aminas com propriedades vasoativas como histamina, proteoglicans, prostaciclina, cininas, leucotrienos, proteases, e óxido nítrico. O óxido nítrico, gás radical livre, tem interessantes propriedades vasodilatadoras, além de

funcionar como antiagregante plaquetário e ser tóxico para bactérias. Tais funções, particularmente benéficas durante uma injúria inflamatória, tornam-se deletérias uma vez da interação do óxido nítrico com outros radicais, em especial o radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), levando a produção de peroxinitrito ($ONOO^-$) e dióxido de nitrogênio (NO_2), compostos capazes de promover graves lesões celulares³⁶.

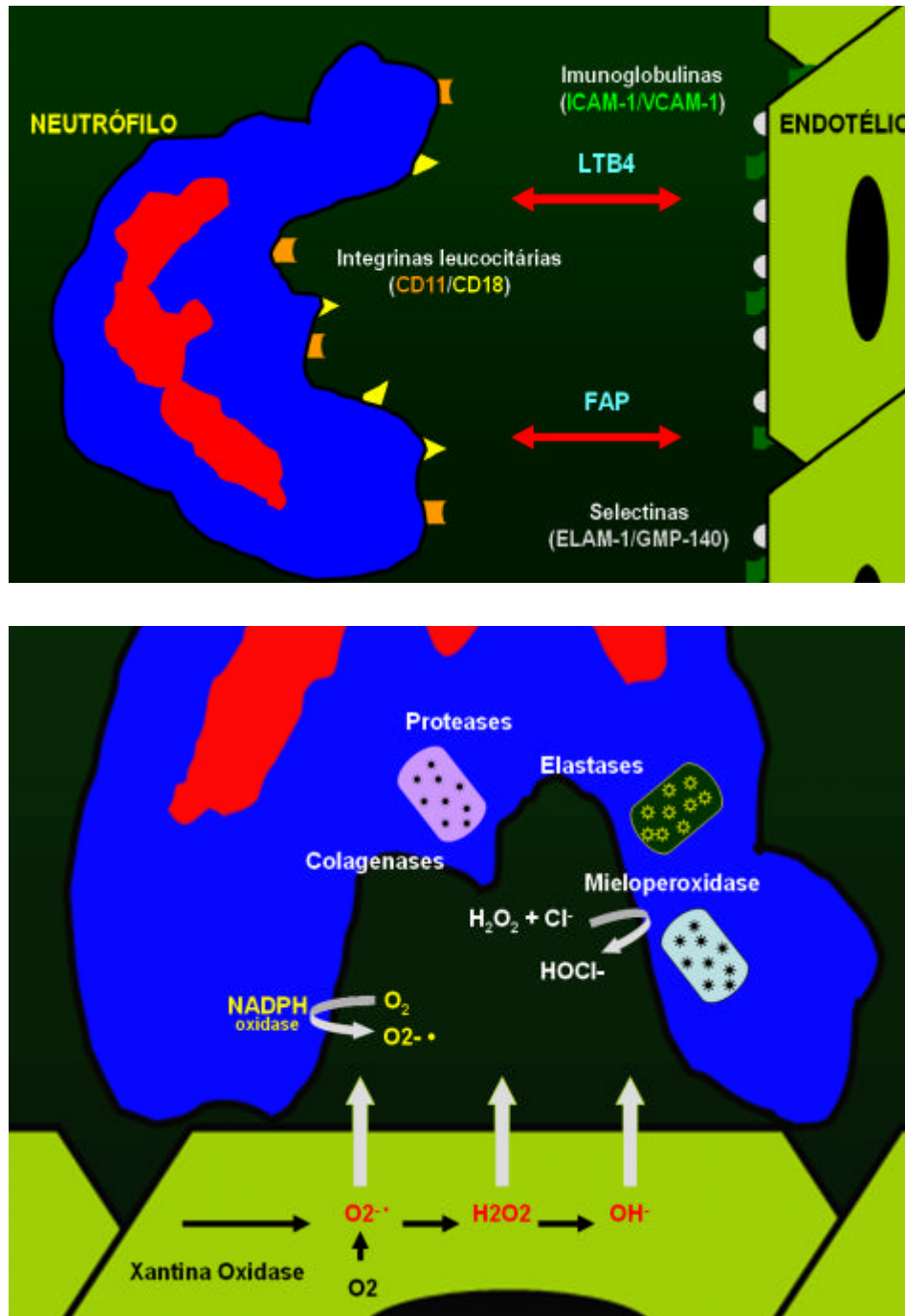


Figura 3: Interação neutrófilo-endotélio e a produção de espécies reativas de oxigênio.

Portanto, observa-se que, à partir de um estímulo gerado pela formação de radicais livres, uma série de reações passam a se desenvolver, caracterizadas pela liberação de sinais químicos que modulam a interação entre o neutrófilo e endotélio, liberação de enzimas proteolíticas e recrutamento de outras linhagens celulares, potencializando a resposta inflamatória inicial. Destaque ainda tem sido dado a outros eventos relacionados ao acúmulo de neutrófilos. Na microcirculação desenvolve-se, por um mecanismo de empilhamento celular, obstrução do fluxo capilar com impossibilidade de restauração de perfusão, acentuando o trauma isquêmico, fenômeno conhecido como *no-reflow*³⁷.

Espécies reativas de oxigênio e sua formação na lesão por I/R.

Percário³⁸ (2004), cita como os mais importantes radicais livres em fenômenos biológicos o radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$), hidroxila (OH^{\cdot}), oxigênio singlet (O_2^*), alcoxido (R^{\cdot}) e peróxido (ROO^{\cdot}). Substâncias outras, como o peróxido de hidrogênio, muito embora não tenham um elétron não pareado em sua camada de valência, podem se combinar com substratos específicos formando radicais livres. Por este motivo, há uma tendência atual em chamar todos esses compostos de espécies reativas de oxigênio (ROS)³⁴.

Em condições fisiológicas, o NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) é o último aceptor de elétrons na cadeia respiratória. Nessa reação, que se processa no interior das mitocôndrias catalisada pela enzima xantina desidrogenase, o oxigênio (O_2) sofre redução tetravalente originando duas moléculas de água (H_2O). Cerca de 2 a 4% do oxigênio reduz de forma incompleta levando a formação dos radicais superóxido, hidroperoxila, hidroxila e do peróxido de hidrogênio (Figura 4). De maneira geral, estas ROS sofrem a ação de sistemas antioxidantes preventivos ou reparadores naturais. Dentre estes, a enzima superóxido dismutase (SOD) – capaz de dismutar o radical superóxido convertendo-o novamente a oxigênio e peróxido de hidrogênio – catalase e o sistema glutatona (glutatona reduzida –

GSH, glutationa redutase – GSHrd e glutationa peroxidase – GSHpx). O sistema glutationa é considerado o maior mecanismo biológico para redução do estresse oxidativo³⁹.

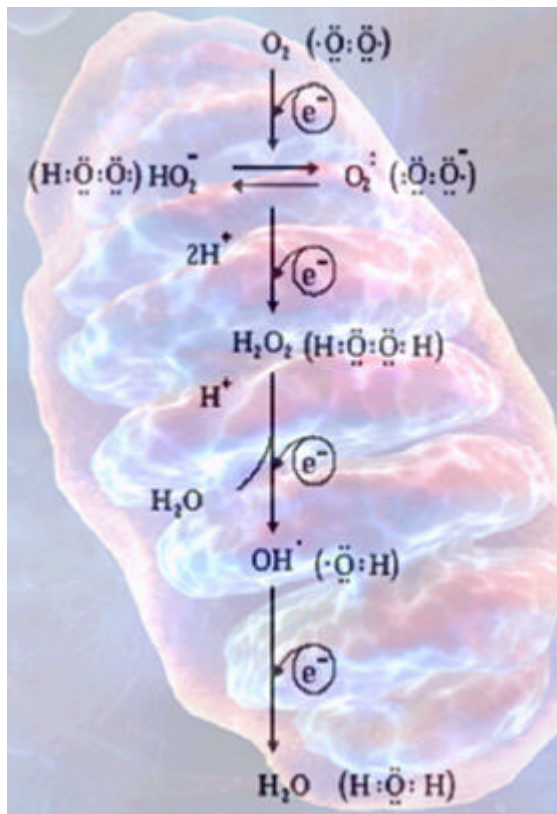


Figura 4: Redução tetraivalente do oxigênio no interior da mitocôndria³⁹.

Granger e cols²⁹, em estudo publicado em 1986, propuseram um mecanismo para explicar a origem das ROS na injúria por I/R. Durante a isquemia, com a interrupção do suprimento de oxigênio para as células, o trifosfato de adenosina (ATP) é metabolizado até hipoxantina, acumulando-a no espaço intra-celular. Isso leva a alterações de gradientes iônicos dada à falha de mecanismos de bomba ATP-dependentes na membrana celular, com consequente afluxo de íons Cálcio (Ca^{2+}) para o interior celular. O íon cálcio ativa proteases intracelulares que convertem a enzima xantina desidrogenase para sua forma oxidada (xantina oxidase). Com a reperfusão, o oxigênio reintroduzido ao meio celular serve de substrato para a xantina oxidase. Esta converte hipoxantina à xantina, formando, nesta reação ROS: radical superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila. Todos esses produtos possuem elevada capacidade desestabilizadora da membrana celular (Figura 5).

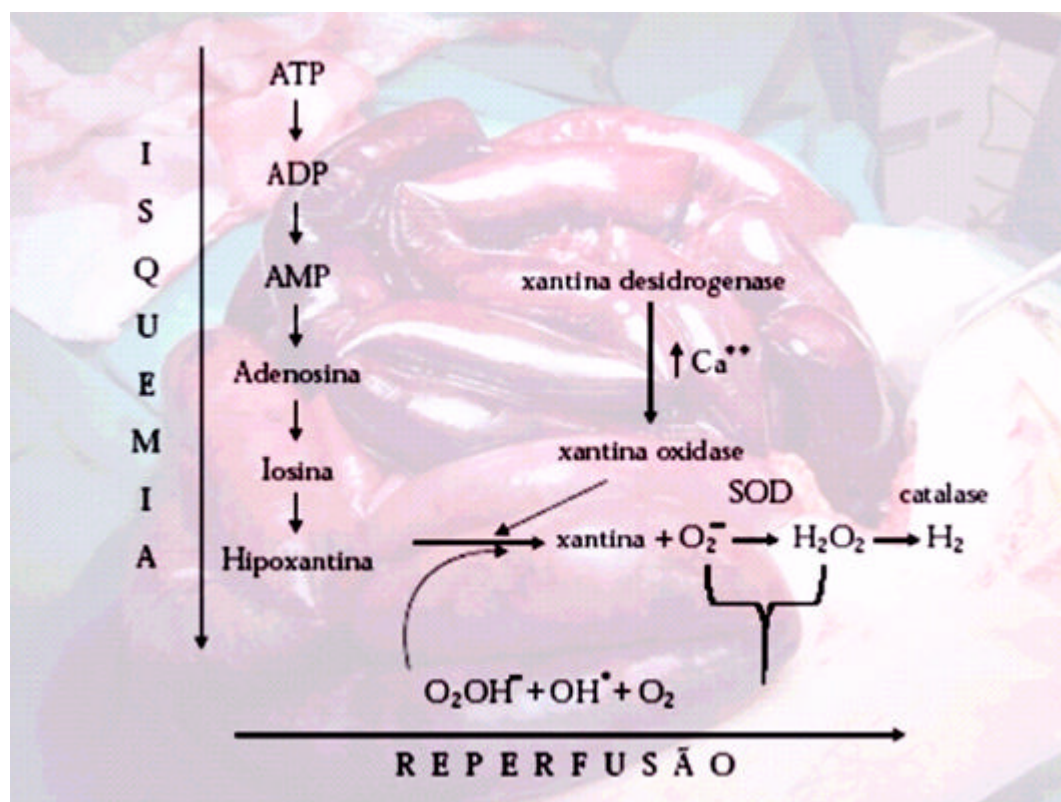
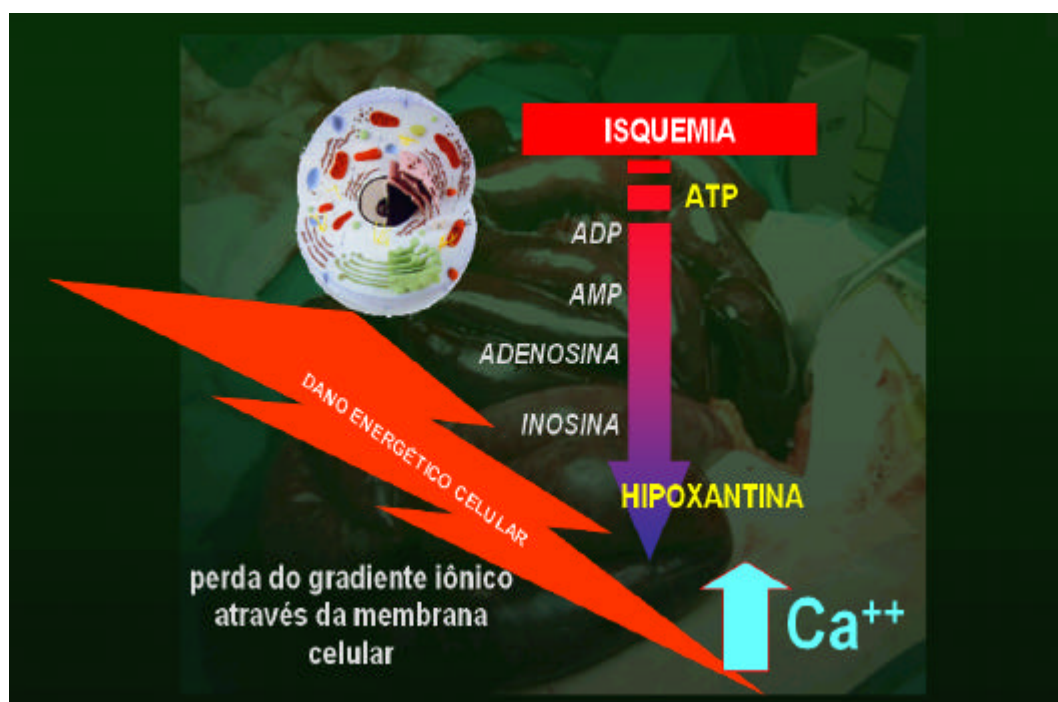


Figura 5: Produção de espécies reativas de oxigênio na injúria de isquemia-reperusão, segundo o mecanismo proposto por Granger e cols²⁹.

Além dessa, há outras vias de produção de ROS relacionadas à injúria por I/R. A fosfolipase A2, é estimulada pelo aumento do íon cálcio intracelular, e converte o ácido aracdônico fosfolípídeo esterificado para sua forma ativa. Uma vez ativado, o ácido aracdônico, sob a ação das enzimas lipoxigenase e cicloxigenase, produz o leucotrieno B4 e tromboxano A2. Estes servem de estímulo a mediadores peptídicos promovendo vasoconstrição, agregação plaquetária e quimiotaxia de neutrófilos⁴⁰. O neutrófilo ao interagir com o endotélio, conforme já descrito anteriormente, potencializa a formação de ROS, especialmente pela formação do radical superóxido e hipoclorito .

Em 1954, Geshman e Gilbert, apud Percário³⁸, postularam que o dano biológico do oxigênio é decorrente da formação de radicais livres. Poucos anos mais tarde, em 1956, Harman⁴¹, propos em sua teoria do envelhecimento o modelo do estresse oxidativo, através do qual, reações desencadeadas por ROS são responsáveis por danos moleculares progressivos, resultando na síntese de proteínas modificadas e desarranjo molecular celular. Considera-se como o efeito mais lesivo das ROS a destruição da membrana celular através da peroxidação lipídica (lipoperoxidação – LPO)⁴². Esse é um processo complexo que inicia-se com a abstração de um átomo de hidrogênio do grupo metileno, posicionado entre as duas bandas insaturadas da molécula lipídica. Forma-se um novo radical livre lipídico, com carbono central que, na presença de O₂, dá origem a lipoperóxidos. Estes são posteriormente metabolizados no malondialdeído (MDA), o qual é passível de ser dosado e tem sido usado como um marcador da atividade deletéria das ROS⁴³. A dosagem do malondialdeído (MDA) é um método simples, baseado na sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em condições acídicas e aquecimento, e tem sido em nosso meio a forma mais utilizada de avaliação da LPO da membrana³⁸.

Mecanismos de defesa antioxidante.

Por definição, uma substância antioxidante é aquela capaz de inibir a oxidação ou qualquer substância que, mesmo presente em baixa concentração comparada ao seu substrato oxidável, diminui ou inibe a oxidação daquele substrato⁴⁴. Do ponto de vista biológico, podemos definir antioxidantes como aqueles compostos que protegem os sistemas biológicos

contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam à oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares⁴⁵.

Como citado anteriormente, o corpo humano está bem equipado com mecanismos de defesa contra a atividade das ROS³⁷. À medida que esses são produzidos, são naturalmente neutralizados por um sistema endógeno de defesa antioxidante, enzimático ou não enzimático, que serviria para prevenir ou reparar a lesão oxidativa³⁶. O estresse oxidativo é resultado de um distúrbio no estado de equilíbrio, do sistema de pró-oxidantes e antioxidantes, nas células intactas⁴⁵. Essa definição implica no fato de que a célula deve ter um sistema onde exista um equilíbrio entre a produção e a eliminação de ROS durante o metabolismo aeróbico normal. Quando existe maior ocorrência de eventos oxidativos, consumindo antioxidantes como a glutatona e a vitamina E, tem-se como resultado final o dano à lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. A severidade deste processo pode levar à morte celular⁴⁵.

Os antioxidantes preventivos impedem a geração de ROS ou, seqüestram estas espécies impedindo sua interação com os alvos celulares³⁷. Dentre estes temos a glutatona (GSH), a superóxido dismutase (SOD), a catalase, e a vitamina E⁴⁵.

Antioxidantes reparadores são os bloqueadores da etapa de propagação da cadeia radicalar que, efetivamente, removem radicais intermediários, como os radicais peroxila ou alcoxila³⁷. São exemplos a glutatona-redutase (GSH-Rd), a glutatona peroxidase (GSH-Px) e o ácido ascórbico⁴⁵.

A GSH (L-gama-glutamil-L-cisteinil-glicina) está presente na maioria das células e pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante. A GSH-Rd é uma flavoproteína que recupera a GSH quando ocorre a oxidação⁴³. A GSH-Px catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e outros peróxidos orgânicos. É encontrada no citosol, na mitocôndria e na membrana. Ela contém selênio em seu sítio ativo⁴⁶. A catalase é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 . Está presente na maioria dos tecidos, mas concentra-se, principalmente, no fígado, rim, baço e eritrócito⁴⁷. A superóxido dismutase catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , na presença do próton H^+ . Existem duas formas de SOD, a SOD-cobre-zinco presente no citosol, e a SOD-mangânês localizada primariamente na mitocôndria⁴⁸. Conforme a definição, além do sistema antioxidante enzimático, também são considerados antioxidantes todas as

substâncias que doam ou recebem um elétron de um radical livre, inativando-o. São exemplos o ácido ascórbico (vitamina C), beta-caroteno, ácido úrico, alfa-tocoferol (vitamina E), albumina, transferrina e manitol. Há ainda aqueles que indiretamente tem um efeito antioxidante, como o alopurinol (inibidor da xantina oxidase), o selênio (presente na glutathione peroxidase), a deferoxamina (quelante do ferro), entre outros⁴³. No plasma, a ordem teórica de preferência no consumo de antioxidantes, no processo de LPO, é a seguinte: vitamina C = tióis (glutathione) > bilirrubina > ácido úrico > vitamina E⁴⁹.

Na atualidade, várias substâncias com propriedades antioxidante têm sido estudadas sob situações de estresse oxidativo. O manitol, inibidor do radical hidroxil, na dose de 0,29g/kg mostrou reduzir o edema pulmonar após cirurgias para aneurismas, por um mecanismo diferente de sua capacidade de provocar diurese osmótica⁵⁰. O alopurinol por sua vez, agindo através da inibição da enzima xantina oxidase, tem mostrado limitar a lesão por I/R em muitos modelos animais⁴⁹. O extrato seco de ginkgo biloba (egb 761) mostrou diminuir o estresse oxidativo em nível miocárdico⁵¹. Em nível intestinal a vitamina C e o manitol mostraram-se, em um modelo animal de isquemia mesentérica e reperfusão, diminuir os níveis teciduais do MDA e elevar os níveis de glutathione, podendo desempenhar um papel protetor na lesão desencadeada por essa condição⁵². Muitas outras substâncias como o beta-caroteno, ácido úrico, alfa-tocoferol (vitamina E), albumina, transferrina e selênio mostraram uma excelente atividade antioxidante *in vitro*. Todavia, muitos desses resultados não foram capazes de serem reproduzidos em modelos *in vivo*⁴².

A glutamina é o aminoácido mais abundante do plasma⁵³. Avidamente captado pelo enterócito, tanto pela corrente sangüínea quanto pela luz intestinal, que o usa como seu principal substrato energético⁵⁴. Classificado como não essencial, é sintetizado em quase todos os tecidos corpóreos e se torna indispensável sob certas condições, especialmente nos estados catabólicos⁵⁵. Aguilar-Nascimento e cols⁵⁶ demonstraram proteção conferida pela injeção intraluminal de glutamina em modelo experimental de lesão por I/R intestinal.

Outros alvos pontenciais na lesão por I/R têm sido descritos: inibição da produção de metabólitos do ácido aracdônico (uso de inibidores da lipoxigenase e tromboxano sintetase),

anticorpos monoclonais anti moléculas de adesão (anti complexo CD-18 do neutrófilo, anticorpos anti-imunoglobulinas endoteliais ICAM-1) e agentes estimulantes e citoprotetores do óxido nítrico. Dentre eles destaca-se a quercetina, bioflavóide neutralizador do radical superóxido e gerador de óxido nítrico, prostaglandina E1, promovendo redução do radical superóxido e peroxinitrito mantendo o óxido nítrico, e L-arginina, aminoácido precursor do óxido nítrico, com ação citoprotetora sob o mesmo⁴⁹.

Marcadores sorológicos da lesão oxidativa induzida por I/R & Marcadores da defesa antioxidante.

Em modelos biológicos, portanto, o estresse oxidativo é o resultado final entre a produção de ROS – o qual pode ocorrer como parte de mecanismos fisiológicos (como na cadeia respiratória) ou ser consequência de condições patológicas (como na lesão por I/R) – e a atividade dos sistema de defesa antioxidantes, sejam de origem endógena ou exógena. Em outras palavras, sendo o plasma, assim como outros fluídos orgânicos, uma mistura complexa, o estudo do estresse oxidativo implica na observação da atividade do conjunto de ROS que nele atuam em função do conjunto de mecanismos enzimáticos ou não-enzimáticos de defesa antioxidante presentes.

Tendo em vista essas condições, a atividade deletéria das ROS tem sido estudada investigando-se as consequências do seu ataque a lípidios componentes da membrana celular. Conforme citado anteriormente, o processo de destruição da membrana celular pelas ROS, recebe o nome de lipoperoxidação (LPO)⁴³. Trata-se de uma reação em cadeia mediada por ROS, resultando na deterioração oxidativa de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs). PUFAs são aqueles que apresentam mais de uma dupla ligação covalente carbono-carbono em sua estrutura. São os principais componentes estruturais da membrana celular, sendo parte integrante de sua estrutura lipoprotéica. Os PUFAs são particularmente susceptíveis ao ataque por ROS⁵⁷.

A LPO é constituída de três fases: iniciação, propagação e terminação (Figura 6).

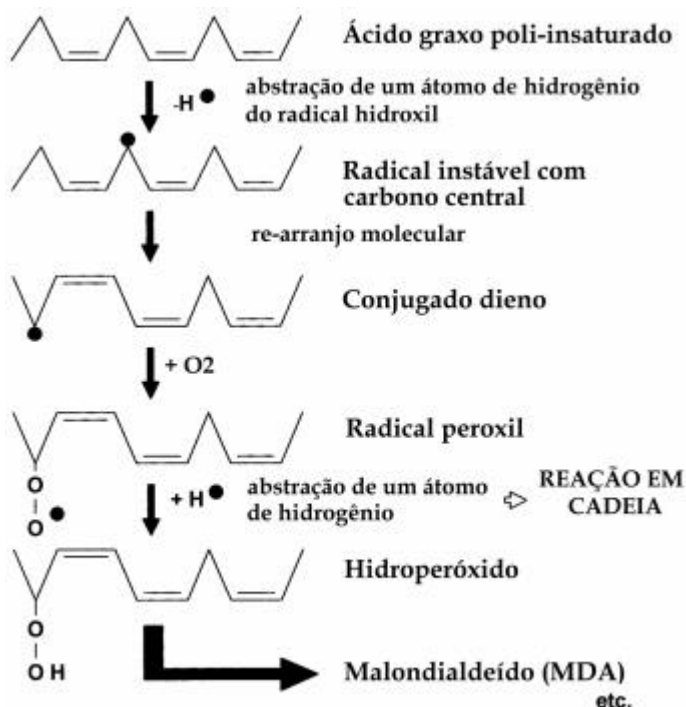


Figura 6: Peroxidação lipídica da membrana e formação de hidroperóxidos. Adaptado de Rice-Evans e cols⁵⁷.

A fase de iniciação começa em geral com a abstração de um átomo de hidrogênio do carbono central entre as duas bandas insaturadas da molécula lipídica. Com isso, forma-se um radical livre instável com carbono central que é estabilizado rapidamente através de re-arranjo molecular espontâneo, formando um conjugado dieno (Farmer e cols, apud Rice-Evans e cols⁵⁷). Há métodos que avaliam a atividade das ROS sob lípidos da membrana celular, como a espectroscopia ultravioleta e cromatografia líquida de alta performance (HPLC), detectando conjugados dienos pela mensuração da perda seletiva de PUFAs à partir de frações de membrana. Tais métodos, apesar de guardar uma boa correlação com outros índices de peroxidação, possuem limitações importantes em sua aplicabilidade *in vivo* (Buttriss & Diplock, apud Rice-Evans e cols⁵⁷). A fase de propagação tem início com a reação espontânea do conjugado lipídico dieno com o oxigênio, formando-se radicais peroxil. Estes podem ser bloqueados por antioxidantes reparadores ou reagir com lipídios poli-insaturados adjacentes pela abstração de um átomo de hidrogênio, formando hidroperóxidos⁴⁹. Observa-se que a abstração deste novo átomo de hidrogênio de uma molécula adjacente de ácido graxo poli-insaturado re-inicia o processo (reação em cadeia) que apenas será interrompido pela ação de antioxidantes (terminação). A determinação de hidroperóxidos em amostras biológicas é um método frequentemente utilizado para quantificação da LPO, embora extremamente complexo pela labilidade destes compostos⁵⁷.

Uma vez produzidos, os hidroperóxidos são metabolizados a aldeídos, dentre estes o MDA (MDA). Trata-se de um dialdeído de três carbonos altamente reativo. Em geral é produzido à partir de hidroperóxidos lipídicos, entretanto, pode também derivar da hidrólise de pentoses, desoriboses, hexoses, de alguns aminoácidos e do DNA (Frankel & Neff, apud Rice-Evans e cols⁵⁷). O MDA pode ser dosado com grande especificidade e acurácia por métodos de HPLC. Todavia, na prática, o método que vem sendo mais utilizado para sua mensuração é o que utiliza de sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), proposto inicialmente por Kohn e Liversedge em 1944⁶⁶. Desde sua proposição, este método sofreu muitas modificações, todas relativas às condições da reação, mas sem que a reação em si sofresse qualquer alteração⁴⁷. Percario e cols⁵⁸ padronizaram a técnica de dosagem do MDA em 1993, tornando-a extremamente factível, reproduzível e tecnicamente simples. A dosagem por diversos métodos de outros aldeídos derivados de hidroperóxidos (alcadienos, alcatrienos, alfa-hidroxi aldeídos, hidroperoxialdeídos, cetonas, etc.) é descrita, porém, em estudos médicos têm sido pouco utilizadas⁵⁷.

Pode-se considerar ainda, como medida indireta do estresse oxidativo, a dosagem de marcadores pró-inflamatórios liberados à partir da agressão inicial das ROS⁴². Um exemplo disso é a dosagem da mieloperoxidase (produzida pelo neutrófilo ativado durante a resposta inflamatória), óxido nítrico, prostaglandinas, fator de necrose tumoral, interleucinas, etc⁴³. Logicamente, esses métodos possuem menos especificidade na aferição do estresse oxidativo, pois sofrem influência de outros fatores potencializadores da resposta inflamatória, além da agressão das ROS⁵⁷.

A dosagem da capacidade antioxidante total (CAT) de amostras biológicas constitui um capítulo à parte no estudo dos mecanismos biomoleculares envolvidos com o estresse oxidativo. Em suma, são métodos capazes de detectar a atividade somatória de todos os antioxidantes de origem endógena e exógena presentes em um sistema. É a inter-relação desses diversos antioxidantes que determinará em última análise o quanto essa mistura está protegida da atividade de ROS⁵⁷. A mensuração da capacidade antioxidante total de uma amostra possibilita, portanto, do ponto de vista biológico, informações mais importantes do que a mensuração de compostos antioxidantes isolados, haja vista considerar o efeito cumulativo de todos os antioxidantes presentes no plasma ou outros fluídos corpóreos. A grande parte desses métodos propicia a análise de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis

sem distinção. A capacidade antioxidante da amostra é determinada tendo por referencia a atividade de algum outro antioxidante conhecido. O trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrameticromono-2-carboxílico), análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E, tem sido muito empregado para esse fim⁵⁹. Não obstante, são descritas mensurações de compostos antioxidantes isolados (complexos enzimáticos ou não), que constituem os principais mecanismos de defesa contra a injúria oxidativa em sistemas biológicos. Dentre os mais utilizados temos: mensuração da vitamina E e carotenóides (HPLC); glutathione peroxidase, glutathione reductase, catalase e superóxido dismutase (métodos colorimétricos)⁵⁷. Os métodos colorimétricos utilizam a comparação, sob condições definidas, da cor produzida pela substância em quantidade desconhecida com a mesma cor produzida por uma quantidade conhecida do material a ser determinado. Essa comparação é feita pela medida da absorção relativa de luz (absorbância), através de leituras sob espectrofotometria⁶⁰.

I/R hepática.

Períodos de isquemia são necessários em um grande número de procedimentos cirúrgicos envolvendo o fígado, como no trauma hepático ou ressecção de lesões intraparenquimatosas⁶¹. Ao restaurar o fluxo sanguíneo, o fígado é alvo de um insulto adicional, agravando a injúria já causada pela isquemia. Isso caracteriza a lesão de I/R que, em especial no transplante hepático, ganha especial interesse haja vista ser condição *sine qua non* para sua realização⁶².

São vários os mecanismos envolvidos com a lesão pós-reperfusão no fígado⁶³. Em um estágio inicial o edema endotelial, vasoconstricção, seqüestro leucocitário e agregação plaquetária sinusoidal levam à falência da microcirculação⁶⁴. O edema endotelial e das células de Kupffer resulta da falha dos mecanismos de bomba ATP-dependentes na membrana celular, devido ao déficit energético gerado pela agressão isquêmica. O delicado balanço entre o óxido nítrico e o endotélio promove vasoconstricção. A velocidade do fluxo sanguíneo nesse nível diminui consideravelmente e isto, por sua vez, leva à leucostasia e aumento no contato entre os leucócitos e o endotélio⁶³. A ativação plaquetária juntamente com o empilhamento leucocitário favorecem o fenômeno de *no-reflow*, que prolongará o período de hipóxia, mesmo na vigência de reperfusão. Por sua vez, a ativação das células de Kupffer e dos neutrófilos desencadearão os fenômenos inflamatórios, potencializados pela produção de citocinas e pela ação de ROS no período de reperfusão⁶⁴.

Durante cirurgias hepáticas, períodos de isquemia quente do órgão podem durar de 15 a 50 minutos. No caso de isquemia intermitente (15 minutos de isquemia seguidos de 5 de reperfusão), esse tempo pode ser superior a 120 minutos⁶⁵. Muitos estudos demonstram o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e na LPO seguida a reperfusão nesses procedimentos⁶³.

Em relação ao transplante hepático, acrescentam-se fatores inerentes ao doador, que já pode estar sendo sujeito a fenômenos isquêmicos devido a períodos de hipotensão, uso de medicações, induzindo-o à disfunção hepática e tornando-o mais sujeito a lesões por I/R⁶². O mesmo pode ser observado em relação a fígados esteatóticos⁶⁶. É importante ressaltar que, a carência de órgãos para transplante faz com que aumente o uso de fígados sub-ótimos, mais propensos às lesões por I/R⁶². Fatores relacionados ao próprio ato operatório, como a redução do fluxo portal e arterial, e tempo prolongado de isquemia a quente e a frio do enxerto também são importantes no desencadeamento das lesões de I/R⁶². Alterações na microcirculação hepática tornam-se mais evidentes quanto maior for o tempo de conservação e são ainda mais significativas quando ocorre a reperfusão⁶⁷. A apoptose é um fenômeno comumente observado em biópsias que seguem o período de reperfusão hepática⁶⁸. Episódios de hipotensão no intra-operatório e isquemia esplâncnica também estão relacionados com a severidade das lesões de I/R⁶³.

Estudos têm demonstrado uma queda acentuada da atividade antioxidante endógena em períodos pós-reperfusão hepática⁶⁹. Isso provavelmente é resultado da degradação de antioxidantes dado ao aumento das ROS⁶³. Superóxido dismutase, alopurinol, N-acetilcisteína e alfa-tocoferol têm demonstrado atenuar a injúria por I/R em nível hepático⁸². No transplante, a perfusão e estocagem do fígado com soluções de conservação contendo ingredientes ativos à base de antioxidantes como o alopurinol, desferrioxamina e glutatona parecem aumentar a sobrevida dos enxertos⁷⁰.

Modelos experimentais de I/R hepática.

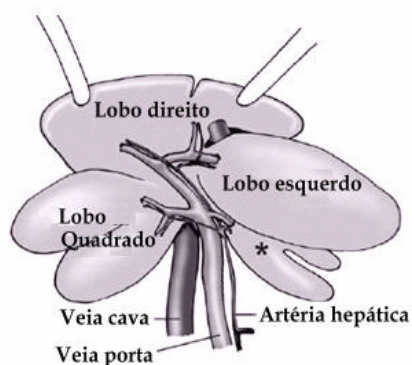
Como descrito anteriormente, Pringle⁸ em 1908, descreveu a técnica de isquemia hepática por clampeamento da tríade portal com finalidade de controlar sangramentos. Tal

método é utilizado até os dias atuais em situações de trauma e ressecções envolvendo o fígado⁷¹. Além disso, o transplante ortotópico do fígado, com isquemia a frio do órgão e posterior revascularização, constitui um dos maiores protótipos da lesão de I/R. Foi com a evolução dos estudos nesta área que os modelos experimentais de isquemia hepática difundiram-se. Tais modelos podem ser utilizados em outras situações como ressecções hepáticas, trauma com lesão hepática e choque hemodinâmico⁷².

Modelos experimentais para estudo de I/R hepáticas têm sido desenvolvidos em camundongos, ratos, cães, porcos e macacos⁷³. Nestes modelos, a descompressão do território venoso esplâncnico têm sido utilizada para garantir a estabilidade das condições circulatórias e metabólicas durante o período de isquemia hepática. Seu uso, no entanto, contraria o que é observado na prática em cirurgias hepáticas.

No estudo da I/R em nível do aparelho digestivo, o modelo murino tem sido o mais amplamente empregado. O rato apresenta facilidade de trabalho, adequabilidade ao protocolo e disponibilidade. A constituição anatômica visceral do rato é bastante similar a do homem, o que permite extrapolar, em certa medida, muitos dos conhecimentos adquiridos. Além disso, é um animal tolerante à anestesia tanto inalatória quanto intravenosa, tem porte pequeno, é de fácil manuseio cirúrgico para abordagem das artérias e, ainda, de baixo custo. Essas características favorecem o agrupamento de maior número de indivíduos, facilitando a avaliação estatística⁷⁴. De maneira geral, modelos de I/R são de fácil execução em animais de pequeno e médio porte, requerendo conhecimentos anatômicos básicos. É possível efetuar ligaduras de ramos principais (exemplos: artéria hepática, mesentérica inferior, cólicas, etc), ou empreender isquemias segmentares em ramos secundários⁷⁵.

A Figura 7 e a Tabela 1 mostram as principais características hepato-biliares e referentes a parâmetros fisiológicos do modelo murino⁷⁶.



- peso do fígado: 10 g / 250 g do rato (4%)
- volume do fígado: 19,6ml / 250 g do rato
- fluxo de bile: 22,5ml / dia / 250 g do rato
- Segmentação hepática: quatro lobos - médio (quadrado), lateral direito, esquerdo e caudado *
- O rato não tem vesícula biliar
- A bile de cada lobo hepático parte via ducto biliar. Estes ductos então formam um ducto biliar comum, o qual entra no duodeno à aproximadamente 25 mm distal do esfíncter pilórico.

Figura 7: Características hepato-biliares do modelo experimental murino⁷⁶.

Tabela 1: Principais parâmetros fisiológicos do modelo experimental murino⁷⁶.

Parâmetros	Valores
Período de vida	2,5 – 3,5 anos
Glândulas mamárias	06 pares
Peso corporal do macho adulto*	450 – 520 gramas
Peso corporal da fêmea adulta *	250 – 300 gramas
Temperatura corporal retal	35,9 – 37,5° C 96,6 – 99,5°F
Consumo de oxigênio**	0,84 ml/nl ² /g de peso corporal
Área de superfície corporal	10,5 cm ² (2/3 do peso corporal em gramas)
Necessidade de alimento	5 – 6 gramas/100g de peso/dia
Necessidade de água	10 – 12 ml/100g de peso/dia
Tempo de trânsito intestinal	12 – 24 horas
Volume de urina	5,5 ml/100g de peso/dia
pH da urina	7,3 – 8,5
Água corporal total*	167ml
Fluído intracelular*	92,8ml
Fluído extracelular*	74,2ml
Volume plasmático*	7,8ml

* peso corporal varia com raça e linhagem.

** baseado em um rato de 250 gramas.

Estudo das repercussões intestinais da isquemia e reperfusão hepática.

Sabe-se que durante a isquemia do fígado, com a obstrução ao fluxo portal dá-se importante congestão venosa esplâncnica levando a isquemia intestinal – muitos modelos usam da isquemia hepática parcial^{77,78,79,80,81,82} ou da isquemia hepática total acrescida de derivação vascular^{83,84,85,86} afim de evitar tal situação. Todavia, são os modelos de isquemia hepática total sem derivação vascular que mais se aproximam da situação real⁸⁷.

A isquemia intestinal leva à lesão da mucosa com aumento da permeabilidade microvascular, perda de fluído na luz intestinal, liberação de hidrolases lisossômicas, aumento de proteólise e liberação de fator de depressão do miocárdio na circulação levando ao choque circulatório. Desencadeia-se um círculo vicioso no qual estas alterações causam depressão da função cardíaca que, por sua vez, levam à progressiva deterioração da função intestinal. Sébe e cols⁸⁸, observaram em um modelo animal de isquemia hepática total sem derivação vascular que quanto maior o tempo de clampeamento do pedículo hepático, maior a congestão esplâncnica e, aos 30 minutos de isquemia, ocorrem lesões morfológicas intestinais marcantes, com desprendimento do revestimento epitelial das vilosidades e hemorragia. Na reperfusão, tais alterações podem ser agravadas pela ampla produção de ROS e conseqüente lesão da membrana celular, com atração de neutrófilos estimulando a produção de mediadores pró-inflamatórios⁸⁹.

O clampeamento portal pode ser utilizado para estudar fenômenos de isquemia com ou sem reperfusão em nível intestinal. Na prática médica, a trombose venosa ocorre em 10% das isquemias intestinais. Geralmente é conseqüência de complicações como infecções intra-abdominais, estados de hipercoagulabilidade, hipertensão portal, trauma, pós-operatório, etc⁸⁷. Todavia, são escassos na literatura trabalhos que estudem as repercussões da I/R em nível intestinal, em modelos de congestão vascular esplâncnica por isquemia hepática seguida de reperfusão.

Marcadores sorológicos do dano isquêmico hepático.

As transaminases (ALT e AST) classicamente têm sido usadas como marcadores do dano isquêmico hepático. Existem no fígado mais de sessenta reações que produzem transaminases, porem, as únicas com valor clínico são a aspartato aminotransferase (também

conhecida pelas siglas TGO, GOT ou ASAT ou AST ou SGOT) e a alanina transaminase (também conhecida pelas siglas TGP, GPT ou ALAT ou ALT ou SGPT), sendo que estas não são produzidas exclusivamente no fígado⁹⁰.

A aspartato aminotransferase (AST) é uma enzima que catalisa a reação do aspartato com alfa-queroglutarato resultando oxaloacetato e glutamato. É encontrada em altas concentrações no citoplasma e nas mitocôndrias do fígado, músculos esquelético e cardíaco, rins, pâncreas e eritrócitos. Quando qualquer um desses tecidos é lesado, a AST é liberada na circulação. Como não há um método laboratorial para determinar a origem da AST encontrada no plasma, o diagnóstico da causa do seu aumento deve levar em consideração a possibilidade de lesão em qualquer um dos órgãos onde é encontrada⁹¹.

Alanina transaminase (ALT) é uma enzima que catalisa a reação do aspartato com alfa-queroglutarato resultando em piruvato e glutamato. Em altas concentrações pode ser encontrada apenas no citoplasma do fígado, o que torna o seu aumento mais específico de lesão hepática. Entretanto, pode estar aumentada em conjunto com a AST em miopatias severas⁹⁰.

A enzima desidrogenase láctica (LDH ou DHL) é observada em lesões hepatocelulares de modo geral. Clinicamente, pode ser útil na diferenciação entre hepatite aguda viral e lesão causada por isquemia ou paracetamol; sugere-se que, em elevações de aminotransferases acima de 5 vezes o limite superior, uma relação ALT/LDH maior que 1,5 sugere hepatite viral⁹⁰.

Em tempos variados de isquemia hepática, tem-se verificado aumento significativo da ALT e da AST em grupos isquêmicos em relação a controles⁹². Boin (1997)⁹³ não verificou aumento destas enzimas após isquemia com tempo de duração entre 60 e 120 minutos, mas sim após reperfusão do fígado. As aminotransferases são, atualmente, os marcadores mais sensíveis da lesão isquêmica do fígado⁹⁴. Clavien e cols⁹⁵ utilizaram essas enzimas, no primeiro estudo com pré-condicionamento isquêmico (plausível mecanismo protetor no qual curtos períodos de I/R conferem a um determinado tecido resistência a um insulto isquêmico mais prolongado), realizado em seres humanos, para mostrar seu efeito benéfico em hepatectomias parciais com exclusão vascular. Eles verificaram diminuição significativa da ALT e AST no grupo de pacientes submetidos a hepatectomia parcial, isquemia e pré-

condicionamento isquêmico. No mesmo estudo com isquemia e pré-condicionamento isquêmico, o comportamento sérico da enzima desidrogenase láctica (LDH) foi semelhante ao das aminotransferases; houve aumento significativo no grupo isquêmico com redução no grupo onde se usou o pré condicionamento isquêmico do fígado⁹⁵. Isso mostra que a LDH também pode ser um bom marcador do dano isquêmico hepático⁹².

Lactato: Marcador sorológico de anaerobiose.

O aumento nos níveis séricos de lactato (hiperlactacidemia) tem sido observado em pacientes sépticos e traumatizados, sendo habitualmente relacionado com hipóxia e/ou hipoperfusão tecidual, com conseqüente glicólise anaeróbica⁹⁶. Isso ocorre mesmo em situações em que os habituais indicadores da perfusão tecidual como a pressão arterial, débito cardíaco e débito urinário são normais ou em margem clinicamente aceitável⁹⁷.

Como a hiperlactacidemia nem sempre se correlaciona com os habituais indicadores de perfusão nem diminui com o aumento do transporte de oxigênio, deverão existir outros mecanismos para a sua formação, inclusive em tecidos bem oxigenados⁹⁶. Na sépsis existem evidências de que a acumulação de lactato não é o resultado da falta de oxigênio. A acidose láctica pode ser classificada em dois tipos: a de tipo A, associada com evidência de deficiente perfusão ou oxigenação tecidual, enquanto que a de tipo B não se relaciona com má perfusão ou oxigenação⁹⁸.

O lactato é um produto final da glicólise anaeróbica que ocorre em tecidos hipóxicos. Contudo, tecidos bem oxigenados podem em certas condições gerar lactato através da glicólise aeróbica. A produção normal de lactato é de 1 mmol/Kg/hora⁹⁶. Ocorre principalmente no músculo esquelético, intestino, cérebro e glóbulos vermelhos. O lactato formado pode ser captado pelo fígado e ser convertido em glicose (neoglicogênese) ou ser utilizado como combustível (fonte de energia). O metabolismo anaeróbico da glicose produz apenas 47 Kcal de energia por mole de glicose, enquanto que o metabolismo aeróbico gera 673 Kcal por mole de glicose. A oxidação do lactato produz 326 Kcal por mole de lactato e como 1 mole de glicose produz 2 moles de lactato, a energia produzida a partir da glicólise anaeróbica será aumentada para 625 Kcal (2 x 326) – esta via é utilizada durante o exercício e pode ocorrer nas fases iniciais do choque (quando o músculo esquelético torna-se anaeróbico

o lactato gerado pode ser utilizado como fonte de energia por outros órgãos vitais que ainda estão em aerobiose, como o coração e o sistema nervoso central)⁹⁷.

Hipóxia (presente nos estados de choque) é a causa mais importante de acidose láctica⁹⁶. Nestes doentes, a severidade da hiperlactacidemia foi relacionada com o prognóstico. Quando superior a 10 mmol/L, são escassas as hipóteses de sobrevivência⁹⁷, conforme pode-se observar na Tabela 2:

Tabela 2: Mortalidade associada à hiperlactacidemia em pacientes apresentando de choque séptico⁹⁷.

Lactato (mmol/L)	Terminologia clínica	Mortalidade associada (%)
< 2,5	normal	-
2,5 – 4,9	hiperlactacidemia leve	25-35
5,0 – 9,9	hiperlactacidemia moderada	60-75
> 10	hiperlactacidemia severa	>95

Segundo Vincent⁹⁸, além dos níveis de lactato, a duração da hiperlactacidemia tem importante valor prognóstico no choque séptico. Outras causas de hiperlactacidemia incluem aumento de níveis séricos de adrenalina (comum nos traumatismos e pacientes sépticos hemodinamicamente compensados)⁹⁹, endotoxemia¹⁰⁰, deficiência de tiamina¹⁰¹, alcalose severa (aumento da atividade de enzimas pH-dependentes da via glicolítica que promovem a formação de lactato), asma aguda¹⁰², convulsões, insuficiência hepática (por diminuição do clearance do lactato) e toxicidade do nitroprussiato (por acúmulo de cianeto)¹⁰¹. Pode-se inferir que vários mecanismos poderão estar presentes no mesmo doente, pelo que, no caso de sépsis/trauma os níveis de lactato não deverão ser considerados sinónimo de deficiente perfusão tecidual¹⁰⁰. Hiperlactacidemia também se faz presente na lesão por I/R, sugerindo-se que ocorra manutenção da via glicolítica anaeróbica mesmo após restabelecimento do fluxo sanguíneo arterial¹⁰³. Sorlie e cols¹⁰⁴ observaram aumento de lactato, durante e após o pinçamento prolongado da artéria femoral, no sangue venoso de 8 pacientes claudicantes que se submeteram à derivação femoropoplíteia.

Imunonutrientes

A nutrição, além de fornecer energia e nitrogênio ao organismo, tem assumido na atualidade papel importante na modulação das respostas metabólica, inflamatória e

imunológica. Segundo Kudsk e cols¹⁰⁵ (1983), a nutrição enteral funciona como um suporte de defesa contra a ação de microorganismos patogênicos, modera a resposta metabólica ao trauma, mantém a integridade da mucosa e da barreira intestinal e ainda, previne alterações da microflora intestinal. Por essa razão, tem-se investigado em pacientes graves o uso de nutrientes e alimentos funcionais associados à nutrição enteral precoce com o intuito de limitar e prevenir as complicações e a perda da barreira intestinal¹⁰⁶.

Um alimento é considerado funcional quando contém nutrientes ou outras substâncias que influenciam benéficamente o organismo, proporcionando uma ação funcional fisiológica que garanta a saúde¹⁰⁷. Nutrientes específicos, também chamados imunonutrientes, têm sido usados como meio de interferir nas respostas orgânicas de pacientes sob condições situações de estresse¹⁰⁴. Estudos realizados com glutamina, arginina, ácido graxo ômega-3, ácido graxo ômega-6 e nucleotídeos mostraram que esses imunonutrientes regulam os processos imunológico e inflamatório, modulam o balanço nitrogenado e a síntese de proteínas após injúria sistêmica¹⁰⁵.

Glutamina

A glutamina (GLN), $\text{NH}_2\text{-C(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH-NH}_2\text{-COOH}$ é sintetizada em praticamente todos os tecidos¹⁰⁸. Apresenta dois grupos nitrogenados: alfa-amino, $\text{CH(NH}_2\text{)}$, e um grupo amida, $\text{NH}_2\text{-C(O)}$, característica peculiar que a faz importante no transporte de nitrogênio entre os diferentes tecidos e de amônia da periferia para os órgãos viscerais¹⁰⁹. A glutamina participa na estrutura de proteínas e peptídeos, além disso, é precursora da gliconeogênese, da amoniogênese renal e de neurotransmissores como o ácido alfa-aminobutírico e o glutamato. Tem papel importante fornecendo nitrogênio para a síntese de purinas, pirimidinas e nucleotídeos¹⁰⁸.

A síntese da GLN ocorre a partir de glutamato e amônia, armazenando energia na forma de ATP, sob ação da enzima glutamina-sintetase¹¹⁰. Por sua vez, a sua desaminação ocorre pela ação da enzima glutaminase, levando à formação de glutamato e amônia. O glutamato pode ser utilizado na síntese protéica ou convertido em alfa-cetoglutarato e alanina¹¹¹. A energia gerada pela oxidação do alfa-cetoglutarato, no ciclo de Krebs, leva à produção de 30 moles de ATP, o que torna a GLN um substrato energético tão importante

quanto a glicose. O outro subproduto da GLN é a alanina, um aminoácido que desempenha importante papel na neoglicogênese¹⁰⁹.

Quantitativamente, a GLN é o aminoácido mais abundante no plasma e tecidos humanos, em concentrações que variam entre de 500 a 900 μmol/L¹¹². É um valor significativamente maior que o encontrado com outros aminoácidos, tais como leucina 160 μmol/L, metionina 32 μmol/L, treonina 146 μmol/L e valina 252 μmol/L¹⁰⁸. O peso molecular da GLN é 146,15 e contém 19,2 % de nitrogênio, ou seja, a relação GLN/teor de nitrogênio é de 1/0,13, assim sendo, 1g de GLN fornece 0,13 g de nitrogênio glutamínico¹¹³. A GLN utiliza diversos sistemas de transporte na membrana celular. O sistema A é dependente de sódio e necessita de ATP, enquanto o sistema L, é independente desse íon. Esses sistemas estão presentes na membrana celular de todas as células, inclusive na bordadura em escova das células da mucosa intestinal e na membrana basolateral dos enterócitos jejunais do rato¹¹⁴. Além da afinidade dos sistemas de transportes ser grande pela GLN, eles são estimulados pela ingestão oral desse aminoácido¹¹⁵.

Em condições de estresse, ocorre um considerável aumento do fluxo de GLN do músculo para o fígado¹¹⁶. O fígado também pode se tornar importante produtor de GLN, especialmente durante períodos de acidose e jejum¹¹⁷. A GLN e a alanina são os principais carreadores de nitrogênio e carbono do músculo esquelético para o leito esplâncnico¹¹⁵. O intestino delgado e os rins são locais de maior utilização da GLN em muitas espécies animais em situação normal¹¹⁸. Em pacientes desnutridos, o teor de GLN na mucosa duodenal encontra-se diminuído, no entanto, em ratos, a infusão intravenosa de GLN contribui para manter e/ou recuperar o trofismo da mucosa intestinal¹¹⁹. A Tabela 3 apresenta uma série de efeitos benéficos relacionados com o uso parenteral de GLN.

Tabela-3: Efeitos da GLN em animais de experimentação¹¹².

Bloqueia a lipólise e cetogênese e aumenta a ureagênese.
Diminui a bacteremia.
Estimula o transporte intestinal de água, sódio e cloro.
Favorece o metabolismo protéico durante regeneração hepática.
Mantém a concentração intra muscular de GLN.
Melhora a retenção nitrogenada e associada a síntese protéica.
Restaura a celularidade da mucosa intestinal durante nutrição parenteral e/ou quimioterapia, radioterapia e sepse.

O intestino é o local de maior metabolismo de GLN na maioria dos animais estudados, inclusive no homem¹¹⁷. Tendo em vista o papel deste aminoácido de transporte de nitrogênio

entre diferentes tecidos, o intestino delgado é considerado como tendo importante função no processamento do nitrogênio oriundo de outros órgãos¹²⁰. A oxidação do carbono da GLN é uma fonte fundamental de energia para as células epiteliais da mucosa intestinal. Isso a torna tão vital quanto a glicose como combustível respiratório nesse tecido¹²¹.

O intestino delgado é mais do que um sítio de digestão e absorção de nutrientes. Esse segmento do tubo digestivo desempenha funções importantes tanto em circunstâncias normais como no catabolismo intenso, o que em parte, pode estar relacionado à capacidade do enterócito de metabolizar a GLN¹²². Sendo a GLN substrato energético para os enterócitos, sua oxidação contribui de forma substancial para o fornecimento de energia necessária ao desempenho das atividades metabólicas normais desse grupo de células. Além disso, o epitélio intestinal apresenta altas taxas de síntese protéica e de renovação celular. A GLN pode ser importante também para esses processos¹²³.

A resposta inflamatória iniciada por infecções, trauma ou intervenções cirúrgicas, resulta em maior mobilização de nitrogênio no corpo humano. Essa resposta inflamatória leva ao balanço nitrogenado negativo e prolongado, o que prejudica a recuperação pós-trauma¹²⁴. É importante verificar a possibilidade do uso terapêutico de aminoácidos que, devido ao teor de nitrogênio, tornam-se suficientes para repor essas perdas, e promovem o reparo de tecidos e órgãos previamente lesados. Nesse contexto, os aminoácidos têm múltiplas funções como papel de substrato na síntese protéica tornando-os, portanto, necessários no suporte e manutenção de várias funções, tanto para indivíduos sadios como doentes. O balanço nitrogenado do organismo depende da interação entre as reservas periféricas e o leito esplâncnico. Em condições de trauma ocorre catabolismo protéico, resultando em exportação de aminoácidos para uso dos tecidos esplâncnicos, na gliconeogênese e na síntese de proteínas de fase aguda¹²⁵.

As alterações na concentração dos aminoácidos no tecido muscular esquelético, após diferentes tipos de lesões, são semelhantes, sugerindo um tipo de resposta comum a vários tipos de trauma. Do ponto de vista metabólico, verifica-se que há consumo de aminoácidos, especialmente os de cadeia ramificada¹²⁶, mais propriamente de GLN. Esta é liberada à partir do tecido muscular para células do sistema imune, fígado e intestino entre outros órgãos. A concentração plasmática de GLN diminui após o trauma, indicando maior captação desse

aminoácido por outros órgãos¹²⁷. A deficiência de GLN também resulta em imunodepressão, sendo a função linfocitária praticamente dependente da presença deste aminoácido¹¹¹.

Há controvérsias sob o uso de GLN como grande regulador de síntese protéica em situações de estresse. Hammarqvist e cols¹²⁸ (1994), em estudo com infusão de vários hormônios, que estão aumentados em condições de trauma (adrenalina, cortisol e glucagon), demonstraram que a oferta de solução de aminoácidos sem GLN é capaz de manter a síntese protéica em relação ao grupo controle. Hiramatsu e cols¹²⁹ (1994), usando o balanço cinético de aminoácidos em jovens eutróficos, mostraram que a oferta de GLN não foi capaz de alterar o equilíbrio de diferentes aminoácidos ou estimular a síntese protéica, tanto no jejum como no pós-prandial. A Tabela 4 mostra alguns dos benefícios clínicos em seres humanos recebendo suplementação de L -GLN.

Tabela 4: Efeitos clínicos benéficos observados em seres humanos após terapia nutricional com suplementação de L-GLN(Gln), alanil- glutamina (Ala -Gln).¹³⁰

Mantém e/ou restabelece a concentração intracelular de GLN
Melhora o balanço nitrogenado após cirurgias, transplante de medula óssea e queimadura extensa.
Aumenta a síntese protéica muscular pós-operatória.
Reduz a degradação protéica miofibrilar.
Aumenta a absorção de d-xilose em pacientes graves.
Reduz a infecção e colonização bacteriana após o transplante de medula óssea.

A elaboração de soluções contendo GLN, destinada a terapia nutricional, apresenta pelo menos duas grandes dificuldades. A primeira relaciona a sua baixa solubilidade em solução aquosa ou seja 36g/L a 18° C. A segunda decorre de uma tendência da GLN, em especial quando aquecida, sofrer hidrólise, originando ácido glutâmico, amônia e ácido piroglutâmico, potencialmente tóxicos¹³¹. Ambas situações podem ser resolvidas através da utilização do dipeptídeo alanil- glutamina, estável, altamente solúvel, bem tolerado¹³². A solução de alanil- glutamina, após administrada é rapidamente metabolizada liberando GLN e tem sido utilizada, de maneira efetiva, por via parenteral e enteral em modelos experimentais e pacientes¹³³.

Considerando que a GLN corresponde a cerca de 7% do total de aminoácidos plasmáticos e que 30% deste total é liberado pelo músculo no estado pós-absortivo ou em situações catabólicas, sugere-se que, a maior parte da GLN liberada pelo músculo, seja proveniente de síntese endógena¹³⁴. A suplementação de GLN enteral ou parenteral resulta em aumento da espessura, conteúdo de DNA e volume protéico da mucosa intestinal¹³⁵. Postula-

se que a GLN possa estar relacionada a redução da translocação bacteriana, entretanto, em modelos animais os resultados têm sido conflitantes¹³⁶. Cunha¹³⁷ (1994), em experimentos com ratos no trauma agudo por queimadura, observou efeito protetor da oferta de GLN, impedindo ou diminuindo a translocação bacteriana. Salvalaggio e cols¹³⁸ (2002), em modelo experimental de obstrução do íleo terminal não observaram proteção na translocação bacteriana conferida pela suplementação oral de GLN. Todavia, este estudo sugeriu que a GLN possa ter função na preservação da barreira intestinal através da melhora na resposta imune sistêmica. A capacidade da GLN prevenir a translocação bacteriana pode ser influenciada ou mesmo limitada pelos mecanismos promotores da translocação utilizados em diferentes modelos animais (Lehninger, apud, Salvalaggio e Campos¹³⁸). Com base nesses princípios, que regem o metabolismo da GLN, vários estudos clínicos e experimentais buscam identificar seu papel na melhoria ou na manutenção da integridade morfo-funcional de diversos órgãos, em resposta a diferentes tipos de trauma¹³⁹.

Papel da GLN nas lesões por I/R intestinal e hepática.

Evidências na literatura mostram que a GLN parece ter importante papel protetor na mucosa intestinal durante o trauma e injúrias graves¹⁴⁰. A GLN é fundamental para a produção de glutathione intestinal¹⁴¹, como visto anteriormente, uma das mais importantes fontes endógenas de defesa antioxidante. O glutamato, produzido através do metabolismo da GLN, é precursor da síntese de glutathione, que têm como um de seus maiores reservatórios o tecido hepático¹³³.

A rota (enteral ou parenteral), momento de aplicação e a formulação (isoladamente ou associada) da GLN parecem ser fatores decisivos nos resultados de seu emprego em modelos experimentais de I/R¹³⁷. Na I/R intestinal, o uso intraluminal de GLN, administrado no decorrer da agressão, mostrou diminuir o dano de mucosa e o acúmulo de neutrófilos na submucosa⁵⁶. Harward e cols¹⁴², observaram que o nível de glutathione na mucosa intestinal foi melhor mantido em ratos que receberam GLN, o que estava associada a menor LPO da membrana, provendo maior proteção ao intestino durante períodos de I/R. Yasuhara¹⁴³, atribuiu esse efeito ao estímulo da produção de moléculas de citoproteção (heme oxygenase-1/HSP32) e de glutathione. Resultados interessantes foram publicados por Kozar e cols^{144,145}, em estudos mostrando que o uso enteral de GLN durante I/R mesentérica manteve a

integridade do citoesqueleto, diminuiu a permeabilidade intestinal, manteve a capacidade absorptiva intestinal preservando os níveis celulares de ATP.

Em muitos modelos experimentais, a glutatona administrada por via parenteral parece ser efetiva na redução da lesão por I/R hepática^{146,147,148}. Todavia, são poucos os estudos que tratam dos efeitos da GLN na I/R hepática. Além disso, os poucos trabalhos existentes mostram resultados conflitantes. Experimentalmente, o pré-tratamento por três dias com GLN parenteral levou a uma melhor tolerância à I/R do fígado, marcadamente aumentando os níveis de glutatona no tecido hepático¹⁴⁹. Já em outro estudo experimental, o uso intraperitonal de GLN, 24h e 6h antecedendo a I/R hepática, não alterou a injúria hepatocelular, a necrose hepática ou os níveis de atividade da mieloperoxidase em relação ao controle, concluindo não ter ocorrido proteção contra a injúria de I/R¹⁵⁰. Não são encontrados estudos que mostrem a ação da GLN quando administrada por via enteral, na I/R hepática.

JUSTIFICATIVA.

Conforme observado em estudo anterior por Sébe e cols⁸⁸, o clampeamento do hilo hepático em ratos por um tempo superior a dez minutos leva a lesão da mucosa intestinal, marcadamente determinada pela dilatação dos vasos presentes no interior das vilosidades intestinais. Esse processo desenvolve-se de forma progressiva, sendo notado, à partir de trinta minutos, desprendimento do revestimento epitelial das vilosidades intestinais e hemorragia. Tais achados, segundo McCord¹⁵¹ (1985) e Koyama e cols¹⁵² (1985), podem estar relacionados à formação local de radicais livres. Sabe-se que a produção mais determinante de radicais livres durante a injúria isquêmica se dá, conforme descrito anteriormente, durante a fase de reperfusão, com o afluxo de oxigênio nos tecidos outrora isquêmicos. Podemos inferir que a isquemia hepática, levando a congestão do fluxo sanguíneo mesentérico, seguida de reperfusão, leve a intensos fenômenos oxidativos. Kobayashi e cols¹⁵³, demonstraram haver importante resposta inflamatória após trinta minutos de isquemia hepática seguida de reperfusão que atenua consideravelmente com a realização de shunt porto-sistêmico com a finalidade de diminuir a congestão intestinal. Segundo o autor, isso demonstra a importância do intestino na produção de citocinas pró-inflamatórias durante a I/R hepática. Constatação semelhante foi feita por Sankary e cols¹⁵⁴. Segundo estes autores, as vísceras esplâncnicas contribuem com a lesão de I/R hepática, havendo benefícios na decompressão do fluxo mesentérico pela realização de shunts porto-sistêmicos.

Entendemos que uma forma de compreender-se melhor este processo seria através da dosagem de marcadores do estresse oxidativo seguindo-se a isquemia hepática por clampeamento da tríade portal (isquemia total) e reperfusão. Conforme comentado, os estudos realizados nesse sentido têm demonstrado que a lesão oxidativa nessas condições processa-se tanto no nível hepático como intestinal. As repercussões sistêmicas assim geradas são consequências de uma somatória de efeitos deletérios ocasionados pela injúria de I/R nesses sítios. Em estudo recente, Pimenta e cols¹⁵⁵ demonstraram que o intestino tem participação importante na lesão por I/R de membros posteriores de ratos: a resposta inflamatória mediada por interleucina-6 nesse modelo teve como origem tanto ao nível do sítio de I/R como do território esplâncnico. Esse achado corrobora com a hipótese de que o intestino deve participar ativamente da síndrome pós-reperfusão, mesmo nas situações em que encontra-se distante da sede inicial da injúria¹⁵⁰.

Cogita-se um papel protetor conferido pela GLN, contra a lesão por I/R¹⁵⁶. Os mecanismos relacionados a esta proteção encontram-se pouco elucidados. Podemos especular que uma das ações da GLN pode ocorrer pela atenuação da produção de ROS¹⁵⁷. Ao nível intestinal, sabe-se da ampla captação deste aminoácido pelo enterócito, mesmo em estados de intenso estresse⁵⁴. Estudos anteriores demonstraram que sua ação pode ser benéfica, quando presente no interior da luz intestinal durante a injúria de I/R⁵⁶. Em um modelo de isquemia hepática total por clampeamento da tríade portal (manobra de Pringle⁸), sem derivação vascular, seguida de reperfusão, isso pode ser particularmente interessante. A nossa grande questão aqui é se a GLN na luz intestinal pode ser utilizada como um agente protetor na formação de radicais livres nessas condições de I/R hepática, conforme já foi observado para outros modelos de lesão intestinal.

No contexto da I/R, as lesões desencadeadas são geradas inicialmente pela produção de ROS²⁹. A implementação de fontes de defesa antioxidante é um ponto passível de estudo, na busca de uma forma de diminuir a injúria oxidativa. A GLN é considerada a principal fonte de energia para o enterócito, além de ser essencial para a síntese da glutathione intestinal¹⁴⁰. O sistema glutathione, por sua vez, constitui o mais importante mecanismo biológico para redução do estresse oxidativo¹⁴². A avidez dos tecidos hepáticos e intestinal por fontes de energia durante a lesão isquêmica, associada a necessidade imediata de utilização de antioxidantes durante a reperfusão, torna estimulante o estudo dos efeitos desse aminoácido sob essas condições.

Partindo de tais premissas, propomo-nos a avaliar o estresse oxidativo em um modelo experimental de isquemia hepática por clampeamento do pedículo hepático seguida de reperfusão. Para tanto, a dosagem de seus marcadores (MDA e CAT), durante os primeiros minutos de reperfusão hepática, torna-se mister. Com isso, estimaremos a intensidade da lesão oxidativa desencadeada e, associadamente, o status dos mecanismos de defesa anti-oxidante. É essa relação que determinará em última análise o estresse oxidativo. Para avaliar uma possível ação protetora conferida pela GLN, propomo-nos a avaliar os mesmos parâmetros, na presença desse aminoácido na luz intestinal. Tal estudo é inovador ao investigar nesse modelo experimental a atividade da GLN, tendo-se em vista especialmente o seu uso pela via enteral. Seus resultados podem elucidar pontos importantes acerca da participação da produção de ROS nas lesões decorrentes do clampeamento da tríade portal, manobra comumente utilizada

em cirurgias hepáticas, enfatizando especialmente o potencial da GLN enquanto agente protetor nessas situações.

OBJETIVOS.

Objetivo Geral.

Investigar em ratos, os efeitos no estresse oxidativo e em marcadores de dano isquêmico hepático e sistêmico do uso enteral de GLN, durante a isquemia total do fígado seguida de reperfusão.

Objetivos Específicos.

Mensurar valores do MDA plasmático na dependência do uso enteral ou não de GLN durante I/R hepática.

Mensurar valores da capacidade antioxidante total (CAT) plasmática na dependência da infusão enteral ou não de GLN durante I/R hepática.

Mensurar alterações sangüíneas em marcadores bioquímicos de dano isquêmico hepático (AST, ALT, LDH) e anaerobiose (lactato), com ou sem o uso enteral de GLN durante I/R hepática.

MATERIAL E MÉTODO.

O experimento seguiu os princípios éticos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Desenho do estudo.

Trata-se de um estudo experimental em ratos, realizado nas dependências do Laboratório de Investigação, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT).

Inicialmente, para fins de adaptação ambiental, os animais (N=30) permaneceram três dias no Laboratório de Investigação sob ciclos de 12 horas de claro e escuro, temperatura ambiente controlada de 25°C, recebendo dieta (AIN-1993¹⁵⁸) *ad libitum*. Após esse intervalo de tempo, os animais foram mantidos em dieta zero para sólidos, por um período de 12 horas e submetidos a ato operatório sob anestesia geral.

A operação consistiu de laparotomia com confecção de uma “alça fechada” de 20cm de comprimento, envolvendo o segmento distal do intestinal delgado do animal. Procedeu-se nesse ponto injeção no interior da luz intestinal de solução contendo GLN (GRUPO GLN, n=10) ou água destilada (GRUPO CONTROLE, n=10). Seguiu-se o clampeamento do pedículo hepático (interessando veia porta, artéria hepática e ducto biliar – manobra de Pringle⁸) por 20 minutos (isquemia) e liberação do clampeamento com reperusão por 5 minutos. Após este período, foi colheitada amostra de sangue (5ml) da veia cava posterior para análise do dano isquêmico hepático (ALT, AST, LDH), sistêmico (lactato) e do estresse oxidativo (MDA e CAT). Um grupo de animais (GRUPO SHAM, n=10) foi submetido a anestesia geral, laparotomia (duração de 25 minutos) com manipulação do conteúdo cavitário, e colheita de sangue para dosagem dos mesmos marcadores sorológicos. Todos os animais foram sacrificados logo após a colheita de sangue, com sobredose de éter inalatório.

Animais.

Utilizou-se 30 ratos Wistar, variedade albinos rodentia mammalia (*Rattus norvegicus*), machos, adultos. Os mesmos foram provenientes do biotério central da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). Os animais foram escolhidos aleatoriamente e pesados. Foram incluídos aqueles que apresentaram peso corporal entre 250 a 300g.

Randomização e grupos.

Cada animal foi escolhido aleatoriamente à partir de sua gaiola, onde permaneceu durante o período de adaptação ao ambiente do laboratório. Ao início do ato anestésico o animal foi identificado por um dos membros da equipe de pesquisa através de um código que passou a constar em sua ficha de experimentação (Anexo 1). O mesmo pesquisador realizou um sorteio que definiu para qual dos grupos de estudo pertenceria o animal. O sorteio foi realizado jogando-se um dado com faces numeradas de 1 a 6. Convencionou-se que se resultado 1 ou 2 o animal em questão perteceria ao GRUPO CONTROLE; 3 ou 4, GRUPO GLN; 5 ou 6, GRUPO SHAM. A caracterização dos grupos de estudo pode ser observada na Tabela-5.

Tabela 5: Distribuição dos animais de experimentação em função dos grupos de estudo (N=30).

Randomização (resultado do jogo de dado)	Grupos de estudo	Número de Animais (n)	Caracterização do grupo
1 ou 2	CONTROLE	10	Animais submetidos a laparotomia com injeção enteral de água destilada , seguida de isquemia por clampamento do hilo hepático e reperfusão.
3 ou 4	GLN	10	Animais submetidos a laparotomia com injeção enteral de GLN , seguida de isquemia por clampamento do hilo hepático e reperfusão.
5 ou 6	SHAM	10	Animais submetidos a laparotomia, e apenas manipulação de alças intestinais e do hilo hepático

Soluções utilizadas para aplicação enteral.

Foram utilizados no experimento dois tipos solução para aplicação enteral:

☞Água destilada: Solução estéril e apirogênica, frasco ampola contendo 10ml (Farmace Indústria Química Farmacêutica Cearense LTDA., Fortaleza-CE, Brasil).

☞Solução de GLN: N(2)-L-alanil-L-glutamina - Dipeptiven®, frasco de 50ml (Fresenius Kabi LTDA., Campinas-SP, Brasil). Cada 100ml da solução contém 20g de N(2)-L-alanil-L-glutamina, correspondente a 8,20g de L-alanina (32,7%) e 13,46g de L-glutamina (67,3%).

A dose para cada animal foi calculada em 0,5g/kg, portanto, para uma animal de 250g (0,25kg), 0,125g de GLN, correspondente a aproximadamente 1ml da solução de N(2)-L-alanil-L-glutamina.

Técnicas anestésica e operatória.

Todos os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos anestésicos. As operações foram realizadas pelo mesmo cirurgião, que desconhecia que tipo de solução estava aplicando na luz intestinal. A sistematização da anestesia e do ato operatório, conforme o grupo de estudo, seguiu rigorosamente a mesma seqüência em todos os animais.

Anestesia.

Os animais receberam anestesia inalatória com éter sulfúrico associada a 10mg/kg de cloridrato de cetamina (Cloridrato de Cetamina, 50mg/ml - Ketalar®, Pfizer LTDA., Guarulhos-SP, Brasil) por via intramuscular. Para esse procedimento, inicialmente foram introduzidos em uma campânula contendo algodão embebido em éter sulfúrico, onde permaneceram até perderem os reflexos motores. A seguir foram retirados da campânula e manteve-se inalação de éter sulfúrico misturado com ar ambiente, sob máscara. A injeção de cloridrato de cetamina (10mg/kg) foi administrada na musculatura da coxa do membro

posterior esquerdo do animal, utilizando-se seringa de 1ml e agulha descartável 13x4,5; cerca de 5 minutos antes do início do ato operatório. Durante todo o experimento os animais foram controlados quanto a manutenção do plano anestésico confirmando-se a ausência dos movimentos voluntários do animal, reflexos motores, e estabilidade da frequência respiratória (número de respirações por minuto) contada em intervalos de 5 minutos.

Material cirúrgico.

Foi utilizado material cirúrgico composto por lâminas descartáveis, pinças, tesouras delicadas, afastadores de Farabeuf, todos acondicionados em caixas metálicas individuais para cada animal, devidamente autoclavadas no Centro de Materiais Esterilizados (CME) do Hospital Universitário Júlio Müller (UFMT) cerca de 12 horas antes das operações. Os campos estéreis fenestrados para assepsia também foram oriundos do Hospital Universitário Júlio Müller. Todos os animais foram operados com utilização de paramentação composta por gorro, máscara cirúrgica e luvas cirúrgicas de látex descartáveis estéreis.

Operação.

O ato operatório obedeceu sistematicamente uma rotina pré-estabelecida.

Procedeu-se o posicionamento do animal na mesa de operação, em decúbito dorsal. Os membros anteriores e posteriores foram mantidos em extensão, sob contenção através de amarras que prendiam suas patas à mesa.

Seguiu-se tricotomia da parede abdominal anterior, antisepsia ampla desta região com solução de polivinilpirrolidona iodo (solução tópica com 0,1g/ml – Laboratório Químico Farmacêutico da Aeronáutica, Rio de Janeiro-RJ, Brasil) e assepsia da área operatória com campo cirúrgico estéril fenestrado.

Realizou-se laparotomia mediana com cerca de 4cm de extensão e breve inventário da cavidade abdominal.

Nos animais dos grupos CONTROLE e GLN, procedeu-se a identificação da transição íleo-cecal. Nesse nível, através de uma brecha feita em espaço avascular do mesentério foi

passado fio de algodão poliéster 3.0 sem agulha pré-cortado (Shalon Fios Cirúrgicos LTDA., São Luís de Montes Belos-GO, Brasil) e realizada ligadura com tensão suficiente para ocluir a luz do órgão, tomando-se o cuidado de não comprometer a circulação mesentérica adjacente (Figura 8). Através de régua milimetrada contou-se desta ligadura no sentido proximal 20cm (Figura 9). Neste local foi realizada uma segunda ligadura, conforme a anteriormente descrita (Figura 10). Na luz da “alça intestinal fechada” assim formada (Figura 11), através de punção com agulha 13x4,5, foi injetado volume correspondente a 0,5g GLN/kg de peso corporal (GRUPO GLUTAMINA), ou igual volume de água destilada (GRUPO CONTROLE). A injeção foi realizada com seringa plástica de 1ml, sob baixa pressão, sendo 50% da solução utilizada injetada no interior do segmento de alça pela sua extremidade distal e 50% injetada pela sua extremidade proximal, de modo à preenche-la por completo (Figura 12). Procedeu-se dissecação cuidadosa do pedículo hepático (Figura 13), seguida do clampeamento de todas as suas estruturas com pinça vascular atraumática tipo bulldog, conforme manobra descrita por Pringle¹⁴ (Figura 14). Disparou-se neste exato momento cronômetro digital, contando em minutos o tempo de isquemia. A isquemia hepática foi constatada pela alteração na coloração do órgão e em nível intestinal pela congestão mesentérica com parada dos pulsos arteriais (Foto 8). Ao completar 20 minutos (tempo de isquemia), o clamp vascular era liberado e, à partir de então, iniciava-se nova contagem até o tempo de 05 minutos (tempo de reperfusão). A reperfusão hepática foi constatada pelo retorno da coloração do órgão e em nível intestinal pelo cessar da congestão vascular no mesentério, com retorno dos pulsos vasculares (Figura 15). Durante todo o tempo de I/R os animais foram mantidos com as bordas da ferida operatória parcialmente aproximadas e protegidas com gazes estéreis umedecidas com solução fisiológica 0,9% aquecida (36°C), afim de evitar desidratação visceral excessiva. Os mesmos foram ainda protegidos da hipotermia, permanecendo sob foco de luz contendo uma lâmpada de tungstênio (60watts), na distância ideal para proporcionar uma temperatura ambiente local, controlada por termômetro de mercúrio, da ordem de 36 a 37°C (Figuras 16 e 17).

Nos animais pertencentes ao grupo SHAM, após a laparotomia, foram realizados os mesmos procedimentos descritos para os demais grupos, porém, com realização de ligaduras frouchas (sem ocluir a luz intestinal). Nesse grupo não houve injeção de qualquer substância na luz intestinal. Realizou-se manipulação do hilo hepático e manutenção do animal sob anestesia, nas mesmas condições dos demais grupos, pelo período de 25 minutos.

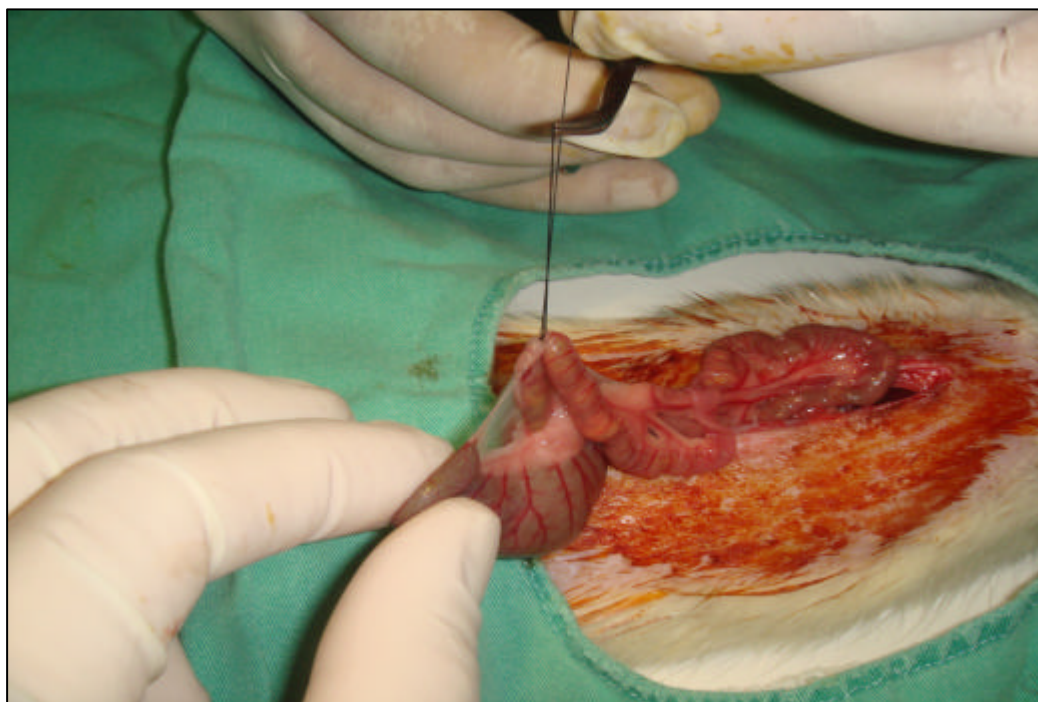


Figura 8: Ligadura ocluindo-se a luz intestinal ao nível do íleo terminal, próximo à transição íleo-cecal.

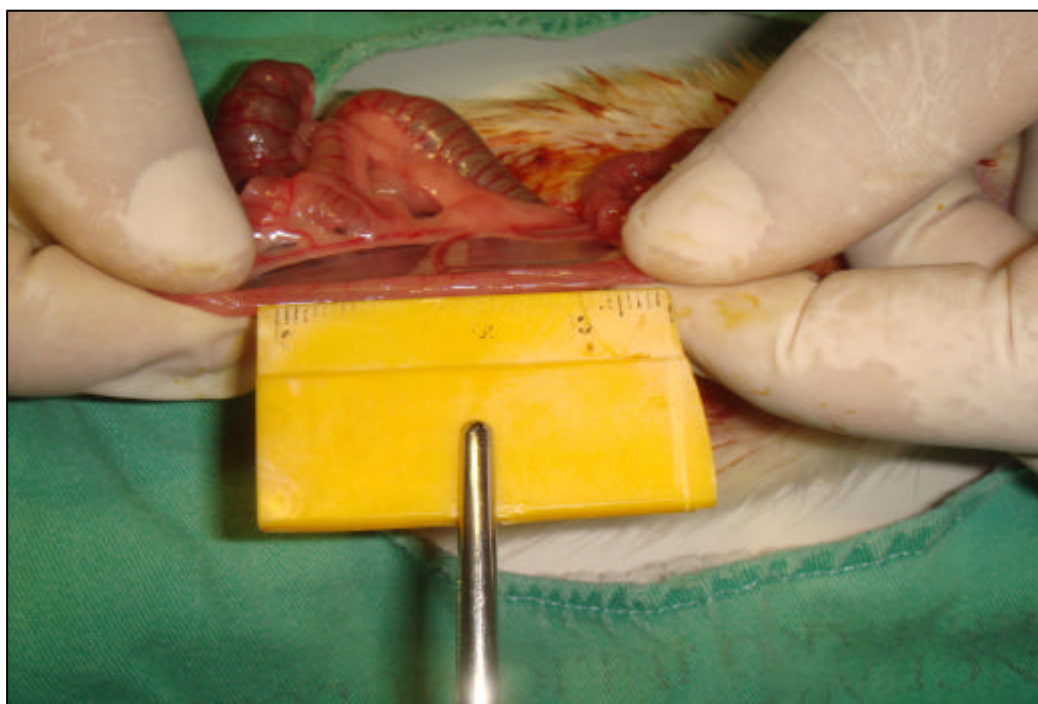


Figura 9: Método de mensuração do comprimento intestinal.

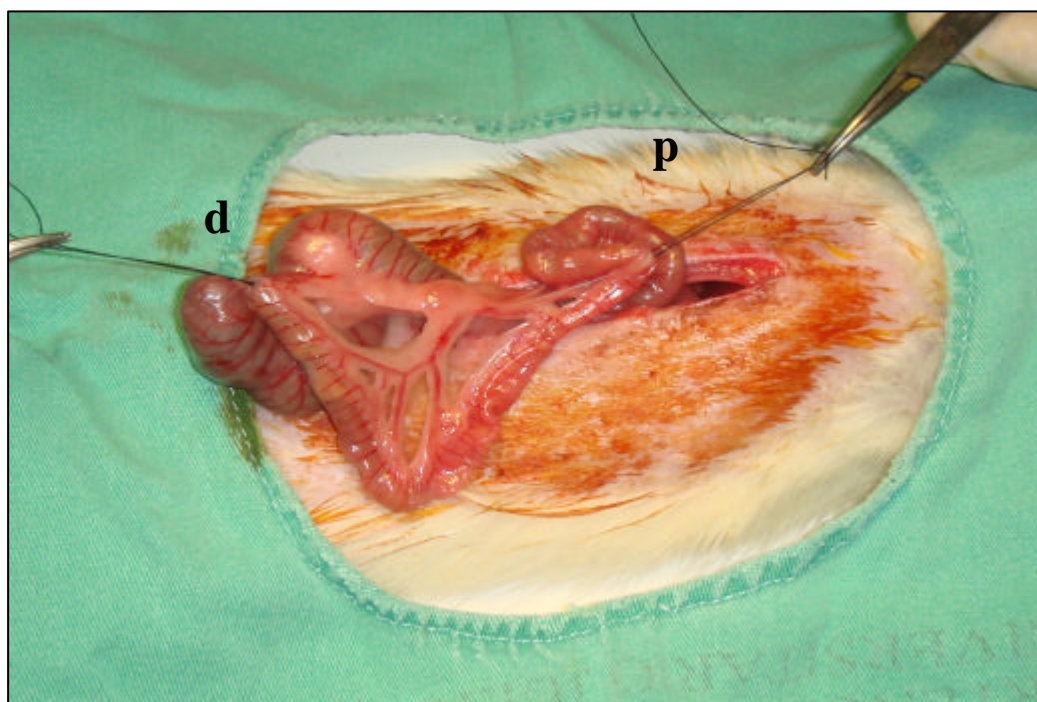


Figura 10: Ligaduras ocluindo-se a luz intestinal: distal (d), próximo a transição íleo-cecal e proximal (p), a 20cm da ligadura distal.

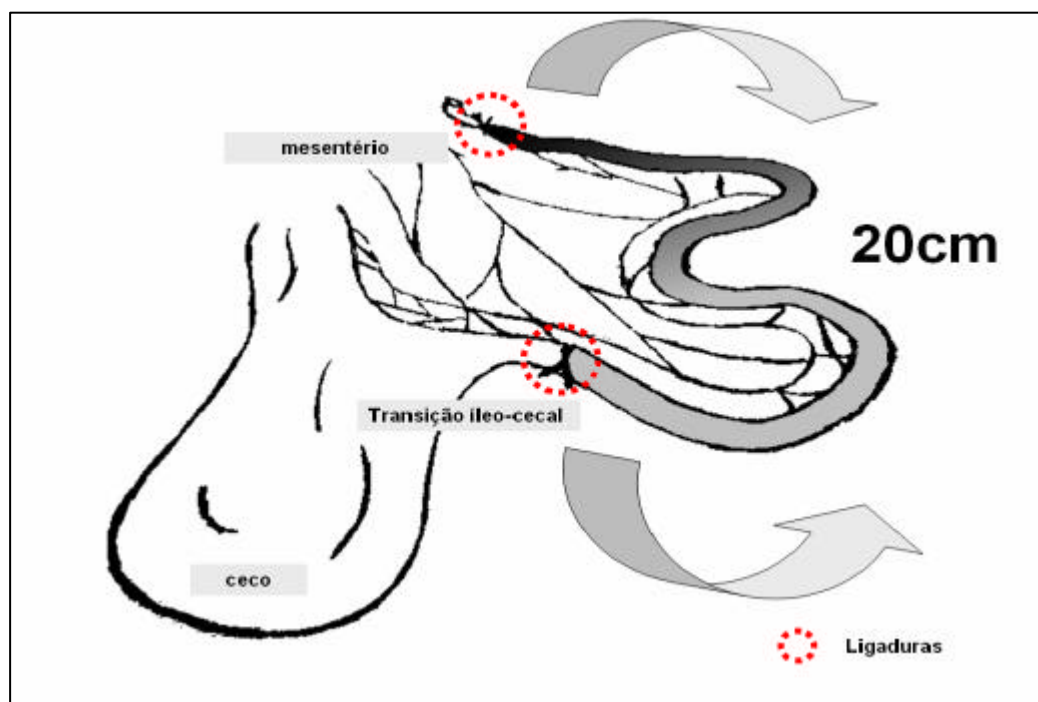


Figura 11: Ilustração do segmento de alça intestinal fechada confeccionado cirurgicamente.

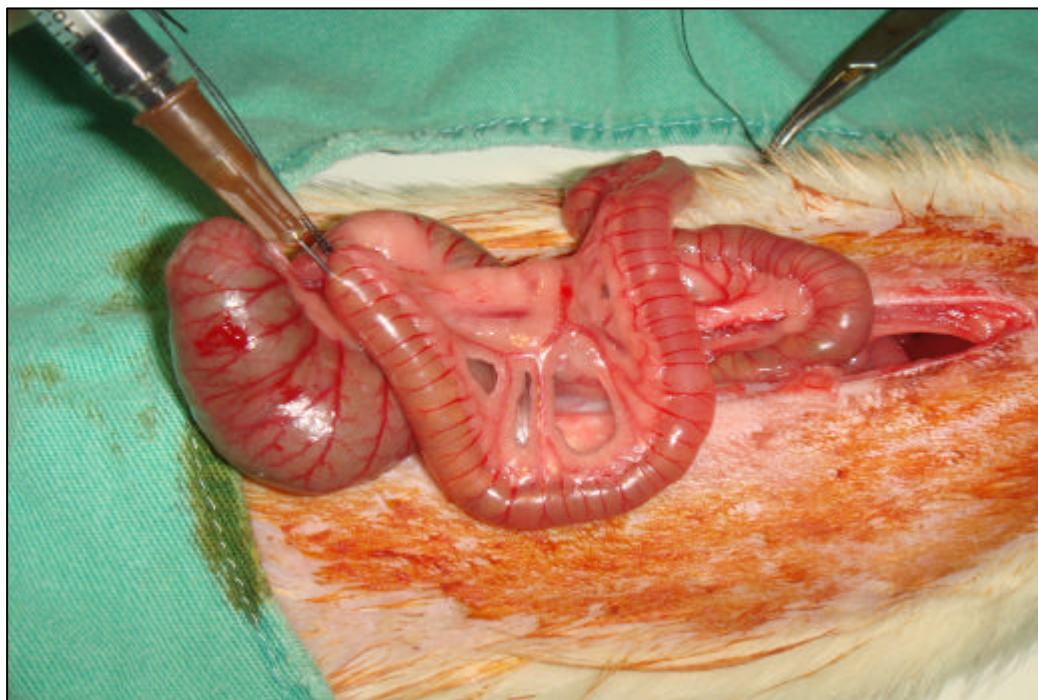


Figura 12: Injeção na luz intestinal de L-alanil- glutamina (grupo glutamina) ou água destilada (grupo controle) com o uso de agulha 13x45 acoplada a seringa de 1ml.

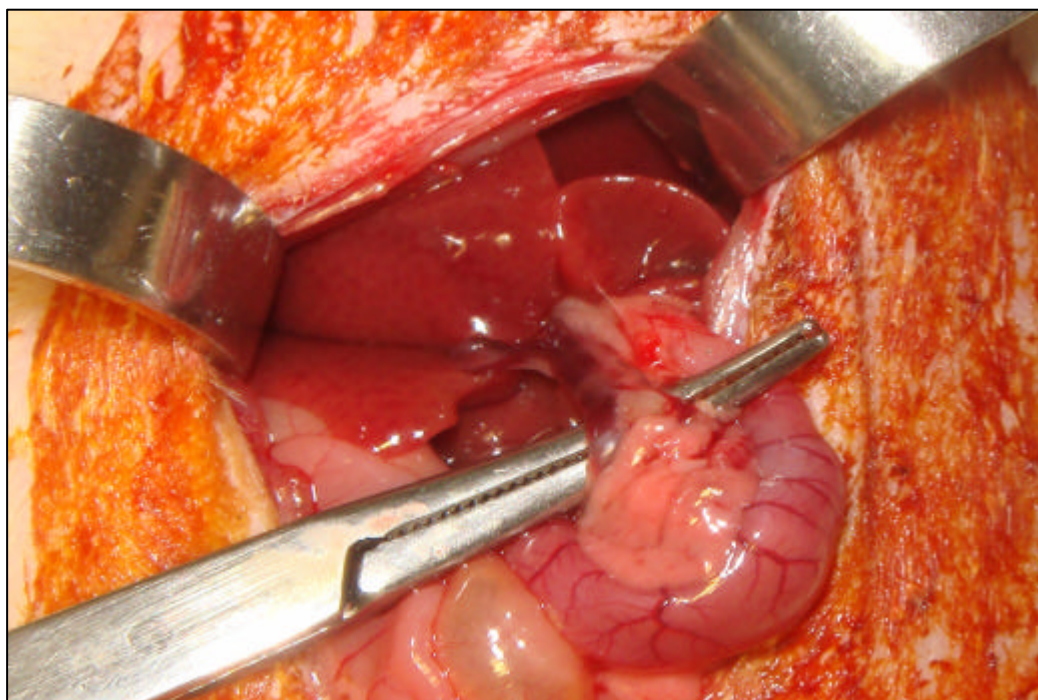


Figura 13: Dissecção da tríade portal (veia porta, artéria hepática e ducto biliar) ao nível do ligamento hepato-duodenal do animal.

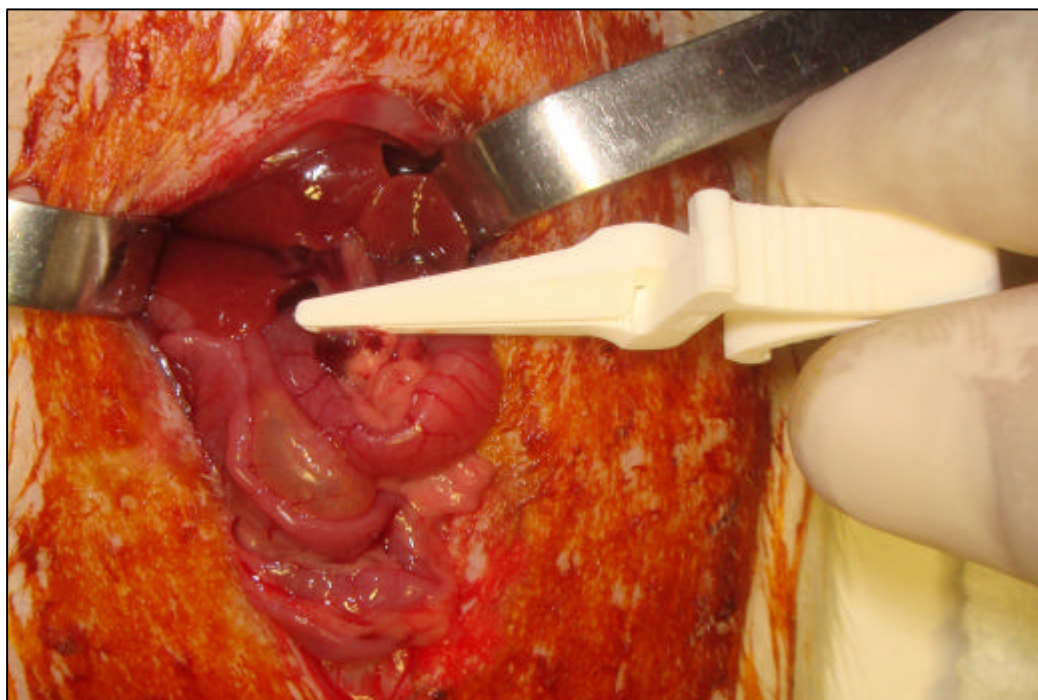


Figura 14: Clampeamento da tríade portal. Início do período de isquemia.

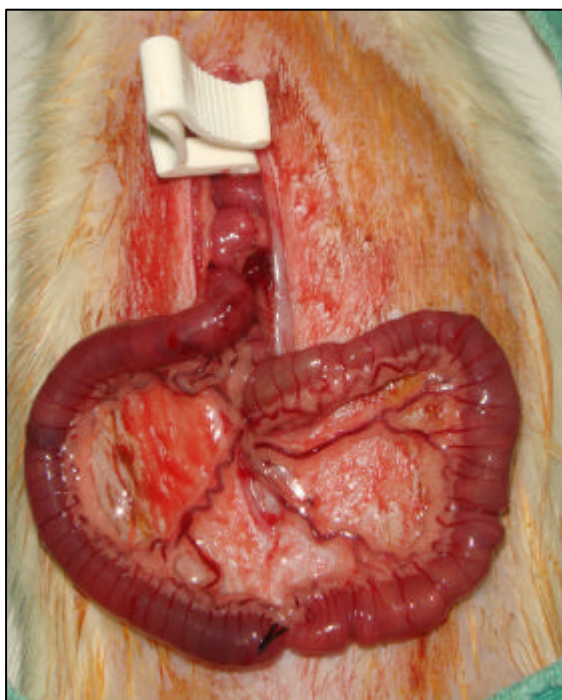


Figura 15: Aspecto das alças intestinais e mesentério durante o período de isquemia.

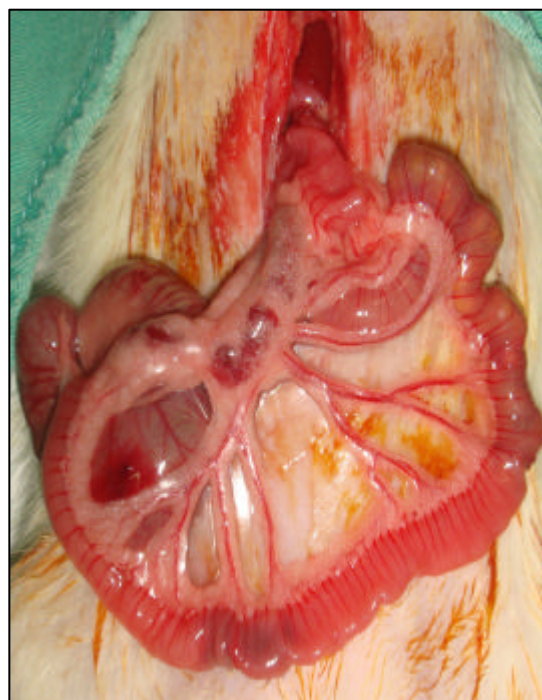


Figura 16: Aspecto das alças intestinais e mesentério durante o período de reperfusão.



Figura 17: Modo de acondicionamento dos animais durante o período de isquemia e reperfusão (casulo de I-R).



Figura 18: Detalhe do acondicionamento dos animais durante o período de isquemia e reperfusão. Proteção contra hipotermia mantendo-se a temperatura local em torno de 36-37°C e contra a desidratação visceral.

Colheita de amostra de sangue e sacrifício.

Seguiu-se sistematicamente os seguintes passos para todos os animais. Realizou-se exposição da veia cava posterior, acima da inserção das veias renais e, nesse local, colheu-se sangue por punção utilizando-se agulha 25x7mm acoplada a seringa de 5ml. Tal procedimento foi realizado com extremo cuidado para evitar-se hemólise. A seringa e agulha utilizada na colheita de sangue haviam sido previamente heparinizados, utilizando-se o seguinte método: aspiração de 0,5ml de heparina (Heparina Sódica 5000 UI/ml – Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos LTDA., São Paulo-SP, Brasil), realização de movimentos repetitivos com o êmbolo de modo ao conteúdo da seringa entrar em contato com toda a sua superfície interna, retirada do excesso de heparina de forma a não sobrem resíduos visíveis.

O sangue foi então imediatamente repassado para frasco de colheita seco, devidamente identificado com o código do animal. Permaneceu em banho-maria à 37°C durante 20 minutos e à seguir foi centrifugados a 1500 rpm durante 20 minutos para separação do plasma. Com uso de pipeta automática de 500µl o plasma foi colheitado. Parte dele (cerca de 1 a 2 ml) foi identificado e imediatamente encaminhado em geladeira a 4°C para dosagem laboratorial de AST, ALT, LDH e do lactato. Outra parte da amostra (cerca de 2 a 3 ml) foi acondicionada em frasco resistente a alta temperatura (Criotubo de tampa rosqueável – Cral Artigos para Laboratório LTDA., São Paulo-SP, Brasil), com capacidade para 4ml, que foi identificado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido à -160°C (Foto 11). Tais amostras destinaram-se à dosagem da concentração do MDA¹⁵⁹ e da CAT¹⁶⁰.



Figura 19: Modo de armazenamento do plasma dos animais em frascos resistentes a baixa temperatura, acoplados a haste para congelamento em nitrogênio líquido.

Após a colheita de sangue os animais foram sacrificados com sobredose de éter por via analatória.

Dosagens bioquímicas: ALT, AST, LDH e Ácido Lático.

As dosagens bioquímicas automatizadas dos valores de AST, ALT, DHL e ácido láctico foram realizadas no Laboratório Exame, em Cuiabá-MT. As dosagens de AST, ALT e LDH foram realizadas pelo método cinético otimizado com leitura na faixa ultravioleta. A dosagem do lactato plasmático foi realizada segundo o método de Gutmann e Wahlefeld¹⁶¹, com leitura colorimétrica na faixa ultravioleta.

Mensuração da agressão oxidativa produzida por ROS: Dosagem do Malondialdeído (MDA).

A dosagem do MDA seguiu os fundamentos iniciais propostos por Konn & Livesedge (1944), com as condições químicas da reação alteradas segundo Percário e cols¹⁵⁹ (1994). O método, conhecido como “teste do TBA”, baseia-se na reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), em pH baixo e temperatura elevada, para formar o complexo MDA-TBA, de cor rósea e absorção máxima em 535nm. Esta dosagem pode ser realizada em soro, plasma, líquidos corporais e homogenados de tecido¹⁶².

No dia da dosagem, realizou-se o descongelamento das amostras, retirando-as do nitrogênio líquido e mantendo-as em bancada, sob temperatura ambiente. Após o descongelamento as mesmas foram armazenadas em geladeira à 4°C até o momento de sua mistura aos reagentes. Cerca de 800µl de plasma de cada amostra foi utilizado para a dosagem do MDA. No Apêndice 1 encontra-se a descrição detalhada da rotina empregada para dosagem do MDA (protocolo de dosagem do malondialdeído).

Mensuração da atividade antioxidante total (CAT) do plasma: Dosagem da capacidade antioxidante em equivalência ao Trolox (TEAC).

Fundamentos do método e reagentes utilizados.

Seguiu-se o método proposto por Miller e cols¹⁵⁵ (1993), modificado por Re e cols¹⁶³ (1999), em condições adaptadas de temperatura, proporções relativas dos reagentes e tempo

de mensuração, conforme já publicado anteriormente por Salomão e cols¹⁶⁴ (2006). O método destina-se à dosagem da capacidade antioxidante total de amostras biológicas (plasma, soro, saliva, urina, homogenados de tecidos, etc...). O potencial antioxidante é determinado segundo a sua equivalência a um potente antioxidante conhecido, o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametocromono-2-carboxílico; Aldrich Chemical Co 23881-3). Trata-se de uma técnica colorimétrica baseada na reação entre o ABTS – sal diamônio do ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) – Sigma-Aldrich A1888, com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$, Sigma-Aldrich P5592), produzindo diretamente o radical cátion $ABTS^{\bullet+}$, cromóforo de coloração verde/azul, com absorvância máxima nos comprimentos de onda 645, 734 e 815nm¹⁶⁵. A adição de antioxidantes a este radical cátion pré-formado o reduz novamente a ABTS, na extensão e escala de tempo dependente da capacidade antioxidante, concentração de antioxidantes e duração da reação¹⁵⁸. Isto pode ser mensurado por espectrofotometria pela observação da mudança na absorvância lida a 734nm durante um determinado intervalo de tempo (Figura 8). Assim, extensão da descoloração como índice de inibição do radical cátion $ABTS^{\bullet+}$ é determinada como a atividade antioxidante total (CAT) da amostra. É então calculada a sua relação com a reatividade do trolox como padrão, sob as mesmas condições¹⁵⁹. Os resultados finais são expressos em micromoles por litro de trolox (mM/l de trolox), o que correspondente à concentração do trolox com capacidade antioxidante equivalente a da amostra. A este padrão de medida dá-se o nome TEAC (trolox equivalente antioxidant capacity)¹⁵⁵.

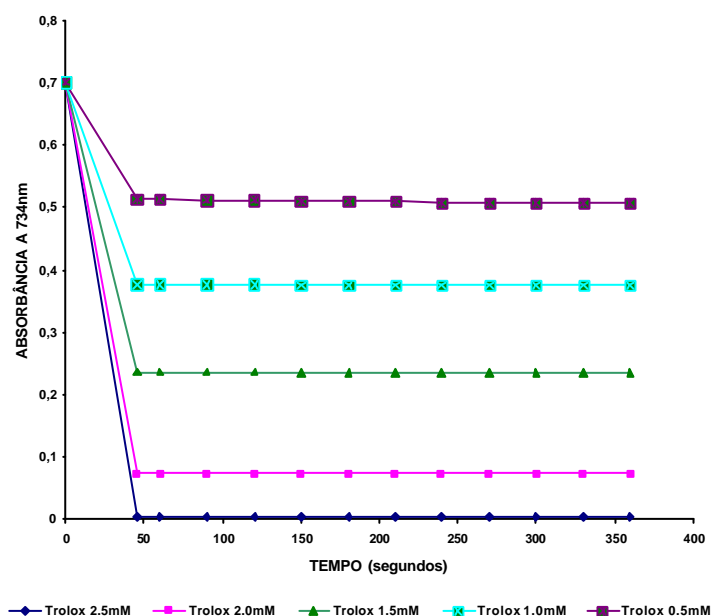


Figura 20: Efeitos do trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametocromono-2-carboxílico) na supressão da absorvância a 734nm do radical cátion $ABTS^{\bullet+}$, em função do tempo, à 25°C. Laboratório de Investigação, FCM-UFMT, Cuiabá-MT.

Sensibilidade do método.

O teste é mais reprodutível para amostras com capacidade antioxidante entre 1,0-2,0mM/l¹⁶⁰. A regressão linear usada para o cálculo da equação que define a curva de dose-resposta do trolox foi feita com base em tais valores (são referentes ao percentual de inibição de aproximadamente 40-80%), os quais correspondem aos pontos que produzem valores de absorbância na região mais linear desta curva¹⁵⁵ (Figura 21). Os valores de referência para atividade antioxidante do plasma e soro humano por este método têm sido considerados de 1,32 a 1,58mM/l ($1,46 \pm 0,14$ mM/l, n=312)¹⁶⁰. O método tem sido usado para análise da capacidade antioxidante de amostras biológicas de uma variedade de espécies de mamíferos não-humanos (camundongos, ratos, coelhos e primatas)¹⁶⁰.

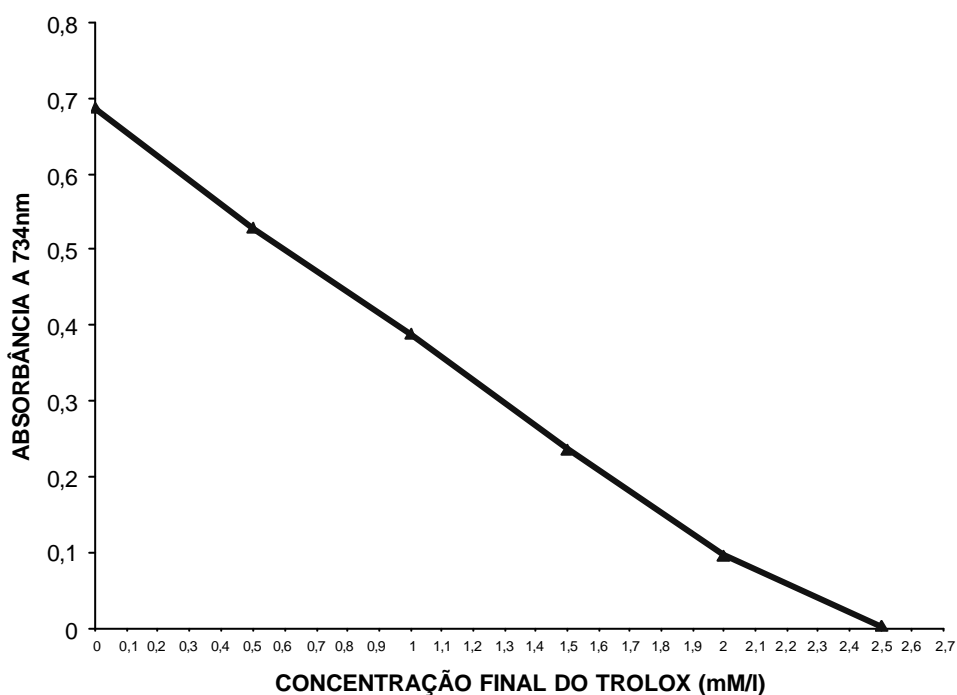


Figura 21: Curva de dose-resposta da concentração final do trolox em função da absorbância a 734nm. Condições: 2970µl ABTS^{•+}, 30 µl trolox, temperatura 25°C, tempo de reação: 5 minutos. Laboratório de Investigação, FCM-UFMT, Cuiabá-MT.

Interferências.

No método original¹⁵⁵, hemólise maciça pode deixar amostras de plasma insatisfatórias para análise, muito embora esteja demonstrado que em graus menores a hemólise não altere os resultados. Drogas e outros materiais exógenos com absorbância

significante a 734nm podem potencialmente ter interferência positiva nas dosagens. EDTA (10mM/l), heparina (10.000UI), uréia (10mM/l), creatinina (10mM/l), glicose (10mM/l) e etanol (60%), não apresentam reatividade e, conseqüentemente, interferência nos resultados nessas concentrações¹⁶⁰.

A descrição detalhada da rotina utilizada na dosagem da capacidade antioxidante total em equivalência ao trolox encontra-se descrita no Apêndice 2.

Análise estatística.

Para tratamento estatístico dos dados foi utilizado o programa SPSS para sistema operacional Windows versão 11.0..

Os resultados obtidos foram analisados quanto a distribuição normal com o teste de Kolmogorov-Smirnov e quanto à homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene¹⁶⁶.

Para comparação dos resultados entre os três grupos estudados foi utilizado, para os dados considerados de distribuição normal e que apresentaram homocedasticidade, o teste ANOVA *one-way*. Sendo encontrada diferença estatística entre os grupos, utilizou-se os testes de Turkey como post-hoc.

Para os demais dados, utilizou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Nesse caso, uma vez encontrada diferença estatística entre os grupos, procedeu-se a comparação dos mesmos entre si (dois a dois), pelo teste de Mann-Whitney.

Um nível de 5% foi estabelecido para significância estatística ($p < 0,05$). Os dados foram expressos como média e desvio padrão ou como mediana e variação.

RESULTADOS.

Todos os dez animais de cada um dos três grupos (controle, glutamina e sham) toleraram bem o experimento. Não houve óbitos durante a sua realização.

Dosagens bioquímicas: ALT, AST, LDH e Ácido Lático.

O nível sérico de ALT foi significativamente maior ($p < 0,001$) nos grupos controle (767 [279-867] U/l) e GLN (548 [417-698] U/l), em relação ao grupo Sham (120 [81-187] U/l). Entre os grupos controle e glutamina não houve diferença significativa ($p = 0,075$).

Os valores de AST estavam significativamente maiores ($p < 0,001$) nos ratos controles (929 [860-962] U/l) que nos do grupo glutamina (603 [386-776] U/l) e do grupo sham (149 [111-223] U/l). A dosagem de AST no grupo glutamina foi significativamente maior que a encontrada no grupo sham ($p < 0,001$). Os valores da mediana das dosagens de ALT e AST e sua variação nos diferentes grupos podem ser vistos nas Figura 22.

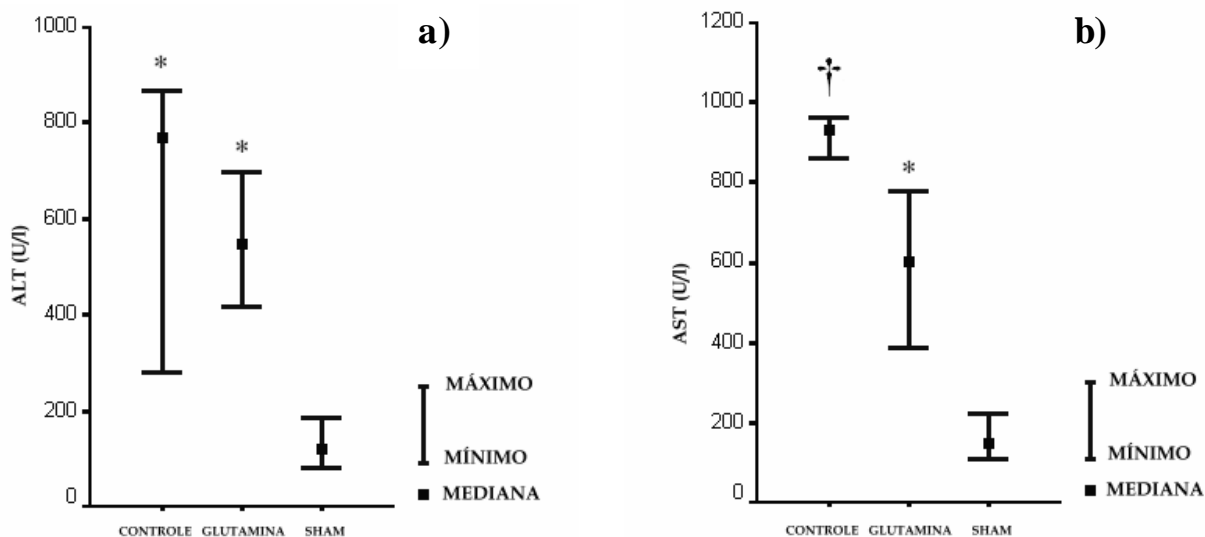


Figura 22: Dosagem sérica nos três grupos de: a) ALT (alanina transaminase); b) AST (aspartato aminotransferase). * = $p < 0,001$ vs. Sham, † = $p < 0,001$ vs. Glutamina e $p < 0,001$ vs Sham.

A dosagem de LDH foi significativamente maior ($p < 0,001$) nos grupos controle e glutamina em relação ao grupo sham (controle = 6352 [6051-6728] U/l, GLN = 5408 [810-7437] U/l e sham = 1261 [867-3111] U/l). Entre os grupos controle e glutamina não se encontrou diferença significativa ($p = 0,165$).

O mesmo ocorreu em relação à dosagem de ácido láctico, que estava significativamente maior ($p < 0,001$) nos grupos controle (6,44 [5,25-8,79] U/l) e glutamina (6,78 [5,69-8,31] U/l) em relação ao grupo sham (2,04 [1,23-3,06] U/l). Não foram observadas diferenças na dosagem de ácido láctico entre os grupos controle e glutamina ($p = 0,739$). Esses resultados podem ser vistos nas Figura 23.

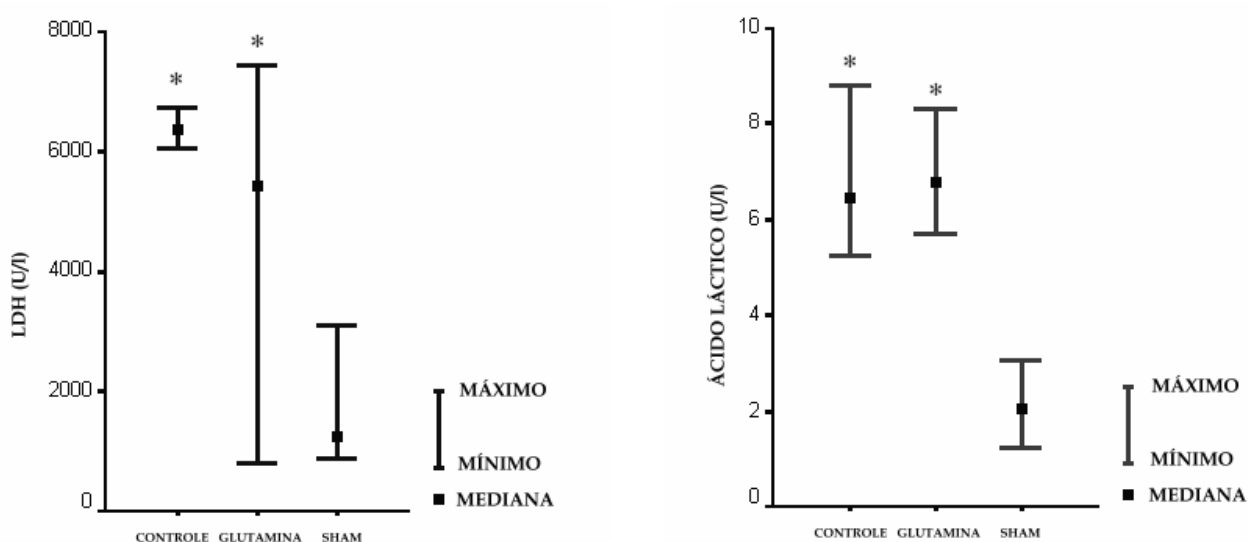


Figura 23: Dosagem sérica de LDH (desidrogenase láctica) e ácido láctico nos diferentes grupos estudados. * = $p < 0,001$ vs Sham.

Dosagem do MDA.

Os níveis de MDA (Figura 24) foram maiores no grupo controle (2037 [1498-5285] nmol/ml) em relação aos grupos glutamina (1543 [1208-2533] nmol/ml, $p = 0,01$) e sham (1287 [1141-1610] nmol/ml, $p < 0,001$). A dosagem do MDA plasmático foi significativamente maior ($p < 0,001$) no grupo glutamina que no grupo sham.

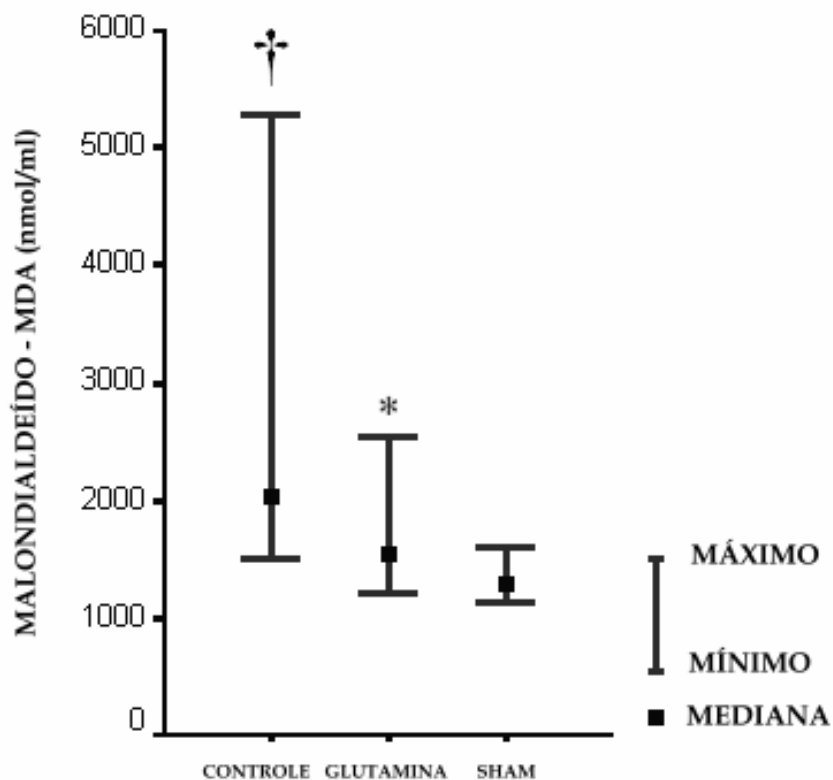


Figura 24: Valores plasmáticos do Malondialdeído (MDA), nos diferentes grupos estudados. * = $p < 0,001$ vs. Sham, † = $p = 0,01$ vs Glutamina e $p < 0,001$ vs. Sham.

Dosagem da capacidade antioxidante total em equivalência ao trolox (TEAC).

O TEAC foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos grupos glutamina e sham em relação ao grupo controle (glutamina = $1,61 \pm 0,07$; sham = $1,55 \pm 0,06$; e controle = $1,44 \pm 0,08$). Não houve diferença ($p = 0,212$) na capacidade antioxidante total entre os grupos glutamina e sham. Esses resultados podem ser vistos na Figura 25.

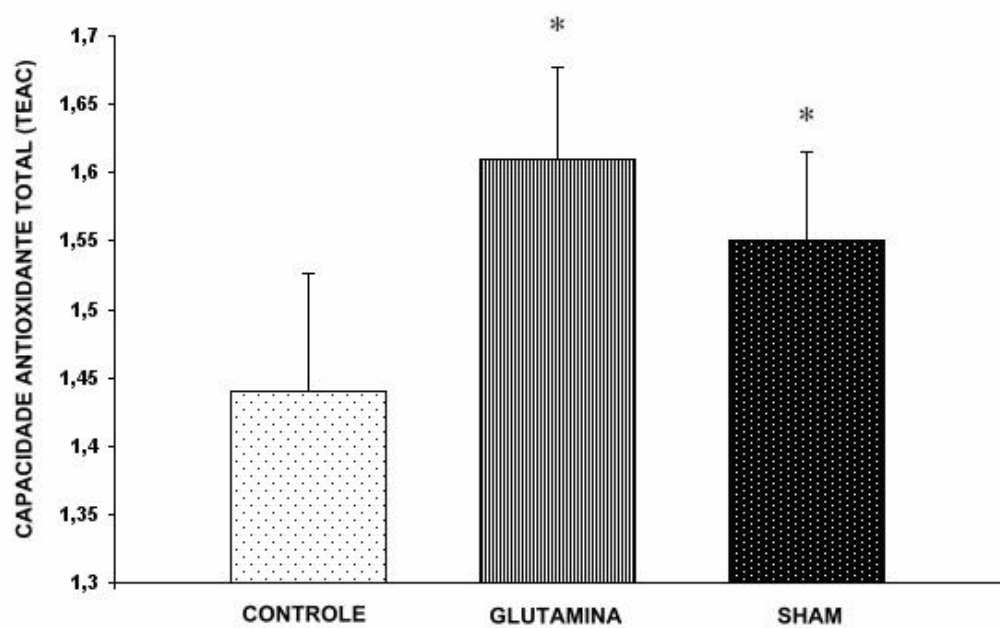


Figura 25: Valores (média±SD) da capacidade antioxidante total (CAT) do plasma, nos diferentes grupos estudados. * = $p < 0,01$ vs Controle.

DISCUSSÃO.

Desde a publicação do trabalho original de Pringle⁸, em 1908, até os dias de hoje (quase um século depois), o clampeamento da tríade portal como forma de obter-se controle vascular sobre o fígado vem sendo amplamente utilizado. Isso se aplica a situações de trauma, ressecções regradas e, mais recentemente, ao transplante de fígado. É notória a evolução da cirurgia hepática ao longo do último século⁴. A medida que aumentou-se a complexidade dos procedimentos operatórios sobre o fígado, aumentou-se também o tempo operatório de tais intervenções e, conseqüentemente, os períodos de isquemia hepática tornaram-se maiores. Conseqüentemente, observou-se um interesse crescente no estudo das lesões decorrentes deste estado de isquemia, somando-se a este, as injúrias relacionadas a síndrome pós-reperusão.

As transaminases (ALT e AST) têm sido utilizadas como marcadores do dano isquêmico hepático⁷¹. Nesse estudo, a isquemia hepática por clampeamento da tríade portal esteve relacionada a um aumento significativo de ALT e AST em relação ao grupo sham. O mesmo foi observado em relação a enzima desidrogenase láctica (LDH), de acordo com outros trabalhos encontrados na literatura, incluindo-se o estudo original realizado por Clavien e cols⁹⁵, pioneiro em utilizar-se dessas enzimas para avaliação da tolerância do fígado a curtos períodos de isquemia seguidos de reperusão (pré-condicionamento isquêmico). No presente trabalho observou-se no grupo de animais onde a GLN foi utilizada por via enteral (grupo glutamina), diminuição do valor de AST em relação ao grupo controle. Sabe-se que a AST é uma enzima pouco específica em relação ao tecido hepático, haja vista ter seus valores elevados em lesões envolvendo diversos órgãos como, músculo esquelético, músculo cardíaco, rins, pâncreas e eritrócitos⁹¹. Sendo a GLN uma fonte importante de energia em estados de estresse, extremamente necessária em situações patológicas onde sua utilização excede a capacidade de síntese muscular e hepática, a suplementação por via enteral realizada nesse modelo, ainda que agudamente, pode estar relacionado a algum grau de proteção sistêmica, demonstrado pelos níveis mais baixos de AST presentes no grupo glutamina. Não obstante, essa suposta proteção não encontrou respaldo nos níveis de lactato. Indicador de injúrias isquêmicas sistêmicas, os níveis desse metabólito típico de situações de anaerobiose, estiveram elevados em ambos os grupos de animais submetidos a I/R, independente do uso de GLN. Outros estudos de I/R utilizando-se suplementação de GLN observaram aumento do lactato sérico, o que foi associado a aumento^{167,168} na glicólise anaeróbica por uma maior

disponibilidade de glutamato, possivelmente ativando a lançadeira malato-aspartato. Tal constatação não foi observada neste estudo.

Neste estudo, a acidose (um dos principais componentes da síndrome de I/R²⁸), foi indiretamente demonstrada pela elevação dos valores de lactato. A literatura reforça a associação desta com a presença de hipercalemia, mioglobinemia, mioglobinúria, insuficiência renal aguda, edema pulmonar não-cardiogênico, alterações na resposta pressora, culminando em disfunção de múltiplos órgãos e morte²⁹. Neste trabalho estes outros parâmetros sistêmicos da síndrome de I/R não foram avaliados ficando-se aqui apenas a sugestão do envolvimento de outros órgãos na lesão desencadeada. Outrossim, fica a sugestão de que a GLN, atuando em nível celular, possa ter agido como fator de proteção. A inespecificidade da AST impede que restrinjamos essa proteção ao nível hepatocelular. Dosagens de outros marcadores celulares de lesão, em especial envolvendo outros órgãos alvo relacionados a elevação da AST (creatinofosfoquinase, troponina, amilase, lipase, etc.), será de valia em estudos futuros afim de ajudar a entendermos de modo mais preciso como e onde se processa essa proteção.

No tocante ao envolvimento extra-hepático, nos é particularmente importante discutir a participação intestinal. Na prática cirúrgica, a realização da manobra de Pringle implica em represamento de sangue na circulação esplâncnica. Com o clampeamento da veia porta a congestão venosa no leito mesentérico torna-se inevitável. Daí advém, portanto, uma injúria isquêmica que acomete diretamente não somente o fígado, mas também os intestinos. Além disso, ainda em situações práticas, no transplante de fígado, a cirurgia convencional no receptor inclui a hepatectomia total com remoção do segmento retro-hepático da veia cava inferior. Soma-se nesse caso um estado de congestão, gerado pelo clampeamento da veia cava em seu trecho infra-hepático que só pode ser contornado com a utilização de circulação extra-corpórea (derivação veno-venosa externa temporária porto-cava-axilar) durante a fase anepática¹⁶⁹. Para evitar-se este inconveniente, atualmente vem sendo desenvolvida a técnica de preservação da veia cava inferior na hepatectomia durante o transplante de fígado, denominada de "piggy-back". Algumas de suas vantagens incluem a diminuição do tempo de isquemia quente (por eliminar a anastomose da veia cava infra-hepática), a redução da necessidade da utilização de derivações veno-venosas e a simplificação da cirurgia do re-transplante hepático¹⁷⁰.

A isquemia hepática determinada pela oclusão das estruturas de seu hilo e a isquemia intestinal assim determinada, continuam sendo um importante fator limitante nas intervenções sobre o fígado. Na compreensão deste processo, inúmeros modelos experimentais surgiram permitindo-se o estudo dos princípios fisiopatológicos que regem as lesões ora desencadeadas, e de possíveis formas de minimizá-las. Alguns destes modelos mostraram tolerar extremamente mal este estado de isquemia – em ratos, 45 a 60 minutos de clampeamento da tríade portal leva quase que invariavelmente a morte do animal¹⁷¹, situação semelhante ao que ocorre com cães¹⁷². Já humanos e primatas apresentam melhor tolerância ao clampeamento portal. Todavia, na prática o tempo de isquemia hepática mantendo-se a congestão esplâncnica, mostrou ter um importante papel nos resultados clínicos das ressecções e do transplante hepático¹⁴⁹.

A congestão venosa na circulação mesentérica em ratos provoca intensas alterações na morfologia macroscópica e microscópica dos intestinos. Camargo e cols⁷² observaram em ratos a presença de células inflamatórias na lâmina própria das vilosidades a partir de vinte minutos de congestão venosa (isquemia); com trinta minutos instala-se desprendimento de grandes áreas do epitélio luminal no ápice das vilosidades intestinais e aparecimento de intensas áreas de hemorragia. É importante ressaltar que o intestino funciona como uma barreira para impedir que toxinas e bactérias presentes na luz intestinal, atinjam o fígado ou outros órgãos distantes¹⁰⁴. Falhas nessa função de barreira desencadeadas pela isquemia intestinal, resultam em aumento da permeabilidade e subsequente translocação de bactérias e toxinas a partir de sua luz¹⁷³. O tempo prolongado de congestão esplâncnica leva a um estado de endotoxemia com efeitos extremamente deletérios¹⁷⁴, muitas vezes levando ao óbito, o qual parece ter como um dos principais fatores causais a translocação intestinal de bactérias e toxinas¹⁵¹.

Acrescenta-se a estas lesões isquêmicas, as injúrias decorrentes do período de reperfusão. Estas são mediadas inicialmente pela produção de ROS²⁹. Sua principal via de produção é a oxidação da hipoxantina a xantina, catalisada pela enzima xantina oxidase, na presença de O₂³⁶. A ação destas ROS sobre os PUFAs, presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, inicia um processo destrutivo em cadeia conhecido como lipoperoxidação (LPO)⁴³. Em consequência dessa agressão celular, iniciam-se eventos inflamatórios, com a participação de mediadores teciduais, neutrófilos e mastócitos, atuando interdependentemente e potencializando as lesões²⁸.

Nesse estudo, o estresse oxidativo foi resultante do clampeamento do pedículo hepático seguido de reperfusão. Testamos, sob essas condições, a ação da GLN administrada por via enteral. O metabolismo intracelular deste aminoácido é regulado, principalmente, por duas enzimas: a Glutaminase, que catalisa a hidrólise da GLN a glutamato, e a glutamina-sintetase, que catalisa a síntese de GLN, a partir de glutamato e amônia¹⁷⁵. A direção e os valores destas reações é que vão determinar se o tecido é consumidor ou produtor de GLN¹⁷⁶. Existe pouca glutamina-sintetase em toda a mucosa do trato gastrointestinal e existe baixa atividade da Glutaminase no esôfago, atividade intermediária em várias partes do colon (ceco, ascendente, transverso, descendente e reto) e alta atividade nas células epiteliais da mucosa do intestino delgado (duodeno e íleo)¹⁷⁷. Ao definirmos a forma de infusão enteral de GLN neste estudo, tivemos em mente referências na literatura que demonstraram haver no íleo de ratos, atividade da Glutaminase que se mantém, mesmo em situações de estresse metabólico (como no jejum prolongado), o que não acontece com a mucosa jejunal¹⁷⁸. Conforme observado em estudo anterior¹⁶⁵, a hipóxia tecidual pode agir como fator de ativação para a Glutaminase, facilitando a utilização de GLN exógena oferecida a tecidos ricos em tal enzima. Optamos pelo emprego de um segmento de 20cm de intestino delgado, envolvendo o íleo do animal, para a aplicação enteral de GLN nesse modelo de I/R. O íleo distal têm demonstrado ser a região onde as lesões decorrentes da I/R intestinal mostram-se mais significativas¹⁷⁹. Por estes motivos, o estudo das ações da GLN no estresse oxidativo, quando aplicada a este nível, nos pareceu particularmente interessante.

A GLN é fonte importante de energia para hepatócitos, linfócitos, macrófagos e enterócitos¹⁸⁰. Além disso, melhora a resposta imunológica, otimiza o balanço nitrogenado, e ainda serve de precursor da biossíntese de importantes agentes metabólicos como a arginina, glutatona e taurina¹⁸¹. A arginina é o substrato para a síntese do óxido nítrico, considerado o maior agente regulador do endotélio vascular, tendo função vasodilatadora e estando envolvido com a fisiologia dos macrófagos e com a resposta inflamatória na célula¹⁸². Por sua vez, a glutatona e o aminoácido taurina tem um papel extremamente importante na defesa antioxidante do organismo¹⁸³. Por tais motivos, os potenciais efeitos terapêuticos da GLN durante as lesões de I/R têm sido alvo de investigações. No presente estudo, seu uso enteral esteve relacionado a manutenção da capacidade antioxidante total do plasma, a qual se equiparou a de animais que não foram submetidos a I/R. Além disso, a melhora no estresse oxidativo pôde ser constatada por uma diminuição do conteúdo plasmático do malondialdeído

(MDA), marcador sorológico da LPO, em relação ao grupo controle. Isto sugere que a GLN tem profundo impacto na redução do estresse oxidativo. Tal achado possui grande importância haja vista haverem evidências de que o intestino é uma fonte importante de marcadores inflamatórios típicos da lesão oxidativa determinada por I/R, mesmo quando esta desenvolve-se em sítios distantes do intestino. Pimenta e cols¹⁵⁰, em um modelo de I/R de membros posteriores de ratos por clampeamento aórtico demonstrou ser o intestino a maior fonte de produção de IL-6.

O estresse oxidativo aqui estudado origina-se fundamentalmente dos sítios hepático e intestinal. Neste último, as propriedades antioxidantes do uso enteral da GLN são bem conhecidas. Para Suh e cols¹⁸⁴, isso decorre de um aumento nos níveis de glutatona intestinal e redução na concentração plasmática de óxido nítrico (NO) pela inibição da expressão da enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS), importante na síntese desse radical livre a partir de estímulos gerados por endotoxinas e citocinas na mucosa intestinal. Corroboram com esses resultados, achados de outros autores que correlacionaram o uso enteral da GLN com uma inibição da LPO em modelos experimentais de I/R intestinal e na musculatura esquelética¹⁸⁵.

Todavia, é importante ressaltar que, em grande parte desses estudos, a suplementação enteral de GLN foi realizada ao longo de vários dias antecedendo a lesão de I/R. No modelo experimental aqui utilizado, a infusão de GLN se deu durante o período de I/R. Isso nos permite questionar se, neste caso, os mecanismos de defesa contra a agressão oxidativa determinada pelo uso da GLN podem ser explicados pelas razões colocadas anteriormente. Além do tempo de uso, alguns autores acreditam que em situações de estresse metabólico o uso enteral da GLN isoladamente pode ser inadequado, devendo ser complementado com o uso parenteral¹⁸⁶. Na literatura, modelos experimentais enfocando efeitos locais do uso da GLN durante a I/R hepática o fizeram por via parenteral^{144,145}. Jia e cols¹⁴⁴ utilizando-se do pré-tratamento por via parenteral com GLN durante três dias antecedendo a I/R hepática, demonstraram melhora na tolerância deste órgão a injúria oxidativa. Noh e cols¹⁴⁵, utilizando GLN parenteral por seis horas antecedendo a I/R hepática não tiveram a mesma constatação. Os resultados são conflitantes, o que pode ser explicado por diferenças no tempo, dose e modo de aplicação da GLN¹⁴⁵.

No tocante a via e momento de infusão enteral de GLN, um modelo experimental similar ao deste estudo (porém gerando isquemia intestinal através do clampeamento de vasos mesentéricos seguido de reperfusão), foi utilizado por Kozar e cols^{141,142}. Nestes trabalhos, a infusão de nutrientes deu-se durante o transcorrer da I/R, na luz de sacos (alças fechadas) confeccionadas cirurgicamente no intestino de ratos. Aguilar-Nascimento e cols⁵⁶ utilizando-se desse mesmo método estudaram os efeitos da I/R intestinal, enfocando aspectos histopatológicos da parede intestinal. Demonstrou-se que a injeção intraluminal de GLN, em segmentos isolados de alças de jejuno e íleo de ratos Wistar resultou em menor dano da mucosa intestinal e menor acúmulo de neutrófilos na lâmina própria da mucosa intestinal. Sukhotnik e cols¹⁷², em estudo recente, também demonstraram prevenção na lesão de mucosa promovendo melhor recuperação seguida a lesão de isquemia reperfusão intestinal em ratos através do uso enteral de GLN. No estudo piloto realizado para a confecção deste trabalho obtivemos resultados bastante similares aos aqui apresentados em relação a uma melhora na atividade anti-oxidante total do plasma, conferida pelo uso enteral de GLN¹⁵⁹. É importante ressaltar que neste estudo foi utilizada uma solução contendo N(2)-L-alanil-L-glutamina. A alanina não é metabolizada pelo intestino¹³⁷, desse modo, acreditamos que os efeitos aqui observados se devem exclusivamente a ação da GLN. Há outros estudos na literatura que utilizaram o dipeptídeo alanil-glutamina por via enteral, em situações de I/R ou não^{131,164,187}. Em estudo anterior, Kozar e cols¹⁴¹ demonstraram que a infusão enteral de GLN diferentemente da alanina, foi efetiva na proteção da mucosa intestinal durante I/R.

A dose de GLN empregada também é um fator de fundamental relevância. Evidências na literatura sugerem que em pacientes gravemente enfermos, a suplementação por via parenteral e enteral de GLN em altas doses associada a antioxidantes pode ter um impacto positivo na sobrevida. Nesse contexto, um grande ensaio clínico multicêntrico chamado REDOXS (reducing deaths due to oxidative stress; the REDOX study) vem sendo realizado por Heyland e cols¹⁸⁸, cujos resultados são promissores em nos fornecer respostas acerca do uso de nutrientes chaves, especificamente GLN associada a antioxidantes, como determinante de maior sobrevida em pacientes graves. Nesse trabalho, ainda em desenvolvimento, a GLN vêm sendo suplementada em paciente críticos na dose de 0,35g de GLN/kg de peso/dia por via parenteral, associada a 30g de GLN por via enteral. Baseado nisso, optamos pelo uso no presente estudo de uma dose considerada alta de GLN para emprego enteral, da ordem de 0,50g de GLN/kg de peso.

Uma das principais funções intestinais da GLN é a preservação da integridade da mucosa o que guarda relação com a manutenção de sua função de barreira⁵⁵. Berg e Garlington¹⁸⁹ definiram translocação bacteriana como a passagem de bactérias viáveis do trato gastrointestinal para os linfonodos do mesentério e outros sítios extraintestinais tais como: baço, fígado, rins, cavidade peritoneal e circulação sangüínea. Atualmente, essa definição envolve também a translocação de produtos bacterianos, tais como lipopolissacarídeos (LPS) ou mediadores inflamatórios (IL-1, IL-6, TNF-a e PGE₂)¹⁵³. A translocação de bactérias e endotoxinas da luz intestinal para a circulação porta está relacionada com a ativação das células de Kuppfer¹⁹⁰. Estas passam a produzir em grande escala uma série de citocinas pró-inflamatórias, em especial do fator de necrose tumoral alfa (TNF-a), importante mediador da lesão por I/R¹⁵¹. A reação inflamatória desencadeada pela ativação de polimorfonucleares, potencializada pelas ações de tais citocinas, está diretamente envolvida com o estresse oxidativo, tanto pela liberação de enzimas proteolíticas na interação neutrófilo-endotélio (por exemplo a mieloperoxidase, envolvida com a produção do radical hipoclorito) quanto pela degranulação de mastócitos levando a produção do óxido nítrico⁴¹. A barreira intestinal deve ser entendida como um conjunto de mecanismos voltados a prevenção da translocação de bacteriana¹³³. Dentre estes incluem o peristaltismo, produção de muco, flora intestinal, tecido linfóide associado ao intestino (GALT), sais biliares, hormônios, acidez gástrica e, a preservação da morfologia da mucosa intestinal (MacFie, apud Salvalaggio e Campos¹³³). Há controvérsias quanto a ação da GLN suplementada por via enteral ou parenteral na inibição da translocação bacteriana¹⁸³, muito embora o seu uso possa atenuá-la através de uma ativação do sistema imunológico¹³⁵. Não há evidências suportando que alterações de vilosidades *per se* ou o aumento da permeabilidade intestinal leve invariavelmente a translocação de bactérias e toxinas¹³⁵. Não obstante, acreditamos que, beneficiando a função de barreira intestinal, seja pela prevenção ou diminuição da translocação de bactérias e toxinas da luz intestinal, a GLN estaria limitando a extensão da resposta inflamatória local e sistêmica e, com isso, contribuindo para a redução do estresse oxidativo. Este, possivelmente, foi um dos principais mecanismos relacionados a diminuição dos valores de MDA e preservação da CAT em animais que utilizaram GLN, observado neste estudo. Limita esta interpretação a inexistência de dados morfológicos ou de confirmação microbacteriológica de translocação bacteriana neste trabalho.

Contraria tal hipótese a constatação de Adams¹⁹¹ (1996) de que LPS ou endotoxinas bacterianas, junto com citocinas, tais como TNF , IL-1 ou IF- , induzem a síntese de

iNOS, de 2 a 4 horas após a exposição ao agente. No presente estudo, foram avaliadas as repercussões oxidativas durante os primeiros minutos de reperfusão. Optamos por essa aferição em estágio precoce dada a constatação de Ashoori e cols¹⁹², que o MDA tem seu pico 10 minutos após a reperfusão, quando ocorre um provável consumo das defesas antioxidantes endógenas, sem que haja condições do organismo produzir um aumento nas defesas sintetizáveis (tais como enzimas antioxidantes e glutatona reduzida). As colheitas de sangue para avaliação do estresse oxidativo foram por nós realizadas 5 minutos após a reperfusão.

Uma maior elucidação dos mecanismos relacionados a ação protetora da GLN neste modelo experimental poderá ser conseguida com novos trabalhos, avaliando-se a morfologia da mucosa intestinal, ocorrência de translocação bacteriana e realizando-se mensurações séricas e/ou teciduais de antioxidantes específicos como a glutatona e de outros marcadores da resposta inflamatória inerente ao estresse oxidativo como o óxido nítrico, mieloperoxidase, fator de necrose tumoral e interleucinas.

Considerações também devem ser feitas acerca do método escolhido para a avaliação do estresse oxidativo neste estudo. Os efeitos deletérios das ROS sob os sistemas biológicos são resultantes da oxidação de componentes celulares como tióis, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lípidos, principalmente ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs)⁵⁷. O processo de LPO é iniciado pela reação de um radical livre com um ácido graxo insaturado e propagada por radicais peroxilas. Resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como 4-hidroxinonal, isoprostanos, e o MDA que podem ser detectados em amostras biológicas e utilizados para se avaliar o estresse oxidativo⁵⁷. Uma das técnicas mais utilizadas para se avaliar a oxidação de lípidos é a dosagem do MDA⁵⁸. O teste padrão, introduzido por Kohn e Liversedge⁶⁰, em 1944, é bastante popular porque é simples e rápido, porém inespecífico. Consiste na medida de um cromógeno róseo formado pela reação do MDA com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA), em meio ácido e alta temperatura. Essa reação, chamada de “teste das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico” (TBARS). A avaliação do MDA pelo teste com TBA não é específica, pois muitas outras substâncias que ocorrem em materiais biológicos também reagem com o TBA. Como exemplo, o ácido tiobarbitúrico pode reagir inespecificamente com interferentes, tais como o ácido siálico, levando a falsos resultados. Felizmente, estes interferentes são de origem exógena e podem ser facilmente evitados em modelos animais controlados¹⁵⁴. Quatro fatores importantes devem ser

considerados neste teste: (a) a influência das condições da reação e dos reagentes na resposta ao TBA; (b) a não especificidade do TBA para a reação com o MDA; (c) a não exclusividade do MDA como produto final da LPO (d) a impossibilidade de se distinguir o complexo MDA-TBA dos outros produtos reativos ao TBA por espectrofotometria¹⁹³. A grande vantagem desse método está sem dúvidas em sua fácil utilização e relativamente baixo custo. Fornece informações sobre a extensão da LPO em sistemas simples, *in vitro*, mas em fluidos biológicos, dado as restrições colocadas, deve ser interpretado com certa cautela¹⁹⁴

A dosagem da capacidade antioxidante total tem sido utilizada para avaliação do potencial antioxidante de misturas complexas⁵⁹. Tem a vantagem de identificar a atividade do conjunto de antioxidantes presentes nessa mistura, computando nesse ínterim o sinergismo que pode ocorrer entre os mesmos⁶⁰. Em sistemas biológicos, a atividade sinérgica entre antioxidantes é muito comum, como é observado com a própria glutathione. A mesma age regenerando o ascorbato e este regenerando o α -tocoferol, recuperando suas propriedades de supressão as ROS¹⁹⁵. Assim, a medida da capacidade antioxidante total de uma amostra pode dar informações biologicamente mais relevantes do que as obtidas pela mensuração da concentração individual de antioxidantes¹⁹⁶. A GLN mostrou nesse estudo preservar a capacidade antioxidante total do plasma em níveis semelhantes aos encontrados em animais que não foram submetidos a lesão por isquemia reperusão. Isto pode estar relacionado a um aumento dos componentes antioxidantes presentes no plasma, destacando-se a glutathione, ou a uma inibição na produção de ROS diminuindo a demanda orgânica por antioxidantes. Sendo este um modelo agudo, é provável que a segunda alternativa seja mais viável. O aumento de componentes anti-oxidantes do plasma é melhor observado sobretudo nos modelos crônicos de estresse oxidativo, como no exercício físico, conforme já demonstrado em estudo anterior¹⁹⁷, sendo pouco comum em modelos de lesão oxidativa aguda, como o aqui empregado.

Dentre as diversas maneiras que podem ser utilizado para a avaliação da capacidade antioxidante total de amostras biológicas, optamos pelo método de inibição do radical $ABTS\bullet^+$ em equivalência ao trolox (TEAC), originalmente descrito por Miller e Rice-Evans⁵⁹. Este radical não é encontrado em mamíferos sendo portanto, uma ROS de origem não-fisiológica. É importante destacar que a velocidade de reação entre antioxidantes plasmáticos e o $ABTS\bullet^+$ pode não ser a mesma: usar end-points para a reação em torno de 4 a 6 minutos pode levar portanto a interpretações incorretas acerca da atividade anti-oxidante

total de uma amostra complexa, subestimando a atividade de antioxidantes de ação mais lenta. Os tióis de maneira geral reduzem rapidamente o radical ABTS^{•+} o que faz esse método interessante na aferição da atividade antioxidante de elementos como a vitamina C e a glutatona¹⁹⁸. Como apenas a produção de enzimas antioxidantes (por exemplo, a superóxido dismutase) e de glutatona podem ser produzidas pelo organismo em resposta a uma agressão oxidativa¹⁵⁴, o presente método nos parece adequado.

Neste modelo de I/R hepática por clampeamento da tríade portal, sem realização de shunt porto-sistêmico, a congestão esplâncnica e conseqüente envolvimento intestinal parece ser um importante mecanismo relacionado as lesões locais e sistêmicas. O dano local hepático foi caracterizado pelo aumento das aminotransferases (ALT e AST) e a lesão sistêmica pelo aumento significativo de lactato em relação aos animais do grupo sham. O estresse oxidativo comprovou ter uma participação extremamente importante nesse mecanismo de lesão. Isso foi verificado pelo aumento do MDA plasmático, aliado ao consumo das defesas antioxidantes. A grande evidência dessa participação intestinal vem do papel protetor demonstrado pela GLN administrada localmente, levando a diminuição nos valores de MDA e preservação das defesas antioxidantes em relação ao grupo controle. Contudo, deve-se cautela na interpretação destes achados. Trata-se de um modelo agudo de estresse oxidativo, onde as alterações na LPO e na defesa antioxidante foram determinadas em uma fase bastante inicial do processo. Certamente, não houve tempo suficiente para o desenvolvimento das respostas orgânicas mais críticas ao estresse, devendo-se provavelmente os resultados aqui observados a alterações sutis na resposta inflamatória determinada pela atividade local, especialmente em nível da mucosa intestinal, pela GLN.

Não encontramos trabalho similar na literatura. Os dados obtidos no presente estudo servem como ponto de partida para uma investigação mais detalhada destes complexos fenômenos fisiopatológicos. Novos estudos com modelos experimentais com uso mais prolongado da GLN e avaliação das repercussões da I/R por períodos mais longos devem ser realizados. Futuros estudos com marcadores sorológicos e morfológicos de lesão, com o objetivo de investigar a evolução destes fenômenos durante as fases mais tardias da injúria de I/R também são esperados. Com isso, poder-se-á determinar com maior precisão, o potencial benefício do uso da GLN por via enteral no tratamento de indivíduos que serão submetidos a procedimentos operatórios ou vítimas de processos mórbidos que envolvam I/R hepática e/ou

intestinal. Os dados permitem especular que a GLN enteral pode ser útil na I/R de outros órgãos ou regiões além do fígado.

CONCLUSÃO.

Neste modelo de isquemia do fígado por clampeamento do pedículo hepático sem derivação vascular seguida de reperfusão julgamos poder concluir que:

1. O uso enteral de GLN reduz o dano oxidativo e melhora a capacidade antioxidante total do plasma. O uso de GLN está associado a uma queda na concentração plasmática do MDA, e preservação da CAT, mantendo-a a níveis similares ao observado em animais que não foram submetidos a I/R.
2. A infusão enteral de GLN diminui a expressão enzimática sérica associada a dano hepático, marcadamente a concentração plasmática de AST em relação ao grupo controle.

APÊNDICE 1.

PROTOCOLO DE DOSAGEM DO MALONDIALDEÍDO (MDA)

Materiais.

Vidraria:

- ☞Becker de 1500ml.
- ☞Becker de 1000ml.
- ☞Becker de 200ml.
- ☞Becker de 100ml.
- ☞Becker de 50ml.
- ☞Becker de 20ml.
- ☞Balão de 1000ml.
- ☞Proveta de 15,0x100ml.
- ☞Tubos de ensaio.
- ☞Tubos de ensaio resistentes à alta temperatura (parede reforçada: dimensões de 11x100, parede de 2mm).

Equipamentos de laboratório:

- ☞Balança analítica eletrônica (balança analítica digital 210G/0,1mg, Hexasystems® Hexa2104N).
- ☞Balança graneleira (Ohaus Scot®)
- ☞Pipetas automáticas: 1000µl, 500 µl, 400 µl, 200 µl. (Eppendorf®).
- ☞Pipetas Pasteur de 3ml.
- ☞Estantes para tubos de ensaio.
- ☞pHmetro (pHmetro Marte® MB10).
- ☞Centrífuga (Centrífuga de Bancada Excelsa® II 206 BL).
- ☞Banho Maria com capacidade de aquecimento até 95°C (Banho Maria com agitação faixa de trabalho de 5°C acima da temperatura ambiente até 110°C, Quimis® 215.110).
- ☞Agitador magnético (agitador magnético com aquecimento Marconi® MA-085).
- ☞Agitador de tubos de ensaio tipo vortex (agitador de tubos vortex Quimis® Q-220).

- ☒ Espectrofotômetro (espectrofotômetro digital Celm® E225D).
- ☒ Espectrofotômetro com controle de temperatura (espectrofotômetro digital Beckman® DU-70, com controlador de temperatura).

Equipamentos de proteção individual:

- ☒ Avental
- ☒ Luvas de látex para procedimento
- ☒ Máscara e gorro (opcional)

Diversos:

- ☒ Parafilm®, rolhas de borracha para tubos de ensaio, suporte (estante para tubos de ensaio), bolas de gude.

Reagentes.

- ☒ Água destilada (H₂O_d) ou superior.
- ☒ Cloreto de Potássio (KCl) 1,15% (CQA Química LTDA., São Paulo-SP, Brasil).
- ☒ Fosfato Monobásico de Potássio (KH₂PO₄) – Tampão fosfato 75Mm, pH 2,5 (CQA Química LTDA., São Paulo-SP, Brasil).
- ☒ Ácido Tiobarbitúrico (TBA) 10 nM (Sigma T-5500, 2-Thiobarbituric Acid, minimum 98% – Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis - Missouri, E.U.A.).
- ☒ Solução Padrão MDA (1,1,3,3, tetrahidroxipropano) 20µM (Sigma T9889, 1,1,3,3, tetrahidroxipropano, MM = 220,3 g/Mol, pureza = 97%. Solução com densidade = 0,92g/ml – Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis - Missouri, E.U.A.).
- ☒ Álcool n-Butílico (Caal Reagentes Analíticos LTDA, São Paulo-SP, Brasil).

Preparo dos reagentes.

Solução de Cloreto de Potássio (KCl) 1,15%.

- ☒ Misturou-se 1000ml de água destilada a 1,15g de Cloreto de Potássio.

☒ Dissolveu-se por completo a mistura em placa agitadora magnética.

☒ Acondicionou-se a solução em frasco âmbar identificado.

Fosfato Monobásico de Potássio (KH₂PO₄) – Tampão fosfato 75Mm (pH 2,5).

☒ Acidificou-se, em phmetro, H2Od até o pH de 2,5.

☒ Pesou-se, em balança graneleira, 10g de Fosfato Monobásico de Potássio (KH₂PO₄). O mesmo foi misturado à água destilada acidificada, em um Becker de 500ml, até que dissolveu-se por completo. Com o uso de um balão de 1000ml, misturou-se os 10g de KH₂PO₄ dissolvidos em água destilada acidificada até completar 1000ml da solução.

☒ Acondicionou-se o reagente preparado em frasco âmbar identificado. O mesmo foi acondicionado em geladeira à 4°C.

Ácido Tiobarbitúrico (TBA) 10 nM.

Obs.: Uma vez preparado o ácido tiobarbitúrico não pode ser estocado. Assim, esse reagente foi invariavelmente preparado no dia da dosagem do MDA.

☒ Utilizou-se 0,036g de TBA para 25ml da solução de Fosfato Monobásico de Potássio (KH₂PO₄) – Tampão fosfato 75Mm (pH 2,5). Dessa forma, por regra de três, para preparo de 100ml utilizou-se 0,144g do TBA, ou seja, 144mg. Para cada dosagem utilizou-se 1ml da solução de ácido tiobarbitúrico 10nM, portanto, 100ml tornaram possíveis 100 dosagens.

☒ Usando um becker de 50ml em balança analítica realizou-se pesagem de 0,144g do TBA.

☒ Em proveta, mediu-se 100ml em volume da solução de Fosfato Monobásico de Potássio (KH₂PO₄) – Tampão fosfato 75Mm (pH 2,5).

O TBA é de difícil solubilização. Desta forma, alguns cuidados nessa etapa inicial foram observados. Iniciou-se a solubilização do TBA usando um Becker de 50ml, passou-se o conteúdo para um Becker de 100ml, lavou-se o Becker de 50ml com a solução de Fosfato Monobásico de Potássio. Passou-se o conteúdo para Becker de 200ml lavando de modo a não ficar resíduos do TBA sem estar dissolvido.

Selou-se o becker de 200ml com parafilm® e a dissolução completa foi concluída em placa agitadora magnética.

Procedeu-se a identificação do reagente TBA 10nM, pronto para uso.

Solução Padrão MDA (1,1,3,3, tetrahidroxipropano) 20μM).

Preparou-se uma solução padrão do MDA a 20μM. Inicialmente preparou-se uma solução a 400μM/l. Usou-se a seguinte regra, tendo por base as especificações do produto original:

$$1 \mu\text{M} = 10^{-6} \text{ mol}$$

$$220,3\text{g} \text{ ----- } 1 \text{ mol}$$

$$X\text{g} \text{ ----- } 400 \times 10^{-6} \text{ mol (400}\mu\text{M)}$$

$X = 0,08812\text{g}$, onde X = massa em gramas equivalente à 400μM do produto.

Como a pureza do produto é de 97%, aplicou-se um fator de correção para 100%, ou seja:

$$C1 \times m1 = C2 \times m2$$

$$100 \times 0,088 = 97 \times m2$$

$m2 = 0,0908$, portanto a massa necessária para uma solução de 400μM é de 0,0908g

Sabia-se que a densidade do produto original era 0,92g/ml, assim:

$$d = m/v; 0,92 = 0,0908/v; v = 0,0987\text{ml} \sim 99 \mu\text{l}$$

Desse modo, pipetou-se 99μl do produto original (Sigma T9889) em 1l de água destilada usando balão de 1000ml.

Neste ponto tinha-se uma solução do reagente MDA a 400μM.

O reagente para uso deveria ter concentração 20μM. Portanto, dilui-se 50 ml (20μ moles) da solução de MDA 400μM em 1000ml de água destilada.

Chegou-se, desse modo, à solução padrão MDA pronta para uso, com concentração 20μM.

Acondicionou-se o reagente preparado em frasco âmbar identificado. O mesmo foi estocado em geladeira à 4°C..

Álcool n-Butílico.

☒ Produto comercializado pronto para uso.

Preparo final dos controles e amostras.

Esta foi a etapa final de preparação, a qual antecedeu a leitura dos valores de absorvância em espectrofotômetro.

☒ Preparou-se uma ou mais estantes para tubos de ensaio de acordo com a quantidade de amostras a serem processadas no período de trabalho. Foram necessários dois tubos para cada amostra de material. Isso ocorreu pois a dosagem do MDA deve ser feita de modo pareado, ou seja, cada peça (espécime de plasma) foi dosada em duplicata, desprezaram-se as amostras na quais houveram diferenças maiores que 10% de absorvância entre os dois tubos, uma vez que os valores absolutos da dosagem são muito pequenos (ordem de 10^{-9} ng/ml), podendo-se refletir em erros muito potencializados.

☒ Iniciou-se a identificação dos tubos dois a dois, à partir do número 1.

☒ Colocaram-se os tubos na estante em seqüência, afim de que, caso houvessem problemas com a identificação feita no tubo nas etapas que seguiriam, pela sua posição na estante se pudesse conhecer o seu número.

☒ Uma vez identificados todos os tubos pareados, iniciou-se pipetagem de 1ml do reagente TBA (Ácido Tiobarbitúrico 10 nM) para cada tubo de ensaio. Houve atenção especial para que não ocorressem erros de pipetagem.

☒ Estando todos os tubos com 1ml do reagente TBA, procedeu-se a pipetagem das amostras. Neste momento, utilizou-se uma ponteira para cada amostra (descartando-a após a pipetagem). Simultaneamente à cada pipetagem, um segundo pesquisador iniciou o preenchimento do ficha de dosagem do MDA (Anexo 2), definindo a que amostra (código do animal) pertencia cada tubo numerado. Os pesquisadores responsáveis pela dosagem desconheciam a que grupo pertencia a amostra que estava sendo processada.

☒ Os tubos de ensaio de número 1 receberam 0,5ml (500 μ l) de água destilada. Estes tubos foram designados “controle branco”.

☒ Os tubos de ensaio de número 2 receberam 0,5ml (500 μ l) da solução padrão MDA 20 μ M. Estes tubos foram designados “controle padrão MDA”.

☒ Os tubos de ensaio de número 3 em diante receberam 0,5ml (500 μ l) de cada amostra.

- ☞ Terminada a pipetagem das amostras todos os tubos foram colocados em banho-maria à temperatura de 94°C, onde permaneceram durante 1h. Um cuidado importante neste ponto a fim de se evitar perda ou contaminação das amostras com água condensada dentro aparelho de banho-maria, foi tampar cada tubo utilizando-se uma bola-de-gude.
- ☞ Após uma hora em banho-maria a 94°C as amostras foram resfriadas. Isso foi realizado deixando-as em repouso sob bancada à temperatura ambiente durante cerca de 15 minutos. Neste tempo, observou-se uma coloração transparente-límpida nos tubos 1 (controle branco) e rósea nos tubos 2 (controle padrão MDA).
- ☞ Terminado o resfriamento, acrescentou-se a cada tubo de ensaio, 4ml do reagente álcool n-Butílico.
- ☞ Os tubos foram cuidadosamente tampados com rolhas apropriadas. À seguir, o conteúdo de cada um deles, individualmente, foi misturado em agitador de tubos tipo vortex, para que houvesse a máxima extração do MDA para a fase orgânica. Não houve tempo definido para misturar a amostra, usou-se o tempo que fosse necessário para ter-se uma boa homogenização.
- ☞ Por fim, centrifugaram-se os tubos a 2500rpm durante 10 minutos.
- ☞ Ao término da centrifugação a amostra continha duas fases. Uma ao fundo, transparente e límpida e outra mais superficial de coloração mais ou menos rósea, de acordo com a quantidade de MDA na amostra. Isso indicou que houve uma boa mistura, tendo ocorrido boa extração do MDA para fase orgânica. Caso a fase ao fundo do tubo ainda apresentasse traços da cor rósea, repetia-se a agitação dos tubos no vortex e centrifugava-se novamente até que ficasse satisfatório. Entre uma fase e outra observou-se um precipitado mais sólido depositado, que foi separado pipetando-se 3ml do sobrenadante. Isto foi feito cuidadosamente na medida ser esse o material destinado à leitura em espectrofotômetro.

Leitura em Espectrofotômetro.

Realizou-se calibragem do espectrofotômetro, ajustando-o para leitura a 535nm. A seguir, zerou-se o aparelho com os tubos de ensaio número 1 (controle branco). Realizaram-se a leitura dos tubos 2 (controle padrão MDA). Esse valor foi anotado no protocolo de dosagem do MDA, pois serviu de referência para os demais resultados. Seguiu-se então a leitura de todas as amostras, com o cuidado de preencher-se os valores de absorbância de maneira correta no protocolo de dosagem do MDA.

Rotina de leitura:

- ✍ Retirou-se excesso de umidade da cubeta de espectrofotometria com algumas batidas leves de sua boca contra papel toalha em superfície rígida.
- ✍ Passou-se o conteúdo (amostra) do tubo de ensaio para cubeta de espectrofotometria.
- ✍ Limpou-se a superfície externa da cubeta com papel higiênico macio.
- ✍ Realizou-se a leitura no espectrofotômetro.
- ✍ Após anotação da leitura (absorbância), retornou-se o conteúdo da cubeta para seu respectivo tubo de ensaio. Anotou-se o valor no protocolo de dosagem do MDA. Separou-se o tubo de ensaio junto aos demais já lidos, deixou-se a cubeta escorrendo com boca virada para baixo por alguns segundos e repetiu-se o processo.

Cálculo do valor de MDA da amostra.

O valor final de MDA da amostra, em ng/ml (ou nmol/ml) foi obtido pelo emprego da seguinte fórmula:

MDA = A média x F, onde:

$$A \text{ média} = (A1+A2)/2$$

(amostras com diferenças entre Absorbância 1 e Absorbância 2 superiores a 10% foram desconsideradas).

$F = ([\text{padrão MDA}] \times 440,61) / A \text{ padrão MDA}$, como a solução padrão MDA utilizada tem concentração de 10nM temos:

$$F = 10 \times 440,61 / A \text{ padrão MDA},$$

$$F = 44,061 / A \text{ padrão MDA}$$

(lembrando que A padrão MDA foi a média, ou seja $(A1+A2)/2$ referente às amostras número 2).

APÊNDICE 2.

PROTOCOLO DE DOSAGEM DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL EM EQUIVALÊNCIA AO TROLOX

Os materiais de vidraria, equipamentos de laboratório, equipamentos de proteção individual e diversos foram os mesmos utilizados na dosagem do MDA.

O método de coleta e estocagem do plasma foi o mesmo utilizado para a dosagem do MDA. Cerca de 100µl de cada amostra é necessário para esta dosagem.

Preparo de reagentes.

Solução salina isotônica (PBS) ph7.2

Solução salina isotônica com pH7.2 foi usada como solvente no preparo de reagentes e diluição de amostras.

- ✍ 1,48g de Na₂HPO₄ (Fosfato de Sódio Dibásico)
- ✍ 0,43g de NaH₂PO₄ (Fosfato de Sódio Monobásico)
- ✍ 7g de NaCl
- ✍ H₂O destilada ----- 1 litro

Ajustou-se o ph da solução (em phmêtro) para pH 7.2, acrescentando-se Na₂HPO₄ ou ácido acético se necessário.

Solução de estoque ABTS^{•+}

A solução de estoque ABTS^{•+} foi preparada de 12 a 16h antes das dosagens. Misturou-se uma solução (A) do sal diamônio ABTS a 7mM com uma solução (B) de persulfato de potássio (K₂S₂O₈), de modo que concentração final fosse 2,45mM. O cálculo para chegar a essa concentração molar, considerando-se o preparo de 20ml (20.000 µl da solução de estoque ABTS^{•+}), foi efetuado da seguinte maneira:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$140\text{mM} \times 352\mu\text{l} = C \times 20.000\mu\text{l}$$

$$C \sim 2,45\text{mM}$$

(A) ABTS 7mM: 0,0768g ----- 20 ml de PBS

(B) $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 140mM: 0,7560g ----- 20 ml de PBS

Retirou-se com pipeta automática 352 μl da solução (A) e misturou-se a esta 352 μl da solução (B):

19,648ml de (A) + 352 μl de (B) *

* A concentração final de (B) nessa mistura é 2,45 mM

Foram preparados 20ml da solução de estoque $\text{ABTS}^{\bullet+}$. A mesma permaneceu no escuro, em temperatura ambiente, durante 12-16h para formar o radical cátion $\text{ABTS}^{\bullet+}$. O radical é estável por cerca de dois dias estocado desta forma, no escuro, à temperatura ambiente ¹⁶¹.

Solução de trabalho $\text{ABTS}^{\bullet+}$

Misturou-se a solução de estoque $\text{ABTS}^{\bullet+}$ à PBS, até que a absorbância a 734nm fosse de 0.7 ± 0.02 (o que equivale a uma concentração de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ de aproximadamente 47 μM), equilibrada a 30°C.

A expectativa calculada para conseguir-se esta leitura foi diluir 2289 μl da solução de estoque $\text{ABTS}^{\bullet+}$ em 200ml de PBS. Assim, procedeu-se do seguinte modo:

Calibrou-se o espectrofotômetro na leitura de 734nm, zerando com PBS.

Preparou-se tubo de Erlenmeyer com 200ml de PBS.

Iniciando-se com 1800 μl da solução de estoque ABTS, misturou-se ao PBS, homogeneizou-se e efetuou-se leitura do espectro. Concentrou-se ou diluiu-se a mistura até atingir valor de leitura de 0.7 ± 0.02 a 30°C.

Atingido esse valor, estava pronta a solução de trabalho $\text{ABTS}^{\bullet+}$

Solução de estoque de Trolox (2.5mM).

Preparo:

- ✍ Pesou-se em balança analítica 0,647g de trolox.
- ✍ O trolox pesado é misturado a 1l de PBS (cálculo para preparar-se 1 litro da solução de estoque de trolox 2.5mM).
- ✍ Dissolveu-se o trolox (trata-se de um sal de difícil dissolução em PBS). Colocou-se em placa agitadora magnética, turbilhonando com leve aquecimento até observar-se completa dissolução.
- ✍ Esta solução é estável por uma semana quando estocada a 4°C ou 6 meses se estocada a -20°C ⁷².

Rotina de dosagem.

As leituras em espectrofotômetro foram realizadas à temperatura ambiente de 25°C. O volume final de cada amostragem para leitura foi de 3ml (3000µl). Cada amostra de plasma foi lida em duplicata (A1 e A2), afim de assegurar-se dos resultados. Foram aceitas diferenças de até 10% entre a média das leituras A1 e A2. Para a realização da curva padrão, cada amostra de trolox foi lida em triplicata. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, a 734nm.

Preparo das soluções de trolox para construção da curva padrão:

- ✍ Separou-se seis (06) tubos de ensaio, os quais foram identificados de A a F. Foram colocados solução de estoque de trolox e PBS em cada tubo, conforme os volumes indicados na Tabela 6:

Tabela 6: Diluições do trolox para construção da curva padrão.

Tubo	Solução de Trabalho de Trolox (µl)	PBS (µl)	Concentração Final (mM de Trolox)
A	5000	0	2,5
B	4000	1000	2,0
C	3000	2000	1,5
D	2000	3000	1,0
E	1000	4000	0,5
F	0	5000	0 (branco)

Rotina de Leitura:

- ✍ Em uma cubeta colocou-se com pipeta automática 2970µl da solução de trabalho ABTS^{•+} outrora preparada. Realizou-se leitura da absorbância a 734nm e anotou-se o valor (correspondente a T0).
- ✍ Retirou-se a cubeta e, imediatamente, acrescentou-se 30µl da solução de trolox, acionando neste exato momento cronômetro digital.
- ✍ Homogenizou-se a mistura manualmente por 20 segundos e re-iniciou-se a leitura (734nm), anotando-se o valor decorridos exatos 5 minutos (correspondente a T5).
- ✍ Repetiu-se o procedimento para cada solução de trolox (tubos de A-F). As dosagens foram feitas em triplicata, anotando os resultados na ficha para construção da curva padrão da atividade antioxidante do trolox (Anexo 3). Aceitou-se diferenças de até 10% entre a média aritmética das absorbâncias de 5 minutos (T5) e os valores individuais.
- ✍ Fez-se o mesmo procedimento com as amostras biológicas estudadas. Fez-se um controle branco (com 30µl de PBS) e um padrão (com 30µl de Trolox 1mM – feito conforme o tubo D da Tabela 6). As dosagens foram feitas em duplicata, anotando os valores referentes de T0 e T5 na tabela da ficha de dosagem da capacidade antioxidante total em equivalência ao trolox (Anexo 4). Aceitou-se diferenças de até 10% entre a média aritmética das absorbâncias de 5 minutos (T5) e os valores individuais.

Cálculo dos resultados:

Definiu-se o valor médio da absorbância em T5, conforme descrito no item anterior. O cálculo da Atividade Antioxidante Total (AAT) de cada amostra, foi efetuado usando a seguinte fórmula:

$$\text{AAT} = \frac{\text{T0} - \text{T5}}{\text{T0}}$$

Calculou-se o valor corrigido da Atividade Antioxidante Total de cada amostra (AATc) subtraindo-se o valor de AAT das amostras biológicas e do Padrão do valor de AAT encontrado para o Branco:

$$\text{AATc} = \text{AAT} - \text{AAT do Branco}$$

Obs.: No caso das amostras de trolox em diferentes concentrações na construção da curva padrão, aplicou-se: $\text{AATc} = \text{AAT} - \text{AAT do tubo F}$.

Plotou-se os valores de AATc encontrados referentes ao trolox em diferentes concentrações em função da concentração final de trolox (mM) da Tabela 6. Uma curva padrão da atividade antioxidante do trolox foi assim construída, podendo ser vista na Figura 10.

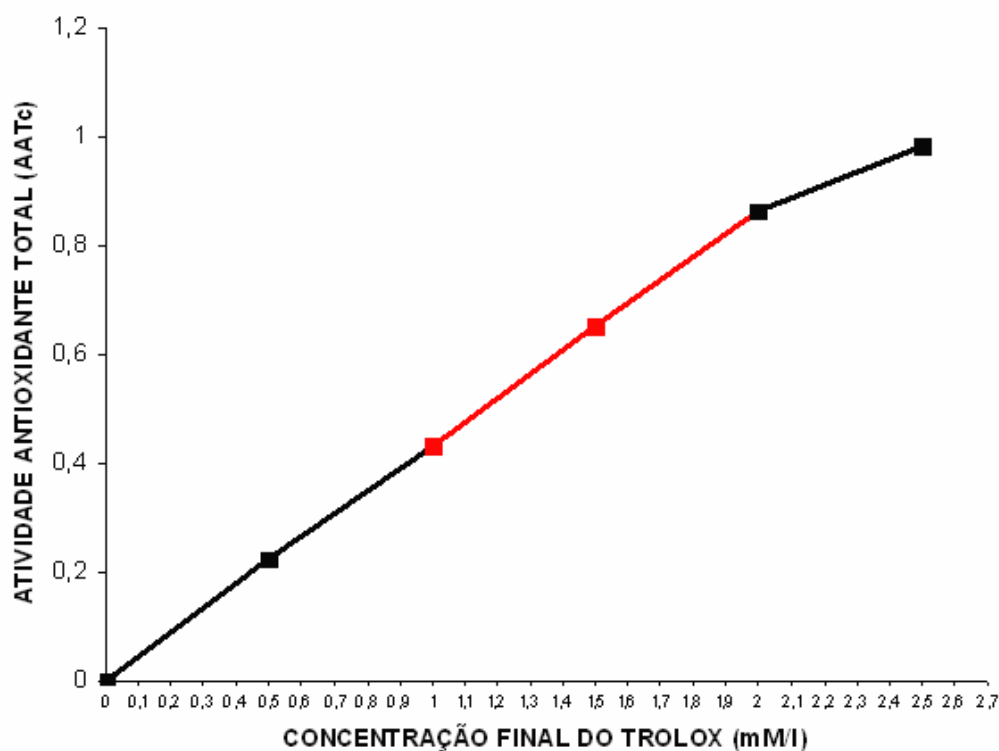


Figura 26: Curva padrão da atividade antioxidante total do trolox (AATc) em função de sua concentração final em mM/l. Condições: 2970 μ l ABTS^{•+}, 30 μ l trolox, temperatura 25°C, tempo de reação: 5 minutos. Em destaque está representada a região mais linear da curva, a qual corresponde a um percentual de inibição de aproximadamente 40-80% (AATc de 0,4 a 0,8 e concentração de 1,0 a 2,0 mM/l)¹⁶⁵. Laboratório de Investigação, FCM-UFMT, Cuiabá-MT.

Calculou-se a equação que represente a melhor reta que corresponda a região mais linear da curva da capacidade antioxidante total do trolox (AATc de 0,4 a 0,8 e concentração de 1,0 a 2,0 mM/l de trolox). Conseguiu-se as seguintes coordenadas:

x (mM/l de trolox)	y (AATc)
1,0	0,432
1,5	0,652
2,0	0,862

A equação da reta foi conseguida pela aplicação da lei dos quadrados perfeitos:

$y = b + m x$, onde:

$$m = \frac{\sum x \cdot \sum y - N \sum (x \cdot y)}{(\sum x)^2 - N \cdot \sum (x^2)}$$

$$b = \bar{y} - m \cdot \bar{x}$$

Portanto, para a curva padrão: $y = 0,0036666666666667 + 0,43x$

$$y = \mathbf{0,004 + 0,43x}$$

Calculou-se a atividade antioxidante em equivalência ao trolox das amostras biológicas usando a equação obtida da regressão linear da curva padrão, através da substituição dos valores de TAAc de cada amostra dentro da equação:

$$y = \mathbf{0,004 + 0,43x}$$
, logo

$$\text{AATc} = \mathbf{0,004 + 0,43 [\text{Trolox mM/l}]}$$
;

$$[\text{Trolox mM/l}] = \frac{\text{AATc} - \mathbf{0,004}}{}$$
;

$$\mathbf{0,43}$$

Desse modo, a fórmula final para a Capacidade Antioxidante em Equivalência ao Trolox em mM/l (TEAC) foi:

$$\text{TEAC} = \frac{\text{AA Tc} - 0,004}{0,43}$$

ANEXO 1.**FICHA DE EXPERIMENTAÇÃO:****Check-list para cada animal:****DATA:** _____ / _____ / 2005.

- ☒ Seringa/agulha de insulina com 3U (0,3ml) de Cetamina
- ☒ Seringa/agulha de insulina com 10U (1,0ml) de Água destilada ou Glutamina (ver grupo)
- ☒ Seringa/agulha de insulina com 1U (0,1ml) de Heparina - 3mg/kg, LIQUEMINE®: 1 ml=5000U=50 mg
- ☒ Seringa de 5ml "lavada" com heparina com agulha 25x7 para coleta de sangue
- ☒ 01 criotubo identificado
- ☒ 01 tubo de coleta à vácuo identificado

1. IDENTIFICAÇÃO DE GRUPO / DESCRITOR

GRUPO	DESCRITOR
C	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
G	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
S	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

ÓBITO (PERDA)**2. CONTROLE DE I-R**

- ☒ Início da Isquemia: _____ **20 MINUTOS**
- ☒ Início da Reperusão: _____ **05 MINUTOS**
- ☒ Início da Coleta de Materiais : _____

Comportamento do Animal (AnotarFR) – Valor normal no rato: 60 – 115 rpm

Tempo	ISQUEMIA	REPERFUSÃO
	FR (RPM)	FR (RPM)
05min		
10min		
15min		
20min		
05 min		

3. PEÇAS PARA BIOQUÍMICA CONVENCIONAL

ORIGEM	CHECK	DESTINO
PLASMA		TGO – TGP – LDH – LACTATO

4. PEÇAS PARA CONGELAMENTO

ORIGEM	CHECK	DESTINO
PLASMA		TEAC / MDA

OBSERVAÇÕES:

ANEXO 3.**FICHA PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DO TROLOX****Data:****Pesquisador:****Temperatura:****Horário de Início do Experimento:****Horário de Término do Experimento:**

CONCENTRAÇÃO (mM): x	T0	T5	Valor Médio		TAA	TAAc
			T0	T5		
TROLOX 2.5 (A) (STT)	A1					
	A2					
	A3					
TROLOX 2.0 (B) (4ml STT + 1ml PBS)	A1					
	A2					
	A3					
TROLOX 1.5 (C) (3ml STT + 2ml PBS)	A1					
	A2					
	A3					
TROLOX 1.0 (D) (2ml STT + 3ml PBS)	A1					
	A2					
	A3					
TROLOX 0.5 (E) (1ml STT + 4ml PBS)	A1					
	A2					
	A3					
TROLOX 0 (F) (PBS)	A1					
	A2					
	A3					

STT: Solução de Trabalho Trolox 2.5mM

TAA: $\frac{T0 - T5}{T0}$

T0

TAAc: TAA – TAA do trolox 0 (F)

Desconsiderar valores individuais que estiverem 10% acima ou abaixo da média.

ANEXO 4.**FICHA DE DOSAGEM DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL
EM EQUIVALÊNCIA AO TROLOX**

Data: _____

$$TAA = \frac{T0 - T5}{T0}$$

$$TAAc = TAA - TAA \text{ do Branco};$$

$$TEAC = \frac{TAAc - 0,004}{0,43} \times \frac{0,434}{TAAc \text{ Padrão}}$$

AMOSTRA		T0	T5	Valor Médio		TAA	TAAc	TEAC
				T0	T5			
Branco (PBS)	A1							
	A2							
Padrão (Trolox 1mM)*	A1							
	A2							
1	A1							
	A2							
2	A1							
	A2							
3	A1							
	A2							
4	A1							
	A2							
5	A1							
	A2							
6	A1							
	A2							
7	A1							
	A2							
8	A1							
	A2							
9	A1							
	A2							
10	A1							
	A2							
11	A1							
	A2							
12	A1							
	A2							
13	A1							
	A2							
14	A1							
	A2							
15	A1							
	A2							

* Trolox 1mM = 2ml Trolox 2.5mM + 3ml PBS

REFERÊNCIAS.

-
- ¹ Jastrow M. The liver in antiquity and the beginnings of anatomy. *Trans Stud Coll Physicians Phila.* 1907; 29(3):117-138.
 - ² Francavilla A, Hagiya M, Porter KA, Polimeno L, Ihara I, Starzl TE. Augmenter of liver regeneration: its place in the universe of hepatic growth factors. *Hepatology.* 1994; 20(3): 747-757.
 - ³ Pistoï S, Morello D. Liver regeneration. Prometheus' myth revisited: transgenic mice as a powerful tool to study liver regeneration. *FASEB J.* 1996; 10(8): 819-828.
 - ⁴ McClusky DA, Skandalakis LJ, Colborn GL, Skandalakis JE. Hepatic surgery and hepatic surgical anatomy: historical partners in progress. *World J Surg.* 1997; 21(3):330-342.
 - ⁵ Sandblom P. The history of portal hypertension. *J R Soc Med.* 1993; 86(9):544-546.
 - ⁶ Farges O, Leese T, Bismuth H. Pyogenic liver abscess: an improvement in prognosis. *Br J Surg.* 1988; 75(9):862-865.
 - ⁷ Thorwald J. O século dos cirurgiões. São Paulo: Hemus Livraria Editora; s/d, 1989.
 - ⁸ Pringle JH. Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. *Ann Surg.* 1908; 48(4): 541-549.
 - ⁹ Blumgart LH. Resection of the liver. *J Am Coll Surg.* 2005; 201(4):492-494.
 - ¹⁰ Cantlie J. On a new arrangement of the right and left lobes of the liver. *Anat Physiol.* 1898; 32(1):4-9.
 - ¹¹ Foster JH. History of liver surgery. *Arch Surg.* 1991; 126(3):381-387.
 - ¹² Couinaud C. Lobes et segments hépatiques: notes sur architecture anatomique et chirurgicale du foie. *Presse Méd.* 1954(1); 62:709-712.
 - ¹³ Santos CER, Ribeiro J, Rezende G. Fígado – Anatomia Cirúrgica, Pré e Pós-operatório e Técnica Operatória. [on line] Disponível na Internet via www. URL: <http://www.cirurgiaonline.com.br>. Última atualização: 2007.
 - ¹⁴ Quattlebaum JK, Quattlebaum Jr JK. Technic of hepatic lobectomy. *Ann Surg.* 1959; 149(5):648-651.
 - ¹⁵ Welch CS. A note on transplantation of the whole liver in dogs. *Transplant Bull.* 1955; 2(1):54-55.
 - ¹⁶ Starzl TE, Kaupp HAJr, Brock DR, Lazarus RE, Johnson, RV. Reconstructive problems in canine liver homotransplantations with special reference to the postoperative role of hepatic venous flow. *Surg Gynecol Obstet.* 1960; 111(1):733-743.

-
- ¹⁷ Moore FD, Wheeler HB, Demissianos HV, Smith LL, Balankura O, Abel K, Greenberg JB, Dammin GJ. Experimental whole organ transplantation of the liver and the spleen. *Ann Surg.* 1960; 152(3):374-385.
- ¹⁸ Starzl TE, Demetris AJ. Liver transplantation: a 31-year experience, part I. *Curr Probl Surg.* 1990; 27(1):116-119.
- ¹⁹ Ryckman FC, Flake AW, Fisher RA, Tchervenkov JI, Pedersen SH, Balisteri WF. Segmental orthotopic hepatic transplantation as a means to improve patient survival and diminish waiting-list mortality. *J Pediatr Surg.* 1991; 26(4):422-427.
- ²⁰ Adam R, McMaster P, O'Grady JG, Castaing D, Klempnauer JL, Jamieson N, Neuhaus P, Lerut J, Salizzoni M, Pollard S, Muhlbacher F, Rogiers X, Garcia Valdecasas JC, Berenguer J, Jaeck D, Moreno Gonzalez E European Liver Transplant Association. Evolution of liver transplantation in Europe: report of the European Liver Transplant Registry. *Liver Transpl.* 2003; 9(12):1231-1243.
- ²¹ Azagra JS, Gowergen M, Gilbert E, Jacobs D. Laparoscopic anatomical left lateral segmentectomy – technical aspects. *Surg Endosc.* 1996; 10(7):758-761.
- ²² D'Albuquerque LAC, Herman P. Laparoscopic liver resection: is it a reality? *Arq Gastroenterol.* 2006; 43(3): 243-246.
- ²³ Vibert E, Kouider A, Gayet B. Laparoscopic anatomic liver resection. *HPB.* 2004; 6(4):222-229.
- ²⁴ De Weese JA, Leather R, Porter J. Practice guidelines: lower extremity revascularization. *J Vasc Surg.* 1993; 18(2):280-294.
- ²⁵ Szabo C, Zingarelli B, Salzman AL. Role of poly-ADP ribosyltransferase activation in the vascular contractile and energetic failure elicited by exogenous and endogenous nitric oxide and peroxynitrite. *Circ Res.* 1996; 78(6): 1051-1063.
- ²⁶ Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull.* 2004; 19(70):71-86.
- ²⁷ Francisco-Neto A, Silva JC, Fagundes DJ, Percario S, Novo NF, Juliano Y, Moreira Neto AA. Oxidative alterations, total antioxidant status and nitric oxide study in rats submitted to ischemia and reperfusion of hind limbs. *Acta Cir Bras.* 2005; 20(2):134-139.
- ²⁸ Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg.* 1994; 81(5):637-647.
- ²⁹ Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand.* 1986; 548(Suppl.):47-63.
- ³⁰ Halliwell B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol.* 1989; 70(6):737-757.

-
- ³¹ Felipe-Jr J, Percario S. Radicais livres em medicina intensiva. *Rev Bras Terap Int.* 1991; 3(3):66-72.
- ³² Cymrot M, Percario S, Ferreira LM. Oxidative stress and total antioxidant status in ischemic skin flaps in rats. *Acta Cir Bras.* 2004; 19(1):18-26.
- ³³ Lucchesi BR. Complement, neutrophils and free radicals: mediators of reperfusion injury. *Arzneimittelforschung.* 1994; 44(3):420-432.
- ³⁴ Campos EBP, Yoshida WB. The role of free radicals in the pathophysiology of ischemia and reperfusion in skin flaps: experimental models and treatment strategies. *J Vasc Br.* 2004; 3(4): 357-366.
- ³⁵ Schmid-Schönbein GW. The damaging potential of leukocyte activation in the microcirculation. *Angiology.* 1993; 44(1):45-56.
- ³⁶ Da-Silveira M, Yoshida WB. Ischemia and reperfusion in skeletal muscle injury mechanisms and treatment perspectives. *J Vasc Br.* 2004; 3(4): 367-378.
- ³⁷ Augustin AJ, Goldstein RK, Milz J, Lutz J. Influence of anti-inflammatory drugs and free radical scavengers on intestinal ischemia induced oxidative tissue damage. *Adv Exp Med Biol.* 1992; 316(1):239-251.
- ³⁸ Percário S. Dosagem do malondialdeído. *Newslab.* 2004; 6(1):46-50.
- ³⁹ Hinder RA, Stein HJ. Oxygen-derived free radicals. *Arch Surg.* 1991; 126(1): 104-105.
- ⁴⁰ Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg.* 1991; 78(6):651-655.
- ⁴¹ Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956; 11(3):298-300.
- ⁴² Del-Maestro RF. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand.* 1980; 492(Suppl.):153-168.
- ⁴³ Jordão-Jr AA, Chiarelo PG, Bernardes MSM, Vannucchi H. Peroxidação lipídica e etanol: o papel da glutatona reduzida e da vitamina E. *Medicina, Ribeirão Preto.* 1998; 31(1):323-338.
- ⁴⁴ Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM. Free radicals: basic concepts concerning their chemistry, pathophysiology, and relevance to plastic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 1987; 79(6):990-997.
- ⁴⁵ Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras.* 1997; 43(1):61-68.

-
- ⁴⁶ Bedwall RS, Nair N, Sharma MP, Mathur RS. Selenium: its biological perspectives. *Med Hypotheses*. 1993; 41(2):150-159.
- ⁴⁷ Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell WW. *Harper's Biochemistry*. McGraw-Hill Publishing Co. 1999.
- ⁴⁸ Halliwell B. Biochemical mechanisms accounting for the toxic action of oxygen on living organism. The key role of superoxide dismutase. *Cell Bio Int Rep*. 1978; 2(2):113-128.
- ⁴⁹ Jacob RA. The integrated antioxidant system. *Nutr Res*. 1995; 15(5): 755-766.
- ⁵⁰ Paterson IS, Klausner JM, Goldman G, Pugatch R, Feingold H, Allen P, Mannick JA, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pulmonary edema after aneurysm surgery is modified by mannitol. *Ann Surg*. 1989; 210(6):796-801.
- ⁵¹ Haramaki N, Aggarwal S, Kawabata T, Droy-Lefaix MT, Packer L. Effects of natural antioxidant ginkgo biloba extract (EGB 761) on myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med*. 1994;16(6):789-94.
- ⁵² Günel E, Çaglayan O, Dilsiz A, Duman S, Aktan M. Treatment of intestinal reperfusion injury using antioxidative agents. *J Ped Surg*. 1998; 33(10):1536-1539.
- ⁵³ Evans MA, Shronts EP. Intestinal fuels: glutamine, short-chain fatty acids, and dietary fiber. *J Am Diet Assoc*. 1992; 92(10):1239-1246.
- ⁵⁴ Souba WW, Smith RJ, Wilmore DW. Glutamine metabolism by the intestinal tract. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1985; 9(5):608-617.
- ⁵⁵ Murad JC. Hormônio do crescimento associado à dieta rica em glutamina na síndrome do intestino curto em ratos. Dissertação de Mestrado - Escola Paulista de Medicina. São Paulo (SP). 1996.
- ⁵⁶ Aguilar-Nascimento JE, Gurgel Marques C, Carvalho Mariano A, Salomao AB, Neves JS. Benefits of intraluminal injection of glutamine for intestinal mucosa during ischemia-reperfusion. *Eur Surg Res*. 2003; 35(4):352-356.
- ⁵⁷ Rice-Evans CA, Diplock AT, Symons MCR. *Techniques in free radical research*. Elsevier. 1991.
- ⁵⁸ Percário S. Dosagem das LDLs modificadas através da peroxidação lipídica: correlação com o risco aterogênico. *Arquivos Médicos*. 1993; 13(49):07-09.
- ⁵⁹ Miller N, Rice-Evans C, Davies M, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)*. 1993; 84(4):407-412.
- ⁶⁰ Wilson K, Walker J. *Principles and techniques in practical biochemistry*. Cambridge University Press. 2000.

-
- ⁶¹ Huguet C, Addario-Chieco P, Gavelli A. Technique of hepatic vascular exclusion for extensive liver resection. *Am J Surg.* 1992; 163(6): 602–605.
- ⁶² Henderson JM. Liver transplantation and rejection: an overview. *Hepatogastroenterol.* 1999; 46(2):1482-1484.
- ⁶³ Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg.* 2001; 181(2):160-166.
- ⁶⁴ Marzi I, Takei Y, Ruker M. Endothelin-1 is involved in hepatic sinusoidal vasoconstriction after ischemia and reperfusion. *Transplant Int.* 1994; 7(1):503–506.
- ⁶⁵ Ishizaki Y, Yoshimoto J, Miwa K, Sugo H, Kawasaki S. Safety of prolonged intermittent Pringle maneuver during hepatic resection. *Am Med Ass.* 2006; 141(7): 649-653.
- ⁶⁶ Adam R, Reynes M, Johann M. The outcome of steatotic grafts in liver transplantation. *Transplant Proc.* 1991; 23(2):1538–1540.
- ⁶⁷ Carles J, Fawaz R, Hamoudi NE. Preservation of human liver grafts in UW solution. Ultrastructural evidence for endothelial and Kupffer cell activation during cold ischemia and after ischemia-reperfusion. *Liver.* 1994; 14(1):50-56.
- ⁶⁸ Borghi-Scoazec G, Scoazec JY, Durand F. Apoptosis after ischemia-reperfusion in human liver allografts. *Liver Transplant Surg.* 1997; 3(4):407-15.
- ⁶⁹ Marubayashi S, Dohi K, Ochi K, Kawasaki T. Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury: prevention of damage by alpha-toco-pherol administration. *Surgery.* 1986; 99(2):184–192.
- ⁷⁰ Post S, Palma P, Rentsch M. Effects of warm Carolina rinse and University of Wisconsin solutions on microcirculation, leukocyte adhesion, Kupffer cell activity, and biliary excretion after liver transplantation. *Hepatology,* 1993; 18(1):1490-1497.
- ⁷¹ Benzoni E, Cojutti A, Lorenzin D, Adani GL, Baccarani U, Favero A, Zompicchiati A, Bresadola F, Uzzau A. Liver resective surgery: a multivariate analysis of postoperative outcome and complication. *Langenbecks Arch Surg.* 2007;392(1):45-54.
- ⁷² Camargo LM, Neto JE, Freitas SH, Simões MJ, Gomes PO, Sébe AA. Aspectos ultra-estruturais das vilosidades intestinais após o clampeamento do pedículo hepático de ratos. *Acta Cir Bra.* 2003; 18(6): 509-513.
- ⁷³ Câmara-Neto RD, Coelho ARB, Souza AP, Ferraz EM, Santos Folho EC, Câmara-Neto JB. Um novo modelo para estudos sobre lesão de isquemia e reperfusão hepáticas em cães. *Acta Cir. Bras.* 2000; 15(2): 124-132.
- ⁷⁴ Ribeiro ME, Yoshida WB. Lesões intestinais decorrentes de isquemia e reperfusão: fisiopatologia e modelos experimentais. *J Vasc Br.* 2005; 4(2): 183-94.

-
- ⁷⁵ Schanaider A, Madi K, Japiassú RM, Considera D, Leite GS. Free oxygen radicals scavengers in visceral ischemia and reperfusion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 1(1):207-210.
- ⁷⁶ Schanaider A, Silva PC. Uso de animais em cirurgia experimental. *Acta Cir Bras*. 2004; 19(4):441-447.
- ⁷⁷ Derry CD, Slapak M. Proceedings: a new model for acuted failure. *Br J Surg*. 1973; 60(11):901-902.
- ⁷⁸ Gonçalves Y, Machado MMC, Gonçalves EL. Isquemia hepática e glicogênio: estudo experimental. *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo*. 1979; 34(1):74-79.
- ⁷⁹ Frederiks WM, James J, Bosch KS, Schröder MJR, Schuyt HC. A model for provoking ischemic necrosis in rat liver. Parenchyma and its quantitative analysis. *Exp Pathol*. 1982; 22(4):245-252.
- ⁸⁰ Frederiks WM, Myagkaya GL, Bosch KS, Fronik GM, Veen HV, Vogels IMC, James J. The value of enzyme leakage for the prediction of necrosis in liver ischemia. *Histochemistry*. 1983; 78(4):459-472.
- ⁸¹ Frederiks WM, Myagkaya GL, Veen HAV. Biochemical and ultrastructural changes in rat liver plasma membranes after temporary ischemia. *Virchows Arch Cell Pathol*. 1984; 46(4): 269-282.
- ⁸² Asakawa H, Jeppson B, Mack P, Hultberg B, Hägerstrand I, Bengmark S. Acute ischemic liver failure in the rat: a reproducible model not requiring portal decompression. *Eur Surg Res*. 1989; 21(1): 42-48.
- ⁸³ Shibayama YY, Asaka S, Nishijima A. Mechanism of liver injury following ischemia. *Exp Mol Pathol*. 1991; 55(3): 251-60.
- ⁸⁴ Isozaki H, Adam R, Gigou M, Szekely AM, Shen M, Bismuth H. Experimental study of the protective effect of intermittent hepatic pedicle clamping in the rat. *Br J Surg*. 1992; 79(4): 310-313.
- ⁸⁵ Isozaki H, Okajima K, Kobayashi M, Szekely AM, Akimoto H. Experimental study of liver injury after partial hepatectomy with intermittent or continuous hepatic vascular occlusion. *Eur Surg Res*. 1995; 27(5): 313-322.
- ⁸⁶ Gonce ME, Brackett DJ, Squires RA, Gibson DD, Balla AK, Lerner MR, McCay PB, Pennington LR. A new model for inducing total hepatic ischemia while preventing circulatory collapse: secondary to splanchnic vascular congestion. *Schock*. 1995; 3(6):440-446.
- ⁸⁷ Camargo LM, Evêncio-Neto J, Freitas SH, Simões MJ, Gomes PO, Sébe AA. Ultrastructural aspects of the intestinal villi after hepatic pedicle clamping in rats. *Acta Cir Bras*. 2003; 18(6):542-544.

-
- ⁸⁸ Sébe AA, Nigro AJT, Gomes PO, Simões MJ. Efeitos do Clampeamento do Pedículo Hepático nos Intestinos. *Acta Cir Bras.* 2000; 15(1): 4-8.
- ⁸⁹ Horton JW, Walker PB. Oxygen radicals lipid peroxidation, and permeability changes after intestinal ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol.* 1993; 74(1):1515-1520.
- ⁹⁰ Quaresma AB, D'Acampora AJ, Tramonte R, Farias DC, Joly FS. Histological study of the liver and biochemistry of the blood of Wistar rats following ligation of right hepatic duct. *Acta Cir. Bras.* 2007; 22(1):68-78.
- ⁹¹ Pompili M, Rapaccini GL, Covino M, Pignataro G, Caturelli E, Siena DA, Villani MR, Cedrone A, Gasbarrini G. Prognostic factors for survival in patients with compensated cirrhosis and small hepatocellular carcinoma after percutaneous ethanol injection therapy. *Cancer.* 2001; 92(1):126-135.
- ⁹² Silva-Jr OC, Centurion S, Pacheco EG, Brisotti JL, Oliveira AF, Sasso KD. Basic aspects of the ischemia reperfusion injury and of the ischemic preconditioning. *Acta Cir. Bras.* 2002; 17(1):96-100.
- ⁹³ Boin IFSF. Atuação do WEB 2086 como inibidor da ação do fator de ativação plaquetária (PAF) em ratos wistar submetidos à isquemia hepática seletiva normotérmica e reperfusão. Tese de doutorado – Universidade de Campinas. Campinas (SP). 1997.
- ⁹⁴ Bulkley GB. Preconditioning for protection from ischemia injury: Discriminating cause from the effect from epiphenomenon *Ann Surg.* 2000; 23(2):163-165.
- ⁹⁵ Clavien PA, Yadav S, Sindram D. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg* 2000; 23(2):155-162.
- ⁹⁶ James JH. Lactate is an unreliable indicator of tissue hypoxia in injury or sepsis. *Lancet.* 1999; 354(9177):505-508.
- ⁹⁷ Vincent JL. *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine.* Springer-Verlag. 1988.
- ⁹⁸ Vincent JL. Serial blood lactate levels can predict the development of multiple organ failure following septic shock. *Am J Surg.* 1996; 171(2):221-226.
- ⁹⁹ Totaro R. Epinephrine-induced lactic acidosis following cardiopulmonary bypass. *Crit Care Med.* 1997; 25(10):1693-1699.
- ¹⁰⁰ Day NP, Phu NH, Bethell DP, Mai NT, Chau TT, Hien TT, White NJ. The effects of dopamine and adrenaline infusions on acid-base balance and systemic haemodynamics in severe infection. *Lancet.* 1996; 348(9022):219-223.
- ¹⁰¹ Romansky SA, McMahon MM. Metabolic acidosis and thiamine deficiency. *Mayo Clin Proc.* 1999; 74(3):259-263.
- ¹⁰² Rabbat A, Laaban JP, Boussairi A, Rochemaure J. Hyperlactatemia during acute severe asthma. *Intensive Care Med* 1998, 24(4):304-312.

-
- ¹⁰³ Oliveira ES, Guimarães SB, Gadelha DD, Araújo Filho AM, Vasconcelos PRL. Metabolic alterations, in vivo, induced by bilateral carotid artery occlusion upon the blood and eye tissue of Wistar rats. *Acta Cir Bras.* 2003; 18(4):308-313.
- ¹⁰⁴ Sorlie D, Huseby NE, Kluge T. Ischaemia during arterial reconstructive surgery: biochemical changes as reflected in popliteal vein samples. *Scand J Thorac Cardiovasc Surg.* 1977; 8(1):111-151.
- ¹⁰⁵ Kudsk KA, Stone JM, Carpenter G. Enteral and parenteral feeding influences mortality after hemoglobin E.coli peritonitis in normal rats. *J. Trauma.* 1983; 23(7):605-609.
- ¹⁰⁶ Gregory MS, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World J. Surg.* 1996; 20(4):411-417.
- ¹⁰⁷ Roberfroid MB. Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties. *Br J Nutr.* 1998; 80(4):197-202.
- ¹⁰⁸ Lacey JM, Wilmore DW. Is glutamine a conditionally essential amino acid? *Nutr. Rev.* 1990; 48(8):297-309.
- ¹⁰⁹ Hartmann F, Plauth M. Intestinal glutamine metabolism. *Metabolism.* 1989; 38(8):18-24.
- ¹¹⁰ Meister A. Metabolism of glutamine. *Physiol. Rev.* 1956; 36(1):103-127.
- ¹¹¹ Hall JC, Hell K, McCauley R. Glutamine. *Br. J. Surg.* 1996; 83(3):305-312.
- ¹¹² Bulus N, Cersosimo E, Ghisham F, Abumrad NW. Physiologic importance of glutamine. *Metabolism.* 1989; 38(8):1-5.
- ¹¹³ Marchini JS, Vanucchi H, Souza DA, Dutra-de-Oliveira JE. Uso clínico da glutamina. *Rev Nutr.* 1997; 4(2):10-17.
- ¹¹⁴ Ncnurlan MA, Garlick PJ. Influence of nutrient intake on protein turnover. *Diabetes Metab Rev.* 1989; 5(2):165-189.
- ¹¹⁵ Penn D, Lebenthal E. Intestinal mucosa energy metabolism - A new approach to therapy of gastrointestinal disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1990; 10(1):111-114.
- ¹¹⁶ Boza JJ, Maire JC, Bovetto L, Ballèvre O. Plasma glutamine response to enteral administration of glutamine in human volunteers (free glutamine versus protein-bound glutamine). *Nutrition.* 2000; 16(12):1037-1042.
- ¹¹⁷ Helton WS, Smith RJ, Rounds J, Wilmore DW. Glutamine prevents pancreatic atrophy and fatty liver during elemental feeding. *J Surg Res.* 1990; 48(4):297-303.
- ¹¹⁸ Hammarqvist F, Wenerman J, Ali R, Von Der Decken A, Vinnars E. Addition of glutamine to total parenteral nutrition after elective abdominal surgery spares free glutamine

in muscle, counteracts the fall in muscle protein synthesis, and improves nitrogen balance. *Ann Surg.* 1989; 209(4):455-461.

¹¹⁹ Platell C, McCauley R, McCulloch R, Hall J. Influence of glutamine and branched chain amino acids on the jejunal atrophy associated with parenteral nutrition. *J Gastroenterol Hepatol.* 1991; 6(4):345-349.

¹²⁰ Hartmann F, Raible A, Plauth M, Bauder D, Veuillardbaron D. Glutamine-dependence of rat enterocyte functions as assessed in cell cultures. *Clin Nutr.* 1991; 10(2):125-127.

¹²¹ Souba WW, Herskowitz K, Salloum RM, Chen MK, Austgen TR. Gut glutamine metabolism. *JPEN.* 1990; 14(5):45S-50S.

¹²² Moore EE, Jones TN. Benefits of immediate jejunostomy feeding after major abdominal trauma-a-prospective, randomized study. *J Trauma.* 1986; 26(10):874-881.

¹²³ McAnena OJ, Moore FA, Moore EE, Jones TN, Parsons P. Selective uptake of glutamine in the gastrointestinal tract: confirmation in a human study. *Br J Surg.* 1991; 78(4):480-482.

¹²⁴ Vernon DR, Hill GL. The relationship between tissue loss and function: recent developments. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 1998; 1(1):5-8.

¹²⁵ Dinarello CA. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. 1984; 311(22):1413-1418.

¹²⁶ Askanazi J, Carpentier YA, Michelsen CB, Elwyn DH, Fürst P, Kantrowitz LR, Gump FE, Kinney JM. Plasma amino acids following injury. Influence of intercurrent infection. *Ann. Surg.* 1980, 192(1):78-85.

¹²⁷ Claeysens S, Bouteloup D, Emange C, Gachon P, Hecketsweiler B, Lerebours E, Lavoigne A, Déchelotte P. Effect of enteral glutamine on leucine, phenylalanine and glutamine metabolism in hypercortisolemic subjects. *Am J Physiol.* 2000; 278(5):E817-E824.

¹²⁸ Hammarqvist F, Von Der Decken A, Vinnars E, Wernerman J. Stress hormone and amino acid infusion in healthy volunteers: short-term effects on protein synthesis and amino acid metabolism in skeletal muscle. *Metabolism.* 1994; 43(9):1158-1163.

¹²⁹ Hiramatsu T, Cortiella J, Marchini JS, Chapman TE, Young VR. Source and amount of dietary nonspecific nitrogen in relation to whole-body leucine, phenylalanine, and tyrosine kinetics in young men. *Am J Clin Nutr.* 1994; 59(6):1347-1355.

¹³⁰ Ziegler TR, Smith RJ, Byrne TA, Wilmore DW. Potential role of glutamine supplementation in nutrition support. *Clin Nutr.* 1993; 12(1):S82-S90.

¹³¹ Adibi SA, Paleos GA, Morse EL. Influence of molecular structure on half-life and hydrolysis of dipeptides in plasma: Importance of glycine as N-terminal amino acid residue. *Metabolism.* 1986; 35(9):830-836.

-
- ¹³² Abumrad NN, Morse EL, Lochs H, Williams PE, Adibi SA. Possible sources of glutamine for parenteral nutrition: impact on glutamine metabolism. *AJP – Endocrinology and Metabolism*. 275(2):228-234.
- ¹³³ Lima NL, Soares AM, Mota RMS, Monteiro HSA, Guerrant RL, Lima AAM. Wasting and intestinal barrier function in children taking alanyl-glutamine supplemented enteral formula. *J Pediatric Gastroenterol Nutr*. 2007; 44(3):365-374.
- ¹³⁴ Souba WW. Nutrition support. *New Engl J Med*. 1997; 336(1):41-48.
- ¹³⁵ Souba WW. Glutamine: a key substrate for the splanchnic bed. *Annu Rev Nutr*. 1991; 11(1):285-308.
- ¹³⁶ Salvalaggio PRO, Campos AC. Bacterial translocation and glutamine. *Nutrition*. 2002; 18(5):435-436.
- ¹³⁷ Cunha DF. Efeito da glutamina na mucosa ileal e na translocação intestinal de *Candida albicans* após trauma térmico em ratos eutróficos ou subnutridos. Tese de doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto-SP. 1994.
- ¹³⁸ Salvalaggio PRO, Neto CZ, Tolazzi ARD, Gasparetto EL, Coelho JCU, Campos ACL. Oral glutamine does not prevent bacterial translocation in rats subjected to intestinal obstruction and *Escherichia coli* challenge but reduces systemic bacteria spread. *Nutrition*. 2002; 18(4):334-337.
- ¹³⁹ Millward DJ, Jepson MM, Omer A. Muscle glutamine concentration and protein turnover in vivo in malnutrition and in endotoxemia. *Metabolism*. 1989; 38(8): 6-13.
- ¹⁴⁰ Aguilar-Nascimento JE. The role of macronutrients in gastrointestinal blood flow. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2005; 8(5):552-556.
- ¹⁴¹ Martensson J, Lai JC, Meister A. High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87(18):7185-7189.
- ¹⁴² Harward RST, Coe D, Souba WW, Klingman N, Seeger JM. Glutamine preserves gut glutathione levels during intestinal ischemia/reperfusion. *J Surg Res*. 1994; 56(4):351-55.
- ¹⁴³ Yasuhara M. L-glutamine-induced heme oxygenase-1 protects small intestine from warm ischemia and reperfusion injury in the rat. *Hokkaido Igaku Zasshi*. 2001; 76(1):21-34.
- ¹⁴⁴ Kozar RA, Schultz SG, Bick RJ. Enteral glutamine but not alanine maintains small bowel barrier function after ischemia/reperfusion injury in rats. *Shock*. 2004; 21(1):433-437.
- ¹⁴⁵ Kozar RA, Schultz SG, Hassoun HT, Desoignie R, Weisbrodt NW, Haber MM, Moore FA. The type of sodium-coupled solute modulates small bowel mucosal injury, transport function, and ATP after ischemia/reperfusion injury in rats. *Gastroenterology*. 2002; 123(3):810-816.

-
- ¹⁴⁶ Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, Meissner H, Michl P, Leiderer R, Schildberg FW, Messmer K, Bilzer M. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after prolonged warm ischemia. *Ann Surg.* 2004; 239(2):220-31.
- ¹⁴⁷ Bilzer M, Baron A, Schauer R, Steib C, Ebensberger S, Gerbes AL. Glutathione treatment protects the rat liver against injury after warm ischemia and Kupffer cell activation. *Digestion.* 2002; 66(1):49-57.
- ¹⁴⁸ Bilzer M, Paumgartner G, Gerbes AL. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after hypothermic preservation. *Gastroenterology.* 1999; 117(1):200-210.
- ¹⁴⁹ Jia CJ, Dai CL, Zhang X, Cui K, Xu F, Xu YQ. Alanyl-glutamine dipeptide inhibits hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol.* 2006; 12(9):1373-1378.
- ¹⁵⁰ Noh J, Behrends M, Choi S, Bedolli MA, Yardi J, Hirose R, Niemann CU. Glutamine does not protect against hepatic warm ischemia/reperfusion injury in rats. *J Gastrointest Surg.* 2006; 10(2):234-239.
- ¹⁵¹ McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.* 1985; 312(1):159-163.
- ¹⁵² Koyama I, Bulkley GB, Williams GM, Michael JL. The role of oxygen free radicals in mediating the reperfusion injury of cold-preserved ischemic kidneys. *Transplantation.* 1985; 40(1):590-595.
- ¹⁵³ Kobayashi M, Takeyoshi I, Yoshinari D, Matsumoto K, Morishita Y. The role of mitogen-activated protein kinases and the participation of intestinal congestion in total hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatology.* 2006; 53(68):243-248.
- ¹⁵⁴ Sankary HN, Yin DP, Chong AS, Ma LL, Blinder L, Shen JK, Foster P, Liu LP, Li C, Williams JW. The portosystemic shunt protects liver against ischemic reperfusion injury. *Transplantation.* 1999; 68(7):958-963.
- ¹⁵⁵ Pimenta MBP, Aguilar-Nascimento JE, Martins DC, Silva DR; Bacelo KL, Bocchese IC, Zaffani S, Zaffani E, Silveira EAO, Carmo AV, Ferreira SSS. The intestinal tract as the major source of interleukin 6 production during abdominal aortic clamping and hind limb ischaemia-reperfusion injury. *Acta Cir Bras.* 2007; 22(Suppl.):34-39.
- ¹⁵⁶ Melis GC, Ter Wengel N, Boelens PG, Van Leeuwen PA. Glutamine: recent developments in research on the clinical significance of glutamine. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2004; 7(1):59-70.
- ¹⁵⁷ Lagranha CJ, de Lima TM, Senna SM, Doi SQ, Curi R, Pithon-Curi TC. The effect of glutamine supplementation on the function of neutrophils from exercised rats. *Cell Biochem Funct.* 2005; 23(2):101-107.

-
- ¹⁵⁸ Reeves PG, Nielsen FR, Fahey Jr GC. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Reports of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diets. *J Nutr.* 1993; 123(1): 1939-1951.
- ¹⁵⁹ Percário S. Alterações oxidativas e da defesa antioxidante no broncoespasmo agudo induzido em cobaias. Tese de Doutorado – UNIFESP-EPM. São Paulo-SP. 2000.
- ¹⁶⁰ Miller N, Rice-Evans C. Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox Rpt.* 1996, 2(1):161-171.
- ¹⁶¹ Gutmann I, Wahlefeld AW. *L(+)-Lactate*: determination with lactic dehydrogenase and NAD. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie Academic Press. 1974; 3(1):1452-1456.
- ¹⁶² Uchiyama M e Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Biochem.* 1978, 86(1):271-278.
- ¹⁶³ Re R, Pellegrini R, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad Biol Med.* 1999; 26(1):1231-1237.
- ¹⁶⁴ Salomão AB, Aguilar-Nascimento JE, Percário S, Sano V, Marques NR, Dias CCGO. Intestinal intraluminal injection of glutamine increases trolox total equivalent antioxidant capacity (TEAC) in hepatic ischemia-reperfusion. *Acta Cir Bras.* 2006; 21(Suppl 4):69-73.
- ¹⁶⁵ Rice-Evans C, Miller N. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol.* 1994; 234(1):279-293.
- ¹⁶⁶ Filho UD. *Introdução à bioestatística*. Editora Negócio. 1999.
- ¹⁶⁷ Alves MA, Guimarães SB, Dias DA, Vasconcelos PRC, Coelho VPM, Vasconcelos PRL. Effects of *L*-alanyl-glutamine upon the blood and kidney biochemical parameters in the rat hind limb model of ischemia/reperfusion. *Acta Cir Bras.* 2005; 20(6):445-449.
- ¹⁶⁸ Torres JMS, Guimarães SB, Vasconcelos PRL, Martins MCR, Chaves CR, Vasconcelos PRC. Efeitos metabólicos da *L*-alanil-glutamina em ratos submetidos à isquemia da pata traseira esquerda seguida de reperfusão. *Acta Cir Bras.* 2003; 18(1):2003-39.
- ¹⁶⁹ Starzl TE, Gordon RD, Tzakis AG, Todo S. Transplante do fígado. In: SABISTON DC. (ed.) *Tratado de Cirurgia: as bases biológicas da prática cirúrgica moderna*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 1993; 14(1):399-408.
- ¹⁷⁰ Nery JR, Jacque J, Weppler D, Casella J, Luque C, Siquijor A, Thompson J, Ruiz P, Khan F, Webb M, Tzakis A. Routine use of the piggyback technique in pediatric orthotopic liver transplantation. *J Pediatr Surg.* 1996; 31(1):1644-1647.
- ¹⁷¹ Deitch EA, Berg R, Specian R. Endotoxin promotes the translocation of bacteria from the gut. *Arch Surg.* 1987; 122(1):185-190.

-
- ¹⁷² Starzl TE, Bernhard VM, Benvenuto R, Cortes N. A new method for one-stage hepatectomy for dogs. *Surgery*. 1959; 46(1):880-886.
- ¹⁷³ Suminoto R, Southard JH, Belzer FO. Livers from fasted rats acquire resistance to warm and cold ischemia injury. *Transplantation*. 1993; 55(1):728-733.
- ¹⁷⁴ Urata K, Nguyen B, Brault A, Lavoie J, Rocheleau B, Huet PM. Decreased survival in rat liver transplantation with extended cold preservation: role of portal vein clamping time. *Hepatology* 1998; 28(1):366-371.
- ¹⁷⁵ Souba WW, Smith RJ, Wilmore DW. Glutamine metabolism by the intestinal tract. *JPEN J Parent Enter Nutr* 1985; 9(1):608-616.
- ¹⁷⁶ Souba WW, Herskowitz K, Austgenm TR, Chen MK, Salloum RM, Glutamine nutrition: theoretical considerations and therapeutic impact. *JPEN J Parent Enter Nutr* 1990; 14(1):37-42.
- ¹⁷⁷ Pinkus LM, Windmueller HG. Phosphate-dependent glutaminase of small intestine: localization and role in glutamine metabolism. *Arch Biochem Biophys* 1977; 182(1):106-117.
- ¹⁷⁸ Kong S, Hall JC, Cooper D, McCauley RD. Starvation alters the activity and mRNA level of glutaminase and glutamine synthetase in the rat intestine. *J Nutr Biochem*. 2000; 11(1):393-400.
- ¹⁷⁹ Sukhotnik I, Khateeb K, Mogilner JG, Helou H, Lurie M, Coran AG, Shiloni E. Dietary glutamine supplementation prevents mucosal injury and modulates intestinal epithelial restitution following ischemia-reperfusion injury in the rat. *Dig Dis Sci*. 2007; Apr 3: [Epub ahead of print].
- ¹⁸⁰ Wilmore DW. The effect of glutamine supplementation in patients following elective surgery and accidental injury. *J Nutr* 2001; 131(9 Suppl):2543S-2549S.
- ¹⁸¹ Albertini SM, Ruiz MA. O papel da glutamina na terapia nutricional do transplante de medula óssea. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2001; 23(1): 41-47.
- ¹⁸² Ziegler TR, Evans ME, Fernandez-Estivariz C, Jones DP. Trophic and cytoprotective nutrition for intestinal adaptation, mucosal repair, and barrier function. *Annu Rev Nutr* . 2003; 23(1):229-261.
- ¹⁸³ Boelens PG, Houdijk AP, Thouars HN, Teerlink T, Engeland MI, Haarman HJ, VanLeeuwen PA. Plasma taurine concentrations increase after enteral glutamine supplementation in trauma patients and stressed rats. *Am J Clin Nutr*. 2003; 77(1):250-256.
- ¹⁸⁴ Suh GJ, Youn YK, Song HG. The effect of glutamine on inducible nitric oxide synthetase gene expression in intestinal ischaemia-reperfusion injury. *Nutr Res* 2003; 23(1):131-140.
- ¹⁸⁵ Harward TR, Coe D, Souba WW, Klingman N, Seeger JM. Glutamine preserves gut glutathione levels during intestinal ischemia/reperfusion. *J Surg Res*. 1994; 56(1):351-355.

-
- ¹⁸⁶ Griffiths RD, Andrews F. Glutamine: a life-threatening deficiency in the critically ill? *Intensive Care Med.* 200; 27(1):12-55.
- ¹⁸⁷ Barbosa RCC, Guimarães SB, Vasconcelos PRC, Chaves CR, Vasconcelos PRL. Metabolic effects of L-alanyl-glutamine in burned rats. *Burns.* 2006; 32(1): 721-727.
- ¹⁸⁸ Heyland DK, Dhaliwal R, Day AG, Muscedere J, Drover J, Suchner U, Cook D. Reducing deaths due to oxidative stress (the REDOXS study): rationale and study design for a randomized trial of glutamine and antioxidant supplementation in critical-ill patients. *Proceedings of the Nutritional Society.* 2006; 65(1): 250-263.
- ¹⁸⁹ Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun.* 1979; 23(2):403-411.
- ¹⁹⁰ Suzuki S, Nakamura S, Sakaguchi T, et al. Alteration of reticuloendothelial phagocytic function and tumor necrosis factor-[alpha] production after total hepatic ischemia. *Transplantation.* 1997; 64(1):821-828.
- ¹⁹¹ Adams HR. Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. *J Am Med Assoc* 1996; 209(1):1297-1302.
- ¹⁹² Ashoori F, Suzuki S, Zhou JH, Isshiki N, Miyachi Y. Involvement of lipid peroxidation in necrosis of skin flaps and its suppression by ellagic acid. *Plast Reconstr Surg.* 1994; 94(1):1027-1037.
- ¹⁹³ Benzie, IFF. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. *Int J Food Sc. Nut.* 1996; .47(1):233-261.
- ¹⁹⁴ Esterbauer H, Lang J, Zdravc S, Slater TF. Detection of malonaldehyde high performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.*1984; 105(1):319-328.
- ¹⁹⁵ May, J. M.; Qu, Z. C.; Whitesell, R. R. Ascorbic acid recycling enhances the antioxidant reserve of human erythrocytes. *Biochemistry.* 1995; 34(1):12721-12728.
- ¹⁹⁶ Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. 2000; 29(11): 1106-1114.
- ¹⁹⁷ Rowbottom GD, Keast D, Morton RA. The emerging role of glutamine as an indicator of exercise stress and overtraining. *Sport Med.*1996; 21(2): 80-97.
- ¹⁹⁸ Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem.* 2005; 53 (10):4290-4302.

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](#)