



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**EFEITO DA GLUTAMINA NO SISTEMA ANTIOXIDANTE DE
ANIMAIS SUBMETIDOS À ISQUEMIA/REPERFUSÃO RENAL**

ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

VALTER TOREZAN GOUVÊA JUNIOR

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato
Grosso, como pré-requisito para a
obtenção do Grau de Mestre em
Ciências da Saúde sob orientação do
Prof. Dr. Cervantes Caporossi.

**Cuiabá-MT
2010**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu pai, Valter, por seus princípios que guiam minha vida.

A minha mãe, Arlene, por conduzir seus filhos à busca intelectual.

Aos meus irmãos, Juliana e Gabriel, pelo amor que nos une.

A minha esposa, Simone, pela compreensão dos meus exageros e períodos de ausência.

A minha filha Isabela, por tornar tudo digno e valioso.

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. Cervantes Caporossi, 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 da Magnífica Reitora Profa. Dra. Maria Lúcia Cavalli Neder, e à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal do Mato Grosso, na pessoa do Prof. Dr. Antônio José de Amorim, Diretor da Faculdade, que tornaram possível a realização deste trabalho.

Ao Hospital Universitário Júlio Müller, na pessoa do Prof. José Carlos Amaral Filho, Diretor Superintendente, pelo constante apoio ao crescimento profissional de seu corpo clínico.

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. Cor Jésus Fernandes Fontes, 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. Fernando Arruda, Chefe do Departamento, pelo apoio sempre bem-vindo.

Aos colegas da Clínica de Urologia do Hospital Universitário Julio Muller pelo constante estímulo e apoio ao aprimoramento profissional.

Aos colegas da Urologia do Hospital Santa Rosa meu agradecimento pelo prazeroso e harmonioso convívio nestes anos, além da ajuda constante na minha caminhada pelo conhecimento.

Ao colega e amigo Alberto Bicudo Salomão, cirurgião geral, companheiro de todas as horas, pelo incentivo e colaboração deveras preciosa com a qual pude contar ao longo desse trabalho e na vida profissional.

Aos acadêmicos de medicina Erlon Côrtez e Marina Munhoz, pela dedicada e valorosa colaboração no desenvolvimento dos experimentos inerentes a este trabalho.

A colega Ivana de Menezes, médica patologista, que gentilmente realizou a análise histológica.

Ao amigo Dr. Celso Antunes Maciel, cirurgião vascular, pela disposição de emprestar material cirúrgico pessoal para utilização nesse experimento.

Ao amigo Carlos Eduardo Bouret, urologista e proprietário do laboratório Santa Rosa, por colocar a disposição o laboratório Santa Rosa para a realização das análises laboratoriais.

Ao Prof. Dr José Eduardo Aguilar Nascimento e Prof. Dr. Pedro Luis Reis Crotti que atenciosamente contribuíram nesta tese com sugestões importantes.

Aos funcionários do laboratório Santa Rosa em especial a Luiza Marques Rossi, biomédica, que incansavelmente me auxiliou nas análises laboratoriais por finais de semanas inteiros.

A Isabel Cristina Bocchese, diretora técnica do laboratório Santa Rosa. por não medir esforços em auxiliar-me nessa pesquisa.

A Vânia Azevedo da Silva, diretora administrativa do laboratório Santa Rosa, que gentilmente disponibilizou funcionários para me auxiliar.

A Adenize Delatore da Silva, coordenadora técnica do laboratório Santa Rosa, pela cooperação nas análises laboratoriais.

A Maria de Fátima da Silva Nascimento, técnica do laboratório Santa Rosa pelo auxílio na coleta do material.

Ao Prof. Ms. José Alberto Alves, exemplo de pessoa e amigo, que continuamente transmite seus saberes sem nada em troca pretender.

Ao Prof. Ms. João Bosco de Almeida Duarte, pelo constante incentivo, orientação, participando ativamente desde os primeiros momentos deste trabalho.

Ao meu tio, Prof. Dr. Francisco Gouvêa Junior, professor adjunto da UNESP-Bauru, pelo auxílio em protocolar o projeto de pesquisa no CEPA daquela Universidade.

Aos Residentes da clínica urológica do HUJM; Luís Augusto Esteves, Fábio Monduzzi Figueredo e Jean Chaves pela colaboração na realização do experimento.

Ao Prof. Ms. Benedito Figueiredo, coordenador do biotério - UFMT, pela contribuição técnica e apoio na realização do experimento.

Ao colega de curso, Bernardo Campos Figueiredo, pelo incentivo e salutar convívio nessa jornada.

A Janaina Giovanetti de Andrade, estatística, que me auxiliou nas análises estatísticas.

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.

A Universidade Estadual de Londrina (UEL) por ter me oferecido as bases da formação médica para que eu pudesse trilhar o caminho na Urologia.

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.

RESUMO

Introdução: A isquemia e reperfusão que ocorre durante cirurgia renal pode desencadear lesões sistêmicas que são mediadas por radicais livres produzidos na fase de reperfusão. A glutamina exerce propriedades importante no sistema antioxidante por ação da glutatona.

Objetivo: Avaliar os efeitos na proteção antioxidante plasmática e na lesão tecidual renal e pulmonar da glutamina oral administrada precedendo a isquemia/reperfusão renal.

Método: Trinta e três ratos winstar machos foram submetidos à nefrectomia a direita. No oitavo dia de pós-operatório os animais foram randomizados em três grupos (n=11) que foram assim divididos: glutamina, controle e sham. Cada grupo de animal recebeu por gavagem uma dieta distinta por sete dias. Ao final do 14º dia da nefrectomia procedeu-se a isquemia renal esquerda por 45 minutos e posterior reperfusão por uma hora, com coleta de sangue, eutanásia e retirada de tecido renal e pulmonar.

Resultados: Os níveis de capacidade antioxidante total foram maiores no grupo glutamina (2,22 [2,16-2,36]mmol/ml) e grupo controle (2,22[2,09-2,33]mmol/ml) em relação ao grupo sham (2,10 [2,02-2,21]mmol/ml). Os níveis de glutatona peroxidase nos grupos sham e glutamina mostraram-se mais elevados quando comparados com o grupo controle.($p < 0,05$). Em relação a dosagem de superóxido dismutase houve uma diferença dos níveis do grupo sham (102 [86 – 121,2]U/ml) quando comparado com os grupos glutamina (86,4[58,8 –107,6]U/ml) e controle(86[54,8-114]). Não houve diferença na análise histológica do rim e pulmão entre os grupos controle e glutamina.

Conclusão: O uso de glutamina antecedendo a isquemia reperfusão renal está associado a uma preservação da capacidade antioxidante total e glutatona peroxidase.

ABSTRACT

Introduction: Ischemia-reperfusion injury that occurs during renal surgery may induce systemic lesions that are mediated by free radicals produced during reperfusion phase. glutamine acts as antioxidant by stimulating glutathione production. Objective: To evaluate the protective effects on plasma antioxidant protection and lung and renal tissue injury of glutamine administered before renal ischemia reperfusion. Method: Thirty-three male wistar rats underwent right nephrectomy. On the eighth post operative day, animals were randomized into three groups each (n = 11): glutamine, control and sham. Each group of animals received by gavage a distinct diet for seven days. At the 14th day of nephrectomy they were submitted to left renal ischemia for 45 minutes and reperfusion for one hour, followed by posterior collection of blood samples, euthanasia and removal of kidney and lung tissue. Results: The levels of total antioxidant capacity were higher in the glutamine group (2.22 [2.16 to 2.36] mmol / ml) and control group (2.22 [2.09 to 2.33] mmol / ml) compared with sham group (2,10[2,02 to 2,21] mmol/ml). The levels of glutathione peroxidase in the sham and glutamine groups were higher when compared with the control group.(p<0,05).The superoxide dismutase levels of the sham group (102 [86 -121.2] U / ml) showed difference when compared with the glutamine group (86.4 [58.8 -107.6] U / ml) and control (86 [54.8 to 114]U/ml). There was no difference in the histological analysis of both, kidney and lung of the control and glutamine groups. Conclusion: The previous intake of glutamine in renal ischemia reperfusion is associated with a preservation of total antioxidant capacity and glutathione peroxidase.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	II
AGRADECIMENTO	III
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
SUMÁRIO	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	X
LISTA DE FIGURAS	XII
INTRODUÇÃO	01
Aspectos históricos	02
Anatomia	04
Cirurgia, isquemia e reperfusão	05
Radical Livre	11
Lipoperoxidação	13
Sistemas antioxidantes	15
Sistema glutaciona	16
Capacidade antioxidante total	19
Superóxido dismutase	19
Glutamina	21
Isquemia/reperfusão renal e glutamina	24
JUSTIFICATIVA	27
OBJETIVOS	29
Objetivo Geral	29
Objetivos Específicos	29
MATERIAL E MÉTODO	30
Desenho do estudo	30
Animais	32
Randomização e grupos	32
Soluções utilizadas para gavagem	33
Técnicas operatória	34
Anestesia	35
Material cirúrgico	35
Operação 1	38

Operação 2 _____	40
Colheita de amostra de sangue e eutanásia _____	42
Dosagens bioquímicas: LDH, uréia, creatinina, capacidade antioxidante total, glutationala peroxidase e superóxido dismutase _____	44
Análise histológica _____	45
Análise estatística _____	46
RESULTADOS _____	47
Dosagens bioquímicas: uréia, creatinina e LDH _____	47
Dosagem da capacidade antioxidante total _____	50
Dosagem da glutationala peroxidase e superóxido dismutase _____	50
Análise morfológicas à microscopia óptica do parênquima renal e pulmonar _____	52
DISCUSSÃO _____	58
CONCLUSÃO _____	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	74
ANEXO _____	83

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP: difosfato de adenosina.
AIN-1993: dieta padrão para roedores preconizada pelo Instituto Americano de Nutrição.
AMP: monofosfato de adenosina.
AP-1: activating protein 1.
ATP: trifosfato de adenosina.
C5a: anafilotoxina C5a, proteína inflamatória encontrada produzida por ativação do sistema complemento.
CAT: capacidade antioxidante total.
CATA: catalase.
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.
DHL: enzima lactato desidrogenase.
DNA: ácido desoxirribonucleico.
FAP: fator de ativação plaquetário.
FCM: Faculdade de Ciências Médicas.
FNT: fator de necrose tumoral.
GLN: glutamina.
GSH: glutationa.
GSHpx: enzima glutationa peroxidase.
GSHrd: enzima glutationa redutase.
GSSG: glutationa oxidada.
HE: hematoxicilina-eosina.
I/R: isquemia e reperfusão.
ICAM-1: proteína de adesão da superfície do endotélio e de monócitos.
IF γ : interferon gama.
IL1: interleucina 1.
IL-6: interleucina 6.
iNOS: enzima óxido nítrico sintase induzida.
LPO: lipoperoxidação ou peroxidação lipídica.
LTB4: leucotrieno B4.
MODS: síndrome da disfunção de múltiplos órgãos.
NAD: nicotinamida adenina dinucleotídeo.
NF-KB: fator nuclear KB.
NO: óxido nítrico.
PAF: fator de agregação plaquetária.
PGE2: prostaglandina E2.
PO: pós-operatório.
ROS: espécies reativas de oxigênio.
SHAM: cirurgia simulada.
SD: desvio padrão.
SIRS: síndrome da resposta inflamatória sistêmica.

SOD: enzima superóxido dismutase.
TFG: taxa de filtração glomerular.
TNF-a: fator de necrose tumoral alfa.
UEL: Universidade Estadual de Londrina.
UFMT: Universidade Federal do Mato Grosso.
UNESP: Universidade Estadual Paulista.
VCAM-1: proteína de adesão da superfície do endotélio.

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1 - Via metabólica para a produção de radicais livres do O ₂ durante a reperfusão de tecidos isquêmicos pela conversão da xantina desidrogenase em xantina oxidase.	07
Figura 2 – Interação neutrófilo-endotélio e a produção de espécies reativas de oxigênio	09
Figura 3 - Interação neutrófilo-endotélio e a produção de espécies reativas de oxigênio.	09
Figura 4 - Redução tetravalente do oxigênio molecular (O ₂) na mitocôndria até a formação de água (H ₂ O). Várias espécies reativas de O ₂ são formadas no processo.	13
Figura 5 - Interconversão de glutathiona nas suas formas reduzida oxidada pela ação das enzimas glutathiona peroxidase (GSHpx) e glutathiona redutase (GR).	17
Figura 6 - Mecanismo pela qual a GSPx catalisa a quebra das hidropoxidases.	18
Figura 7 - Função da superóxido dismutase (SOD) sob as espécies reativas de oxigênios.	20
Figura 8 - Valor calórico e nutricional das dietas complementares utilizadas nos animais.	32
Figura 9 - Distribuição dos animais de experimentação em função dos grupos de estudo (N= 33).	33
Figura 10 - Técnica de gavagem.	34
Figura 11 - Técnica utilizada para anestésiar o animal.	36
Figura 12 - Animal anestésiado, imobilizado e realizado anti-sepsia.	37
Figura 13 - Animal com campo estéril e demarcação da incisão cirúrgica.	37
Figura 14 – Incisão em flanco direito com localização renal.	38

Figura 15 - Isolamento e ligadura de pedículo renal direito.	39
Figura 16 - Sutura de cavidade abdominal utilizando nylon 2-0.	39
Figura 17 - Dissecção de rim esquerdo para posterior isolamento do pedículo renal.	41
Figura 18 - Clampeamento do pedículo renal esquerdo e início da palidez.	41
Figura 19 - Início do retorno a coloração normal do rim após retirada do clamp.	42
Figura 20 - Dissecção de cava para coleta da amostra sanguínea.	43
Figura 21 - Coleta de sangue da veia cava.	43
Figura 22 - Aspecto do laboratório de investigação, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal do Mato Grosso.	44
Figura 23 - Componente utilizado nas dosagens.	45
Figura 24 - Dosagem sérica de uréia nos diferentes grupos estudados.	48
Figura 25 - Dosagem sérica de creatinina nos diferentes grupos estudados.	48
Figura 26 - Dosagem sérica de LDH nos diferentes grupos estudados.	49
Figura 27 - Dosagem sérica de CAT nos diferentes grupos estudados.	49
Figura 28 - Dosagem sérica de Glutathione Peroxidase nos diferentes grupos estudados.	51
Figura 29 - Dosagem sérica de Superóxido Dismutase nos diferentes grupos estudados.	51
Figura 30 - Aspecto histológico renal do grupo sham. Parênquima renal sem alterações. Coloração HE (200X).	52
Figura 31 - Aspecto histológico renal do grupo GLN. Parênquima renal com áreas de necrose tubular aguda. Coloração HE (400X).	53
Figura 32 - Aspecto histológico renal do grupo controle. Parênquima renal com áreas de necrose tubular aguda. Coloração HE (200X).	53
Figura 33 - Aspecto histológico pulmonar do grupo sham. Parênquima pulmonar normal. Coloração HE (100X).	54

Figura 34 - Aspecto histológico pulmonar do grupo GLN. Parênquima pulmonar com infiltrado linfocítico intersticial discreto. Coloração HE (200X).	54
Figura 35 – Aspecto histológico pulmonar do grupo controle. Parênquima pulmonar com agregado linfóide perivascular. Coloração HE (100X).	55
Figura 36 - Alterações morfológicas no exame histopatológico dos rins de ratos submetidos a I/R renal e tratados com glutamina (GLN), albumina (controle) e glicose 50% (sham).	56
Figura 37 - Alterações morfológicas no exame histopatológico do parênquima pulmonar de ratos submetidos a I/R renal e tratados com glutamina (GLN), albumina (controle) e glicose 50% (sham).	57

1- INTRODUÇÃO

O número estimado de pacientes com indicação de terapia de substituição renal por doença renal terminal nos Estados Unidos da América é cerca de 335 por milhão de habitantes¹. No Brasil este número é de 383 por milhão com uma população total de 70.872 pacientes em tratamento dialítico, com este número aumentando 9,9% ao ano.² A média de idade dos pacientes é de 65 anos, e o diabetes melitus e a hipertensão arterial são, respectivamente, a primeira e a segunda causa de lesão renal.¹

A isquemia renal produzida durante o transplante é um dos maiores responsáveis de lesão renal aguda e com o advento da nefrectomia laparoscópica para doadores renais vivos houve um aumento no tempo dessa isquemia quente.^{3,4} A isquemia e reperfusão renal também ocorre durante revascularização de artéria renal, tratamento de aneurismas de aorta suprarenal e nefrectomias parciais (especialmente nas laparoscópicas).^{5,6}

A reperfusão é essencial para sobrevivência do tecido isquêmico, entretanto tal aporte de substratos causa uma lesão adicional à célula.⁷ Isquemia/reperfusão (I/R) de um órgão ou tecido resulta em uma lesão celular desencadeada por uma complexa série de eventos, os quais afetam a estrutura e função de todas as organelas celulares.⁷ Radicais livres mediam essa lesão celular, sendo produzidos quando o fornecimento de oxigênio é restaurado através da reperfusão.⁷ Dentre esses processos inclui a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), depleção de adenosina 5' trifosfato (ATP), infiltração de neutrófilos, ativação de fosfolipases e alteração da membrana lipídica e acúmulo de cálcio intracelular.⁷

A redução dos efeitos deletérios da I/R renal deve ser propósito durante todo o processo de tratamento, e a sua minimização pode e deve ser iniciada antes do ato cirúrgico, como conduta de preparo pré-operatório.⁸

A ingesta de nutrientes específicos pode modular a resposta inflamatória de vários órgãos diminuindo o poder nocivo da cascata fisiológica desse evento.⁹ Foi demonstrado que a administração de aminoácidos neutros como glicina e alanina protegem as células do túbulo renal da lesão causada pela isquemia ou hipoxemia.⁸ GLN é o aminoácido mais abundante encontrado no sangue.¹⁰ Uma das características mais importante é sua função no metabolismo da glutathione (GSH).¹⁰ Glutathione é um potente agente antioxidante que tem como precursor a GLN .¹⁰ Sabe-se que quando os rins estão sobre estresse oxidante, GLN é o fator limitante da síntese de GSH.¹⁰

Sabe-se ainda do efeito benéfico da glutamina na proteção do fígado contra os efeitos da lesão por I/R.¹⁰ Fuller e cols. (2007)¹¹ relataram que a glutamina (GLN) administrada no pré tratamento de ratos submetidos a transplante renal determinou uma atenuação da apoptose celular tubular.¹¹ Mora e cols. (2003)¹² observaram proteção parcial da nefrotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos tratados com GLN.¹²

Nesse contexto, é bastante provável que a suplementação de GLN durante sete dias antes de promover uma I/R renal eleve a capacidade antioxidante do organismo e consequentemente diminua a lesão renal.

1.1 - ASPECTOS HISTÓRICOS

Desde tempos antigos que se conhece a existência de doenças urinárias: os cálculos renais encontradas em múmias egípcias e de alguns relatos posteriores à invenção da escrita.¹³

A prática de atos simples de cirurgia urológica, sobretudo ao nível dos órgãos genitais, como circuncisão (por motivos religiosos), castração (por determinação jurídica), ou com finalidade terapêutica (sondagem da bexiga) já era de domínio de Assírios e de Gregos.^{13,14}

É, contudo com Hipócrates (século V antes de Cristo.), e posteriormente com Galeno (século II depois de Cristo), que se estabelecem os preceitos e a prática da medicina fundamentada na observação e posterior descrição das inúmeras afecções, algumas na área da urologia, baseando-se em organização de sintomas e num correto estudo da urina.¹³ Aristóteles afirmava que os rins não eram órgãos vitais e, até Galeno, acreditava-se que a urina era produzida na bexiga.¹⁵

Na Idade Média, a Medicina, como muitas outras ciências, viveu em escuridão. Apesar disso, a medicina árabe, com Avicena e Averroes, atingiu o seu apogeu, com reflexos também nas doenças urinárias.¹³ Na Europa os cirurgiões-barbeiros itinerantes, especializados na extração de pedra da bexiga – os litotomistas –, fizeram história ao tratarem reis e nobres.¹³

A estrutura tubular renal foi observada pela primeira vez por Lorenzo Bellini, professor de Anatomia em Pisa, em 1662.¹⁵ Marcello Malpighi contemplou os glomérulos renais em 1666, tomou-os por glândulas, comparou-os a maçãs e chamou-os “corpúsculos”.¹⁵ Alexander Schumlansky, fisiologista russo radicado na França, cunhou o nome atual (do latim *glomus* = novelo) em seu livro “De structura renum”, de 1788.¹⁵

Todos estes avanços no campo do diagnóstico foram acompanhados por progressos na terapêutica, em particular na cirurgia com a introdução da antissepsia e da assepsia (Lister, 1869; Pasteur, 1864) e o desenvolvimento da anestesia (Morton, 1846 – éter; Simpson, 1848 – clorofórmio), o que permitiu a realização da primeira nefrectomia em 1869, seguida de variantes técnicas para diferentes doenças cirúrgicas do rim.^{9,13,16} Durante os anos de 1953 a 1963, estabeleceu-se um marco na medicina com o início dos transplantes renais na França por Kuss e nos Estados Unidos da América (EUA) por Murray e Merrill.¹⁷

Também na mesma década (1956) são relatados os casos iniciais de cirurgia conservadora renal para tratamento de carcinoma de células renais na Cleveland Clinic Foundation, em Ohio, EUA.¹⁸

Estes avanços da cirurgia renal necessitavam da realização de isquemia e posterior reperusão durante a sua realização.

1.2 - ANATOMIA

Os rins (do latim ren, do grego nephros; daí os adjetivos renal e néfrico) são órgãos de coloração marrom-avermelhada cobertos por uma cápsula fibromuscular, fina, brilhante, e estão localizados paralelamente a coluna vertebral, sobre o músculo psoas maior, e num plano oblíquo entre coronal e sagital.¹⁹ Como o músculo psoas maior possui a forma de um cone, os rins também são inclinados posteriormente sobre o eixo longitudinal; assim, os pólos superiores são mais mediais e mais posteriores que os pólos inferiores.²⁰ Os rins apresentam cerca de 11 a 13 cm de comprimento, sendo o esquerdo um pouco mais longo que o direito, ambos retroperitoneais e irrigados pelas artérias renais que emergem diretamente da aorta, imediatamente abaixo da origem da artéria mesentérica superior, próximo ao nível do disco entre a primeira e segunda vértebra lombar.^{19,20}

O pedículo renal clássico consiste de uma artéria e uma veia. A veia renal se situa anteriormente a artéria, e desemboca na veia cava.^{19,20} A artéria renal origina quatro ou mais ramos que são as artérias segmentares, sendo que cada segmento supre uma porção distinta do rim, sem circulação colateral entre elas, podendo, a oclusão de um ramo, levar a um infarto renal segmentar.^{19,20}

As artérias segmentares se dividem antes de entrarem no parênquima renal em artérias interlobares (artérias infundibulares) que cursam adjacentes aos infundíbulos caliciais progredindo e originando as artérias arqueadas.^{19,20} Dessa última origina as artérias interlobulares que cursam em direção da periferia, e de onde se originam as artérias aferentes dos glomérulos.^{19,20} A arteríola aferente se invagina na cápsula glomerular (cápsula de

Bowman) formando o glomérulo, de onde sai a arteríola eferente.²⁰ Esse complexo formado pelo glomérulo invaginado dentro da cápsula é chamado de corpúsculo renal (ou de Malphighi).²⁰

Cada rim é composto de um conjunto de cerca de um milhão de glomérulos cada um deles capaz de formar urina, sendo que cada glomérulo nada mais é que uma rede de cerca de 50 capilares paralelos dentro da cápsula de Bowman onde o líquido é filtrado, e, um longo túbulo no qual o líquido filtrado é convertido em urina.²¹

Os rins desempenham duas importantes funções no organismo; a excreção dos produtos finais do metabolismo, e o controle das concentrações da maioria dos constituintes da parte líquida do organismo, sendo que na sua ausência a falência de todo organismo é inevitável.²¹

1.3 - CIRURGIA, ISQUEMIA E REPERFUSÃO

O primeiro transplante renal foi realizado em 1954 em Boston, Massachusetts entre irmãos gêmeos, e o órgão permaneceu em isquemia fria por 82 minutos até efetivamente ser revascularizado.²²

Estudos em cães demonstram que a recuperação após isquemia quente é diretamente dependente do seu período de duração.^{23,24} Assim, há recuperação completa e rápida se a isquemia quente não prolongar mais que dez minutos, porém com isquemia de 20 minutos a função renal se recuperará somente após algumas horas.^{23,24} Com períodos maiores de 30 minutos de isquemia quente renal, a recuperação se dará após três a nove dias, com 60 minutos somente após semanas e após 120 minutos esta função será recuperada parcialmente (30-50%).^{23,24}

Está claro que a reperfusão de tecidos isquêmicos inicia uma complexa série de reações que paradoxalmente lesam os tecidos, tendo sido propostos vários mecanismos para explicar a lesão da I/R, com particular atenção na função dos ROS.²⁵

Em adição a esses mecanismos, recentes evidências sugerem que a exposição a breves períodos de isquemia (pré condicionamento isquêmico) minimiza o desenvolvimento da injúria celular pela subsequente interrupção do fluxo sanguíneo.²⁵

Hipóxia é definida como qualquer estado em que existe uma redução do oxigênio disponível a célula, podendo ser causada pela redução na quantidade ou na saturação da hemoglobina.²⁶ A isquemia ocorre devido a uma redução no fluxo sanguíneo, geralmente como consequência a uma obstrução no sistema arterial, ou como resultado da má perfusão que acontece como resposta fisiológica ao estado de choque.²⁶ Dessa forma, nos tecidos isquêmicos, a geração anaeróbica de energia é interrompida depois que os substratos glicolíticos são exauridos, ou a função glicolítica é inibida pelo acúmulo de metabólitos que deveriam ter sido removidos pelo fluxo sanguíneo.²⁶ Assim, a lesão isquêmica apresenta uma tendência para lesionar os tecidos mais rapidamente que a hipóxia.²⁶

As consequências 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 envolvidos.²⁷ 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.²⁷

Concomitantemente há uma intensa reação inflamatória nos tecidos pós isquêmicos levando a uma grande lesão após a reperfusão que também pode ser manifestada em outros órgãos do organismo.²⁸ Esses efeitos da I/R são mais frequentemente observados no pulmão e sistema cardiovascular, e pode resultar no possível desenvolvimento da síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (MODS).²⁸

Para reverter o estado isquêmico, há necessidade de restauração de fluxo sanguíneo.²⁹

Porém, o restabelecimento do suprimento de sangue normal paradoxalmente pode ser responsável por lesões ainda mais graves do que as da isquemia *per se*.²⁶ O afluxo de oxigênio no tecido isquêmico levaria a uma série de alterações bioquímicas, inflamatórias e celulares mediadas principalmente pela formação dos radicais livres de oxigênio ou espécies reativas de oxigênio (ROS).²⁶

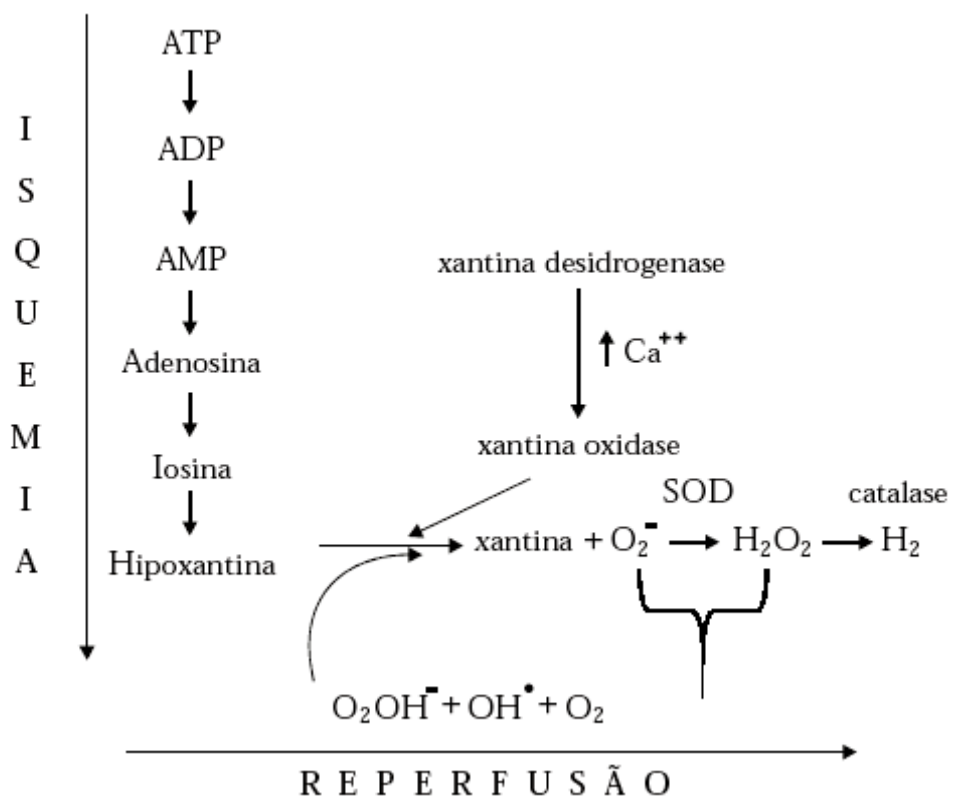


FIGURA 1. Via metabólica para a produção de radicais livres do O_2 durante a reperfusão de tecidos isquêmicos pela conversão da xantina desidrogenase em xantina oxidase.

FONTE: Modificado de Silveira M. e cols.²⁷

Granger e cols., apud Bicudo-Salomão³⁰, em um estudo sobre isquemia e reperfusão no intestino delgado, propuseram um mecanismo para explicar a origem dos radicais livres: “Durante o período de isquemia, o ATP é catabolizado até a hipoxantina, que se acumula nos tecidos. Como resultado do estado de baixa energia, há falência da homeostase celular

caracterizada pela perda do gradiente iônico através da membrana celular, permitindo o influxo de Ca^{++} para as células, que ativa a protease a converter a xantina desidrogenase a xantina oxidase. A hipoxantina é o primeiro substrato para a oxidação pela xantina oxidase, o que ocorre quando o segundo substrato, o oxigênio, é fornecido na reperfusão, formando as espécies reativas do metabolismo do oxigênio”³⁰ (Figura 1).

Outra origem dos radicais livres seria a produção de radicais superóxidos pela já mencionada quebra de elétrons do sistema de transporte de elétrons dentro da mitocôndria ou pela via da ciclooxigenase do metabolismo do ácido aracdônico.³¹ Por esse último mecanismo haveria a ativação de proteases e fosfolipases inespecíficas induzida pelo acúmulo de cálcio intracelular no período de reperfusão, que levaria à síntese de mediadores pró-inflamatórios: o fator de agregação plaquetária (PAF) e os compostos eicosanóides (leucotrienos, tromboxane e prostaglandinas).²⁹

As lesões assim produzidas servem como um estímulo a partir do qual se inicia a reação inflamatória.²⁹ Mediadores humorais levam à quimiotaxia de neutrófilos aos sítios de lesão.²⁷ 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 tumoral (FNT).^{27,29,32} Com a interação neutrófilo-endotélio dá-se um incremento na produção de ROS.^{27,29,32} Enzimas proteolíticas como a collagenase, elastase e mieloperoxidase passam a ser liberadas pelo neutrófilo.²⁵ Esta última ocupa um papel importante, catalisando a

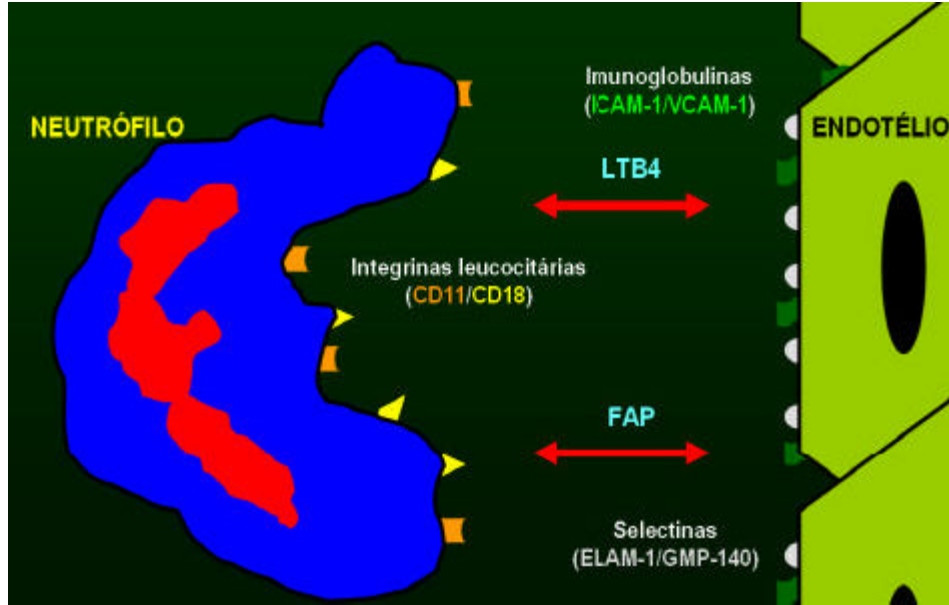


FIGURA 2: Interação neutrófilo-endotélio e a produção de espécies reativas de oxigênio. **FONTE:** Adaptado de Bicudo-Salomão e cols.³⁰

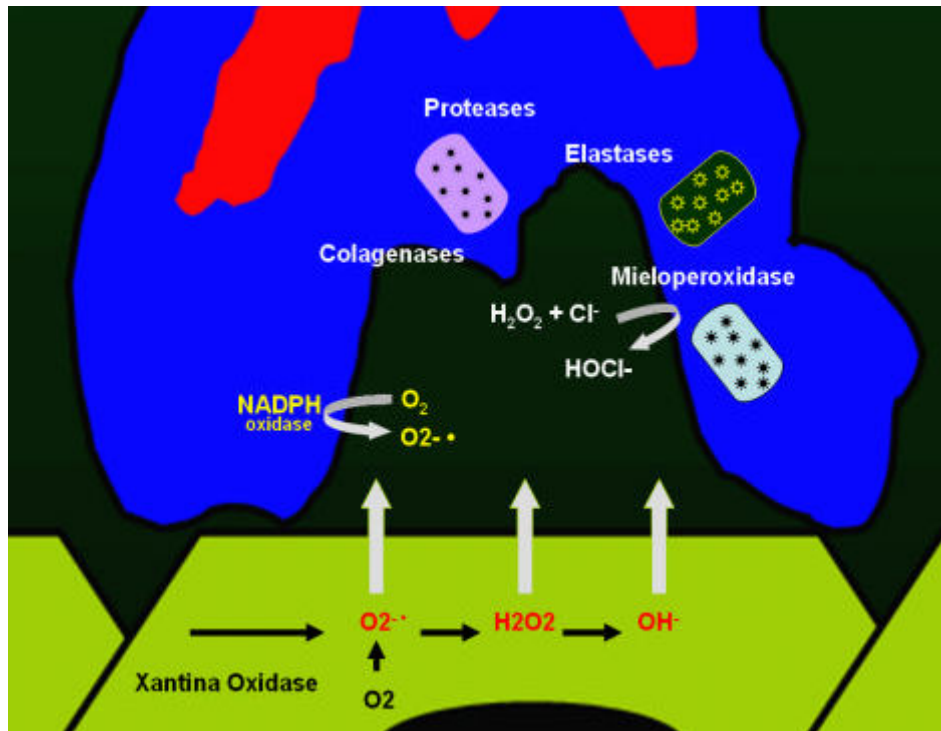


FIGURA 3: Interação neutrófilo-endotélio e a produção de espécies reativas de oxigênio. **FONTE:** Adaptado de Bicudo-Salomão e cols.³⁰

reação entre peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e íon cloreto (Cl^-), para a formação do radical hipoclorito ($HOCl$), potente agente oxidante.^{25,27,29,30} (Figura 2 e 3).

O neutrófilo ativado estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias.^{26,27,29} Destacam-se a interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), metabólitos do ácido aracdônico (leucotrieno B4 e tromboxano A2) e o FNT.^{26,27,29}

Com a amplificação da resposta inflamatória, outras linhagens celulares passam a ser recrutadas, dentre estas, os mastócitos.³¹

Da sua decomposição e liberação de grânulos são originadas diversas aminas com propriedades vasoativas como histamina, proteoglicans, prostaciclina, cininas, leucotrienos, proteases, e óxido nítrico.²⁶ O óxido nítrico, gás radical livre, tem interessantes propriedades vasodilatadoras, além de funcionar como antiagregante plaquetário e ser tóxico para bactérias.²⁶ 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^-), levando a produção de peroxinitrito ($ONOO^-$) e dióxido de nitrogênio (NO_2), compostos capazes de promover graves lesões celulares.²⁷

Concomitantemente a isso, 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*.²⁵

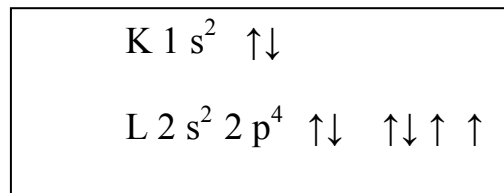
O tromboxano A 2 (TXA2) e Leucotrieno B 4 (LTB4) são, respectivamente, subprodutos da ação da cicloxigenase e lipoxigenase sobre o ácido aracdônico.²⁵ O LTB4 é um potente quimiotático de leucócito que favorece a interação neutrófilo-célula endotelial com liberação de radicais livres e enzimas proteolíticas e o TXA2, além de induzir os neutrófilos a liberarem radicais livres, é um potente vasoconstritor e agregador plaquetário, diminuindo o fluxo capilar após reperfusão.²⁵⁻³²

Por fim essa grande produção de (ERO) leva a peroxidação lipídica e oxidação protéica da membrana celular levando por fim a morte celular.^{24-33,34,35,36,37}

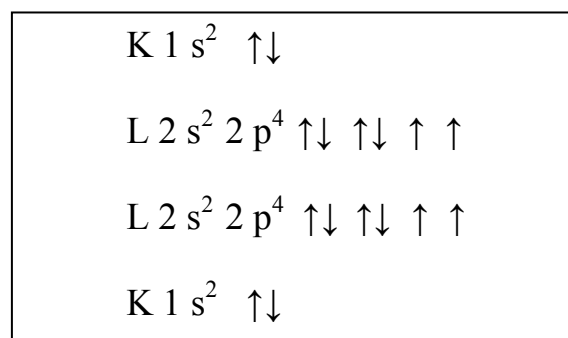
1.3.1-RADICAL LIVRE

As camadas eletrônicas de um elemento químico são denominadas K, L, M e N, e seus subníveis, s, p, d e f.³⁷ O termo radical livre refere-se a átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica.^{35,38} É este não emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos e moléculas.^{25,26,32-34,36,37}

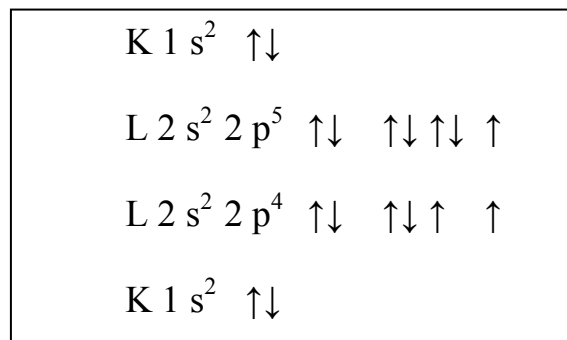
Podemos exemplificar a formação de um radical livre citando o radical superóxido (O_2^-), que é derivado do oxigênio molecular (O_2) o qual é composto por dois elementos oxigênio (O), cujo número atômico é 8, sendo sua distribuição de elétrons a seguinte:



Para formar o O_2 , os dois elétrons solitários do sub nível p de um elemento oxigênio fazem intercâmbio com os dois elétrons de outro elemento oxigênio, formando um composto estável com 12 elétrons na última camada (L).³⁷



Lembra-se que reações de redução implicam em ganho de elétrons e as de oxidação, em perda. Portanto, quando no metabolismo normal ocorrer uma redução do oxigênio molecular (O_2), este ganhará um elétron, formando o radical superóxido (O_2^-), considerado instável por possuir número ímpar (13) de elétrons na última camada L.³⁷ Assim, a configuração eletrônica do radical superóxido é a seguinte :



Logo, os radicais livres são formados em um cenário de reações de oxido-redução, ou cedem o elétron solitário, oxidando-se, ou recebem outro, reduzindo-se.^{25,32,34-38}

Radical livre não é o termo ideal para designar os agentes reativos patogênicos, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada.³⁷ Como em sua maioria são derivados do metabolismo do O_2 , utiliza-se o termo “espécies reativas de oxigênio”(ROS) ou “espécies reativas tóxicas de oxigênio”(ERTO).^{35,36}

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando em formação de H_2O (Figura 4).^{36,37} Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido (O_2^-), hidroperoxila (HO_2), e hidroxila (OH), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).^{25,36,37}

Normalmente, a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria, e a reatividade dos ROS é neutralizada com a entrada de quatro elétrons.^{25,36,37}

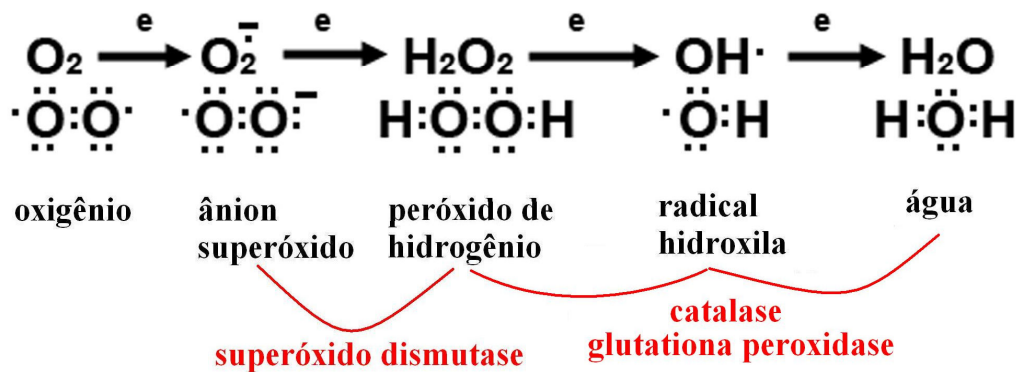


FIGURA 4- Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O). Várias espécies reativas de O_2 são formadas no processo.

FONTE: Modificado de Évora PR e cols.²⁹

Esses ROS estão relacionados com diversas doenças, incluindo câncer, doenças hepáticas, aterosclerose e envelhecimento, sendo isto devido a propriedade dos radicais livres de produzir injúria celular pelo ataque as membranas, servindo como iniciadores do processo de peroxidação lipídica ou lipoperoxidação.^{24,25,32-37}

A formação de radicais hidroxila nos sistemas biológicos ocorre de maneira não enzimática, através da reação de Haber-Weiss e necessita da presença de ferro (Fe^{+++}) ou metais de transição.^{25,32,34,36,37} Os radicais livres superóxido e peróxido de hidrogênio apesar de pequena ação direta sobre os constituintes celulares são considerados agressivos principalmente pelo fato de na reação de Haber-Weiss, reagirem para produzir radicais hidroxilas, os verdadeiros responsáveis pela injúria celular.³⁵

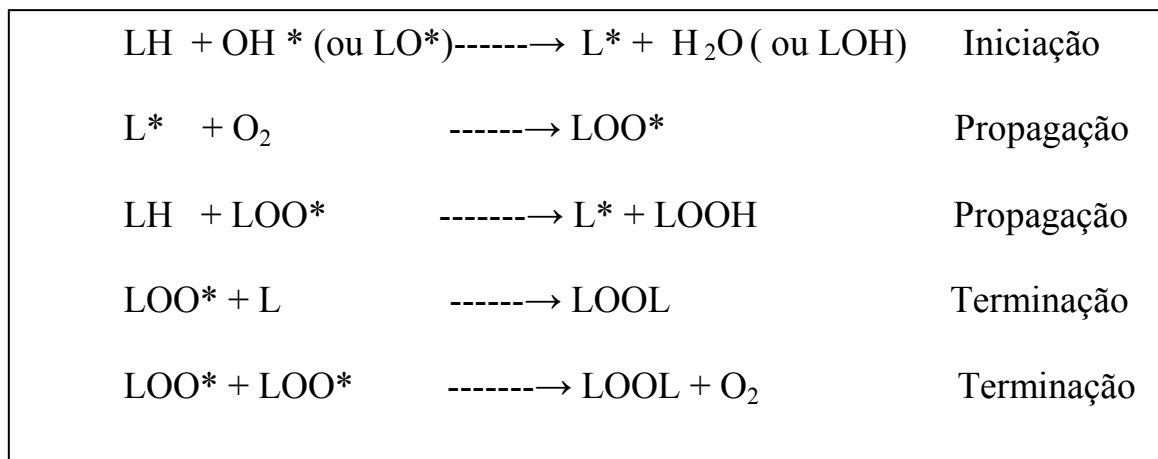
1.3.2- LIPOPEROXIDAÇÃO

Efeitos tóxicos do oxigênio sobre componentes biológicos já eram conhecidos no final do século XIX, tornando-se objeto de intensa investigação científica nos últimos anos.³⁵ Esses

efeitos provem da oxidação de componentes celulares como tióis, co-fatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lipídios, principalmente ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), mediados por ROS e espécies reativas de nitrogênio (ERN), conhecidas genericamente como radicais livres (RL).^{24,25,32-37}

Todos os componentes celulares são suscetíveis a ação das ROS, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares.³⁷ Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo da organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular.^{24,25,32-37}

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação, e terminação. Estas etapas estão apresentadas nas reações seguintes, onde L representa o lipídio:^{37,38}



A reação acima se inicia com seqüestro de hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH) da membrana celular.^{26,35,37,38} Tal seqüestro pode ser realizado pelo OH^* ou pelo LO^* (radical alcóxila), com conseqüente formação do L^* (radical lipídico).^{35,37} Na primeira equação de propagação, o L^* reage rapidamente com O_2 resultando em LOO^* (radical

peroxila), que, por sua vez, seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, formando novamente o L* na segunda equação de propagação.^{35,37} O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais (L* e LOO*) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até destruírem a si próprios.^{26,35,37}

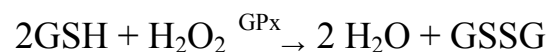
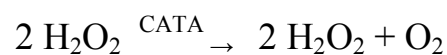
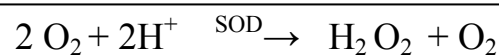
O radical hidroxila (OH*) é frequentemente reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante na lipoperoxidação associado ao ferro.^{37,38}

1.4 - SISTEMAS ANTIOXIDANTES

No estresse oxidativo há um estímulo exagerado, com super produção e conseqüente desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio de oxidantes e danos conseqüentes.³³

Em sistemas biológicos, a membrana celular constitui um dos focos de atuação de ROS, de ERN e de outras espécies reativas e sua função é vital para célula.^{25,26,33-38}

Em nível fisiológico, podemos nos defender da injúria mediada pelos radicais livres utilizando as reservas antioxidantes celulares.^{26,33,39} O sistema antioxidante sanguíneo é classificado em enzimático e não enzimático, sendo o primeiro representado, principalmente pelas enzimas antioxidantes: a superóxido dismutase (SOD) que atua sobre o radical superóxido transformando-o em peróxido de hidrogênio, a catalase (CATA) e a glutathiona peroxidase (GPx), as quais atuam sobre o peróxidos de hidrogênio transformando em água.^{26,33,37,38}



O sistema antioxidante não enzimático é formado por muitas substâncias, com destaque para a GSH, principal composto antioxidante intracelular, tocoferóis, ascorbato, ácido úrico e β -caroteno, que atuam sobre o radical hidroxila, verdadeiro causador do stress oxidativo além de proteínas de transporte de transição, como transferrina, lactoferrina, albumina, metaloproteínas e ceruloplasmina, as quais se ligam à metais de transição impedindo-os de catalisar a reação de Haber-Weiss.^{26,33,37,38} O sistema antioxidante enzimático e a GSH estão presentes, predominantemente, no meio intracelular, já o sistema não enzimático localiza-se, preferencialmente, no meio extracelular.³³

1.4.1 - SISTEMA GLUTATIONA

O sistema antioxidante glutaciona é o principal tiol não protéico envolvido na defesa antioxidante celular.^{33,40} É composta do tripeptídeo glutaciona(γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina), a qual é formado por cisteína, ácido glutâmico e glicina sendo sintetizada principalmente pelo fígado.^{33,40} Sua concentração é maior no meio intracelular no entanto pode ser encontrada tanto no plasma quanto na urina.⁴⁰ Existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular.⁴¹

Esse sistema também é composto pelas enzimas glutaciona peroxidase (GSHpx) e glutaciona redutase (GSHrd).^{40,41} Ambas catalisam a ação da glutaciona.^{40,41} Glutaciona peroxidase catalisa a conversão de H_2O_2 , produzida pela superóxido dismutase (SOD) com a dismutação do ânion superóxido (O_2^-), para H_2O .^{40,41} A glutaciona redutase contém flavina adenina dinucleotídeo e utiliza a redução do NADPH para reconverter GSSG para 2GSH.^{40,41}

GSHpx, descrita inicialmente por Mills (1957)⁴², não tem sido encontrada em plantas superiores ou bactérias.⁴²

Até o momento são conhecidas cinco formas estruturais e funcionais da GSHpx nos mamíferos sendo todas dependentes do selênio.⁴³ Duas formas foram identificadas no sangue.⁴³ GSHpx é uma das 25 classes de selênio proteínas conhecidas; a GSHpx age como antioxidante através da redução de peróxido, tais como H_2O_2 .⁴⁴ O peptídeo glutathiona (GSH) é um co-fator necessário na redução de peróxidos, e age como um substrato redutor, entretanto não exibe a capacidade de atividade da GSHpx.⁴⁴ Outra enzima que age conjuntamente com a glutathiona peroxidase é a GSHrd.⁴¹ Esta enzima não age diretamente na remoção de espécies radicalares, porém é responsável pela regeneração da glutathiona à sua forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutathiona.⁴¹ (Figura 5)

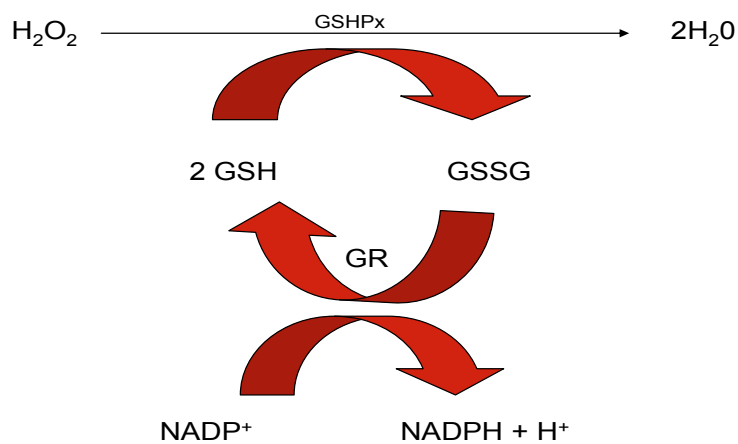


FIGURA 5- Interconversão de glutathiona nas suas formas reduzida e oxidada pela ação das enzimas glutathiona peroxidase (GSHpx) e glutathiona redutase (GR).

FONTE: Modificado de Battin EE e cols.⁴⁴

Assim, alguns trabalhos têm sido desenvolvidos para determinação destas enzimas tanto em tecidos celulares como no plasma sanguíneo.⁴¹

Glutathione e as enzimas que fazem parte do ciclo catalítico deste peptídeo, apresentam associações com alterações dos estados antioxidantes e com o aumento do estresse oxidativo.^{40,41,43,44} A quantificação de glutathione pode indicar uma possível correlação entre a diminuição das atividades de enzimas antioxidantes, como a glutathione peroxidase, e o aumento nos níveis de bases de DNA lesadas devido ao dano oxidativo.⁴¹

O mecanismo catalítico da glutathione peroxidase tem sido estudado extensivamente (Figura 6).⁴⁵

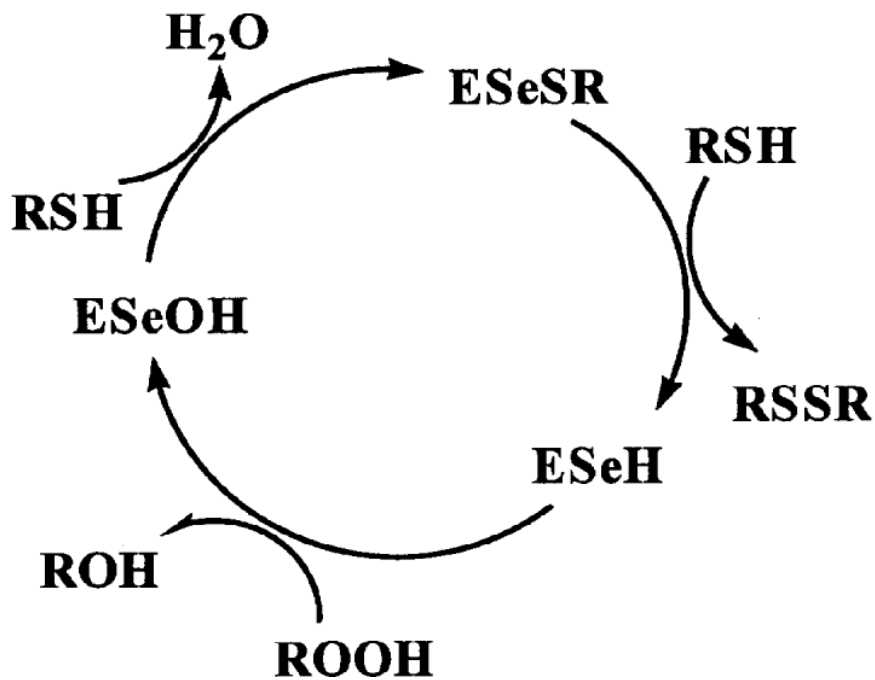


FIGURA 6. Mecanismo pela qual a GSPx catalisa a quebra das hidroperoxidasas.

FONTE: Adaptado de Battin e cols.⁴⁴

O selenol da molécula selenocisteína reduzida (EseH) é oxidada pela hidroperoxidase para originar o ácido selênico (EseOH). O tripeptídeo GSH reage com o ácido selênico, originando água e selenosulfeto (ESeSG).⁴⁵ Uma segunda molécula do GSH ataca o enxofre

do selenosulfeto, produzindo GSH disulfeto e regenerando o selenol (ESeH) para completar o ciclo catalítico.⁴⁵

1.4.2 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

No que se refere aos antioxidantes alguns autores defendem o estudo da capacidade antioxidante total (CAT), ao invés da análise de antioxidantes isolados, principalmente devido a interação que existe entre eles no plasma e no soro.³³ Na análise da CAT, leva-se em conta a ação acumulativa de todos os antioxidantes presentes; obtém-se um parâmetro integrado, capaz de revelar nuances acerca do delicado equilíbrio redox existente in vivo.³³ Em sistemas biológicos, a atividade sinérgica entre antioxidantes é muito comum, como é observado com a própria glutathione.⁴⁶ A mesma age regenerando o ascorbato e este regenerando o α -tocoferol, recuperando suas propriedades de supressão aos ROS.⁴⁶ 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 antioxidantes.³³

1.4.3 - SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

Superóxido dismutase (SOD) é uma metaloenzima encontrada em células eucariontes e procariontes que catalisam a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2).⁴⁷ Nas células há três isoenzimas de SOD: citosólica (CuZnSOD; SOD1), mitocondrial (MnSOD; SOD2) e extracelular (EC-SOD; SOD3).^{47,48} Desses três tipos a mais abundante é a SOD1.⁴⁷

Os dois passos para a reação do anion superóxido com o grupo protético da SOD inicia-se com a oxidação da forma da enzima (Fe^{3+} , Cu^{2+} e Mn^{3+} respectivamente) ligando-se ao anion superóxido, adquirindo um próton e liberando um oxigênio molecular.⁴⁷

A forma reduzida da enzima (Fe^{2+} , Cu^{+} e Mn^{2+}) liga-se a um segundo peróxido anion e próton, liberando H_2O_2 e retornando para seu estado oxidado.⁴⁷

Apesar do centro do íon metal permanecer mais negativamente carregado, a ligação do segundo ânion superóxido é possível em um meio de pH neutro, porque a carga total do local ativado permanece a mesma.⁴⁷

É esperado que o superóxido ânion, seja um substrato para a enzima catalase e outra enzima catalisadora do peróxido de hidrogênio como a glutathiona peroxidase, conforme figura 7.⁴⁷ Entretanto a conversão do ânion superóxido para peróxido de hidrogênio pela SOD pode levar a conseqüências pró-oxidantes.⁴⁷

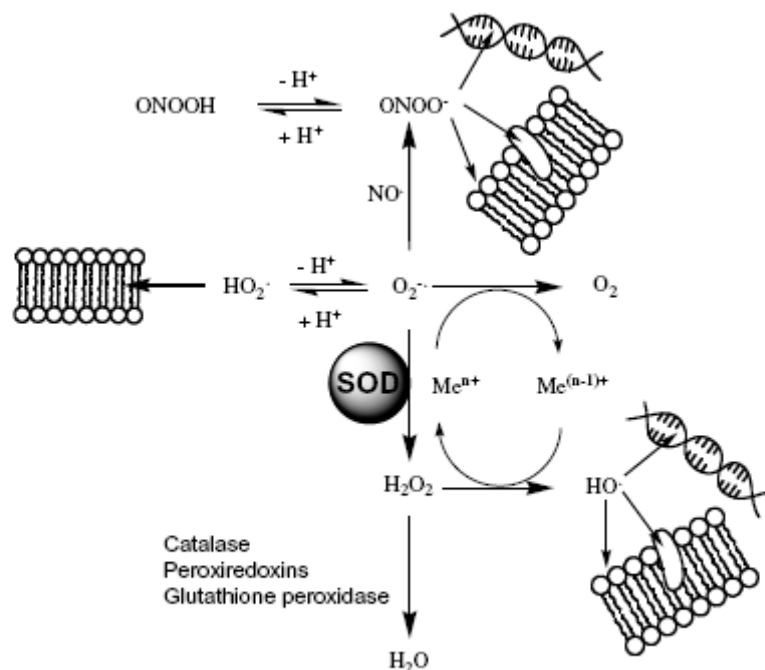


FIGURA 7 - Função da superóxido dismutase (SOD) sob as espécies reativas de oxigênio.

FONTE: Johnson F. e cols.⁴⁷

1.5 - GLUTAMINA

Em 1873, Hlasiwetz e Habermann foram os primeiros a considerar a glutamina como sendo uma molécula com propriedades biologicamente importantes.⁴⁹ Posteriormente, novas observações levaram os pesquisadores a pensar que a amônia encontrada em hidrolisados protéicos poderia ser o resultado da liberação de GLN, bem como de asparagina.⁴⁹ Cerca de 60 anos depois, Krebs, em 1935, demonstrou que células possuem a capacidade de sintetizar ou degradar GLN.⁴⁹

A glutamina (C₅H₁₀N₂O₃) é um L- α -aminoácido, com peso molecular de aproximadamente 146,15 kda e pode ser sintetizada por todos os tecidos do organismo.⁴⁹ Fazem parte de sua composição química nas seguintes quantidades: carbono (41,09%), oxigênio (32,84%), nitrogênio (19,17%) e hidrogênio (6,90%).⁴⁹ É classificada de acordo com seu grupamento R como não carregada, mas é polar, o que significa uma característica mais hidrofílica, sendo facilmente hidrolisada por ácidos ou bases.⁴⁹

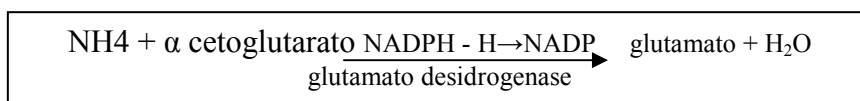
GLN é classificada como um aminoácido não essencial sendo o mais abundante aminoácido livre no corpo.⁵⁰ A elevada capacidade de síntese e liberação de GLN, principalmente em situações em que há aumento na sua demanda por outros órgãos e tecidos, confere ao músculo esquelético um papel metabólico essencial na regulação da glutaminemia.⁵⁰ Eventos cirúrgicos, queimaduras, infecção pelo vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida, câncer e exercícios físicos intensos e prolongados são algumas situações em que se observa que o consumo de GLN excede a capacidade de síntese corporal.⁵⁰ Nessas situações é considerada essencial devido ao seu grande consumo.⁵⁰

A síntese da GLN no músculo esquelético, durante o estado pós- absortivo, ocorre por meio da captação de glutamato, a partir da circulação sanguínea.⁵¹ O glutamato é responsável por 40% da síntese de GLN.⁵¹

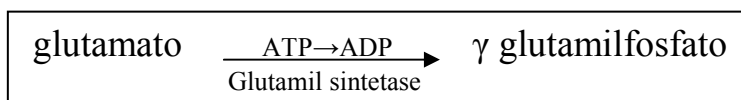
Esse aminoácido é a fonte de energia preferencial para os enterócitos, hepatócitos, linfócitos e macrófagos.^{50,52} A síntese de GLN é de aproximadamente 70 g por dia em humanos e, aproximadamente 30% desta é proveniente da quebra protéica e o restante é originado da síntese de novo deste aminoácido.⁵³ GLN pode ser sintetizada em vários órgãos.⁵³ As maiores quantias são sintetizadas na musculatura esquelética, no entanto cérebro, tecido adiposo, coração e o pulmão também podem a sintetizar sobre certas condições fisiológicas e patológicas.⁵³ Esse aminoácido está envolvido na amoniagênese sendo também responsável pelo equilíbrio ácido-base.⁵² A capacidade de receber e doar nitrogênio faz da GLN o maior veículo de transferência de nitrogênio entre os tecidos.⁵⁴

O glutamato é formado pelo ácido α cetoglutarato como um intermediário do ciclo de Krebs e amônia.⁵⁵ Na reação catalisada pela glutamina sintetase o glutamato reage com a amônia para formar a GLN.^{55,56}

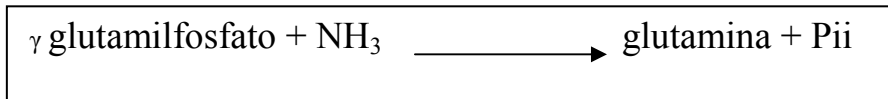
Assim, o amônio reage com o ácido α cetoglutarato originando glutamato numa reação mediada pela enzima glutamato desidrogenase, utilizando energia fornecida pelo NADPH + H.⁵⁵



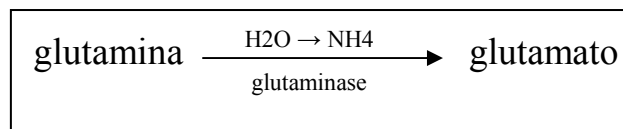
O glutamato assim formado reagirá com o ATP, recebendo um grupo fosfato e formando o intermediário γ glutamifosfato. Esta reação é catalisada pela glutamil sintetase.^{51,55,56}



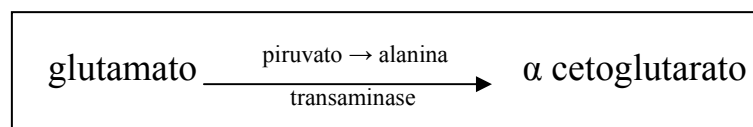
A amônia, presente no organismo, deslocará o grupo fosfato incorporando-se à molécula, originando a glutamina e liberando fosfato inorgânico (Pi). Não há catálise enzimática, nesta reação.^{51,55,56}



A rota catabólica percorre caminho inverso, porém sob a ação catalítica de outras enzimas. A primeira fase do catabolismo consta da transformação da GLN em glutamato catalisada pela glutaminase que é a única enzima da rota catabólica da GLN.^{51,55}



O glutamato reverte em ácido α cetoglutarico numa reação catalisada pela transaminase e mediada pelo ácido pirúvico e a alanina.⁵⁵



A glutaminase, enzima que catabolisa a GLN, e a glutamato desidrogenase, enzima que participa de sua síntese, são localizadas na mitocôndria.⁵¹ A glutaminase apresenta-se sob a forma de, pelo menos duas isoenzimas: as glutaminases hepática e renal.⁵¹ O rim é rico em glutaminase do tipo “renal” que aumenta quando o órgão é submetido a acidose.⁵¹

A hidrólise da GLN a glutamato nos túbulos distais dos néfrons é a principal via de produção de NH_3 pelos rins.⁵⁷ O metabolismo oxidativo da glutamina nos rins gera fluxo de metabólicos para a gliconeogênese renal, que é responsável pela produção de cerca de 25% de

toda a glicose sistêmica.⁵¹ Em condições de acidose, quando a eliminação renal de NH_4^+ precisa ser incrementada, ocorre um aumento na gliconeogênese renal e o rim se torna o maior consumidor de glutamina no organismo.⁵¹

O receio de administrar glutamina se dissipou quando se comprovou que sua oferta era acompanhada de elevações modestas da amônia sanguínea e desprovida de efeito adverso significativo.⁵¹

Sabe-se que a GLN é utilizada em altas taxas pelo sistema imune, como linfócitos, macrófagos e neutrófilos, seja em uma resposta sistêmica ou local.⁵⁸

Evidências na literatura mostram que a GLN parece ter importante papel protetor na mucosa intestinal durante o trauma e injúrias graves.⁵⁹ A glutamina é fundamental para a produção de glutatona, como visto anteriormente, uma das mais importantes fontes endógenas de defesa antioxidante.⁵⁸ O glutamato, produzido através do metabolismo da glutamina, é precursor da síntese de glutatona.⁵⁸

1.5.1- ISQUEMIA/REPERFUSÃO RENAL E GLUTAMINA

A causa mais comum de falência renal aguda é a isquemia, a qual leva a piora da função renal através da combinação de vasoconstrição renal, obstrução tubular renal, perda de filtrado glomerular e diminuição na permeabilidade glomerular.³⁴ A diminuição do fornecimento de energia fosfato aumenta a concentração de cálcio intracelular, perda da função de síntese celular, ativação do processo degradativo da membrana, e geração de toxinas endógenas.^{26,33,34}

Vários trabalhos demonstram o efeito protetor do uso de substâncias antioxidantes no combate ao estresse oxidativo prevenindo ou atenuando o dano tecidual.^{39,59,60,61,62}

Dentre essas substâncias encontra-se a glutamina, que constitui o mais abundante aminoácido encontrado no sangue.⁶³ Uma das propriedades mais importantes da GLN é estimular a produção da glutatona.^{64,65}

Welbourne (1979)⁶⁶ demonstrou que quando o rim é submetido a um stress oxidativo, a síntese de GSH é regulada na dependência da quantidade de GLN.⁶⁶

Glutaciona é um potente antioxidante e também um importante fator no metabolismo de muitas drogas e substâncias endógenas.⁶⁷ Já se sabe que o pré-tratamento com GLN exerce um efeito protetor parcial renal na nefrotoxicidade induzida pela cisplatina em modelos animais.⁶⁸ Modelos de injúria intestinal e de fígado sugerem que o fornecimento de adequada quantidade de GLN pode aumentar o sistema GSH e sua habilidade em combater a lesão por I/R.^{69,70} Esses estudos tem demonstrado que o aumento da glutaciona total antes da injúria pode reduzir o dano celular.^{69,70}

Também já se sabe que a lesão provocada pela I/R não é somente no órgão lesado, mas atinge em fase posterior a todo organismo.^{25,26}

O significado desta lesão de I/R é manifestado em órgãos distantes através do intermédio de neutrófilos mediando a produção ROS.^{25,26}

Kramer e cols. (1999)⁷² demonstraram que a I/R renal leva a um aumento na permeabilidade vascular pulmonar mediada por macrófagos, assim como Hoke e cols. (2007)⁷¹, no entanto nenhum deles utilizou imunonutrientes na tentativa de prevenir ou reduzir tal estresse.^{71,72} Já Shin e cols. (1997)⁷³ realizaram I/R renal em ovelhas não se evidenciando disfunção pulmonar.⁷³

Aguilar e cols. (2007)⁷⁴ demonstraram que em rins submetido a isquemia, independente de ser frio ou quente, há uma queda nos níveis das substâncias antioxidantes.

O mecanismo de proteção, oferecido pela GLN, na lesão de I/R deve-se ao aumento dos “varredores” de radicais livres. GLN é essencial para a síntese de GSH. A severidade da

lesão por I/R no tecido intestinal, hepático e cardíaco tem sido correlacionado diretamente com o nível presente da atividade da glutathione intracelular.⁷⁵

Jia e cols. (2006)⁷⁰ levantaram a hipótese que a GLN poderia estimular a síntese de glicogênio e aumentar sua quantidade armazenada nos hepatócitos, reforçando a habilidade do fígado a suportar a isquemia.⁷⁰ Neste mesmo estudo concluiu-se que o pré-tratamento com GLN pode proteger a injúria hepática pela regulação da expressão do bcl-2 e proteína bax, as quais são responsáveis pela regulação da apoptose celular.⁷⁰

Não foram encontrados estudos que mostrem a ação da GLN quando administrada por via enteral, na I/R renal associado à preservação da capacidade antioxidante do organismo.

2 - JUSTIFICATIVA

Conforme observado por estudos anteriores a isquemia renal quente provoca prejuízo na função renal.^{23,24} Esse processo desenvolve-se de forma progressiva, sendo notado, que a partir de 30 minutos a recuperação renal se dará somente após três a nove dias e após 120 minutos esta função somente será recuperada parcialmente.^{23,24} A complexa fisiopatologia da falência renal aguda por isquemia inclui a inevitável fase de reperfusão associado com estresse oxidativo e disfunção celular.⁷⁶ Tal estresse oxidativo pode ser inibido ou pelo menos amenizado através de uma substância antioxidante.⁷⁴ Algumas substâncias já se mostraram protetoras da lesão renal por I/R quando administradas antes do ato cirúrgico.^{39,59-63}

A GLN é uma importante fonte de energia de muitas células além de ser precursor de nucleotídeos, glutamato, e GSH.⁶⁵ O sistema GSH é o maior mecanismo de redução do estresse oxidativo sendo que a GLN provêm a fonte de glutamato desse sistema.⁶⁵ Também se sabe que a GLN atenua a apoptose das células tubulares na lesão renal aguda e reduz o dano oxidativo na I/R hepática.^{30,77} Estudos mostram que a lesão provocada pela I/R não é somente no órgão lesado, mas posteriormente em todo organismo, levando inclusive a dano pulmonar.^{25,26,71,72}

A implementação de fontes de defesa antioxidante é um ponto passível de estudo, na busca de uma forma de diminuir a injúria oxidativa.

A isquemia renal produzida durante o transplante é um dos maiores responsáveis de lesão renal aguda.³ A I/R renal também ocorre durante revascularização de artéria renal, tratamento de aneurismas de aorta supra renal e nefrectomias parciais.^{5,6}

Partindo de tais premissas, propomo-nos a avaliar o estresse oxidativo e a capacidade antioxidante em um modelo experimental de isquemia renal por clampeamento do pedículo renal seguida de reperfusão. Para tanto, a dosagem dessa capacidade antioxidante após a reperfusão renal, torna-se mister. Para estimar a lesão tecidual renal utilizaremos o estudo histológico assim como para avaliar a lesão pulmonar.

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, em animais tratados por gavagem previamente com esse aminoácido.

Tal estudo é inovador ao investigar nesse modelo experimental a atividade da GLN, tendo-se em vista especialmente o seu uso pela via oral.

Seus resultados podem auxiliar na elucidação de pontos importantes acerca da participação do sistema de proteção antioxidante e sua influência nas lesões decorrentes da I/R, conhecimentos que poderão ser transferidos para a prática clínica em humanos.

Como, durante grande número de cirurgias renais, é freqüente o uso de clampeamento do seu pedículo, diferentes graus de I/R podem ser determinados, e o controle da sua severidade deve ser controlada, pois pode ser fator importante nos índices de morbidade e mortalidade. Caso a GLN demonstre possuir esta capacidade, poderá tornar-se um fármaco nutriente fundamental para esta finalidade.

3 - Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da suplementação de glutamina, no sistema antioxidante plasmático, na lesão tecidual renal e pulmonar, em ratos submetidos à isquemia renal seguida de reperfusão.

3.1 - Objetivos Específicos

Mensurar valores da capacidade antioxidante total, glutationala peroxidase e superóxido dismutase plasmática;

Mensurar alterações sangüíneas em marcadores bioquímicos sanguíneo (LDH, uréia e creatinina);

Avaliar as repercussões morfológicas à microscopia óptica do parênquima renal e pulmão.

4 - MATERIAL E MÉTODO

O experimento seguiu os princípios éticos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em animais da Universidade Estadual Paulista (UNESP). (Anexo 1)

4.1 - DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental em ratos, realizado no Laboratório de Investigação, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT).

O cálculo da amostra foi realizado levando-se em consideração o nível de creatinina como marcador de lesão renal, obtendo-se o número mínimo de oito animais.

Inicialmente, para fins de adaptação ambiental, os animais (N=33) permaneceram dois dias no Laboratório de Investigação sob ciclos de 12 horas de claro e escuro, temperatura ambiente controlada de 25°C, recebendo dieta (AIN-1993) *ad libitum*. Após esse intervalo de tempo, os animais foram mantidos em dieta zero para sólidos, por um período de 6 horas e posteriormente foram submetidos ao ato operatório sob anestesia geral.

A operação consistia de uma incisão no flanco direito do animal, com abertura de todos os planos até atingir a cavidade peritoneal. Posteriormente dissecou-se o rim direito

com tesoura e ligou-se o pedículo renal com fio de algodão 2-0 e retirou-se a peça cirúrgica (rim direito). Finalmente realizou-se a sutura em plano único da musculatura e pele com fio de nylon 3-0.

No oitavo dia de pós-operatório, os animais foram randomizados em três grupos, com 11 animais em cada grupo e que foram assim divididos: 1) grupo glutamina, 2) grupo albumina (grupo controle) e 3) grupo glicose (grupo sham). Cada grupo de animal recebeu uma dieta distinta, pelo período de sete dias e que foi administrada por gavagem. As dietas continham elementos diferentes, porém eram equivalentes em calorias. Nos grupos glutamina e albumina, a quantidade de proteína era semelhante.(figura 8).

Ao final do décimo - quarto dia da nefrectomia procedeu-se a laparotomia com incisão abdominal ampla, dissecação cautelosa do pedículo renal esquerdo em todos os grupos de animais e realização do clampeamento do mesmo nos grupos glutamina e albumina utilizando pinças vasculares por quarenta e cinco minutos e posteriormente liberado o pedículo renal para a realização da reperfusão do órgão. No grupo glicose (grupo sham) somente foi reparado o pedículo renal utilizando um fio de algodão 2-0 sem tracioná-lo, sendo o mesmo retirado após os quarenta e cinco minutos iniciais.

Em todo o período do experimento os animais mantiveram-se consumindo dieta AIN-1993 *ad libitum*. Todos os animais eram pesados no sétimo dia do pós operatório e avaliados a ferida cirúrgica. Animais com sinais de infecção na ferida cirúrgica ou identificados com uma alteração clínica eram excluídos do experimento.

Após uma hora da reperfusão houve a colheita de 5 ml de sangue da veia cava através de punção com agulha calibre 7 x 28 mm.

Todos os animais foram sacrificados logo após a colheita de sangue, utilizando anestésico inalatório (halotano) e realizada retirada do rim e pulmão para análise histológica.

	GLUTAMINA	ALBUMINA	GLICOSE
Calorias(Kcal)	400	350	400
Proteínas(gramas)	100(L-glutamina)	80	-
Sódio (mg)	-	307	-

FIGURA 8 - Valor calórico e nutricional das dietas complementares utilizadas nos animais.

FONTE: NUTERAL[®] LTDA, Advanced Products[®], Indústria Química Farmacêutica Cearense LTDA[®]

4.2 - ANIMAIS

Utilizou-se 33 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 280 a 320g.

4.3 - RANDOMIZAÇÃO E GRUPOS

Cada animal foi escolhido aleatoriamente a partir de sua gaiola, onde permaneceu durante o período de pós-operatório (PO) da nefrectomia direita. O mesmo pesquisador realizou um sorteio, no sétimo PO, 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 pertenceria ao GRUPO CONTROLE; 3 ou 4, GRUPO GLN; 5 ou 6, GRUPO SHAM. A caracterização dos grupos de estudo pode ser observada na figura 9.

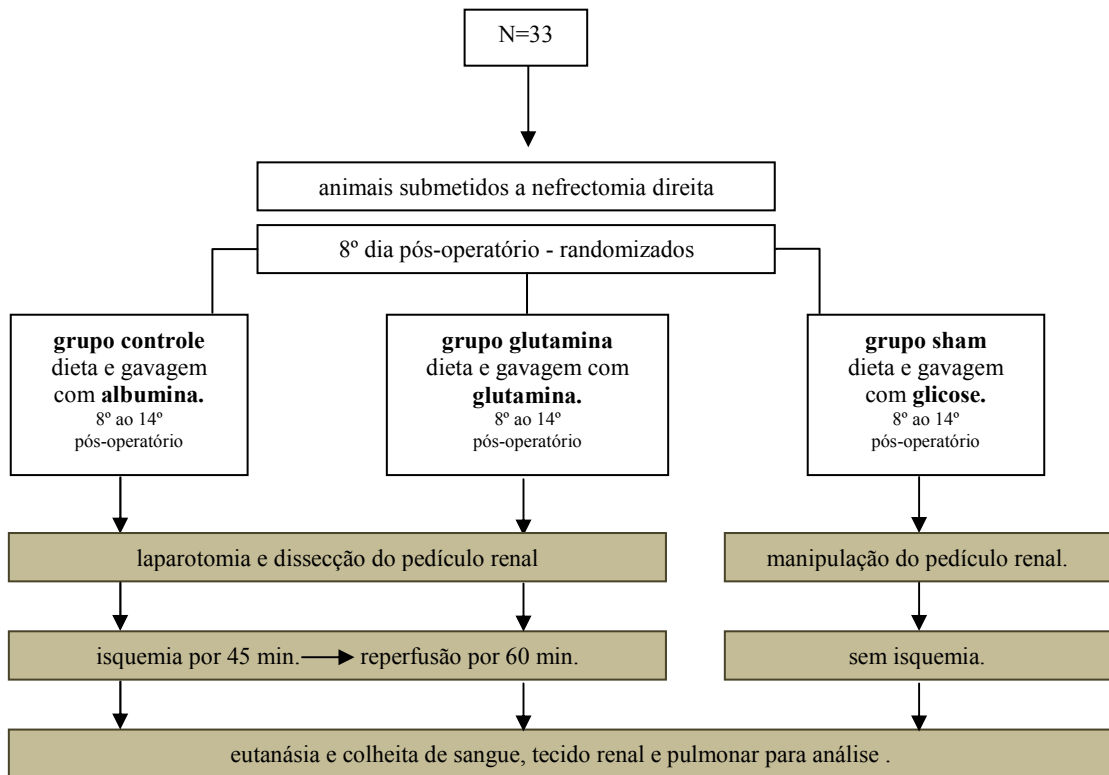


FIGURA 9 - Distribuição dos animais de experimentação em função dos grupos de estudo (N= 33). **FONTE:** Material da pesquisa.

4.4 - SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA GAVAGEM

Foram utilizados no experimento três tipos solução para aplicação enteral:

- Glicose 50%: Solução estéril e apirogênica, frasco ampola contendo 10 ml (Indústria Química Farmacêutica Cearense LTDA., Fortaleza-CE, Brasil). Utilizou-se 0,5g/kg;
- L-glutamina módulo de dieta enteral ou oral – L-GLUTAMINA[®], envelope 10 g (NUTERAL[®] LTDA, Fortaleza-CE, Brasil) Cada envelope com 10 g contém 10g de L-glutamina. A dose para cada animal

foi calculada em 0,5g/kg, portanto para uma animal de 300g (0,3kg), 0,150g de GLN, que foi devidamente pesada em balança de precisão e diluída em 2 ml de água destilada e instilado aos animais por gavagem.

- Albumina pura, clara de ovo concentrada em pó, (Advanced Products[®], Rio de Janeiro-RJ, Brasil) conteúdo 500g. Cada 100g contém 84 g de albumina. A dose para cada animal foi de 0,57g/kg, logo para um animal de 300 g(0,3kg) utilizou-se 0,171 g de albumina aferida em balança de precisão e diluída em 2ml de água destilada e instilado aos animais por gavagem.



FIGURA 10 – Técnica de gavagem. **FONTE:** Material da pesquisa.

4.5 - TÉCNICAS OPERATÓRIAS

Todos os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos anestésicos. As operações foram realizadas pelo mesmo cirurgião, que era cego em relação qual o grupo de

animais que estava operando. A sistematização da anestesia e do ato operatório, conforme o grupo de estudo, seguiu rigorosamente a mesma seqüência em todos os animais.

4.5.1 - ANESTESIA

Os animais receberam anestesia intramuscular de cloridrato de cetamina 100 mg/kg (Cloridrato de Cetamina, 50mg/ml - Ketalar®, Pfizer LTDA., Guarulhos-SP, Brasil) por via intramuscular tanto na primeira como na segunda cirurgia. A injeção de cloridrato de cetamina foi administrada na musculatura da coxa do membro posterior esquerdo do animal, utilizando-se seringa de 1 ml e agulha descartável 13x4,5; cerca de 10 minutos antes do início do ato operatório. Durante todo o experimento os animais foram controlados quanto à 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.

4.5.2 - 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.



FIGURA 11 – Técnica utilizada para anestésiar o animal.

FONTE: Material da pesquisa.

4.5.3 - OPERAÇÃO

O ato operatório obedeceu sistematicamente a 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, antissepsia 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.(figuras 12 e 13)



FIGURA 12 – Animal anestesiado, imobilizado e realizado anti-sepsia.
FONTE: Material da pesquisa.



FIGURA 13 – Animal com campo estéril e demarcação da incisão cirúrgica.
FONTE: Material da pesquisa.

4.5.3.1 - Operação 1

Realizou-se laparotomia em região de flanco direito mediana com cerca de 4 cm de extensão e breve inventário da cavidade abdominal.(Figura 14). Posteriormente procedeu-se a dissecação de todo o rim direito com tesoura de Metzenbaum e isolamento do pedículo renal com ligadura do mesmo utilizando fio de algodão 2-0. (figura 15) Retirou-se a peça cirúrgica (rim direito) e suturou-se a cavidade abdominal em plano único utilizando fio de nylon 2-0.(Figura 16)

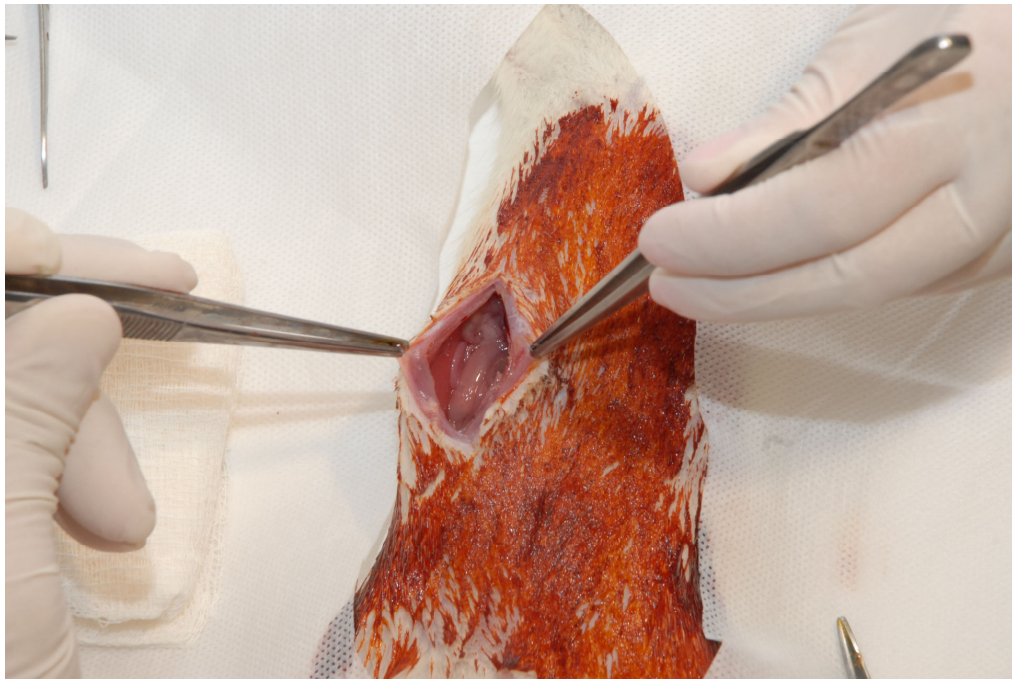


FIGURA 14 – Incisão em flanco direito com localização renal.
FONTE: Material da pesquisa.

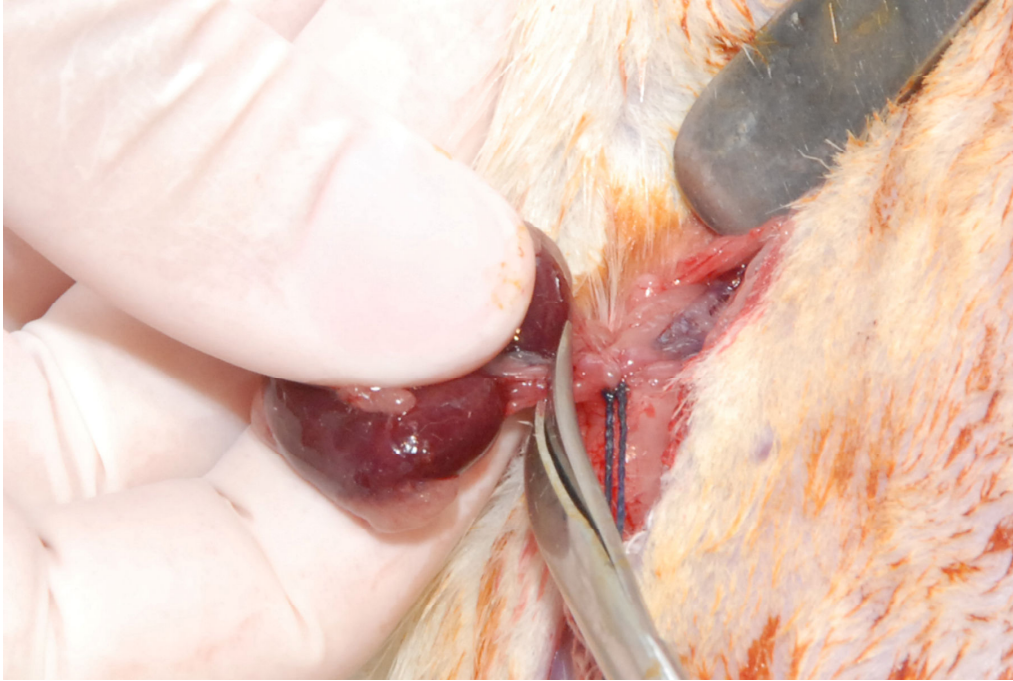


FIGURA 15 – Isolamento e ligadura de pedículo renal direito.
FONTE: Material da pesquisa.

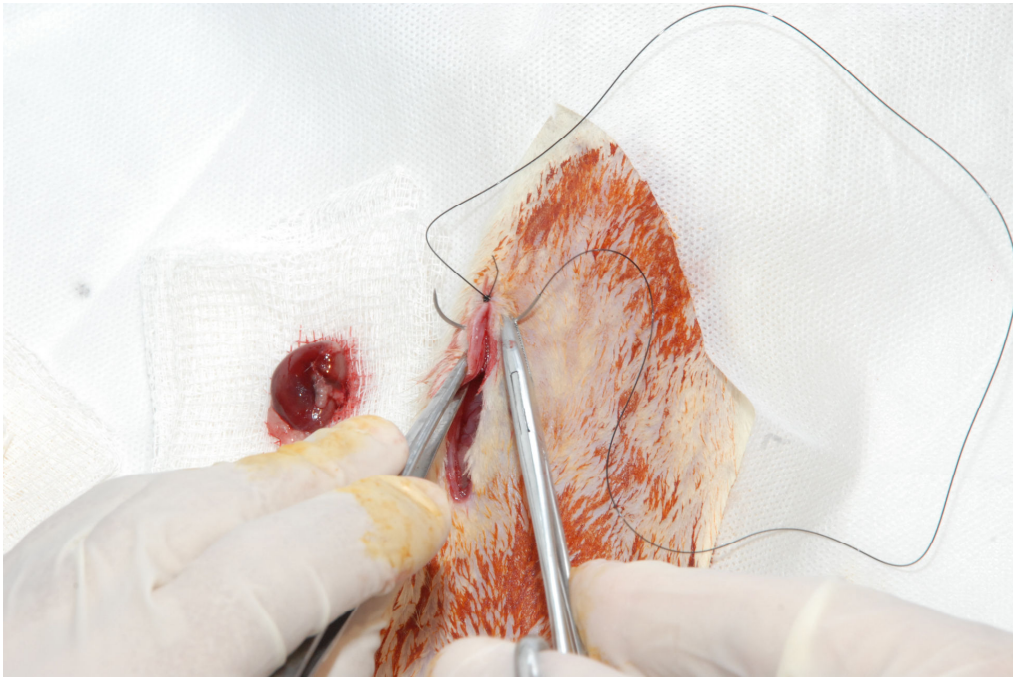


FIGURA 16 – Sutura de parede abdominal utilizando nylon 2-0.
FONTE: Material da pesquisa.

4.5.3.2 - Operação 2

Realizou-se laparotomia com incisão ampla e arciforme em todos os animais e posteriormente dissecou-se delicadamente o pedículo renal esquerdo.(figura 17) Nos animais dos grupos CONTROLE e GLN, procedeu-se o clampeamento do pedículo renal com pinça vascular atraumática. Acionou-se, neste exato momento, cronômetro digital, fixando-se em 45 minutos o tempo de isquemia. A isquemia renal foi constatada pela visível e bem definida alteração na coloração do órgão.

Ao completar 45 minutos (tempo de isquemia), o clamp vascular era liberado e, a partir de então, iniciava-se nova contagem, desta vez fixado em 60 minutos o tempo de reperfusão. A reperfusão renal foi constatada pelo retorno da coloração do órgão.

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), com a finalidade de evitar desidratação visceral excessiva.

Nos animais pertencentes ao grupo SHAM, após a laparotomia, foram realizados os mesmos procedimentos descritos para os demais grupos, porém, sem realização de clampeamento do pedículo vascular renal (somente reparo delicado com fio de algodão 2-0 sem tração).

Realizou-se liberação do reparo do pedículo renal após 45 minutos e aguardou-se mais 60 minutos para colheita do material e eutanásia do animal. Foram mantidas as mesmas condições operatórias que os demais grupos.



FIGURA 17 – Dissecção de rim esquerdo para posterior isolamento do pedículo renal.

FONTE: Material da pesquisa.

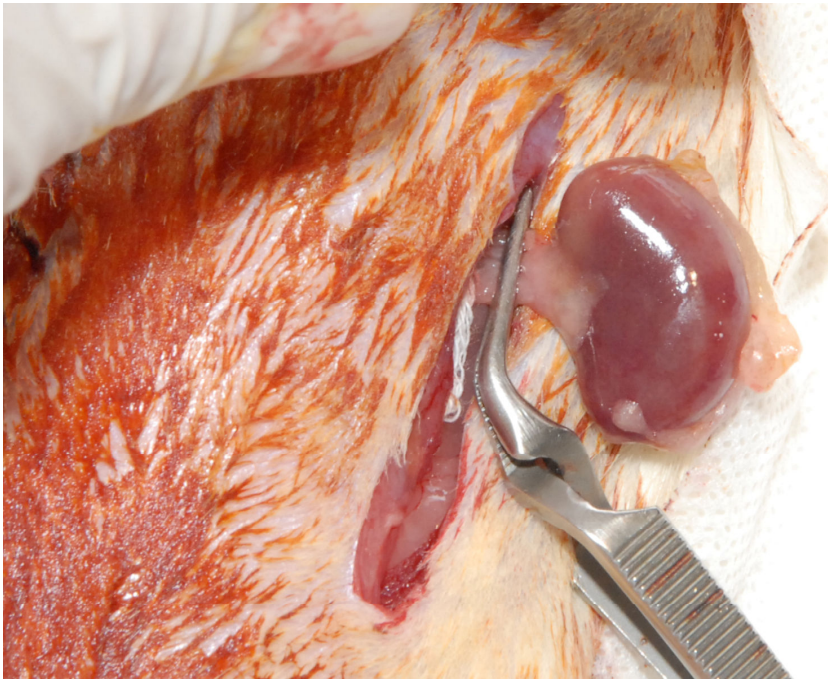


FIGURA 18 – Clampeamento do pedículo renal esquerdo e início da palidez

FONTE: Material da pesquisa.

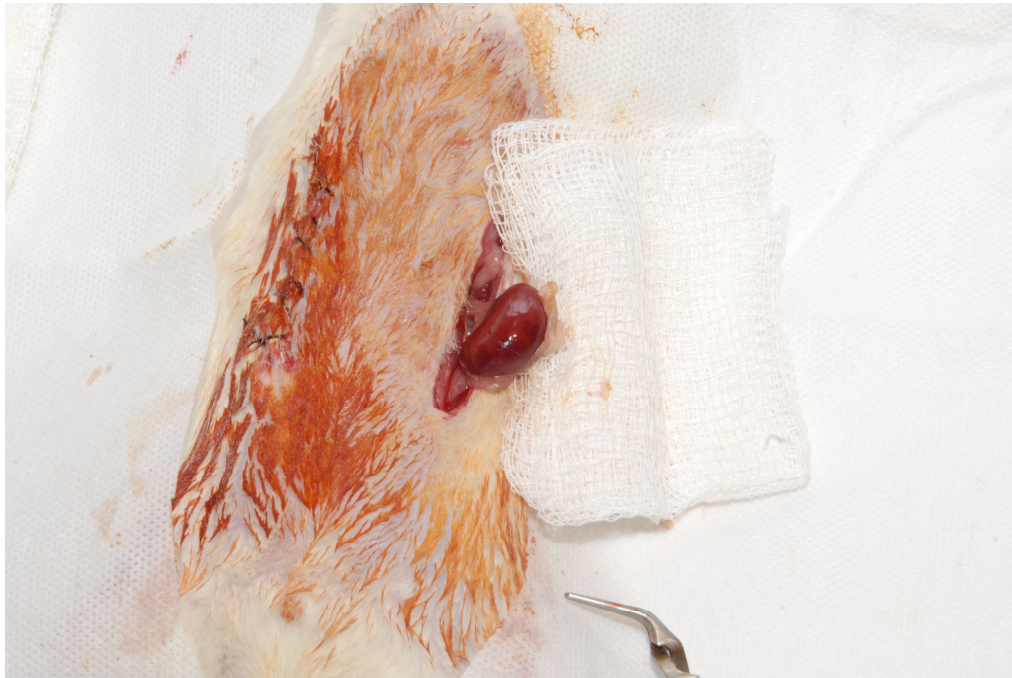


FIGURA 19 – Início do retorno a coloração normal do rim após retirada do clamp.
FONTE: Material da pesquisa.

4.5.4 - COLHEITA DE AMOSTRA DE SANGUE E EUTANÁSIA

Seguiram-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, coletou-se sangue por punção utilizando-se agulha 25x7mm acoplada a seringa de 5 ml. (figuras 20 e 21) 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. Após a colheita de sangue os animais foram sacrificados com inalação de halotano e colheita de rim e pulmão para estudo histológico.

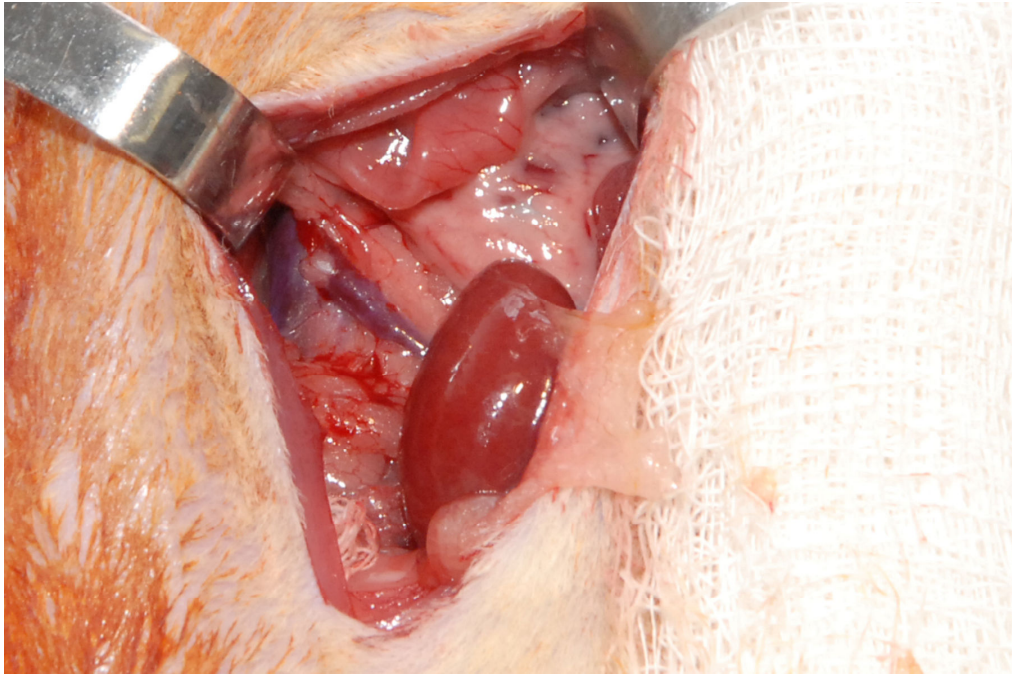


FIGURA 20 – Dissecção de cava para coleta da amostra sanguínea.

FONTE: Material da pesquisa.

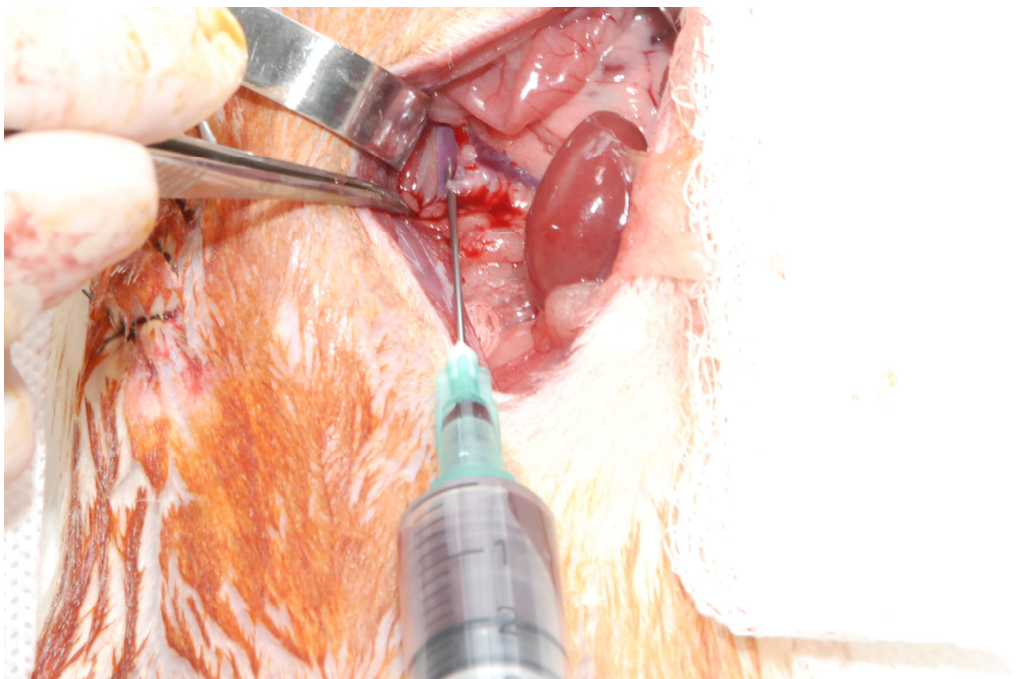


FIGURA 21 – Colheita de sangue da veia cava. **FONTE:** Material da pesquisa.



FIGURA 22 – Aspecto do laboratório de investigação, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal do Mato Grosso.
FONTE: Material da pesquisa.

4.6 – DOSAGENS BIOQUÍMICAS: DHL, URÉIA, CREATININA, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL, GLUTATIONA PEROXIDASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE

As dosagens bioquímicas automatizadas dos valores de LDH, uréia e creatinina, CAT, glutaciona peroxidase e superóxido dismutase foram realizadas no Laboratório Santa Rosa, em Cuiabá-MT. As dosagens foram realizadas utilizando kits da Randox realizados no aparelho Daytona. (figura 23) Todas as dosagens foram realizadas no mesmo dia da colheita do material.

	TAS	RANSEL	RANSOD
COMPONENTE MEDIDO	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL	GLUTATIONA PEROXIDASE	SUPERÓXIDO DISMUTASE
PRINCÍPIO DA MEDIDA	FORMAÇÃO DO RADICAL ABST	OXIDAÇÃO DO NADPH	MÉTODO XANTINA-OXIDASE
TIPO DE AMOSTRA	PLASMA OU SANGUE	SANGUE TOTAL	SANGUE TOTAL
PROCEDIMENTO AUTOMATIZADO	SIM	SIM	SIM

FIGURA 23 – Componente utilizado nas dosagens.
FONTE: SITE RANDOX.⁷⁸

4.7 – ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os rins e pulmões permaneceram por 48 horas em formaldeído tamponado a 10%, sendo posteriormente processados e emblocados em parafina.

O estudo histológico foi realizado no Serviço de Anatomia Patologia do Hospital Universitário Julio Muller/ UFMT, por um médico patologista experiente.

Os cortes histológicos foram feitos em micrótomo, com 4µm de espessura.

Os referidos cortes foram corados pela coloração de rotina – Hematoxilina e eosina (HE), sendo analisados segundo os seguintes critérios: Rim – edema de células tubulares, edema intersticial, dilatação tubular, necrose epitelial e casts hialino, como sugerido por Chander e cols. (2005).⁷⁹ Um mínimo de 10 campos por cada caso foi examinado. Lesões teciduais foram graduadas como: Sem alterações (0), alterações leves (+), alterações moderadas (++) , alterações severas (+++).

Em relação às lesões pulmonares, o parâmetro analisado foi o grau de edema intersticial. O edema foi graduado em: ausência de alterações (0), alterações discretas (+), se somente alterações focais eram presentes; alterações moderadas (++), se alterações multifocais estavam presentes; e alterações intensas (+++), se as alterações eram difusas, conforme preconizado por Greca e cols.(2008).⁸⁰

As avaliações histológicas foram feitas pelo mesmo observador que era cego em relação ao tratamento original dos tecidos.

4.8 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

Os resultados obtidos foram analisados quanto à distribuição normal com o teste de Ryan-Joiner comparado ao Shapiro Wilk.

Para comparação dos resultados, utilizou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, 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.

5 - RESULTADOS

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

Os resultados foram apresentados da seguinte forma: (“mediana” [“valor mínimo observado”-“valor máximo observado”] unidade medida).

5.1 - DOSAGENS BIOQUÍMICAS: URÉIA, CREATININA E DHL

O nível sérico de uréia foi semelhante entre os grupos; grupo glutamina (70[61-74] mg/dl), grupo sham (64 [53-75] mg/dl) e grupo controle (66[56-74] mg/dl).(p= 0,07 GLN x sham. p=0,13 GLN x CTL)(figura 24).

Da mesma forma os níveis séricos de creatinina se mostraram sem diferenças entre os grupos; grupos GLN (1,05[0,95-1,17 mg/dl), grupo controle (1,03[0,95-1,18]mg/dl) e grupo sham(0,96[0,67-1,12]mg/dl)(p=0,05 GLN x sham. p=0,77 GLN x CTL).(figura 25).

A dosagem de LDH foi significativamente menor no grupo sham (p<0,05) comparado com os grupos controle e GLN (controle = 1134 [555-1550] U/l, GLN =873 [696-1061] U/l e sham = 523 [378-736] U/l). Entre os grupos controle e GLN não se encontrou diferença significativa.(p=0,23).(figura 26).

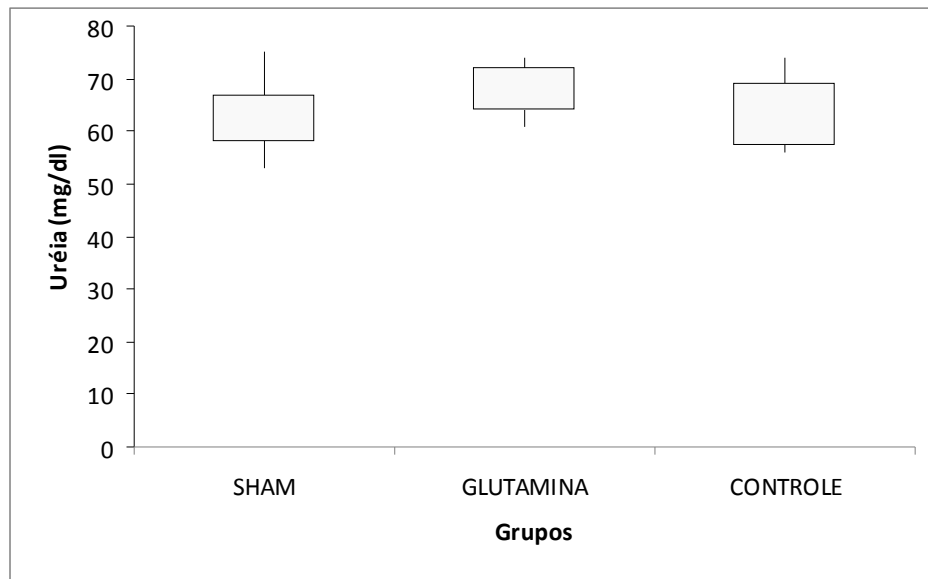


FIGURA 24 – Dosagem sérica de uréia nos diferentes grupos estudados.
FONTE: Material da pesquisa.

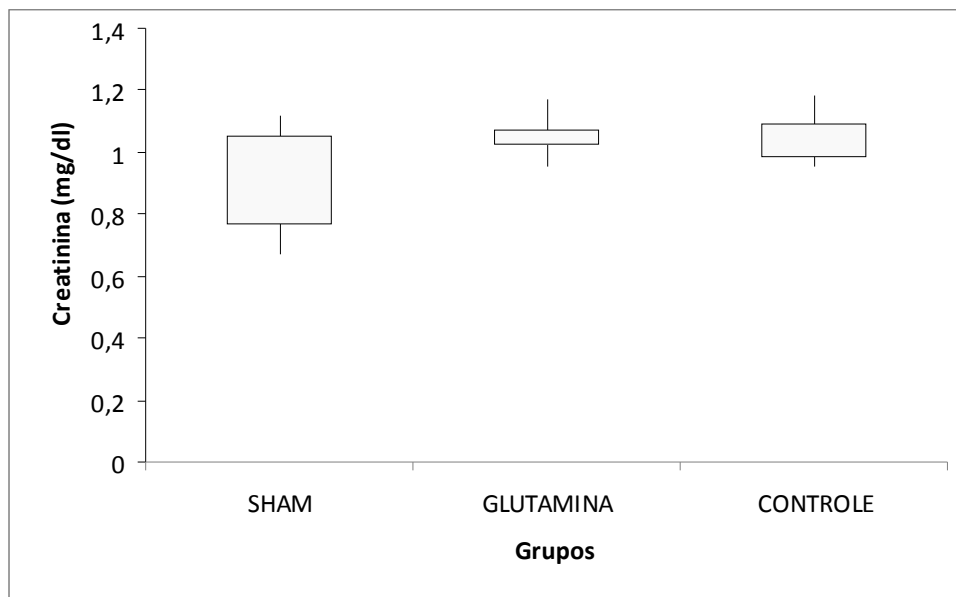


FIGURA 25 – Dosagem sérica de creatinina nos diferentes grupos estudados.
FONTE: Material da pesquisa.

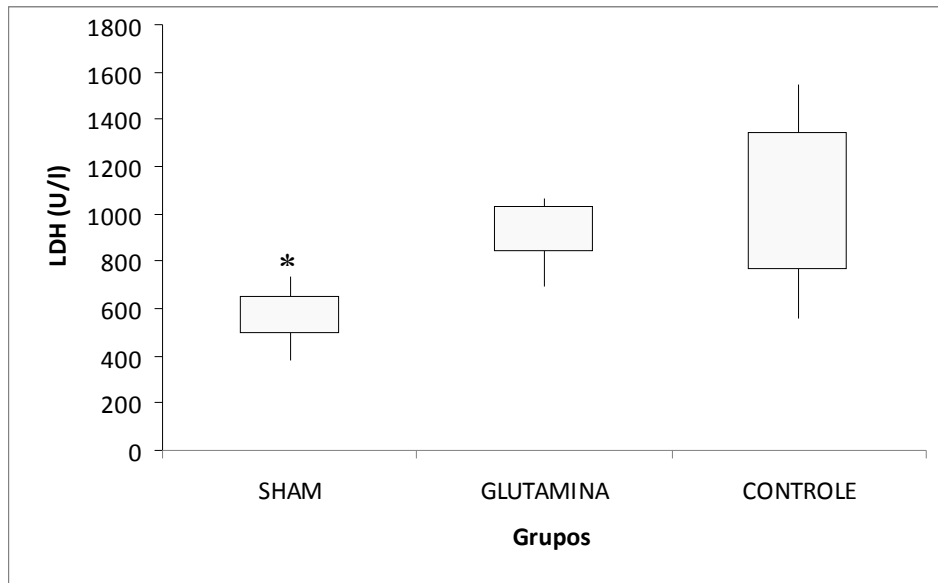


FIGURA 26 – Dosagem sérica de DHL nos diferentes grupos estudados.
* = $p < 0,05$ Sham vs Glutamina e Controle.
FONTE: Material da pesquisa.

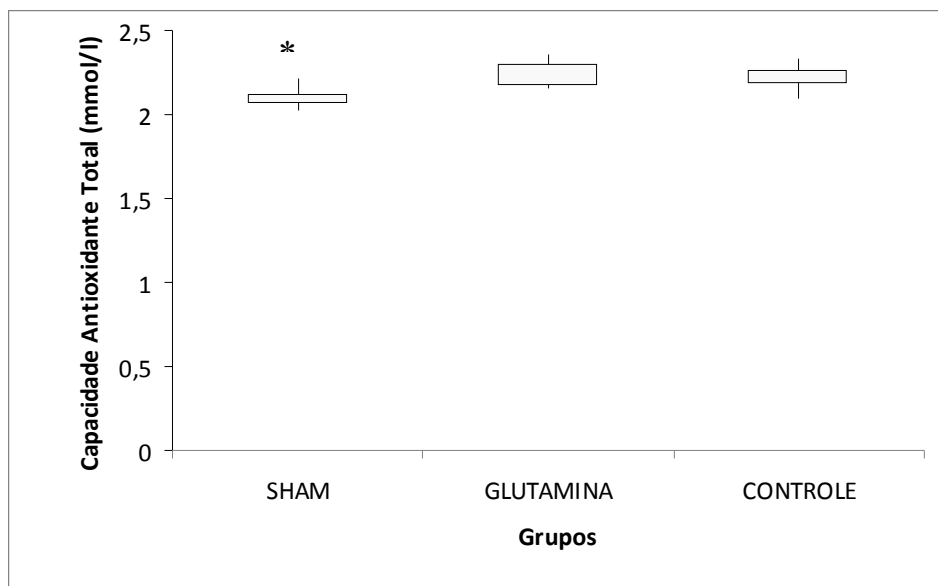


FIGURA 27 – Dosagem sérica de CAT nos diferentes grupos estudados.
* = $p < 0,05$ vs Grupo Glutamina e Controle vs sham.
FONTE: Material da pesquisa.

5.2 - DOSAGEM DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

Os níveis de CAT (figura 27) foram maiores no grupo GLN (2,22 [2,16-2,36] e grupo controle (2,22[2,09-2,33]mmol/ml em relação ao grupo sham (2,10 [2,02-2,21] mmol/ml, $p=0,05$).

5.3 - DOSAGEM DE GLUTATIONA PEROXIDASE e SUPERÓXIDO DISMUTASE

Os níveis de glutathione peroxidase nos grupos sham e glutamina mostraram-se mais elevados quando comparados com o grupo controle. (sham-13.365[8.440-18.000] U/L, GLN-12.439[9.592-13.154] U/L e controle- 10.721[7.975-11.783] U/L $p<0,05$). Entre os grupos sham e glutamina não houve diferença estatística. (figura 28)

Em relação à dosagem de superóxido dismutase houve uma diferença dos níveis do grupo sham (102 [86 –121,2] U/ml) quando comparado com os grupos GLN (86,4[58,8 – 107,6] U/ml e controle (86 [54,8-114] U/ml ($p<0,01$).

Não houve diferença estatística entre os grupos GLN e controle. (figura 29)

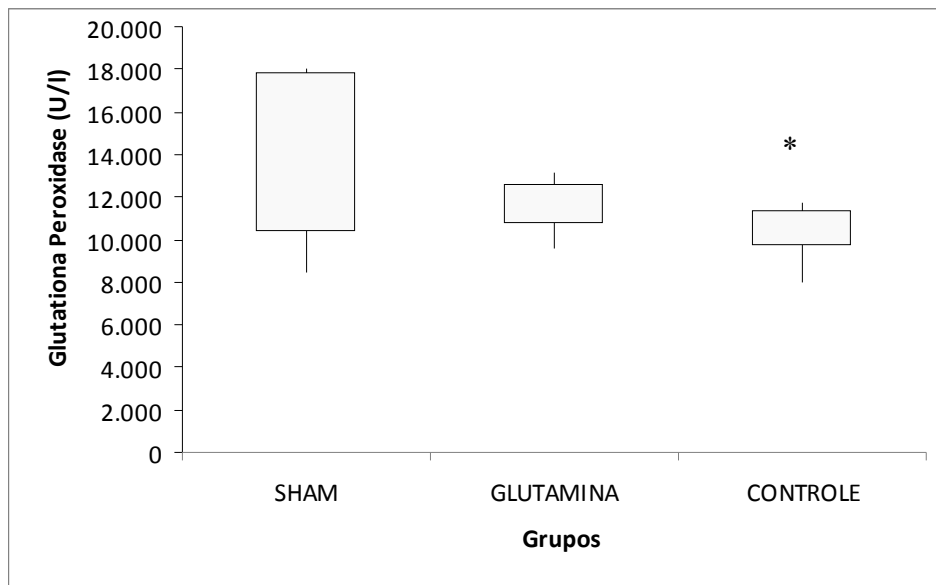


FIGURA 28 – Dosagem sérica de Glutathione Peroxidase nos diferentes grupos estudados.

* $p < 0,05$ Controle vs GLN e Sham.

FONTE: Material da pesquisa.

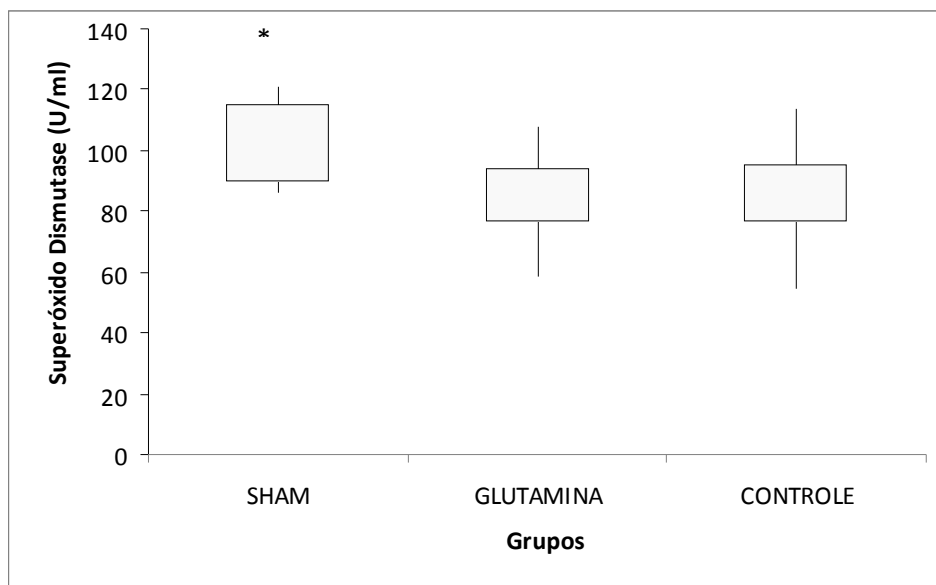


FIGURA 29 – Dosagem sérica de Superóxido Dismutase nos diferentes grupos estudados. * = $p < 0,05$ Sham vs GLN e controle. **FONTE:** Material da pesquisa.

5.4 – ANÁLISE MORFOLÓGICA À MICROSCOPIA ÓPTICA DO PARÊNQUIMA RENAL E PULMONAR

O grupo sham demonstrou alterações morfológicas de menor intensidade, tanto na análise renal quanto pulmonar, quando comparados com o grupo controle e GLN. Ao contrário, os rins do grupo de animais que receberam glutamina e grupo controle apresentaram alterações semelhantes e em graus parecidos como descritos nas figuras 31 a 35. Tais alterações incluíam edema das células tubulares, edema intersticial, dilatação tubular, casts hialino e moderada a severa necrose. As alterações histopatológicas foram graduadas e sumarizadas nas figuras 36 e 37.

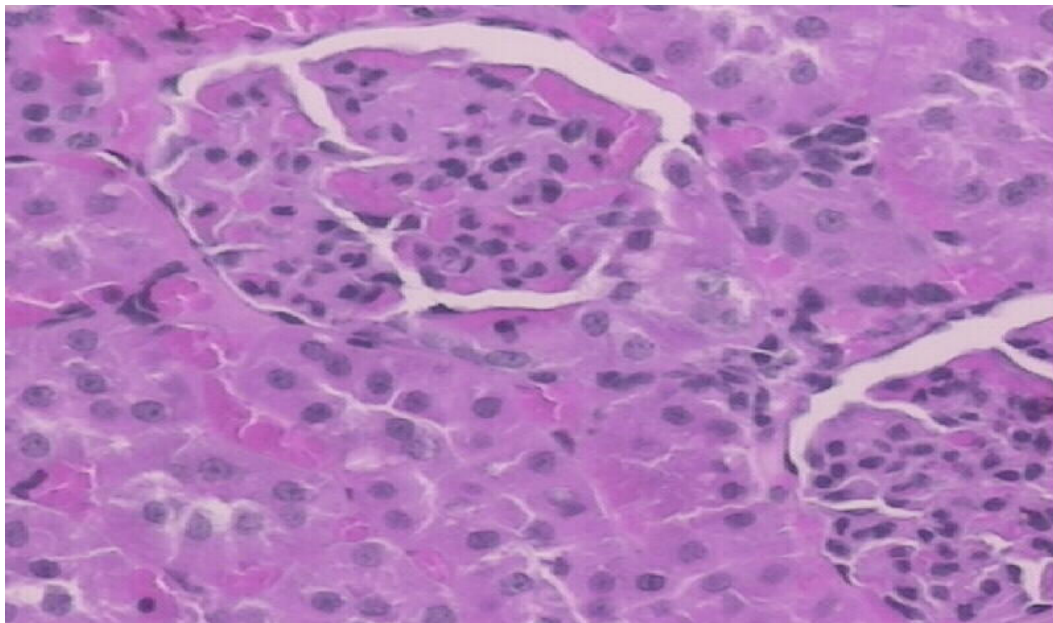


FIGURA 30 – Aspecto histológico renal do grupo sham. Parênquima renal sem alterações. Coloração HE (200X). Rato número 10.
FONTE: Material da pesquisa.

As alterações alveolares menos intensas no grupo sham. Em contraste nos animais do grupo glutamina assim como no grupo controle notaram-se alterações das estruturas

alveolares semelhantes e iguais intensidade. Essas se caracterizaram por edema septal, hemorragia e inflamação.

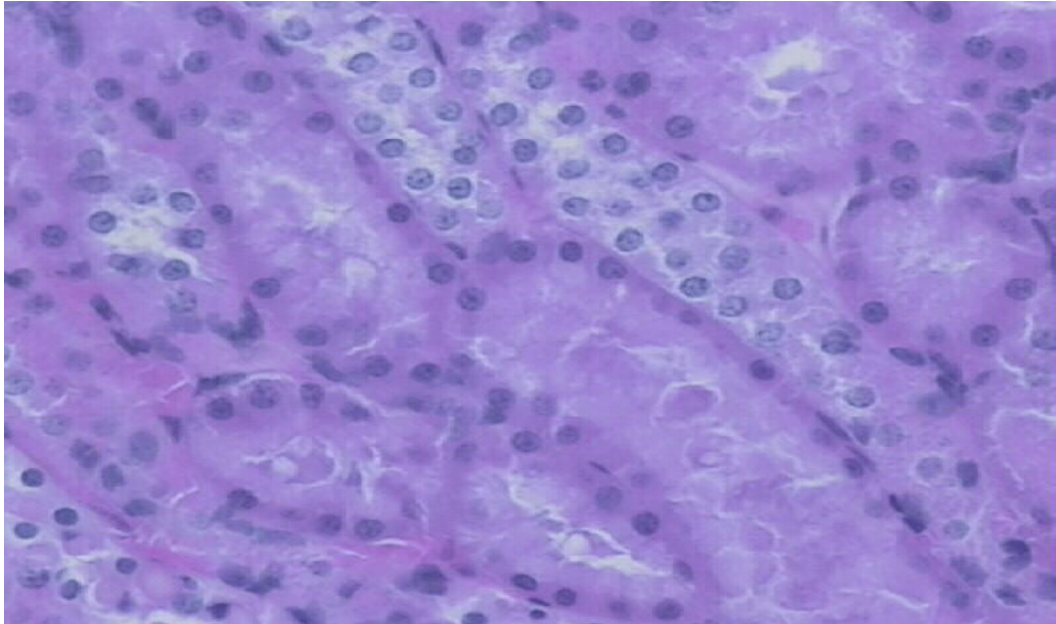


FIGURA 31 – Aspecto histológico renal do grupo GLN. Parênquima renal com áreas de casts hialinos . Coloração HE (200X). Rato número 11.
FONTE: Material da pesquisa.

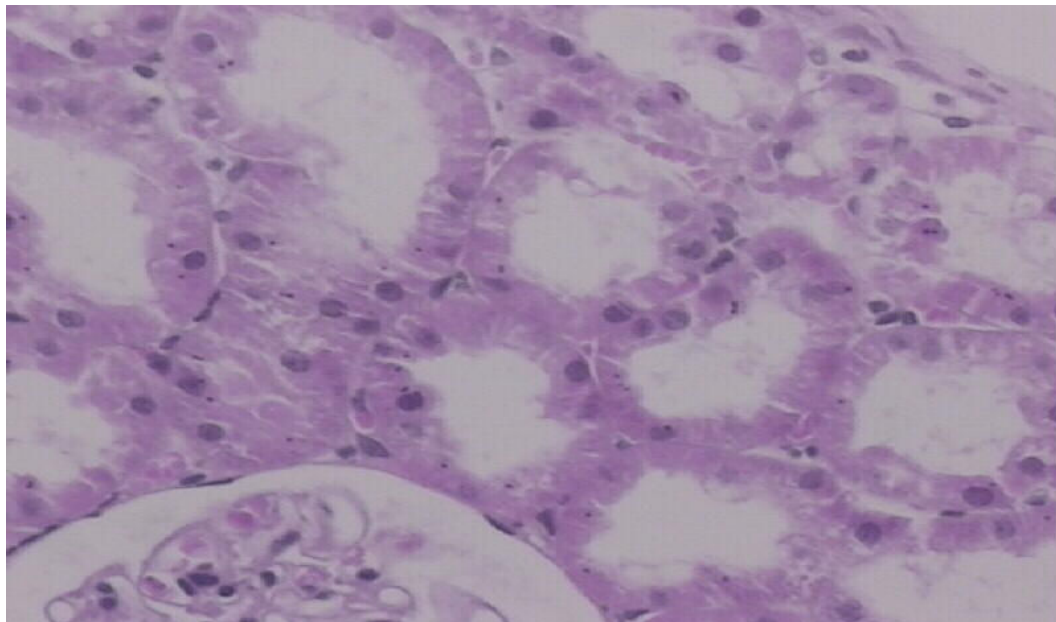


FIGURA 32 – Aspecto histológico renal do grupo controle. Parênquima renal com áreas de necrose tubular aguda. Coloração HE (200X). Rato número 1.
FONTE: Material da pesquisa.

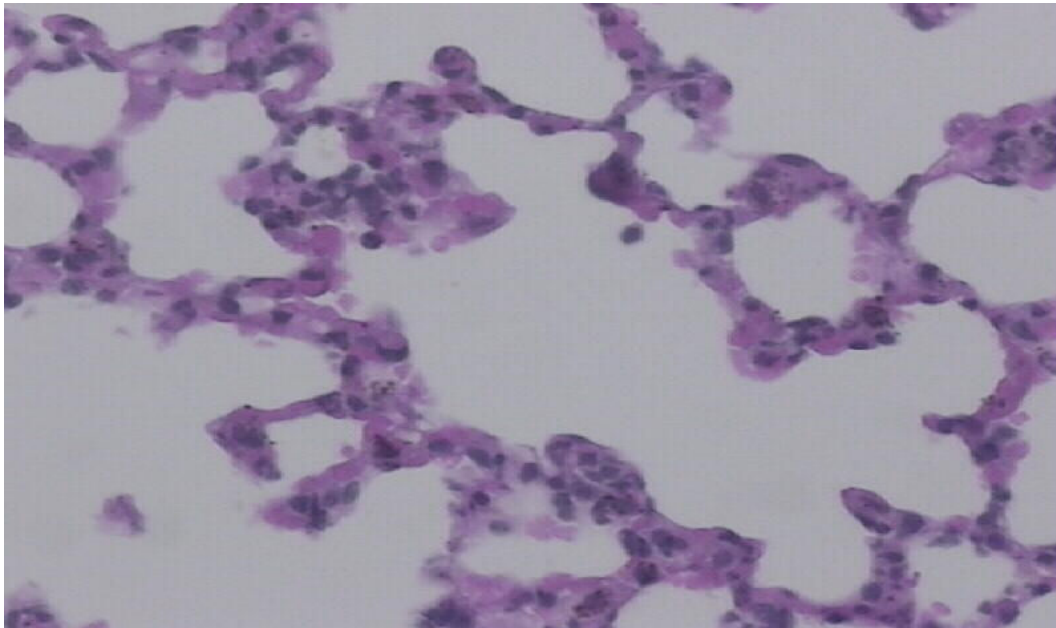


FIGURA 33– Aspecto histológico pulmonar do grupo sham. Parênquima pulmonar normal. Coloração HE (200X). Rato número 1.
FONTE: Material da pesquisa.

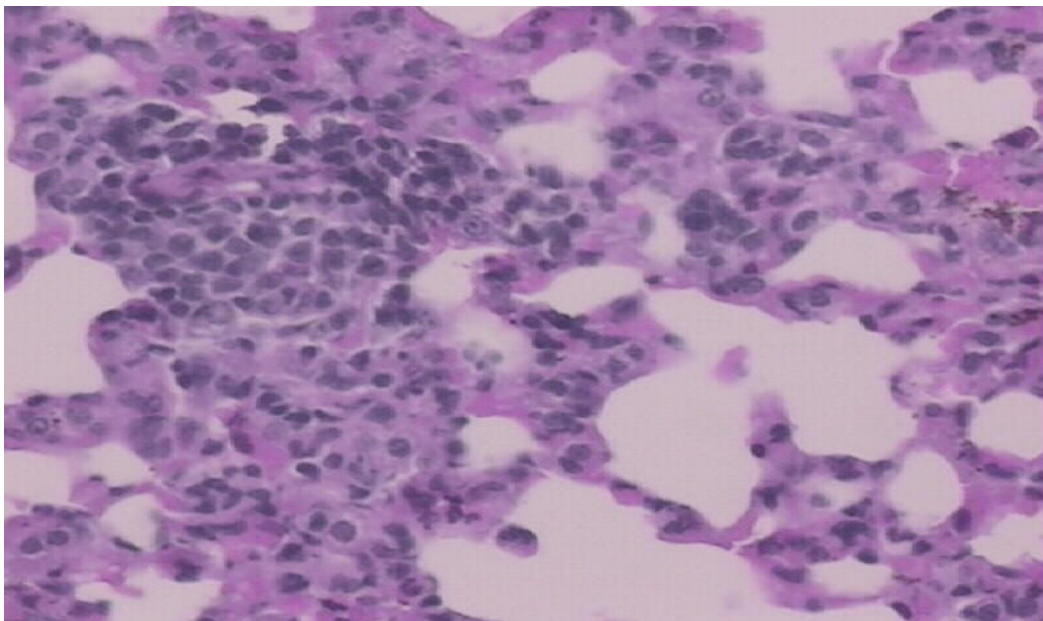


FIGURA 34 - Aspecto histológico pulmonar do grupo GLN. Parênquima pulmonar com infiltrado linfocítico intersticial discreto. Coloração HE (200X). Rato número 1.
FONTE: Material da pesquisa.

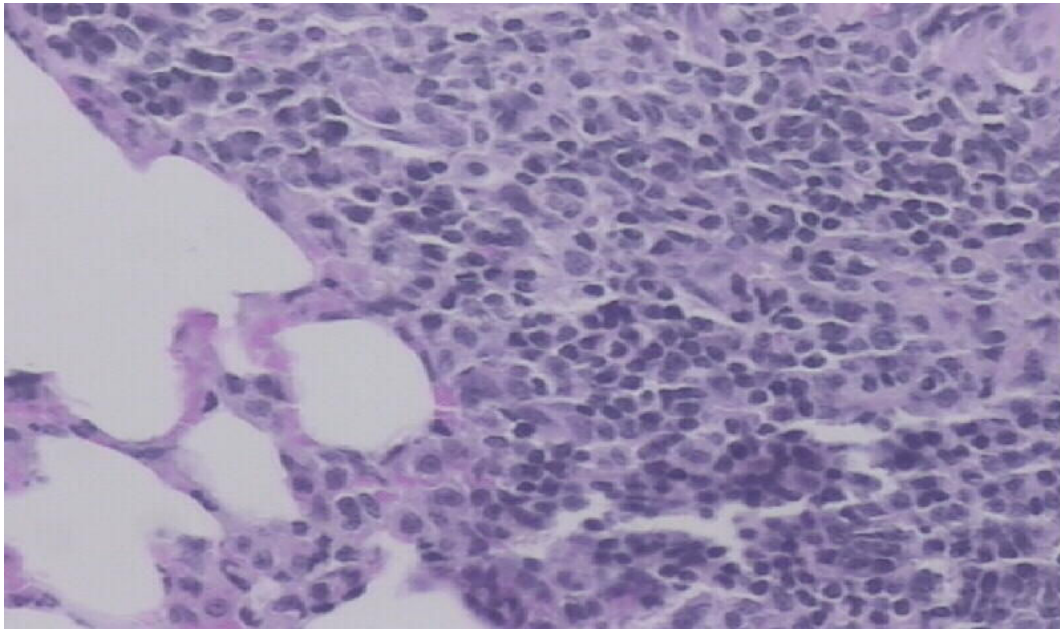


FIGURA 35 – Aspecto histológico pulmonar do grupo controle. Parênquima pulmonar com agregado linfóide perivascular. Coloração HE (200X). Rato número 2.
FONTE: Material da pesquisa.

	Edema de células tubulares	Edema intersticial	Dilatação tubular	Necrose de epitélio	Casts hialino
Grupo Glutamina					
Animal 1	++	+	0	+	0
2	+	0	+	+	+
3	++	+	++	+	0
4	+	0	+	0	+
5	+	+	0	+	+
6	+	+	+	+	+
7	+	+	0	0	0
8	+	0	+	+	0
9	+	+	+	+	0
10	++	+	+	+	0
11	+	+	+	+	+
Grupo Controle					
Animal 1	+	+	+	+	+
2	+	0	+	0	0
3	+	0	+	+	+
4	+	0	+	+	0
5	++	+	++	+	+
6	+	+	+	+	+
7	+	0	+	0	++
8	++	+	+	+	++
9	+	0	+	+	0
10	+	0	+	+	++
11	+	0	+	0	0
Grupo Sham					
Animal 1	0	+	+	0	0
2	0	+	++	0	0
3	0	0	+	0	0
4	0	0	+	0	0
5	0	0	+	0	0
6	+	0	0	0	0
7	0	+	+	0	0
8	0	0	+	0	0
9	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
11	+	0	+	0	0

FIGURA 36 - Alterações morfológicas no exame histopatológico dos rins de ratos submetidos a I/R renal e tratados com glutamina (GLN), albumina (controle) e glicose 50% (sham).

FONTE: Material de Pesquisa.

Grupo	Edema intersticial
GLN	
Animal 1	++
2	+
3	+
4	+
5	+
6	+
7	+
8	+
9	+
10	++
11	+
Controle	
Animal 1	+
2	++
3	+
4	+
5	+
6	+
7	+
8	+
9	+
10	+
11	++
Sham	
Animal 1	0
2	+
3	+
4	+
5	+
6	0
7	+
8	+
9	+
10	+
11	+

FIGURA 37 - Alterações morfológicas no exame histopatológico do parênquima pulmonar de ratos submetidos a I/R renal e tratados com glutamina(GLN), albumina (controle) e glicose 50% (sham).
FONTE: Material de Pesquisa.

6 - DISCUSSÃO

Desde a publicação das primeiras operações com a utilização do clampeamento do pedículo renal para controle vascular seja para transplante renal, nefrectomia parcial ou correção de aneurismas de aorta, tal manobra cirúrgica vem cada vez mais sendo amplamente utilizada. É notória a evolução da urologia ao longo do último século. À medida que se aumentou a complexidade dos procedimentos operatórios sobre o rim, e em particular com a advento da laparoscopia e sua integração a prática cirúrgica urológica, aumentou-se também o tempo da utilização do procedimento de isquemia renal e em particular o da isquemia quente.^{4,81}

Conseqüentemente, observou-se um interesse crescente no estudo das lesões decorrentes deste estado de isquemia, somando-se a este, as injúrias relacionadas à síndrome pós-reperfusão. Lesão por I/R é a maior causa de falência renal e rejeição do enxerto em transplantes renais.³ Tal agressão leva a produção de excesso de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de hidrogênio, causando stress oxidativo, resultando em alterações ao nível da fosforilação oxidativa mitocondrial, depleção de ATP, aumento no cálcio intracelular e ativação das proteínas quinases, fosfatases, proteases, lipases e nucleases levando a perda da integridade e função celular.²⁵

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 renal quente em cães.^{23,24}

Vários estudos experimentais em ratos utilizaram modelos de I/R renal associado à utilização de nutrientes com o intuito de diminuir a lesão renal.

Rhoden e cols. (2001)⁶¹ avaliaram os efeitos da L-arginina na I/R renal.⁶¹ A suplementação com tal aminoácido levou a uma maior lesão renal aferido pelo malondialdeído apesar de, paradoxalmente, haver uma melhora da função renal determinado pela dosagem de creatinina. Tal benefício foi constatado principalmente nas primeiras 96 horas de reperfusão.⁶¹ Guz e cols. (2007)⁸² utilizando modelo semelhante em ratos submetidos a isquemia/reperfusão renal, também demonstraram o efeito benéfico da taurina na preservação da função renal.⁸² Vários outros nutrientes foram pesquisados em estudos semelhantes no intuito de proporcionar maior preservação da função renal após I/R.^{39,59,60} Nesse rol de substâncias inclui-se até moléculas sintéticas como a mesna (2-mercaptoetano sulfonato) descrito por Kabasakal e cols. (2004)⁸³ prevenindo a lesão renal por I/R.⁸³

No presente estudo avaliou-se a preservação da capacidade antioxidante dos animais submetidos à isquemia e reperfusão renal com suplementação prévia de glutamina por gavagem.

A glutamina é um aminoácido usado como substrato energético de muitas células. É também precursor de nucleotídeos, sendo o mais abundante aminoácido livre encontrado no plasma e no corpo humano.⁶⁵ Uma das mais importantes características da GLN é a sua relação com a biossíntese de glutathione.⁶⁵ Glutamina provê glutamato para o sistema glutathione, o qual é uma das principais fontes da defesa antioxidante ao nível celular.⁶⁵ Glutamato é pouco transportado através das membranas; a glutamina, uma vez sendo facilmente transportada, serve como uma fonte intracelular de glutamato.⁶⁹ Deve-se lembrar que esse sistema antioxidante também é composto pela enzima glutathione peroxidase que é

responsável pela oxidação da glutathione reduzida catalisando a redução do peróxido de hidrogênio e uma variedade de hidroperóxidos orgânicos, utilizando a glutathione como agente redutor.⁴³

A dose de GLN utilizada é um fator de fundamental relevância.

Johnson e cols. (2003)⁸⁴ demonstraram que a suplementação de glutamina em modelos animais com câncer de mama, na dose de 1g/kg/ dia por duas semanas, eleva em cerca do duas vezes os níveis de glutathione em tecidos mamários.⁸⁴ Engel e cols. (2009)⁸⁵ também demonstraram que a administração de glutamina na dose de 0,5 g/kg/dia em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca mantém os níveis de glutathione após o ato cirúrgico.⁸⁵ Uma metanálise de Novak e cols (2002)⁸⁶, demonstrou que a dose mínima de 0,2 g/kg/dia é necessária para obtenção de algum efeito benéfico ao paciente crítico, sendo que a via parenteral, neste estudo, se mostrou com melhores resultados.⁸⁶ Baseado nisso, optou-se neste estudo por uma dose considerada alta de GLN da ordem de 0,5 g/kg de peso.

A via para administração de glutamina também merece considerações especiais. Como Luo e cols. (2008)⁸⁷ demonstraram não haver diferença na utilização da GLN parenteral ou enteral no tocante a capacidade antioxidante e diminuição do stress oxidativo.⁸⁷ Os mecanismos relacionados à preservação do sistema glutathione em situações envolvendo a injúria por I-R têm sido objeto de diversos estudos.

Sob condições normais a ligação do glutamato com a cisteína é o que limita a síntese de glutathione, entretanto foi demonstrado que a depleção de glutamina acarreta uma diminuição na taxa de glutathione intracelular.⁶⁹ O nível de glutathione é conhecido por progressivamente diminuir durante a isquemia com posterior retorno aos níveis basais na reperfusão.⁶⁹ Harward e cols. (1994)⁶⁹ demonstraram que a suplementação de GLN previamente a I/R intestinal preserva parcialmente a glutathione das células intestinais, e diminui a peroxidação lipídica, evidenciando um efeito protetor ao intestino nessa condição.⁶⁹

Jia e cols. (2006)⁸⁸ ao investigarem em modelo animal o efeito protetor do dipeptídeo alanil-glutamina contra a lesão hepática por isquemia e reperfusão concluíram haver uma maior tolerância do fígado a I/R quente e níveis elevados de glutathione nesses animais.⁸⁸ Nesse mesmo estudo não foi constatada a elevação dos níveis de superóxido dismutase nos ratos a que foram ofertados a alanil-dipeptidase.⁸⁸

Glutathione Peroxidase (GSHpx)

Neste estudo, a glutathione peroxidase apresentou-se com valores semelhantes entre o grupo sham e grupo GLN, sendo que o grupo controle demonstrou-se com nível estatisticamente menor que os demais. A partir dos resultados alcançados pode-se inferir que o stress oxidativo decorrente da lesão de I/R renal tenha levado a uma produção excessiva de ROS. Consequentemente é esperado um consumo dos estoques de glutathione no sentido de oxidar tais radicais. Animais que receberam suplementação de glutamina, podem ter formado maiores estoques de glutathione. Uma vez submetidos à lesão por I/R, esses animais demonstraram níveis séricos superiores de glutathione em relação aos animais que receberam suplementação de albumina. É interessante observar que os níveis de glutathione dos animais que receberam suplementação de glutamina equipararam-se aos níveis encontrados em animais pertencentes ao grupo sham e que, portanto, não sofreram lesão de I-R. Tais resultados são promissores em relação ao uso de glutamina para preservar os estoques de glutathione nessa situação específica.

O presente estudo parece ratificar o efeito benéfico da glutamina como agente protetor celular na isquemia/reperfusão. Esse mesmo efeito foi observado por Ezhilan e cols. (2008)⁸⁹ em células do miocárdio submetidos à injúria oxidativa. Este autor constatou elevação da glutathione total e glutathione peroxidase em animais tratados previamente com glutamina.⁸⁹

A atividade da enzima glutathione peroxidase é fundamental para o bom funcionamento da glutathione. Abilés e cols. (2008)⁹⁰ suplementando glutathione em pacientes graves demonstraram um aumento na glutathione peroxidase proporcional a elevação da glutathione, e relação inversa dos níveis dessa enzima com a peroxidação lipídica desses pacientes.⁹⁰ Resultado semelhante apresentou Kul e cols. (2009)⁹¹ utilizando glutamina enteral em modelos animais, com elevação da glutathione peroxidase e diminuição da peroxidação lipídica no intestino.⁹¹

Os achados deste estudo corroboram aqueles evidenciados em outros modelos experimentais (particularmente de I/R hepática e intestinal) onde a suplementação de glutamina preservou os níveis de glutathione total.^{69,70} Deve-se destacar que não há nenhum trabalho na literatura que utilize glutamina como antioxidante para I/R renal como proposto nesse modelo.

Contrariamente a tais achados, Gonzáles e cols. (2005)⁹² demonstraram que a administração de 300mg/kg/dia de glutamina por gavagem em ratos não eleva a atividade das enzimas glutathione reductase, catalase ou superóxido dismutase, apesar de conter a diminuição da glutathione e peroxidação lipídica em ratos submetidos a stress oxidativo.⁹² Tal discordância em relação aos resultados encontrados no presente estudo podem estar relacionado ao tempo de uso de glutamina. No estudo de Gonzáles a glutamina foi administrada por gavagem durante apenas um dia.⁹² Já no presente estudo a administração de glutamina deu-se por sete dias. Além disso, a dose aqui empregada (500mg/kg/dia) é superior àquela empregada pelo autor citado.

Capacidade Antioxidante Total (CAT)

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 antioxidantes.³³ A CAT tem a finalidade de mostrar a resposta do organismo ao agente agressor estudado, ou seja, aos radicais livres. Sabe-se que esta capacidade tem um limite.⁹³ Quando a produção de radicais livres sobrepuja a capacidade de defesa antioxidante, inicia-se o fenômeno do “stress oxidativo” resultando em distúrbio morfológico-funcional da célula lesada.⁹³ Neto e cols. (2005)⁹³ demonstraram que a CAT no músculo esquelético de ratos diminui acentuadamente após isquemia dos membros inferiores.⁹³ Cymrot e cols. (2004)⁹⁴ não observaram alteração em amostra do soro de ratos submetidos a retalhos cutâneos isquêmicos, no entanto a visualizaram nos tecidos após alguns dias da cirurgia.⁹⁴ Segundo estes autores, tal achado deve-se provavelmente ao fato de que as alterações antioxidantes ocorridas no retalho não sejam suficientes para serem evidenciadas na circulação sistêmica, ou estas alterações ocorreriam precocemente, não podendo ser visualizadas neste modelo experimental.⁹⁴

No modelo aqui empregado, a GLN mostrou preservar a capacidade antioxidante total do plasma. Tal efeito já foi anteriormente constatado por outros autores como Bicudo - Salomão e cols. (2007)³⁰ e Szijártó e cols. (2007)⁹⁵ em modelo animal de I/R hepática.⁹⁵ Isto pode estar relacionado a um aumento dos componentes antioxidantes presentes no plasma, destacando-se a glutatona, ou a uma inibição na produção de ROS diminuindo a demanda orgânica por antioxidantes.

Um achado interessante foi a constatação de valores semelhantes da CAT no grupo GLN e controle. Isso pode ser explicado pelo fato da albumina ser, conforme descrito por outros autores, também um agente antioxidante.⁹⁶⁻¹⁰⁰ A albumina contém 585 aminoácidos e

apresenta um peso de 66kDa.⁹⁶ É uma proteína altamente solúvel no plasma apresentando funções importantes no organismo. Dentre essas funções estão o transporte de ácidos graxos, colesterol, pigmentos de bile e drogas.⁹⁶ Em condições fisiológicas apresenta meia vida de vinte dias e a concentração plasmática representa o equilíbrio entre sua síntese pelo fígado e o seu catabolismo.^{96,97} A albumina é uma ativa molécula ‘redox’ e pode exibir atividade pró-oxidante através da redução do ciclo do ferro para o estado ferroso, modulando como um catalisador na reação de Fenton e potencial fonte de radical hidroxila.⁹⁸ Paradoxalmente ela tem a capacidade de se ligar a esse ferro e cobre reduzindo seus potenciais oxidantes.⁹⁹ Por outro lado a albumina representa um considerável agente antioxidante no plasma exposto a stress oxidativo contínuo.¹⁰⁰ Isto se deve, provavelmente pelo fato de estar contido em sua estrutura um derivado livre de cisteína, grupo thiol(-SH) que constitui-se em uma fonte de proteção antioxidante.¹⁰⁰

Faure e cols. (2008)¹⁰⁴ demonstraram a queda na capacidade antioxidante da albumina plasmática em pacientes com diabetes e melhora dessa capacidade nos tratados com metformina. Quinlan e cols. (2004)⁹⁸ demonstraram uma importante ocorrência de stress oxidativo em pacientes com síndrome da angustia respiratória aguda.⁹⁸ Nesses pacientes foi observado um efeito benéfico da administração de albumina através da melhora da capacidade antioxidante plasmática e redução da lesão oxidativa protéica.⁹⁸

Superóxido Dismutase (SOD)

Verificou-se uma atividade diminuída de SOD nos grupos GLN e controle em relação ao grupo sham. Tal comportamento é compatível com os resultados de outro estudo.⁸⁹ Jia e cols (2006)⁸⁸ igualmente não observaram elevação dos níveis de SOD após I/R hepática em ratos que utilizavam glutamina.⁸⁸

Levando-se em consideração que os genes de expressão da SOD são regulados por diversos fatores de transcrição, particularmente aqueles sensíveis ao stress oxidativo: AP-1 (activating protein 1) e NF-kB (fator nuclear kB) e que participam das decisões celulares como proliferação e crescimento, era de se esperar uma elevação dos seus níveis.¹⁰¹ Ahmet, apud Kahraman (2003)¹⁰², sugere que a SOD seja inativada por grandes cargas de radicais de oxigênio, diminuindo sua quantidade após isquemia/reperfusão.¹⁰² Por outro lado pode ter ocorrido um consumo grande dessa enzima na fase de reperfusão. Isso pode ser justificado uma vez que a SOD constitui-se em enzima antioxidante chave, neutralizando o radical superóxido, precursor molecular de todos outros ROS e seus derivados.

Uréia e Creatinina

A creatinina é um subproduto do metabolismo muscular.²¹ É quase totalmente depurada dos líquidos corpóreos por filtração glomerular.²¹ A transformação de creatina em creatinina acontece no tecido muscular, no qual 1%-2% da creatina livre se converte espontânea e irreversivelmente em creatinina todos os dias.¹⁰³ Logo, a quantidade de creatinina produzida é dependente da massa muscular e não apresenta grandes variações diárias.¹⁰³

A creatinina é filtrada livremente no glomérulo. Ao contrário da uréia, a creatinina é ativamente secretada em uma pequena parcela, mas o suficiente para superestimar a taxa de filtração glomerular (TFG).¹⁰³⁻¹⁰⁵ A quantidade secretada não é constante e depende do indivíduo e da concentração plasmática desse analito, dificultando sobremaneira a determinação de uma constante de secreção.¹⁰⁴ Sabe-se que é necessária uma redução superior a 50% na ultrafiltração glomerular antes que ocorra aumento na creatinina sérica.¹⁰⁴

Já a uréia é o principal metabólito nitrogenado derivado da degradação de proteínas pelo organismo, sendo 90% excretados pelos rins e correspondendo a aproximadamente 75% do nitrogênio não-protéico excretado.¹⁰³ O restante da uréia é eliminado basicamente pelo trato gastrointestinal e pela pele.¹⁰³ Após a lise das proteínas em aminoácidos, a biossíntese da uréia se dá exclusivamente em processo hepático intracelular, no qual o nitrogênio contido no aminoácido é convertido em uréia por um ciclo enzimático.¹⁰³

Apesar de ser filtrada livremente pelo glomérulo, não ser reabsorvida nem secretada ativamente, a uréia é um fraco preditor da TFG, pois 40%-70% retornam para o plasma por um processo de difusão passiva, que é dependente do fluxo urinário.^{103,105} Logo, a estase urinária leva a um maior retorno de uréia ainda nos túbulos renais e a uma subestimação da TFG calculada pelo clearance de uréia.¹⁰³ Outros fatores podem mudar significativamente os valores plasmáticos da uréia sem terem relação com a função renal, destacando-se a dieta e a taxa de produção hepática.¹⁰⁵ A principal utilidade clínica da uréia parece estar na determinação em conjunto com a creatinina.¹⁰³ A razão uréia sérica/creatinina sérica pode indicar estados patológicos diferentes.¹⁰³

Eschwége e cols. (1999)¹⁰⁶ demonstraram que a isquemia renal superior a 45 minutos provoca elevação da uréia e creatinina com maiores níveis após 48 horas de reperfusão os quais se normalizam após o décimo dia.¹⁰⁶ Paller e cols. (1984)³⁴ em estudo clássico onde isquemiaram o rim de ratos por 1 hora e reperfundiram por quinze minutos fornecendo a enzima SOD previamente, observaram menores níveis de creatinina nos animais tratados.³⁴ Tais diferenças foram mais intensas nas amostras coletadas após 24 horas de isquemia.³⁴

Tucci e cols. (2008)¹⁰⁷ evidenciaram proteção à isquemia renal por uma hora utilizando clorpromazina previamente; no entanto os níveis de uréia e creatinina elevaram-se após 24 horas de reperfusão.¹⁰⁷

No estudo aqui apresentado não se observou diferenças nos resultados de uréia e creatinina entre os grupos. Tal fato pode estar relacionado ao período de reperfusão mais curto, no caso, somente de uma hora. Soma-se a isso o fato já bem estabelecido pela literatura, da hipertrofia renal compensatória.¹⁰⁸

No modelo utilizado nesse estudo os animais permaneceram duas semanas com somente um rim. Segundo Garcia (1995)¹⁰⁹ as primeiras alterações nos níveis de uréia e creatinina ocorrem quando a função renal é comprometida acima de 50%.¹⁰⁹ Não se pode deixar de considerar a ação da glutamina como renoprotetor e da possível ação da albumina. Sabe-se que períodos de isquemia maiores levam a lesões mais intensa no parênquima renal.¹⁰⁵ Talvez se o período de isquemia fosse maior nesse estudo ter-se-ia uma diferença nos níveis de creatinina e uréia. Novos estudos nessa linha podem responder essa pergunta utilizando métodos mais sensíveis à aferição da filtração glomerular e conseqüente diagnóstico de alteração renal mais precoce.

Desidrogenase Láctica (DHL)

Quando os tecidos animais não podem ser supridos com oxigênio suficiente para suportar a oxidação aeróbica do piruvato e do NADH produzidos na glicólise, o NAD⁺ é regenerado a partir do NADH pela redução do piruvato a lactato.^{110,111} A redução de piruvato a lactato é catalisado pela enzima lactato desidrogenase (DHL), que forma o isômero L do ácido láctico.^{110,111} A enzima DHL se apresenta em pelo menos cinco formas moleculares diferentes, ou isoenzimas, com capacidades diferentes de promover a redução da concentração de piruvato.¹¹⁰

Nesse estudo, a isquemia renal esteve relacionada a um aumento significativo de DHL em relação ao grupo sham, sendo que houve um efeito protetor da glutamina, no entanto sem

significado estatístico. Tal fato foi observado em outros estudos de stress oxidativo não havendo benefício do uso da glutamina.³⁰

Neste estudo, a acidose (um dos principais componentes da síndrome de I/R), foi indiretamente demonstrada pela elevação dos valores de DHL maiores no grupo controle. 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 morte.²⁵ 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. Igualmente, fica a sugestão de que a GLN, atuando em nível celular, possa ter agido como fator de proteção.

Análise Histológica Pulmonar

A mortalidade da associação entre insuficiência renal aguda e falência respiratória aguda é extremamente alta pode-se aproximar a 80%.¹¹²

A injúria pulmonar tem sido observada após falência renal aguda isquêmica e é caracterizada por edema não cardiogênico e infiltração por neutrófilos.⁷¹ Também é de notório conhecimento que lesões de isquemia-reperfusão (fígado, rim, membros) causam lesões pulmonares. Devido à grande rede microvascular pulmonar, há uma intensa resposta a sinais inflamatórios com ativação de macrófagos situados nesse órgão, secretando citocinas pró inflamatórias, recrutando neutrófilos e macrófagos, resultando na lesão pulmonar.¹¹³ Neutrófilos, linfócitos T e B e macrófagos são importantes na patogênese da lesão por I/R.¹¹⁴ Neutrófilos marginais ao endotélio vascular ligam-se a microvasculatura e subsequentemente liberam radicais livres de oxigênio e proteases.¹¹⁴ Neutrófilos secretam citocinas incluindo

interferon (INF)- γ , 3, 4 interleucina (IL)-4,5 IL-6, 6IL-10,7 e o fator α de necrose tumoral (TNF-- α).¹¹⁴

Nesse estudo as alterações histológicas pulmonares foram de discreta intensidade (alteração focal), tanto no grupo GLN quanto no grupo controle sendo sensivelmente menos intensa no grupo sham. Isso é justificado pelo fato da reperfusão renal não ter-se estendido por um período de tempo maior. Deve-se destacar o fato da subjetividade de tais dados visto que a análise foi realizada por somente um patologista além de não haver uma análise estatística para os resultados coletados.

Hoke e cols. (2007)⁷¹ demonstraram a lesão pulmonar é independente do prejuízo da função renal aguda determinado pela lesão por I/R, mas sim devido ao contexto da resposta inflamatória.⁷¹

Kramer e cols. (1999)⁷² ressaltaram o aumento da permeabilidade vascular pulmonar após I/R renal.⁷² Tal aumento foi notado apenas após uma hora de reperfusão renal e apresentou seu pico com 48 horas, não estando presente após 96 horas.⁷²

Deng e cols.(2004)¹¹⁵ evidenciaram alterações na histologia pulmonar após 4 horas de reperfusão renal.¹¹⁵ Tais alterações compreendiam edema dos espaços intersticiais, aumento da celularidade intersticial e inflamação do espaço alveolar.¹¹⁵ Nesse estudo a utilização do hormônio estimulador de alfa melanócito, que age como uma anti-citocina, inibiu a lesão pulmonar após I/R renal.¹¹⁵

Guiqi (2009)¹¹⁶ também relata atenuação da injúria pulmonar em animais submetidos a I/R intestinal que foram previamente tratados com glutamina.¹¹⁶ O mecanismo dessa proteção é o aumento da expressão da proteína do choque inflamatório (HSP 70).¹¹⁶ Entretanto o modo pelo qual essa proteção é desencadeada ainda não está elucidado.¹¹⁶

Nesse ensaio nos permitimos sugerir que em estudos posteriores utilizando tal aminoácido, prolongue-se por maior tempo a reperfusão, a fim de comprovar o possível efeito benéfico da glutamina na injúria pulmonar.

Análise Histológica Renal

Neste estudo não houve diferença significativa em relação a análise histológica no grupo tratado com glutamina em relação ao grupo controle. Ambos apresentaram-se com lesões histológicas semelhantes e com a mesma intensidade.

É bem conhecido o fato de que alterações morfológicas compatíveis com necrose isquêmica de células tubulares renais são verificadas após pelo menos 30 minutos de isquemia e com mais de uma hora de reperfusão.^{26,117} As modificações, reflexo da irreversibilidade da injúria, consistem na presença de alterações nucleares como picnose, cariólise ou cariorréxis associada com a homogeneidade e acidofilia citoplasmática.¹¹⁸ Sabe-se que muitas vezes as células agredidas ainda conseguem sobreviver apresentando somente alterações subletais que consistem em degeneração hidrópica ou vacuolar com modificações metabólicas discretas, mas ainda compatíveis com a sobrevivência celular.

Entretanto, com o aporte de oxigênio, quando do restabelecimento do fluxo sanguíneo, as lesões se exacerbam pelo fato dessas células já estarem metabolicamente comprometidas não tendo, portanto, a capacidade de exercer suas funções no sentido de manter o equilíbrio iônico e suas defesas antioxidantes.¹¹⁸ Associado à morte celular por necrose, genes reguladores da apoptose também são ativados culminando com a perda maior de células ao longo dos segmentos dos néfrons o que contribui para o estabelecimento da insuficiência renal.¹¹⁹

Fuller e cols.(2007)¹¹ obtiveram em seu estudo benefício com a administração prévia de glutamina a rins de ratos submetidos a transplante.¹¹ Nesse caso houve um efeito protetor histológico principalmente na diminuição da apoptose celular renal, com conseqüente diminuição de necrose tubular.¹¹

Talvez essa diferença em relação ao atual estudo se dê pelo fato do maior tempo para realizar a análise histológica, pois o órgão permaneceu em conservação hipotérmica por 40 horas e após 24 horas de pós transplante (reperfusão) houve a análise. Podemos inferir que quanto maior o tempo de reperfusão mais significativa será a atuação do agente protetor utilizado previamente.

Efeito benéfico da L-alanil-glutamina também foi verificado por Stangl e cols.(2009)¹²⁰ em estudo histológico de tecido hepático submetido a I/R. Neste caso o estudo se deu após 24 horas de reperfusão hepática.¹²⁰

Partindo do resultado desse estudo apresentado, propõe-se, no futuro, maior tempo de reperfusão, para a partir daí investigar se há comprovação histológica do benefício verificado na atividade antioxidante sistêmica por parte desse aminoácido.

Enfim esse estudo utilizando glutamina propõe uma conduta inovadora a fim de beneficiar, em última instância, pacientes que serão submetidos a procedimentos cirúrgicos onde se fará necessário a I/R renal, bem como os que serão submetidos a transplante renal. Deve-se atentar ao fato que estudos recentes propõem pré-condicionamento isquêmico em órgãos que serão submetidos ao estresse da I/R.¹²¹ Tal pré-condicionamento significa indução de um pequeno período de isquemia seguido por pequeno período de reperfusão antes de um período mais longo de isquemia.¹²¹ O papel do pré-condicionamento isquêmico no aumento da tolerância à isquemia tem sido descrito em vários órgãos como coração, cérebro, medula espinhal, músculo esquelético, retina, rins, intestino, além de fígado.¹²¹ Entretanto, apesar de

estudos sobre o porquê do efeito protetor do pré-condicionamento isquêmico e seu real fundamento não esta ainda claramente estabelecido.¹²¹

Diante disso, sugere-se, em estudos posteriores, unir a utilização de glutamina com o pré-condicionamento isquêmico, de modo a potencializar seus efeitos benéficos e com isso minimizar a lesão advinda da I/R renal.

7 - CONCLUSÃO

Neste modelo de isquemia renal por clampeamento do pedículo seguido de reperfusão concluimos que:

1. O uso pré evento de GLN melhora o sistema antioxidante, pois foi associado a uma preservação da CAT e a uma elevação da glutathione peroxidase.

2. A GLN não mostrou melhora em relação as outras variáveis estudadas, inclusive nas lesões histológicas no rim e no pulmão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- ¹ - Barry JM, Jordan ML, Conlin MJ. Renal Transplantation. In : Wein, AJ. Campbell-Walsh Urology. 9^a ed. Philadelphia: Saunders Elseviers; 2007. 1295-324.
 - ² - Sesso R, Gordan P. Dados disponíveis sobre a doença renal crônica no Brasil. J Bras Nefrol. 2007; 24(1):9-12.
 - ³ - O'Valle F, Del Moral RGM, Benitez MDC, Martín-Oliva D, Gómez-Morales M, e cols. Poly[ADP-Ribose] polymerase-1 expression is related to cold ischemia, acute tubular necrosis, and delayed renal function in kidney transplantation. 2009. Disponível em; <<http://www.plosone.org/article/info:doi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0007138>>. Acessado em 20 de novembro de 2009.
 - ⁴ - Giessing M. Laparoscopic living-donor nephrectomy. Nephrol. Dial. Transplant. 2004; 19(4):36-9.
 - ⁵ - Desai MM, Gill IS, Ramani AP, Spaliviero M, Rybicki L, Kaouk JH. The impact of arm ischemia on renal function after laparoscopic partial nephrectomy. BJU Int. 2004; 95:377-83.
 - ⁶ - Chander V, Chopra K. Renal protective effect of molsidomine and l-arginine in ischemia-reperfusion induced injury in rats. J.Surg.Res. 2005; 128:132-9.
 - ⁷ - Karaman A, Turkmen E, Gursul C, Tas E, Fadillioglu E. Prevention of renal ischemia/reperfusion-induced injury in rats by leflunomide. Int. J. Urol. 2006; 13(11):1434-41.
 - ⁸ - Kosieradzki M, Rowinski W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. Transplant. Proc. 2008; 40(10):3279-88.
 - ⁹ - Singer P, Cohen J, Cynober L. Effect of nutritional state of brain-dead organ donor on transplantation. Nutrition. 2001; 17(11-12):948-52.
 - ¹⁰ - Schuster H, Blanc M, Bonnefont-Rousselot D, Nakib S, Tourneau AL, Fürst P e cols. Protective effects of glutamine dipeptide and α -tocopherol against ischemia-reperfusion injury in the isolated rat liver. Clin. Nutr. 2009; 28(3):331-337.
 - ¹¹ - Fuller TF, Rose F, Singleton KD, Linde Y, Hoff U, Freise CE e cols. Glutamine donor pretreatment in rat kidney transplants with severe preservation reperfusion injury. J Surg. Res. 2007; 140(1):77-83.
 - ¹² - Mora LO, Antunes LMG, Francescato HDC, Bianchi MLP. The effects of oral glutamine on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. Pharmacol Res. 2003; 47(6):517-22.

-
- ¹³ - Silva MM. História e desenvolvimento da urologia: visão sintética. *Acta Urol Port.* 2002; 19(1):25-30.
- ¹⁴ - Neuburger M, Riesman D. The early history of urology. *Bull Med Libr Assoc.* 1937; 25(3):147-65.
- ¹⁵ -Bezerra JEF. Dosagem, in vivo, de metabólitos sanguíneos e tissulares de ratos submetidos a isquemia renal e a reperfusão durante a oferta de l-alanil-glutamina[tese mestrado]. Fortaleza(CE). Universidade Federal do Ceará; 2004. Disponível em; < http://www.uece.br/ppgcv/dmdocuments/erika_menezes.pdf>Acesso em: 14 de julho de 2010.
- ¹⁶ - Uzzo RG, Novick AC. Nephron sparing surgery for renal tumors: indications, techniques and outcomes. *J Urol.* 2001; 166(1):6-18.
- ¹⁷ -Starz TE, Barcker C. The origin of clinical organ transplantation revisited – commentary. *JAMA.* 2009; 301(19):2041-43.
- ¹⁸ - Novick AC, Strem S, Montie JE, Pontes JE, Siegel S, Montague DK, Goormastic M. Conservative surgery for renal cell carcinoma : a single-center experience with 100 patients. *J Urol* 2002(2pt2); 167:878-82.
- ¹⁹ - Gardner E, Gray DJ, Rahilly RO. *Anatomia.* 4ª ed. Rio de Janeiro(RJ): Guanabara Koogan;1988.
- ²⁰ - Sampaio FJB, Favorito LA, Costa WS. *Anatomia renal para urologia.* 1ª ed. Rio de Janeiro(RJ): Gráfica e Editora Prensa; 2007.
- ²¹ - Guyton AC. *Tratado de fisiologia médica.* 11ª ed. Rio de Janeiro (RJ). Elsevier Editora Ltda; 2006.
- ²² - Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, Guild WR. Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *JAMA.* 1956; 160:277-82.
- ²³ - Ward JP. Determination of optimal temperature for regional hypothermia. *Br J Urol.* 1975; 47:17-24.
- ²⁴ - Novick AC. Renal hypothermia in vivo and ex-vivo. *Urol Clin North Am.* 1983; 10(4):637-44.
- ²⁵ - Granger DN, Korthuis JR. Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. *Annu Rev Physiol.* 1995; 57:311-32.
- ²⁶ - Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Robbins Patologia estrutural e funcional.* 6ª ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan; 2000.
- ²⁷ - Silveira M, Yoshida WB. Isquemia e reperfusão em músculo esquelético: mecanismo de lesão e perspectivas de tratamento. *J Vasc Br.* 2004; 3(4):367-78.

-
- ²⁸ - Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol.* 2000; 190:255-66.
- ²⁹ - Évora PRB, Pearson PJ, Seccombe JF, Schaff HV. Lesão de isquemia-reperfusão. Aspectos fisiopatológicos e a importância da função endotelial. *Arq. Bras. Cardiol.* 1996; 66(4):239-45.
- ³⁰ - Bicudo-Salomão, A. O uso enteral de glutamina durante isquemia/reperfusão hepática diminui os níveis de malondialdeído, aspartato aminotransferase e mantém a capacidade antioxidante total do plasma [tese mestrado]. Cuiabá(Mato Grosso). Universidade Federal de Mato Grosso;2007.
- ³¹ - Ribeiro ME, Yoshida WB. Lesões intestinais decorrentes de isquemia e reperfusão: fisiopatologia e modelos experimentais. *J Vasc Br.* 2005; 4(2):183-94.
- ³² - Gourdim MJ, Bree B, De Kock M. The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel. *Eur J Anaesthesiol.* 2009; 26(7):537-47.
- ³³ - Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Benfato VMMS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova Brasil.* 2007; 30(5):1323-38.
- ³⁴ - Paller SM, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure. *J Clin Invest.* 1984; 74(4):1156-64.
- ³⁵ - Lima SE, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev Bras Cienc Farm.* 2001; 37(3):293-303.
- ³⁶ - Junior JF, Percário S. Protocolos de consenso. 2005. Disponível em: <<http://www.medicinacomplementar.com.br/temaSET05.asp>>. Acesso em 10 de fevereiro de 2009.
- ³⁷ - Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Ass. Med. Brasil.* 1997; 43(1):61-8.
- ³⁸ - Jordão AAJ, Chiarello PG, Bernandes MSM, Vannucchi H. Lipid Peroxidation and ethanol: role of vitamin E and glutathione. *Medicina, Ribeirão Preto.* 1998; 31:434-49.
- ³⁹ - Gurel, A, Armutcu F, Sahin S, Sogut S, Ozyurt H, Gulec M, Kutlu NO, Akyol O. Protective role of α -tocopherol and caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury via nitric oxide and myeloperoxidase in rat kidneys. *Clin. Chim. Acta.* 2004; 339:33-41.
- ⁴⁰ - Pastore A, Federicia G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin.Chim. Acta.* 2003; 333:19-39.

-
- ⁴¹ - Rover LJ, Höehr NF, Vellasco AP, Kubota LT. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quim. Nova.* 2001; 24(1):112-9.
- ⁴² - Mills GC. Hemoglobin catabolism. I . Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem.* 1957; 229(1):189-97.
- ⁴³ - Zachara BA, Gromadzinska J, Zbrog Z, Swietch R, Wasowicz W, Twardowska E e cols. Selenium supplementation to chronic kidney disease patients on hemodialysis does not induce the synthesis of plasma glutathione peroxidase. *Acta Biochim. Pol.* 2009; 56(1):183-7.
- ⁴⁴ - Battin EE, Brumaghim JL. Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell. Biochem. Biophys.* 2009;55(1):1– 23.
- ⁴⁵ - Lu J, Holmgren A. Selenoproteins. *J Biol Chem.* 2009; 284(2):723–7.
- ⁴⁶ - May JM, Qu ZC, Whitesell RR. Ascorbic acid recycling enhances the antioxidant reserve of human erythrocytes. *Biochemistry.*1995; 34(39):12721–8.
- ⁴⁷ - Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mols Aspects Med.* 2005; 26(4-5):340–52.
- ⁴⁸ - Skrzycki M, Majewska M, Podsiad M, Czeczot M. Expression and activity of superoxide dismutase isoenzymes in colorectal cancer. *Acta Biochim. Pol.* 2009; 56(4):663-70.
- ⁴⁹ -Cruzat VF, Petry ER, Tirapegi J. Glutamina: aspectos bioquímicos, metabólicos, moleculares e suplementação. *Rev Bras Med Esporte.* 2009; 15(5):392-7.
- ⁵⁰ - Buchaman AL. Glutamine for gut: mystical properties or na ordinary amino acid? *Current Gastroenterol Rep.* 1999; 1(5):417-23.
- ⁵¹ - Newsholme P, Procopio J, Lima MMR, Pithon-Curi TC, Curi R. Glutamine and glutamate – their central role in cell metabolism and function. *Cell. Biochem. Funct.* 2003; 21(1):1-9.
- ⁵² - Melis GC, Wengel NT, Boelens PG, Leeuwen PAMV. Glutamine: recent developments in research on the clinical significance of glutamine. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2004; 7(1):59-70.
- ⁵³ - Van de Poll MC, Soeters PB, Deutz NEP, Fearon KCH, Dejong CHC. Renal metabolism of amino acids: its role in interorgan amino acid exchange. *Am J Clin Nutr.* 2004. 79(2):185–97.
- ⁵⁴ - Bartell SM, Batal AB. Efect of supplemental glutamine on growth performance, development of the gastrointestinal tract, and humoral immune response of broilers. *Poult Sci.* 2007; 86(9):1940–47.

-
- ⁵⁵ - Romano L, Borges IP. A suplementação da glutamina não reverte a imunossupressão induzida pelo exercício. *Rev Bras Presc Fis Exerc.* 2007; 1(1):65-78.
- ⁵⁶ - Brosnan ME, Brosnan JT. Hepatic glutamate metabolism: a tale of hepatocytes. *Am J Clin Nutr.* 2009; 90(3):857S–61S.
- ⁵⁷ - Fontana KE, Valdes H, Valdissera V. Glutamina como suplemento ergogênico. *R Bras Ci e Mov.* 2003; 11(3):91-96.
- ⁵⁸ - Freitas LS, Pena SM. Utilização de glutamina em processos infeccioso. Disponível em: <www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/035V3N4P337_342_JUL2006.pdf>. Acesso em 18 de junho de 2010.
- ⁵⁹ - Sener G, Sener E, Sehirli O, Ogunnç AV, Çetinel S, Gedik N, Sakarcan A. Ginko biloba extract ameliorates ischemia reperfusion-induced renal injury in rats. *Pharmacol Res.* 2005; 52(3):216-22.
- ⁶⁰ - Inman SR, Davis NA, Mazzone ME, Kristly N. Simvastatin and I-arginine preserve renal function after ischemia/reperfusion injury. *Am Med.* 2005; 329(1):13-7.
- ⁶¹ - Rhoden EL, Lucas ML, Pereira-lima L, Rhoden CR, Souto CAV. Effects of I-arginine on the kidney level of malondialdehyde in rats submitted to renal ischaemia-reperfusion. *BJU Int.* 2001; 88(3):273-7.
- ⁶² - Aktz T, Aydogdu N, Alagol B, Yalcin O, Huseyinova G, Atakan IH. The protective effects of melatonin and vitamin E against renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Ren Fail.* 2007; 29(5):535-42.
- ⁶³ - Prem JT, Eppinger M, Lemmon G, Miller RS, Nolan D, Peoples J. The role of glutamine in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in the rat hind limb model. *Am. J. Surg.* 1999; 178(2):147-50.
- ⁶⁴ - Wu G. Amino acids:metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids.* 2009; 37(1):1-17.
- ⁶⁵ - Mates JM, Pérrz-Gomes C, Castro IN, Asenio M, Márquez J. Glutamine and its relationship with intracelullar redox status,oxidative stress and cell proliferação/death. *Int J Biochem Cell Biology.* 2002; 34(5):439-58.
- ⁶⁶ - Welbourne TC. Ammonia production and glutamine incorporation into glutathione in the functioning rat kidney. *Can J Biochem.* 1979; 57(3):233-7.
- ⁶⁷ - Wardle EM. Cellular oxidative processes in relation to renal disease. *Am J Nephrol.* 2005; 25(1):13-22.
- ⁶⁸ - Mora LO, Antunes LMG, Francescato HDC, Bianchi MLP. The effects of oral glutamine on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res.* 2003; 47(6):517-22.

-
- ⁶⁹ - Harward TRS, Coe D, Souba WW, Klingman N, Seerger JM. Glutamine preserves gut glutathione levels during intestinal ischemia/reperfusion. *J. Surg. Res.* 1994; 56(4):351-5.
- ⁷⁰ - Jia CJ, Daí CL, Zhang X, Cui K, Xu F, Xu Y-O. Alanyl-glutamine dipeptide inhibits hepatic ischemia reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol.* 2006; 12(9):1373-8.
- ⁷¹ - Hoke TS, Douglas IS, Klein CL, HE Z, Fang W, Thurman JM, Tão T, Dursun B, Voekel NF, Edelstein CL, Fausbel S. Acute renal failure after bilateral nephrectomia is associated with cytokine-mediated pulmonary injury. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18(1):155-64.
- ⁷² - Kramer AA, Postler G, Salhab KF, Mendez C, Carey LC, Rabb H. Renal ischemia/reperfusion leads to macrophage-mediated increase in pulmonary vascular permeability. *Kidney Int.* 1999; 55(6):2362-7.
- ⁷³ - Shin CS, Lee KY, Kim JL, Lee HW, Schenarts PJ, Traber DL. Renal ischemia-reperfusion injury does not induce pulmonary dysfunction in sheep. *Yonsei Med J.* 1997; 38(3):142-50.
- ⁷⁴ - Aguilar A, Alvarez-Vijande R, Capdevila S, Alcoberro J, Alcaraz A. Antioxidant patterns (superoxide dismutase, glutathione reductase, and glutathione peroxidase) in kidneys from non-heart-beating-donors: experimental study. *Transplant Proc.* 2007; 9(1):249-52.
- ⁷⁵ - Harward TRS, Coe D, Souba WW, Klingman N, Seerger JM. Glutamine preserves gut glutathione levels during intestinal ischemia/reperfusion. *Journal of surgical research.* 1994; 56:351-5.
- ⁷⁶ - Legrand M, Mik EG, Johannes T, Payen D, Ince C. Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the ischemic kidney. *Mol Med.* 2008; 14(7-8);502-16.
- ⁷⁷ - Kim YS, Jung MH, Choi MY, Kim YH, Scheverdin V, Kim JH e cols. Glutamine attenuates tubular cell apoptosis in acute kidney injury via inhibition of the c-jun n-terminal kinase phosphorylation of 14-3-3. *Crit Care Med.* 2009; 37(6);2033-44.
- ⁷⁸ - Radox Laboratories Ltda. Disponível em: < [HTTP:WWW.radox.com/brochres/PDF%20Brochure/LT086.pdf](http://www.radox.com/brochres/PDF%20Brochure/LT086.pdf). Acesso em: 25 de fevereiro de 2009.
- ⁷⁹ Chander V, Chopra1 K. Renal protective effect of molsidomine and l- arginine in ischemia-reperfusion induced injury in rats. *J Surg Res.*2005; 128(1):132-39.
- ⁸⁰ Greca FH, Gonçalves NMF, Filho ZAS, Noronha L, Kuenzer RF, Rubin MR. The protective effect of methylene blue in lungs, small bowel and kidney after intestinal ischemia and reperfusion. *Acta Cir. Bras.* 2008; 23(2);149- 56.
- ⁸¹ Rawlins MC, Hefty TL, Brown SL, Biehl TR. Learning laparoscopic donor nephrectomy safely:a report 100 cases. *Arch Surg.* 2002; 137(5):531-5.
- ⁸² Guz G, Oz E, Lortlar N, Ulus NN, Nurlu N, Demirogullari B e cols. The effect of taurine on renal ischemia/reperfusion injury. *Amino Acids.* 2007; 32(3):405-11.

-
- ⁸³ Kabasakal L, Sehirli AO, Çetinel S, Cilkler E, Gedik N, Sener G. Mesna(2-mercaptoethane sulfonate) prevents ischemia/reperfusion induced renal oxidative damage in rats. *Life Sci.* 2004; 75(19):2329-40.
- ⁸⁴ Johnson AT, Kaufmann YC, Luo S, Todorova V, Klimberg VS. Effect of glutamine on glutathione, igf-1, and tgf- β_1 . *J Surg Res.* 2003; 111(2):222-8.
- ⁸⁵ Engel JM, Muhling J, Kwapisz M, Heidt M. Glutamine administration in patients undergoing cardiac surgery and the influence on blood glutathione levels. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2009; 53(10):1317-23.
- ⁸⁶ Novak F, Heyland DK, Avenell A, Drover JW, Su X. Glutamine supplementation in serious illness: A sistematic review of the evidence. *Crit Care Méd.* 2002; 30(9):2022-9.
- ⁸⁷ Luo M, Bazargan N, Griffith DP, Fernández-Estivariz C, Leader LM, Easley KA e cols. Metabolic effects of enteral versus parenteral alanyl-glutamine dipeptide administration in critically ill patients receiving enteral feeding: a pilot study. *Clin Nutr.* 2008; 27(2):297-306.
- ⁸⁸ Jia CJ, Daí CL, Zhang X, Cui K, Xu F, Xu YQ. Alanyl-glutamine dipeptide inhibits hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Word J Gastroenterol.* 2006; 12(9):1373-8.
- ⁸⁹ Ezhilan RA, Rajesh R, Rajaprabhu D, Meena B, Ganesan B, Anandan R. Antioxidant defense of glutamine on myocardial antioxidant status in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *J. Cell Anima. Biol.* 2008;2(5);107-11.
- ⁹⁰ Abilés J, Moreno-Torres R, Moratalla G, Castano J, Abúd P, Mudarra A e cols. Efects de la suplementación com glutamina sobre el sistema antioxidante y la peroxidación lipídica em pacientes críticos com nutrición pareteral. *Nutri Hosp.* 2008; 23(4):332-9.
- ⁹¹ Kul M, Vurucu S, Demirkaya E, Tunc T, Aydinoz S, Meral C e cols. Enteral glutamine and/or arginine supplementation have favorable effects on oxidative stress parameters in neonatal rat intestine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009; 49(1):85-9.
- ⁹² Gonzáles S, Polizio AH, Erário MA, Tomaro ML. Glutamine is highly effective in preventing in vivo cobalt-induced oxidative stress in rat liver. *Word J Gastroenterol.* 2005; 11(23):3533-8.
- ⁹³ Neto AF, Silva JCB, Fagundes DJ, Percário S, Ferreira N, Juliano Y, Neto AAM. Estudo das alterações oxidativas, da capacidade antioxidante total e do óxido nítrico, em ratos submetidos à isquemia e reperfusão de membros posteriores. *Acta Cir. Bras.* 2005; 20(2):134-9.
- ⁹⁴ Cymrot M, Percário S, Ferreira LM. Comportamento do estresse oxidativo e da capacidade antioxidante total em ratos submetidos a retalhos cutâneos isquêmicos. *Acta Cir. Bras.* 2004; 19(1):18-26.

-
- ⁹⁵ Szijarto A, Hahn O, Batmunkh E, Stangl R, Kiss A, Lotz G e cols. Short-term alanyl-glutamine dipeptide pretreatment in liver ischemia–reperfusion model: effects on microcirculation and antioxidant status in rats. *Clin Nutr.* 2007; 26(5): 640–8.
- ⁹⁶ Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* 2008; 582(13):1783-7.
- ⁹⁷ Soriane M, Pietraforte D, Minetti M. Antioxidant potencial of anaerobic human plasma: role of serum albumin and thiols as scavengers of carbon radicals. *Arch Biochem Biophys.* 1994; 312(1):180-8.
- ⁹⁸ Quinlan JG, Mumby S, Martin GS, Bernard GR, Gutteridge JMC, Evans TW. Albumine influences total plasma antioxidant capacity favorably in patients with acute lung injury. *Crit Care Méd.* 2004; 32(3):755-9.
- ⁹⁹ Quinlan GJ, Martin GS, Evans TW. Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology.* 2005; 41(6):1211–9
- ¹⁰⁰ Faure P, Wieernsperger N, Polge C, Faviers A, Halimi S. Impairment of the antioxidant properties of serum albumin in patients with diabetes: protective effects of metformin. *Clin Sci (Lond).* 2008; 114(3):251-6.
- ¹⁰¹ Skrzycki M, Majewska M, Podsiad M, Czczot H. Expression and activity of superoxide dismutase isoenzymes in colorectal câncer. *Acta Biochim Pol.* 2009; 56(4):663-70.
- ¹⁰² Kahraman A, Erkasap N, Serteser M, Koken T. Protective effect of quercetin on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *J Nephrol.* 2003; 16(2):219-24.
- ¹⁰³ Sodré FL, Costa JCB, Lima JCC. Evaluation of renal function and damage: a laboratorial challenge. *J Bras Patol Med Lab.* 2007; 43(5):329-37.
- ¹⁰⁴ Kirsztajn GM. Assessment of glomerular filtration rate. *J Bras Patol Méd Lab.* 2007; 43(4):257-64 .
- ¹⁰⁵ Waikar SS, Bonventre JV. Can we rely on blood urea nitrogen as a biomarker to determine when to initiate dialysis? *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006; 1(5):903–4.
- ¹⁰⁶ Eschwège P, Paradis V, Conti M, Holstege A, Richet F, Detève J, Ménager P, Legrand A, Jardin A, Bedossa P, Benoit G. In situ detection of lipid peroxidation by-products as markers of renal ischemia injuries in rat kidneys. *J Urol.* 1999; 162(2):553-7.
- ¹⁰⁷ Tucci SJ, Carvalho RN, Celini FM, Cologna AJ, Suaid HJ, Tirapelli LF, Martins ACP. Renal ischemia and reperfusion injury: influence of chorpromazine on renal function and lipid peroxidation. *Acta Cir. Bras.* 2008; 23(1):42-6.
- ¹⁰⁸ Tucci SJ, Carvalho RN, Celini FM, Cologna AJ, Suaid HJ, Tirapelli LF, Martins ACP. Compensatory renal growth and mitochondrial function: the influence of warm ischemia and reperfusion. *Acta Cir. Bras.* 2008; 23(1):31-5.

-
- ¹⁰⁹ Garcia TMP. Avaliação dos efeitos nefrotóxicos causados pela ciclosporina A em ratos através do estudo dinâmico renal com 99mTC-MAG3. [Tese Doutorado]. Universidade de São Paulo – FMRPUSP; 1995. In Cologna AJ, Lima LVS, Tucci SJ, Suaid HJ, Reis RB, Tirapelli LF e cols. Cyclosporine action on kidneys of rats submitted to normothermic ischaemia and reperfusion. *Acta Cir. Bras.* 2008; 23(1):36-41.
- ¹¹⁰ Carvalho JLB. Serum lactate dehydrogenase in neoplastic disease. 2002. Disponível em: < <http://pediatriasaopaulo.usp.br/upload/pdf/128.pdf> >. Acesso em 03 de janeiro de 2010.
- ¹¹¹ Nelson LD, Cox MM. *Lehninger princípios de bioquímica*. 3^a ed. São Paulo(SP): SARVIER; 2002.
- ¹¹² Chertow GM, Christiansen CL, Cleary PD, Munro C, Lazarus JM. Prognostic stratification in critically ill patients with acute renal failure requiring dialysis. *Arch Intern Med* 1995; 155(14):1505–1511.
- ¹¹³ Rabb H, Chamoun F, Hotchkiss J. Molecular mechanisms underlying combined kidney-lung dysfunction during acute renal failure. *Contrib Nephrol.* 2001; 132:41–52.
- ¹¹⁴ Awad AS, Rouse M, Huang L, Vergis AL, Reutershan J, Cathro HP, Okusa MD. Compartmentalization of neutrophils in the kidney and lung following acute ischemic kidney injury. *Kidney Int.* 2009; 75(7):689-98.
- ¹¹⁵ Deng J, Hu X, Yuen PS, Star RA. Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits lung injury after renal ischemia/reperfusion. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004 ; 169(6):749-56.
- ¹¹⁶ Guiqi G. Pre-treatment with glutamine attenuates lung injury in rats subjected to intestinal ischaemia–reperfusion. *Injury* (2009), doi:10.1016/j.injury.2009.09. Acessado em 10/04/2010.
- ¹¹⁷ Kelly KJ, Plotkin Z, Vulgamott SL.. P53 mediates the apoptotic response to GTP depletion after renal ischemia-reperfusion: protective role of a p53 inhibitor. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14(1):128-38.
- ¹¹⁸ Kane AB. Mechanisms of cell and tissue injury. In: Kane AB. *Cellular and molecular pathogenesis*. Philadelphia: Lippincott- Raven; 1996. p.1-22.
- ¹¹⁹ Cuttle L, Zhang XJ, Endre ZH. Bcl-X(L) translocation in renal tubular epithelial cells in vitro protects distal cells from oxidative stress. *Kidney Int.* 2001; 59(5):1779-88.
- ¹²⁰ Stangl R, Szijártó A, Onody P, Tamás J, Tátrai M, Hegedús V e cols. Reduction of liver ischemia-reperfusion injury via glutamine pretreatment. *J Surg Res.* 2009; 22; 1118-25.
- ¹²¹ Silva Jr OC, Centurion S, Pacheco Eg, Brisoti JL, Oliveira AF, Sasso KD. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. *Acta Cir Bras.* 2002; 17(3):96-100.

ANEXO

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Bauru



O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista – UNESP, em sua 55ª Reunião Ordinária realizada no dia 29 de março de 2010, no Prédio do STI da Faculdade de Ciências da UNESP, Campus de Bauru, às 09h00, após análise do parecer emitido pelo relator **APROVA** o projeto “Efeitos da Injeção Intra-peritoneal de glutamina na lesão de isquemia e reperfusão renal. Estudo experimental em ratos”, Processo nº 453/46/01/10, sob responsabilidade do Professor Doutor Cervantes Caporossi.

Bauru (SP), 29 de março de 2010

PROF. DR. ARI FERNANDO MAIA
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Av. Engº Luiz Armando Lages Coube, 14-01 - Vergem Lusa - Bauru-SP - CEP: 13025-900
Fone: (14) 3103-8187 - e-mail: cetaf@unesp.br

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](#)