**Universidade de São Paulo
Departamento de Cirurgia e Anatomia
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**

VALTER TOREZAN GOUVÊA JUNIOR

**Efeitos do pré-condicionamento isquêmico e
suplementação de glutamina na isquemia e
reperfusão renal**

Estudo experimental em ratos

**Ribeirão Preto
2016**

VALTER TOREZAN GOUVÊA JUNIOR

**Efeitos do pré-condicionamento isquêmico e
suplementação de glutamina na isquemia e
reperusão renal**

Estudo experimental em ratos

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo como
qualificação para obtenção do
título do Doutor em Ciências
Médicas.

Área de concentração – Clínica
Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Silvio
Tucci Jr.

Ribeirão Preto - SP
2016

GOUVÊA JUNIOR, V.T. Efeitos do pré-condicionamento isquêmico e suplementação de glutamina na isquemia e reperfusão renal - Estudo experimental em ratos. Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Aprovado em 20/05/2016.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Silvio Tucci Junior
Julgamento:

Instituição: FMRP/USP
Assinatura:

Prof. Dr. João Luiz Amaro
Julgamento:

Instituição: UNESP
Assinatura:

Prof. Dr. Edwaldo Edner Joviliano
Julgamento:

Instituição: FMRP/USP
Assinatura:

Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes Molina
Julgamento:

Instituição: FMRP/USP
Assinatura:

Prof. Dr. Cervantes Caporossi
Julgamento:

Instituição: UFMT
Assinatura:

Agradecimentos

A 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. Silvio Tucci Junior, orientador deste trabalho, por seu apoio e confiança; por quem sinto muita admiração e respeito, sempre disposto a transmitir conhecimento sem medir tempo.

Ao Departamento de Anatomia e Medicina da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, na pessoa do atual chefe Prof. Dr. Silvio Tucci Junior, que tornou possível a realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), na pessoa da Magnífica Reitora Prof^a. 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 através do apoio disponibilizando o laboratório de investigação da instituição para o desenvolvimento da pesquisa.

À Prof^a. Dra. Nair Honda Kawashita, professora do Departamento de Química da UFMT, exemplo de professor, dedicação à ciência, e senso de humanidade, compartilhando de maneira tão nobre seus conhecimentos, pela gentileza na recepção,

cordialidade em todos os momentos e pronto serviço durante as etapas do processamento de materiais e dosagens referentes ao estresse oxidativo.

À Prof^a. Dra Máisa Pavani do Departamento de Química da UFMT, pela incansável disposição em realizar as dosagens estudadas, bem como pela participação ativa nas discussões da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Cervantes Caporossi, pela parceria nas pesquisas e constante incentivo e orientação, participando ativamente desde os primeiros momentos deste trabalho.

Aos amigos Prof. Dr. Alberto Bicudo e Prof. Dr. Alex Semenoff pelo apoio na análise estatística.

Aos residentes de urologia do Hospital Universitário Júlio Muller pelo auxílio na realização do experimento.

Aos acadêmicos de medicina da UFMT pela dedicada e valorosa colaboração no desenvolvimento dos experimentos inerentes a este trabalho.

Ao acadêmico de medicina veterinária da UFMT Rafael Moraes Assis pela árdua missão de cuidar dos animais aos finais de semana.

Ao amigo, Prof. Ms. José Alberto Alves, chefe da Urologia do HUJM-UFMT, por constantemente me substituir nos ambulatórios para que pudesse me deslocar à cidade de Ribeirão Preto.

Ao amigo Carlos Eduardo Bouret, sócio proprietário do laboratório Santa Rosa de Cuiabá pela disponibilização do laboratório para realização dos exames plasmáticos.

Ao amigo e técnico de enfermagem Luis Carlos da Silva pela ajuda na limpeza e esterilização dos materiais cirúrgicos.

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

RESUMO

GOUVÊA JUNIOR, V. T. **Efeitos do pré-condicionamento isquêmico e suplementação de glutamina na isquemia e reperfusão renal. Estudo experimental em ratos.** 2016. 114 f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Introdução: A isquemia e reperfusão, que ocorre durante cirurgia renal, pode desencadear lesões que são mediadas por radicais livres produzidos na fase de reperfusão. A glutamina exerce propriedades positivas no sistema antioxidante por ação da glutatona. O pré-condicionamento isquêmico aumenta a tolerância a tecidos que sofrem isquemia. **Objetivo:** Avaliar a ação da glutamina associada ao pré-condicionamento isquêmico na isquemia e reperfusão renal em modelo animal. **Métodos:** Cinquenta ratos wistar machos foram submetidos à nefrectomia a direita. No oitavo dia de pós-operatório os animais foram randomizados em cinco grupos (n=10) que foram assim divididos: grupo I – grupo Sham, grupo II – grupo isquemia e reperfusão, grupo III – grupo pré-condicionamento isquêmico, grupo IV – grupo glutamina e grupo V- pré-condicionamento isquêmico associado a glutamina. Os grupos IV e V receberam glutamina através de gavagem por sete dias. Ao final do 14º dia da nefrectomia procedeu-se a isquemia renal esquerda por 45 minutos. Após 1 e 7 dias, cinco animais de cada subgrupo foram submetidos a nova cirurgia com coleta de sangue e retirada de tecido renal. **Resultados:** Após um dia de reperfusão o grupo V apresentou os níveis mais elevados de glutatona reduzida ($2,55 \pm 0,34 \text{ mmol/g tecido}$) quando comparado aos outros grupos. A atividade da enzima superóxido dismutase apresentou-se elevada no grupo V quando comparado ao grupo II ($p=0.018$). Já no sétimo dia de reperfusão o grupo V apresentou-se com a maior atividade da enzima glutatona peroxidase dentre todos os grupos ($p=0.009$), bem como a atividade da enzima glutatona reduzida ($p=0,001$). Neste mesmo dia a superóxido dismutase mostrou-se mais elevada no grupo V quando comparado aos grupos que sofreram intervenção isquêmica ($p=0.02$). No sétimo dia a caspase-3 e a proteína carbonilada do grupo V se mostraram com maiores valores quando comparados aos grupos restantes. A associação da glutamina ao pré-condicionamento isquêmico elevou a glutatona reduzida e superóxido dismutase no grupo no primeiro dia após a reperfusão. No sétimo dia após a reperfusão se observa uma persistente elevação da superóxido dismutase, enzimas glutatona peroxidase e glutatona redutase bem como os níveis de caspase-3 e proteína carbonilada. **Conclusão:** Neste modelo de isquemia renal por clampeamento de pedículo seguido de reperfusão se conclui que há uma potencialização do efeito antioxidante da associação da glutamina e pré-condicionamento isquêmico após 24 horas de reperfusão, entretanto tal efeito não é mantido até o sétimo dia após a reperfusão.

Palavras Chaves; Isquemia. Transplante Renal. Estresse oxidativo. Glutamina. Rim.

ABSTRACT

GOUVÊA JUNIOR, VT. **Effects of pre ischemic conditioning and glutamine supplementation on renal ischemia and reperfusion. Experimental study in rats** 2016. 114 f.Tese (PhD) - Faculty of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Introduction: Ischemia and reperfusion injury that occurs during renal surgery can trigger injuries that are mediated by free radicals generated in the reperfusion phase. Glutamine exerts positive properties in the antioxidant system by the action of glutathione. Ischemic preconditioning increases tolerance to tissue suffering ischemia. **Objective:** To evaluate the action of glutamine associated with ischemic preconditioning in ischemia and reperfusion in animal models. **Methods:** Fifty rats Wistar males underwent nephrectomy right. On the eighth day after the operation the animals were randomized into five groups (n = 10) were divided as follows: Group I - sham group, II - ischemia and reperfusion group, III - ischemic preconditioning group, IV - glutamine group and group V- ischemic preconditioning group associated with glutamine. Groups IV and V received glutamine via gavage for seven days. At the end of 14 days nephrectomy proceeded to the left renal ischemia for 45 minutes. After 1 and 7 days, five animals in each subgroup underwent new surgery with blood collection and removal of kidney tissue. **Results:** After one day reperfusion group V showed higher levels of reduced glutathione (2.55 ± 0.34 mmol / g tissue) compared to other groups. The enzyme activity superoxide dismutase showed up high in the V group compared to group II ($p = 0.018$). In the seventh day of reperfusion group V presented with the increased activity of glutathione peroxidase enzyme among all groups ($p = 0.009$) as well as the activity of reduced glutathione ($p = 0.001$). On the same day the superoxide dismutase was shown to be higher in the V group compared to groups who have suffered ischemic intervention ($p = 0.02$). On the seventh day caspase-3 and protein carbonyl group V are shown with larger values when compared to the other groups. The association of glutamine to ischemic preconditioning increased the reduced glutathione and superoxide dismutase in the group on the first day after reperfusion. On the seventh day after reperfusion is observed a persistent elevation of superoxide dismutase, glutathione peroxidase enzymes and glutathione reductase and the levels of caspase-3 and protein carbonyl. **Conclusion:** In this model of renal ischemia by clamping the pedicle followed by reperfusion is concluded that there is a potentiation of the antioxidant effect of glutamine association and ischemic preconditioning after 24 hours of reperfusion, however this effect is not maintained until the seventh day after reperfusion.

Keywords; Ischemia. Renal transplant. Oxidative stress. Glutamine. Kidney.

LISTA DE ABREVIATURAS.

ADP: difosfato de adenosina.
AIN-1993: dieta padrão para roedores preconizada pelo Instituto Americano de Nutrição.
AMP: monofosfato de adenosina.
ATP: trifosfato de adenosina.
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).
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: glutathione.
GPx: enzima glutathione peroxidase.
GR: enzima glutathione reductase.
GSSG: glutathione oxidada.
HUFM- Hospital Universitário Júlio Muller.
I/R: isquemia e reperfusão.
ICAM-1: proteína de adesão da superfície do endotélio e de monócitos.
IL-1: interleucina 1.
IL-6: interleucina 6.
iNOS: enzima óxido nítrico sintase induzida.
LPO: lipoperoxidação ou peroxidação lipídica.
LTB4: leucotrieno B4.
MDA: malonaldeído.
NAD: nicotinamida adenina dinucleotídeo.
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.
PCI : pré-condicionamento isquêmico.
TFG: taxa de filtração glomerular.
TNF- α : fator de necrose tumoral alfa.
UFMT: Universidade Federal do Mato Grosso.
VCAM-1: proteína de adesão da superfície do endotélio.

LISTA DE FIGURAS

	Página
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. _____	19
Figura 2 – Interação neutrófilo-endotélio e a produção de espécies reativas de oxigênio _____	20
Figura 3 - Interação neutrófilo-endotélio e a produção de espécies reativas de oxigênio _____	21
Figura 4 -Interconversão de glutathione nas suas formas reduzida oxidada pela ação das enzimas glutathione peroxidase e glutathione reductase _____	23
Figura 5 - Função da superóxido dismutase (SOD) sob as espécies reativas de oxigênios. _____	25
Figura 6 - Peroxidação lipídica da membrana e formação de hidroperóxidos. ____	27
Figura 7 - Distribuição dos animais de experimentação em função dos grupos de estudo (N= 50). _____	40
Figura 8 - Técnica de gavagem. _____	41
Figura 9 - Técnica utilizada para anestésiar o animal. _____	42
Figura 10 - Animal anestesiado, imobilizado e realizado anti-sepsia. _____	43
Figura 11 - Animal com campo estéril e demarcação da incisão cirúrgica ____	44
Figura 12 – Incisão em flanco direito com localização renal. _____	44
Figura 13 - Isolamento e ligadura de pedículo renal direito _____	45
Figura 14 -Sutura de cavidade abdominal utilizando nylon 2-0 _____	46
Figura 15 -Dissecção de rim esquerdo para posterior isolamento do pedículo renal _____	47
Figura 16 - Clampeamento do pedículo renal esquerdo e início da palidez ____	48
Figura 17 - Início do retorno a coloração normal do rim após retirada do clamp_	48

Figura 18 - Dissecção de cava para coleta da amostra sanguínea _____	49
Figura 19 - Coleta de sangue da veia cava _____	50
Figura 20 - Acondicionamento e identificação renal. Componente utilizado nas dosagens _____	50
Figura 21 - Imersão em nitrogênio líquido do tecido renal _____	51
Figura 22 - Aspecto do laboratório de investigação, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal de Mato Grosso _____	52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Dosagem em tecido renal da capacidade antioxidante total nos diferentes grupos estudados com 24 horas de reperfusão ____	57
Gráfico 2 – Dosagem em tecido renal da capacidade antioxidante total nos diferentes grupos estudados com sete dias de reperfusão ____	57
Gráfico 3 – Dosagem em tecido renal da glutathione reduzida nos diferentes grupos estudados com 24 horas após a reperfusão ____	58
Gráfico 4 – Dosagem em tecido renal da glutathione reduzida nos diferentes grupos estudados com sete dias de reperfusão _____	58
Gráfico 5 – Dosagem em tecido renal da atividade da enzima glutathione peroxidase nos diferentes grupos estudados 24 horas após a reperfusão _____	58
Gráfico 6 – Dosagem em tecido renal da atividade da enzima glutathione peroxidase nos diferentes grupos estudados sete dias após a reperfusão _____	58
Gráfico 7 – Dosagem em tecido renal da atividade da enzima glutathione redutase nos diferentes grupos estudados 24 horas após a reperfusão _____	59
Gráfico 8 – Dosagem em tecido renal da atividade da enzima glutathione redutase nos diferentes grupos estudados sete dias após a reperfusão _____	59
Gráfico 9 – Dosagem em tecido renal da atividade da enzima superóxido dismutase nos diferentes grupos estudados 24 horas após a reperfusão _____	60
Gráfico 10 – Dosagem em tecido renal da atividade da enzima superóxido dismutase nos diferentes grupos estudados sete dias após a reperfusão _____	60
Gráfico 11 – Dosagem em tecido renal do malonaldeído nos diferentes grupos estudados 24 horas após a reperfusão _____	61
Gráfico 12 – Dosagem em tecido renal do malonaldeído nos diferentes grupos estudados sete dias após a reperfusão _____	61
Gráfico 13 – Dosagem em tecido renal da proteína carbonilada nos diferentes grupos estudados 24 horas após a reperfusão _____	61

Gráfico 14 - Dosagem em tecido renal da proteína carbonilada nos diferentes grupos estudados sete dias após a reperfusão _____	61
Gráfico 15 - Dosagem em tecido renal da caspase-3 nos diferentes grupos estudados 24 horas após a reperfusão _____	62
Gráfico 16 - Dosagem em tecido renal da caspase-3 nos diferentes grupos estudados sete dias após a reperfusão _____	62
Gráfico 17 - Dosagem sérica da creatinina nos diferentes grupos estudados 24 horas após a reperfusão _____	63
Gráfico 18 - Dosagem sérica da creatinina nos diferentes grupos estudados sete dias após a reperfusão _____	63
Gráfico 19 - Dosagem sérica da uréia nos diferentes grupos estudados 24 horas após a reperfusão _____	64
Gráfico 20 - Dosagem sérica da uréia nos diferentes grupos estudados sete dias após a reperfusão _____	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valor (media $\pm$ desvio padrão) das dosagens realizadas conforme os grupos (n=5), após 24 horas de reperfusão. _____ 55

Tabela 2 – Valor (media $\pm$ desvio padrão) das dosagens realizadas conforme os grupos (n=5), após sete dias de reperfusão. _____ 56

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	17
1.1 - Cirurgia, isquemia e reperfusão	18
1.2 - Sistemas antioxidantes	22
1.2.1 - Sistema glutathiona	23
1.2.2 - Capacidade antioxidante total	24
1.2.3 - Superóxido dismutase	25
1.3 – Marcadores da lesão oxidativa induzida por I/R	26
1.3.1 – Malonaldeído	26
1.3.2 – Proteína Carbonilada	28
1.3.3 – Caspase-3	28
1.4 – Glutamina	29
1.4.1 – Isquemia/Reperfusão Renal e Glutamina	32
1.5 – Pré-Condicionamento Isquêmico	34
 2. JUSTIFICATIVA	 36
 3. OBJETIVO	 37
 4. MÉTODOS	 38
4.1 - Desenho do estudo	38
4.2 - Animais	39
4.3 - Randomização e Grupos	39
4.4 - Solução utilizada para gavagem	40
4.5 - Técnicas Operatórias	41

4.6 - Anestesia	41
4.7 - Material Cirúrgico	42
4.8 - Operação	43
4.8.1 -Operação 1	45
4.8.2 -Operação 2	46
4.8.3 -Operação 3 – Colheita de amostra de sangue e Eutanásia	49
4.9 - Dosagens bioquímicas: LDH, uréia, creatinina, capacidade antioxidante total, glutathione peroxidase e superóxido dismutase	52
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
6. RESULTADOS	55
6.1 - Dosagem da Capacidade Antioxidante Total	57
6.2 – Dosagem da Glutathione Reduzida	57
6.3 - Dosagem da Atividade da Enzima Glutathione Peroxidase	58
6.4 - Dosagem da Atividade da Enzima Glutathione Redutase	59
6.5 - Dosagem da Atividade da Enzima Superóxido Dismutase	59
6.6 - Dosagem do Malonaldeído	60
6.7 - Dosagem das Proteínas Carboniladas	61
6.8 - Dosagem da Caspase-3	62
6.9 - Dosagem da Creatinina	62
6.10 – Dosagem da Ureia	63
7. DISCUSSÃO	65
7.1 – Capacidade Antioxidante Total	66
7.2 – Sistema Glutathione	67
7.2.1 – Glutathione Reduzida	67
7.2.2 – Glutathione Peroxidase	68
7.2.3 – Glutathione Redutase	69

7.3 – Superóxido Dismutase	69
7.4 – Ureia e Creatinina	70
7.5 – Malonaldeído	72
7.6 – Caspase-3	74
7.7 – Proteína Carbonilada	75
7.8 – Considerações Finais	76
8. CONCLUSÃO	78
BIBLIOGRAFIA	79
ANEXOS	92

1. INTRODUÇÃO

A doença renal crônica terminal (DRCT) é um problema de saúde pública de maior importância e há evidências de aumento crescente na incidência e na prevalência dessa condição. Estima-se que a prevalência de DRCT em adultos, no mundo, gire em torno de 2,5 casos por milhão da população (pmp) na Nigéria, até os 1.403 casos pmp nos Estados Unidos.¹

O transplante renal é reconhecido como um grande avanço na medicina moderna, que fornece anos de vida com alta qualidade para pacientes com insuficiência renal irreversível. O que era uma opção de tratamento experimental, arriscado e muito limitado há 50 anos, atualmente é uma prática clínica de rotina em mais de 80 países.² 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 ingestão 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 Glutamina (GLN) é o aminoácido mais abundante encontrado no sangue sendo que uma das características mais importante é sua função de precursora da

glutathiona (GSH), a qual é um potente agente antioxidante. 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 GLN na proteção do fígado contra os efeitos da lesão por I/R.^{10,11} Fuller e cols. relataram que a GLN administrada no pré tratamento de ratos submetidos a transplante renal determinou uma atenuação da apoptose celular tubular.¹² Mora et al. observaram proteção parcial da nefrotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos tratados com GLN.¹³

1.1 - 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.¹⁴

Estudos clássicos em cães demonstram que a recuperação após isquemia quente é diretamente dependente do seu período de duração.^{15,16} 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.^{15,16} 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%).^{15,16}

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 das ROS.¹⁷

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.¹⁸

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.¹⁸ 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.¹⁹

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.²⁰ Para reverter o estado isquêmico, há necessidade de restauração de fluxo sanguíneo.²¹

Porém, o restabelecimento do suprimento de sangue normal paradoxalmente pode ser responsável por lesões ainda mais graves do que as da isquemia *per se*.²¹ O afluxo de oxigênio no tecido isquêmico levaria a uma série de alterações bioquímicas, inflamatórias e celulares mediadas principalmente pela formação de ROS.²¹

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.¹⁹

Granger et al., apud Bicudo-Salomão, em estudo sobre isquemia e reperfusão no intestino delgado, propuseram o 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”.²²(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 ciclooxygenase do metabolismo do ácido araquidônico.²³ 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).²⁴

As lesões assim produzidas servem como um estímulo, a partir do qual se inicia a reação inflamatória.²⁰⁻²⁴ Mediadores humorais levam à quimiotaxia de neutrófilos aos sítios de lesão.²⁰⁻²⁴

FIGURA 2: Interação neutrófilo-endotélio e a produção de espécies reativas de oxigênio. FONTE: Adaptado de Bicudo-Salomão e cols.²²

FIGURA 3: Interação neutrófilo-endotélio e a produção de espécies reativas de oxigênio. FONTE: Adaptado de Bicudo-Salomão e cols.²²

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).²⁰⁻²⁴ Com a interação neutrófilo-endotélio dá-se um incremento na produção de ROS.²⁰⁻²⁴ Enzimas proteolíticas como a collagenase, elastase e mieloperoxidase passam a ser liberadas pelo neutrófilo.^{23,24} Esta última ocupa um papel importante, catalisando a reação entre peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e íon cloreto (Cl^-), para a formação do radical hipoclorito ($HOCl^-$), potente agente oxidante ²⁰⁻²⁵ (Figuras 2 e 3). O neutrófilo ativado estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias.²⁰⁻²⁵ Destacam-se a interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), metabólitos do ácido araquidônico (leucotrieno B4 e tromboxano A2) e o FNT.²⁰⁻²⁴

Com a amplificação da resposta inflamatória, outras linhagens celulares passam a ser recrutadas, dentre estas, os mastócitos.²¹

Da sua decomposição e liberação de grânulos são originadas diversas aminas com propriedades vasoativas como histamina, proteoglicans, prostaciclina, cininas,

leucotrienos, proteases, e óxido nítrico.²³ O óxido nítrico, gás radical livre, tem interessantes propriedades vasodilatadoras, além de funcionar como antiagregante plaquetário e ser tóxico para bactérias.²³ 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.²⁰⁻²⁵

Concomitantemente a isso, na microcirculação se desenvolve, 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*.²⁰⁻²⁵

Essa grande produção de ROS leva a peroxidação lipídica e oxidação proteica da membrana celular levando por fim a morte celular.²³⁻²⁵

1.2 - SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Em nível fisiológico, podemos nos defender da injúria mediada pelos radicais livres utilizando as reservas antioxidantes celulares.^{26,27,28} 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.^{26,27}

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.^{18-19,26-27}

1.2.1 - SISTEMA GLUTATIONA

O sistema antioxidante glutathiona é o principal thiol não protéico envolvido na defesa antioxidante celular.²⁹ É composta do tripeptídeo glutathiona (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina), a qual é formado por cisteína, ácido glutâmico e glicina sendo sintetizada principalmente pelo fígado.^{29,30} Sua concentração é maior no meio intracelular no entanto pode ser encontrada tanto no plasma quanto na urina.²⁹ 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.³⁰

Esse sistema também é composto pelas enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR).^{29,30}

FIGURA 4- Interconversão de glutathiona nas suas formas reduzida e oxidada pela ação das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR).

FONTE: Modificado de Battin EE et al..³⁶

Ambas catalisam a ação da glutathiona.^{29,30} Glutathiona peroxidase catalisa a conversão de H_2O_2 , produzida pela superóxido dismutase (SOD) com a dismutação do

ânion superóxido (O_2^-), para H_2O .^{29,30} A glutathione redutase contém flavina adenina dinucleotídeo e utiliza a redução do NADPH para reconverter GSSG para 2GSH.^{29,30}

Até o momento são conhecidas cinco formas estruturais e funcionais da GPx nos mamíferos sendo todas dependentes do selênio.^{31,32} Duas formas foram identificadas no sangue.³¹ GPx é uma das 25 classes de selênio proteínas conhecidas; a GPx age como antioxidante através da redução de peróxido, tais como H_2O_2 .³³ A GSH é um co-fator necessário na redução de peróxidos, e age como um substrato redutor, entretanto não exibe a capacidade de atividade da GPx.³¹⁻³³ Outra enzima que age conjuntamente com a glutathione peroxidase é a GR.³¹⁻³³ Essa enzima não age diretamente na remoção de espécies radicalares, porém é responsável pela regeneração da glutathione à sua forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutathione.(figura 4)³¹⁻³³ Assim, alguns trabalhos têm sido desenvolvidos para determinação destas enzimas tanto em tecidos celulares como no plasma sanguíneo.³¹

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.³⁰⁻³³ A quantificação de glutathione pode indicar uma 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.³¹

1.2.2 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

No que tange 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.³⁴ 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.³⁴ Em sistemas biológicos, a atividade sinérgica entre antioxidantes é muito comum, como é observado com a própria glutathione.³⁵ A mesma age regenerando o ascorbato e este regenerando o α -tocoferol, recuperando suas propriedades de supressão aos ROS.³⁵ 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.³

1.2.3 - SUPERÓXIDO DISMUTASE

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).³⁶ Nas células há três isoenzimas de SOD: citosólica (CuZnSOD; SOD1), mitocondrial (MnSOD; SOD2) e extracelular (EC-SOD; SOD3).^{36,37} Desses três tipos a mais abundante é a SOD1.³⁷

Os dois passos para a reação do ânion 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 ânion superóxido, adquirindo um próton e liberando um oxigênio molecular.³⁷

FIGURA 5 - Função da superóxido dismutase (SOD) sob as espécies reativas de oxigênio.

FONTE: Johnson F. e cols.³⁷

A forma reduzida da enzima (Fe^{2+} , Cu^+ e Mn^{2+}) liga-se a um segundo peróxido ânion e próton, liberando H_2O_2 e retornando para seu estado oxidado.³⁷

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.³⁷

É esperado que o superóxio ânion, seja um substrato para a enzima catalase e outra enzima catalisadora do peróxido de hidrogênio como a glutathione peroxidase, conforme figura 5.³⁷ Entretanto a conversão do ânion superóxido para peróxido de hidrogênio pela SOD pode levar a consequências pró-oxidantes.³⁷

1.3 - MARCADORES DA LESÃO OXIDATIVA INDUZIDA POR I/R

Em modelos biológicos, portanto, o estresse oxidativo é o resultado final entre a produção de ROS – o qual pode ocorrer como parte de mecanismos fisiológicos (como na cadeia respiratória) ou ser consequência de condições patológicas (como na lesão por I/R) – e a atividade do sistema de defesa antioxidante, sejam de origem endógena ou exógena.^{26,27}

Biomarcadores de estresse oxidativo são moléculas que são modificadas pela interação com ROS e que se alteram com o aumento do estresse oxidativo.^{26,27} DNA, lipídios, proteínas e carboidratos são alguns exemplos de substâncias que podem ser modificadas.^{26,27,38} Alguns fatores influenciam a aplicação clínica desses biomarcadores; a estabilidade, especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade da mensuração.^{26,27,38-44}

1.3.1 - MALONALDEÍDO (MDA)

A lipoperoxidação (LPO) trata-se de uma reação em cadeia mediada por ROS, resultando na deterioração oxidativa de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs).³⁸ PUFAs são aqueles que apresentam mais de uma dupla ligação covalente carbono-carbono em sua estrutura.³⁸ São os principais componentes estruturais da membrana celular, sendo parte integrante de sua estrutura lipoprotéica. Os PUFAs são particularmente susceptíveis ao ataque por ROS.³⁸

A LPO é constituída de três fases: iniciação, propagação e terminação (Figura 6).³⁸ A fase de iniciação começa em geral com a abstração de um átomo de hidrogênio do carbono central entre as duas bandas insaturadas da molécula lipídica.³⁸ Com isso, forma-se um radical livre instável com carbono central que é estabilizado rapidamente.³⁸

Figura 6: Peroxidação lipídica da membrana e formação de hidroperóxidos. Adaptado de Rice-Evans et al.³⁸

Há métodos que avaliam a atividade das ROS sob lípidos da membrana celular, como a espectroscopia ultravioleta e cromatografia líquida de alta performance (HPLC), detectando conjugados dienos pela mensuração da perda seletiva de PUFA's a partir de frações de membrana.³⁸ Tais métodos, apesar de guardar uma boa correlação com outros índices de peroxidação, possuem limitações importantes em sua aplicabilidade *in vivo* (Buttriss & Diplock, apud Rice-Evans et al.³⁸). A fase de propagação tem início com a reação espontânea do conjugado lipídico dieno com o oxigênio, formando-se radicais peroxil.³⁸ Estes podem ser bloqueados por antioxidantes reparadores ou reagir com lipídios poli-insaturados adjacentes pela abstração de um átomo de hidrogênio, formando hidroperóxidos.³⁹ Observa-se que a abstração deste novo átomo de hidrogênio de uma molécula adjacente de ácido graxo poli-insaturado reinicia o processo (reação em cadeia) que apenas será interrompido pela ação de antioxidantes (terminação).^{38,39} A determinação de hidroperóxidos em amostras biológicas é um método frequentemente utilizado para quantificação da LPO, embora extremamente complexo pela labilidade destes compostos.³⁸

Uma vez produzidos, os hidroperóxidos são metabolizados a aldeídos, dentre estes o MDA.^{38,39} Trata-se de um dialdeído de três carbonos altamente reativo.^{38,39} Em geral é produzido a partir de hidroperóxidos lipídicos, entretanto, pode também derivar da hidrólise de pentoses, desoriboses, hexoses, de alguns aminoácidos e do DNA (Frankel & Neff, apud Rice-Evans et al.³⁸). O MDA pode ser dosado com grande especificidade e acurácia por métodos de HPLC.^{38,39} Desde sua proposição, este método sofreu muitas modificações, todas relativas às condições da reação, mas sem que a reação em si sofresse qualquer alteração.⁴⁰ Percário et al. padronizaram a técnica de dosagem do MDA em 1993, tornando-a extremamente factível, reprodutível e tecnicamente simples.⁴¹

1.3.2 - PROTEINA CARBONILADA

Dentre os vários testes de oxidação tecidual, a proteína carbonilada é um dos mais utilizados para inferir o estresse oxidativo. Isso deve-se ao fato que a carbonilação proteica pode ser produzida pelos ROS, bem como pelos produtos da peroxidação lipídica.⁴² Apresenta ainda a vantagem de ser mais estável e apresentar uma meia vida mais longa quando comparado com o malonaldeído.⁴³

Há três tipos de modificações oxidativa responsáveis pela elevação da proteína carbonilada; 1) lesão direta pelas ROS em certos locais das cadeias de aminoácidos 2) modificações na histidina, cisteína e resíduos de lisina provocado pelos produtos da peroxidação lipídica e 3) reação com açúcares reduzidos.⁴²

Os diversos métodos de aferição da proteína carbonilada baseiam-se na detecção do grupo proteico CO marcando-o com ácido borohidreto.⁴⁴

1.3.3 - CASPASE-3

As caspases são endoproteases que clivam ligações peptídicas numa reação que depende de resíduos de cisteína no sítio catalítico ativo de caspase e ocorre apenas com certos resíduos de ácido aspártico como substrato.⁴⁵ Embora o processamento de caspase-mediada possa resultar na inativação de substrato, pode também gerar moléculas sinalizadoras ativas que participam nos processos de apoptose e inflamação.⁴⁵ Devido a isso cada vez mais, as caspases têm sido amplamente classificadas pelas suas funções conhecidas na apoptose (caspase-3, -6, -7, -8, -9 e em mamíferos), e, em inflamação

(caspase-1, -4, -5, -12 em seres humanos e da caspase-1, -11, e -12 em camundongos).⁴⁵ As funções de caspase-2, -10, -14 e são menos facilmente categorizados.⁴⁵ As caspases envolvidas na apoptose foram subclassificadas pelo seu mecanismo de ação em iniciadores (caspase-8 e -9) e promotoras (caspase-3, -6 e -7).⁴⁵ São inicialmente produzidos como pró-caspases monoméricas inativos que requerem dimerização e frequente quebra para ativação.⁴⁵ A apoptose é executada através de vias de sinalização específicas sendo que dois mecanismos são conhecidos; via caspase-independente e via caspase-dependente.⁴⁶ Em uma sequência de eventos semelhantes à coagulação sanguínea, o início da apoptose dispara a “cascata das caspases”, na qual as caspases “iniciadoras” são ativadas (i.e., caspase-8, caspase-9, caspase-12).⁴⁶ Por sua vez, estas ativam as caspases “efetadoras” (i.e., caspase-3, caspase-6, caspase-7), as quais realizam os verdadeiros eventos proteolíticos e fragmentação do DNA (via DNAase ativada por caspase) que, finalmente, resulta em degradação da célula.⁴⁶ O mecanismo apoptótico caspase-independente é executado via liberação de mediadores a partir da mitocôndria (fator de indução da apoptose e endonuclease G que são capazes de produzir, diretamente, fragmentação de DNA em grande escala.⁴⁶ A mitocôndria é atualmente considerada a chave para a indução e regulação da apoptose. Sabe-se que a necrose ocorre quando se esgotam os estoques de ATP.⁴⁶ Quando ATP é ao menos parcialmente preservado, citocromo c é liberado com ativação da caspase, resultando em morte celular.⁴⁶

1.4 - GLUTAMINA

Em 1873, Hlasiwetz e Habermann foram os primeiros a considerar a glutamina como sendo uma molécula com propriedades biologicamente importantes.⁴⁷ Posteriormente, novas observações levaram os pesquisadores a pensar que a amônia encontrada em hidrolisados proteicos poderia ser o resultado da liberação de GLN, bem como de asparagina.⁴⁷ Cerca de 60 anos depois, Krebs, em 1935, demonstrou que células possuem a capacidade de sintetizar ou degradar GLN.⁴⁷

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.⁴⁷ Fazem parte de sua composição química nas seguintes quantidades: carbono (41,09%), oxigênio (32,84%), nitrogênio (19,17%) e hidrogênio (6,90%).⁴⁷ 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.⁴⁷

GLN é classificada como um aminoácido não essencial sendo o mais abundante aminoácido livre no corpo.⁴⁸ 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.⁴⁸ Eventos cirúrgicos, queimaduras, infecção pelo vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida, câncer e exercícios físicos intensos e prolongados são algumas situações nas quais se observa que o consumo de GLN excede a capacidade de síntese corporal.⁴⁸ Nessas situações a GLN é considerada essencial devido ao seu grande consumo.⁴⁸

A síntese da GLN no músculo esquelético, durante o estado pós-absortivo, ocorre por meio da captação de glutamato, a partir da circulação sanguínea.⁴⁹ O glutamato é responsável por 40% da síntese de GLN.^{48,50}

Esse aminoácido é a fonte de energia preferencial para os enterócitos, hepatócitos, linfócitos e macrófagos.^{50,49} A síntese de GLN é de aproximadamente 70 g por dia em humanos e, aproximadamente 30% desta é proveniente da quebra proteica sendo que o restante é originado da síntese de novo deste aminoácido.⁵⁰ A GLN pode ser sintetizada em vários órgãos.⁵⁰ As maiores quantias são sintetizadas na musculatura esquelética, no entanto cérebro, tecido adiposo, coração e o pulmão também podem sintetizar sobre certas condições fisiológicas e patológicas.⁵⁰ Esse aminoácido está envolvido na amoniogênese, sendo também responsável pelo equilíbrio ácido-base.⁴⁹ A capacidade de receber e doar nitrogênio faz da GLN o maior veículo de transferência de nitrogênio entre os tecidos.⁵¹

O glutamato é formado pelo ácido α cetoglutarato como um intermediário do ciclo de Krebs e amônia.⁵² Na reação catalisada pela glutamina sintetase o glutamato reage com a amônia para formar a GLN.^{52,53}

Assim, o amônio reage com o ácido α cetoglutarato originando glutamato numa reação mediada pela enzima glutamato desidrogenase, utilizando energia fornecida pelo NADPH + H.⁵²

O glutamato assim formado reagirá com o ATP, recebendo um grupo fosfato e formando o intermediário γ glutamilfosfato. Esta reação é catalisada pela glutamil sintetase.^{49,52,53}

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.^{49,52,53}

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.^{49,53}

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 cataboliza a GLN, e a glutamato desidrogenase, enzima que participa de sua síntese, são localizadas na mitocôndria.⁴⁹ A glutaminase apresenta-se sob a forma de, pelo menos duas isoenzimas: as glutaminases hepática e renal.⁴⁹ O rim é rico em glutaminase do tipo “renal” que aumenta quando o órgão é submetido a acidose.⁴⁹

A hidrólise da GLN a glutamato nos túbulos distais dos néfrons é a principal via de produção de NH_3 pelos rins.⁵¹ 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.⁵⁴

Evidências na literatura demonstram que a GLN parece ter importante papel protetor na mucosa intestinal durante o trauma e injúrias graves.⁵⁹ A mesma é fundamental para a produção de glutatona, como visto anteriormente, uma das mais importantes fontes endógenas de defesa antioxidante.⁵⁸

1.4.1 - ISQUEMIA/REPERFUSÃO RENAL E GLUTAMINA

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. 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.^{4,8,55}

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 constitui um fator de risco importante para a falência renal e rejeição do enxerto em transplantes renais.⁵⁶ 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.²⁰⁻²⁴

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. Estudos clássicos destes modelos, mostraram tolerar extremamente mal este estado de isquemia renal quente em cães.^{57, 58}

Várias pesquisas experimentais, em animais, utilizaram modelos de I/R renal associado à utilização de nutrientes com o intuito de diminuir a lesão renal.^{59,39,40,41}

Shokeir et al. avaliaram os efeitos da L-arginina e alfa tocoferol na I/R renal.³⁸ A suplementação com tais nutrientes apresentou um efeito protetor antioxidante na isquemia/reperfusão renal em transplantes realizados em animais.³⁸ Tal benefício foi constatado principalmente após o 14º dia do transplante.³⁸ Guz et al. utilizando modelo semelhante em ratos submetidos a isquemia/reperfusão renal, também demonstraram o efeito benéfico da taurina na preservação da função renal.⁶⁰ Bernardi et al. suplementaram N-acetilcisteína e deferoxamina em ratos submetidos a isquemia/reperfusão renal e obtiveram diminuição nas lesões por estresse oxidativo.⁶¹ Nesse rol de substâncias inclui-se até moléculas sintéticas como a mesna (2-mercaptoetano sulfonato) descrito por Kabasakal et al. atenuando a lesão renal por I/R.⁶²

Dentre tais substâncias ofertadas ao organismo no intuito de amenizar lesões teciduais e sistêmicas advindas da agressão da isquemia reperfusão se destaca a glutamina. Trata-se de um aminoácido mais abundante no plasma e musculatura esquelética.⁶³ Há diversos estudos que correlacionam a queda dos níveis de glutamina após trauma e infecções.⁶⁴ Dentre as hipóteses do efeito benéfico da glutamina sobre pacientes graves se incluem a regulação imunológica e a preservação da capacidade antioxidante total e glutatônica.⁴² Recentemente, tal aminoácido foi correlacionado com efeito protetor contra lesão por isquemia reperfusão em diversos tecidos como rins, intestino, coração, fígado, cérebro e musculatura esquelética.^{65,66} Uma das mais importantes características da GLN é a sua relação com a biossíntese de glutatônica.⁶⁷ Glutamina provê glutamato para o sistema glutatônico, o qual é uma das principais fontes da defesa antioxidante ao nível celular.⁴⁶ Glutamato é pouco transportado através das membranas; a glutamina, uma vez sendo facilmente transportada, serve como uma fonte intracelular de glutamato.⁶⁸ Deve-se lembrar que esse sistema antioxidante também é composto pela enzima glutatônica peroxidase que é responsável pela oxidação da glutatônica reduzida catalisando a redução do peróxido de hidrogênio e uma variedade de hidroperóxidos orgânicos, utilizando a glutatônica como agente redutor.³¹

A dose de ideal de GLN utilizada é um fator de fundamental relevância e ainda gera dúvidas. Johnson et al. 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.⁶⁹ Engel et al. 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.⁷⁰ Uma metanálise de Novak et al. 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.⁷¹ Já Pires et al. utilizaram 0,75g/Kg e obteve redução do estresse oxidativo na I/R cerebral.⁶⁶ Outra revisão mais recente, na qual foram utilizadas doses de 0,13 a 0,86 g/kg/dia, questiona o real benefício dessa suplementação em pacientes graves.⁷² Gouvêa Junior et al. demonstraram, em estudo experimental em ratos, que 0,5 g/kg/dia administrado através de gavagem favorece o sistema antioxidante em um modelo de isquemia e reperfusão renal.⁶⁵ Dois outros estudos preconizam doses que variam entre 0,15g/Kg a 0,75g/kg com o intuito da proteção contra a lesão de isquemia/reperfusão.^{73,74} Embora devamos destacar que estudos demonstrem que altas doses de GLN em idosos elevem os níveis de uréia e creatinina, justificado pelo fato da dificuldade dos rins desses pacientes em excretar tais substâncias apesar de não ter havido significado clínico.⁷⁵

A via para administração de glutamina também merece considerações especiais. Luo et al. utilizando uma dose de 0,5 g/Kg/dia demonstraram não haver diferença na utilização da GLN parenteral ou enteral no tocante a capacidade antioxidante e diminuição do stress oxidativo.⁷⁶

1.5 - PRÉ CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO

O termo pré-condicionamento isquêmico (PCI) foi introduzido na literatura por Murry et al. e significa a realização de um curto período de isquemia seguido por um breve espaço de tempo de reperfusão que geralmente antecede ao período definitivo, mais longo, de isquemia.⁷⁷ Os autores demonstraram o efeito benéfico de curtos episódios de oclusão coronária seguidos de curtos períodos de reperfusão na extensão da área de infarto quando comparada com a causada por isquemia sem PCI.⁷⁷

O papel do PCI no aumento da tolerância à isquemia tem sido descrito em outros órgãos, como cérebro, medula espinhal, músculo esquelético, retina, rins, intestino, além do fígado.^{78,79,80,81}

Recentemente se aplicou em estudos experimentais renais, técnicas descritas inicialmente para I/R miocárdica, como pré e pós condicionamento isquêmico e ainda o pré-condicionamento isquêmico remoto e pós-condicionamento remoto, sendo que as duas últimas consistem em isquemiar um membro distante do órgão que sofre a isquemia principal.⁸² Tais técnicas obtiveram sucesso na minimização do traumatismo em diversos órgãos, mas não há estudos clínicos em rins humanos.^{83, 84}

A base molecular do PCI envolve a liberação de vários mediadores que posteriormente alteram uma múltipla e complexa via de sinais intracelulares.⁸⁵ Tal processo acarreta diminuição da resposta inflamatória, redução da apoptose celular e preservação da reserva energética.⁸⁶ Também é conhecido como efeito cíclico de ação do PCI no miocárdio desaparecendo 2-3 horas posteriormente a injúria isquêmica, e reaparecendo após 24 horas.⁸⁷ Especificamente no rim, Joo et al. relataram um efeito prolongado do PCI estendendo-se por até 2 a 3 dias.⁵⁷

Não há um consenso na literatura quanto ao tempo a ser aplicado no PCI, existindo uma variedade de protocolos, com um único período mais longo de estímulo ou dois ou mais períodos de breves de isquemia.⁸⁸ Em estudo de PCI em rins de ratos, Ma et al. propõem três períodos de isquemia com três minutos de duração, intercalados com cinco minutos de perfusão.⁸⁹ Já Tsutsui et al. utilizaram, em modelo semelhante, o tempo de PCI de 2 minutos de isquemia e 5 de perfusão apresentando efeito protetor.⁹⁰

Deve-se lembrar ainda sobre o método do pré condicionamento remoto, que nada mais é que breves períodos de isquemia em locais distantes do órgão alvo da isquemia principal. Esse tem se mostrado importante na diminuição da injúria da I/R.⁹¹

Em relação ao tempo de proteção do PCI, Wever et al., na única metanálise existente sobre o tema, avaliando-se a creatinina, referem maior proteção em animais submetidos a I/R após 24 horas do estímulo da PCI.⁸⁸ Esta mesma revisão relatou uma variedade de protocolos utilizados com somente um ciclo de pré condicionamento a até mesmo vários ciclos não se observando diferenças nos resultados.⁸⁸ Observou-se ainda benefício do PCI quando se aferiu a função e histologia renal.⁸⁸

Entretanto, apesar dos estudos com finalidade de definir o efeito protetor do PCI, o seu real fundamento não está ainda claramente estabelecido.⁹²

2 - JUSTIFICATIVA

Conforme observado em estudos anteriores, a lesão de isquemia e reperfusão apresenta grande potencial de causar disfunção do enxerto renal. Em nosso meio, devido à influência de vários fatores como distância entre o local da captação do órgão e o centro transplantador, e o tempo decorrido desde a comunicação com o receptor e o início da cirurgia, o fator isquemia/reperfusão assume papel fundamental.

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 é fato que a GLN atenua a apoptose das células tubulares na lesão renal aguda e reduz o dano oxidativo na I/R hepática.^{30,93} Logo a implementação de fontes de defesa antioxidante é um ponto passível de estudo, na busca de uma forma de diminuir a injúria oxidativa.

O PCI apresenta-se como uma alternativa a ser adotada a fim de amenizar a lesão da I/R em diversos órgãos.

Baseado em tais premissas, nos propusemos estudar a associação de glutamina e pré-condicionamento isquêmico de modo a verificar se há uma potencialização dos efeitos benéficos e, com isso, minimizar a lesão celular advinda do processo de isquemia/reperfusão renal.

3 - OBJETIVO

Avaliar a ação da glutamina associada ao pré-condicionamento isquêmico na isquemia e reperfusão renal em modelo animal.

4 - MÉTODOS

O experimento seguiu os princípios éticos preconizados pelo Colégio Brasileiro de experimentação animal (COBEA). O mesmo foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa em animais da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). (Anexos)

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 de Mato Grosso.

O cálculo da amostra foi realizado levando-se em consideração estudos prévios, nos quais realizamos I/R renal e dosagens de enzimas e peroxidação lipídica.

Inicialmente, para fim de adaptação ambiental, os animais (N=50) permaneceram dois dias no laboratório de investigação sob ciclo de 12 horas de claro e escuro, temperatura ambiental controlada em 24⁰C, 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 utilizando fio de algodão 2-0 sendo retirado a peça cirúrgica (rim direito). Finalmente, realizou-se a sutura em plano único da musculatura e pele com fio de nylon 3-0.

No sétimo dia de pós-operatório, os animais foram randomizados em cinco grupos, com 10 animais em cada grupo e foram assim divididos: Grupo I – sham, Grupo II – isquemia/reperfusão (I/R), Grupo III – pré-condicionamento isquêmico (PCI), Grupo IV – glutamina (GLN), Grupo V: pré-condicionamento e glutamina (PCI+GLN). Cada grupo recebeu a mesma dieta por mais sete dias, sendo que o grupo IV (glutamina) e o grupo V (pré condicionamento e glutamina) receberam através de gavagem, por 7 dias, suplementação com glutamina (0,5g/kg/dia).

Ao final do décimo quarto dia após a nefrectomia procedeu-se a laparotomia com incisão abdominal ampla, dissecação cautelosa do pedículo renal esquerdo em todos os grupos de animais e realização dos seguintes procedimentos;

Grupo I – sham: dissecação do pedículo renal esquerdo sem indução de isquemia renal;

Grupo II – isquemia/reperfusão: após dissecação do pedículo renal, indução de isquemia quente durante 45 minutos por obstrução arterial com pinça vascular (bulldog);

Grupo III – pré-condicionamento: 3 ciclos de obstrução arterial por 3 minutos seguidos de 5 minutos de reperfusão, que antecedem o período de isquemia de 45 minutos;

Grupo IV – glutamina: após dissecação do pedículo renal foram submetidos a indução de isquemia de 45 minutos como descrito acima;

Grupo V: glutamina e pré-condicionamento: Foram submetidos a tratamento semelhante ao do grupo III, ou seja, 3 ciclos de pré-condicionamento antecedendo a isquemia de 45 minutos.

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

Os animais foram submetidos a uma terceira intervenção cirúrgica após anestesia onde era coletado o rim esquerdo e 3 ml de sangue da veia cava através de punção da veia cava com agulha 7 x 28mm. Posteriormente os animais eram mortos por exsanguinação.

4.2 - ANIMAIS

Utilizou-se 50 ratos Wistar, variedade albinos roentia mammalia (*Rattus norvegicus*), machos e adultos. Os mesmos foram provenientes do biotério central da UFMT. Os animais foram escolhidos aleatoriamente e pesados. Foram incluídos aqueles que apresentaram peso corporal entre 280 e 320 g e mesma data de nascimento.

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 através de um papel com o nome do grupo depositado em uma urna, de modo que se sorteava qual animal iria para cada grupo. A caracterização dos grupos de estudo pode ser observada na figura 7.

FIGURA 7 - Distribuição dos animais de experimentação em função dos grupos de estudo (N= 50). DPR – Dissecção do pedículo renal; GLN - Glutamina; PCI- pré condicionamento isquêmico três períodos de 3' isquemia e 5' reperusão; I/R – isquemia reperusão; 45' isquemia e posterior reperusão. FONTE: Material da pesquisa.

4.4 - SOLUÇÃO UTILIZADA PARA GAVAGEM

Foi utilizado no experimento um tipo de solução para aplicação enteral:

- 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 um 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.

FIGURA 8 – 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. A sistematização da anestesia e do ato operatório, conforme o grupo de estudo, seguiu rigorosamente a mesma sequência em todos os animais.

4.6 - ANESTESIA

Os animais receberam anestesia intramuscular de cloridrato de cetamina 75 mg/kg (Cloridrato de Cetamina, 50mg/ml - Ketalar®, Pfizer LTDA., Guarulhos-SP, Brasil) associado a xilasina 10 mg/kg (Cloridrato de Xilazina 2% - XILAZIN®, Syntec do Brasil Ltda, Cotia- SP, Brasil) por via intramuscular. 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 contada em intervalos de 5 minutos.

4.7 - 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 (HUFMT-UFMT).

FIGURA 9 – Técnica utilizada para anestésiar o animal.

FONTE: Material da pesquisa.

Os campos estéreis fenestrados para assepsia também foram oriundos do HUFMT-UFMT. Todos os animais foram operados com utilização de paramentação composta por gorro, máscara cirúrgica e luvas cirúrgicas de látex descartáveis estéreis.

4.8 - 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, delicadamente.

Seguiu-se tricotomia da parede abdominal anterior, antisepsia ampla desta região com solução de polivinil povidine (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 10 e 11)

FIGURA 10 – Animal anestesiado, imobilizado e realizado anti-sepsia.

FONTE: Material da pesquisa.

FIGURA 11 – Animal com campo estéril e demarcação da incisão cirúrgica.

FONTE: Material da pesquisa.

FIGURA 12 – Incisão em flanco direito com localização renal.

FONTE: Material da pesquisa.

4.8.1 - 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 12). 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 13) Retirou-se a peça cirúrgica (rim direito) e suturou-se a cavidade abdominal em plano único utilizando fio de nylon 2-0.(Figura 14)

FIGURA 13 – Isolamento e ligadura de pedículo renal direito.

FONTE: Material da pesquisa.

FIGURA 14 – Sutura de parede abdominal utilizando nylon 2-0.

FONTE: Material da pesquisa.

4.8.2 - Operação 2

Realizou-se laparotomia com incisão ampla em todos os animais e posteriormente dissecou-se o pedículo renal a esquerda delicadamente. (figura 15) No grupo sham realizamos somente a dissecação do pedículo sem indução de isquemia renal. No grupo isquemia/reperfusão após dissecação do pedículo renal, foi realizada a indução de isquemia quente durante 45 minutos por obstrução arterial com pinça microvascular (bulldog)(figura 16). Já no grupo do pré-condicionamento foram realizados três ciclos de obstrução do pedículo vascular renal por três minutos seguidos de cinco minutos de reperfusão, que antecedem o período de isquemia de 45 minutos. No grupo glutamina os animais foram submetidos a indução de isquemia de 45 minutos como descrito acima. Por fim, o grupo glutamina e pré-condicionamento foram submetidos a tratamento semelhante ao do grupo III, ou seja, 3 ciclos de pré-condicionamento antecedendo a isquemia de 45 minutos. Exceto ao grupo sham, 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 reperfusão renal foi constatada pelo retorno da coloração do órgão.(figura 17)

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 e temperatura ambiente superior a 28°C a fim de evitar a hipotermia dos animais.

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.

Posteriormente, em todos animais, foi realizado a sutura em plano único, da parede abdominal utilizando fio nylon 2-0.

FIGURA 15 – Dissecção de rim esquerdo para posterior isolamento do pedículo renal.

FONTE: Material da pesquisa.

FIGURA 16 – Clampeamento do pedículo renal esquerdo e início da palidez
FONTE: Material da pesquisa.

FIGURA 17 – Início do retorno a coloração normal do rim após retirada do clamp.

FONTE: Material da pesquisa.

4.8.3 - Operação 3: COLHEITA DE AMOSTRA DE SANGUE E EUTANÁSIA

Após 24 horas e sete dias do início da reperfusão, realizou-se, respectivamente, a colheita do material em todos os grupos. A fim de não haver alterações decorrentes do hiato de tempo entre a eutanásia do animal e colheita do material que poderiam resultar em um viés do estudo, realizou-se novo procedimento cirúrgico. Após anestesiado o animal, conforme descrito previamente, acessou-se a cavidade abdominal através de laparotomia.

Efetou-se a 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 18 e 19). 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 sobrares resíduos visíveis.

FIGURA 18 – Dissecção de cava para coleta da amostra sanguínea.

FONTE: Material da pesquisa.

FIGURA 19 – Colheita de sangue da veia cava. FONTE: Material da pesquisa.

FIGURA 20 – Acondicionamento e identificação renal. FONTE: Material da pesquisa.

O sangue foi então imediatamente repassado para frasco de colheita seco devidamente identificado com o código do animal. Subsequentemente realizou-se a colheita do rim e morte do animal.

O rim era imediatamente seccionado em quatro fragmentos de tamanhos semelhantes de forma que todas as amostras serem representadas pelo córtex e medula renal e acondicionado em papel alumínio, identificando o grupo e o dia. Após a identificação, o material era submerso no nitrogênio líquido a -196° Celsius até ser transportado ao freezer -80°C .

FIGURA 21 – Imersão em nitrogênio líquido do tecido renal. 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.

4.9 - DOSAGENS BIOQUÍMICAS: URÉIA, CREATININA, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL, SUPERÓXIDO DISMUTASE, PROTEÍNA CARBONILADA, GLUTATIONA PEROXIDASE, GLUTATIONA REDUZIDA, GLUTATIONA REDUTASE, CASPASE-3, MALONALDEÍDO E PROTEÍNA CARBONILADA.

As dosagens bioquímicas dos valores de capacidade antioxidante total, superóxido dismutase, glutaciona peroxidase, glutaciona reduzida, glutaciona redutase, caspase-3, malonaldeído e proteína carbonilada foram realizadas no laboratório de química da UFMT. As dosagens de uréia e creatinina foram realizadas no laboratório Santa Rosa em Cuiabá.

Exceto as dosagens de uréia e creatinina, todas as outras foram realizadas utilizando uma contraprova (“em espelho”). As metodologias das dosagens encontra-se nos “ANEXOS”.

5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

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

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

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

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.

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

Tabela 1: Valor (média ± desvio padrão) das dosagens realizadas conforme os grupos (n=5), após 24 horas de reperusão.						
	Sham	Glut	Pte	IR	PreGlut	P value
CAT (µmol/mg de proteína)	22,02±1,74 ^a	15,92±2,67 ^b	17,43±2,71 ^b	13,43±1,49 ^b	13,38±1,95 ^b	<0,001
GSH (µmol GSH/mg tecidos)	1,67±0,29 ^a	1,56±0,36 ^a	2,39±0,30 ^b	1,90±0,32 ^{a,b}	2,55±0,34 ^c	<0,001
GPx (U/mg de proteína)	2,59±0,39 ^a	2,66±0,68 ^a	2,78±0,82 ^a	2,01±0,75 ^a	2,35±0,30 ^a	0,35
GR (U/mg de proteína)	0,17±0,04 ^a	0,18±0,02 ^a	0,22±0,05 ^a	0,20±0,04 ^a	0,22±0,02 ^a	0,18
SOD (U/mg de proteína)	63,60±12,78 ^a	72,03±9,68 ^{a,b}	64,67±7,19 ^a	63,25±12,45 ^a	83,11±2,42 ^b	0,018
Caspase 3 (%do controle)	1,92±0,80 ^a	1,86±0,78 ^a	2,11±1,36 ^a	2,22±0,87 ^a	1,89±1,13 ^a	0,975
Ureia (mg/dL)	48,6±2,14 ^a	189,8±81,3 ^b	156,2±42,35 ^b	165,3±54,41 ^b	121,8±26,25 ^{a,b}	0,002
Creatinina (mg/dL)	0,43±0,08 ^a	2,04±1,47 ^b	1,59±0,58 ^a	1,53±0,61 ^a	0,97±0,17 ^a	0,026
MDA (µmol/mg tecidos)	9,90±0,91 ^a	9,80±1,91 ^a	7,93±0,82 ^a	8,34±1,14 ^a	8,35±0,88 ^a	0,064
Proteínas carboniladas (µmol proteína/mg de proteína)	1,31±0,75 ^a	3,55±1,08 ^b	2,38±1,20 ^{a,b}	1,77±0,43 ^a	1,28±0,37 ^a	0,002

Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. CAT (Capacidade antioxidante total), GSH (Glutathiona reduzida), GPx (Glutathiona peroxidase), GR (Glutathiona redutase), SOD (Superóxido dismutase), MDA (malonaldeído).

Tabela 2: Valor (média ± desvio padrão) das dosagens realizadas conforme os grupos (n=5), após sete dias de reperusão.

	Sham	Glut	Pre	IR	Pre/Glut	P value
CAT ($\mu\text{mol/mg}$ de proteína)	26,07±2,91 ^a	20,21±4,72 ^{ab}	21,44±4,60 ^{ab}	17,94±3,20 ^b	18,34±1,51 ^b	0.014
GSH (μmol GSH/g tecidos)	2,51±0,12 ^{ab}	2,15±0,24 ^a	2,47±0,22 ^{ab}	2,56±0,18 ^b	2,35±0,15 ^{ab}	0.022
GPx (U/mg de proteína)	4,68±0,48 ^{ab}	3,51±1,20 ^b	3,92±0,57 ^b	3,65±0,83 ^b	7,26±3,25 ^a	0.009
GR (U/mg de proteína)	0,20±0,05 ^a	0,20±0,01 ^a	0,19±0,05 ^a	0,19±0,04 ^a	0,33±0,05 ^b	0.001
SOD (U/mg de proteína)	68,97±13,88 ^{ac}	39,90±10,48 ^b	47,90±12,05 ^{ab}	48,46±13,78 ^{ab}	74,80±16,27 ^c	0.002
Caspase-3 (% do controle)	1,16±0,53 ^a	2,01±0,37 ^{ab}	1,79±0,55 ^{ab}	1,57±0,37 ^{ab}	2,52±1,12 ^b	0.027
Ureia (mg/dL)	51,6±7,62 ^b	167,03±61,65 ^a	49,9±8,48 ^b	75,3±16,99 ^b	50,80±6,43 ^b	<0.001
Creatinina (mg/dL)	0,41±0,04 ^a	1,35±0,46 ^c	0,52±0,08 ^{ab}	0,86±0,16 ^b	0,52±0,08 ^{ab}	<0.001
MDA ($\mu\text{mol/g}$ tecidos)	6,95±0,76 ^a	5,10±1,70 ^a	7,19±1,91 ^a	6,83±2,17 ^a	6,57±1,77 ^a	0.364
Proteínas carboniladas (μmol proteína/mg de proteína)	0,61±0,29 ^a	0,93±0,20 ^{ac}	1,65±0,31 ^{bcd}	1,30±0,32 ^{b,ce}	2,01±0,08 ^d	<0.001

Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. CAT (Capacidade antioxidante total), GSH (Glutathione reduzida), GPx (Glutathione peroxidase), GR (Glutathione reductase), SOD (superóxido dismutase), MDA (malonaldeído).

6.1 - DOSAGEM DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

A mensuração da capacidade antioxidante total após 24 horas do período de reperfusão, neste modelo experimental, demonstrou diferença entre o grupo sham ($22,02 \pm 1,74$) com os demais grupos ($p < 0,001$). Não se visualizou diferenças entre os grupos GLN, PCI, I/R e PCI+GLN (GLN $15,92 \pm 2,67$ vs PCI $17,43 \pm 2,71$ vs. I/R $13,43 \pm 1,49$ vs. PCI+GLN $13,38 \pm 1,95$; $p > 0,05$ - gráfico 1).

Em relação ao sétimo dia observou-se diferença entre os grupos I/R ($17,94 \pm 3,29$, $p = 0,015$) e PCI+GLN ($18,34 \pm 1,51$ $p = 0,022$) quando comparados com o grupo sham ($26,07 \pm 2,91$). Já os grupos GLN ($20,21 \pm 4,72$) e grupo PCI ($21,44 \pm 4,60$) não apresentaram diferenças quando comparados ao grupo Sham ($P > 0,05$), entretanto também não foram diferentes dos grupos I/R e PCI+GLN ($p > 0,05$ – gráfico 2).

Gráfico 1 - Dosagem em tecido renal da Capacidade Antioxidante Total nos diferentes grupos estudados com 24 horas de reperfusão. Média e Desvio padrão. Símbolos diferentes representam diferença estatística. (GLN- Glutamina, PCI- pré condicionamento isquêmico, I/R- isquemia/reperfusão, PCI+GLN - Pré- condicionamento isquêmico associado a Glutamina) $p < 0,001$.

Gráfico 2 - Dosagem em tecido renal da Capacidade Antioxidante Total nos diferentes grupos estudados com sete dias de reperfusão. Média e Desvio padrão. Símbolos diferentes representam diferença estatística. (GLN- Glutamina, PCI- pré condicionamento isquêmico, I/R- isquemia/reperfusão, PCI+GLN - Pré- condicionamento isquêmico associado a Glutamina) $p < 0,001$.

6.2 - DOSAGEM DA GLUTATIONA REDUZIDA

Observou-se neste modelo experimental que após 24 horas da isquemia o grupo Sham apresentou diferença com o grupo PCI ($1,67 \pm 0,29$ vs $2,39 \pm 0,34$; $p < 0,01$) e grupo PCI+GLN ($1,67 \pm 0,29$ vs $2,55 \pm 0,34$; $p = 0,03$). Constatou-se também diferença entre o grupo GLN e PCI ($1,56 \pm 0,36$ vs $2,39 \pm 0,34$; $p = 0,06$) bem como o grupo GLN comparando-se com PCI+GLN ($1,56 \pm 0,36$ vs $2,55 \pm 0,34$; $p = 0,001$). O grupo I/R ($1,90 \pm 0,32$) apresentou diferença estatística quando comparado com o grupo PCI+GLN ($1,90 \pm 0,32$ vs $2,55 \pm 0,34$;

$p=0,03$). Os grupos PCI e I/R também não demonstraram diferença, bem como o grupo PCI+GLN e Grupo PCI ($p>0,05$ – gráfico 3).

Após o sétimo dia da reperfusão foi observado uma diferença entre os grupos GLN e I/R (GLN $2,15\pm0,24$ vs I/R $2,56\pm0,18$; $p=0,02$). Comparando-se os demais grupos não houveram diferenças (Sham $2,51\pm0,12$; PCI $2,47\pm0,22$; PCI+GLN $2,35\pm0,15$; $p>0,05$ – gráfico 4).

Gráfico 3 - Dosagem em tecido renal da glutathiona reduzida nos diferentes grupos estudados 24 horas após a reperfusão. Média e desvio padrão. Símbolos diferentes representam diferenças estatísticas. (GLN- Glutamina, PCI - Pré condicionamento isquêmico, I/R- isquemia/reperfusão, PCI+GLN- Pré-condicionamento isquêmico associado a Glutamina) $p=0,002$

Gráfico 4 - Dosagem em tecido renal da glutathiona reduzida nos diferentes grupos estudados sete dias após a reperfusão. Média e desvio padrão. Símbolos diferentes representam diferenças estatísticas. (GLN- Glutamina, PCI - Pré condicionamento isquêmico, I/R- isquemia/reperfusão, PCI+GLN- Pré-condicionamento isquêmico associado a Glutamina) $p=0,022$

6.3 - DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA PEROXIDASE

O valor da GPx no primeiro dia após a reperfusão não apresentou diferença entre os grupos (sham $2,59\pm0,39$; GLN $2,66\pm0,68$; PCI $2,78\pm0,82$; I/R $2,01\pm0,75$; PCI+GLN $2,35\pm0,30$; $p>0,05$ – gráfico 5).

Gráfico 5 - Dosagem em tecido renal da atividade da enzima glutathiona peroxidase nos diferentes grupos estudados 24 horas após a reperfusão. Média e desvio padrão. Símbolos diferentes representam diferença estatística. (GLN- Glutamina, PCI- pré condicionamento isquêmico, I/R- isquemia/reperfusão, PCI+GLN- Pré-condicionamento isquêmico associado a Glutamina) $p=0,35$.

Gráfico 6 - Dosagem em tecido renal da atividade da enzima glutathiona peroxidase nos diferentes grupos estudados sete dias após a reperfusão. Média e desvio padrão. Símbolos diferentes representam diferença estatística. (GLN- Glutamina, PCI- pré condicionamento isquêmico, I/R- isquemia/reperfusão, PCI+GLN- Pré-condicionamento isquêmico associado a Glutamina) $p=0,09$.

No sétimo dia o grupo PCI+GLN ($7,26 \pm 3,25$) apresentou-se mais elevado que o grupo GLN ($3,51 \pm 1,20$; $p=0,01$), PCI ($3,92 \pm 0,57$; $p=0,03$) e I/R ($3,65 \pm 0,83$; $p=0,01$), no entanto não diferiu do grupo Sham ($4,68 \pm 0,48$; $p=0,13$). Não se visualizou diferença entre o restante dos grupos (gráfico 6).

6.4 - DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA REDUTASE

A dosagem da GR após 24 horas da reperfusão não se observou diferença entre os diversos grupos (Sham $0,17 \pm 0,04$; GLN $0,18 \pm 0,02$; PCI $0,22 \pm 0,05$; I/R $0,20 \pm 0,04$; PCI+GLN $0,22 \pm 0,02$; $p>0,05$).

Gráfico 7 - Dosagem em tecido renal da atividade da enzima glutathione reductase nos diferentes grupos estudados 24 horas após a reperfusão. Média e desvio padrão. (GLN- Glutamina, PCI- pré condicionamento isquêmico, I/R-isquemia/reperfusão, PCI+GLN- Pré-condicionamento isquêmico associado a Glutamina) $p=0,18$.

Gráfico 8 - Dosagem em tecido renal da atividade da enzima glutathione reductase nos diferentes grupos estudados sete dias após a reperfusão. Média e desvio padrão. Símbolos diferentes representam diferença estatística. (GLN- Glutamina, PCI- pré-condicionamento isquêmico, I/R-isquemia/reperfusão, PCI+GLN- Pré-condicionamento isquêmico associado a Glutamina) $p=0,001$.

Na dosagem do sétimo dia de reperfusão visualizou-se diferença entre o grupo PCI+GLN ($0,32 \pm 0,05$) quando comparado com os outros grupos estudados (Sham $0,20 \pm 0,05$; $p=0,006$; GLN $0,20 \pm 0,01$; $p=0,006$; PCI $0,19 \pm 0,05$; $p=0,003$ I/R $0,19 \pm 0,04$; $p=0,003$).

6.5 - DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE

Observou-se nos valores da SOD, no primeiro dia após a reperfusão, diferença entre o grupo PCI+GLN e Sham ($83,11 \pm 2,42$ vs $63,60 \pm 12,78$; $p=0,034$), PCI+GLN e PCI ($83,11 \pm 2,42$ vs $64,67 \pm 7,19$; $p=0,048$) e PCI+GLN e I/R ($83,11 \pm 0,97$ vs $63,25 \pm 12,45$; $p=0,030$). Não houve diferença entre o grupo PCI+GLN e o grupo GLN ($83,11 \pm 2,42$ vs $72,03 \pm 9,68$; $p=0,39$), bem como entre GLN e o restante dos grupos ($p>0,05$ - gráfico 9).

A dosagem da SOD no sétimo dia após a reperfusão apresentou diferença entre o grupo sham quando comparado ao grupo Glutamina ($68,97 \pm 13,88$ vs $39,90 \pm 10,48$; $p = 0,02$). Observou-se também diferença entre o grupo GLN quando comparado com o grupo PCI+GLN ($39,90 \pm 10,48$ vs $74,80 \pm 16,27$; $p = 0,004$). O grupo PCI+GLN diferenciou-se também do grupo PCI ($74,80 \pm 16,27$ vs $47,90 \pm 12,05$; $p = 0,035$) e do grupo I/R ($74,80 \pm 16,27$ vs $48,46 \pm 13,78$; $p = 0,04$ - gráfico 10).

Gráfico 9 - Dosagem em tecido renal da atividade da enzima superóxido dismutase nos diferentes grupos estudados 24 horas após a reperfusão. Média e desvio padrão. Símbolos diferentes representam diferenças estatísticas. (GLN- Glutamina, PCI - Pré condicionamento isquêmico, I/R-isquemia/reperfusão, PCI+GLN- Pré condicionamento isquêmico associado a Glutamina, $p=0,022$

Gráfico 10 - Dosagem em tecido renal da atividade da enzima superóxido dismutase nos diferentes grupos estudados sete dias após a reperfusão. Média e desvio padrão. Símbolos diferentes representam diferenças estatísticas. (GLN- Glutamina, PCI - Pré condicionamento isquêmico, I/R-isquemia/reperfusão, PCI+GLN- Pré condicionamento isquêmico associado a Glutamina) $p=0,002$

6.6 - DOSAGEM DO MALONALDEÍDO

A aferição do MDA após 24 horas da isquemia não demonstrou diferença entre os grupos estudados (Sham $9,90 \pm 0,91$; GLN $9,80 \pm 1,91$; PCI $7,93 \pm 0,82$; I/R $8,34 \pm 1,14$; PCI+GLN $8,35 \pm 0,88$; $p > 0,05$ - gráfico 11). Também não houve diferença entre os grupos no sétimo dia de reperfusão após a isquemia (Sham $6,95 \pm 0,76$; GLNt $5,10 \pm 1,70$; PCI $7,19 \pm 1,91$; I/R $6,83 \pm 2,17$; PCI+GLN $6,57 \pm 1,77$; $p > 0,05$ - gráfico 12).

Gráfico 11 - Dosagem em tecido renal do malonaldeído nos diferentes grupos estudados 24 horas após a reperusão. Média e desvio padrão. (GLN- Glutamina, PCI- pré-condicionamento isquêmico, I/R-isquemia/reperusão, PCI+GLN- Pré-condicionamento isquêmico associado a Glutamina) $p=0,064$.

Gráfico 12 - Dosagem em tecido renal do malonaldeído nos diferentes grupos estudados sete dias após a reperusão. Média e desvio padrão. (GLN- Glutamina, PCI- pré-condicionamento isquêmico, I/R-isquemia/reperusão, PCI+GLN- Pré-condicionamento isquêmico associado a Glutamina) $p=0,36$.

6.7 - DOSAGEM DAS PROTEÍNAS CARBONILADAS

No primeiro dia de reperusão se observou diferença entre os grupos GLN e sham ($3,55 \pm 1,08$ vs $1,31 \pm 0,75$; $p=0,003$), GLN com I/R ($3,55 \pm 1,08$ vs $1,77 \pm 0,43$; $p=0,023$) e GLN com o grupo PCI+GLN ($3,55 \pm 1,08$ vs $1,28 \pm 0,37$; $p=0,003$). Não apresentou diferença quando comparado a GLN com o grupo PCI ($3,55 \pm 1,08$ vs $2,38 \pm 1,20$; $p=0,21$). O restante do grupo não apresentou diferenças entre si (gráfico 13).

Gráfico 13 - Dosagem em tecido renal da proteína carbonilada nos diferentes grupos estudados 24 horas após a reperusão. Média e desvio padrão. Símbolos diferentes representam diferenças estatísticas. (GLN- Glutamina, PCI - Pré condicionamento isquêmico, I/R-isquemia/reperusão, PCI+GLN- Pré-condicionamento isquêmico associado a Glutamina) $p=0,002$

Gráfico 14 - Dosagem no tecido renal da proteína carbonilada nos diferentes grupos estudados sete dias após a reperusão. Média e desvio padrão. Símbolos diferentes representam diferenças estatísticas. (GLN- Glutamina, PCI - Pré condicionamento isquêmico, I/R-isquemia/reperusão, PCI+GLN- Pré-condicionamento isquêmico associado a Glutamina) $p<0,001$

Já no sétimo dia o grupo sham apresentou diferenças com os grupos I/R ($0,61 \pm 0,29$ vs $1,30 \pm 0,32$; $p=0,003$), PCI ($0,61 \pm 0,28$ vs $1,65 \pm 0,31$; $p<0,001$) e PCI+GLN ($0,61 \pm 0,28$ vs $2,01 \pm 0,08$; $p<0,001$). Observou-se ainda diferença do grupo GLN em

relação aos grupos PCI ($0,92 \pm 0,20$ vs $1,65 \pm 0,31$; $p=0,002$) e PCI+GLN ($0,92 \pm 0,20$ vs $2,01 \pm 0,08$; $p<0,001$). Também se visualizou diferença entre o grupo I/R e PCI+GLN ($1,30 \pm 0,32$ vs $2,01 \pm 0,08$; $p=0,003$ – gráfico 14).

6.8 - DOSAGEM DA CASPASE-3

A mensuração da caspase-3, após 24 horas do período de reperfusão, neste modelo experimental, demonstrou valor semelhante entre os diversos grupos (Sham $1,92 \pm 0,80$; GLN $1,86 \pm 0,78$; PCI $2,11 \pm 1,36$; I/R $2,22 \pm 0,87$; PCI+GLN $1,89 \pm 1,13$, $p=0,975$ - gráfico 15)

Aos sete dias observou-se diferença entre os grupos sham ($1,16 \pm 0,53$) e PCI+GLN ($2,52 \pm 1,12$) $p=0,027$). Nos demais grupos não houve diferença estatística (GLN $2,01 \pm 0,37$; PCI $1,79 \pm 0,55$; I/R $1,57 \pm 0,37$, $p>0,05$ - gráfico 16).

Gráfico 15 - Dosagem em tecido renal da caspase-3 nos diferentes grupos estudados 24 horas após a reperfusão. Média e desvio padrão. Símbolos diferentes representam diferença estatística. (GLN- Glutamina, PCI - pré condicionamento isquêmico, I/R-isquemia/reperfusão, PCI+GLN- Pré-condicionamento isquêmico associado a Glutamina) $p=0,975$

Gráfico 16 - Dosagem em tecido renal da caspase 3 nos diferentes grupos estudados sete dias após a reperfusão. Média e desvio Padrão. Símbolos diferentes representam diferença estatística. (GLN- Glutamina, PCI - Pré condicionamento isquêmico, I/R-isquemia/reperfusão, PCI+GLN- Pré-condicionamento isquêmico associado a Glutamina) $p=0,02$

6.9 - DOSAGEM DA CREATININA

A dosagem sérica de creatinina no primeiro dia de reperfusão demonstrou diferença somente entre os grupos Sham e o grupo GLN (Sham $0,42 \pm 0,08$ vs GLN $2,04 \pm 1,47$; $p=0,021$). Quando comparado o grupo sham com o grupo PCI ($1,59 \pm 0,58$), I/R ($1,53 \pm 0,51$) e grupo PCI+GLN ($0,97 \pm 0,17$) não se constatou diferença. (gráfico 17)

Gráfico 17 - Dosagem sérica da creatinina nos diferentes grupos estudados 24 horas após a reperusão. Média e desvio padrão. Símbolos diferentes representam diferença estatística. (GLN- Glutamina, PCI- Pré condicionamento isquêmico, I/R-isquemia/reperusão, PCI+GLN- Pré-condicionamento isquêmico associado a Glutamina) $p=0,02$

Gráfico 18 - Dosagem sérica da creatinina nos diferentes grupos estudados sete dias após a reperusão. Média e desvio padrão. Símbolos diferentes representam diferenças estatísticas. (GLN- Glutamina, PCI- Pré condicionamento isquêmico, I/R-isquemia/reperusão, PCI+GLN- Pré-condicionamento isquêmico associado a Glutamina) $p=0,02$

Após sete dias constatou-se diferença entre o grupo sham com o grupo GLN ($0,41 \pm 0,04$ vs $1,35 \pm 0,46$; $p < 0,001$) e entre o grupo Sham com o grupo I/R ($0,41 \pm 0,04$ vs $0,86 \pm 0,16$; $p = 0,04$). Também houve diferença entre o grupo GLN com o grupo I/R ($1,35 \pm 0,46$ vs $0,86 \pm 0,16$; $p = 0,02$), grupo PCI ($1,35 \pm 0,17$ vs $0,52 \pm 0,08$; $p < 0,001$) e grupo PCI+GLN ($1,35 \pm 0,17$ vs $0,52 \pm 0,08$; $p < 0,001$ - gráfico 18).

6.10 - DOSAGEM DA URÉIA

Após 24 horas de reperusão não foi observado diferença entre o grupo sham e PCI+GLN (Sham $48,6 \pm 2,14$ vs PCI+GLN $121,84 \pm 26,25$; $p = 0,169$). Entretanto houve diferença entre o grupo sham com os demais grupos (Sham $48,6 \pm 2,14$ vs GLN $189,78 \pm 81,3$; $p = 0,002$ / vs PCI $156,2 \pm 42,35$; $p = 0,018$ / vs I/R $165,36 \pm 54,41$; $p = 0,10$). Não se constatou diferença entre o grupo PCI+GLN com o restante do grupo. ($p > 0,05$ - gráfico 19).

As dosagens após sete dias demonstraram que a o grupo glutamina apresentou-se diferente do grupo Sham ($167,03 \pm 61,65$ vs $51,6 \pm 7,62$; $p < 0,001$), grupo PCI ($167,03 \pm 61,65$ vs $49,9 \pm 8,48$; $p < 0,001$), grupo I/R ($167,03 \pm 61,65$ vs $75,3 \pm 16,99$; $p < 0,001$) e grupo PCI+GLN ($167,03 \pm 61,65$ vs $50,80 \pm 6,43$; $p < 0,001$). Não houve diferenças entre o restante dos grupos. (gráfico 20)

Gráfico 19 - Dosagem sérica da uréia nos diferentes grupos estudados 24 horas após a reperusão. Média e desvio padrão. Símbolos diferentes representam diferenças estatísticas. (GLN- Glutamina, PCI - Pré condicionamento isquêmico, I/R-isquemia/reperusão, PCI+GLN- Pré-condicionamento isquêmico associado a Glutamina) $p=0,002$

Gráfico 20 - Dosagem sérica da uréia nos diferentes grupos estudados sete dias após a reperusão. Média e desvio padrão. Símbolos diferentes representam diferenças estatísticas. (GLN- Glutamina, PCI - Pré condicionamento isquêmico, I/R-isquemia/reperusão, PCI+GLN- Pré-condicionamento isquêmico associado a Glutamina) $p<0,001$

7 - DISCUSSÃO

Atualmente a utilização do clampeamento do pedículo renal tem sido cada vez mais utilizada como controle vascular em diversos procedimentos cirúrgicos tais como transplante renal, nefrectomia parcial ou correção de aneurisma de aorta. Com o advento do emprego, na última década, da cirurgia laparoscópica na urologia, tornou-se corriqueiro a utilização do procedimento da isquemia renal e, em particular, da isquemia renal quente.

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

No intuito de compreender esse processo foram criados inúmeros modelos animais de experimentação de I/R renal.⁹⁴ Esses modelos basicamente constituem-se de I/R renal quente unilateral ou bilateral.⁹⁴ Também são classificados em unilateral com nefrectomia contralateral ou sem a nefrectomia.⁹⁴ Em relação ao controle da isquemia renal, preconiza-se realiza-lo através de um microclamp vascular bem como a visualização da alteração da coloração.⁹⁴ A mesma metodologia é utilizada na verificação da reperfusão após a retirada do clamp.⁹⁴

No modelo proposto do presente estudo, realizou-se a nefrectomia unilateral previamente a cirurgia de clampeamento do pedículo renal. Tal proposta levou em consideração o isolamento total deste rim, pois não teria influência do contralateral na avaliação do desfecho. Considerou-se também a realização prévia desse procedimento cirúrgico, sete dias, a fim de haver tempo suficiente para a recuperação do animal. Não se realizou o clampeamento do pedículo renal bilateral pois haveria um hiato de tempo entre o clampeamento de um pedículo vascular em relação ao contralateral, o que poderia interferir no resultado final.

Vários estudos experimentais utilizaram nutrientes com intuito de diminuir a lesão renal na I/R. Mehdi Salehipour et al. utilizaram vitamina E em coelhos previamente a I/R relatando atenuação da lesão tecidual.⁹⁵ Bo-Lin Chen et al. demonstraram atenuação na

lesão renal com a utilização de um flavonoide chamado quercitina.⁹⁶ Nesse rol de substâncias utilizou-se até mesmo tadalafila, sendo relatado efeito protetor sobre a I/R renal.⁹⁷

Sabe-se que a GLN é um aminoácido usado como substrato energético em várias células. Uma característica da mesma é sua relação com a biossíntese de glutathione que é um dos componentes do sistema antioxidante no organismo.

No presente estudo avaliou-se a utilização de um nutriente associado ao pré-condicionamento isquêmico na intenção de observar seus efeitos sobre a I/R renal.

7.1 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

Uma das estratégias mais utilizadas para avaliar o balanço do sistema antioxidante em sistemas biológicos é a utilização da CAT.⁹⁸ A CAT tem a finalidade de mostrar a resposta do organismo ao agente agressor, ou seja, o radical livre. Apresenta como maior vantagem a integração das ações antioxidantes individuais de diferentes componentes e os efeitos aditivos, de sinergia ou antagônicos.^{99, 100} Entretanto, na interpretação da CAT, há a desvantagem de sua medida não considerar a contribuição antioxidante de algumas enzimas, proteínas ligadas a metais e outros elementos químicos.⁹⁸

Diversos estudos descrevem a elevação da CAT através da utilização prévia da glutamina, sendo a maioria relatada para I/R do trato gastrointestinal.¹⁰¹

No modelo aqui empregado, o grupo PCI+GLN não apresentou elevação da CAT após 24 horas do momento da isquemia quando comparado ao grupo I/R, mesma condição visualizada após sete dias. Observa-se que este estudo apresentou elevação da capacidade antioxidante para o grupo glutamina e para o grupo PCI, o que foi significativo no sétimo dia, sem diferença com o grupo sham. Isso leva a crer que, de alguma forma, a suplementação de glutamina e o PCI se antagonizam quando utilizados no mesmo grupo animal, não elevando a capacidade antioxidante total como quando utilizados separadamente.

Gouvêa Junior et al. observaram a elevação da capacidade antioxidante total no grupo que sofreu I/R renal e foi suplementado previamente com glutamina.⁶⁵ Deve-se citar a diferença na aferição da CAT a qual foi realizado dosagem plasmática, o que difere do estudo atual onde realizou-se a medida tecidual, além de agregar outro fator, a presença do pré-condicionamento isquêmico. Chunrui Wang et al. não observaram elevações dos

valores da CAT quando administraram glutathione, no intuito de avaliar a preservação da função renal após a utilização de contraste venoso.¹⁰² Cymrot et al. também não observaram alterações na CAT de animais submetidos a isquemia de retalhos cutâneos comparando com o grupo controle.¹⁰³ Segundo os autores as alterações não teriam sido suficientes para serem aferidas através da CAT, ou ainda, teriam ocorrido mais precocemente.¹⁰³

Estudos prévios demonstraram elevação da CAT quando utilizado o pré-condicionamento isquêmico antes da I/R. Em estudo recém-publicado, Gouvêa Junior et al. constataram tal comportamento em animais que sofreram I/R renal e foram submetidos a PCI previamente.¹⁰⁴ Entretanto a aferição ocorreu somente após uma hora de reperfusão, o que difere do estudo atual que ocorreu 24 horas e sete dias respectivamente da reperfusão renal.¹⁰⁴

Embora na atualidade haja apenas um único estudo que associou PCI+GLN no intuito de verificar seus efeitos sobre a I/R renal, não houve aferição do comportamento da defesa antioxidante do organismo.¹⁰⁵

7.2 - SISTEMA GLUTATIONA

7.2.1 – GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

O sistema glutathione se constitui em um importante responsável pelo pool antioxidante no organismo. É composto pela glutathione e suas enzimas. Sabe-se que há uma correlação entre a atividade dessas enzimas com os níveis de glutathione, já que o peptídeo glutathione é um co-fator necessário na redução de peróxidos, agindo como substrato redutor.

Verificou-se com o presente estudo que ocorreu clara elevação dos níveis de GSH após 24 horas de reperfusão renal nos animais que realizaram a suplementação de glutamina associado ao pré condicionamento isquêmico. Esse evento já não é observado no sétimo dia, o que se torna previsível visto que os animais se encontravam privados do suplemento nesse período de reperfusão. Um dado destoante é o fato do grupo PCI apresentar níveis elevados de reserva GSH possivelmente sendo o ator principal, neste modelo de I/R renal, para a elevação do GSH no grupo PCI+GLN. A ausência de elevação

da GSH no grupo Glutamina talvez possa ser explicado pela dose, que foi de 0,5 g/kg/dia. Zhi-Yong Peng et al. relataram uma dependência da dose para ocorrer a elevação da glutathione, observando tal elevação somente quando administrado dose de 0,75 g/kg por dia.¹⁰⁶ Nesse mesmo estudo animais que se submeteram a dosagens menores não apresentaram elevação da GSH, apesar de haver melhora histológica da lesão renal.¹⁰⁶ Sabe-se que a glutamina é indutora da HSP-70 que é uma importante proteína contra vários estresses celulares, sendo que sua ativação inibe a liberação de mediadores inflamatórios.¹⁰⁷

Diversos estudos demonstram o benefício do sistema glutathione sobre a proteção na I/R entretanto há poucos estudos utilizando modelos renais. Devido esse fato, mais recentemente, alguns estudos questionam sobre a verdadeira eficácia da glutathione na proteção renal. Chunrui Wang et al. ofertando glutathione para pacientes não observaram redução da lesão renal aguda induzida pelo contraste.¹⁰²

7.2.2 - GLUTATHIONE PEROXIDASE (GPx)

A função da GPx é converter a glutathione oxidada em glutathione reduzida e durante esse processo reduz o H_2O_2 para H_2O .^{108,109} Em estudo anterior Gouvêa Junior et al. constataram a preservação da atividade da GPx em animais submetidos a suplementação de glutamina previamente a I/R renal.⁶⁵ Semelhante achado foi relatado por Ezhilan et al. quando utilizaram glutamina em modelo de injúria oxidativa miocárdica.¹¹⁰

Outro autor descreve atividade da GPx maior no grupo PCI quando comparado ao grupo controle, entretanto inferior ao grupo sham.¹¹¹

No presente estudo a atividade da GPx apresentou-se com valores semelhantes no primeiro dia após a reperfusão. Entretanto o grupo PCI+GLN demonstrou níveis elevados dessa enzima aos sete dias de reperfusão quando comparado ao grupo controle. Um dos efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio é a inibição da atividade enzimática.¹¹²

A partir desse resultado alcançado pode-se inferir que o estresse oxidativo decorrente da I/R renal tenha levado uma produção excessiva de espécies reativa de oxigênio. Consequentemente é esperado um consumo dos estoques que glutathione peroxidase, porém a associação entre a glutamina e o PCI potencializou a atividade dessa enzima até mesmo superior aos grupos Glutamina e PCI isoladamente. Com isso pode ser

atribuído um efeito benéfico, nesse período de tempo maior, da união entre PCI+GLN sobre essa enzima.

7.2.3 - GLUTATIONA REDUTASE (GR)

Sabe-se que o sistema glutathione possui papel central na defesa celular contra o estresse oxidativo. A GR exerce a função de regenerar a glutathione oxidada a glutathione reduzida, tornando-se uma peça fundamental no processo de tamponamento das espécies reativas de oxigênio.¹¹³

Chad R Frasier et al. observaram que a diminuição da atividade da GR aboliu o efeito cardioprotetor da atividade física.¹¹⁴ Outros autores, Jing Yan et al. relataram, em elegante estudo com animais, que a diminuição da atividade da GR está associado a maior probabilidade de infecções por bactérias gram-negativas.¹¹⁵ Tal correlação encontra embasamento na diminuição do poder de tamponar as espécies reativas de oxigênio devido ao decréscimo da atividade GR nesse modelo experimental.

No presente estudo não houve diferença entre os grupos após 24 horas de reperfusão, entretanto, no sétimo dia houve uma proeminente elevação da GR no grupo PCI+GLN quando comparado aos demais grupos. Pode-se deduzir que houve uma maior reposição de glutathione reduzida com isso a capacidade de tamponamento das EROs nesse sistema se elevou.

7.3 - SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

Apesar de haver três tipos de SOD; mitocondrial, intracelular (mas não na mitocôndria) e outro, extracelular, todas apresentam a mesma função; eliminar o ânion superóxido e produzir oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, o que, posteriormente, será removido pela catalase e glutathione peroxidase.¹¹⁶

Wan-Xing Zhang et al. relataram elevação da atividade da SOD no grupo de animais que receberam glutamina previamente a I/R hepática.¹¹⁷ Porém, diferente do estudo aqui apresentado, a aferição foi após duas horas da isquemia. Por outro lado Gia et al. não observaram elevação da atividade da SOD em estudo semelhante, ofertando glutamina.¹¹⁸ Gouvêa Junior et al. suplementaram, através de gavagem, o aminoácido glutamina a animais por sete dias e posteriormente os submeteram a I/R renal, não

havendo elevação da atividade da SOD no grupo glutamina quando comparado ao controle.⁶⁵

A atividade da SOD no grupo glutamina do atual estudo apresentou-se elevada no primeiro dia após a reperfusão sendo o único grupo semelhante ao grupo PCI+GLN nesse momento. Após sete dias, constata-se uma grande queda da atividade dessa substância nesse grupo, nos levando a crer que a privação da suplementação de glutamina, a qual foi ofertada somente previamente a isquemia, de alguma forma, foi a responsável por esse decréscimo.

Já o grupo PCI não apresentou elevação da atividade da SOD em nenhum dos tempos aferidos, discordando de Shokeir et al. que relataram semelhança desse parâmetro quando comparado ao grupo sham, porém sem apresentar valores superiores a este grupo em animais submetidos a PCI e I/R renal.¹¹⁹

Noiri E et al. foram quem primeiramente reconheceram a função da SOD como inibidor da lesão renal agindo no óxido nítrico e superóxido, inibindo assim a citotoxicidade desses dois componentes.¹²⁰ Scheneider MP et al. observaram piora do estresse oxidativo renais pós isquemia na ausência da SOD.¹²¹

No presente estudo é notório a elevação da SOD no grupo PCI+GLN quando comparado ao grupo controle no primeiro dia após a reperfusão. Tal elevação ainda persiste no sétimo dia levando a crer que a combinação da glutamina com o PCI nutre um mecanismo que eleva os níveis dessa enzima antioxidante, com uma influência primordial da glutamina.

7.4-URÉIA E CRETININA

A creatinina é um subproduto do metabolismo muscular. Ao contrário da uréia a creatinina é ativamente secretada em uma pequena parcela, mas suficiente para superestimar as taxas de filtração glomerular (TFG). Sabe-se que é necessário que haja uma redução superior a 50% na ultrafiltração glomerular antes que ocorra aumento na creatinina sérica. 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 proteico secretado. Apesar de ser filtrada livremente pelo glomérulo, não ser reabsorvida nem secretada ativamente, a uréia é um

fraco preditor da TFG, pois 40 a 70% retornam ao plasma por um processo de difusão passiva, que é dependente do fluxo urinário.

Em estudo clássico, Eschewege et al. demonstraram que isquemia renal após 45 minutos apresenta o pico de elevação da creatinina após 48 horas e retorna aos valores basais no décimo dia.¹²²

No presente estudo pode-se observar a elevação da dosagem de creatinina em todos os grupos que sofreram isquemia após 24 horas de reperfusão, com o grupo glutamina apresentando-se superior quando comparado aos outros. Nota-se ainda que no sétimo dia o referido grupo ratifica sua tendência inicial e mantém a elevação da creatinina. Já o grupo PCI+GLN apresentou, tanto no primeiro quanto no sétimo dia após a reperfusão, níveis mais elevados que o grupo sham, porém sem diferença estatística, levando a crer que o pré-condicionamento apresentou uma grande influência, antagonizando o possível efeito da glutamina sobre a função renal, aferido por esse exame.

Lian-hui Fan et al. em modelo de pré-condicionamento isquêmico renal, não observaram diferença entre o grupo submetido a PCI quando comparado ao grupo controle na dosagem de creatinina, após 24 horas de reperfusão, apesar de ter havido benefício do PCI confirmado através do estudo de imunohistoquímica.¹²³ Semelhante ao presente estudo onde o Grupo PCI não apresentou diferenças com o grupo controle no primeiro dia após a reperfusão.

Tal comportamento do grupo glutamina em relação a creatinina a algum tempo tem sido motivo de discussão. Apesar da sua utilização como agente antioxidante, a décadas atrás já se era questionada a associação entre a ingesta de proteína, hiperfiltração glomerular e hipertensão e, consequentemente expansão da matriz glomerular extracelular com lesão renal progressiva.^{124,125} Atualmente ainda persiste tal paradoxo entre os benefícios e malefícios da glutamina sobre o rim. Em estudo com animais T C Alba-Loureiro et al. verificaram que a suplementação de glutamina aumenta as proteínas pró-inflamatórias no córtex renal e induz a alterações na característica glomerular.¹²⁶

No presente estudo fica claro a elevação dos níveis de uréia e creatinina no grupo glutamina com ênfase no sétimo dia após a isquemia. Tal fato foi observado por outro pesquisador o qual utilizou suplementação do mesmo aminoácido.¹²⁷ Em investigação anterior na qual também se suplementou glutamina a um grupo de animais submetidos a I/R, Gouvêa Junior et al. não obtiveram benefício, através da dosagem da uréia e creatinina, quando comparado ao grupo controle.⁶⁵

No estudo aqui analisado, o grupo PCI+GLN apesar de apresentar valores de ureia e creatinina menores que o grupo I/R não apresentou diferença significativa em relação ao mesmo. Valores semelhantes também são descritos no grupo PCI levando-nos a crer que houve uma anulação do efeito da glutamina sobre esses marcadores de função renal.

Lian-hui Fan et al. demonstraram que o PCI atua reduzindo as moléculas de adesão renal ICAM-1, P-selectina, e E-selectina.¹²³ Tais moléculas mediam a adesão dos leucócitos polimorfonucleares as células endoteliais. Devido a essa redução da expressão das moléculas de adesão após a I/R ocorre menos infiltração de granulócito ao tecido e, por fim, menor lesão tecidual.¹²³

Estudo publicado recentemente, em humanos, evidencia que a I/R renal leva a uma hipertrofia renal compensatória contralateral após seis meses da intervenção.¹²⁸ Tal fato já havia sido relatado por Tucci et al. que verificaram hipertrofia renal compensatória em animais submetidos a nefrectomia previamente.¹²⁹ Dessa forma, se por um lado a nefrectomia unilateral evita viés no estudo dos agentes antioxidantes, ela poderia hipertrofiar o rim solitário diminuindo a acurácia desse marcado.

Na única associação do pré-condicionamento isquêmico com a glutamina em animais submetidos a I/R renal e acompanhados somente por 24 horas, também se observou elevação dos níveis de uréia e creatinina em todos os grupos sem diferença entre os mesmos.¹⁰⁵

7.5-MALONALDEÍDO

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ROS frente ao estresse oxidativo, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade.¹³⁰

Os produtos da peroxidação lipídica, como o MDA, podem ser utilizados como indicadores da ação dos ROS no organismo.¹³⁰ O MDA possui ação citotóxica e genotóxica, encontrando-se em níveis elevados em algumas patologias associadas ao estresse oxidativo.¹³⁰ A sua quantificação nos sistemas biológicos é um parâmetro importante para avaliação do estresse oxidativo celular.¹³⁰ O método introduzido por Yagi (1976) tem sido amplamente utilizado.¹³⁰ O princípio deste método consiste na reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), sendo o produto detectado através de leitura espectrofotométrica na região do visível.¹³⁰ Embora este método ainda seja amplamente

utilizado, ele não é específico para detecção dos produtos de peroxidação lipídica, uma vez que quantifica a soma das diferentes substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, denominadas TBARS.¹³⁰ Desta forma, os valores de TBARS incluem interferentes provenientes da reação do TBA com outras substâncias presentes na amostra, como por exemplo, carboidratos e proteínas.¹³⁰

No clássico estudo de Eschwége et al. animais foram submetidos a clampeamento do pedículo renal bilateral por 4 períodos diferentes (15, 30, 45 e 60 minutos) e posteriormente realizou-se a nefrectomia a direita.¹³¹ Observou-se diferença na elevação do MDA, quando comparado ao grupo sham, entre os grupos 15, 30 e 60 minutos.¹³¹ O grupo 45 minutos não apresentou diferença com o grupo que não sofreu isquemia.¹³¹ Ainda nesse estudo constatou-se que a lesão renal se inicia primeiramente no córtex superficial, especialmente no túbulo renal proximal, e após 30 minutos no córtex profundo.¹³¹

No atual estudo não foi observado diferença da dosagem de malonaldeído entre os grupos, seja no primeiro dia como no sétimo. Semelhante ao presente estudo, Nasser Ahmadiasl et al. submeteram os animais a isquemia por 45 minutos e reperfusão por 24 horas, observando valores semelhantes de MDA entre o grupo I/R e grupo sham.¹³² Diferentemente, Sposito E et al. relataram diminuição do MDA em animais tratados previamente com glutamina que sofreram I/r renal.¹³³ Torna-se relevante destacar que, nesse estudo, a reperfusão foi de somente seis horas, diferentemente do atual estudo cujo em um grupo de animais foi de 24 horas e no outro de sete dias.¹³³

Enfim, sabe-se que o próprio método de aferição da lesão originada pelo estresse oxidativo apresenta baixa especificidade, pois o ácido tiobarbitúrico pode reagir com diversos componentes derivados da oxidação e com isso levar a uma leitura errônea do resultado.¹³⁴ Ainda outra interação desse método pode propiciar geração in vitro de aldeídos.¹³⁵ Isso ocorre devido às condições experimentais de incubação em temperatura elevada (96°C), por 1 hora, em meio ácido.^{130,135}

No presente estudo a dosagem do MDA não contribuiu na observação, seja do benefício ou malefício do tratamento proposto. Apesar de haver críticas ao método, contribuiu para isso o excesso de manipulação dos animais com uma possível liberação de catecolaminas, as quais possivelmente são degradadas oxidativamente, com resultante elevação do estresse oxidativo basal dos animais. Associa-se a isso o tempo de colheita da amostra, que talvez possa ter sido o fator crítico no experimento. Tem-se a impressão que, independentemente do tempo de isquemia, a produção de radicais livres é excessiva

nos primeiros cinco minutos da reperfusão. Para as amostras de um e sete dias pós-reperfusão, o sistema endógeno antioxidante provavelmente reverteu o dano oxidativo causado, dificultando a utilização do MDA como marcador.

7.6- CASPASE-3

No presente estudo observou-se uma semelhança dos grupos em relação aos valores da caspase-3 no primeiro dia após isquemia, entretanto no sétimo dia constatou-se que o grupo PCI+GLN apresentou os maiores valores entre os grupos. Isso significa que, de alguma forma, o estímulo traumático neste grupo acarretou a ativação dessa proteína a qual, por fim, desencadeia a apoptose celular. Hai-Yan Yin et al. relataram diminuição da caspase-3 em modelo animal de sepse que utilizou glutamina.¹³⁶ Tal diferença foi mais exuberante após 12 horas da indução da sepse com diminuição dos níveis após 24 horas. Da mesma forma Raimundo Jose et al. novamente utilizando glutamina demonstraram que o pré-condicionamento com L-alanil-glutamina reduz a lesão de isquemia-reperfusão no fígado de ratos.¹³⁷ Nesse mesmo modelo de I/R hepática houve diminuição da caspase-3, entretanto, a diferença fundamental em relação ao atual estudo concentra-se no tempo de reperfusão de apenas 60 minutos.

Outro autor demonstrou diminuição da caspase-3 em fígados de animais que foram submetidos a autotransplante pulmonar com PCI prévio.¹³⁸ Novamente esse modelo diferencia do atual devido ao breve período de reperfusão, apenas trinta minutos.¹³⁸

Já Chang-Chi Lai et al. demonstraram a diminuição da caspase-3 em um modelo de I/R miocárdica utilizando pré-condicionamento isquêmico e com o tempo de reperfusão de 3 horas.¹³⁹

Necrose é um processo explosivo, caótico e caracterizado pela perda da membrana celular, edema e fragmentação celular.¹⁴⁰ Já a apoptose é um silencioso e ordeiro processo no qual há uma redução do volume celular, com fragmentação do DNA que são posteriormente fagocitados.¹⁴⁰ Sabe-se ainda que a ativação da caspase por via intrínseca ou extrínseca é, por fim, o desencadeador da apoptose celular sendo que o fator de necrose tumoral α modula a ativação da caspase-3.¹⁴¹

É notório que o grupo PCI+GLN apresentou elevação substancial do nível da caspase-3 no sétimo dia após a reperfusão. Estudo anterior já demonstrou que a apoptose

na I/R renal ocorre com um pico em três dias, apresentando uma onda de elevação aos sete dias correlacionando assim com o presente estudo.¹⁴⁰ A literatura atual não correlaciona modelo de I/R renal com períodos longos de tempo de reperfusão e níveis dessa substância, logo não há como confrontar os atuais resultados com outros. Entretanto há uma clara evidencia de uma ação nefasta a longo prazo, quando associamos glutamina e PCI na isquemia e reperfusão renal e correlacionamos com caspase-3.

7.7 - PROTEINA CARBONILADA

Estresse oxidativo é uma condição na qual a geração de espécies reativas de oxigênio no sistema celular excede a capacidade de tamponamento das defesas antioxidantes levando por fim a uma lesão oxidativa envolvendo lipídios, DNA e proteínas.⁴² Tal condição é quantificada através da presença da quantidade de lesão das macromoléculas.⁴²

A proteína carbonilada é uma molécula quimicamente estável e essa característica auxilia na sua detecção e depósito.¹⁴² Apresenta, ainda, a vantagem dos seus níveis permanecerem elevados por mais tempo do que o malonaldeído.¹⁴²

Recentemente, Alberto Schanaider et al. utilizando um modelo de I/R esplênico ratificou a proteína carbonilada como um marcador para lesão do estresse oxidativo.¹⁴³

No atual estudo o grupo PCI+GLN não demonstrou diferença com o grupo controle após 24 horas de reperfusão, entretanto mostrou-se como o grupo que apresentou os mais altos níveis de carbonilação proteica aos sete dias de reperfusão. Zhi-Yong Peng et al. não observaram diferenças nos níveis de carbonilação proteica, quando comparados ao grupo controle, camundongos aos quais ofertou-se glutamina e foram submetidos a injúria renal aguda.¹⁴⁴

Este resultado do atual estudo infere ao grupo PCI+GLN uma maior lesão oxidativa, a ponto de correlacionarmos que os malefícios pró-oxidação foram superiores aos benefícios antioxidantes. Tal resultado corrobora os valores encontrados na caspase-3 onde esse mesmo grupo destoou do restante. Isso leva a crer que a associação entre PCI+GLN apresenta uma ação pró-oxidante que suplanta seu benefício antioxidante.

7.8 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como benefício antioxidante, esse estudo ratifica os efeitos dos seus dois protagonistas partícipes; GLN e PCI. Tal associação elevou o GSH nesse grupo no primeiro dia após a reperfusão paralelamente a um aumento no nível da SOD, o que deveria lhe conferir uma maior proteção em relação ao stress oxidativo. Porém, no sétimo dia após a reperfusão, observa-se uma persistente elevação da SOD, enzimas GPx e GR.

Em contrapartida esta união entre GLN + PCI elevaram os níveis de caspase-3 associado a um acréscimo nos níveis de proteína carbonilada visualizado principalmente após sete dias de reperfusão, chegando-se à conclusão que houve uma possível potencialização dos efeitos pró-oxidantes da glutamina e do pré-condicionamento isquêmico nesse momento.

Não há na literatura até o presente momento, estudo com esse desenho, no qual se acompanhou após vários dias, a evolução do estresse oxidativo. Tal fato torna ímpar a presente pesquisa, onde se aferiu alguns componentes da defesa antioxidante e o comportamento do produto final da lesão provocado pelos mesmos. Analisando os resultados pode-se inferir que o PCI associado a GLN elevou alguns dos atores responsáveis pela proteção da injúria desencadeada pela I/R renal, embora não tenha ocorrido uma diminuição do produto final do estresse oxidativo. É evidente que o mecanismo do estresse oxidativo é complexo, e diversos destes componentes não foram aferidos na presente pesquisa, bem porque alguns, tem-se a impressão, de que nem são conhecidos. Apesar da sua limitação, o corrente estudo soma-se a outros na tentativa de desvendar o enigmático comportamento orgânico frente a I/R renal e utilização de substâncias e PCI, demonstrando uma tendência de potencialização das atividades antioxidante, porém com o paradoxo da maior lesão celular aferido aqui através da caspase-3 e proteína carbonilada. Esse comportamento obviamente exigirá outras pesquisas a fim de visualizar qual mecanismo foi responsável por maior ativação da injúria. Entretanto, sabe-se que, após sete dias de reperfusão, a associação desses dois componentes, no equilíbrio do estresse oxidativo, tendeu para o lado pró-oxidante.

A dificuldade na realização desse modelo de estudo encontra-se principalmente na interação dos mecanismos antioxidantes do organismo dificultando a segmentação dos mesmos. Diante desse resultado sugere-se, em estudos posteriores, a estratificação dos grupos conforme a dose do aminoácido GLN pois alguns autores, mais recentemente,

propõem que a dose ideal desse aminoácido seja menor do que a considerada na corrente pesquisa.

8 - CONCLUSÃO

Neste modelo de isquemia renal por clampeamento de pedículo seguido de reperfusão se conclui que há uma potencialização do efeito antioxidante da associação da glutamina e pré-condicionamento isquêmico após 24 horas de reperfusão, entretanto tal efeito não é mantido até o sétimo dia após a reperfusão.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ NOGUEIRA PC et al. Estimated prevalence of childhood end-stage renal disease in the state of São Paulo. **Rev. Assoc. Med. Bras.** [online]. 2011, vol.57, n.4 [cited 2013-02-11], pp. 443-449. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302011000400020&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0104-4230. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42302011000400020>.
- ² GARCIA GG, HARDEN P, CHAPMAN J. The global role of kidney transplantation. **Bras Nefrol** 2012;34(1):1-7.
- ³ O'VALLE F, DEL MORAI 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 2013.
- ⁴ GIESSING M. Laparoscopic living-donor nephrectomy. **Nephrol. Dial. Transplant.** 2004; 19(4):36-9.
- ⁵ THOMPSON RH, LANE BR, LOHSE CM, LEIBOVICH BC, FERGANY A, FRANK I, GILL IS, BLUTE ML, CAMPBELL SC. Renal function after partial nephrectomy: effect of warm ischemia relative to quantity and quality of preserved kidney. **Urology.** 2012 Feb;79(2):356-60.
- 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 CETIN N , SULEYMAN H, SENER E, DEMIRCI E, GUNDOGDU C, AKCAY F. The prevention of ischemia/reperfusion induced oxidative damage by venous blood in rabbit kidneys monitored with biochemical, histopatological and immunohistochemical analysis. **J Physiol Pharmacol.** 2014 Jun;65(3):383-92.
- ⁸ KOSIERADZKI M, ROWINSKI W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. **Transplant. Proc.** 2008; 40(10):3279-88.
- ⁹ Bi W, WANG F, Bi Y, WANG T, XUE P, ZHANG Y, GAO X, LIU S, WANG Z, LI M, BAUDY-FLOCH M, ROBINSON SC, NGEREBARA N, Bi L. Renal ischemia/reperfusion injury in rats is attenuated by a synthetic glycine derivative. **Eur J Pharmacol.** 2009; 15;616(1-3):256-64.
- ¹⁰ SCHUSTER H, BLANC M, BONNEFONT-ROUSSELOT D, NAKIB S, TOURNEAU AL, FURST P et al. 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 SÖZEN S, KISAKÜREK M, YILDIZ F, GÖNÜLTAŞ M, DINÇEL AS. The effects of glutamine on hepatic ischemia reperfusion injury in rats. **Hippokratia**. 2011 Apr;15(2):161-6.
 - ¹² FULLER TF, ROSE F, SINGLETON KD, LINDE Y, HOFF U, FREISE CE et al. Glutamine donor pretreatment in rat kidney transplants with severe preservation reperfusion injury. **J Surg. Res.** 2007; 140(1):77-83.
 - ¹³ 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.
 - ¹⁴ MERRIL JP, MURRAY JE, HARRISON JH, GUILD WR. Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. **JAMA**. 1956; 160:277-82.
 - ¹⁵ WARD JP. Determination of optimal temperature for regional hypothermia. **Br J Urol**. 1975; 47:17-24.
 - ¹⁶ NOVICK AC. Renal hypothermia in vivo and ex-vivo. **Urol Clin North Am**. 1983; 10(4):637-44.
 - ¹⁷ GRANGER DN, KORTHUIS JR. Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. **Annu Rev Physiol**. 1995; 57:311-32.
 - ¹⁸ KUMAR V, ABBDAS AK. **Bases patológicas das doenças**. 7ª ed. Rio de Janeiro (RJ): Elsevier ; 2005.
 - ¹⁹ 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.
 - ²⁰ GILLANI S, CAO J, SUZUKI T, HAK DJ. The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle. **Injury**. 2012 Jun;43(6):670-5.
 - ²¹ PERCIVAL TJ, RASMUSSEN TE. Reperfusion strategies in the management of extremity vascular injury with ischaemia. **Br J Surg**. 2012 Jan;99 Suppl 1:66-74.
 - ²² 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.
 - ²³ BHATTACHARYYA A, CHATTOPADHYAY R, MITRA S, CROWE SE. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiol Rev**. 2014 Apr;94(2):329-54.
 - ²⁴ GOURDIM MJ, BREE B, DE KOCK M. The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel. **Eur J Anaesthesiol**. 2009; 26(7):537-47.

-
- ²⁵ 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.
- ²⁶ FERREIRA ALA, MATSUBARA LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**. 1997; 43(1):61-8.
- ²⁷ RAJENDRAN P, NANDAKUMAR N, RENGARAJAN T, PALANISWAMI R, GNANADHAS EN, LAKSHMINARASIAH U, GOPAS J, NISHIGAKI I. Antioxidants and human diseases. **Clin Chim Acta**. 2014 Jun 13;436C:332-347.
- ²⁸ GUREL, A, ARMAUTCU F, SAHIN S, SOGUT S, OZYURT H, GULEC M, KUTLU NO, AKYOL O. Protective role of α -tocoferol and caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury via nitric oxide and myeloperoxidase in rat kidneys. **Clin. Chim. Acta**. 2004; 339:33-41.
- ²⁹ PASTORE A, FEDERICA G, BERTINI E, PIEMONTE F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clin. Chim. Acta**. 2003; 333:19-39.
- ³⁰ ROVER LJ, HÖHR 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.
- ³¹ 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.
- ³² LU SC. Glutathione synthesis. **Biochim Biophys Acta**. 2013 May;1830(5):3143-53.
- ³³ MORRIS D, KHURASANY M, NGUYEN T, KIM J, GUILFORD F, MEHTA R, GRAY D, SAVIOLA B, VENKETARAMAN V. Glutathione and infection. **Biochim Biophys Acta**. 2013 May;1830(5):3329-49.
- ³⁴ C.G. FRAGA et al. In vitro measurement and interpretation of total antioxidant activity. **Biochimica et Biophysica Acta** 1840 (2014) 931-934.
- ³⁵ MAY JM, QU ZC, WHITESELL RR. Ascorbic acid recycling enhances the antioxidant reserve of human erythrocytes. **Biochemistry**. 1995; 34(39):12721-8.
- ³⁶ JOHNSON F, GIULIVI C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. **Mols Aspects Med**. 2005; 26(4-5):340-52.
- ³⁷ 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.
- ³⁸ RICE-EVANS CA, DIPLOCK AT, SYMONS MCR. Techniques in free radical research. **Elsevier**. 1991.

-
- ³⁹ JACOB RA. The integrated antioxidant system. **Nutr Res.** 1995; 15(5): 755-766.
- ⁴⁰ MURRAY RK, GRANNER DK, MAYES PA, RODWELL WW. **Harper's Biochemistry.** McGraw-Hill Publishing Co. 1999.
- ⁴¹ PERCÁRIO S. Dosagem das LDLs modificadas através da peroxidação lipídica: correlação com o risco aterogênico. **Arquivos Médicos.** 1993; 13(49):07-09.
- ⁴² YAN LJ, FORSTER MJ. Chemical probes for analysis of carbonylated proteins: a review. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.** 2011 May 15;879(17-18):1308-15. doi: 10.1016/j.jchromb.2010.08.004. Epub 2010 Aug 7.
- ⁴³ JAMEL MJ et al. Blood carbonyl protein measurement as a specific oxidative stress biomarker after intestinal reperfusion in rats. **Acta Cir Bras.** 2010 Feb;25(1):59-62.
- ⁴⁴ DALLE-DONNE I et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clin Chim Acta.** 2003 Mar;329(1-2):23-38.
- ⁴⁵ MCILWAIN DR, BERGER T, MAK TW. Caspase functions in cell death and disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** 2013 Apr 1;5(4):a008656. doi: 10.1101/cshperspect.a008656.
- ⁴⁶ KOSIERADZKI M, ROWIŃSKI W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. **Transplant Proc.** 2008 Dec;40(10):3279-88. doi: 10.1016/j.transproceed.2008.10.004.
- ⁴⁷ CRUZAT VF, PETRY ER, TIRAPEGI J. Glutamina: aspectos bioquímicos, metabólicos, moleculares e suplementação. **Rev Bras Med Esporte.** 2009; 15(5):392-7.
- ⁴⁸ BUCHAMAN AL. Glutamine for gut: mystical properties or na ordinary amino acid? **Current Gastroenterol Rep.** 1999; 1(5):417-23.
- ⁴⁹ MELIS GC, WENGEL NT, BOELEN 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.
- ⁵⁰ 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.
- ⁵¹ BARTELL SM, BATAL AB. Effect of supplemental glutamine on growth performance, development of the gastrointestinal tract, and humoral immune response of broilers. **Poult Sci.** 2007; 86(9):1940-47.

-
- ⁵² 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.
- ⁵³ BROSANAN ME, BROSANAN JT. Hepatic glutamate metabolism: a tale of hepatocytes. **Am J Clin Nutr.** 2009; 90(3):857S–61S.
- ⁵⁴ FREITAS LS, PENA SM. Utilização de glutamina em processos infecciosos. Disponível em: www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/035V3N4P337_342_JUL_2006.pdf. Acesso em 18 de junho de 2014.
- ⁵⁵ WILSON CH, SANNI A, RIX DA, SOOMRO NA. Laparoscopic versus open nephrectomy for live kidney donors. **Cochrane Database Syst Rev.** 2011 Nov 9;(11):CD006124. doi: 10.1002/14651858.CD006124.pub2.
- ⁵⁶ HELLEGERING J, VISSER J, KLOKE HJ, D'ANCONA FC, HOITSMA AJ, VAN DER VLIET JA, WARLÉ MC. Deleterious influence of prolonged warm ischemia in living donor kidney transplantation. **Transplant Proc.** 2012 Jun;44(5):1222-6. doi: 10.1016/j.transproceed.2012.01.118.
- ⁵⁷ WARD JP. Determination of optimal temperature for regional hypothermia. **Br J Urol.** 1975; 47: 17-24.
- ⁵⁸ NOVICK AC. Renal hypothermia: in vivo and ex vivo. **Urol Clin North Am.** 1983 Nov;10(4):637-44.
- ⁵⁹ SHOKEIR AA, BARAKAT N, HUSSEIN AA, AWADALLA A, ABDEL-AZIZ A, ABO-ELENIN H. Role of combination of L-arginine and α -tocopherol in renal transplantation ischaemia/reperfusion injury: a randomized controlled experimental study in a rat model. **BJU Int.** 2011 Aug;108(4):612-8. doi: 10.1111/j.1464-410X.2010.09943.x. Epub 2011 May 18.
- ⁶⁰ GUZ G, OZ E, LORTLAR N, ULUSU NN, NURLU N, DEMIROGULLARI B et al. The effect of taurine on renal ischemia/reperfusion injury. **Amino Acids.** 2007; 32(3):405-11.
- ⁶¹ BERNARDI RM, CONSTANTINO L, MACHADO RA, VUOLO F, BUDNI P, RITTER C, DAL-PIZZOL F. N-acetylcysteine and deferrioxamine protects against acute renal failure induced by ischemia/reperfusion in rats. **Rev Bras Ter Intensiva.** 2012 Sep;24(3):219-223.
- ⁶² 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.
- ⁶³ WEITZEL LR, WISCHMEYER PE. Glutamine in critical illness: the time has come, the time is now. **Crit Care Clin.** 2010 Jul;26(3):515-25, ix-x. doi: 10.1016/j.ccc.2010.04.006.

-
- ⁶⁴ WANG X, XUE Y, LIANG M, JIANG W. Glutamine treatment decreases plasma and lymph cytotoxicity during sepsis in rats. **Acta Biochim Biophys Sin** (Shanghai). 2012 Sep;44(9):774-82. doi: 10.1093/abbs/gms054. Epub 2012 Jul 10.
- ⁶⁵ GOUVÊA JUNIOR VT, CAPOROSSI C, SALOMÃO AB, CÔRTEZ E, MUNHOZ MF, NASCIMENTO JE. Effect of glutamine on the total antioxidant system of rats subjected to renal ischemia and reperfusion. **Acta Cir Bras**. 2011 Dec;26(6):445-50.
- ⁶⁶ PIRES VL, SOUZA JR, GUIMARÃES SB, SILVA FILHO AR, GARCIA JH, VASCONCELOS PR. Preconditioning with L-alanyl-L-glutamine in a Mongolian gerbil model of acute cerebral ischemia/reperfusion injury. **Acta Cir Bras**. 2011;26 Suppl 1:14-20.
- ⁶⁷ MATÉS JM, PÉREZ-GÓMEZ C, NÚÑEZ DE CASTRO I, ASENJO M, MÁRQUEZ J. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. **Int J Biochem Cell Biol**. 2002 May;34(5):439-58.
- ⁶⁸ HARWARD TR, COE D, SOUBA WW, KLINGMAN N, SEEGER JM. Glutamine preserves gut glutathione levels during intestinal ischemia/reperfusion. **J Surg Res**. 1994 Apr;56(4):351-5.
- ⁶⁹ JOHNSON AT, KAUFMANN YC, LUO S, TODOROVA V, KLIMBERG VS. Effect of glutamine on glutathione, igf-I, and tgf- β ₁. **J Surg Res**. 2003; 111(2):222-8.
- ⁷⁰ 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.
- ⁷¹ NOVAK F, HEYLAND DK, AVENELL A, DROVER JW, SU X. Glutamine supplementation in serious illness: A systematic review of the evidence. **Crit Care Méd**. 2002; 30(9):2022-9.
- ⁷² BOLLHALDER L, PFEIL AM, TOMONAGA Y, SCHWENKGLINKS M. A systematic literature review and meta-analysis of randomized clinical trials of parenteral glutamine supplementation, **Clinical Nutrition** (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2012.11>.
- ⁷³ ZHANG WX, ZHOU LF, ZHANG L, BAO L, WANG CC, MENG HY, YIN W. Protective effects of glutamine preconditioning on ischemia-reperfusion injury in rats. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**. 2011 Feb;10(1):78-82.
- ⁷⁴ HWANG JK, KIM JM, KIM YK, KIM SD, PARK SC, KIM JI, NAM HW, KIM J, MOON IS. The early protective effect of glutamine pretreatment and ischemia preconditioning in renal ischemia-reperfusion injury of rat. **Transplant Proc**. 2013 Nov;45(9):3203-8. doi:10.1016/j.transproceed.2013.08.028.
- ⁷⁵ GALERA SC, FECHINE FV, TEIXEIRA MJ, COELHO ZCB, VASCONCELOS RC, LEITÃO DE VASCONCELOS PC. The safety of oral use of L-glutamine in middle-aged and elderly individuals. **Nutrition** 26 (2010) 375–381.

-
- ⁷⁶ LUO M, BAZARGAN N, GRIFFITH DP, FERNÁNDEZ-ESTIVARIZ C, LEADER LM, EASLEY KA et al. 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.
- ⁷⁷ STEENKS M, PETERS J, RADEMACHER W ET AL. Intermittent ischemia enhances the uptake of indocyanine green to livers subject to ischemia and reperfusion. **J Gastroenterol Hepatol.** 2012; 3:1440-1447.
- ⁷⁸ JIN DEOK JOO JD, KIM M, D'AGATI DD, LEE HT. Ischemic preconditioning provides both acute and delayed protection against renal ischemia and reperfusion injury in mice. **J Am Soc Nephrol.** 2006;17:3115–3123.
- ⁷⁹ WANG Y, REIS C, APPELEGATE R et al. Ischemic conditioning-induced endogenous brain protection: Applications pre-, per- or post-stroke. **Exp Neurol.** 2015 Oct;272:26-40. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.04.009. Epub 2015 Apr 18.
- ⁸⁰ MINAMINO T. Cardioprotection from Ischemia/Reperfusion injury – Basic and translational research. **Circ J.** 2012; 76:1074-1082.
- ⁸¹ WU HH, HSIAO TY, CHIEN CT ET AL. Ischemic conditioning by short periods of reperfusion attenuates renal ischemia/reperfusion induced apoptosis and autophagy in the rat. **Journal of Biomedical Science.** 2009; 16(19):1-10.
- ⁸² YAMAKI VN, GONÇALVES TB, COELHO JVB et al. Protective effect of remote ischemic per-conditioning in the ischemia and reperfusion-induce renal injury in rats. **Rev Col Bras Cir.** 2012; 39(6):529-533.
- ⁸³ SANADA S, KOMURO I, KITAKAZE M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: Preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 2011; 301:H1723 – H741.
- ⁸⁴ SKYSCHALLY A, VAN CASTER P, ILIODROMITIS EK et al. Ischemic postconditioning: Experimental models and protocol algorithms. **Basic Res Cardiol** 2009; 104: 469 – 483.
- ⁸⁵ PESSOA EA, CONVENTO MB, RIBAS OS et al. Preconditioning induced by gentamicin protects against acute kidney injury: The role of prostaglandins but not nitric oxide. **Toxicol Appl Pharm** 2011, 253:1-6.
- ⁸⁶ HALESTRAP AP, CLARKE SJ, KHALILULIN I. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. **Biochim Biophys Acta** 2007, 1767:1007-1031.
- ⁸⁷ MINAMINO, T. Cardioprotection from injury. **Circ J.** 2012;76(5):1074-82. Epub 2012 Apr 14.
- ⁸⁸ WEVER KE, MENTING TP, ROVERS M et al. Ischemic Preconditioning in the Animal Kidney, a Systematic Review and Meta-Analysis. 2012. **PLoS ONE** 7(2): e32296. doi:10.1371/journal.pone.003229.

-
- ⁸⁹ MA JW, QIAO ZW, XU B. Effects of ischemic preconditioning on myocardium Caspase-3, SOCS-1, SOCS-3, TNF- α and IL-6 mRNA expression levels in myocardium IR rats. **Mol Biol Rep.**2013; 40:5741–5748. DOI 10.1007/s11033-013-2677-1. Acessado em outubro de 2013.
- ⁹⁰ TSUTSUI H, TANAKA R, YAMAGATA M, YUKIMURA T, OHKITA M, MATSUMURA Y. Protective effect of ischemic preconditioning on ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury through sympathetic nervous system in rats. **Eur J Pharmacol.** 2013 Oct 15;718(1-3):206-12. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.08.032. Epub 2013 Sep 12.
- ⁹¹ HO PW, PANG WF, SZETO CC. Remote ischaemic pre-conditioning for the prevention of acute kidney injury. **Nephrology (Carlton).** 2016 Apr;21(4):274-85. doi: 10.1111/nep.12614.
- ⁹² BALAKUMAR P, ROHILLA A, SINGH M. Pre-conditioning and postconditioning to limit ischemia–reperfusion-induced myocardial injury: What could be the next footstep? **Pharmacological Research.** 2008; 57: 403–412.
- ⁹³ KIM YS, JUNG MH, CHOI MY, KIM YH, SCHEVERDIN V, KIM JH et al. 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.
- ⁹⁴ WEI Q, DONG Z. Mouse model of ischemic acute kidney injury: technical notes and tricks. **Am J Physiol Renal Physiol.** 2012 Dec 1;303(11):F1487-94. doi: 10.1152/ajprenal.00352.2012. Epub 2012 Sep 19.
- ⁹⁵ SALEHIPOUR M et al. Protective Effect of Parenteral Vitamin E on ischemia-reperfusion injury of rabbit kidney. **Urology.** April 2010;vol 75,issue 4, pages 858-861.
- ⁹⁶ CHEN BL, WANG LT, HUANG KH, WANG CC, CHIANG CK, LIU SH. Quercetin attenuates renal ischemia/reperfusion injury via an activation of AMP-activated protein kinase-regulated autophagy pathway. **J Nutr Biochem.** 2014 Nov;25(11):1226-34. doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.05.013. Epub 2014 Jul 4.
- ⁹⁷ EROL B, TURKER T, TOK A, BEKTAS S, MUNGAN G, OZKANLI S, KARAKAS B, TOKGOZ H², AKDUMAN B, MUNGAN A. The protective effects of tadalafil on renal damage following ischemia reperfusion injury in rats. **Kaohsiung J Med Sci.** 2015 Sep;31(9):454-62. doi: 10.1016/j.kjms.2015.06.005. Epub 2015 Jul 22.
- ⁹⁸ FRAGA CG, OTEIZA PI, GALLEANO M. In vitro measurements and interpretation of total antioxidant capacity. **Biochim Biophys Acta.** 2014 Feb;1840(2):931-4. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.06.030. Epub 2013 Jul 2.
- ⁹⁹ T.L. PARKER, S.A. MILLER, L.E. MYERS, F.E. MIGUEZ, N.J. ENGESETH, Evaluation of synergistic antioxidant potential of complex mixtures using Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Electron Paramagnetic Resonance (EPR), **J. Agric. Food Chem.** 58 (2010) 209–217.

-
- ¹⁰⁰ S. WANG, K.A. MECKLING, M.F. MARCONE, Y. KAKUDA, R. TSAO, Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities, **J. Agric. Food Chem.** 59 (2011) 960–968.
- ¹⁰¹ BRAGA M, BISSOLATI M, ROCCHETTI S, BENEDUCE A, PECORELLI N, DI CARLO V. Oral preoperative antioxidants in pancreatic surgery: a double-blind, randomized, clinical trial. **Nutrition.** 2012 Feb;28(2):160-4. doi: 10.1016/j.nut.2011.05.014. Epub 2011 Sep 3.
- ¹⁰² WANG C, WANG W, MA S, LU J, SHI H, DING F. Reduced Glutathione for Prevention of Renal Outcomes in Patients Undergoing Selective Coronary Angiography or Intervention. **J Interv Cardiol.** 2015 Jun;28(3):249-56. doi: 10.1111/joic.12204. Epub 2015 May 20.
- ¹⁰³ 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.
- ¹⁰⁴ GOUVÊA JUNIOR VT, CAPOROSSI C, HONDA N, PAVANI M. Efeito protetor do pre-condicionamento isquêmico em rins. 2016. **Revista do Colégio Brasileiro Cirurgia.** No prelo.
- ¹⁰⁵ HWANG JK, KIM JM, KIM YK et al. The early protective effect of glutamine pretreatment and ischemia preconditioning in renal ischemia-reperfusion injury of rat. **Transplant Proc** 2013 Nov;45(9):3203-8. doi: 10.1016/j.transproceed.2013.08.028.
- ¹⁰⁶ PENG ZY, ZHOU F, WANG HZ, WEN XY, NOLIN TD, BISHOP JV, KELLUM JA. The anti-oxidant effects are not the main mechanism for glutamine's protective effects on acute kidney injury in mice. **Eur J Pharmacol.** 2013 Apr 5;705(1-3):11-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.02.028. Epub 2013 Feb 27.
- ¹⁰⁷ KIM YS, JUNG MH, CHOI MY, KIM YH, SHEVERDIN V, KIM JH, HA HJ, PARK DJ, KANG SS, CHO GJ, CHOI WS, CHANG SH. 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 Jun;37(6):2033-44. doi: 10.1097/CCM.0b013e3181a005ba.
- ¹⁰⁸ KIDIR V, UZ E, YIGIT A et al. Manganese superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase gene polymorphisms and clinical outcomes in acute kidney injury. **Ren Fail.** 2016 Apr;38(3):372-7. doi: 10.3109/0886022X.2015.1135468. Epub 2016 Jan 20.
- ¹⁰⁹ BHATTACHARYYA A, CHATTOPADHYAY R, MITRA S, CROWE SE. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiol Rev.** 2014 Apr;94(2):329-54. doi: 10.1152/physrev.00040.2012.

-
- ¹¹⁰ EZHILAN RA et al. Antioxidant defense of glutamine on myocardial antioxidante status in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. **J Cell Anima Biol.**2008;2(5);107-11.
- ¹¹¹ YUAN GJ, MA JC, GONG ZJ, SUN XM, ZHENG SH, LI X. Modulation of liver oxidant-antioxidant system by ischemic preconditioning during ischemia/reperfusion injury in rats. **World J Gastroenterol.** 2005 Mar 28;11(12):1825-8.
- ¹¹² HO E, KARIMI GALOUGAHI K, LIU CC, BHINDI R, FIGTREE GA. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. **Redox Biol.** 2013 Oct 8;1:483-91. doi: 10.1016/j.redox.2013.07.006.
- ¹¹³ HUBER PC, ALMEIDA WP, FATIMA A . Glutathiona e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quím. Nova, São Paulo** , v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000500046&lng=en&nrm=iso>. access on 23 Jan. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000500046>.
- ¹¹⁴ FRASIER CR, MOUKDAR F, PATEL HD, SLOAN RC, STEWART LM, ALLEMAN RJ, LA FAVOR JD, BROWN DA. Redox-dependent increases in glutathione reductase and exercise preconditioning: role of NAD PH oxidase and mitochondria. **Cardiovasc Res.** 2013 Apr 1;98(1):47-55. doi: 10.1093/cvr/cvt009. Epub 2013 Jan 22.
- ¹¹⁵ YAN J, RALSTON MM, MENG X, BONGIOVANNI KD, JONES AL, BENNDORF R et al. Glutathione reductase is essential for host defense against bacterial infection. **Free Radic Biol Med.** 2013 Aug;61:320-32. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.015. Epub 2013 Apr 24.
- ¹¹⁶ BAR-OR D, BAR-OR R, RAEL LT, BRODY EN. Oxidative stress in severe acute illness. **Redox Biol.** 2015;4:340-5. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.006. Epub 2015 Jan 13.
- ¹¹⁷ ZHANG WX et al. Protective effects of glutamine preconditioning on ischemia-reperfusion injury in rats. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int.** 2011 Feb;10(1):78-82.
- ¹¹⁸ JIA CJ et al. Alanyl-glutamine dipeptide inhibits hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. **World J Gastroenterol.** 2006 Mar 7;12(9):1373-8.
- ¹¹⁹ SHOKEIR AA et al. Protection against renal ischaemia/reperfusion injury: A comparative experimental study of the effect of ischaemic preconditioning vs. postconditioning. **Arab J Urol.** 2012 Dec;10(4):418-24. doi: 10.1016/j.aju.2012.08.003. Epub 2012 Oct 17.
- ¹²⁰ NOIRIE, NAKAO A, UCHIDA K, TSUKAHARA H et al. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. **American Journal of Physiology - Renal**

Physiology Published 1 November 2001 Vol. 281 no. 5, F948-F957 DOI: 10.1152/ajprenal.0071.2001.

- ¹²¹ SCHNEIDER MP, SULLIVAN JC, WACH PF, BOESEN EI, YAMAMOTO T, FUKAI T, HARRISON DG, POLLOCK DM, POLLOCK JS. Protective role of extracellular superoxide dismutase in renal ischemia/reperfusion injury. **Kidney Int.** 2010 Aug;78(4):374-81. doi: 10.1038/ki.2010.141. Epub 2010 May 26.
- ¹²² 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 Aug;162(2):553-7.
- ¹²³ FAN LH, HE L, CAO ZQ, XIANG B, LIU L. Effect of ischemia preconditioning on renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Int Braz J Urol.** 2012 Nov-Dec;38(6):842-54.
- ¹²⁴ BRENNER BM, MEYER TW, HOSTETTER TH (1982) Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. **N Engl J Med** 307:652–659.
- ¹²⁵ ZATZ R, MEYER TW, RENNKE HG et al. (1985) Predominance of hemodynamic rather than metabolic factors in the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. **Proc Natl Acad Sci USA** 82:5963– 5967.
- ¹²⁶ ALBA-LOUREIRO TC, RIBEIRO RF, ZORN TM, LAGRANHA CJ. Effects of glutamine supplementation on kidney of diabetic rat. **Amino Acids.** 2010 Apr;38(4):1021-30. doi: 10.1007/s00726-009-0310-3. Epub 2009 Jun 17.
- ¹²⁷ HEYLAND D, MUSCEDERE J, WISCHMEYER PE, COOK D, JONES G, ALBERT M, ELKE G, BERGER MM, DAY AG; Canadian Critical Care Trials Group. A randomized trial of glutamine and antioxidants in critically ill patients. **N Engl J Med.** 2013 Apr 18;368(16):1489-97. doi: 10.1056/NEJMoa1212722.
- ¹²⁸ CHOI KH, YOON YE, KIM KH, HAN WK. Contralateral kidney volume change as a consequence of ipsilateral parenchymal atrophy promotes overall renal function recovery after partial nephrectomy. **Int Urol Nephrol.** 2015 Jan;47(1):25-32. doi: 10.1007/s11255-014-0847-2. Epub 2014 Oct 1.
- ¹²⁹ TUCCI S JR, MOLINA CA, COLOGNA AJ, SUAID HJ, TIRAPELLI LF, CELINI FM, MARTINS AC. Compensatory renal growth and mitochondrial function: the influence of warm ischemia and reperfusion. **Acta Cir Bras.** 2008;23 Suppl 1:31-5; discussion 35.
- ¹³⁰ FRANÇA BK et al. Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **Jornal Português de Gastroenterologia.** 2013.20(5);199-206.

-
- ¹³¹ 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 Aug;162(2):553-7.
- ¹³² AHMADIASL N, BANAEI S, ALIHEMATI A, BARADARAN B, AZIMIAN E. Effect of a combined treatment with erythropoietin and melatonin on renal ischemia reperfusion injury in male rats. **Clin Exp Nephrol.** 2014 Dec;18(6):855-64. doi: 10.1007/s10157-014-0937-6. Epub 2014 Feb 4.
- ¹³³ ESPOSITO E, MONDELLO S, DI PAOLA R, MAZZON E, ITALIANO D, PATERNITI I, MONDELLO P, ALOISI C, CUZZOCREA S. Glutamine contributes to ameliorate inflammation after renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** 2011 May;383(5):493-508. doi: 10.1007/s00210-011-0610-5. Epub 2011 Mar 11.
- ¹³⁴ HO E, KARIMI GALOUGAHI K, LIU CC, BHINDI R, FIGTREE GA. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. **Redox Biol.** 2013 Oct 8;1:483-91. doi: 10.1016/j.redox.2013.07.006.
- ¹³⁵ DEL RIO D, STEWART AJ, PELLEGRINI N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.** 2005 Aug;15(4):316-28.
- ¹³⁶ YIN HY, WEI JR, ZHANG R, YE XL, ZHU YF, LI WJ. Effect of glutamine on caspase-3 mRNA and protein expression in the myocardium of rats with sepsis. **Am J Med Sci.** 2014 Oct;348(4):315-8. doi: 10.1097/MAJ.0000000000000237.
- ¹³⁷ ARAÚJO JÚNIOR RJ, SILVA JÚNIOR RG, VASCONCELOS MP, GUIMARÃES SB, VASCONCELOS PR, GARCIA JH. Preconditioning with L-alanyl-glutamine reduces hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. **Acta Cir Bras.** 2011;26 Suppl 1:8-13.
- ¹³⁸ HUERTA L, RANCAN L, SIMÓN C, ISEA J, VIDAURRE E, VARA E, GARUTTI I, GONZÁLEZ-ARAGONESES F. Ischaemic preconditioning prevents the liver inflammatory response to lung ischaemia/reperfusion in a swine lung autotransplant model. **Eur J Cardiothorac Surg** 013 Jun;43(6):1194-201. doi: 10.1093/ejcts/ezs599. Epub 2012 Nov 23.
- ¹³⁹ LAI CC, TANG CY, CHIANG SC, TSENG KW, HUANG CH. Ischemic preconditioning activates prosurvival kinases and reduces myocardial apoptosis. **J Chin Med Assoc.** 2015 Aug;78(8):460-8. doi: 10.1016/j.jcma.2015.04.006. Epub 2015 Jun 10.
- ¹⁴⁰ PRASAD DEVARAJAN ,2006; Uptade on mechanisms of ischemic acute kidney injury. **J Am Soc Nephrol**17:1503-1520.

-
- ¹⁴¹ CHANG CH , WANG Y, GUPTA P, GOLDENBERG DM. Extensive crosslinking of CD22 by epratuzumab triggers BCR signaling and caspase-dependent apoptosis in human lymphoma cells. **MAbs**. 2015;7(1):199-211. doi: 10.4161/19420862.2014.979081.
- ¹⁴² JAMEL MJ, PEREIRA LDE P, MELLO NB, ELEUTHÉRIO EC, SCHANAIDER A. Blood carbonyl protein measurement as specific oxidative stress biomarker after intestinal reperfusion in rats. **Acta Cir Bras**. 2010 Feb;25(1):59-62.
- ¹⁴³ SCHANAIDER A, DE CARVALHO TP, DE OLIVEIRA COELHO S, RENTERIA JM, ELEUTHÉRIO EC, CASTELO-BRANCO MT, MADI K, BAETAS-DA-CRUZ W, DE SOUZA HS. Ischemia-reperfusion rat model of acute pancreatitis: protein carbonyl as a putative early biomarker of pancreatic injury. **Clin Exp Med**. 2015 Aug;15(3):311-20. doi: 10.1007/s10238-014-0289-2. Epub 2014 Jun 17.
- ¹⁴⁴ PENG ZY, ZHOU F, WANG HZ, WEN XY, NOLIN TD, BISHOP JV, KELLUM JA. The anti-oxidant effects are not the main mechanism for glutamine's protective effects on acute kidney injury in mice. **Eur J Pharmacol**. 2013 Apr 5;705(1-3):11-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.02.028. Epub 2013 Feb 27.

ANEXOS

ANEXO A – Resultados das dosagens.

Capacidade Antioxidante Total (1 DIA).				DOSAGEM DE PROTEÍNAS									
	A1	A2	ΔA	GRUPOS	A1	A2	ΔA	[mmol/L]	[ug/mL]	diluição (50x) [ug/mL]	[ug/mL] em 20uL	mg de pr	(mM/mg de proteína)
BRANCO	0,0225	0,4493	0,4268	1S	0,0620	0,065	####	3,182	129,74	6487	129,74	0,130	24,52
				2S	0,0576	0,066	####	3,140	145,14	7257	145,14	0,145	21,63
PADRÃO	0,0216	0,1514	0,1298	3S	0,0640	0,103	####	2,911	142,06	7103	142,06	0,142	20,49
	0,0217	0,1351	0,1134	4S	0,0535	0,135	####	2,591	126,66	6333	126,66	0,127	20,46
				5S	0,0598	0,0652	####	3,161	137,44	6872	137,44	0,137	22,99
Média	0,0217	0,1433	0,1216	MÉDIA	0,0594	####	####	3,00	136,21	6810,60	136,21	0,14	22,02
Fator=				ERRO PAD	0,002	0,014	####	0,11	3,53	176,26	3,53	0,004	0,78
[Padrão]													
[ΔA branco - ΔA padrão]													
Fator =	7,50			1 GLUT	0,0502	0,158	####	2,391	132,82	6641	132,82	0,133	18,00
				2 GLUT	0,0570	0,178	0,1210	2,294	135,90	6795	135,90	0,136	16,88
				3 GLUT	0,0660	0,21	####	2,118	132,82	6641	132,82	0,133	15,95
				4 GLUT	0,0425	0,273	####	1,470	129,74	6487	129,74	0,130	11,33
				5 GLUT	0,0536	0,1681	0,1145	2,342	134,36	6718	134,36	0,134	17,43
Calculo para [] das amostras				MÉDIA	0,0539	####	####	2,12	133,13	6656,60	133,13	0,133	15,92
Calculo Fator x [ΔA branco - ΔA amostra]				ERRO PAD	0,004	0,021	####	0,17	1,02	51,08	1,02	0,001	1,20
= mmol/L													
				1 PRE	0,0770	0,2306	####	2,049	102,02	5101	102,02	0,102	20,08
				2 PRE	0,1252	0,2977	####	1,907	117,42	5871	117,42	0,117	16,24
				3 PRE	0,1314	0,2156	####	2,570	126,66	6333	126,66	0,127	20,29
				4 PRE	0,1132	0,2594	####	2,105	126,66	6333	126,66	0,127	16,61
				5 PRE	0,0661	0,2891	####	1,529	109,72	5486	109,72	0,110	13,93
				MÉDIA	0,1026	####	####	2,03	116,50	5825,00	116,50	0,117	17,43
				ERRO PAD	0,013	0,016	####	0,17	4,30	215,16	4,30	0,004	1,21
				1 IR	0,0629	0,2609	####	1,716	132,82	6641	132,82	0,133	12,92
				2 IR	0,0526	0,2559	####	1,676	123,58	6179	123,58	0,124	13,56
				3 IR	0,0708	0,2094	####	2,162	135,90	6795	135,90	0,136	15,90
				4 IR	0,0481	0,2133	####	1,962	163,62	8181	163,62	0,164	11,99
				5 IR	0,0577	0,2664	####	1,636	128,20	6410	128,20	0,128	12,76
				MÉDIA	0,0584	####	####	1,83	136,83	6841,40	136,83	0,137	13,43
				ERRO PAD	0,004	0,012	####	0,10	6,28	313,80	7,02	0,007	0,67
				1 PRE/GLU	0,0500	0,2750	####	1,514	126,66	6333	126,66	0,127	11,95
				2 PRE/GLU	0,0488	0,1958	####	2,099	132,82	6641	132,82	0,133	15,80
				3 PRE/GLU	0,0648	0,2671	####	1,684	114,34	5717	114,34	0,114	14,73
				4 PRE/GLU	0,0552	0,2226	####	1,946	145,14	7257	145,14	0,145	13,40
				5 PRE/GLU	0,0494	0,2854	####	1,431	129,74	6487	129,74	0,130	11,03
				MÉDIA	0,0536	####	####	1,73	129,74	6487,20	129,74	0,130	13,38
				ERRO PAD	0,003	0,017	####	0,13	4,44	222,10	4,97	0,005	0,87

Capacidade Antioxidante Total (7 Dia).								DOSAGEM DE PROTEÍNAS					CAT (mM/mg de proteína)
A1	A2	ΔA	GRUPOS	A1	A2	ΔA	[mmol/L]	(ug/mL L)	Fator de diluição (50x)	(ug/mL em 20uL	mg de pr		
BRANCO	0,0256	0,4829	0,457	1S	0,0294	0,0338	0,0044	3,175	119,53	5977	119,53	0,120	26,56
				2S	0,0269	0,0286	0,0017	3,194	143,00	7150	143,00	0,143	22,33
PADRÃO	0,0226	0,1561	0,134	3S	0,0251	0,0281	0,0030	3,185	116,92	5846	116,92	0,117	27,24
	0,0344	0,1622	0,128	4S	0,0265	0,0286	0,0021	3,191	106,49	5325	106,49	0,106	29,96
				5S	0,0281	0,0312	0,0031	3,184	131,27	6563	131,27	0,131	24,26
Média	0,0285	0,1592	####	MEDIA	0,0272	0,0301	0,0029	3,19	123,44	6172,20	123,44	0,12	26,07
				ERRO F	0,001	0,001	0,000	0,00	6,28	314,02	6,28	0,006	1,30
Fator=	[Padrão]												
	[ΔA branco - ΔA padrão]												
Fator =	7,01			1 GLUT	0,0278	0,0946	0,0668	2,737	103,89	5194	103,89	0,104	26,35
				2 GLUT	0,0026	0,1631	0,1606	2,080	114,32	5716	114,32	0,114	18,20
				3 GLUT	0,0295	0,2650	0,2355	1,555	114,32	5716	114,32	0,114	13,60
				4 GLUT	0,0273	0,1837	0,1564	2,109	101,28	5064	101,28	0,101	20,83
				5 GLUT	0,0151	0,1288	0,1137	2,409	109,10	5455	109,10	0,109	22,08
Calculo para [] das amostras				MEDIA	0,0205	0,1670	0,1466	2,18	108,58	5428,97	108,58	0,109	20,21
Cálculo Fator x (ΔA branco - ΔA amostra)				ERRO F	0,005	0,029	0,028	0,20	2,66	132,97	2,66	0,003	2,11
= mmol/L													
				1 PRE	0,0258	0,2247	0,1989	1,811	109,10	5455	109,10	0,109	16,60
				2 PRE	0,0417	0,2082	0,1665	2,039	98,67	4933	98,67	0,099	20,66
				3 PRE	0,0258	0,1514	0,1256	2,325	88,24	4412	88,24	0,088	26,35
				4 PRE	0,0305	0,1406	0,1101	2,434	93,45	4673	93,45	0,093	26,04
				5 PRE	0,0337	0,2314	0,1977	1,820	103,89	5194	103,89	0,104	17,52
				MEDIA	0,0315	0,1913	0,1598	2,09	98,67	4933,49	98,67	0,099	21,44
				ERRO F	0,003	0,019	0,018	0,13	3,30	184,40	3,69	0,004	2,06
				1 IR	0,0308	0,2244	0,1936	1,849	106,49	5325	106,49	0,106	17,36
				2 IR	0,0267	0,1854	0,1587	2,093	98,67	4933	98,67	0,099	21,21
				3 IR	0,0288	0,2949	0,2661	1,340	96,06	4803	96,06	0,096	13,95
				4 IR	0,0377	0,2336	0,1959	1,832	85,63	4282	85,63	0,086	21,40
				5 IR	0,0287	0,2549	0,2262	1,620	102,58	5129	102,58	0,103	15,79
				MEDIA	0,0305	0,2386	0,2081	1,75	97,89	4894,37	97,89	0,098	17,94
				ERRO F	0,002	0,018	0,018	0,13	3,16	176,87	3,54	0,004	1,48
				1 PRE/IR	0,0291	0,2162	0,1871	1,894	96,06	4803	96,06	0,096	19,72
				2 PRE/IR	0,0308	0,2612	0,2304	1,591	98,67	4933	98,67	0,099	16,12
				3 PRE/IR	0,0313	0,1949	0,1636	2,059	103,89	5194	103,89	0,104	19,82
				4 PRE/IR	0,0257	0,2347	0,2090	1,741	96,06	4803	96,06	0,096	18,12
				5 PRE/IR	0,0299	0,2380	0,2081	1,747	97,37	4868	97,37	0,097	17,94
				MEDIA	0,0294	0,2290	0,1996	1,81	98,41	4920,45	98,41	0,098	18,34
				ERRO F	0,001	0,011	0,011	0,08	1,30	72,60	1,45	0,001	0,68

GR 1 DIA												
						Taxa amostr	Taxa Líquid	Atividade GR (mU/mL)	Correção diluição do ensaio (mU/mL)		Correção qtidade proteínas	
GRUPOS	A1	A2	A3	A4	A5	(A1-A5)/4	ΔA(amostr a) -	ΔA340/min/ E ^m	(total/Vamo st) Ativ. GR	Ptns totais	μU/mg proteína	μmg proteínas
1S	0,6169	0,3817	0,2703	0,229	0,217	0,1000	0,0991	15,93	493,91	2,81	175,50	0,1755
2S	0,6639	0,4133	0,2745	0,228	0,214	0,1126	0,1117	17,95	556,45	2,93	189,66	0,1897
3S	0,6067	0,3541	0,2585	0,224	0,215	0,0979	0,0970	15,59	483,32	4,60	105,02	0,1050
4S	0,6718	0,4692	0,3226	0,238	0,2	0,1180	0,1171	18,82	583,49	2,69	216,55	0,2165
5S	0,6398	0,4045	0,2814	0,23	0,211	0,1071	0,1062	17,07	529,29	2,87	184,16	0,1842
Média	0,640	0,405	0,281	0,230	0,211	0,107	0,106	17,07	529,29	3,18	174,18	0,17
Err. Pad.	0,011	0,017	0,010	0,002	0,003	0,003	0,003	0,54	16,78	0,32	16,64	0,02
1 GLUT	0,5961	0,3903	0,2728	0,21	0,185	0,1028	0,1019	16,38	507,74	2,37	214,55	0,2146
2 GLUT	0,5819	0,4067	0,2561	0,228	0,22	0,0905	0,0895	14,39	446,19	2,83	157,44	0,1574
3 GLUT	0,5815	0,3936	0,2771	0,22	0,198	0,0959	0,0950	15,27	473,47	2,98	158,78	0,1588
4 GLUT	0,6649	0,4971	0,3752	0,289	0,237	0,1070	0,1060	17,05	528,42	2,85	185,41	0,1854
5 GLUT	0,6061	0,4219	0,2953	0,236	0,2099	0,0991	0,0981	15,78	489,05	2,60	188,08	0,1881
MEDIA	0,606	0,422	0,295	0,236	0,210	0,099	0,098	15,77	488,97	2,73	180,85	0,18
ERRO PAD.	0,014	0,018	0,019	0,012	0,008	0,003	0,003	0,41	12,62	0,10	9,47	0,01
1 PRE	0,6078	0,416	0,308	0,263	0,246	0,0904	0,0895	14,39	446,06	3,09	144,17	0,1442
2 PRE	0,7032	0,537	0,4124	0,326	0,233	0,1175	0,1166	18,74	580,88	2,11	275,23	0,2752
3 PRE	0,6969	0,4664	0,3307	0,266	0,184	0,1282	0,1273	20,46	634,33	2,25	281,86	0,2819
4 PRE	0,6357	0,4617	0,3409	0,266	0,224	0,1030	0,1020	16,40	508,48	2,48	204,83	0,2048
5 PRE	0,6609	0,4702	0,3480	0,28	0,2218	0,1098	0,1089	17,50	542,50	2,60	208,47	0,2085
MEDIA	0,661	0,470	0,348	0,280	0,222	0,110	0,109	17,50	542,45	2,51	222,91	0,22
ERRO PAD.	0,016	0,017	0,016	0,011	0,009	0,006	0,006	0,92	28,54	0,15	22,76	0,02
1 IR	0,7642	0,7086	0,6446	0,536	0,428	0,0842	0,0832	13,38	414,79	2,47	168,17	0,1682
2 IR	0,6053	0,3916	0,2793	0,237	0,224	0,0954	0,0945	15,18	470,73	2,64	178,41	0,1784
3 IR	0,6198	0,4185	0,3109	0,267	0,252	0,0919	0,0910	14,62	453,29	2,01	225,46	0,2255
4 IR	0,6392	0,4337	0,2985	0,225	0,193	0,1115	0,1105	17,77	550,85	2,08	265,02	0,2650
5 IR	0,6571	0,4831	0,3833	0,316	0,2742	0,0957	0,0948	15,24	472,48	2,55	185,10	0,1851
MEDIA	0,657	0,487	0,383	0,316	0,274	0,096	0,095	15,24	472,43	2,35	204,43	0,20
ERRO PAD.	0,025	0,051	0,061	0,051	0,036	0,004	0,004	0,64	19,84	0,11	16,10	0,02
1 PRE/ GLUT	0,672	0,4586	0,3429	0,293	0,273	0,0997	0,0988	15,88	492,16	2,57	191,47	0,1915
2 PRE/ GLUT	0,6311	0,4119	0,3112	0,252	0,225	0,1015	0,1006	16,17	501,13	2,34	213,93	0,2139
3 PRE/ GLUT	0,7239	0,5032	0,3619	0,29	0,26	0,1160	0,1150	18,49	573,28	2,33	246,41	0,2464
4 PRE/ GLUT	0,6798	0,4989	0,3708	0,292	0,245	0,1088	0,1079	17,35	537,77	2,10	255,77	0,2558
5 PRE/ GLUT	0,6767	0,4681	0,3467	0,282	0,2507	0,1065	0,1056	16,97	526,18	2,46	214,20	0,2142
MEDIA	0,677	0,468	0,347	0,282	0,251	0,106	0,106	16,97	526,10	2,36	224,36	0,22
ERRO PAD.	0,013	0,015	0,009	0,007	0,007	0,003	0,003	0,41	12,86	0,07	10,52	0,01

GR - 7 DIA												
						Taxa amostr	Taxa Líquida	Atividade	Correção		Correção	
							$\Delta A(\text{amostr} - a) -$	GR (mU/mL)	diluição do		qtidade	
GRUPOS	A1	A2	A3	A4	A5	(A1-A5)/4		$(\Delta A340/\text{min})/E^M$	ensaio	Ptns	proteína	proteínas
									(total/Vamo st)* Ativ. GR	totais	µU/mg	µU/mg
1S	0,657	0,424	0,3232	0,298	0,287	0,0926	0,0914	14,70	455,66	3,68	123,94	0,1239
2S	0,76	0,513	0,3387	0,248	0,21	0,1375	0,1363	21,91	679,31	2,46	275,69	0,2757
3S	0,787	0,51	0,329	0,26	0,229	0,1396	0,1384	22,25	689,77	2,95	234,22	0,2342
4S	0,779	0,509	0,3754	0,334	0,324	0,1140	0,1128	18,14	562,19	3,25	173,09	0,1731
5S	0,735	0,482	0,3303	0,268	0,242	0,1232	0,1221	19,62	608,29	3,07	198,12	0,1981
Média	0,744	0,488	0,339	0,281	0,258	0,121	0,120	19,32	599,04	3,08	201,01	0,20
Err. Pad.	0,021	0,015	0,008	0,014	0,019	0,008	0,008	1,24	38,30	0,18	23,16	0,02
1 GLUT	0,87	0,636	0,4529	0,333	0,266	0,1509	0,1497	24,06	745,97	4,04	184,83	0,1848
2 GLUT	0,893	0,691	0,5358	0,404	0,326	0,1418	0,1406	22,61	700,86	3,28	213,61	0,2136
3 GLUT	0,875	0,69	0,5531	0,433	0,338	0,1344	0,1332	21,41	663,86	2,91	227,93	0,2279
4 GLUT	0,89	0,68	0,5199	0,423	0,377	0,1282	0,1270	20,42	633,08	3,24	195,40	0,1954
5 GLUT	0,882	0,674	0,5154	0,398	0,327	0,1388	0,1376	22,13	685,91	3,66	187,48	0,1875
MÉDIA	0,882	0,674	0,515	0,398	0,327	0,139	0,138	22,13	685,94	3,43	201,85	0,20
ERRO PAD.	0,004	0,009	0,015	0,016	0,016	0,003	0,003	0,54	16,86	0,17	7,37	0,01
1 PRE	0,876	0,703	0,5465	0,423	0,331	0,1363	0,1351	21,72	673,33	2,75	245,11	0,2451
2 PRE	0,645	0,381	0,2925	0,168	0,099	0,1367	0,1355	21,78	675,32	5,16	130,89	0,1309
3 PRE	0,832	0,55	0,3639	0,263	0,22	0,1530	0,1518	24,40	756,43	3,03	249,65	0,2496
4 PRE	0,735	0,473	0,3519	0,316	0,202	0,1332	0,1320	21,23	658,00	3,91	168,09	0,1681
5 PRE	0,772	0,527	0,3887	0,293	0,213	0,1398	0,1386	22,28	690,77	3,95	174,74	0,1747
MÉDIA	0,772	0,527	0,389	0,293	0,213	0,140	0,139	22,28	690,77	3,76	193,70	0,19
ERRO PAD.	0,036	0,047	0,038	0,037	0,033	0,003	0,003	0,50	15,40	0,38	20,72	0,02
1 IR	0,848	0,638	0,5655	0,426	0,367	0,1201	0,1190	19,12	592,84	2,65	224,05	0,2241
2 IR	0,9	0,696	0,5306	0,412	0,382	0,1295	0,1283	20,63	639,44	2,65	241,30	0,2413
3 IR	0,871	0,703	0,5469	0,43	0,352	0,1297	0,1285	20,66	640,56	3,44	186,32	0,1863
4 IR	0,76	0,521	0,3931	0,353	0,336	0,1059	0,1048	16,84	522,07	4,48	116,62	0,1166
5 IR	0,8445	0,6397	0,5840	0,4802	0,4243	0,1051	0,1039	16,70	517,70	2,65	195,51	0,1955
MÉDIA	0,845	0,640	0,524	0,420	0,372	0,118	0,117	18,79	582,52	3,17	192,76	0,19
ERRO PAD.	0,021	0,029	0,030	0,018	0,013	0,005	0,005	0,78	24,14	0,32	19,16	0,02
1 PRE/ GLUT	0,853	0,663	0,5085	0,391	0,314	0,1349	0,1337	21,49	666,23	2,12	313,59	0,3136
2 PRE/ GLUT	0,928	0,691	0,5282	0,405	0,325	0,1508	0,1496	24,05	745,47	1,99	374,42	0,3744
3 PRE/ GLUT	0,827	0,608	0,4751	0,417	0,397	0,1075	0,1064	17,10	530,04	1,40	378,60	0,3786
4 PRE/ GLUT	0,782	0,534	0,4014	0,353	0,335	0,1118	0,1106	17,78	551,10	2,24	246,03	0,2460
5 PRE/ GLUT	0,8476	0,624	0,4783	0,391	0,343	0,1262	0,1251	20,10	623,24	2,06	302,87	0,3029
MÉDIA	0,848	0,624	0,478	0,391	0,343	0,126	0,125	20,10	623,21	1,96	323,10	0,32
ERRO PAD.	0,021	0,024	0,019	0,010	0,013	0,007	0,007	1,13	35,03	0,13	22,05	0,02

GLUTATIUNA PEROXIDASE- 1 Dia												
	Taxa amostra				Taxa Líquida	Atividade GR (mU/mL)	Correção diluição do ensaio	Correção diluição da amostra		Correção qtidade proteínas		
GRUPOS	A1	A2	A3	(A1-A3)/2	ΔA(amostra) -	(ΔA340/min)/E ^m	(total/V amostra) * Ativ. GR	x 50	Ptns totais	μU/mg proteína	μU/mg proteína	log
1S	1,502	1,455	1,412	0,0448	0,0155	2,49	132,07	6603,70	2,81	2346,52	2,35	0,37042
2S	1,49	1,444	1,398	0,0463	0,0171	2,74	145,28	7264,07	2,93	2475,82	2,48	0,39372
3S	1,48	1,425	1,369	0,0555	0,0263	4,22	223,67	11183,68	4,60	2430,18	2,43	0,38564
4S	1,484	1,43	1,383	0,0502	0,0209	3,36	178,09	8904,34	2,69	3304,64	3,30	0,51912
5S	1,496	1,449	1,405	0,0456	0,0163	2,62	138,89	6944,53	2,87	2416,23	2,42	0,38314
Média	****	****	****	0,048	0,019	3,087	163,60	8180	3,18	2595	2,59	
Err. Pad.	0,004	0,005	0,007	0,002	0,002	0,286	15,18	759	0,32	160	0,16	
1 GLUT	1,469	1,421	1,377	0,0462	0,0170	2,73	144,43	7221,46	2,37	3051,54	3,05	0,48452
2 GLUT	1,452	1,398	1,351	0,0507	0,0214	3,44	182,35	9117,36	2,83	3217,14	3,22	0,50747
3 GLUT	1,453	1,41	1,363	0,0447	0,0155	2,48	131,65	6582,40	2,98	2207,38	2,21	0,34388
4 GLUT	1,439	1,398	1,358	0,0404	0,0112	1,79	95,01	4750,40	2,85	1666,81	1,67	0,22189
5 GLUT	1,461	1,409	1,364	0,0485	0,0192	3,09	163,60	8180,06	2,60	3145,88	3,15	0,49774
MEDIA	****	****	****	0,046	0,017	2,706	143,41	7170	2,73	2658	2,66	
ERRO PAD	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002	0,250	13,28	664	0,10	275	0,28	
1 PRE	1,502	1,46	1,418	0,0420	0,0128	2,05	108,64	5432,07	3,09	1755,68	1,76	0,24445
2 PRE	1,48	1,43	1,386	0,0473	0,0181	2,90	153,80	7690,11	2,11	3643,74	3,64	0,56155
3 PRE	1,48	1,428	1,383	0,0484	0,0192	3,08	163,18	8158,76	2,25	3625,31	3,63	0,55935
4 PRE	1,484	1,436	1,398	0,0430	0,0138	2,21	117,16	5858,12	2,48	2359,77	2,36	0,37287
5 PRE	1,491	1,445	1,402	0,0447	0,0154	2,48	131,22	6561,09	2,60	2521,32	2,52	0,40163
MEDIA	****	****	****	0,045	0,016	2,543	134,80	6740	2,51	2781	2,78	
ERRO PAD	0,004	0,005	0,006	0,001	0,001	0,176	9,33	466	0,15	332	0,33	
1 IR	1,444	1,398	1,353	0,0451	0,0158	2,54	134,63	6731,51	2,47	2729,18	2,73	0,43603
2 IR	1,433	1,395	1,361	0,0363	0,0071	1,13	60,07	3003,62	2,64	1138,38	1,14	0,05629
3 IR	1,43	1,386	1,345	0,0427	0,0134	2,15	114,18	5709,00	2,01	2839,59	2,84	0,45326
4 IR	1,433	1,395	1,361	0,0363	0,0071	1,13	60,07	3003,62	2,08	1445,09	1,45	0,15389
5 IR	1,438	1,396	1,357	0,0407	0,0114	1,83	97,14	4856,91	2,55	1902,81	1,90	0,27939
MEDIA	****	****	****	0,040	0,011	1,759	93,22	4661	2,35	2011	2,01	
ERRO PAD	0,002	0,002	0,003	0,002	0,002	0,249	13,22	661	0,11	303	0,30	
1 PRE/GLU	1,381	1,332	1,294	0,0432	0,0140	2,24	118,87	5943,33	2,57	2312,13	2,31	0,36401
2 PRE/GLU	1,374	1,332	1,292	0,0411	0,0119	1,91	100,97	5048,63	2,34	2155,23	2,16	0,33349
3 PRE/GLU	1,367	1,32	1,277	0,0450	0,0157	2,52	133,78	6688,91	2,33	2875,09	2,88	0,45865
4 PRE/GLU	1,361	1,318	1,281	0,0399	0,0107	1,71	90,75	4537,38	2,10	2158,09	2,16	0,33407
5 PRE/GLU	1,377	1,332	1,293	0,0422	0,0129	2,07	109,92	5495,98	2,46	2237,32	2,24	0,34973
MEDIA	****	****	****	0,042	0,013	2,092	110,86	5543	2,36	2348	2,35	
ERRO PAD	0,003	0,003	0,003	0,001	0,001	0,125	6,61	331	0,07	121	0,12	

GLUTATONA PEROXIDASE- 7 Dia											
					Taxa amostra	Atividade	Correção	Correção			
					axa Líquida	GR (mU/mL)	diluição do	diluição da			
					ΔA(amostr	E"	ensaio	amostra			
					a) -		(mU/mL)	(mU/mL)			
GRUPOS	A1	A2	A3	(A1-A3)/2			(total/Vamo		Ptns	Correção qtidade	
							st) * Ativ. GR	x 50	totais	proteínas	proteínas
										U/mg proteína	U/mg proteínas
1S	1,441	1,369	1,308	0,0663	0,0424	6,81	360,86	18043,01	3,68	4907,66	4,91
2S	1,43	1,379	1,335	0,0478	0,0239	3,84	203,65	10182,48	2,46	4132,50	4,13
3S	1,463	1,403	1,355	0,0543	0,0303	4,87	258,18	12909,16	2,95	4383,42	4,38
4S	1,457	1,386	1,327	0,0651	0,0411	6,61	350,21	17510,45	3,25	5391,15	5,39
5S	1,436	1,374	1,321	0,0571	0,0331	5,33	282,25	14112,74	3,07	4596,61	4,60
Média	****	****	****	0,058	0,034	5,491	291,03	14552	3,08	4682	4,68
Err. Pad.	0,006	0,005	0,007	0,003	0,003	0,494	26,21	1310	0,18	195	0,20
1 GLUT	1,469	1,415	1,369	0,0500	0,0260	4,18	221,54	11077,17	4,04	2744,59	2,74
2 GLUT	1,469	1,421	1,374	0,0475	0,0235	3,78	200,24	10012,06	3,28	3051,53	3,05
3 GLUT	1,452	1,406	1,361	0,0458	0,0219	3,52	186,61	9330,39	2,91	3203,57	3,20
4 GLUT	1,458	1,379	1,325	0,0669	0,0429	6,91	365,97	18298,63	3,24	5647,73	5,65
5 GLUT	1,469	1,418	1,372	0,0487	0,0248	3,98	210,89	10544,61	3,66	2882,22	2,88
MEDIA	****	****	****	0,052	0,028	4,473	237,05	11853	3,43	3506	3,51
ERRO PAD	0,003	0,007	0,008	0,003	0,003	0,553	29,29	1464	0,17	484	0,48
1 PRE	1,446	1,388	1,339	0,0535	0,0296	4,75	251,79	12589,63	2,75	4583,05	4,58
2 PRE	1,408	1,342	1,282	0,0631	0,0392	6,30	334,02	16700,96	5,16	3236,93	3,24
3 PRE	1,415	1,355	1,305	0,0551	0,0312	5,01	265,43	13271,30	3,03	4379,97	4,38
4 PRE	1,408	1,347	1,296	0,0559	0,0319	5,14	272,24	13612,14	3,91	3477,36	3,48
5 PRE	1,427	1,365	1,307	0,0604	0,0364	5,86	310,59	15529,34	3,95	3928,25	3,93
MEDIA	****	****	****	0,058	0,034	5,412	286,81	14341	3,76	3921	3,92
ERRO PAD	0,006	0,007	0,008	0,002	0,002	0,258	13,70	685	0,38	229	0,23
1 IR	1,48	1,428	1,377	0,0518	0,0278	4,47	236,88	11844,05	2,65	4476,21	4,48
2 IR	1,484	1,433	1,386	0,0489	0,0250	4,01	212,60	10629,82	2,65	4011,25	4,01
3 IR	1,466	1,415	1,363	0,0515	0,0276	4,43	234,75	11737,54	3,44	3414,06	3,41
4 IR	1,452	1,383	1,32	0,0661	0,0422	6,78	359,58	17979,10	4,48	4016,33	4,02
5 IR	1,482	1,45	1,405	0,0384	0,0144	2,32	122,70	6135,05	2,65	2316,86	2,32
MEDIA	****	****	****	0,051	0,027	4,402	233,30	11665	3,17	3647	3,65
ERRO PAD	0,005	0,010	0,013	0,004	0,004	0,638	33,84	1692	0,32	333	0,33
1 PRE/GLL	1,379	1,325	1,271	0,0542	0,0303	4,86	257,76	12887,86	2,12	6066,30	6,07
2 PRE/GLL	1,38	1,326	1,278	0,0510	0,0271	4,36	230,92	11545,82	1,99	5799,01	5,80
3 PRE/GLL	1,363	1,293	1,234	0,0647	0,0407	6,54	346,80	17340,03	1,40	12385,74	12,39
4 PRE/GLL	1,352	1,284	1,228	0,0624	0,0384	6,17	327,20	16360,13	4,24	3856,70	3,86
5 PRE/GLL	1,38	1,325	1,253	0,0636	0,0396	6,37	337,43	16871,38	2,06	8198,95	8,20
MEDIA	****	****	****	0,059	0,035	5,661	300,02	15001	2,36	7261	7,26
ERRO PAD	0,005	0,008	0,009	0,002	0,002	0,394	20,87	1043	0,44	1301	1,30

Glutaciona Reduzida - Dia 1					
Amostra	Peso	ABS	g de rim / 1ml	[MILI mols de GSH / 1 mL]	[MILI mols de GSH / g de tecido]
1S	0,2033	0,3669	0,0508	0,0829	1,63
2S	0,2025	0,3718	0,0506	0,0840	1,66
3S	0,2071	0,4850	0,0518	0,1096	2,12
4S	0,2064	0,2920	0,0516	0,0660	1,28
5S	0,2029	0,3693	0,0507	0,0835	1,65
Média	0,2044	0,3770	0,0511	0,085	1,67
Err. Pad.	0,0010	0,0309	0,0002	0,007	0,13
1 GLUT	0,2001	0,3987	0,0500	0,0901	1,80
2 GLUT	0,2028	0,3976	0,0507	0,0899	1,77
3 GLUT	0,2008	0,3292	0,0502	0,0744	1,48
4 GLUT	0,1945	0,2059	0,0486	0,0465	0,96
5 GLUT	0,2014	0,3981	0,0504	0,0900	1,79
MEDIA	0,1999	0,3459	0,0500	0,078	1,56
ERRO PAD	0,0014	0,0375	0,0004	0,008	0,16
1 PRE	0,2027	0,5078	0,0507	0,1148	2,26
2 PRE	0,2030	0,4807	0,0508	0,1086	2,14
3 PRE	0,1969	0,6318	0,0492	0,1428	2,90
4 PRE	0,1683	0,4579	0,0421	0,1035	2,46
5 PRE	0,2028	0,4942	0,0507	0,1117	2,20
MEDIA	0,1947	0,5145	0,0487	0,116	2,39
ERRO PAD	0,0067	0,0305	0,0017	0,007	0,14
1 IR	0,2022	0,4144	0,0506	0,0937	1,85
2 IR	0,2032	0,3400	0,0508	0,0768	1,51
3 IR	0,2016	0,5096	0,0504	0,1152	2,29
4 IR	0,2043	0,4927	0,0511	0,1114	2,18
5 IR	0,2027	0,3772	0,0507	0,0852	1,68
MEDIA	0,2028	0,4268	0,0507	0,096	1,90
ERRO PAD	0,0005	0,0327	0,0001	0,007	0,15
1 PRE/GLL	0,2096	0,5250	0,0524	0,1187	2,26
2 PRE/GLL	0,2021	0,5277	0,0505	0,1193	2,36
3 PRE/GLL	0,2063	0,7009	0,0516	0,1584	3,07
4 PRE/GLL	0,2065	0,6278	0,0516	0,1419	2,75
5 PRE/GLL	0,2058	0,5263	0,0515	0,1189	2,31
MEDIA	0,2061	0,5815	0,0515	0,131	2,55
ERRO PAD	0,0012	0,0357	0,0003	0,008	0,16

Glutaciona Reduzida - Dia 7								
Amostr	ABS	Conc mM	Amostra	Peso	ABS	[g de rim / 1mL]	[MILI mols de GSH / 1 mL]	mmols de GSH / g de tecido
Pad 1	0,4268	0,1000	1S	0,2100	0,5082	0,0525	0,12	2,33
Pad 2	0,2067	0,0500	2S	0,2189	0,6041	0,0547	0,15	2,66
Pad 3	0,0967	0,0250	3S	0,2094	0,5638	0,0524	0,14	2,60
Pad 4	0,0336	0,0100	4S	0,2107	0,5345	0,0527	0,13	2,45
Pad 5	0,0242	0,0050	5S	0,2144	0,5561	0,0536	0,13	2,50
Total	0,7880	0,1900	Média	0,2127	0,5533	0,0532	0,133	2,51
			Err. Pad.	0,0018	0,0159	0,0004	0,004	0,06
			1 GLUT	0,2105	0,4255	0,0526	0,10	1,95
			2 GLUT	0,2164	0,5082	0,0541	0,12	2,26
			3 GLUT	0,2028	0,4036	0,0507	0,10	1,92
			4 GLUT	0,2013	0,5219	0,0503	0,13	2,50
			5 GLUT	0,2134	0,4668	0,0534	0,11	2,11
			MEDIA	0,2089	0,4652	0,0522	0,112	2,15
			ERRO PAD	0,0029	0,0228	0,0007	0,006	0,11
			1 PRE	0,2067	0,4941	0,0517	0,12	2,31
			2 PRE	0,2171	0,6292	0,0543	0,15	2,80
			3 PRE	0,2119	0,4862	0,0530	0,12	2,21
			4 PRE	0,2129	0,5486	0,0532	0,13	2,49
			5 PRE	0,2119	0,5616	0,0530	0,14	2,56
			MEDIA	0,2121	0,5439	0,0530	0,131	2,47
			ERRO PAD	0,0017	0,0259	0,0004	0,006	0,10
			1 IR	0,2078	0,5492	0,0520	0,13	2,55
			2 IR	0,2119	0,5333	0,0530	0,13	2,43
			3 IR	0,2165	0,5490	0,0541	0,13	2,45
			4 IR	0,2084	0,6222	0,0521	0,15	2,88
			5 IR	0,2098	0,5412	0,0525	0,13	2,49
			MEDIA	0,2109	0,5590	0,0527	0,135	2,56
			ERRO PAD	0,0016	0,0161	0,0004	0,004	0,08
			1 PRE/GLU	0,2050	0,5219	0,0513	0,13	2,46
			2 PRE/GLU	0,2146	0,5211	0,0537	0,13	2,34
			3 PRE/GLU	0,2042	0,5231	0,0511	0,13	2,47
			4 PRE/GLU	0,2109	0,4573	0,0527	0,11	2,09
			5 PRE/GLU	0,2098	0,5215	0,0525	0,13	2,40
			MEDIA	0,2089	0,5090	0,0522	0,123	2,35
			ERRO PAD	0,0019	0,0129	0,0005	0,003	0,07

Dosagem de malonaldeído - 1 Dia						
Padrões				Amostras	Peso	AB
μM	AB1	AB2	Média			μmol
2,5	0,0916	0,0834	0,0875	1S	0,2012	0,0682
5	0,1755	0,1848	0,1802	2S	0,2003	0,0745
10	0,3271	0,3375	0,3323	3S	0,1997	0,0657
17,5			0,600	4S	0,19	0,0557
				5S	0,2104	0,0767
				Média	0,2003	0,0682
				Err. Pad.	0,00	0,00
				1 GLUT	0,2486	0,0710
				2 GLUT	0,2444	0,0731
				3 GLUT	0,2432	0,0875
				4 GLUT	0,2408	0,1061
				5 GLUT	0,2465	0,0725
				MÉDIA	0,2447	0,0820
				ERRO PAD.	0,00	0,01
				1 PRE	0,2548	0,0801
				2 PRE	0,2586	0,0660
				3 PRE	0,2516	0,0649
				4 PRE	0,2438	0,0599
				5 PRE	0,2567	0,0735
				MÉDIA	0,2531	0,0689
				ERRO PAD.	0,00	0,00
				1 IR	0,2412	0,0565
				2 IR	0,2512	0,0724
				3 IR	0,2447	0,0687
				4 IR	0,2526	0,0920
				5 IR	0,2462	0,0644
				MÉDIA	0,2472	0,0708
				ERRO PAD.	0,00	0,01
				1 PRE/GLUT	0,2496	0,0765
				2 PRE/GLUT	0,2493	0,0732
				3 PRE/GLUT	0,2425	0,0564
				4 PRE/GLUT	0,244	0,0728
				5 PRE/GLUT	0,2494	0,0748
				MÉDIA	0,2470	0,0707
				ERRO PAD.	0,00	0,00

Dosagem de malonaldeído - 7 Dia						
Padrões				Amostras	Peso	AB
μM	AB1	AB2	Média			μmol
2,5	0,0868	0,0834	0,0851	1S	0,2535	0,0649
5	0,1638	0,1588	0,1613	2S	0,2586	0,0492
10	0,3308	0,3385	0,3347	3S	0,2527	0,0614
17,5			0,581	4S	0,2429	0,0583
				5S	0,2561	0,0575
				Média	0,2528	0,0583
				Err. Pad.	0,002	0,002
				1 GLUT	0,2421	0,028
				2 GLUT	0,2588	0,0367
				3 GLUT	0,2516	0,0597
				4 GLUT	0,2581	0,0576
				5 GLUT	0,2504	0,0323
				MÉDIA	0,2522	0,0429
				ERRO PAD.	0,003	0,006
				1 PRE	0,2509	0,0841
				2 PRE	0,2504	0,0502
				3 PRE	0,2481	0,0532
				4 PRE	0,2530	0,0446
				5 PRE	0,2506	0,0671
				MÉDIA	0,2506	0,0598
				ERRO PAD.	0,001	0,006
				1 IR	0,2574	0,0371
				2 IR	0,2466	0,0758
				3 IR	0,2496	0,0419
				4 IR	0,257	0,0747
				5 IR	0,2521	0,0564
				MÉDIA	0,2525	0,0572
				ERRO PAD.	0,002	0,007
				1 PRE/GLU	0,2522	0,0500
				2 PRE/GLU	0,2526	0,0751
				3 PRE/GLU	0,2548	0,0531
				4 PRE/GLU	0,2584	0,0360
				5 PRE/GLU	0,2524	0,0626
				MÉDIA	0,2541	0,0554
				ERRO PAD.	0,001	0,006

SUPEROXIDO DISMUTASE - 1 DIA								
			Taxa amostra			volume da amostra (U/mL)		
GRUPOS	A1	A2	(A1-A2)/3	% INIBIÇÃO	Atividade SOD	1000/25	Ptns totais	U/mg proteínas
1S	0,0621	0,0746	0,0042	86,98	5,16	206,43	2,81	73,35
2S	0,0651	0,0829	0,0059	81,46	4,57	182,72	2,93	62,28
3S	0,0581	0,0734	0,0051	84,06	4,85	193,91	4,60	42,14
4S	0,0485	0,0635	0,0050	84,38	4,88	195,25	2,69	72,46
5S	0,0636	0,0787	0,0050	84,27	4,87	194,80	2,87	67,78
Média	0,0595	0,0746	0,0050	84,23	4,87	194,62	3,18	63,60
Err. Pad.	0,0027	0,0029	0,0003	0,78	0,08	3,36	0,32	5,11
1 GLUT	0,0447	0,0534	0,0049	84,63	4,91	196,59	2,367	83,07
2 GLUT	0,0509	0,069	0,0060	81,15	4,53	181,38	2,834	64,00
3 GLUT	0,0394	0,0449	0,0018	94,27	5,94	237,75	2,982	79,73
4 GLUT	0,0487	0,0687	0,0067	79,17	4,32	172,88	2,850	60,66
5 GLUT	0,0478	0,0642	0,0055	82,92	4,72	188,99	2,600	72,68
MÉDIA	0,0463	0,0612	0,0050	84,44	4,89	195,52	2,73	72,03
ERRO PAD.	0,0018	0,0040	0,0008	2,35	0,25	10,08	0,10	3,88
1 PRE	0,0596	0,0756	0,0053	83,33	4,77	190,78	3,09	61,66
2 PRE	0,0636	0,0924	0,0096	70,00	3,34	133,51	2,11	63,26
3 PRE	0,1177	0,1467	0,0097	69,79	3,32	132,61	2,25	58,93
4 PRE	0,0452	0,0610	0,0053	83,54	4,79	191,67	2,48	77,21
5 PRE	0,0616	0,0840	0,0075	76,67	4,05	162,14	2,60	62,31
MÉDIA	0,070	0,092	0,007	76,67	4,05	162,14	2,51	64,67
ERRO PAD.	0,011	0,013	0,001	2,71	0,29	11,63	0,15	2,88
1 IR	0,1387	0,159	0,0068	78,85	4,29	171,54	2,47	69,55
2 IR	0,0507	0,0763	0,0085	73,33	3,70	147,82	2,64	56,03
3 IR	0,0461	0,0707	0,0082	74,38	3,81	152,30	2,01	75,75
4 IR	0,0415	0,0677	0,0087	72,71	3,63	145,14	2,08	69,83
5 IR	0,0947	0,1276	0,0110	65,73	2,88	115,16	2,55	45,12
MÉDIA	0,0743	0,1003	0,0086	73,00	3,66	146,39	2,35	63,25
ERRO PAD.	0,017	0,016	0,0006	1,89	0,20	8,11	0,11	4,98
1 PRE/GLUT	0,0516	0,0643	0,0042	86,77	5,14	205,54	2,57	79,96
2 PRE/GLUT	0,0492	0,0642	0,0050	84,38	4,88	195,25	2,34	83,35
3 PRE/GLUT	0,0826	0,0974	0,0049	84,58	4,90	196,14	2,33	84,31
4 PRE/GLUT	0,0394	0,0575	0,0060	81,15	4,53	181,38	2,10	86,27
5 PRE/GLUT	0,0504	0,0642	0,0046	85,63	5,02	200,62	2,46	81,67
MÉDIA	0,055	0,070	0,005	84,50	4,89	195,79	2,36	83,11
ERRO PAD.	0,007	0,006	0,0003	0,84	0,09	3,61	0,07	0,97

SUPEROXIDO DISMUTASE - 7 DIA								
			Taxa amostra			volume da amostra (U/mL)		
GRUPOS	A1	A2	(A1-A2)/3	% INIBIÇÃO	Atividade SOD	1000/25	Ptns totais	U/mg proteínas
1S	0,0287	0,0447	0,0053	83,33	4,77	190,78	3,68	51,89
2S	0,0192	0,0283	0,0030	90,52	5,54	221,65	2,46	89,95
3S	0,0222	0,0334	0,0037	88,33	5,31	212,25	2,95	72,07
4S	0,0282	0,0405	0,0041	87,19	5,18	207,33	3,25	63,83
5S	0,0239	0,0365	0,0042	86,88	5,15	205,99	3,07	67,09
Média	0,0244	0,0367	0,0041	87,25	5,19	207,60	3,08	68,97
Err. Pad.	0,0016	0,0025	0,0003	1,05	0,11	4,49	0,18	5,56
1 GLUT	0,0347	0,0573	0,0075	76,46	4,03	161,25	4,036	39,95
2 GLUT	0,0917	0,1309	0,0131	59,17	2,17	86,98	3,281	26,51
3 GLUT	0,0409	0,0701	0,0097	69,58	3,29	131,72	2,913	45,23
4 GLUT	0,1094	0,129	0,0065	79,58	4,37	174,67	3,240	53,91
5 GLUT	0,0632	0,0941	0,0103	67,81	3,10	124,11	3,659	33,92
MÉDIA	0,0680	0,0963	0,0094	70,52	3,39	135,75	3,43	39,90
ERRO PAD.	0,0129	0,0134	0,0010	3,19	0,34	13,70	0,17	4,19
1 PRE	0,0366	0,0566	0,0067	79,17	4,32	172,88	2,75	62,93
2 PRE	0,046	0,0682	0,0074	76,88	4,08	163,04	5,16	31,60
3 PRE	0,0322	0,0532	0,0070	78,13	4,21	168,41	3,03	55,58
4 PRE	0,0433	0,0609	0,0059	81,67	4,59	183,62	3,91	46,91
5 PRE	0,0413	0,0624	0,0070	78,02	4,20	167,96	3,95	42,49
MÉDIA	0,040	0,060	0,007	78,77	4,28	171,18	3,76	47,90
ERRO PAD.	0,002	0,002	0,000	0,72	0,08	3,11	0,38	4,82
1 IR	0,0244	0,0421	0,0059	81,56	4,58	183,17	2,65	69,23
2 IR	0,0549	0,0896	0,0116	63,85	2,68	107,11	2,65	40,42
3 IR	0,0388	0,064	0,0084	73,75	3,74	149,61	3,44	43,52
4 IR	0,0332	0,0575	0,0081	74,69	3,84	153,64	4,48	34,32
5 IR	0,0396	0,0658	0,0087	72,71	3,63	145,14	2,65	54,81
MÉDIA	0,0382	0,0638	0,0085	73,31	3,69	147,74	3,17	48,46
ERRO PAD.	0,004	0,007	0,0008	2,53	0,27	10,86	0,32	5,52
1 PRE/GLUT	0,0408	0,062	0,0071	77,92	4,19	167,51	2,12	78,85
2 PRE/GLUT	0,0381	0,0574	0,0064	79,90	4,40	176,01	1,99	88,40
3 PRE/GLUT	0,0315	0,0668	0,0118	63,23	2,61	104,43	1,40	74,59
4 PRE/GLUT	0,0424	0,0562	0,0046	85,63	5,02	200,62	4,24	47,29
5 PRE/GLUT	0,0394	0,0590	0,0065	79,58	4,37	174,67	2,06	84,88
MÉDIA	0,038	0,060	0,007	77,25	4,12	164,65	2,36	74,80
ERRO PAD.	0,002	0,002	0,0011	3,34	0,36	14,36	0,44	6,51

PROTEÍNAS CARBONILADAS 1 DIA										
GRUPOS	Ptns totais	Ptns totais no teste	Abs Control	Abs Amostra	Delta	mol ptns carbonyl	μmol ptns	nmol ptns carbonyl	Em 350μL	nmol ptns carbonyl/mg de ptns
1S	6,49	2,271	0,0667	0,1375	0,0708	0,0000032182	3,2182	3218,182	1,126	0,496
2S	7,26	2,540	0,1884	0,4296	0,2412	0,0000109636	10,9636	10963,636	3,837	1,511
3S	7,10	2,486	0,2153	0,6158	0,4005	0,0000182045	18,2045	18204,545	6,372	2,563
4S	6,33	2,217	0,1222	0,2697	0,1475	0,0000067045	6,7045	6704,545	2,347	1,059
5S	6,87	2,405	0,1276	0,2836	0,156	0,0000070909	7,0909	7090,909	2,482	1,032
MÉDIA	6,81	2,38	0,14	0,347	0,203	0,00000924	9,24	9236,36	3,23	1,332
ERRO PAD.	0,16	0,06	0,02	0,073	0,050	0,00000229	2,29	2285,99	0,80	0,311
1 GLUT	6,64	2,324	0,1154	0,7434	0,628	0,0000285455	28,5455	28545,455	9,991	4,298
2 GLUT	6,80	2,378	0,3960	0,6888	0,2928	0,0000133091	13,3091	13309,091	4,658	1,959
3 GLUT	6,64	2,324	0,0242	0,6998	0,6756	0,0000307091	30,7091	30709,091	10,748	4,624
4 GLUT	6,49	2,271	0,0956	0,6581	0,5625	0,0000255682	25,5682	25568,182	8,949	3,941
5 GLUT	6,72	2,351	0,2557	0,7161	0,4604	0,0000209273	20,9273	20927,273	7,325	3,115
MÉDIA	6,66	2,33	0,18	0,701	0,524	0,00002381	23,81	23811,82	8,33	3,587
ERRO PAD.	0,05	0,02	0,06	0,013	0,061	0,00000277	2,77	2769,06	0,97	0,428
1 PRE	5,10	1,785	0,0106	0,4889	0,4783	0,0000217409	21,7409	21740,909	7,609	4,262
2 PRE	5,87	2,055	0,1388	0,3756	0,2368	0,0000107636	10,7636	10763,636	3,767	1,833
3 PRE	6,33	2,217	0,4414	0,5930	0,1516	0,0000068909	6,8909	6890,909	2,412	1,088
4 PRE	6,33	2,217	0,0557	0,3265	0,2708	0,0000123091	12,3091	12309,091	4,308	1,944
5 PRE	5,49	1,920	0,0747	0,4323	0,3575	0,0000162523	16,2523	16252,273	5,688	2,962
MÉDIA	5,83	2,04	0,14	0,443	0,299	0,00001359	13,59	13591,36	4,76	2,418
ERRO PAD.	0,22	0,08	0,07	0,041	0,050	0,00000226	2,26	2263,02	0,79	0,491
1 IR	6,64	2,324	0,0795	0,3483	0,2688	0,0000122182	12,2182	12218,182	4,276	1,840
2 IR	6,18	2,163	0,0437	0,3589	0,3152	0,0000143273	14,3273	14327,273	5,015	2,319
3 IR	6,80	2,378	0,0759	0,2792	0,2033	0,0000092409	9,2409	9240,909	3,234	1,360
4 IR	8,18	2,863	0,0651	0,3288	0,2637	0,0000119864	11,9864	11986,364	4,195	1,465
5 IR	6,41	2,244	0,0616	0,3536	0,292	0,0000132727	13,2727	13272,727	4,645	2,071
MÉDIA	6,84	2,39	0,07	0,334	0,269	0,00001221	12,21	12209,09	4,27	1,811
ERRO PAD.	0,31	0,11	0,01	0,013	0,017	0,00000076	0,76	760,99	0,27	0,161
1 PRE/GLUT	6,33	2,217	0,1588	0,2970	0,1382	0,0000062818	6,2818	6281,818	2,199	0,992
2 PRE/GLUT	6,64	2,324	0,1594	0,4375	0,2781	0,0000126409	12,6409	12640,909	4,424	1,903
3 PRE/GLUT	5,72	2,001	0,0508	0,2333	0,1825	0,0000082955	8,2955	8295,455	2,903	1,451
4 PRE/GLUT	7,26	2,540	0,1839	0,3944	0,2105	0,0000095682	9,5682	9568,182	3,349	1,318
5 PRE/GLUT	6,49	2,271	0,2091	0,3673	0,1582	0,0000071886	7,1886	7188,636	2,516	1,108
MÉDIA	6,49	2,27	0,15	0,346	0,193	0,00000880	8,80	8795,00	3,08	1,355
ERRO PAD.	0,22	0,08	0,02	0,032	0,022	0,00000099	0,99	990,65	0,35	0,142

PROTEINAS CARBONILADAS 7 DIA										
GRUPOS	Ptns totais [mg/mL]	totais no teste (350µL)	Abs Contro le	Abs Amost ra	Delta	mol ptns carbon/L	µmol ptns carb/L	nmol ptns carb/L	Em 350µL (0,35mL)	nmol ptns carb/mg de ptns
1S	5,98	2,092	0,1809	0,2383	0,0574	0,0000026091	2,6091	2609,091	0,913	0,437
2S	7,15	2,503	0,0793	0,1563	0,077	0,0000035000	3,5000	3500,000	1,225	0,490
3S	5,85	2,046	0,1047	0,1875	0,0828	0,0000037636	3,7636	3763,636	1,317	0,644
4S	5,32	1,864	0,1180	0,2467	0,1287	0,0000058500	5,8500	5850,000	2,048	1,099
5S	6,56	2,297	0,1301	0,1973	0,0672	0,0000030545	3,0545	3054,545	1,069	0,465
MEDIA	6,17	2,16	0,12	0,205	0,083	0,00000376	3,76	3755,45	1,31	0,627
ERRO PAI	0,28	0,10	0,02	0,015	0,011	0,00000050	0,50	500,31	0,18	0,110
1 GLUT	5,19	1,818	0,0881	0,1846	0,0965	0,0000043864	4,3864	4386,364	1,535	0,844
2 GLUT	5,72	2,001	0,1503	0,2499	0,0996	0,0000045273	4,5273	4527,273	1,585	0,792
3 GLUT	5,72	2,001	0,1340	0,2490	0,115	0,0000052273	5,2273	5227,273	1,830	0,915
4 GLUT	5,06	1,772	0,1205	0,2645	0,144	0,0000065455	6,5455	6545,455	2,291	1,293
5 GLUT	5,46	1,909	0,1192	0,2173	0,09805	0,0000044568	4,4568	4456,818	1,560	0,817
MEDIA	5,43	1,90	0,12	0,233	0,111	0,00000503	5,03	5028,64	1,76	0,932
ERRO PAI	0,12	0,04	0,01	0,013	0,008	0,00000037	0,37	365,02	0,13	0,083
1 PRE	5,46	1,909	0,1857	0,3538	0,1681	0,0000076409	7,6409	7640,909	2,674	1,401
2 PRE	4,93	1,727	0,1976	0,3571	0,1595	0,0000072500	7,2500	7250,000	2,538	1,470
3 PRE	4,41	1,544	0,0938	0,2765	0,1827	0,0000083045	8,3045	8304,545	2,907	1,882
4 PRE	4,67	1,635	0,1506	0,3645	0,2139	0,0000097227	9,7227	9722,727	3,403	2,081
5 PRE	5,19	1,818	0,1917	0,3555	0,1638	0,0000074455	7,4455	7445,455	2,606	1,433
MEDIA	4,93	1,73	0,16	0,341	0,178	0,00000807	8,07	8072,73	2,83	1,653
ERRO PAI	0,16	0,06	0,02	0,015	0,009	0,00000040	0,40	401,65	0,14	0,123
1 IR	5,32	1,864	0,0938	0,2252	0,1314	0,0000059727	5,9727	5972,727	2,090	1,122
2 IR	4,93	1,727	0,1010	0,2374	0,1364	0,0000062000	6,2000	6200,000	2,170	1,257
3 IR	4,80	1,681	0,0608	0,1759	0,1151	0,0000052318	5,2318	5231,818	1,831	1,089
4 IR	4,28	1,499	0,0366	0,1516	0,115	0,0000052273	5,2273	5227,273	1,830	1,221
5 IR	5,13	1,795	0,0974	0,2313	0,1339	0,0000060864	6,0864	6086,364	2,130	1,187
MEDIA	4,89	1,71	0,08	0,204	0,126	0,00000574	5,74	5743,64	2,01	1,175
ERRO PAI	0,16	0,06	0,01	0,015	0,004	0,00000019	0,19	190,45	0,07	0,028
1 PRE/GLU	4,80	1,681	0,0743	0,2920	0,2177	0,0000098955	9,8955	9895,455	3,463	2,060
2 PRE/GLU	4,93	1,727	0,1083	0,3295	0,2212	0,0000100545	10,0545	10054,545	3,519	2,038
3 PRE/GLU	5,19	1,818	0,0741	0,2866	0,2125	0,0000096591	9,6591	9659,091	3,381	1,860
4 PRE/GLU	4,80	1,681	0,0865	0,3027	0,2162	0,0000098273	9,8273	9827,273	3,440	2,046
5 PRE/GLU	4,87	1,704	0,0913	0,3108	0,21945	0,0000099750	9,9750	9975,000	3,491	2,049
MEDIA	4,92	1,72	0,09	0,304	0,217	0,00000988	9,88	9882,27	3,46	2,011
ERRO PAI	0,06	0,02	0,01	0,007	0,001	0,00000006	0,06	60,43	0,02	0,034

CASPASE-3 VALTER 7º DIA				CASPASE-3 VALTER 1º DIA			
Amostras	Leitura caspase-3	Tubulina	Razão	Amostras	Leitura caspase-3	Tubulina	Razão
1S	73161	35631	2,05	1S	80301	35671	2,25
2S	13659	22933	0,60	2S	52577	22961	2,29
3S	18907	18573	1,02	3S	53591	18696	2,87
4S	29758	28449	1,05	4S	40321	28527	1,41
5S	30690	27360	1,12	5S	22833	27482	0,83
Média	33235	26589	1,17	Média	49924	26667	1,93
Err. Pad.	9383	2557	0,21	Err. Pad.	8413	2549	0,32
1 GLUT	43560	22913	1,90	1 GLUT	39308	18450	2,13
2 GLUT	43975	19236	2,29	2 GLUT	81895	28370	2,89
3 GLUT	47548	32742	1,45	3 GLUT	19592	27237	0,72
4 GLUT	72583	35838	2,03	4 GLUT	49589	25230	1,97
5 GLUT	83276	34445	2,42	5 GLUT	42869	25836	1,66
MÉDIA	58189	29035	2,02	MÉDIA	46651	25025	1,87
ERRO PAD.	7391	2985	0,15	ERRO PAD.	9058	1549	0,31
1 PRE	37058	25456	1,46	1 PRE	42807	12514	3,42
2 PRE	54978	31254	1,76	2 PRE	86683	22913	3,78
3 PRE	78605	34903	2,25	3 PRE	21509	19236	1,12
4 PRE	41695	37576	1,11	4 PRE	35174	32742	1,07
5 PRE	76327	31292	2,44	5 PRE	42159	35838	1,18
MÉDIA	57733	32096	1,80	MÉDIA	45666	24648	2,11
ERRO PAD.	7678	1826	0,22	ERRO PAD.	9791	3848	0,55
1 IR	31962	20373	1,57	1 IR	68492	18573	3,69
2 IR	34604	21051	1,64	2 IR	68470	28449	2,41
3 IR	62683	30496	2,06	3 IR	41859	27360	1,53
4 IR	29829	30065	0,99	4 IR	44023	25244	1,74
5 IR	30000	18428	1,63	5 IR	46276	25892	1,79
MÉDIA	37816	24083	1,58	MÉDIA	53824	25103	2,23
ERRO PAD.	5614	2296	0,15	ERRO PAD.	5388	1544	0,35
1 PRE/ GLUT	49151	20805	2,36	1 PRE/ GLUT	81022	23130	3,50
2 PRE/ GLUT	82253	21073	3,90	2 PRE/ GLUT	47793	19323	2,47
3 PRE/ GLUT	43897	32929	1,33	3 PRE/ GLUT	29248	32904	0,89
4 PRE/ GLUT	46808	29492	1,59	4 PRE/ GLUT	28186	36028	0,78
5 PRE/ GLUT	82654	23930	3,45	5 PRE/ GLUT	63258	34620	1,83
MÉDIA	60953	25646	2,53	MÉDIA	49901	29201	1,89
ERRO PAD.	7886	2146	0,45	ERRO PAD.	9054	2994	0,45

RESULTADO ESTUDO GLUTAMINA ASSOCIADO A PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUEMICO NA ISQUEMIA REPERFUSÃO RENAL

DOSAGEM DE UREIA E CREATININA (18/08/2014) DIA 1 (24 HORAS APÓS CIRURGIA)

RATO	URÉIA	CREATININA
1	47,9	0,39 MG/DL
2	49,2	0,32 MG/DL
3	51,1	0,46 MG/DL
4	49,6	0,40 MG/DL
5	45,4	0,56 MG/DL

GRUPO SHAM - DIA 1

DIA 7

RATO	URÉIA	CREATININA
1	64,7	0,35
2	46,7	0,38
3	51,3	0,48
4	49,5	0,42
5	45,9	0,43

GRUPO I/R (ISQUEMIA /REPERFUSÃO)**DIA 1**

RATO	URÉIA	CREATININA
1	87,6	0,75
2	201,5	2,00
3	153,1	1,42
4	230,3	2,00
5	154,3	1,52

DIA 7

RATO	URÉIA	CREATININA
1	69	0,82
2	77	0,80
3	100,1	1,05
4	53,1	0,63
5	77,4	0,98

GRUPO GLUTAMINA DIA 1 (24 HORAS APÓS I/R)

RATO	URÉIA	CREATININA
1	200,8	1,93
2	110,6	0,91
3	137,9	1,18
4	178,5	1,61
5	321,1	4,59

DIA 7

RATO	URÉIA	CREATININA
1	170,4	1,20
2	125,6	0,94
3	269,4	2,04
4	205,2	1,61
5	122,7	0,97

GRUPO PRE-CONDICIONAMENTO ISQUEMICO
DIA 1

RATO	URÉIA	CREATININA
1	142,5	1,45
2	149,9	1,51
3	105,4	0,88
4	161,2	1,61
5	222,1	2,50

DIA 7

RATO	URÉIA	CREATININA
1	53,1	0,53
2	52,1	0,48
3	62,1	0,66
4	51,9	0,45
5	40,3	0,47

GRUPO PRE-CONDICIONAMENTO ISQUEMICO + GLUTAMINA**(PCI + GLN)****DIA 1**

RATO	URÉIA	CREATININA
1	131,5	0,92
2	109,2	1,04
3	143,8	0,99
4	142,7	1,19
5	82	0,71

DIA 7

RATO	URÉIA	CREATININA
1	49,5	0,50
2	61,5	0,62
3	55,3	0,56
4	45,8	0,50
5	48,1	0,40

ANEXO B- Aprovação do projeto pelo comitê de ética de animais.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo Nº 23108.021777/12-2, sobre "Efeitos do pré-condicionamento isquêmico e suplementação de glutamina na lesão de isquemia e reperfusão renal", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. CERVANTES CAPOROSSI/VALTER TOREZAN GOUVÊA JÚNIOR**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de laboratório (SBCAL), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UFMT em reunião ordinária de **21/06/2012**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº 23108.021777/12-2, entitled "Effects of ischemic preconditioning and glutamine supplementation in ischemia reperfusion injury renal", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian Society of Science in Animals of Laboratory (SBCAL). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in the Animal Use (Federal University of Mato Grosso – UFMT) on **Jun 21, 2012**.

Cuiabá-MT, 22 de junho de 2012.

Prof. Dr. Roberto Vilela Veloso
Presidente

Profª Drª Nair Honda Kawashita
Vice-Presidente

Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT
Cidade Universitária – Av. Fernando Correa da Costa, 2.367
Bairro Boa Esperança – CEP 78060-900 – CUIABÁ-MT, Brasil.

Telefone: (65) 3615 8829
Fax.: (65) 3615 8254
E-mail: cepa@ufmt.br

ANEXO C – Metodologias das dosagens.

METODOLOGIA DAS DOSAGENS

1- Avaliação da peroxidação lipídica no rim.

A avaliação da peroxidação lipídica no tecido renal foi realizada conforme descrito por Percário et al (1994). Uma alíquota de 200 mg de cada tecido, após lavagem com salina 0,9%, foi homogeneizado com 800 μ L de KCl (1,15%). Após centrifugação (4000rpm/10min a 4 °C), a 0,5 mL do sobrenadante deste homogenato foi adicionado 1 mL da solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) em tampão fosfato (pH 2,5). Em seguida, as amostras foram colocadas em banho-maria, a temperatura de 94°C, por 1 hora. Após resfriamento em água corrente foi adicionado 2 mL de álcool n-butílico, as quais foram agitadas e centrifugadas a 3000rpm, por 10 minutos e a absorbância da fase orgânica determinada a 535 nm. A concentração de malonaldeído (MDA) das amostras foi determinada pela extrapolação da reta da curva de calibração traçada com 1,1,3,3 – tetraetoxipropano, e os resultados expressos em mmol de MDA/g de tecido.

2.2 Determinação dos grupamentos sulfidrilas totais (GSH - Glutathione reduzida).

A determinação dos grupos SH foi realizada pelo método de Sedlak e Lindsay (1968), baseado na reação do Reagente de Ellman [5,5 – ditiobis -2-nitro- benzóico (DTNB)] com o tiol livre da amostra, originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. O produto da reação formado é determinado através da leitura da absorbância a 412 nm em espectrofotômetro. Fragmentos de 200 mg dos tecidos foram retirados, lavados com salina 0,9% e homogeneizados com 2,0 mL de EDTA 0.02 M gelado. A alíquota de 1,0 mL do homogeneizado, foi adicionado 800 μ L de água deionizada e 200 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 50% e, em seguida, centrifugada a 3000 rpm durante 15 minutos. Em um volume de 1,0 mL do sobrenadante, foi adicionado 2,0 mL de tampão Tris (0,4M – pH 8,9) e 50 μ L de DTNB em PBS (Tampão fosfato-salino) (pH=8.0) nos tubos sob agitação. Após 5 minutos foi realizada a leitura das absorbâncias a 412 nm. Um branco foi feito substituindo o volume do homogenato por

igual volume de água deionizada. A concentração de GSH celular foi determinada pela extrapolação da reta obtida da curva de calibração traçada. Os resultados obtidos foram expressos em mmol de GSH/g de tecido.

2.3 Determinação da concentração de proteínas totais.

As dosagens de proteínas totais nas amostras dos homogenatos dos tecidos utilizados nas avaliações da capacidade antioxidante total, das enzimas do sistema antioxidante e no western blot foram realizada pelo método descrito por Bradford et al (1976). Esse método se baseia na formação de um complexo entre o corante azul G e as proteínas na solução, onde a absorção é proporcional à quantidade de proteínas presentes na amostra. A concentração de proteína foi determinada utilizando a curva padra de albumina bovina (BSA) nas concentrações (25 -400 mg/mL). Foi realizada a leitura em 545 nm no leitor de microplacas.

2.4 Capacidade antioxidante total.

A capacidade antioxidante total (CAT) foi determinada conforme descrito por Miller e colaboradores (1993), utilizando-se o kit comercial TAS® NX2332, da Randox. Aliquotas de 150 mg do rim foram homogeneizados (durante 30 segundos) em 750 µL de tampão contendo 1,15% KCl e 100 mM de PMSF. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000 RPM durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e transferido para eppendorffs e utilizado para determinação da CAT. Uma alíquota de 20 µL de amostra/padrão/branco foram adicionados a 1mL de cromógeno (6,1 µM metmioglobina, 610 µM ABTS - ácido 2,2'-azido dietil-benzotiazolina sulfônico. Os tubos foram homogeneizados e 3 minuto depois foi realizado a leitura da absorbância inicial (A_1), a 37°C, em um comprimento de onda de 600 nm. Após adição de 200 µL do reagente 3 (250 µmol/L peróxido de hidrogênio), foram efetuadas novas leituras no tempo 3 minutos (A_2), sob as mesmas condições da leitura A_1 . Os resultados obtidos foram expressos em nmol/mg de proteína.

2.5 Preparo do homogenato para determinação das atividades das enzimas do sistema antioxidante.

Alíquotas de 200 mg dos tecidos foram homogeneizadas (durante 1 minuto) em 2 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 mol/L; pH 7,0) gelado. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e transferido para eppendorfs e armazenados em -80°C para posterior determinações das atividades máximas das enzimas superóxido dismutase, glutatona peroxidase e glutatona redutase.

2.5.1 Determinação da atividade superóxido dismutase (SOD).

A atividade da SOD foi determinada conforme descrito por Woolliams et al. (1983), utilizando-se o kit comercial Ransod® SD125, da Randox. Em uma alíquota de 50 µL da amostra diluída (1:2 v/v)/ padrões (0,19; 0,58; 1,16; 2,31 e 4,62 U/L) ou diluente de amostra, foram adicionados 1,7 mL de substrato (0,05 mM de xantina e 0,025 mM de INT – (2,4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-cloreto de feniltetrazólio). Após mistura vigorosa adicionou-se a todos os tubos 250 µL xantina oxidase (80 U/L). Após 30 segundos de incubação a 37°C realizou-se uma leitura da absorbância (A1), no comprimento de onda 505 nm, e nova leitura (A2) após 3,5 minutos da leitura A1. Assim foi determinado o ΔA minuto, dos padrões e amostras. Os resultados obtidos foram expressos em U/mg de proteína.

2.5.2 Determinação da atividade da-glutatona redutase (GR).

A atividade da GR foi determinada conforme descrito por Carlberg et al. (1975), utilizando-se o Kit comercial GR 2368®, da Randox. Em uma alíquota de 5 µL da amostra/padrão/branco foram adicionados 125 µL do reagente 1 (GSSH 6,5 mM, EDTA 0,05 M em tampão fosfato de potássio 50mM pH 7,0). Os tubos foram homogeneizados e logo em seguida adicionados o NADPH. Após nova homogeneização, foram realizadas leituras em 340 nm a 37°C, em espectrofotômetro, nos tempos 1, 2, 3, 4 e 5 min. Os resultados obtidos foram expressos em U/mg de proteína.

2.5.3 Determinação da atividade da glutatona peroxidase (GPx).

A atividade da GPx foi determinada conforme descrito por Paglia & Valentine (1967), utilizando-se o Kit comercial Ransel® RS505, da Randox. Em uma alíquota de 5 µL da amostra/padrão/branco foram adicionados 250µL do reagente 1 (GSH 4 mM, GR 0,5 U/ e NADPH 0,34 mM em tampão fosfato 0,5M / EDTA 4,3 mM) e 10 µL de cumeno. Os tubos foram homogeneizados e 1 minuto depois foi realizado a leitura da absorbância inicial (A_1), a 37°C, em comprimento de onda de 340 nm. Novas leituras foram efetuadas nos tempos de 2 e 3 minutos, obtendo-se A_2 e A_3 , sob as mesmas condições da leitura A_1 . Os resultados obtidos foram expressos em U/mg de proteína.

2.6. Determinação do conteúdo de caspase-3 por Western Blotting.

O tecido foi homogeneizado em tampão 50mM de Tris-HCl (pH 7,4) contendo 150mM de NaCl; 1mM de EDTA; 1% de Triton X-100; 0,1% de SDS; 5µg/mL de aprotinina; 1mM de PMSF; 10mM de ortovanadato de sódio; 100mM de NaF; 10mM de pirofosfato de sódio. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante separado. Para eletroforese foi utilizado gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) de acordo com o método descrito por Laemmli. Amostras contendo 100µL do extrato total de proteínas foram fervidas por 5 minutos a 95°C com tampão da amostra concentrado 4x (0,250 mM de tampão Tris-HCl pH 6,8; 0,5% de azul de bromofenol, 50% de glicerol, 10% de SDS e 500 mM DTT (4:1, v/v). Após esse procedimento 60 µg de proteínas foram aplicadas em sistema de mini-gel (modelo mini protean III cell – Bio Rad®) de acrilamida-bisacrilamida (40:1) com 1,5 mm de espessura, gel de separação 12%, e de empilhamento de 4%. Após a corrida eletroforética das proteínas foi realizada a transferência para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF). Após esse processo as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 10% em solução basal para evitar a ligação não específica de proteínas e incubas em overnight com o anticorpo primário específico para a proteína em estudo. Após esse processo, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário por duas horas. Finalmente a membrana foi exposta ao reagente de quimiluminescência e revelada em filme radiográfico. Como proteína constitutiva foi utilizada α -tubulina. A análise densitométrica foi realizada utilizando o programa Scion Image e os resultados expressos em % dos controles.

REFERÊNCIAS UTILIZADAS NO ANEXO C

PERCARIO, S.; VITAL, A.C.C.; JABLONKA, F. Dosagem do Malondialdeído (MDA). **NewsLab**, v.2, n.6, p.46-50, 1994.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v.25, n.1, p.192-205 1968.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.7, n.72, p.248-54, 1976.

MILLER NJ, RICE-EVANS C, DAVIES MJ, GOPINATHAN V, MILNER A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science** 84 (4), 407-12, 1993.

WOOLLIAMS JA, WIENER G, ANDERSON PH, MCMURRAY CH. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. **Research in Veterinary Science** 34 (3), 253-56, 1983.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **The Journal of Biological Chemistry**, v.250, n.14, p. 5475-80, 1975.

PAGLIA DE, VALENTINE WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, 70 (1), 158-69, 1967.