Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Área de Biociências Aplicada à Clínica Médica

Incorporação protéica de L[1-¹³C]-leucina em ratos desnutridos: Efeito da suplementação oral de glutamina

Andrea Ferreira Schwartz Tannus
Andrea Ferreira Schwartz Tannus
Andrea Ferreira Schwartz Tannus

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Área de Biociências Aplicada à Clínica Médica

INCORPORAÇÃO PROTÉICA DE L[1-¹³C]-LEUCINA EM RATOS DESNUTRIDOS:
EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO ORAL DE GLUTAMINA

Andrea Ferreira Schuwartz Tannus

Orientador: Prof. Dr. Júlio Sérgio Marchini

Tese apresentada ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção de título de doutor em Biociências Aplicadas à Clínica Médica.

Ribeirão Preto :: 2004

Ficha Catalográfica

Ficha Catalográfica

Ficha Catalográfica

Tannus, Andrea Ferreira Schuwartz

Incorporação protéica de L-[1-¹³C]-leucina em ratos desnutridos: efeito da suplementação oral de glutamina. Ribeirão Preto, 2004.XXXp.:il.;XXXXcm

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP-
Área de concentração: Clínica Médica.

Orientador: Marchini, Júlio Sérgio.

1. Glutamina. 2. Desnutrição. 3. Isótopos Estáveis.

Dedicatória

Dedicatória

Dedicatória

Ao meu orientador, Professor Doutor Júlio Sérgio Marchini, agradecimento especial pelo apoio incondicional, exemplo de profissionalismo, por toda sua dedicação, paciência, incentivo constante na pesquisa e sobretudo, acreditar em mim!

Agradecimentos

Agradecimentos

Agradecimentos

À Deus, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais e irmãos por todo o carinho, incentivo e compreensão.

Ao Prof. Dr. Dominique Darmaun por abrir as portas do Centre de Recherche Humaine em Nantes/França, pela sua hospitalidade, colaboração e incentivo a pesquisa.

Eng. Pascale Maugère, Dr. Olivier Le Baquer, Dr. Maud Chetiveaux, Dr. Blanca Ripolles pela atenção, carinho e muita paciência para me ensinarem novos métodos de pesquisa e principalmente a língua francesa.

Ao amigo e técnico do Laboratório de Espectrometria de Massa, Gilberto João Padovan, pelo carinho e colaboração.

Aos amigos e técnicos do Biotério do Departamento de Clínica Médica, Adalberto, Maurício e Roni, pelo apoio técnico, auxílio na manutenção e cuidado com os animais e principalmente com o humor em nosso dia-dia.

Aos amigos do Anexo A e funcionários do departamento de Clínica Médica, Adriana, Cici, Eloisa, Sandra, Aurea, Ednéia, Mirian, Regina e Alex sempre disposto a ajudar.

Aos Profs. Eduardo Ferriolli e Júlio Moriguti pela colaboração e alegre convivência.

Aos maravilhosos companheiros, Maria do Rosário, Márcia Morandi, Mônica Silva, Márcia Zanutto, Carolina Bosch, Cláudia Rocco, Paula Chiarelli, Alceu Jordão.

Aos queridos amigos Guilherme Portari, Luciana Rodrigues e Karina Pfrimer.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa de estudo e apoio financeiro para a realização deste projeto de pesquisa.

SUMÁRIO	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
PERSPECTIVA	vi
1. Introdução	1
2. Justificativa	7
3. Objetivos	7
4. Materiais e métodos	8
4.1. Delineamento experimental	8
4.2. Metodologia de análise do nitrogênio urinário	11
4.3. Método de determinação de aminoácido plasmático	12
4.4. GC-MS - Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrometro de Massa	13
4.4.1. Metodologia para análise em GCMS de ¹³ C leucina e ¹³ C KIC	14
4.5. GC-C-IRMS (cromatografia gasosa em combustão acoplado a razão isotópica em espectrometria de massa)	17
4.5.1. Metodologia para análise de GC-C-IRMS	18
5. Resultados	20
6. Discussão	31
7. Referências bibliográficas	38
8. Anexos	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais funções dos aminoácidos no organismo	1
Tabela 2. Abundância natural de alguns isótopos estáveis	2
Tabela 3. Postulados de modelo de estudo do metabolismo com isótopo estável, tomando por exemplo a infusão de L-[1- ¹³ C]-leucina	3
Tabela 4. Composição química da dieta Nuvilab CR1 [®]	8
Tabela 5. Evolução de peso corporal (g) dos ratos nos grupos estudados	21
Tabela 6. Evolução de nitrogênio urinário dos grupos estudos (mg/24h)	22
Tabela 7. Concentração plasmática de aminoácidos essenciais após infusão de L[1- ¹³ C]-leucina no minuto 240, mmol/L	23
Tabela 8. Concentração plasmática de aminoácidos não essenciais após infusão de L[1- ¹³ C]- leucina no minuto 240, mmol/L	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Transaminação de leucina em KIC	3
Figura 2. Delineamento do estudo	10
Figura 3. Procedimentos executados no dia do estudo cinético	11
Figura 4. Representação esquemática de análise de leucina marcada a ¹³ C por GCMS	13
Figura 5. Representação de curva de calibração para ¹³ C leucina/ leucina	14
Figura 6. Representação de curva de calibração para ¹³ C KIC/ KIC	16
Figura 7. Esquema de aquisição de GC-C-IRMS	17
Figura 8. Variação da perda de peso entre os dias experimentais zero, 7 e 14 em relação ao dia zero -28 dias. Entre os dias -28 e zero, os animais do grupo receberam 50% da dieta usual	21
Figura 9. Variação da excreção de nitrogênio urinário entre os dias experimentais zero, 7 e 14 em relação ao dia zero -28 dias. Entre os dias -28 e zero, os animais do grupo receberam 50% da dieta usual	22
Figura 10. Concentração plasmática de leucina durante infusão de L[1- ¹³ C]-leucina	24
Figura 11. Concentração plasmática de glutamina durante infusão de L[1- ¹³ C]-leucina	25
Figura 12. Enriquecimento isotópico plasmático de ¹³ C leucina durante infusão de L[1- ¹³ C]-leucina	26
Figura 13. Enriquecimento isotópico plasmático de ¹³ C KIC durante infusão de L[1- ¹³ C]-leucina	26
Figura 14. Razão isotópica plasmática de ¹³ C KIC/ ¹³ C leucina durante infusão de L[1- ¹³ C]-leucina	27
Figura 15. Enriquecimento isotópico protéico na mucosa intestinal de ¹³ C leucina durante infusão de L[1- ¹³ C]-leucina	28
Figura 16. Enriquecimento isotópico protéico livre na mucosa intestinal de ¹³ C leucina durante infusão de L[1- ¹³ C]-leucina	28
Figura 17. Taxa de síntese fracionada na mucosa intestinal (FSR)	29
Figura 18. Fluxo e degradação de ¹³ C leucina na proteína da mucosa intestinal	30

Resumo

Resumo

Resumo

Não existe um consenso do efeito da suplementação de glutamina sobre a síntese protéica. No entanto, sugere-se que em animais desnutridos submetidos a trauma orgânico ou não, a glutamina além de seu papel no metabolismo energético, poderia ter efeito sobre a taxa de reciclagem protéica, tornando-se um aminoácido, *condicionalmente*, essencial.

O objetivo deste trabalho foi determinar a incorporação protéica do aminoácido marcado ¹³C leucina em proteínas do plasma e da mucosa intestinal em ratos portadores de desnutrição protéico-calórica, suplementados ou não com glutamina via oral. Os animais foram pareados pelo peso/idade e subdivididos em 5 grupos: grupo controle nutrido (grupo 1), grupo controle desnutrido (grupo 2), grupo realimentado (grupo 2 A), grupo realimentado e suplementado com proteína e glutamina (grupo 2B) e grupo realimentado e suplementado com glutamina, a suplementação de glutamina por via oral durante 14 dias (0,42g/kg/dia). O estudo não teve por objetivo avaliar a fisiopatologia da desnutrição, mas sim o efeito terapêutico da oferta de glutamina no tratamento de animais desnutridos e em analogia, ao que ocorreria com pacientes desnutridos e internados. O estudo cinético efetuou-se por meio de infusão contínua $\cong 620\text{mmol/h}$ L-[1-¹³C]-leucina durante 4 horas. O grupo de animais desnutridos (grupo 2), que recebeu 50% da alimentação recomendada, perdeu peso continuamente durante o experimento.

Os grupos que receberam tratamentos dietoterápicos recuperaram o peso corporal, independente do tipo de realimentação e/ou suplementação de glutamina. O nitrogênio urinário teve comportamento similar ao do peso, ratificando o efeito de um tratamento dietético, independente da fonte de suplementação glutâmica. Os resultados de concentração plasmática de aminoácidos não foram uniformes tanto para os aminoácidos essenciais quanto para os aminoácidos considerados não essenciais. Reforçando tanto o ganho de peso, como a excreção de nitrogênio, tiveram comportamento semelhante independente da suplementação de glutamina. Na concentração plasmática de glutamina a diferença foi 649 ± 12 vs $171 \pm 14\text{mmol/L}$, no grupo controle nutrido (grupo 1) e grupo controle desnutrido (grupo 2), respectivamente. Houve diferença significativa de enriquecimento plasmático isotópico de ¹³C leucina $1,27 \pm 0,5$ vs $3,2 \pm 1,2$, e enriquecimento de ¹³C KIC $1,93 \pm 0,6$ vs $4,04 \pm 0,9$ MPE%, respectivamente nos grupos 1 e 2. O enriquecimento isotópico de ¹³C leucina na proteína da mucosa intestinal, mostrou-se significativo entre os grupos 1 e 2, respectivamente, $0,0024 \pm 0,0006$ vs $0,0020 \pm 0,0001$ MPE% e o enriquecimento isotópico de ¹³C leucina livre apresentou-se semelhante com diferença entre os grupos 1 e 2, respectivamente $0,0019 \pm 0,00030$ vs $0,0028 \pm 0,0007$ MPE%. A taxa de síntese fracionada (FSR) foi menor no grupo controle desnutrido (grupo 2) $0,0037 \pm 0,0007/\text{h}$ em comparação ao grupo controle nutrido (grupo 1) $0,0044 \pm 0,0005/\text{h}$ e similar nos grupos experimentais. Conclui-se que a oferta de glutamina não estimulou ou alterou a incorporação protéica de aminoácido marcado, sendo que os resultados obtidos nos grupos suplementados com glutamina assemelharam-se aos encontrados no grupo de animais tratados com dieta.

Desta maneira, sugere-se que o uso de suplemento de glutamina via oral não seja necessário no tratamento de animais desnutridos.

Abstrac

Abstrac

Abstrac

Nutritional status recovery is thought more effective when there are amino acids, especially, glutamine supplementation. The aim of the study was to verify the effect of glutamine on duodenal mucosa protein synthesis in the nourished or malnourished rats. The experimental groups animals received oral diet glutamine supplementation (0.42g/kg/day) for 14 days while the control group did not. Thereafter, kinetic study with L-[1-¹³C]-leucine to 4-h and biopsies of duodenal mucosa were done. The malnourished groups showed 25% weight loss with increase urinary nitrogen. Amino acid concentration in the plasma of control group was not significantly different with from that of the experimental groups. The result showed that ¹³C enrichment in the plasma and biopsy sample of the malnourished group is higher than that of the nourished group, but that of the fractional synthetic rate (FSR) is inverse; FSR of the nourished group is higher $0.0044 \pm 0.0005/h$ than that of the malnourished group $0.0037 \pm 0.0007/h$. We conclude that oral supplementation glutamine does not acutely stimulate duodenal protein incorporation in malnourished rats, regardless the refilling protocol, with or without glutamine.

Perspectiva

Perspectiva

Perspectiva

No final dos anos 80, observou-se que havia uma correlação positiva entre o conteúdo de glutamina intracelular e a velocidade de síntese protéica em músculo isolados de rato (MacLENNAN et al., 1987). Estes resultados foram confirmados *in vivo* em ratos sadios e com infecção (JEPSON et al., 1988). A partir destes resultados, inúmeros autores procuraram mostrar o possível efeito do potencial anabólico da glutamina e possíveis aplicações clínicas de suplementação de glutamina em humanos como terapia nutricional.

Sabe-se que a glutamina é um aminoácido não essencial, e potencialmente semi-essencial em estados de agressão, sendo a glutamina caracterizada como uma fonte de reserva protéica muscular de nitrogênio (AHLMAN et al., 1993). Estudos demonstraram, que, a administração de glutamina melhora o balanço nitrogenado em certos estados de catabolismo (STEHLER et al., 1989; ZIEGLER et al., 1992). Posteriormente, observou-se que a glutamina age como estimulante de síntese protéica e reduz a proteólise em crianças miopatas (HANKARD et al., 1998). Sugere-se, inclusive, que a glutamina diminui a atrofia da mucosa intestinal, induzida por diferentes agressões e patologias em modelos animais (WINDMUELLER & SPAETH, 1978) e melhora a função de absorção intestinal (TREMEL et al., 1994). Porém estes efeitos anabólicos, aparentemente, utilizando metodologia mais adequada, não têm sido ratificados em humanos e cães (MARCHINI et al., 1999, DARMAUN et al., 2004).

Introdução

1 - Introdução

Introdução

O corpo humano abrange perto de 9 kg de proteína, principalmente na forma de proteína muscular. Ao inverso dos triglicerídeos (fornecedores de energia) as proteínas têm função plástica e metabólica, atuando como enzimas, anticorpos, hormônios e neurotransmissores. Assim sendo, a massa protéica do organismo não pode ser encarada como uma reserva calórica em analogia ao tecido adiposo. Os aminoácidos podem, certamente, ser catabolizados, originando energia, mas têm funções fisiológicas específicas (tabela 1), portanto, quando este fato ocorre, há prejuízo da homeostase geral do organismo.

Tabela 1. Principais funções dos aminoácidos no organismo

Funções	Aminoácidos
1. Constituintes de proteínas de estrutura de, transporte e de enzimas	todos
2. Fonte de nitrogênio para a síntese de bases púricas e pirimídicas (ácidos nucleicos)	Gln, Asp, Gli
3. Precursores de hormônio peptídeos, catecolaminas e neuromediadores (serotonina, histamina, ácido α - gama-aminobutírico, etc.)	Phe, Tyr, His, Try, Glu
4. Fonte de energia (leucina no músculo, glutamina nos tecidos de renovação rápida; células linfóides, intestinais, tumorais, etc.)	Leu, Gln
5. Precursores de glicose e/ou corpos cetônicos	Ala, Gln, Ile, Leu
6. Precursor de vaso dilatadores	Arg
7. Reguladores metabólicos	Gln, Leu

(GUTHRIE & PICCIANO, 1985)

Em geral, o estudo do metabolismo intermediário, em particular protéico e/ou aminoacídico, realiza-se por meio do balanço nitrogenado, dos valores plasmáticos de produtos nitrogenados, e por meio de marcadores específicos, como os aminoácidos marcados com isótopo estável do carbono.

A elaboração do método não invasivo, utilizando os elementos traços - isótopos estáveis, através da tecnologia de mensuração por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GCMS), permite ultrapassar os dados obtidos até então pelas técnicas clássicas (balanço nitrogenado e concentração de aminoácidos). A utilização de marcadores específicos permite explorar aspectos cinéticos do metabolismo dos aminoácidos (MENAND et al., 1997), o que antes seria impossível

de se obter por meio do balanço nitrogenado ou valores plasmáticos de produtos nitrogenados.

Os isótopos estáveis, em oposição aos radioativos, são naturais, existem livremente na natureza e, portanto, não representam qualquer dano aos seres biológicos. Ainda que o número de prótons do núcleo de um elemento dado determine suas propriedades químicas, sua massa atômica depende, entre outros fatores, de seu número de nêutrons e de prótons. Cada elemento (por exemplo carbono) pode ter espécies isotópicas que compartilhem das mesmas características químicas, tem números diferentes de nêutrons e, então, suas massas atômicas diferentes. O termo isótopo estável é comumente utilizado para designar estas formas pouco abundantes de isótopos não radioativos (tabela 2).

Tabela 2. Abundância natural de alguns isótopos estáveis.

Elemento	Abundância natural (%)	Isótopo estável	Abundância natural (%)
¹ H	99,98	² H	0,02
¹² C	98,89*	¹³ C	1,11*
¹⁴ N	99,64	¹⁵ N	0,36
¹⁶ O	99,73	¹⁷ O	0,04
		¹⁸ O	0,20
²⁸ Si	92,23	²⁹ Si	4,67
		³⁰ Si	3,10

*: a porcentagem de ¹³C é dada como título indicativo, pois varia de acordo com a fonte de origem do carbono; por exemplo o ¹³C de glicídeos varia em função do vegetal onde é extraído (De BIEVRE & BARNES, 1985).

O enriquecimento isotópico em moléculas marcadas corresponde a quantidade do isótopo em questão, além dos valores encontrados na natureza. Assim, o ¹⁵N está na proporção de abundância natural a 0,36%. Quando esta molécula tiver uma porcentagem maior, por exemplo, 2,36%, diz-se que a mesma está enriquecida em 2% de ¹⁵N.

Nos estudos que utilizam isótopos estáveis para exploração do metabolismo, deve-se ressaltar que o organismo seja considerado inicialmente com um enriquecimento nulo de isótopo marcado, uma vez que a abundância natural deste isótopo está presente e precisa ser desconsiderada quando se aplica, ou enriquece um marcador específico. Para que um estudo cinético seja adequado, recomenda-se que as normas mínimas seguintes sejam consideradas, como exposta na tabela 3.

Tabela 3 . Postulados de modelo de estudo do metabolismo com isótopo estável, tomando por exemplo a infusão de L-[1- ¹³ C]-leucina

Não existe dentro do organismo diferença entre a utilização metabólica entre isótopos de um mesmo elemento.

O marcador não é reciclado, uma vez incorporado dentro da proteína, a ¹³C leucina não é mais liberada durante o período do experimento.

O enriquecimento de ¹³C leucina plasmática é representativo do enriquecimento intracelular.

A fonte de leucina é conhecida.

Se o modelo é correto, a utilização de qualquer aminoácido essencial marcado deve fornecer os mesmos resultados cinéticos do metabolismo protéico do corpo inteiro.

A leucina não tem outro destino exceto a oxidação ou incorporação dentro da proteína.

(MARCHINI et al., 1997 a)

Comumente, os melhores marcadores de metabolismo protéico, são aquelas substâncias que infundidas caracterizam precursores de proteínas e ao mesmo tempo, transformam em outras substâncias dentro da célula; estas substâncias resultantes de transformações bioquímicas recirculam e rotulam-se "pool recíproco".

A figura 1 mostra o exemplo da leucina e do ácido a-cetoisocapróico (KIC), considerado o "pool recíproco" da leucina (SCHWENK et al., 1985). O KIC é o cetoácido análogo da leucina, resultante da reação de transaminação intracelular da leucina com o alfa-cetoglutarato. Espera-se que 80% de enriquecimento de KIC sejam advindas da leucina plasmática, atribuindo esta diferença à diluição intracelular de ¹³C leucina pela leucina natural no interior das células.

Em cães, Horber et al., (1989) nos mostraram que, dentro da maior parte dos tecidos, a atividade específica do KIC plasmática reflete de maneira fidedigna, a síntese protéica (figura 1). Paralelamente, Young e cols (1987), utilizaram o mesmo princípio para determinação da síntese protéica em humanos.

A mensuração da incorporação de ¹³C leucina em tecidos é utilizada como indicador da síntese protéica do organismo como um todo. Esta utilização *in vivo* de traços isotópicos pode igualmente associar a uma utilização *in vitro* (LE BAQUER et al., 2001).

Graças a este método de incorporação isotópica de aminoácidos torna-se possível determinar a síntese protéica fracionada (FSR) de um tecido ou proteína específica, durante tempo determinado. Ela corresponde à fração de renovação de proteínas ("turn-over") em um dado tempo e é calculada a partir da variação do enriquecimento de traços no tecido durante um período dado (BOUTELoup-DEMANGE et al., 1998; RITTLER et al., 2000).

Uma das vantagens do uso de marcadores inócuos ao homem, isótopos estáveis, seria o estudo do metabolismo intermediário em humanos, principalmente os desnutridos. A desnutrição protéico-calórica (DPC) ou caquexia caracteriza-se como condição patológica resultante da oferta deficiente de proteínas e calorias (WHO/NUT, 1996). Ela pode ser primária, em decorrência da ingestão deficiente de nutrientes, e secundária, devido à baixa absorção e/ou aumento na perda/excreção e/ou aumento das necessidades (TORUN & CHEW, 1999).

A DPC é uma carência nutricional que constitui grave problema de saúde pública no mundo. Ela tem sido registrada em 30 a 40% dos pacientes hospitalizados em nações desenvolvidas, sendo ainda um grave problema médico em países subdesenvolvidos, tanto na comunidade como em pacientes hospitalizados (BISTRAN & BLACKBURN, 1976; VANNUCCHI H et al., 1998). No Brasil a prevalência de desnutrição intra-hospitalar se assemelha e oscila entre 40-60% (ADDISON et al., 1986).

Campana e cols. (1975) e Deo e cols. (1965) observaram em ratos adultos com deficiência em proteína os seguintes dados clínicos: perda de peso corporal, diminuição da ingestão de alimentos e declínio da concentração plasmática de proteínas totais e albumina. Descreve-se que na deficiência protéica ocorrem alterações não relacionadas diretamente à diminuição da massa protéica, como por exemplo, uma menor quantidade de linfócitos intra-epiteliais do intestino delgado e menor resistência a infecções, retardo na cicatrização de feridas (PEN & LEBENTHAL, 1990).

O tratamento da DPC vem sendo estudado experimentalmente dando-se ênfase a suplementações de aminoácidos (SMITH & JOHSON, 1967; SOUBA, 1997), além do tratamento dietoterápico convencional enteral e/ou parenteral (MARCHINI et al., 1997 b). Os aminoácidos ingeridos e o resultado da digestão protéica fornecem ao organismo substratos para a síntese e reposição de proteínas corpóreas e atuam como precursores de compostos não protéicos metabolicamente ativos.

Um aminoácido quando não pode ser sintetizado pelo organismo, ou quando é sintetizado em quantidades insuficientes, denomina-se essencial, uma vez que deve ser obtido de fontes exógenas. Na década de 40 inicialmente, considerava-se como aminoácidos essenciais para o homem: lisina, triptofano, histidina, fenilalanina, leucina, isoleucina, treonina, metionina e valina (ROSE, 1949; MUNRO & ALLISSON, 1969). Os demais aminoácidos: ácido aspártico, ácido glutâmico, alanina, arginina, asparagina, cisteína, glicina, glutamina, prolina, tirosina e serina, são sintetizados a partir de produtos comuns do metabolismo intermediário, razão pela qual foram classificados como não essenciais. Em algumas situações, as necessidades de um aminoácido não essencial podem ultrapassar a capacidade de síntese do organismo. Em tais circunstâncias, um aminoácido

não essencial para um indivíduo normal torna-se fisiologicamente indispensável para o organismo enfermo e nesse contexto particular, o aminoácido não essencial é denominado *condicionalmente essencial* (CHIPPONI et al., 1982; YOUNG & MARCHINI, 1990).

A carência da ingestão energética e protéica têm sido associada com menor excreção urinária de nitrogênio (CAMPANA et al., 1975). À medida em que a oferta de nitrogênio diminui, na ausência de trauma metabólico, as perdas de nitrogênio urinário também diminuem, havendo decréscimo da massa orgânica até ser atingido um novo estado de equilíbrio (CALLOWAY & SPECTOR, 1955).

Para manutenção protéica do organismo como um todo, é imprescindível que haja equilíbrio entre os processos de síntese e degradação protéica, sendo estes associados à ingestão e excreção de produtos nitrogenados. Tal mecanismo regulador torna-se relevante no processo de manutenção da integridade estrutural e funcional do organismo (McNURLAN & GARLICK, 1989). Vários fatores têm sido relacionados aos processos de síntese e degradação protéica, como por exemplo: oferta energética da dieta, insulina, hormônio de crescimento, ingestão de aminoácidos ramificados, idade e doenças (Recommended Dietary Allowances, 1989).

A velocidade da taxa de reciclagem protéica (síntese/degradação, "turnover") depende da função da proteína e do tipo de tecido ou órgão. A taxa média diária do adulto de proteína renovada ou reciclada situa-se na ordem de 3% do total protéico do organismo. Na pele perdem-se e renovam-se 5 g proteína/dia, no sangue 25 g, no trato intestinal cerca de 70 g e no tecido muscular em torno de 75 g (MUNRO & ALLISON, 1969).

No trauma sistêmico e/ou local, o intestino apesar da menor estimulação de suas funções digestivas, impostas pela suspensão da dieta oral, apresenta intensa atividade metabólica. Isso resulta em aumento do gasto energético intestinal e conseqüentemente, da demanda de substratos para suprir as necessidades nessa circunstância (WINKLER & MANCHESTER, 1996). Tendo em vista as características do intestino representadas pela rápida renovação e diferenciação celular, quaisquer modificações de absorção de nutrientes, poderão alterar as células epiteliais intestinais, as quais necessitam de grande quantidade de energia para manutenção da integridade morfo-funcional (WILLIAMS, 1997).

Sugere-se, inclusive, que as células epiteliais da mucosa do intestino delgado dependam da glutamina, da glicose e de corpos cetônicos para suprir suas necessidades energéticas. Dentre esses a glutamina parece ser a principal fonte energética para o enterócito (BULUS et al., 1989). Por outro lado, em cães eutróficos não se demonstra qualquer efeito com a suplementação de glutamina na síntese protéica em epitélio intestinal delgado (MARCHINI et al., 1999).

A glutamina GLN, $\text{NH}_2\text{-C(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH-NH}_2\text{-COOH}$ é o aminoácido mais abundante no plasma dos mamíferos e por ser sintetizada em praticamente todos os tecidos, classifica-se como não essencial (LACEY & WILMORE, 1990; WATERLOW, 1996). Como aminoácido básico e, diferentemente da maioria dos demais aminoácidos, tem dois grupos amino: alfa-amino = $\text{CH(NH}_2\text{)}$ e amida = $\text{NH}_2\text{-C(O)}$. Esta característica o faz importante no transporte de nitrogênio entre os diferentes tecidos e, no transporte de amônia da periferia para os órgãos viscerais (DARMAUN & HUMBERT, 2000). Além de participar da estrutura de proteínas e peptídeos, apresenta-se como precursor da gliconeogênese, da amoniogênese renal e de neurotransmissores como o ácido gama-aminobutírico, e ainda via glutamato, fornece nitrogênio para a síntese de purinas, pirimidinas, nucleotídeos e glucosaminas (FÜRT & STEHLE, 1995).

Sua concentração plasmática é de 0,5 a 0,9 mmol/L e no músculo contribui com aproximadamente 60% do conteúdo total de aminoácidos, o equivalente a mais de 15g de nitrogênio no adulto (MEISTER, 1980). O peso molecular da glutamina é 146 e contém 19,2% de nitrogênio, ou seja, 1g de glutamina fornece 0,13g de nitrogênio glutamínico (MEISTER, 1980).

Os tecidos que removem a glutamina da circulação usam seu esqueleto de carbono para produção de energia. A glutamina sob ação da enzima glutaminase origina glutamato que este por reação de transaminação fornece a-cetoglutarato que entra no ciclo de Krebs originando 30 moles de ATP para cada mol de glutamina, portanto, esse aminoácido com 5 átomos de carbono fornece 83% de energia em relação a glicose que com 6 átomos de carbono em sua molécula gera 36 moles de ATP/mol oxidado (MIANAMI et al., 1992; SOUBA et al., 1990).

A síntese da glutamina acontece predominantemente no tecido muscular esquelético e no cérebro pela ação da glutamina sintetase, enquanto a degradação opera-se principalmente no intestino delgado, no fígado, nos linfócitos e no rim (CALDER, 1995). A glutamina é captada por diversos sistemas de transporte na membrana celular. O sistema A depende de sódio e necessita de ATP, enquanto o sistema L independe desse íon. Esses sistemas encontram-se presentes na membrana celular de todas as células, inclusive na bordadura em escova das células da mucosa intestinal e na membrana baso-lateral dos enterócitos jejunais do rato (McNURALN & GARLICK, 1989). Além da afinidade dos sistemas de transportes ser grande pela glutamina, eles são estimulados pela ingestão oral desse aminoácido (PEN & LEBENTHAL, 1990).

A concentração plasmática de glutamina diminui após o trauma, indicando maior captação desse aminoácido por outros órgãos (CLAEYSSSENS et al., 2000). Estudos realizados nas últimas três décadas demonstram ser o intestino delgado o local de maior metabolismo da glutamina na maioria dos animais estudados, inclusive no homem (HALL et al., 1996). Em estado catabólico o organismo encontra-se sob uma agressão, seja ela: séptica, pós-queimaduras, traumática, grandes cirurgias, doenças inflamatórias intestinais e desnutrição, todas estas situações se caracterizam por um hipermetabolismo protéico, em particular, uma proteólise muscular acelerada mediada pelos hormônios, ditos de estresse (glucocorticoides) e que se traduzem por uma excreção nitrogenada elevada (ASKANAZI et al., 1980).

A necessidade protéica apresenta-se diferente, segundo a origem do estresse. Pode-se, entretanto, definir o estado catabólico graças a três critérios principais, assim descritos: 1) hipercatabolismo protéico (aceleração de proteólise e/ou diminuição da síntese protéica; 2) secreção de hormônios de estresse; 3) redução importante do "pool" de aminoácido muscular e principalmente de glutamina. Conclui-se que, a glutamina é um aminoácido condicionalmente essencial no curso dos estados de estresse e da restauração de seu "pool", tornando-se um elemento majoritário para a recuperação da homeostase.

Portanto, considerando os múltiplos efeitos que a glutamina exerce sobre o organismo, existe a possibilidade de que a glutamina possa ter também efeito anabólico protéico sobre a musculatura estriada, ou mesmo sobre a proteína da mucosa intestinal de animais desnutridos ou mesmo pacientes hospitalizados (KLIMBERG et al., 1990; DÉCHELOTTE et al., 1991).

*Justificativa***2 - Justificativa***Justificativa*

Considerando que a glutamina:

- 1) corresponde a cerca de 7% do total de aminoácidos protéicos orgânicos;
- 2) contribui com 30% dos aminoácidos liberados pelo músculo no estado pós-absortivo ou em situações catabólicas;
- 3) é precursora de ácidos nucleicos, nucleotídeos e proteínas;
- 4) participa da detoxicação nitrogenada;
- 5) constitui fonte energética para o enterócito e demais células de replicação rápida;
- 6) a maior parte da glutamina liberada pelo músculo é proveniente de síntese endógena.

Sugere-se que, a suplementação de glutamina em pacientes críticos pode ser benéfica quando usada em terapia nutricional. No entanto, a glutamina não é rotineiramente usada em terapia nutricional e apresenta baixas concentrações ou até mesmo ausente nas fórmulas nutritivas. Assim, no presente trabalho deverá ser estudado o efeito da incorporação de ¹³C leucina em proteínas do plasma e na mucosa intestinal, após suplementação oral de glutamina em ratos desnutridos.

*Objetivos***3 - Objetivos***Objetivos***Geral**

O presente trabalho tem por objetivo verificar o efeito da suplementação de glutamina por meio de incorporação de marcador biológico ¹³C leucina na proteína do plasma e na mucosa intestinal, em ratos nutridos e desnutridos.

Específico

- a) Acompanhar a evolução do peso dos animais estudados
- b) Determinar valores de nitrogênio urinário
- c) Quantificar as concentrações plasmáticas de aminoácidos
- d) Mensurar a incorporação de ¹³C leucina na proteína do plasma e na mucosa intestinal.

*Materiais e Métodos***4 - Materiais e Métodos****Materiais e Métodos**

No presente trabalho foram estudados ratos da raça Wistar, oriundos do Biotério Central da USP- Ribeirão Preto e mantido no Biotério de Clínica Médica (FMRP-USP). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais. A temperatura variando $24^{\circ}\text{C} \pm 2$ e luminosidade da sala foi controlada com ciclo luz/escuro de 12h/12h. Os animais previamente desnutridos foram tratados com diferentes doses de glutamina por via oral para a verificação do efeito sobre diferentes aspectos do metabolismo protéico. Não se pretendeu estudar o processo de desnutrição e sim, o processo da renutrição e suplementação, conseqüentemente, a recuperação do estado nutricional. Para a suplementação via oral utilizou-se o produto glutamina em pó (Ajinomoto Co., INC. Tokyo®), dieta de biotério Nuvilab CR1® (tabela 4), anestésico 2,2,2-Tribromoetano 1,99% (Aldrich Chemical Company, INC®), bomba de microinfusão (Harvard Apparatus®, INC) e isótopo estável L-[1-¹³C]-leucina 99% (Cambridge Isotope Laboratories®, Andover, MA).

Tabela 4 . Composição química da dieta Nuvilab CR1®

Vitaminas	Vit.A 12.000 UI; D3 1.8000 UI; E 30 mg; B1 5 mg; B2 6 mg; B6 7 mg; B12 20mg; Niacina 60 mg; ác. pantotênico 20 mg; ác. fólico 1 mg; biotina 0,05 mg; colina 600 mg
Microelementos	Fe 50 mg; Zn 60 mg ; Cu 10 mg; I 2 mg ; Mn 60 mg; Se 0,05 mg; Cb 1,5 mg
Aminoácidos	DL- metionina 300 mg; lisina 100 mg
Valor Calórico	3,71 kcal/g
Valor Protéico	19,9 g/%

4.1. Delineamento Experimental

Para o experimento foram utilizados 5 grupos de animais, no total de 35 ratos da raça Wistar em fase adulto (6 meses) e peso aproximado de 400g. Para melhor conhecimento e manuseio dos animais foi realizado um estudo piloto, onde foram verificados as possibilidades de realização do projeto de pesquisa. A partir deste piloto obteve-se dados importantes como, a ingestão diária de ração $\cong 30\text{g}/\text{dia}$, coleta de urina 24h em gaiolas metabólicas, conhecimento cirúrgico de canulação e estudo cinético. Os ratos dos grupos experimentais foram previamente desnutridos por 28 dias, neste período os ratos foram alimentados com metade da ração usualmente ingerida e água à vontade. O início do experimento foi considerado o dia em que se iniciou a realimentação e/ou suplementação de glutamina, sendo chamado de dia zero. A realimentação e/ou suplementação teve a duração total de 14 dias. O delineamento experimental está representado na figura 2.

Grupo 1 controle nutrido (n=7): eutróficos (idade/peso e aspectos clínicos) evoluídos durante 14 dias com 30 g/dia (75 kcal/dia) de dieta padrão usual e oferta *ad libitum* de água, colhida amostra de urina 24 hs a cada 7 dias. Ao final dos 14 dias, os ratos foram submetidos a estudo cinético descrito a seguir.

Estudo cinético

Os animais, após jejum de 24hs, foram pesados e anestesiados usando anestésico numa relação 100g/kg-1mL, em seguida canulação (2hs antes da infusão), na artéria carótida e veia jugular, que foram utilizadas respectivamente, para coleta de sangue e infusão L-[1-¹³C]-leucina. A dose de saturação do isótopo foi $\cong 480\text{mmol L-[1-}^{13}\text{C]-leucina}$ e infusão constante de 620 mmol/h L-[1-¹³C]-leucina durante 4hs ($0,67\text{mmol.ml}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Foram coletadas amostras de sangue com volume 1 mL nos minutos 0, 180, 210, 240 min. do período de infusão, colocados em ependorff com anticoagulante (EDTA), identificados, centrifugados (coleta do plasma) e armazenado em congelador a -70°C. Ao final da infusão, os animais foram anestesiados e retiradas amostras de $\cong 50$ mg da mucosa intestinal, a partir do ângulo de Treitz 15 cm, lavados em salina, pesados e guardados em congelador a -70°C. (figura 3).

Para atingir uma desnutrição protéico-calórica severa, 28 animais foram submetidos a uma restrição de oferta de proteína e caloria, para isso, foram oferecidos 50% da dieta do grupo (grupo 1), ou seja, 15g/dia (35 kcal/dia) de dieta padrão usual com oferta *ad libitum* de água, durante 28 dias. Estes animais previamente desnutridos foram subdivididos em 4 grupos a seguir descritos.

Grupo 2 controle desnutrido (n=7): os animais continuaram recebendo 50% de dieta usual (15 g/dia) por mais 14 dias e colhida amostra de urina 24 hs a cada 7 dias e, ao final do período, submetidos a estudo cinético do experimento.

Grupo 2A (n=7): os animais foram realimentados com 100% da dieta padrão usual de 30 g/dia por mais 14 dias e coleta de amostra de urina 24 hs a cada 7 dias em seguida submetidos a estudo cinético.

Grupo 2B (n=7): os animais foram alimentados com 100% de calorias da dieta padrão usual e adicionados de 2g de proteína (obtidas da dieta usual) e suplementados com 1 g de glutamina em pó, por mais 14 dias e coleta de amostra de urina 24 hs a cada 7 dias, em seguida submetidos a estudo cinético.

Grupo 2C (n=7): os animais foram alimentados com 100% de calorias da dieta padrão usual e suplementados com 1 g de glutamina em pó por mais 14 dias e coleta de amostra de urina 24 hs a cada 7 dias, em seguida submetidos a estudo cinético.

Figura 2. Delineamento experimental

Figura 3: Procedimentos executados no dia do estudo cinético, no 14º dia de experimento, semelhantes para todos os grupos estudados.

4.2. Método de análise do nitrogênio urinário

O método de Kjeldahl foi utilizado para determinar o nitrogênio em amostras urinárias. Tal método consiste, transformar o nitrogênio da amostra em amônia (NH₄) em meio ácido, o qual é posteriormente separado por destilação e finalmente dosado pela titulação. Neste método determina-se o nitrogênio total contido na amostra, incluindo o nitrogênio protéico propriamente dito e outros compostos nitrogenados não protéicos, tais como: aminas, amidas, aminoácidos e outros (AOAC,1980).

Técnica de Kjeldahl

- 1) pesar ou medir quantidade adequada de amostra, que deve constar aproximadamente 1 mg de nitrogênio, exemplo: urina 100mL;
- 2) transferir para um tubo de digestão de 50 ml e adicionar 2 mL de ácido sulfúrico concentrado e 3 gotas de solução 5% de dióxido de selênio;
- 3) aquecer brandamente no início e aumentar gradativamente até completar a digestão;

Onde R é a cadeia carbônica da amostra e D aquecimento

4) transferir a solução para o destilador, juntamente com a água de lavagem e adicionar corante fenolftaleína 1% e NaOH 50% em excesso, ou seja:

5) recolher o produto em 5 mL de ácido bórico a 4% e 3 gotas de Mazuazaga (verde bromocresol e vermelho de metila) como indicador de mudança de cor.

6) titular com ácido sulfúrico 0,1 N até mudança de cor,

7) cálculo

$$\text{g\% nitrogênio} = \frac{(\text{vol. encontrado da titulação} - \text{vol. branco}) \times \text{F.C.}}{\text{vol. da amostra utilizada}}$$

F.C: Fator de Cálculo (concentração de nitrogênio do sulfato de amônia em relação a concentração do ácido sulfúrico 0,01N): 0,1574.

4.3. Método de determinação de aminoácido plasmático

O método de cromatografia líquida de alta especificidade (HPLC) é um teste quantitativo e qualitativo para análise dos aminoácidos plasmáticos.

As análises dos aminoácidos foram efetuadas no HPLC Shimadzu®, modelo LC 10AD, constando de 2 bombas que fizeram o gradiente de diluição das fases móveis A e B. A fase A foi uma solução de fosfato de sódio 25 mmol/L com pH 6,9 contendo 20 mL ME OH (metanol), 20 mL ACN (acetonitrila), 20 mL THF (tetrahydrofurano). A fase B metanol à 65%. Uma unidade comandada pelo programa de computador operava a mistura proporcional das 2 fases.

O fluxo utilizado durante a análise foi 0,8 mL/minuto, a temperatura ambiente entre 23-25°C. A coluna utilizada na separação dos aminoácidos foi Adsorbosphere OPA-HS de 150 mm comprimento por 4,6 mm diâmetro interno e partícula 5mm (Alltech Associates®, Inc, USA).

A amostra passou por um processo de derivatização pós-coluna onde o reagente OPA (ortophthal aldeído) foi carregado por bomba até a coluna sílica com 18 carbonos, separados de acordo com o peso molecular e polaridade através do detector de fluorescência Shimadzu modelo RF535 em 335 nm de excitação e 455 nm de emissão.

Após esse processo de detecção foram registrados diferentes picos e, cada pico representa um determinado aminoácido que já fora previamente identificado pelo respectivo tempo de eluição, utilizando-se para isto uma solução padrão de aminoácido de concentração 25 nanomoles/5ml (Amino acid Standard®, Pierce Chemical Company, USA). A concentração de cada aminoácido na coluna é de 17,86 picomoles. O tempo total de cada análise plasmática é de 55 minutos. A determinação da concentração dos aminoácidos é feita em relação à área de cada pico, comparando-os com picos dos padrões.

4.4. GCMS - Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massa

O GCMS é uma combinação de duas técnicas microanalíticas que são a cromatografia gasosa (GC) e a espectrometria de massa (MS). Essa permite mensurar os enriquecimentos isotópicos dentro de pequenas quantidades de substrato orgânicos específicos presentes dentro de misturas complexas como o plasma.

Os aminoácidos são derivatizados quimicamente para se tornarem mais voláteis. Eles são em seguida injetados no GC de longa coluna capilar. Cada aminoácido dentro de sua condição precisa de temperatura, tipo de coluna, modelo de derivação e eluído a um tempo de retenção apropriado. O derivado específico de aminoácido é em seguida transferido para o MS, onde submete-se a um bombardeio eletrônico que, por consequência, libera fragmentos de íons (MARCHINI et al, 1997a). Estes fragmentos passam por um filtro programado para deixar que os fragmentos de razão massa/íon (m/z) selecionados fossem registrados.

O tipo de fragmentação é específico para cada substância, resultando em um espectro de massa particular. Para medida do enriquecimento plasmático de ¹³C leucina, utiliza-se o derivativo (HFBA- heptafluoroacetylbutylester). A leucina natural produz um íon característico de $m/z = 313$ e a ¹³C leucina um íon correspondente de $m/z = 314$. A razão 314/313 é diretamente proporcional à relação ¹³C leu/ ¹²C leu na amostra (BIER, 1997), figura 4.

Figura 4. Representação esquemática de análise de leucina marcada a ¹³C por GCMS. O composto derivado apresenta-se em forma de HFBA (heptafluoroacetylbutylester).

4.4.1. Metodologia para análise em GCMS de ¹³C leucina e ¹³C KIC

O equipamento utilizado para mensuração dos enriquecimentos isotópicos foi GCMS-QP 5000, Shimadzu®, GC-17 A equipado com coluna capilar (25m x 0,32mm) com injetor eletrônico.

a) Características do método utilizado no GCMS:

- aquisição em SIM (selector ion mass), onde seleciona os íons de procura, no caso da leucina íons ¹²C: 313 e ¹³C: 314
- volume de injeção: 2μL
- temperaturas: inicial 80° C, rampa 10° C/ min-170° C, 40° C/min-250° C
- tempo de retenção: 5,5 minutos

Antes de preparar as amostras plasmáticas para serem analisadas é preciso calibrar e verificar o método aplicado no GCMS sendo assim, passa-se várias vezes por uma curva de calibração de diferentes concentrações para verificar a sensibilidade do aparelho, observando temperatura, tempo de retenção dos íons e integração de área analisada.

b) Curva de Calibração (figura 5).

Concentração ¹³ C/ ¹² C	Leucina Natural 10mM	L-[1- ¹³ C]-leucina 10mM
0	100μL	0
0,25	100μL	25μL
0,5	100μL	50μL
0,75	100μL	75μL
1,0	100μL	100μL

Figura 5. Representação de curva de calibração para ¹³C leucina/ ¹²C leucina natural.

c) Derivatização HFBA (heptafluoroacetylbutylester)

- Utilizar 50 µL de cada ponto da curva
- Evaporar em nitrogênio gasoso (N₂) à 60°C
- Acrescentar: n-propanol 500mL + acetil cloreto 100mL (5:1-v/v)
- Incubar 110° C/ 30min, evaporar N₂ à 60°C
- Acrescentar 50 µL de HFBA
- Incubar a 60° C/ 30 minutos
- Evaporar N₂ à 60°C
- Acrescentar 300 µL de acetato de etila

Após derivatização dos pontos da curva de calibração, estão prontos para serem analisadas pelo GCMS.

d) Preparo de amostras plasmáticas

• Separação e hidrólise: 100 mL de plasma, acrescentar 40 µL de solução padrão de norleucina (150mg/mL) + 300 µL de SSA 10% (ácido sulfassalicílico) + 1 mL de TCA 12% (ácido tricloroacético), deixar decantar e centrifugar a 4°C/10min/4000rpm, recuperar o sobrenadante + 2 mL de ácido acético

• Extração da leucina e KIC: passar as amostras hidrolizadas em resina catiônica Dowex 50WX8 (3 cm de coluna) previamente lavada com 5 mL de H₂O deionizada. Para recolher o KIC lava-se a coluna com 2 mL de HCL (0,01M), recolhendo o volume em tubos de vidro próprios para derivatização. Após recolhida o KIC, lava-se esta coluna novamente com HCL (0,01M) + 20 mL H₂O deionizada. Recolher a leucina, utilizando 3 mL de NH₄OH (3 M) + 1 mL H₂O e evaporar em N₂ à 60°C

- Derivatização da amostra de leucina utiliza-se HFBA, acima descrita.

e) Derivatização do KIC e curva de calibração

- Acrescentar 90 µL de NaOH (10N) + 200 µL de hidroxilamina (0,36 M)
- Pôr em banho-maria 60°C/30 min, após colocar no gelo durante 2 mim
- Acrescentar 256 µL HCl (6N) + 500µL de solução saturada de sulfato de amônia
- Extrair: acrescentando 2 mL de etil acetato, centrifugar 4°C/20 min/4000 rpm, desprezar o sobrenadante e evaporar N₂ à 50°C
- Acrescentar 50 µL de HFBA
- Deixar a temperatura ambiente durante 24 hs, recolher a amostra em 400 µL de etil acetato.

f) Características do método utilizado no GCMS para KIC

- Aquisição em SIM (selector íon mass), onde seleciona-se os íons de procura, no caso do KIC ¹²C :316 e ¹³C:317
- Volume de injeção: 2µL
- Temperaturas: inicial 80° C, rampa 10° C/ min -170°C, 40° C/min-250° C
- Tempo de retenção: 8, 5 minutos.

g) Curva de calibração do KIC

Concentração ¹³ C KIC/KIC	KIC 10 mM	¹³ C KIC 10 mM
0	100 µL	0
0,1	100 µL	10 µL
0,25	100 µL	25µL
0,5	100 µL	50µL
0,75	100 µL	75µL

- Utiliza-se 50 µL de cada ponto da curva para a derivatização (figura 6).

Figura 6. Representação de curva de calibração para ¹³C KIC/ KIC.

h) Enriquecimento isotópico de ¹³C leucina e ¹³C KIC

Para medir o enriquecimento isotópico de ¹³C leucina e ¹³C KIC, foi utilizado o cálculo a seguir:

$$\text{MPE\%} = (R_1 - R_0) / ((1 + R_1) \times (1 + R_0)) \times 100$$

Onde:

MPE% (massa por cento em excesso)

R_0 = razão isotópica ¹³C/¹²C leucina e ¹³C/¹²C KIC no ponto zero das curvas de calibração

R_1 = razão isotópica ¹³C/¹²C leucina e ¹³C/¹²C KIC encontrados no plasma.

i) Fluxo plasmático de leucina

Para medir o fluxo plasmático de leucina, utiliza-se o enriquecimento isotópico do precursor KIC, na seguinte fórmula:

$$\text{Flux} = i [(E_i / \text{MPE}_{\text{KIC}}) - 1]$$

Onde:

i = quantidade infundida total de ¹³C leucina em mmol.kg⁻¹.h⁻¹

E_i = enriquecimento isotópico natural de ¹³C leucina, ou seja, 0,999

MPE_{KIC} = enriquecimento de ¹³C/¹²C KIC plasmático.

4.5. GC-C-IRMS (cromatografia gasosa em combustão acoplado a razão isotópica em espectrometria de massa)

Principais etapas de análise isotópica por GC-C-IRMS:

- separação cromatográfica de constituintes da mistura a analisar
- conversão dos compostos voláteis diluídos em gás elementar CO₂ e H₂O
- captura de H₂O
- introdução de CO₂ na fonte de ionização
- separação dos íons em função das diferentes massas de isótopo de CO₂
- a mensuração da razão isotópica ¹³C/¹²C é efetuada em comparação a uma referência internacional PDB (Pee Dee Belemnite- belemnitella americana) e a um referente secundário o CO₂.

A figura 7 ilustra as etapas do GC-C-IRMS, utilizadas para analisar a amostra da mucosa intestinal, onde os enriquecimentos isotópicos são menores que 0,1 MPE% .

- As amostras são injetadas no GC : separação dos compostos em função da temperatura de ebulição e de suas afinidades com a fase estacionária
- Os compostos separados por GC são queimados e transformados em gases elementares (CO₂ e H₂O)
- Eliminação de moléculas de água formadas durante a combustão
- Introdução de CO₂ de referência no sistema de válvula que deixa passar, sejam moléculas de CO₂ do composto ou de CO₂ de referência em função do método
- Ionização de moléculas de CO₂ por colisão com um feixe de elétrons (chapa magnética que permite os elétrons de ter uma trajetória helicoidal e aumento das probabilidades de colisão)
- Os íons formados são expulsados para um analisador de massa composto de um seletor magnético.

Figura 7. Esquema de aquisição de GC-C-IRMS

4.5.1. Metodologia para análise de GC-C-IRMS

O equipamento utilizado para mensuração dos enriquecimentos isotópicos inferiores a 0,01MPE% foi GC-C-IRMS, série 5890 Hewlett-Packard® and Delta S IRMS equipado com coluna capilar (25m x 0,32mm) com injetor eletrônico acoplado.

a) Características do método utilizado no GC-C IRMS:

- volume de injeção: 1µL
- temperaturas: inicial 80° C, rampa 5° C/ min-160 ° C , 40° C/min -250° C
- coluna apolar: OV (30 m X 0,25µm X0,25µm).

b) Curva de Calibração ¹³C leucina com baixo enriquecimento:

L-[1- ¹³ C]-leucina enriquecida % 10 mM
0%
0,5%
0,25%
0,167%
0,081%
0,041%
1%

Evaporar sob N₂ à 60° C

c) Derivatização (NAP)

- n-propanol 500mL + acetil clorido 100mL (5:1-v/v)
- incubar 110° C/30min, evaporar N₂ à 60°C
- Acetona: 250 mL + Trietilamine: 100mL + Anidrido acético: 50mL
- incubar 70° C/5min
- evaporar sob N₂ a temperatura ambiente
- recolher com 150 mL acetato de etila.

d) Preparo de amostras teciduais para análise em GC-C-IRMS

- descongelar a biopsia e manter em gelo, ≅ 25 mg de amostras teciduais, + 2 mL de TCA 12%, triturar as amostras em Ultraturrax®, deixar repousar 5 mim em gelo, centrifugar a 4°C/20 min/400 rpm, separar o sobrenadante (amostra de leucina livre) e congelar à -70°C, acrescentar no pelite 1 mL de éter para desengordurar (delipidação)

- hidrólise de proteínas: secar o pelite desengordurado em N₂, recolher com 2 mL de HCL (6N) e incubar a 110°C/24h. Evaporar em N₂

- extração de ¹³C leucina protéica e livre: acrescentar 2 mL de ácido acético (1M), passar a amostras por resina catiônica Dowex 50WX8 previamente lavada com 5 mL de H₂O, lavar as amostras com + 20 mL de H₂O, recolher a leucina com NH₄OH (3M) + 1 mL H₂O e, evaporar em N₂ à 60°C e utilizar a derivatização (NAP), acima descrita.

e) Enriquecimento isotópico protéico e leucina livre na mucosa intestinal

Para medir o enriquecimento isotópico protéico de ¹³C leucina foram utilizados os cálculos a seguir:

1. correção da amostra pelo padrão internacional PDB

$$C\%_0 = (R_1 - R_{PDB}) / (R_{PDB}) \times 1000$$

Onde:

R_{PDB} = padrão internacional valor 0,0112372

R_1 = razão isotópica ¹³C/¹²C leucina encontrado no tecido.

2. transformando em ¹³C átomo por cento (atom%)

Atom% =

$$100 \times R_{PDB} \times (0,001 \times C\%_0 + 1) / 1 + R_{PDB} \times (0,001 \times C\%_0 + 1)$$

3. convertendo atom% em APE (átomo por cento em excesso)

$$APE = \text{atom\% amostra} - \text{atom\% natural}$$

Onde:

atom% natural = enriquecimento isotópico natural de ¹³C leucina, ou seja, 0,999.

4. transformando APE em MPE%

$$MPE\% = APE / 11$$

Onde:

11 significa isótopo 13 do carbono (PONT et al., 1997).

f) Taxa de síntese fracionada (FSR)

Para medir o FSR, fazemos a suposição de que o organismo é estudado em equilíbrio, e que a incorporação de traços aumenta linearmente ao longo do tempo, então o "plateau" isotópico é conhecido dentro do "pool" precursor. O seguinte cálculo foi utilizado:

$$FSR = [MPE_{ptn} / (MPE_{livre} \times DT)]$$

Onde:

MPE_{ptn} = enriquecimento de ¹³C/¹²C leucina na proteína

MPE_{livre} = enriquecimento de ¹³C/¹²C leucina intracelular

ΔT = tempo de exposição do traço, ou seja, 240 minutos (MARCHINI et al., 1999).

g) Fluxo de leucina incorporada a mucosa intestinal

Para medir o fluxo de leucina, utiliza-se o enriquecimento isotópico intracelular na mucosa intestinal, na seguinte fórmula:

$$\text{Flux} = i [(E_i / MPE_{intra}) - 1]$$

Onde:

i = quantidade infundida total de ¹³C leucina (12 mmol.kg⁻¹.h⁻¹)

E_i = enriquecimento isotópico natural de ¹³C leucina, ou seja, 0,999

MPE_{intra} = enriquecimento de ¹³C/¹²C intracelular da mucosa intestinal.

h) Degradação protéica na mucosa intestinal

A degradação foi calculada utilizando uma variação da fórmula

$$F = I + D,$$

$$D = F - I$$

Onde:

D= degradação protéica na mucosa intestinal

F= fluxo de leucina incorporada (fórmula acima descrita)

I= ingestão de leucina (a quantidade de ¹³C leucina infundida substitui a ingestão pois, os animais estavam em jejum durante o estudo cinético) ou seja, 12 mmol.kg⁻¹.h⁻¹.

Análise Estatística

Nos resultados obtidos de cada grupo em particular foi considerado independente, e utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Esta análise buscou detectar a diferença entre cada grupo experimental.

A comparação múltipla entre os grupos num mesmo dia de experimento foi feita utilizando o teste de Dunn (GUIMARÃES & CABRAL, 1998).

Resultados

5 - Resultados

Resultados

Aspectos gerais dos animais

Conforme descrito na metodologia, todo experimento foi realizado em condições consideradas adequadas quanto à temperatura, luz e umidade ambiente. O seguimento dos animais do grupo controle mostrou que eles mantiveram peso constante, sem alterações visíveis quanto ao crescimento anormal de pêlo, cor de pele, massas tumorais e edema. Estes animais também tiveram comportamento considerado adequado (DE OLIVEIRA & ALMEIDA, 1985), quanto ao comportamento dentro das gaiolas de experimentação. Em oposição, os animais desnutridos tinham comportamento agressivo, sendo que a manipulação dos mesmos requereu cuidados especiais, como o uso de luvas apropriadas. Estes animais também tiveram concomitantemente perda de peso, queda de pêlos, erupções cutâneas e oculares, palidez cutânea e de mucosa. Nenhum dos animais no exame clínico apresentou hipertemia.

No dia do experimento em si, os animais após jejum de 24 horas, foram anestesiados, e até o término do experimento foram mantidos em mesa apropriada sendo que a frequência cardíaca dos animais, independentemente do grupo a que pertenciam, variou entre 300 e 400 bpm/minuto e afebris.

Peso

A tabela 5 e figura 8 apresentam a evolução do peso dos animais durante o estudo. Os animais desnutridos (grupo 2) tiveram perda de peso e os animais do grupo controle (grupo 1) mantiveram o peso estável. Os resultados dos grupos:

realimentado (grupo 2A), realimentado e suplementado com glutamina (grupo 2B) e suplementado com glutamina (grupo 2C), aumentaram significativamente o peso corporal, mas não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos dietoterápicos.

Tabela 5. Evolução do peso corporal (g) dos ratos nos grupos estudados.

Dias	1	2	2A	2B	2C
-28	496±48	401±32	437±40	428±19	465±42
0	461±40	328±43	344±29	334±30	352±26
7	461±32	316±37	375±29	361±10	403±15
14	471±26 ^{abc}	311±30 ^a	388±23 ^b	390±9 ^c	422±14

Média ± desvio padrão (n=7)

1= controle nutrido, 2= controle desnutrido, 2A= realimentados com 100% da dieta, 2B= realimentados com 100% da dieta +2gPtn+1gGln; 2C= realimentados com 100% da dieta +1gGln
Letras iguais na mesma linha p<0,05 (comparação entre grupos experimentais com o grupo controle nutrido (grupo 1) no final do experimento).

Figura 8. Variação da perda de peso entre os dias experimentais zero, 7 e 14 em relação ao dia zero -28 dias. Entre os dias -28 e zero, os animais do grupo receberam 50% da dieta usual.

Média ± desvio padrão (n=7). 1= controle nutrido, 2= controle desnutrido, 2A= realimentados com 100% da dieta, 2B= realimentados com 100% da dieta +2gPtn+1gGln; 2C= realimentados com 100% da dieta +1gGln.

* p<0,05 (comparação entre grupos experimentais com o grupo controle nutrido (grupo 1) no final do experimento).

Nitrogênio urinário

Os resultados de nitrogênio urinário excretado durante os diferentes dias de estudo encontram-se na tabela 6 e figura 9, onde visualiza-se uma excreção nitrogenada elevada do grupo desnutrido (grupo 2), em comparação ao grupo controle (grupo 1). Após a oferta de nutrientes e/ou suplementação com glutamina, observou-se uma diminuição de nitrogênio urinário. Não foram encontradas diferenças estatísticas significantes para os grupos que receberam tratamento dietoterápico distintos.

Tabela 6. Evolução de nitrogênio urinário dos grupos estudados (mg/24h)

Dias	1	2	2A	2B	2C
-28	322±61	259±44	258±33	270±61	300±63
0	322±36	302±54	295±55	309±60	350±44
7	354±24	389±59	324±69	397±37	410±60
14	351±56	450±72 ^a	293±75	205±30 ^{ab}	366±46 ^b

Média ± desvio padrão (n=7)

1= controle nutrido, 2= controle desnutrido, 2A= realimentados com 100% da dieta, 2B= realimentados com 100% da dieta +2gPtn+1gGln; 2C= realimentados com 100% da dieta +1gGln

Letras iguais na mesma linha p<0,05 (comparação entre grupos experimentais com o grupo controle nutrido (grupo 1) no final do experimento).

Figura 9. Variação da excreção de nitrogênio urinário entre os dias experimentais zero, 7 e 14 em relação ao dia zero -28 dias. Entre os dias -28 e zero, os animais do grupo receberam 50% da dieta usual.

Média ± desvio padrão (n=7). 1= controle nutrido, 2= controle desnutrido, 2A= realimentados com 100% da dieta, 2B= realimentados com 100% da dieta +2gPtn+1gGln; 2C= realimentados com 100% da dieta +1gGln.

* p<0,05 (comparação entre grupos experimentais com o grupo controle nutrido (grupo 1) no final do experimento).

Concentração plasmática de aminoácidos

Em geral os resultados encontrados não foram uniformes tanto para os aminoácidos essenciais como para os aminoácidos considerados não essenciais e muitas vezes de difícil interpretação, estes dados estão de acordo com Marchini e cols. (1993). Com relação aos aminoácidos essenciais (tabela 7), as maiores diferenças foram encontradas para a fenilalanina, isoleucina, metionina, treonina e valina. A fenilalanina apresenta significativamente menor no grupo realimentado e suplementado com glutamina (grupo 2B); quando comparada ao grupo controle (grupo 1), para a isoleucina as diferenças encontradas foram nos grupos: desnutrido (grupo 2) e realimentado e suplementado com glutamina (grupo 2B) quando comparada ao grupo controle (grupo 1). A metionina foi significativamente menor nos grupos realimentado (grupo 2A) e o grupo realimentado e suplementado com glutamina (grupo 2B) quando comparada ao grupo controle (grupo 1). A treonina teve significância menor no grupo realimentado e suplementado com glutamina (grupo 2B) quando comparada ao grupo controle (grupo 1). A valina traduz-se em menor quantidade nos grupos realimentado e suplementado com glutamina (grupo 2B) e grupo suplementado com glutamina (grupo 2C) quando comparados ao grupo controle (grupo 1).

Tabela 7. Concentração plasmática de aminoácidos essenciais após infusão de L-[1-¹³C]-leucina no minuto 240, $\mu\text{mol/L}$

Aminoácidos	1	2	2A	2B	2C
Fenilalanina	78,44 $\pm$ 8,62 ^a	64,24 $\pm$ 9,44	64,19 $\pm$ 9,99	44,55 $\pm$ 10,34 ^a	65,05 $\pm$ 5,95
Isoleucina	95,01 $\pm$ 4,91 ^{bc}	48,61 $\pm$ 10,13 ^b	58,37 $\pm$ 6,78	45,45 $\pm$ 2,13 ^c	60 $\pm$ 18,3 ^c
Lisina	48,07 $\pm$ 9,15	38,07 $\pm$ 6,28	39,46 $\pm$ 3,94	37,08 $\pm$ 3,82	39 $\pm$ 9,63
Metionina	23,98 $\pm$ 5,34 ^{de}	23,51 $\pm$ 8,89	5,75 $\pm$ 1,45 ^d	6,00 $\pm$ 1,25 ^e	15,24 $\pm$ 3,84
Treonina	158,70 $\pm$ 2,06 ^f	101,89 $\pm$ 10,14	136,82 $\pm$ 13,83	94,80 $\pm$ 12,86 ^f	146,81 $\pm$ 11,01
Valina	188,86 $\pm$ 8,24 ^{ghi}	109,47 $\pm$ 7,56 ^g	126,38 $\pm$ 12,06	79,57 $\pm$ 16,19 ^h	147,68 $\pm$ 11,23 ⁱ
Leucina	82,69 $\pm$ 13,44	50,88 $\pm$ 5,83	59,68 $\pm$ 10,52	49,93 $\pm$ 12,59	58,18 $\pm$ 15,70

Média $\pm$ desvio padrão (n=7)

1 = controle nutrido, 2 = controle desnutrido, 2A = realimentados com 100% da dieta, 2B = realimentados com 100% da dieta + 2gPtn + 1gGln; 2C = realimentados com 100% da dieta + 1gGln

Letras iguais na mesma linha p < 0,05 (comparação entre grupos experimentais com o grupo controle nutrido (grupo 1) no final do experimento)

Na figura 10, observa-se que mesmo após infusão do traçor ¹³C leucina, a concentração plasmática de leucina não teve alteração significativa nos grupos estudados, enfatiza-se o grupo controle (grupo 1) e o grupo desnutrido (grupo 2), respectivamente 83 $\pm$ 13 vs 50 $\pm$ 6 mmol/L. Desta maneira considerou-se que a infusão do aminoácido marcado foi mínima e não suficiente para alterar os níveis plasmáticos deste.

Figura 10. Concentração plasmática de leucina durante infusão de L[1-¹³C]-leucina.

Média $\pm$ desvio padrão (n=7). 1 = controle nutrido, 2 = controle desnutrido, 2A = realimentados com 100% da dieta, 2B = realimentados com 100% da dieta + 2gPtn + 1gGln; 2C = realimentados com 100% da dieta + 1gGln.

* p < 0,05 (comparação entre grupos experimentais com o grupo controle nutrido (grupo 1) no final do experimento).

Com relação aos aminoácidos não essenciais (tabela 8), as maiores diferenças foram encontradas para alanina, ácido aspártico, arginina, glicina, histidina, serina e glutamina. O ácido aspártico foi significativamente maior nos grupos realimentado (grupo 2A) e realimentado e suplementado com glutamina (grupo 2B) quando comparados ao grupo desnutrido (grupo 2). A arginina e a alanina manifestaram-se menor nos grupos realimentado (grupo 2A) e grupo realimentado e suplementado com glutamina (grupo 2B) quando comparada ao grupo controle (grupos 1). A glicina revelou-se maior no grupo suplementado com glutamina (grupo 2C) quando comparada ao grupo controle desnutrido (grupo 2). A histidina foi significativamente maior no grupo realimentado e suplementado com glutamina (grupo 2B) quando comparada ao grupo desnutrido (grupo 2).

Tabela 8. Concentração plasmática de aminoácidos não essenciais após infusão de L-[1-¹³C]-leucina no minuto 240, $\mu\text{mol/L}$

Aminoácidos	1	2	2A	2B	2C
Alanina	218,53 $\pm$ 14,78 ^a	184,27 $\pm$ 3,44	151,58 $\pm$ 17,72 ^a	98,42 $\pm$ 6,19 ^a	184,63 $\pm$ 8,99
Ácido Aspártico	50,21 $\pm$ 9,8	37,13 $\pm$ 2,77 ^b	66,65 $\pm$ 8,15 ^b	67,69 $\pm$ 9,81 ^{b10}	40,61 $\pm$ 9,81
Arginina	212,05 $\pm$ 2,21 ^{cd}	102,11 $\pm$ 11,23	97,30 $\pm$ 9,65 ^c	55,99 $\pm$ 15,44 ^d	161,60 $\pm$ 2,22
Glicina	147,75 $\pm$ 12,72	106,25 $\pm$ 4,39 ^e	143,05 $\pm$ 4,23	139,39 $\pm$ 17,81	166,35 $\pm$ 12,60 ^e
Histidina	64,77 $\pm$ 7,14 ^f	47,10 $\pm$ 9,66 ^f	72,20 $\pm$ 16,85	110,67 $\pm$ 8,06 ^f	68,20 $\pm$ 13,32
Serina	174,02 $\pm$ 15,23	111,35 $\pm$ 12,34 ⁱ	181,07 $\pm$ 16,20	257,19 $\pm$ 2,21 ⁱ	135,60 $\pm$ 2,76
Tirosina	65,91 $\pm$ 14,50	56,82 $\pm$ 7,03	43,09 $\pm$ 12,21	47,03 $\pm$ 15,35	46,01 $\pm$ 13,71
Ácido Glutâmico	80,93 $\pm$ 8,94	61,93 $\pm$ 12,10	84,86 $\pm$ 8,90	99,69 $\pm$ 12,56	68,42 $\pm$ 9,80

Média $\pm$ desvio padrão (n=7)

1 = controle nutrido, 2 = controle desnutrido, 2A = realimentados com 100% da dieta, 2B = realimentados com 100% da dieta + 2gPtn + 1gGln; 2C = realimentados com 100% da dieta + 1gGln

Letras iguais na mesma linha p < 0,05 (comparação entre grupos experimentais com o grupo controle nutrido (grupo 1) no final do experimento)

Na figura 11 observa-se a concentração plasmática de glutamina, onde encontra-se diferença significativa na diminuição plasmática no grupo desnutrido (grupo 2) em comparação ao grupo controle nutrido (grupo 1), respectivamente, 649 ± 12 vs 171 ± 14 mmol/L. Os demais grupos experimentais, 2A, 2C, 2B também tiveram valores expressivos maiores de glutamina em comparação ao grupo desnutrido (grupo 2), ou seja, respectivamente, 540 ± 7 , 570 ± 7 , 414 ± 14 mmol/L.

Figura 11. Concentração plasmática de glutamina durante infusão de L[1-¹³C]-leucina.

Média $\pm$ desvio padrão (n=7). 1 = controle nutrido, 2 = controle desnutrido, 2A = realimentados com 100% da dieta, 2B = realimentados com 100% da dieta + 2gPtn + 1gGln; 2C = realimentados com 100% da dieta + 1gGln.

* $p < 0,05$ (comparação entre grupos experimentais com o grupo controle nutrido (grupo 1) no final do experimento).

Enriquecimento isotópico plasmático de ¹³C leucina e ¹³C KIC

O resultado da infusão constante do isótopo L- [1-¹³C]-leucina confirmou-se por meio do enriquecimento isotópico plasmático de ¹³C leucina e ¹³C KIC. A análise do enriquecimento efetuou-se nos minutos 180, 210, 240 no total de 4hs de infusão do isótopo, os resultados são apresentados na figura 12 para o enriquecimento de ¹³C leucina e, na figura 13, para o enriquecimento de ¹³C KIC. O enriquecimento isotópico de ¹³C leucina caracterizou-se como maior no grupo desnutrido (grupo 2) no tempo 240 minutos, em comparação ao grupo controle nutrido (grupo 1), respectivamente, $3,2 \pm 1,2$ vs $1,27 \pm 0,5$ MPE%.

Encontra-se a mesma diferença relevante no enriquecimento do ¹³C KIC no grupo controle desnutrido (grupo 2) em comparação ao grupo controle nutrido (grupo 1), respectivamente, $4,04 \pm 0,9$ vs $1,93 \pm 0,6$ MPE%. Nos demais grupos não foram detectados diferenças significativas. Não se encontra diferença significativa na razão isotópica de ¹³C KIC/¹³C leucina no grupo controle desnutrido (grupo 2) em comparação ao grupo controle nutrido (grupo 1) respectivamente, $0,78 \pm 0,2$ vs $0,73 \pm 0,4$ MPE%. Também não foi encontrada nenhuma diferença para os grupos com tratamentos dietoterápicos, ou seja, grupo realimentado (grupo 2 A), grupo realimentado e suplementado com glutamina (grupo 2B) e grupo suplementado com glutamina (grupo 2C), respectivamente $0,79 \pm 0,41$ vs $1,76 \pm 1,30$ vs $1,17 \pm 0,63$ MPE% (figura 14).

Figura 12. Enriquecimento isotópico plasmático de ¹³C leucina durante infusão de L[1-¹³C]-leucina.

Média ± desvio padrão (n=7). 1 = controle nutrido, 2 = controle desnutrido, 2A = realimentados com 100% da dieta, 2B = realimentados com 100% da dieta + 2gPtn + 1gGln; 2C = realimentados com 100% da dieta + 1gGln.

* p < 0,05 (comparação entre grupos experimentais com o grupo controle nutrido (grupo 1) no final do experimento).

Figura 13. Enriquecimento isotópico plasmático de ¹³C KIC durante infusão de L[1-¹³C]-leucina.

Média ± desvio padrão (n=7). 1 = controle nutrido, 2 = controle desnutrido, 2A = realimentados com 100% da dieta, 2B = realimentados com 100% da dieta + 2gPtn + 1gGln; 2C = realimentados com 100% da dieta + 1gGln.

* p < 0,05 (comparação entre grupos experimentais com o grupo controle nutrido (grupo 1) no final do experimento).

Figura 14. Razão isotópica plasmática de ¹³C KIC/ ¹³C leucina durante infusão de L[1-¹³C]-leucina.

Média $\pm$ desvio padrão (n=7). 1 = controle nutrido, 2 = controle desnutrido, 2A = realimentados com 100% da dieta, 2B = realimentados com 100% da dieta + 2gPtn + 1gGln; 2C = realimentados com 100% da dieta + 1gGln.

* $p < 0,05$ (comparação entre grupos experimentais com o grupo controle nutrido (grupo 1) no final do experimento).

Enriquecimento isotópico protéico, leucina livre e taxa de síntese fracionada (FSR) na mucosa intestinal

O enriquecimento isotópico de ¹³C leucina da mucosa intestinal está apresentado na figura 15. Foi observado um aumento significativo no grupo controle desnutrido (grupo 2) em comparação ao grupo controle nutrido (grupo 1), respectivamente $0,0024 \pm 0,0006$ vs $0,0020 \pm 0,0001$ MPE%. O grupo realimentado (grupo 2A), grupo realimentado e suplementado com glutamina (grupo 2B) e grupo suplementado com glutamina (grupo 2C), tiveram valores similares ao grupo controle (grupo 1), respectivamente, $0,0023 \pm 0,003$; $0,0025 \pm 0,001$; $0,0020 \pm 0,002$ MPE%, independente de receberem tratamento dietético com ou sem suplementação de glutamina. Um aumento do enriquecimento isotópico intracelular de ¹³C leucina na mucosa intestinal foi encontrado no grupo desnutrido (grupo 2) comparado ao grupo controle nutrido (grupo 1) respectivamente $0,0028 \pm 0,0007$ vs $0,0019 \pm 0,0003$, MPE% não encontrado diferença relevante nos grupos com tratamentos dietoterápicos distintos, figura 16.

A taxa de síntese fracionada ratifica os resultados acima obtidos de enriquecimento isotópico protéico e de leucina intracelular na mucosa intestinal, o FSR foi significativamente menor no grupo controle desnutrido (grupo 2) em comparação ao grupo controle nutrido (grupo 1), respectivamente, $0,003 \pm 0,0007$ vs $0,004 \pm 0,0005$ FSR/h (figura 17), sem alterações significativas quando se suplementou a dieta com glutamina.

Figura 15. Enriquecimento isotópico protéico na mucosa intestinal de ¹³C leucina durante infusão de L[1-¹³C]-leucina.

Média ± desvio padrão (n=7). 1 = controle nutrido, 2 = controle desnutrido, 2A = realimentados com 100% da dieta, 2B = realimentados com 100% da dieta + 2gPtn + 1gGln; 2C = realimentados com 100% da dieta + 1gGln.

* p < 0,05 (comparação entre grupos experimentais com o grupo controle nutrido (grupo 1) no final do experimento).

Figura 16. Enriquecimento isotópico protéico extracelular na mucosa intestinal de ¹³C leucina durante infusão de L[1-¹³C]-leucina.

Média ± desvio padrão (n=7). 1 = controle nutrido, 2 = controle desnutrido, 2A = realimentados com 100% da dieta, 2B = realimentados com 100% da dieta + 2gPtn + 1gGln; 2C = realimentados com 100% da dieta + 1gGln.

* p < 0,05 (comparação entre grupos experimentais com o grupo controle nutrido (grupo 1) no final do experimento).

Figura 17. Taxa de síntese fracionada na mucosa intestinal (FSR).

Média ± desvio padrão (n=7). 1 = controle nutrido, 2 = controle desnutrido, 2A = realimentados com 100% da dieta, 2B = realimentados com 100% da dieta + 2gPtn + 1gGln; 2C = realimentados com 100% da dieta + 1gGln.

* $p < 0,05$ (comparação entre grupos experimentais com o grupo controle nutrido (grupo 1) no final do experimento).

Fluxo de ¹³C leucina e degradação protéica

O fluxo de ¹³C leucina, foi medido pelo enriquecimento intracelular na mucosa intestinal, mostra diferença significativa entre o grupo controle desnutrido (grupo 2) em comparação ao grupo controle nutrido (grupo 1) respectivamente, 4490 ± 1731 vs 5959 ± 1249 mmol.kg⁻¹.h⁻¹ (figura 18). Nos grupos com diferentes tratamentos dietoterápicos, grupo realimentado (grupo 2A), grupo realimentado e suplementado com glutamina (grupo 2B) e grupo suplementado com glutamina (grupo 2C), tiveram valores considerados estatisticamente semelhantes tanto ao grupo controle (grupo 1) quanto ao grupo desnutrido (grupo 2), respectivamente, 4878 ± 731 ; 4800 ± 491 e 5891 ± 927 mmol.kg⁻¹.h⁻¹.

Os resultados de degradação protéica (figura 18) foram similares aos encontrado pelo fluxo, onde o grupo controle desnutrido (grupo 2) mostra uma diferença significativa em comparação ao grupo controle nutrido (grupo 1) respectivamente, 4478 ± 1731 vs 5948 ± 1249 mmol.kg⁻¹.h⁻¹, e os resultados dos grupos com tratamentos dietoterápicos, 2A, 2B e 2C, respectivamente, 4867 ± 731 , 4788 ± 491 e 5880 ± 927 mmol.kg⁻¹.h⁻¹, estes semelhantes ao grupo controle nutrido (grupo 1).

Figura 18. Fluxo e degradação de ¹³C leucina na proteína da mucosa intestinal.

Média ± desvio padrão (n=7). 1 = controle nutrido, 2 = controle desnutrido, 2A = realimentados com 100% da dieta, 2B = realimentados com 100% da dieta + 2gPtn + 1gGln; 2C = realimentados com 100% da dieta + 1gGln.

* p < 0,05 (comparação entre grupos experimentais com o grupo controle nutrido (grupo 1) no final do experimento).

*Discussão***6 - Discussão***Discussão*

A presente pesquisa procurou esclarecer o problema da utilização de glutamina como suplemento, no que diz respeito ao efeito sobre o metabolismo protéico e calórico em animais desnutridos. Para tal, os animais dos grupos experimentais foram desnutridos, tanto em proteína como calorias, perdendo cerca de 25% do peso corporal inicial, e apresentaram sinais clínicos e excreção urinária de nitrogênio compatíveis com desnutrição grave (CAMPANA et al., 1975). Estes resultados foram os esperados, pois o projeto não pretendia estudar o processo da desnutrição e sim o que ocorreria com o tratamento nutricional. Em analogia aos animais, no qual utilizamos a oferta de 50% da dieta usual como desencadeadora da desnutrição, os humanos em condições de “estresse” orgânico também apresentam piora do quadro nutricional, com desnutrição protéica calórica grave (CLAEYSSSENE et al., 2000). Desta maneira, acreditamos que o modelo experimental do presente trabalho atingiu os objetivos propostos, que era provocar a desnutrição para, posteriormente, observar a resposta ao tratamento com ou sem suplemento de glutamina.

Seqüencialmente, discutiremos os dados de perda de peso, da excreção de nitrogênio urinário, da concentração plasmática de aminoácidos e do estudo cinético. No estudo cinético foram considerados o enriquecimento isotópico de ¹³C leucina, ¹³C KIC no plasma, no líquido intracelular da mucosa intestinal e da incorporação da ¹³C leucina na proteína da mucosa intestinal. Foram calculados o fluxo de leucina, a FSR, e a degradação de proteína na mucosa intestinal. Também foram comentadas as limitações da pesquisa proposta.

Peso corporal

Os resultados, como esperado, mostraram que, a oferta reduzida de proteínas e calorias resultou em perda de peso e conseqüente desnutrição dos animais. Estes dados são semelhantes ao descrito por Hill e cols. (1984), que usando ratos wistar, machos, de 100 g de peso inicial, em jejum de 3 dias, perderam de 19% do peso. A perda de peso do nosso estudo foi de 25%, o que pode ser explicado pela maior duração do tempo de desnutrição e restrição de 50% da dieta habitual, em oposição ao curto espaço de tempo e ao jejum total.

O grupo controle nutrido (grupo 1) e grupo controle desnutrido (grupo 2), foram considerados controles para uma comparação no comportamento dos diferentes tratamentos dietoterápicos. Os ratos do grupo controle nutrido (grupo 1) mantiveram peso até o final do experimento, cujos valores foram sempre significativamente superiores que os de outros grupos, em especial do grupo controle desnutrido (grupo 2). Assim, o grupo 2, continuou perdendo peso até o final do experimento, compatível com a oferta reduzida e constante de nutrientes.

Nos outros grupos experimentais, inclusive no grupo 2B, que além de receber dieta semelhante ao grupo controle nutrido (grupo 1) foi suplementado com glutamina, não houve ganho de peso igual ou superior ao grupo 1. A recuperação do peso foi igual para todos os grupos tratados, de maneira semelhante ao descrito por Mosoni e cols. (1999).

O referido trabalho relata que animais desnutridos realimentados por 5 dias voltam a ganhar peso, sugerindo processo de recuperação nutricional adequado. Outros animais, submetidos ao mesmo tipo de protocolo, também mostram comportamento similar McCance & Widdowson, (1966).

Desta forma podemos sugerir que, independente do tipo de realimentação, seja ela suplementação de proteína, caloria e/ou glutamina, o peso corporal de ratos desnutridos tende a retornar aos valores normais. Ressalta-se que, os animais previamente desnutridos e tratados nutricionalmente, ganharam peso, mas não atingiram, ao final de 14 dias, o peso do grupo controle nutrido (grupo 1). Sugere-se que talvez o tempo de tratamento nutricional tenha sido insuficiente para completa recuperação dos animais desnutridos. Novamente, por analogia, em pacientes desnutridos, observa-se que a recuperação nutricional não é imediata, principalmente nos pacientes adultos.

Nitrogênio urinário

Concordante com o previsto, em animais desnutridos que perderam peso, mostraram uma elevação da excreção nitrogenada urinária. Estes dados sugerem que os animais entraram em processo energético de adaptação, degradando proteína, aumentando a excreção urinária de produtos nitrogenados, e possivelmente utilizando a cadeia de carbono como fonte energética (BOS et al., 2000). Tanto pacientes em processo de desnutrição, como submetidos a estresse orgânico, apresentam uma perda aumentada de nitrogênio urinário (QUEVEDO et al., 1994). Desta maneira, o processo de desnutrição provocado nos animais mostrou-se eficiente, pois ocorreu perda peso e aumento da excreção urinária de nitrogênio. Os dados encontrados por Felgines e cols. (1999) em ratos adultos com restrição de 50% da dieta, relatam uma excreção nitrogenada elevada após 3 semanas de desnutrição, sendo estes dados concordantes com encontrados nesta pesquisa.

Para os outros grupos experimentais, os achados de nitrogênio urinário mostram que no grupo 2B (realimentado e suplementado com glutamina), houve uma tendência da excreção de nitrogênio ficar igual ao grupo controle nutrido (grupo 1). Por outro lado, o grupo que recebeu somente glutamina (grupo 2C), ou o grupo que foi somente realimentado (grupo 2A), não apresentou tendência de normalizar a excreção urinária de nitrogênio. Assim, pode-se sugerir que, nos animais desnutridos, foi necessário oferecer um maior teor total de nitrogênio ou ainda que, o tempo de terapia foi insuficiente.

Concentração plasmática de aminoácidos

A análise de valores de aminoácidos plasmáticos geralmente não é utilizada como indicador de desnutrição, síntese e/ou degradação protéica. Muitas vezes os resultados encontrados se conflitam, dificultando a interpretação. Em geral, espera-se que com uma redução da oferta de proteínas e calorias, haja diminuição das concentrações plasmáticas de aminoácidos essenciais, tais como a isoleucina e a valina. Não foi possível mostrar o efeito da realimentação e/ou suplementação de glutamina. Estes achados concordam com os encontrados por Morens e cols. (2000) e Peng e cols. (1972).

Os resultados de aminoácidos não essenciais alanina, arginina e serina, encontrados no estudo, mostraram uma tendência de diminuição no grupo controle desnutrido (grupo 2). Estes dados também concordam com os observados por Peters & Harper (1985) e Lunn & Autim (1983) em situação semelhante.

A suplementação de glutamina via oral por 14 dias (0,35g/kg/dia) aumentou as concentrações plasmáticas de glutamina nos grupos experimentais 2B e 2C, que receberam glutamina. O grupo 2A que recebeu somente a realimentação, 100% do total da dieta usual, também aumentou a concentração plasmática de glutamina, sem ser suplementado com glutamina. Estes dados nos sugerem que independente da oferta de glutamina, o tratamento nutricional de 14 dias, após uma desnutrição protéico calórica grave, mostrou que as concentrações plasmáticas de glutamina tendem a alcançar os valores normais semelhantes ao grupo controle nutrido (grupo 1). Como previsto, o grupo controle nutrido (grupo 1) manteve constante suas concentrações de glutamina e o grupo controle desnutrido (grupo 2) mostrou uma diminuição significativa da concentração plasmática de glutamina. Estes achados se confirmam em Hankard e cols. (1995), que encontraram aumento de concentrações de glutamina maior em sujeitos nutridos. Melis e cols. (2004) e Lin e cols. (2002), relatam que há uma depleção de glutamina no compartimento plasmático em caso de estresse humano e com os dados de Holecek e cols. (1997) em ratos estressados.

Nos animais desnutridos e mantidos em desnutrição, os baixos valores de glutamina podem ser explicados pela menor ingestão e/ou pelo maior consumo. Nestes animais a glutamina seria utilizada como fonte de nitrogênio para síntese protéica e/ou como substrato energético. Esta hipótese é consistente com a visão de Austgen e cols. (1991), que observaram em pacientes sépticos, nos quais ocorre um aumento do consumo de glutamina por células do sistema imune e fígado.

Finalizando, mesmo após infusão constante de leucina, durante o estudo cinético, vide a seguir, não foi observada uma alteração nas concentrações plasmáticas deste aminoácido. Isto nos leva a sugerir que o a infusão de isótopo de leucina foi realmente insignificante como fonte de aminoácido essencial. A hipótese de que ocorra uma diluição isotópica maior de ¹³C leucina e que esta poderia contribuir para uma diminuição do ¹³C KIC é rebatida por Schwenk & Haymond (1987). Eles observaram que, com infusão de ¹⁵N leucina em sujeitos normais, a diluição isotópica não altera o a análise para a estimativa de síntese protéica.

Estudo cinético

Para estudarmos o metabolismo de aminoácidos de ratos desnutridos, o emprego de isótopo estáveis foi primordial para o conhecimento da taxa de reciclagem protéica. Para tal o aminoácido essencial marcado ¹³C leucina foi utilizado. Dentre as principais vantagens do uso de isótopo estáveis temos; 1) são estáveis, ou seja, não acarretam emissão de radioatividade; 2) são seguros para emprego em humanos saudáveis ou pacientes em qualquer idade e sexo; 3) o próprio sujeito do estudo pode servir como controle dele mesmo; 4) não intervém com o tratamento clínico em andamento, 5) não invasivos e inócuos ao homem; 6) os estudos podem ser completados em um espaço de tempo relativamente pequenos de 3 a 4 hs. A frequência de utilização de isótopos estáveis na área de investigação biomédica tem aumentado significativamente pela variedade de aplicações e pela diminuição no custo, com o avanço e barateamento de técnicas de cromatografia gasosa e espectrometria de massa (PATTERSON et al., 1997). A título de ilustração o National Library of Medicine (PubMed) na década de 1995-2004 indexou cerca 360% a mais de artigos que na década de 1975-1984 contendo “¹³C” no título.

Para o estudo cinético foi considerado o teor de aminoácidos marcados tanto plasmático, como intracelular e também aquele incorporado à proteína do tecido considerado. A concentração plasmática de aminoácidos, em si, não é necessariamente um reflexo da concentração intracelular, ou da capacidade intracelular de síntese protéica (BERGSTROM et al., 1990). O transporte de aminoácidos, via membrana celular, é essencial no equilíbrio metabólico intracelular e o no compartimento extracelular. O "pool" de aminoácidos intracelular livre é considerado o maior fator envolvido na regulação de síntese de proteína (DIVINO-FILHO et al., 1997).

No presente trabalho, para avaliar o processo de síntese protéica foi utilizada a incorporação do aminoácido marcado, ¹³C leucina, na proteína de mucosa intestinal, além da análise dos valores plasmáticos da própria leucina e de seu cetoácido, o ¹³C KIC. Este modelo de enriquecimento de "pool" intracelular de leucina e o KIC é considerado viável para o estudo cinético do metabolismo de aminoácidos, como ratificado por Darmaun e cols. (1991).

Os resultados obtidos no trabalho mostram um aumento de enriquecimento isotópico plasmático no grupo controle desnutrido (grupo 2), em comparação ao grupo controle nutrido (grupo 1). Estes achados sugerem que no grupo controle nutrido (grupo 1) a leucina foi incorporada na célula para seguir a via da síntese protéica, enquanto um elevado enriquecimento isotópico plasmático de leucina no grupo controle desnutrido (grupo 2) nos sugere uma baixa incorporação deste aminoácido pela célula, possivelmente prejudicando a síntese protéica destes animais. Os grupos experimentais que receberam tratamento nutricional, independente de realimentação e/ou suplementação de glutamina, tiveram comportamento semelhante do grupo controle nutrido (grupo 1).

Para confirmar estes dados, os resultados de ¹³C KIC, produzido a partir da transaminação de ¹³C leucina, seguiram a mesma lógica da incorporação plasmática de ¹³C leucina. O grupo controle desnutrido (grupo 2) apresentou maior enriquecimento de ¹³C KIC em comparação ao grupo controle nutrido (grupo 1), e os grupos com tratamento nutricional mantiveram os valores similares àqueles do grupo controle nutrido (grupo 1).

Ratificando os achados observados de enriquecimento plasmático de ¹³C leucina e de ¹³C KIC, a razão isotópica de ¹³C KIC/ ¹³C leucina do grupo controle nutrido (grupo 1) e grupo controle desnutrido (grupo 2), são semelhantes. Estes resultados evidenciam que no rato nutrido os níveis de ¹³C leucina são primordialmente dirigidos à síntese protéica, mantendo os valores plasmáticos inferiores ao do animal desnutrido, mas proporcionalmente semelhantes. Os grupos experimentais que receberam tratamento nutricional, foram semelhantes ao grupo controle nutrido (grupo 1).

Após observação dos resultados de enriquecimento plasmático de ¹³C leucina, podemos sugerir que em ratos desnutridos há uma diminuição de síntese protéica celular. A menor incorporação de leucina à proteína celular explicaria esta sugestão, mesmo se houvesse entrada de leucina na célula. A entrada de leucina no intracelular pode ser confirmada por elevados valores de KIC. Considerando que houve passagem de leucina para o intracelular, e não houve incorporação da proteína, os ratos desnutridos possivelmente transformam o esqueleto de carbono do aminoácido em energia. Esta hipótese poderia ser verificada pela avaliação do enriquecimento isotópico na excreção pulmonar de ¹³CO₂, que no entanto, não foi objetivo do presente trabalho.

O enriquecimento isotópico plasmático de leucina do estudo mostrou que o efeito da suplementação de glutamina não foi específico para a melhora da síntese protéica, mas independente da fonte de suplementação, observamos que um tratamento nutricional adequado, em proteínas e calorias, melhoram significativamente a incorporação de ¹³C leucina celular, o qual sugerimos uma tendência de retorno semelhante ao grupo controle nutrido (grupo 1) ao final de 14 dias de recuperação nutricional.

O enriquecimento isotópico de ¹³C leucina intracelular da mucosa intestinal nos revela um aumento significativo no grupo controle desnutrido (grupo 2) em comparação ao grupo controle nutrido (grupo 1). Estes dados nos sugerem uma maior captação deste aminoácido na mucosa intestinal de ratos desnutridos, possivelmente, para substrato energético e/ou síntese protéica. Estudo feito em ratos submetidos a jejum de 24h, mostram aumento da oxidação de ¹⁴C leucina em músculo esquelético, tendo ocorrido elevação de 50% nos valores de ¹⁴CO₂ liberados em relação ao músculo esquelético de ratos alimentados (DORETTO, 1995).

Os resultados dos grupos experimentais de realimentação e/ou suplementação de glutamina seguem o mesmo aumento de incorporação do grupo controle desnutrido (grupo 2), sugerindo que os animais apresentam possibilidade de recuperação da mucosa intestinal. O mesmo efeito não foi observado pelo grupo controle nutrido (grupo 1), uma vez que suas funções orgânicas estão em equilíbrio, a incorporação de ¹³C leucina está em acordo com as necessidades imposta pelo organismo. O grupo controle desnutrido (grupo 2) manteve elevada incorporação do marcador na proteína da mucosa intestinal, isto leva a ratificar que há uma necessidade real do aminoácido na mucosa intestinal em ratos desnutridos. Os achados de Schröder e cols. (2003) utilizando ovelhas e cabras submetidas a uma dieta com baixa proteína, revelam um aumento no transporte de leucina na bordadura de escova do enterócito jejunal, similares aos dados de incorporação encontrados no presente estudo.

Os dados dos grupos experimentais que receberam tratamento dietético, reforçam os já obtidos, não revelam diferença no tipo de realimentação e/ou suplementação de glutamina para uma melhor incorporação de ¹³C leucina na proteína da mucosa intestinal. O grupo controle nutrido (grupo 1), ratifica a incorporação de ¹³C leucina na proteína da mucosa intestinal com valores adequados para um balanço equilibrado entre síntese e degradação. Estes dados confirmam a importância do metabolismo de aminoácidos no papel da regulação da integridade e função intestinal, em acordo com Wu (1998).

O fluxo de ¹³C leucina é o resultado da interação entre síntese e degradação em determinado período de tempo. Com este resultado podemos interpretar o que ocorre no organismo dos ratos experimentais. Os dados do grupo controle desnutrido (grupo 2) são inferiores em comparação ao grupo controle nutrido (grupo 1) e os outros grupos, independente de realimentação e ou suplementação de glutamina, semelhantes ao grupo controle nutrido (grupo 1). Estes achados podem sugerir uma maior síntese protéica no grupo controle nutrido (grupo 1) e uma recuperação desta nos grupos experimentais que receberam tratamento nutricional. Sugere-se que a leucina que foi incorporada seguiu a via para fazer síntese de proteína, modelo em acordo com Coëffier e cols. (2003) e Cobelli e cols. (1991), o que não ocorreu no grupo controle desnutrido (grupo 2), onde

encontramos uma diminuição do fluxo de ¹³C leucina; este resultado sugere uma lógica de maior degradação de proteína em ratos desnutridos protéicos calóricos.

A taxa de síntese fracionada de proteína (FSR) na mucosa intestinal, encontrada no estudo, mostra que no grupo controle nutrido (grupo 1), manteve constante a incorporação de ¹³C leucina, seja ela intracelular ou protéica da mucosa intestinal. No grupo controle desnutrido (grupo 2), apesar de um elevado aumento de incorporação intracelular e de proteína da mucosa intestinal, os valores de FSR são inferiores em comparação ao grupo controle nutrido (grupo 1). Isto sugere que, apesar da avidéz da célula da mucosa intestinal em captar leucina, não há o resultante aumento da taxa de síntese de proteína da mucosa intestinal. Este fato reforça a hipótese de que, apesar de tentar incorporar mais aminoácido na proteína da mucosa intestinal, possivelmente, a FSR é menor que a degradação.

Os grupos 2A, 2B e 2C independente do tipo de realimentação e/ou suplementação de glutamina, apresentaram uma tendência de melhora de síntese protéica (FSR), os resultados são semelhantes ao encontrados no grupo controle nutrido (grupo 1), sugerindo que a leucina incorporada resultou em proteína da mucosa intestinal, mas o efeito de suplementação de glutamina não foi confirmado no caso de ratos desnutridos visando melhorar ou estimular a síntese protéica da mucosa intestinal.

A depuração do fluxo de leucina plasmática nos dá uma idéia da quantidade de leucina incorporada na mucosa intestinal. Os resultados encontrados mostraram que no grupo controle desnutrido (grupo 2) havia uma menor depuração em comparação o grupo controle nutrido (grupo 1), respectivamente 2 mmol.kg⁻¹.h⁻¹ vs 8 mmol.kg⁻¹.h⁻¹ e os grupos em tratamento nutricional mostraram valores similares ao do grupo controle nutrido (grupo 1). Este achado, mais uma vez, reforça a hipótese de que nos ratos desnutridos, apesar da captação de aminoácido na mucosa intestinal, sua depuração é baixa, ou seja, não há incorporação na célula para fazer proteína.

A degradação protéica foi menor no grupo controle desnutrido (grupo 2) em comparação ao grupo controle nutrido (grupo 1). Os animais desnutridos, com cerca de metade do peso dos animais controles, estão em desequilíbrio metabólico, e para manter suas funções vitais o organismo tenta diminuir a degradação protéica num período de adaptação para que possam sobreviver a este estresse (TAWA et al., 1992; YOUNG & MARCHINI, 1990).

A partir de resultado de nitrogênio em célula de mucosa intestinal, trabalho anterior realizado por nós (TANNUS, 2001), foi possível estimar a quantidade tecidual do nitrogênio em animais desnutridos em comparação com nutridos. Pode-se observar que os ratos nutridos incorporam, na célula da mucosa intestinal, cerca de 300% a mais de nitrogênio que os ratos desnutridos. Este achado poderia nos sugerir que o transporte de nitrogênio, ligado a aminoácidos, na mucosa intestinal funcionaria como estoque de fonte protéica ou fonte energética para serem utilizados em condições de estresse. Novamente, a suplementação de glutamina não interferiu nesta incorporação.

A principal limitação do experimento foi de não mensuração do ¹³CO₂ nos animais estudados. Esta medida em animais, principalmente quando a diluição isotópica é significativa, e praticamente torna-se impossível de ser realizada nas condições atuais do laboratório onde foi realizado o presente experimento. Assim, no protocolo experimental foram infundidos $\cong$ 620mmol/h ¹³C leucina, isto diluindo no animal todo, cerca de 20

vezes, considerando a volemia do rato, e a seguir seria eliminado via ar expirado. Nos pulmões, novamente, haveria diluição com o ar expirado. Como o CO₂ representa cerca de 2% do ar expirado, ou seja, no ar expirado haveria algo em torno de 0,000002 mol% de CO₂ marcado. O limite de sensibilidade do aparelho é 0,001%.

Conclusões

Conclusões

Conclusões

1) Animais com desnutrição protéico calórica grave tem perda significativa de peso corporal, excreção nitrogenada urinária elevada, concentrações plasmáticas de aminoácidos alteradas e uma diminuição de síntese e degradação protéica na mucosa intestinal.

2) O tratamento nutricional, tais como, uma realimentação de dieta habitual, uma suplementação de proteína e/ou suplementação de glutamina, mostram uma melhora nas condições clínicas de ratos com desnutrição protéico calórica.

Não foi possível detectar efeito positivo com o uso oral de glutamina, para maior recuperação do estado nutricional em ratos desnutridos.

Referências Bibliográficas

7 - Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

ADDISON E, MARCHINI JS, SILVA MR, VANNUCCHI H. Estudo nutricional de pacientes hospitalizados, subsidio a favor da criação de comissões de suporte nutricional. Rev Soc Braz Nutr Parent. 3(1):9-12, 1986.

AHLMAN B, LEIJONMARCK C, WERNERMAN J. The content of free amino acids in the human duodenal mucosa. Clin Nutr. 12(1):266-71, 1993.

AOAC. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC, USA. 13th ed 1980.

ASKANAZI J, CARPENTIER Y, MICHELSEN C, ELWYN D, FÜRST P, KANTROWITZ L, GUMP F, KINNEY M. Muscle and plasma amino acids following injury: influence of intercurrent infection. Ann Surg. 192(1):78-85, 1980.

AUSTGEN TR, CHEN MK, FLYNN TC, SOUBA WW. The effects of endotoxin on the splanchnic metabolism of glutamine and related substrates. J Trauma. 31(6):742-51, 1991.

BERGSTROM J, ALVESTRAND A, FURST P. Plasma and muscle free amino acids in maintenance hemodialysis patients without protein malnutrition. Kidney Int. 38(1):108-14, 1990.

BIER DM. Stable isotopes in biosciences, their measurement and models for amino acid metabolism. Eur J Pediatr. 156 (suppl. 1):S2-8, 1997.

BISTRIAN BR, BLACKBURN GL, VITALE J, COCHRAN D, NAYLOR J. Prevalence of malnutrition in general medical patients. JAMA. 235(15):1567-70, 1976.

BOS C, BENAMOUZIG R, BRUHAT A, ROUX C, MAHE S, VALENSI P, GAUDICHON C, FERRIERE F, RAUTUREAU J, TOME D. Short-term protein and energy supplementation activates nitrogen kinetics and accretion in poorly nourished elderly subjects. Am J Clin Nutr. 71(5):1129-37, 2000.

BOUTELOUP-DEMANGE C, BOIRIE Y, DÉCHELOTTE P, GACHON P, BEAUFRÈRE B. Gut mucosal protein synthesis in fed and fasted humans. Am J Physiol. 274 (3 Pt 1):E541-46, 1998.

BULSUS N, CERSOSIMO E, GHISHAN F, ABUMRAD N. Physiologic importance of glutamine. Metabolism. 38(8):1-5, 1989.

CALDER PC. Glutamine action in cells of the immune system In: CYNOBER L, FÜRST P, LAWIN P. Pharmacological Nutrition, Immune Nutrition. Munick, Germany, W. Zuckschewdt Verlag. 1995. CALLOWAY DH, SPECTOR H. Nitrogen utilization during caloric restriction. J Nutr. 56(1):545-54, 1955.

CAMPANA AO, BURINI RC, OUTA AY, CAMARGO JLV. Experimental protein deficiency in adult rats. *Rev Bras Pesq Med e Biol.* 8(1-2):221-6, 1975.

CHIPPONI JX, BLEIER JC, SANTI MT, RUDMAN D. Deficiencies of essential and conditionally essential nutrients. *Am J Clin Nutr.* 35(5):1112-16, 1982.

CLAEYSENS S, BOUTELOUP-DEMANGE C, GACHON P, HECKETSWEILER B, LEREBOURS E, LAVOINNE A, DÉCHELOTTE P. Effect of enteral glutamine on leucine, phenylalanine and glutamine metabolism in hypercortisolemic subjects. *Am J Physiol.* 278(5):E817-24, 2000.

COBELLI C, SACCOMANI MP, TESSARI P, BIOLO G, LUZI L, MATTHEWS DE. Compartmental model of leucine kinetics in humans. *Am J Physiol.* 261(4 Pt 1):E539-50, 1991.

COEFFIER M, CLAEYSENS S, HECKETSWEILER B, LAVOINNE A, DUCROTTE P, DECHELOTTE P. Enteral glutamine stimulates protein synthesis and decreases ubiquitin mRNA level in human gut mucosa. *Am J Physiol.* 285(2):G266-73, 2003.

DARMAUN D, DÉCHELOTTE P. Role of leucine as a precursor of glutamine alpha-amino nitrogen in vivo in humans. *Am J Physiol.* 260 (23):E326-29, 1991.

DARMAUN D, HAYES V, SCHAEFFER D, WELCH S, MAURAS N. Effects of glutamine and recombinant human growth hormone on protein metabolism in prepubertal children with cystic fibrosis. *J Clin Endocrinol Metab* 89(3):1146-52, 2004.

DARMAUN D, HUMBERT B. Does the fate of enterally administered glutamine depend on its molecular form? Bound versus free amino acid. *Nutrition.* 16(11-12):1101-02, 2000.

DE BIEVRE P, BARNES IL. Relative abundance of naturally occurring isotopes. *J Mass spectrometry.* 65(1):211-30, 1985.

DE OLIVEIRA LM, ALMEIDA S S. Effects of malnutrition and environment on the acquisition and extinction of avoidance behavior in rats. *Physiol Behav.* 34(1):141-5, 1985.

DÉCHELOTTE P, DARMAUN D, RONGIER M, HECKETSWEILER B, RIGAL O, DESJEUX J. Absorption and metabolic effects of enterally administered glutamine in humans. *Am J Physiol.* 260 (23):G677-82, 1991.

DEO MG, SOOD SK, RAMALINGASWAMI V. Experimental protein deficiency. *Arch Pathol.* 80(1):14-23, 1965.

DIVINO FILHO JC, BARANY P, STEHLE P, FURST P, BERGSTROM J. Free amino-acid levels simultaneously collected in plasma, muscle, and erythrocytes of uraemic patients. *Nephrol Dial Transplant.* 12(11):2339-48, 1997.

DORETTO AL. Controle da degradação e da síntese de proteína em músculo de ratos submetidos à dieta rica em proteínas. Dissertação (mestrado Departamento de Fisiologia). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1995.

FELGINES C, SAVANOVITCH C, FARGES MC, CYNOBER L, VASSON MP. Protein metabolism in rats during long-term dietary restriction: influence of aging. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 23(1):32-7, 1999.

FÜRST P, STEHLE P. Glutamine and Glutamine-containing dipeptides. In: CYNOBER L Amino acid metabolism and therapy in health and nutritional disease. CRC Press, Inc, New York. 1995.

GUIMARÃES RC, CABRAL JAS. Estatística. Ed. Mc Graw-Hill, Portugal. 1998.

GUTHRIE HA, PICCIANO MM. .Human Nutrition.. Mosby, St. Louis, 1985.

HALL JC, HEEL K, McCAULEY R. Glutamine. Br J Surg. 83(3):305-312, 1996.

HANKARD R, HAMMOND D, HAYMOND M, DARMAUN D. Oral glutamine slows down whole body protein breakdown in Duchenne muscular dystrophy. Pediatr Rev. 43(2):222-26, 1998.

HANKARD RG, DARMAUN D, SAGER BK, D'AMORE D, PARSONS WR, HAYMOND M. Response of glutamine metabolism to exogenous glutamine in humans. Am J Physiol. 269(4 Pt 1):E663-70, 1995.

HILL JO, FRIED SK, DIGIROLAMO M. Effects of fasting and restricted refeeding on utilization of ingested energy in rats. Am J Physiol. 247(2 Pt 2):R318-27, 1984.

HOLECEK M, SPRONGL L, SKOPEC F, ANDRYS C, PECKA M. Leucine metabolism in TNF-alpha-and endotoxin-treated rats: contribution of hepatic tissue. Am J Physiol. 273(6 Pt 1):E1052-8, 1997.

HORBER FF, HORBERT-FEYDER S ,KRAYER W, SCHWENK W, HAYMOND M. Plasma reciprocal pool specific activity predicts that of intracellular free leucine for protein synthesis. Am J Physiol. 257(3 Pt 1):E385-99, 1989.

JEPSON M, BATES P, BROADBENT P, PELL J, MILLWARD D. Relationship between glutamine concentration and protein synthesis in rat skeletal muscle. Am J Physiol. 255(2 Pt 1):E166-72, 1988.

KLIMBERG VS, SOUBA W, SALLOUM RM, PLUMLEY DA, COHEN FS, DOLSON DJ, BLAND KI, COPELAND EM. Glutamine-enriched diets support muscle glutamine metabolism without stimulating tumor growth. J Surg Res. 48(4):319-23, 1990.

LACEY JM, WILMORE DW. Is glutamine a conditionally essential amino acid? *Nutr Rev.* 48(8):297-309, 1990.

LE BAQUER O, NAZIH H, BLOTTIERE H, MEYNIAL-DENIS D, LABOISSE C, DARMAUN D. Effects of glutamine deprivation on protein synthesis in a model of human enterocytes in culture. *Am J Physiol.* 281(6):G1340-47, 2001.

LIN MT, KUNG SP, YEH SL, LIN C, LIN TH, CHEN KH, LIAW KY, LEE PH, CHANG KJ, CHEN WJ. The effect of glutamine-supplemented total parenteral nutrition on nitrogen economy depends on severity of diseases in surgical patients. *Clin Nutr.* 21(3):213-8, 2002.

LUNN PG, AUSTIN S. Differences in nitrogen metabolism between protein-deficient and energy-deficient rats with similarly restricted growth rates. *Ann Nutr Metab.* 27(3):242-51, 1983.

MacLENNAN P, BROWN R, RENNIE M. A positive relationship between protein synthetic rate and intracellular glutamine concentration in perfused rat skeletal muscle. *FEBS Lett.* 215:187-91, 1987.

MARCHINI JS, CORTIELLA J, HIRAMATSU T, CHAPMAN TE, YOUNG VR. Requirements for indispensable amino acids in adult humans: longer-term amino acid kinetic study with support for the adequacy of the Massachusetts Institute of Technology amino acid requirement pattern. *Am J Clin Nutr.* 58(5):670-83, 1993.

MARCHINI JS, FILHO AB, VANNUCCHI H, DARNAM D, KREMPF M. Utilização de espectrometria de massa para o estudo do metabolismo protéico e aminoácido, em medicina. *Medicina Ribeirão Preto, Ribeirão Preto*, 30(4):594-607, 1997.

MARCHINI JS, NGUYEN P, DESCHAMPS JY, MAUGERE P, KREMPF M, DARMAUN D. Effect of intravenous glutamine on duodenal mucosa protein synthesis in healthy growing dogs. *Am J Physiol.* 276(4 Pt 1):E747-53, 1999.

MARCHINI JS, VANNUCCHI H, SOUZA DA, DUTRA-OLIVEIRA JE. Uso clínica da glutamina. *Revista de Metabolismo e Nutrição.* 4(1-2):10-17, 1997.

McCANCE RA, WIDDOWSON EM. Protein deficiencies and calorie deficiencies. *Lancet* 16;2(7455):158-9, 1966.

McNURLAN MA, GARLICK PJ. Influence of nutrient intake on protein turnover. *Diabetis Metab Rev.* 5(2):165-89, 1989.

MEISTER A. Catalytic mechanism of glutamine synthetase; overview of glutamine metabolism. In: MORA J, PALACIOS R, eds. *Glutamine: metabolism, enzymology, and regulation.* New York: Academic Press. 1980.

MELIS GC, TER WENGEL N, BOELEN PG, VAN LEEUWEN PA. Glutamine: recent developments in research on the clinical significance of glutamine. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 7(1):59-70, 2004.

MENAND C, POUTEAU E, MARCHINI S, MAUGERE P, KREMPF M, DARMAUN D. Determination of low ¹³C-glutamine enrichments using gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 32(10):1094-9, 1997.

MIANAMI H, MORSE EL, ADIBI SA. Characteristics and mechanism of glutamine-dipeptide absorption in human intestine. *Gastroenterol*. 103(1):3-11, 1992.

MORENS C, GAUDICHON C, METGES CC, FROMENTIN G, BAGLIERI A, EVEN PC, HUNEAU JF, TOME D. A high-protein meal exceeds anabolic and catabolic capacities in rats adapted to a normal protein diet. *J Nutr*. 130(9):2312-21, 2000.

MOSONI L, MALMEZAT T, VALLUY MC, HOULIER ML, ATTAIX D, MIRAND PP. Lower recovery of muscle protein lost during starvation in old rats despite a stimulation of protein synthesis. *Am J Physiol*. 277(4 Pt 1):E608-16, 1999.

MUNRO HN, ALLISSON JB. Mammalian protein metabolism. Ed. Academic Press, INC, London, 1969.

PATTERSON BW, ZHANG XJ, CHEN Y, KLEIN S, WOLFE RR. Measurement of very low stable isotope enrichments by gas chromatography/mass spectrometry: application to measurement of muscle protein synthesis. *Metabolism*. 46(8):943-8, 1997.

PENG Y, TEWS JK, HARPER AE. Amino acid imbalance, protein intake, and changes in rat brain and plasma amino acids. *Am J Physiol*. 222(2):314-21, 1972.

PENN D, LEBENTHAL E. Intestinal mucosa energy metabolism - A new approach to therapy of gastrointestinal disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 10(1):1-4, 1990.

PETERS JC, HARPER AE. Adaptation of rats to diets containing different levels of protein: effects on food intake, plasma and brain amino acid concentrations and brain neurotransmitter metabolism. *J Nutr*. 115(3):382-98, 1985.

PONT F, DUVILLARD L, MAUGEAIS C, ATHIAS A, PERSEGOL L, GAMBERT P, VERGES B. Isotope ratio mass spectrometry, compared with conventional mass spectrometry in kinetic studies at low and high enrichment levels: application to lipoprotein kinetics. *Anal Biochem*. 248(2):277-87, 1997.

QUEVEDO MR, PRICE GM, HALLIDAY D, PACY PJ, MILLWARD DJ. Nitrogen homeostasis in man: diurnal changes in nitrogen excretion, leucine oxidation and whole body leucine kinetics during a reduction from a high to a moderate protein intake. *Clin Sci (Lond)*. 86(2):185-93, 1994.

Recommended Dietary Allowances. National Academy of Sciences Press, NW, Washington. 10th ed., 1989.

RITTLER P, DEMMELMAIR H, KOLETZKO B, SCHILDBERG F, HARTL W. Determination of protein synthesis in human ileum in situ by continuous [1-¹³C]-leucine infusion. *Am J Physiol.* 278(4): E634-38, 2000.

ROSE WC. Amino acid requirements of man. *Fed Proc.* 8(1):546-52, 1949.

SCHRODER B, SCHONEBERGER M, RODEHUTSCORD M, PFEFFER E, BREVES G. Dietary protein reduction in sheep and goats: different effects on L-alanine and L-leucine transport across the brush-border membrane of jejunal enterocytes. *J Comp Physiol [B].* 173(6):511-8, 2003.

SCHWENK W, BEAUFRÈRE B, HAYMOND M. Use of reciprocal pool specific activities to model leucine metabolism in humans. *Am J Physiol.* 249(6 Pt 1): E646-50, 1985.

SCHWENK WF, HAYMOND MW. Effects of leucine, isoleucine, or threonine infusion on leucine metabolism in humans. *Am J Physiol.* 253(4 Pt 1):E428-34, 1987.

SMITH EB, JOHSON BC. Studies of amino acid requirements of adult rats. *Br J Nutr.* 21(1):17-27, 1967.

SOUBA WW, HERSKOWITZ K, SALLOUM RM, CHEN MK, AUSTGEN TR. Gut glutamine metabolism. *JPEN J Parent Ent Nutr.* 14 (suppl 5):S45-50, 1990.

SOUBA WW. Nutrition support. *N Engl J Med.* 336(1):41-48, 1997.

STEHLE P, ZANDER J, MERTES N, ALBERS S, PUCHSTEIN C, LAWIN P, FURST P. Effect of parenteral glutamine peptide supplements on muscle glutamine loss and nitrogen balance after major surgery. *Lancet.* 4(8632): 231-33, 1989.

TANNUS AFS. Nitrogênio urinário e tecidual em ratos desnutridos com suplementação de glutamina. Dissertação (mestrado em Clínica Médica aplicada à Biociências). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2001. [on line] <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17138/tde-06122001->

TAWA NE JR, KETTELHUT IC, GOLDBERG AL. Dietary protein deficiency reduces lysosomal and nonlysosomal ATP-dependent proteolysis in muscle. *Am J Physiol.* 263(2 Pt 1):E326-34, 1992.

TORUN B, CHEW F. Protein-energy malnutrition. In: SHILS ME, OLSON JA, SHIKE M. *Modern nutrition in health and disease.* 9th ed. Williams & Wilkins. New York. 1999.

TREMEL H, KIENLE B, WEILEMAN L, STEHLE P, FURST P. Glutamine dipeptide-supplemented parenteral nutrition maintains intestinal function in the critically ill. *Gastroenterology.* 107(6):1595-1601, 1994.

VANNUCCHI H, SANTOS JE, MARCHINI JS, DUTRA-DE-OLIVEIRA JE. Nutrição Clínica na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Medicina, Ribeirão Preto. Ribeirão Preto. 31(1):7-12, 1998.

WATERLOW JC. The requirements of adult man for indispensable amino acids. Eur J Clin Nutr. 50(suppl.1):S151-76, 1996.

WILLIAMS SR. Nutrition and Diet Therapy. 8th ed. Mosby. 1997.

WINDMUELLER H, SPAETH A. Identification of ketone bodies and glutamine as the major respiratory fuels in vivo for postabsorptive rat small intestine. J Biol Chem. 253(1): 69-76, 1978.

WINKLER MF, MANCHESTER S. Nutrition Care in Metabolic stress: sepsis, trauma, burns and surgery. In: MAHAN LK, ESCOTT-STUMP S. Food, nutrition & diet therapy 9th ed., W.B. Saunders Company Philadelphia. 1996.

WORDL HEALTH ORGANIZATION / UNICEF. Genova, (WHO/NUT) 1996.

WU GY. Intestinal mucosal amino acid catabolism. J Nutrition. 128:(8):1249-52, 1998.

YOUNG VR, GUCALP C, RAND WM, MATTHEWS DE, BIER DM. Leucine kinetics during three weeks at submaintenance-to-maintenance intakes of leucine in men: adaptation and accommodation. Hum Nutr Clin Nutr. 41(1):1-18, 1987.

YOUNG VR, MARCHINI JS. Mechanisms and nutritional significance of metabolic responses to altered intakes of protein and amino acids, with reference to nutritional adaptation in human. Am J Clin Nutr. 51(2):270-89, 1990.

ZIEGLER T, YOUNG L, BENFELL K, SCHELTINGA M, HORTOS K, BYE R, MORROW F, JACOBS D, SMITH R, ANTIN J. Clinical and metabolic efficacy of glutamine-supplemented parenteral nutrition after bone marrow transplantation. A randomized, double-blind, controlled study. Ann Intern Med. 116(10):821-28, 1992.

Anexos
Anexos
Anexos

Anexo I. Resultados individuais de peso dos grupos experimentais (g).

Grupos	1	2	2A	2B	2C
Dia (- 28)	441	375	396	438	438
	568	404	423	435	435
	519	394	375	406	463
	433	388	452	412	548
	473	384	467	460	457
	473	395	474	413	412
	533	472	476	438	498
	528				472
Dia (0)	433	295	296	312	315
	535	308	338	328	321
	427	310	395	315	360
	418	307	342	319	394
	460	299	337	345	345
	438	403	350	398	343
	497	379	351	324	372
	482				366
Dia (7)	425	284	360	366	387
	518	287	351	371	380
	467	304	328	349	401
	425	314	397	353	425
	450	288	393	374	400
	450	380	402	349	414
	494	358	398	367	417
	465				402
Dia (14)	448	284	374	390	407
	519	287	390	395	404
	460	304	345	381	433
	434	314	410	383	450
	472	288	406	407	417
	467	361	407	383	424
	477	345	386	397	424
	497				418

Anexo II. Resultados individuais de nitrogênio urinário dos grupos experimentais (mg/24h).

Grupos	1	2	2A	2B	2C
Dia (- 28)	285	293	234	222	258
	236	205	239	280	235
	427	217	261	216	281
	384	269	223	238	375
	334	249	313	393	305
	324	320	276	296	216
	275			246	385
	309				343
Dia (0)	313	267	250	319	384
	321	210	323	298	294
	312	338	241	223	353
	341	354	232	288	390
	367	317	300	422	338
	359	326	358	326	280
	253		362	290	403
	309				356
Dia (7)	337	401	297	193	450
	351	492	220	224	327
	372	346	266	187	362
	376	411	314	127	428
	368	337	368	217	353
	381	346	405	192	398
	312		394	240	501
	338				459
Dia (14)	321	424	252	242	359
	431	570	208	231	361
	302	367	207	194	392
	280	497	386	154	414
	431	412	285	197	322
	367	433	335	189	287
	330		378	227	425
	346				368

Anexo III. Concentração plasmática de aminoácidos individuais nos grupos experimentais, $\mu\text{mol/L}$.

Grupos	1	2	2A	2B	2C
Ácido aspártico	54	27	72	56	44
	51	10	90	79	53
	40	25	49	69	49
	56	31	56	67	40
	47				32
	44				24
	60				43
Ácido glutâmico	71	69	78	112	50
	64	69	104	131	63
	64	48	96	141	83
	103		62	135	73
	101				79
	57				62
	80				71
	109				67
Alanina	238	210	143	107	
	226	164	132	97	
	211	179	157	94	
	223		174	94	
	239				
	206				
	203				
	203				
Arginina	234	90	103	76	170
	182	105	97	44	155
	180	111	84	60	131
	222		105	44	175
	233				186
	235				177
	204				128
	206				171
Glicina	123	110	137	157	198
	135	107	146	125	141
	137	102	143	123	145
	154		146	153	161
	168				145
	124				163
	165				190
	176				188

Anexo IV. Concentração plasmática de aminoácidos individuais nos grupos experimentais, $\mu\text{mol/L}$.

Grupos	1	2	2A	2B	2C
Fenilalanina	83	67	79	59	60
	70	72	63	37	56
	68	54	56	46	70
	81		59	37	73
	86				66
	70				59
	76				73
	94				64
Glutamina	624	157	525	550	398
	685	170	553	585	435
	645	187	525	561	438
	648		557	585	436
	680				440
	633				381
	630				387
	648				395
Histidina	63	37	88	115	65
	74	56	86	108	73
	46	49	59	119	83
	49		56	101	77
	97				55
	50				52
	72				86
	67				55
Isoleucina	59	104	34	43	65
	47	91	52	45	60
	39	95	80	48	61
		96	89	46	49
		100	54		
		90	43		
		92	63		
		92	64		
Leucina	93	54	70	69	39
	69	54	64	41	42
	67	44	60	45	77
	93		45	46	71
	93				59
	62				36
	89				71
	97				71

Anexo V. Concentração plasmática de aminoácidos individuais nos grupos experimentais, $\mu\text{mol/L}$.

Grupos	1	2	2A	2B	2C
Lisina	57	45	42	34	30
	59	36	41	42	35
	45	33	34	38	53
	52		41	35	50
	31				38
	40				29
	49				47
	51				30
Metionina	24	34		17	14
	21	20		16	25
	15	17		17	12
	29			14	13
	31				15
	25				13
Serina	185	125	172	272	164
	168	101	198	234	113
	158	108	163	276	123
	158		191	247	144
	194				136
	159				100
	198				144
	173				160
Valina	196	129	130	58	176
	160	103	136	77	130
	189	96	130	91	144
	192		109	92	177
	203				127
	162				163
	201				130
	208				134
treonina	176	110	127	110	129
	135	90	124	85	166
	138	105	142	101	158
	166		154	83	145
	169				141
	132				145
	174				146
	179				145

Anexo VI. Enriquecimento isotópico plasmático de ¹³C leucina durante estudo cinético.

Grupo 1	KIC	LEU	KIC/leu		KIC	LEU	KIC/leu		KIC	LEU	KIC/leu	
180mim	MPE%	MPE%	MPE%	210mim	MPE%	MPE%	MPE%	240mim	MPE%	MPE%	MPE%	FSR/h
41	0.690	0.910	0.757		1.153	1.280	0.901		1.581	1.056	1.496	0.003
42	0.734	1.299	0.565		0.885	2.228	0.397		0.824	2.399	0.344	0.012
43	0.894	0.809	1.106		1.289	1.964	0.656		1.047	3.009	0.348	0.012
44	0.091	0.977	0.093		2.044	1.608	1.271		0.753	1.010	0.746	0.006
45	1.210	0.886	1.366		1.300	1.894	0.686		0.971	1.982	0.490	0.009
46	1.903	1.131	1.682		2.762	1.829	1.510		1.753	2.200	0.797	0.005
47	0.244	0.843	0.290		0.577	1.938	0.298		0.848	1.783	0.476	0.009
48	0.884	1.122	0.788		1.214	1.882	0.645		2.449	2.042	1.199	0.003

MPE%: massa por cento em excesso

FSR/h : taxa de síntese fracionada

Anexo VII. Enriquecimento isotópico plasmático de ¹³C leucina durante estudo cinético.

Grupo 2	KIC	LEU	KIC/leu		KIC	LEU	KIC/leu		KIC	LEU	KIC/leu	
180mim	MPE%	MPE%	MPE%	210mim	MPE%	MPE%	MPE%	240mim	MPE%	MPE%	MPE%	FSR/h
1	0.897	1.731	0.519		2.145	2.948	0.728		2.906	3.618	0.803	0.005
2	1.042	2.749	0.379		3.077	5.155	0.597		4.727	4.319	1.094	0.004
3	2.078	2.180	0.953		4.480	4.587	0.977		4.510	4.916	0.918	0.005
4	1.043	1.166	0.895		2.059	1.478	1.393		1.495	2.287	0.654	0.006
5	0.733	1.931	0.379		1.853	3.675	0.504		2.673	4.473	0.598	0.007
6	0.980	1.226	0.799		2.140	3.507	0.610		2.890	4.676	0.618	0.007

MPE%: massa por cento em excesso

FSR/h: taxa de síntese fracionada

Anexo VIII. Enriquecimento isotópico plasmático de ¹³C leucina durante estudo cinético.

Grupo 2A	KIC	LEU	KIC/leu		KIC	LEU	KIC/leu		KIC	LEU	KIC/leu	
180mim	MPE%	MPE%	MPE%	210mim	MPE%	MPE%	MPE%	240mim	MPE%	MPE%	MPE%	FSR/h
11	1.199	2.056	0.583		2.186	2.882	0.758		1.320	3.766	0.351	0.012
13	0.580	1.200	0.483		0.882	3.507	0.251		1.419	4.871	0.291	0.014
14	0.702	0.903	0.777		1.701	2.138	0.796		1.670	2.268	0.736	0.006
15	0.892	1.658	0.538		1.436	1.906	0.753		2.530	1.898	1.333	0.003
16	0.904	0.898	1.007		1.464	2.346	0.624		2.112	1.871	1.129	0.004
17	0.962	0.916	1.051		1.685	1.865	0.903		1.498	1.658	0.903	0.005

MPE% : massa por cento em excesso

FSR/h: taxa de síntese fracionada

Anexo IX. Enriquecimento isotópico plasmático de ¹³C leucina durante estudo cinético.

Grupo 2B	KIC	LEU	KIC/Leu		KIC	LEU	KIC/Leu		KIC	LEU	KIC/Leu	
180mim	MPE%	MPE%	MPE%	210mim	MPE%	MPE%	MPE%	240mim	MPE%	MPE%	MPE%	FSR/h
21	0.427	0.970	0.440		0.939	2.107	0.446		1.651	2.250	0.734	0.006
22	1.746	1.462	1.194		2.340	1.889	1.239		2.074	2.152	0.964	0.004
23	0.835	1.738	0.481		2.113	1.963	1.076		2.651	1.682	1.576	0.003
24	1.274	0.546	2.333		2.042	2.580	0.791		2.594	2.794	0.928	0.004
25	1.385	0.820	1.688		1.385	2.716	0.510		2.222	3.569	0.623	0.007
27	0.540	0.865	0.625		3.075	0.676	4.546		4.070	0.586	6.945	0.001
28	0.275	1.899	0.145		0.699	2.220	0.315		1.178	2.069	0.569	0.007

MPE%: massa por cento em excesso

FSR/h: taxa de síntese fracionada

Anexo X. Enriquecimento isotópico plasmático de ¹³C leucina durante estudo cinético.

Grupo 2C	KIC	LEU	KIC/leu	KIC	LEU	KIC/leu	KIC	LEU	KIC/leu			
180mi	MPE%	MPE%	MPE%	210mi	MPE%	MPE%	MPE%	240mi	MPE%	MPE%	MPE%	FSR/h
m				m				m				
31	2.275	1.132	2.010		2.945	2.513	1.172		1.531	2.615	0.586	0.007
32	0.791	1.256	0.629		1.381	1.380	1.001		2.145	1.456	1.474	0.003
33	1.523	1.711	0.890		2.658	2.287	1.162		2.627	3.849	0.683	0.006
34	1.299	1.301	0.998		1.594	1.970	0.809		1.594	2.070	0.770	0.005
35	1.044	1.224	0.853		1.366	3.228	0.423		1.454	1.325	1.097	0.004
36	0.743	0.808	0.919		1.142	2.233	0.512		2.797	1.082	2.585	0.002
37	1.658	1.212	1.368		2.583	2.202	1.173		1.907	1.882	1.013	0.004
38	1.128	1.664	0.678		2.553	2.104	1.213		2.403	2.017	1.192	0.003

MPE%: massa por cento em excesso

FSR/h: taxa de síntese fracionada

Anexo XI. Resultados individuais dos grupos experimentais de enriquecimento isotópico de ¹³C leucina na mucosa intestinal.

Grupo 1	Intracelular	proteína		Grupo 2	Intracelular	proteína	
	MPE %	MPE%	FSR/h		MPE %	MPE%	FSR/h
46	0.00196	0.00220	0.00467	1	0.00372	0.00290	0.00325
	0.00196	0.00216	0.00458		0.00368	0.00288	0.00326
48	0.00133	0.00172	0.00541	2	0.00334	0.00279	0.00347
	0.00132	0.00170	0.00537		0.00336	0.00283	0.00351
45	0.00209	0.00196	0.00391	3	0.00322	0.00271	0.00350
	0.00208	0.00193	0.00386		0.00328	0.00274	0.00348
41	0.00201	0.00212	0.00440	4	0.00335	0.00258	0.00321
	0.00203	0.00209	0.00429		0.00333	0.00251	0.00314
43	0.00220	0.00209	0.00396	5	0.00257	0.00245	0.00398
	0.00247	0.00213	0.00359		0.00256	0.00247	0.00402
44	0.00234	0.00234	0.00418	6	0.00140	0.00103	0.00306
	0.00237	0.00235	0.00413		0.00141	0.00100	0.00297
47	0.00178	0.00202	0.00473	7	0.00210	0.00264	0.00525
	0.00181	0.00201	0.00464		0.00212	0.00265	0.00521

MPE%: massa por cento em excesso

FSR/h :taxa de síntese fracionada

Anexo XII. Resultados individuais dos grupos experimentais de enriquecimento isotópico de ¹³C leucina na mucosa intestinal.

Grupo 2A	intracelular	proteína		Grupo 2B	intracelular	proteína		Grupo 2C	intracelular	proteína	
	MPE %	MPE%	FSR/h		MPE %	MPE%	FSR/h		MPE %	MPE%	FSR/h
14	0.00309	0.00303	0.00408	21	0.00253	0.00279	0.00460	31	0.00252	0.00223	0.00370
	0.00308	0.00298	0.00403		0.00238	0.00279	0.00488		0.00253	0.00225	0.00370
15	0.00232	0.00247	0.00444	24	0.00249	0.00263	0.00439	33	0.00217	0.00235	0.00450
	0.00232	0.00252	0.00452		0.00247	0.00266	0.00448		0.00214	0.00226	0.00440
16	0.00292	0.00226	0.00321	25	0.00250	0.00247	0.00412	34	0.00225	0.00208	0.00384
	0.00288	0.00223	0.00322		0.00252	0.00242	0.00399		0.00224	0.00209	0.00388
17	0.00220	0.00203	0.00385	28	0.00235	0.00280	0.00497	38	0.00159	0.00169	0.00441
	0.00222	0.00205	0.00385		0.00233	0.00281	0.00503		0.00161	0.00169	0.00438
11	0.00214	0.00216	0.00420	22	0.00194	0.00265	0.00570	32	0.00191	0.00169	0.00367
	0.00213	0.00218	0.00426		0.00194	0.00266	0.00573		0.00190	0.00166	0.00365
13	0.00202	0.00231	0.00476	23	0.00244	0.00246	0.00420	35	0.00168	0.00194	0.00483
	0.00206	0.00231	0.00468		0.00245	0.00247	0.00420		0.00166	0.00192	0.00482
18	0.00207	0.00204	0.00411	27	0.00263	0.00237	0.00375	36	0.00180	0.00213	0.00492
	0.00209	0.00208	0.00414		0.00261	0.00235	0.00375		0.00180	0.00211	0.00489
								37	0.00213	0.00226	0.00442
									0.00220	0.00224	0.00426

MPE%: massa por cento em excesso

FSR/h: taxa de síntese fracionada

Anexo XII. Fluxo e degradação individuais dos grupos experimentais de ¹³C leucina na mucosa intestinal, $\mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Grupo 1			Grupo 2			Grupo 2A			Grupo 2B			Grupo 2C		
Fluxo	Degradação		Fluxo	Degradação		Fluxo	Degradação		Fluxo	Degradação		Fluxo	Degradação	
46	5824	5813	1	3064	3053	14	3689	3678	21	4518	4506	31	4538	4526
	5815	5804		3098	3086		3710	3698		4789	4778		4505	4494
48	8623	8611	2	3411	3399	15	4922	4910	24	4578	4566	33	5258	5246
	8662	8650		3399	3387		4915	4904		4613	4601		5341	5330
45	5454	5442	3	3543	3531	16	3902	3890	25	4572	4561	34	5071	5059
	5490	5479		3476	3465		3963	3951		4527	4515		5093	5082
41	5674	5662	4	3409	3397	17	5195	5184	28	4867	4855	38	7167	7155
	5623	5612		3427	3416		5153	5141		4903	4891		7104	7093
43	5193	5181	5	4446	4434	11	5331	5320	22	5887	5876	32	5977	5965
	4630	4618		4465	4453		5356	5345		5903	5891		6011	6000
44	4882	4870	6	8166	8155	13	5643	5631	23	4672	4660	35	6820	6808
	4816	4804		8114	8102		5549	5538		4660	4649		6890	6878
47	6435	6424	7	5446	5434	18	5506	5495	27	4336	4324	36	6342	6331
	6311	6299		5394	5383		5459	5447		4374	4362		6363	6352
												37	5364	5352
													5198	5186