

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Efeito do desmame precoce e da suplementação com glutamina, *in vitro* e *in vivo*, sobre a funcionalidade de macrófagos peritoniais e o estado nutricional de camundongos

Marcelo Macedo Rogero

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo
2007

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

R723e8 Rogero, Marcelo Macedo
Efeito do desmame precoce e da suplementação com
glutamina, *in vitro* e *in vivo*, sobre a funcionalidade de
macrófagos peritoniais e o estado nutricional de camundongos /
Marcelo Macedo Rogero. -- São Paulo, 2007.
191p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos
e Nutrição Experimental

Orientador: Tirapegui Toledo, Julio Orlando

1. Nutrição experimental : Ciência dos alimentos. 2.
Imunologia. I. T. II. Tirapegui Toledo, Julio Orlando, orientador.

641.1 CDD

Marcelo Macedo Rogero

Efeito do desmame precoce e da suplementação com glutamina, *in vitro* e *in vivo*, sobre a funcionalidade de macrófagos peritoniais e o estado nutricional de camundongos

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2007.

“A vida na Terra é comparável à viagem por longas áreas de oceano. Convence-te de que, renteando com quaisquer tempestades, aflições, ventanias de discórdia, rochedos de angústia ou golpes de incompreensão — trabalha e serve sempre — porque o trabalho, em todo tempo e em toda parte, será, invariavelmente, o leme divino que nos conduzirá no rumo dos portos de paz e libertação” (Francisco Cândido Xavier; Livro “Mais Luz”).

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,
Jairo Rogero (*in memorian*) e
Maria Zélia Castelo Branco Macedo Rogero (*in memorian*),
que apesar da dor da saudade,
a certeza de reencontrá-los um dia me enche de esperança e fé.

Aos meus avós maternos,
Ana Augusta Castelo Branco Vilaça Macedo e
Manuel Bastos Pereira Macedo (*in memorian*),
pelo amor, disciplina e educação.

À minha amada esposa,
Valéria Jorge de Magalhães,
mulher, amiga e confidente, que muito mais do que compreender
os momentos difíceis, sabe se empenhar em resolvê-los. Companheira
de todas as horas e momentos, não mede esforços na busca da felicidade e
alegria para o nosso lar.

Ao meu orientador,
Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo,
pela sua amizade, orientação, paciência e confiança em todos esses anos de
convivência, e pela oportunidade do desenvolvimento desse trabalho, o qual
propiciou o meu crescimento profissional e pessoal.
Muito obrigado!

À Profa. Dra. Primavera Borelli,
pela sua amizade, pelo seu carinho e dedicação
— que visam sempre o aprendizado constante de todos os alunos que estão ao
seu redor — e por ter aberto as portas de seu laboratório para a realização de
parte desse trabalho.
Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

A **DEUS** acima de tudo, por conceder-nos a oportunidade do aprendizado constante em todas as esferas evolutivas da humanidade e por permitir a realização desse trabalho.

À minha amiga **Ivanir Santana de Oliveira Pires**, pelo seu carinho, dedicação e amizade em todos os momentos desse trabalho.

À minha amiga **Maria Carolina Borges**, que durante a realização da sua iniciação científica não mediu esforços para colaborar e enriquecer o presente trabalho.

Aos amigos do laboratório de Hematologia Clínica: **Ricardo Ambrósio Fock, Marco Aurélio Ramirez Vinolo, Mariana Cristina Ferreira Silva, Karina Nakajima e Amanda Rabello Crisma**, pelo auxílio na realização dos ensaios envolvidos na avaliação da resposta hematológica e da funcionalidade de macrófagos e também pelos momentos de descontração.

Aos funcionários do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo: **Silvânia, Flávia, Eliane, Wagner, Marcelo, Matildes, Roseni, Roberto, Isael, Ricardo e Fátima**, pelo auxílio e dedicação durante o período em que os camundongos utilizados no presente trabalho foram mantidos no biotério. Em especial, às funcionárias **Renata Alves e Renata Spalutto**, pela dedicação diária na padronização do acasalamento, gestação e lactação dos camundongos utilizados no presente trabalho.

À **Elaine Midori Ychico** e ao **Jorge Alves de Lima**, responsáveis pela Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela sua prestimosidade e dedicação em diversos momentos da realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. **Fernando Salvador Moreno**, pela acolhida no início do doutorado.

Ao **Rogério Graça Pedrosa**, pelas discussões científicas sempre proveitosas e pela sua amizade.

Ao Prof. Dr. **Sandro Rogério de Almeida**, pelo fornecimento das leveduras — *Candida albicans* —, que foram utilizadas para a realização do ensaio de fagocitose de macrófagos peritoniais.

À **Sônia Regina Caramico Buratto**, técnica do laboratório de Micologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, pelo auxílio na realização dos ensaios de fagocitose de macrófagos peritoniais.

À Profa. Dra. **Dulcinéia Saes Parra Abdalla**, por permitir a realização das dosagens de óxido nítrico em seu laboratório.

Ao **Maurício dos Santos**, técnico do Laboratório de Análises Clínicas, pelo auxílio nas dosagens de óxido nítrico.

À Profa. Dra. **Inar Alves de Castro**, pelo auxílio na análise estatística e pelos ensinamentos durante a realização desse trabalho.

Aos funcionários responsáveis pela secretaria do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, **Mônica** e **Edilson**, pela sua disposição e atenção em todas as situações.

Às funcionárias do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, **Lurdinha** e **Joana**, pela sua dedicação à organização do laboratório.

Às funcionárias responsáveis pela secretaria do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas: **Ana Maria**, **Maria Auxiliadora**, **Edna** e **Sueli**, pela ajuda prestada em diversos momentos da realização desse trabalho.

Às funcionárias do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, **Rose**, **Claudia** e **Dorlei**, pela atenção e dedicação à organização do laboratório.

À **Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda**, pelo fornecimento dos aminoácidos utilizados no preparo das rações utilizadas no presente trabalho.

Aos **funcionários da Biblioteca do Conjunto das Químicas**, pelo trabalho árduo e de primordial importância para a realização deste estudo.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão do auxílio financeiro (processo 03/01606-8) para a realização desse trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq)**, pela concessão da bolsa de doutorado, que permitiu a realização desse trabalho de maneira digna.

RESUMO

Efeito do desmame precoce e da suplementação com glutamina, *in vitro* e *in vivo*, sobre a funcionalidade de macrófagos peritoneais e o estado nutricional de camundongos

Bebês precocemente desmamados apresentam maior incidência de infecções, o que sugere que a ausência de ingestão de alguns fatores presentes no leite materno possa modificar processos de defesa. A glutamina (GLN) está presente em concentração significativa no leite materno, sendo o aumento de sua concentração diretamente proporcional ao período de aleitamento. Esse aminoácido é essencial para a funcionalidade de macrófagos, que apresentam aumento da utilização de GLN durante processos inflamatórios e infecciosos. Bebês apresentam necessidade aumentada de GLN, que é suprida pela ingestão do leite materno, enquanto bebês precocemente desmamados dependem da síntese endógena e do fornecimento exógeno de GLN; todavia, a concentração de GLN em fórmulas infantis artificiais é significativamente baixa ou inexistente. Diante desses fatos, o presente projeto avaliou: (i) o efeito do desmame precoce associado à ingestão de ração isenta e suplementada de GLN sobre a funcionalidade de macrófagos peritoneais e o estado nutricional de camundongos; (ii) o efeito da suplementação com GLN *in vitro* sobre a funcionalidade de macrófagos peritoneais de camundongos desmamados precocemente e alimentados com ração isenta de GLN; e (iii) o efeito da suplementação crônica com GLN *in vivo* sobre a funcionalidade de macrófagos peritoneais e o estado nutricional de camundongos desmamados precocemente e inoculados com bacilo de Calmette-Guérin (BCG). O desmame precoce associado à ingestão de ração isenta de GLN reduz o crescimento de camundongos e a concentração de proteína presente no fígado, no músculo esquelético e na carcaça, ao mesmo tempo em que diminui as concentrações plasmática e muscular de GLN e prejudica a resposta hematopoiética (leucopenia e linfopenia associada à redução da celularidade na medula óssea) e a funcionalidade de macrófagos peritoneais (redução da capacidade de adesão, espraiamento, fagocítica e fungicida e da síntese de óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 β e IL-6). A suplementação com GLN, por meio da ração, reverteu a diminuição da concentração muscular e hepática de proteína, enquanto essa intervenção nutricional reverteu apenas parcialmente as alterações observadas no tocante à funcionalidade de macrófagos (capacidade de espraiamento e síntese de H₂O₂, NO, TNF- α , IL-1 e IL-6). A suplementação com GLN *in vitro*, similarmente ao efeito da suplementação *in vivo*, reverteu apenas parcialmente o prejuízo da função de macrófagos peritoneais de camundongos desmamados precocemente (capacidade de adesão, espraiamento e fagocítica e síntese de H₂O₂, NO e IL-6). A suplementação crônica com GLN acarreta em aumento da função de macrófagos peritoneais de camundongos previamente inoculados com BCG (capacidade de adesão, espraiamento e fungicida e síntese de H₂O₂, NO e TNF- α). A partir dos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que a GLN modula a função de macrófagos peritoneais de camundongos desmamados precocemente, contudo, a ausência desse aminoácido na dieta é responsável parcialmente pelo prejuízo induzido pelo desmame precoce.

Palavras-chave: Glutamina. Macrófagos. Suplementação. Desmame precoce. Hemopoese.

ABSTRACT

Effect of precocious weaning and *in vitro* and *in vivo* supplementation with glutamine on the functionality of peritoneal macrophages and on the nutritional state of mice

Precociously weaned infants present a higher incidence of infections, which suggests that the absence of ingestion of certain factors present in maternal milk may modify the organism's processes of defence. Glutamine (GLN) is present in a significant concentration in maternal milk, this concentration increasing proportionally with the duration of lactation. This amino acid is essential for the correct functioning of macrophages, which increase their demand for GLN during inflammatory and infectious processes. Infants present a high demand for GLN, which is supplied by the ingestion of maternal milk. Precociously weaned infants, on the other hand, depend on the endogenous synthesis and on the exogenous supply of GLN, however, the concentration of GLN in artificial formulations for infants is significantly low or nonexistent. In view of these facts, this study sought to evaluate: (i) the effect in mice of precocious weaning coupled with an ingestion of either a GLN-free or rich diet on the functionality of their peritoneal macrophages and their nutritional state; (ii) the effect of an *in vitro* supplementation with GLN on the functionality of peritoneal macrophages obtained from precociously weaned mice that were fed a GLN-free diet; and (iii) the effect of a chronic supplementation with GLN *in vivo* on the functionality of peritoneal macrophages and on the nutritional state of precociously weaned mice that were previously inoculated with BCG. Early weaning coupled with the ingestion of a GLN-free diet slows down growth in mice and decreases the concentration of protein in the liver, in the skeletal muscle and in the carcass, and at the same time decreases the concentration of GLN in the plasma and in the muscle, hindering the haematopoietic response (resulting in leucopenia and lymphopenia associated to the decrease in bone marrow cellularity) as well as the functionality of peritoneal macrophages (decrease in their capacity to adhere, spread, phagocytose, kill fungi and synthesise nitric oxide (NO), hydrogen peroxide (H₂O₂), tumour necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and IL-6). The supplementation with GLN through ingestion of ration was able to reverse the fall in muscle and liver concentrations of protein, whereas it only partly reversed the alterations observed as to the functionality of macrophages (adhesion, spreading, and synthesis of H₂O₂, NO, TNF- α , IL-1 and IL-6). The *in vitro* supplementation with GLN, like the effect of the supplementation *in vivo*, was able to only partly reverse the hindering of the functionality of peritoneal macrophage obtained from precociously weaned mice (as to adhesion, spreading, phagocytosis and synthesis of H₂O₂, NO and IL-6). The chronic supplementation with GLN leads to an increase in the functionality of peritoneal macrophages obtained from mice that were previously inoculated with BCG (as to adhesion, spreading, killing fungi and synthesis of H₂O₂, NO and TNF- α). We can therefore conclude, from the results obtained in this study that GLN modulates the functionality of peritoneal macrophages obtained from precociously weaned mice and that the absence of GLN in the diet is partly responsible for the damage induced by precocious weaning.

Key words: Glutamine. Macrophages. Supplementation. Precocious Weaning. Haematopoiesis.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Síntese e utilização de glutamina por diversos tecidos e órgãos do organismo.....	7
Figura 2. Bactéria Gram-negativa.....	13
Figura 3. Vias de ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B).....	14
Figura 4. Metabolismo da glutamina em macrófagos.....	17
Figura 5. Distribuição mundial da mortalidade infantil.....	22
Figura 6. Consumo de ração de camundongos desmamados no 14º dia de vida e alimentados até o 21º dia de vida com ração isenta de glutamina (DESM) ou suplementada com glutamina (GLN).....	67
Figura 7. Pesos absolutos de tecidos referentes aos grupos da etapa 1.....	69
Figura 8. Concentração de proteína no músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro referente aos grupos da etapa 1.....	71
Figura 9. Concentração de RNA no músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro referente aos grupos da etapa 1.....	72
Figura 10. Razão entre as concentrações de proteína e de RNA no músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro referente aos grupos da etapa 1.....	73
Figura 11. Concentração de DNA no músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro referente aos grupos da etapa 1.....	74
Figura 12. Contagem total e diferencial de células presentes no lavado peritoneal referente aos grupos da etapa 1.....	80
Figura 13. Distribuição percentual de células presentes no lavado peritoneal referente aos grupos da etapa 1.....	81
Figura 14. Capacidade de adesão de macrófagos peritoneais de camundongos da etapa 1.....	81
Figura 15. Teste de espreiamento de macrófagos peritoneais de camundongos da etapa 1.....	82
Figura 16. (A) Teste de fagocitose e (B) atividade fungicida de macrófagos peritoneais referentes aos grupos da etapa 1.....	83
Figura 17. Síntese de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a partir de macrófagos peritoneais de camundongos da etapa 1.....	84
Figura 18. Síntese de óxido nítrico e (B) área sob a curva correspondente à cinética de síntese de óxido nítrico em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos da etapa 1.....	85

Figura 19.	Síntese de (A) TNF- α , (B) IL-1 β , (C) IL-6 e (D) IL-10 em culturas de macrófagos peritoniais de camundongos da etapa 1.....	87
Figura 20.	Área sob a curva correspondente à cinética de síntese de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 <i>in vitro</i> por macrófagos peritoniais de camundongos da etapa 1.....	88
Figura 21.	Teste de adesão de macrófagos peritoniais de camundongos amamentados até o 21º dia de vida (AMAM) ou desmamados no 14º dia de vida e alimentados com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida (DESM) (etapa 2).....	90
Figura 22.	Capacidade de espraiamento de macrófagos peritoniais de camundongos amamentados até o 21º dia de vida (AMAM) ou desmamados no 14º dia de vida e alimentados com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida (DESM) (etapa 2).....	91
Figura 23.	(A) Teste de fagocitose e (B) atividade fungicida de macrófagos peritoniais de camundongos amamentados até o 21º dia de vida (AMAM) ou desmamados no 14º dia de vida e alimentados com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida (DESM) (etapa 2).....	92
Figura 24.	Síntese de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) <i>in vitro</i> a partir de macrófagos peritoniais de camundongos amamentados até o 21º dia de vida (AMAM) ou desmamados no 14º dia de vida e alimentados com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida (DESM) (etapa 2).....	93
Figura 25.	(A) Cinética e (B) área sob a curva relativas à síntese de óxido nítrico (NO) a partir de macrófagos peritoniais de camundongos amamentados até o 21º dia de vida (AMAM) ou desmamados no 14º dia de vida e alimentados com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida (DESM) (etapa 2).....	94
Figura 26.	(A) Cinética e (B) área sob a curva relativas à síntese de TNF- α <i>in vitro</i> a partir de macrófagos peritoniais de camundongos amamentados até o 21º dia de vida (AMAM) ou desmamados no 14º dia de vida e alimentados com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida (DESM) (etapa 2).....	95
Figura 27.	(A) Cinética e (B) área sob a curva relativas à síntese de IL-1 β <i>in vitro</i> a partir de macrófagos peritoniais de camundongos amamentados até o 21º dia de vida (AMAM) ou desmamados no 14º dia de vida e alimentados com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida (DESM) (etapa 2).....	96
Figura 28.	(A) Cinética e (B) área sob a curva relativas à síntese de IL-6 <i>in vitro</i> a partir de macrófagos peritoniais de camundongos amamentados até o 21º dia de vida (AMAM) ou desmamados no 14º dia de vida e alimentados com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida (DESM) (etapa 2).....	98

Figura 29.	(A) Cinética e (B) área sob a curva relativas à síntese de IL-10 <i>in vitro</i> a partir de macrófagos peritoneais de camundongos amamentados até o 21º dia de vida (AMAM) ou desmamados no 14º dia de vida e alimentados com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida (DESM) (etapa 2).....	99
Figura 30.	Pesos de tecidos dos grupos da etapa 3.....	102
Figura 31.	Contagem de células presentes no lavado peritoneal de camundongos dos grupos da etapa 3.....	112

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Relações entre o sistema imune de bebês e a função imune do leite materno.....	25
Tabela 2. Os dez passos para o sucesso do aleitamento materno da Iniciativa Hospital Amigo da Criança.....	29
Tabela 3. Formulação das rações experimentais.....	39
Tabela 4. Perfil de aminoácidos das rações isenta de glutamina (-GLN) e suplementada com glutamina (+GLN).....	40
Tabela 5. Ganho de peso (g) referente aos grupos da etapa 1.....	66
Tabela 6. Parâmetros plasmáticos e séricos dos grupos da etapa 1.....	68
Tabela 7. Parâmetros teciduais relativos ao metabolismo da glutamina dos grupos da etapa 1.....	70
Tabela 8. Massa e composição química da carcaça dos grupos da etapa 1..	75
Tabela 9. Valores percentuais relativos à composição química da carcaça dos grupos da etapa 1.....	75
Tabela 10. Eritrograma e contagem de reticulócitos referente aos grupos da etapa 1.....	76
Tabela 11. Contagem total e diferencial de leucócitos presentes no sangue periférico referente aos grupos da etapa 1.....	77
Tabela 12. Mielograma referente aos grupos da etapa 1.....	78
Tabela 13. Esplenograma referente aos grupos da etapa 1.....	79
Tabela 14. Peso corporal e consumo de ração dos grupos da etapa 3.....	100
Tabela 15. Parâmetros plasmáticos e séricos dos grupos da etapa 3.....	101
Tabela 16. Parâmetros teciduais relativos ao metabolismo da glutamina referentes aos grupos da etapa 3.....	103
Tabela 17. Concentrações teciduais de proteína, RNA e DNA referentes aos grupos da etapa 3.....	104
Tabela 18. Massa e composição química da carcaça referentes aos grupos da etapa 3.....	105
Tabela 19. Percentual relativo à composição química da carcaça corporal referentes aos grupos da etapa 3.....	105

Tabela 20. Eritrograma e contagem de reticulócitos dos grupos da etapa 3....	106
Tabela 21. Leucograma dos grupos da etapa 3.....	107
Tabela 22. Mielograma dos grupos da etapa 3.....	109
Tabela 23. Esplenograma dos grupos da etapa 3.....	111
Tabela 24. Capacidade de adesão de macrófagos peritoniais dos grupos da etapa 3.....	113
Tabela 25. Capacidade de espraiamento de macrófagos peritoniais dos grupos da etapa 3.....	114
Tabela 26. Capacidade de fagocitose de macrófagos peritoniais dos grupos da etapa 3.....	115
Tabela 27. Atividade fungicida de macrófagos peritoniais dos grupos da etapa 3.....	115
Tabela 28. Síntese de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e de óxido nítrico (NO) a partir de macrófagos peritoniais dos grupos da etapa 3.....	116
Tabela 29. Síntese de TNF- α por macrófagos peritoniais dos grupos da etapa 3.....	117
Tabela 30. Síntese de IL-1 β por macrófagos peritoniais dos grupos da etapa 3.....	118
Tabela 31. Síntese de IL-6 por macrófagos peritoniais dos grupos da etapa 3.....	119
Tabela 32. Síntese de IL-10 por macrófagos peritoniais dos grupos da etapa 3.....	120
Tabela 33. Resumo dos resultados observados na etapa 1 referentes à avaliação do estado nutricional.....	121
Tabela 34. Resumo dos resultados observados nas etapas 1 e 2 referentes à avaliação da funcionalidade de macrófagos peritoniais.....	123
Tabela 35. Resumo dos resultados observados na etapa 3 referentes à avaliação do estado nutricional.....	124
Tabela 36. Resumo dos resultados observados na etapa 3 referentes à avaliação da funcionalidade de macrófagos peritoniais.....	126

LISTA DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1. Determinações realizadas na etapa 1.....	43
Esquema 2. Determinações realizadas na etapa 2.....	44
Esquema 3. Determinações realizadas na etapa 3.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
AIN	<i>American Institute of Nutrition</i>
AP-1	Ativador da proteína-1
ATP	Adenosina trifosfato
BCG	Bacilos de Calmette-Guérin
DHA	Ácido graxo poliinsaturado docosaexaenóico
EDTA	Sal do ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EN	Enterocolite necrosante
EPO/EOC	Eritroblatos policromáticos e ortocromáticos
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FcγRI	Receptor para a imunoglobulina IgG
GABA	Ácido gama aminobutírico
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
G/E	Relação grânulo-eritróide
GH	Hormônio do crescimento
G/L	Relação grânulo-linfóide
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GS	Glutamina sintetase
GSH	Glutationa
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana 1
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina

IHAC	Iniciativa Hospital Amigo da Criança
IκB	Inibidor do NF-κB
IKK	Quinase inibidora do IκB
IL	Interleucina
IL-1R	Receptor de IL-1
IMP	Inosina monofosfato
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IRAK	Quinase associada ao receptor de IL-1
LBP	Proteína ligadora de LPS
LCK	Proteína com atividade tirosina quinase
L/E	Relação linfo-eritróide
LPS	Lipopolissacarídeo
MAGUK	Quinase guanilato associada à membrana
MAP	Proteína ativada por mitógeno
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MD-2	Proteína acessória extracelular
MEKK3	MAP/ERK quinase quinase 3
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MYD88	Proteína adaptadora citoplasmática
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NEMO	Modulador essencial da subunidade regulatória do NF-κB
NF-κB	Fator nuclear-κB
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator de ativação plaquetário
PAMP	Modelos moleculares de associação a patógenos

PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCA	Ácido perclórico
PKC θ	Proteína quinase C θ
PMA	Forbol-12-acetato-13-miristato
RIP	Quinase serina/treonina de interação com receptor
RNA _m	RNA mensageiro
SHN	Soro homólogo normal
TAB1	Proteína ligadora de TAK1
TAB2	Proteína ligadora de TRAF6 à TAK1
TAK1	Quinase ativada pelo fator de transformação do crescimento β
TCA	Ácido tricloroacético
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TIR	Domínio do receptor Toll/IL-1
TLR	Receptores do tipo Toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNFR1	Receptor 1 do TNF
TRADD	Receptor de TNF associado via domínio da morte
TRAF2	Fator 2 associado ao receptor de TNF
TRAF6	Fator 6 associado ao receptor de TNF
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	01
2. JUSTIFICATIVA	03
3. REVISÃO DA LITERATURA	06
3.1 Metabolismo da glutamina	06
3.2 Macrófagos	08
3.2.1 Mecanismos de ativação de macrófagos induzidos por lipopolissacarídeos (LPS)	11
3.3 Metabolismo da glutamina em macrófagos	16
3.4 Metabolismo da glutamina durante a infecção	19
3.5 Leite materno	20
3.5.1 Características nutricionais e imunológicas do leite materno	23
3.5.2 Prevalência do aleitamento materno exclusivo	26
3.6 Desmame, glutamina e imunocompetência	31
4. OBJETIVOS	33
5. MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1 Condições experimentais	34
5.1.1 Animais	34
5.1.2 Acasalamento, gestação e lactação	34
5.1.3 Grupos experimentais	36
5.1.4 Ração	38
5.1.5 Curva de crescimento	41
5.1.6 Indução ao processo inflamatório	41
5.2 Obtenção do material biológico	41
5.3 Parâmetros plasmáticos e séricos	46
5.3.1 Determinação da concentração plasmática de glutamina	46
5.3.2 Determinação da concentração sérica de proteínas totais	46
5.3.3 Determinação da concentração sérica de albumina	46
5.3.4 Determinação da concentração sérica de glicose	46
5.3.5 Determinação da concentração sérica de ferro	47
5.3.6 Determinação da concentração sérica de insulina	47
5.3.7 Determinação da concentração sérica de corticosterona	47

5.3.8 Determinação da concentração sérica do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1)	47
5.4 Parâmetros teciduais	48
5.4.1 Determinação das concentrações muscular e hepática de glutamina	48
5.4.2 Extração de proteína, RNA e DNA no músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro	48
5.4.3 Determinação da concentração de proteína no músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro	49
5.4.4 Determinação da concentração de RNA no músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro	49
5.4.5 Determinação da concentração de DNA no músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro	49
5.4.6 Determinação da atividade máxima da enzima glutamina sintetase no músculo gastrocnêmio e no fígado	50
5.5 Análise da composição química da carcaça	51
5.6 Avaliação hematológica.....	51
5.6.1 Determinação do hemograma e da contagem de reticulócitos	51
5.6.2 Mielograma	52
5.6.3 Esplenograma	53
5.6.4 Critérios para classificação das células hemopoéticas	53
5.6.5 Relação grânulo-eritrocítica	54
5.6.6 Relação linfo-eritrocítica	54
5.6.7 Relação grânulo-linfóide	54
5.7 Avaliação de aspectos funcionais de macrófagos peritoniais	55
5.7.1 Obtenção de macrófagos residentes	56
5.7.2 Viabilidade e número de células presentes no lavado peritoneal ..	56
5.7.3 Avaliação da síntese de óxido nítrico por macrófagos peritoniais	57
5.7.4 Avaliação da síntese de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoniais	58
5.7.5 Teste de adesão e de espriamento de macrófagos peritoniais ..	59

5.7.6 Teste de fagocitose e da atividade fungicida, <i>in vitro</i> , de macrófagos peritoniais	60
5.7.6.1 Obtenção de soro homólogo normal	60
5.7.6.2 Preparo e opsonização da suspensão de <i>Candida albicans</i>	60
5.7.6.3 Obtenção da suspensão de macrófagos peritoniais	61
5.7.6.4 Ensaio	61
5.7.6.5 Avaliação da fagocitose	61
5.7.6.6 Avaliação da atividade fungicida	62
5.7.7 Avaliação da síntese de citocinas <i>in vitro</i>	62
5.7.8 Determinação da concentração de proteína celular em cultura de macrófagos peritoniais	64
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	65
7. RESULTADOS	66
7.1 Resultados referentes à Etapa 1	66
7.1.1 Ganho de peso	66
7.1.2 Consumo diário de ração	67
7.1.3 Parâmetros plasmáticos e séricos	67
7.1.4 Parâmetros teciduais	68
7.1.4.1 Peso de tecidos.....	68
7.1.4.2 Parâmetros teciduais relativos ao metabolismo da glutamina ..	69
7.1.4.3 Concentração de proteína no músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro	70
7.1.4.5 Concentração de RNA no músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro	71
7.1.4.7 Razão entre as concentrações de proteína e de RNA no músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro	72
7.1.4.8 Concentração de DNA no músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro	73
7.1.5 Massa e composição química da carcaça dos grupos experimentais da etapa 1	74

7.1.6 Avaliação hematológica	76
7.1.6.1 Eritrograma e contagem de reticulócitos	76
7.1.6.2 Leucograma	76
7.1.7 Mielograma	77
7.1.8 Esplenograma	78
7.1.9 Parâmetros de avaliação de aspectos funcionais de macrófagos peritoniais	80
7.1.9.1 Contagem total e diferencial de células do lavado peritonal	80
7.1.9.2 Teste de adesão de macrófagos peritoniais	81
7.1.9.3 Teste de espraiamento de macrófagos peritoniais	82
7.1.9.4 Teste de fagocitose e atividade fungicida de macrófagos peritoniais	82
7.1.9.5 Síntese de peróxido de hidrogênio em cultura de macrófagos peritoniais	83
7.1.9.6 Síntese de óxido nítrico em cultura de macrófagos peritoniais .	84
7.1.9.7 Síntese de citocinas, <i>in vitro</i> , por macrófagos peritoniais	85
7.1.9.7.1 Área sob a curva correspondente à cinética de síntese de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 <i>in vitro</i>	87
7.2 Resultados referentes à Etapa 2	89
7.2.1 Parâmetros de avaliação de aspectos funcionais de macrófagos peritoniais	89
7.2.1.1 Teste de adesão de macrófagos peritoniais	89
7.2.1.2 Capacidade de espraiamento de macrófagos peritoniais	90
7.2.1.3 Teste de fagocitose e atividade fungicida de macrófagos peritoniais	91
7.2.1.4 Síntese de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoniais .	92
7.2.1.5 Síntese de óxido nítrico por macrófagos peritoniais	93
7.2.1.6 Síntese de citocinas <i>in vitro</i> por macrófagos peritoniais	94
7.2.1.6.1 Síntese de TNF- α <i>in vitro</i> por macrófagos peritoniais	94
7.2.1.6.2. Síntese de IL-1 β <i>in vitro</i> por macrófagos peritoniais	95
7.2.1.6.3 Síntese de IL-6 <i>in vitro</i> por macrófagos peritoniais	97
7.2.1.6.4 Síntese de IL-10 <i>in vitro</i> por macrófagos peritoniais	98

7.3 Resultados referentes à Etapa 3	100
7.3.1 Peso corporal e consumo de ração	100
7.3.2 Parâmetros plasmáticos e séricos	100
7.3.3 Parâmetros teciduais	101
7.3.3.1 Peso dos tecidos dos grupos da Etapa 3	101
7.3.3.2 Parâmetros teciduais relativos ao metabolismo da glutamina ...	102
7.3.3.3 Concentração tecidual de proteína, RNA e DNA	103
7.3.3.4 Análise da composição química da carcaça	104
7.3.4 Avaliação hematológica	106
7.3.4.1 Eritrograma e contagem de reticulócitos	106
7.3.4.2 Leucograma.....	106
7.3.4.3 Mielograma	107
7.3.4.4 Esplenograma	110
7.3.5 Parâmetros de avaliação de aspectos funcionais de macrófagos peritoniais	112
7.3.5.1 Contagem de células peritoniais.....	112
7.3.5.2 Teste de adesão de macrófagos peritoniais	113
7.3.5.3 Capacidade de espraiamento de macrófagos peritoniais	113
7.3.5.4 Capacidade de fagocitose e atividade fungicida de macrófagos peritoniais	114
7.3.5.5 Síntese de peróxido de hidrogênio e de óxido nítrico	116
7.3.5.6 Síntese de citocinas <i>in vitro</i> por macrófagos peritoniais	117
7.3.5.6.1 Síntese de TNF- α <i>in vitro</i> por macrófagos peritoniais	117
7.3.5.6.2 Síntese de IL-1 β <i>in vitro</i> por macrófagos peritoniais	118
7.3.5.6.3 Síntese de IL-6 <i>in vitro</i> por macrófagos peritoniais	119
7.3.5.6.4 Síntese de IL-10 <i>in vitro</i> por macrófagos peritoniais	120
8. DISCUSSÃO.....	127
8.1 Etapa 1	127
8.1 Etapa 2	147
8.1 Etapa 3	155
9. CONCLUSÕES.....	163
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	164

1. INTRODUÇÃO

A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no plasma e tecido muscular e é utilizada em altas taxas por células de divisão rápida para fornecer energia e favorecer a biossíntese de nucleotídeos, além de atuar tanto no anabolismo protéico quanto na promoção do processo de adaptação e crescimento de tecidos altamente especializados. Estudos em animais em fase de crescimento demonstram que este aminoácido representa um substrato essencial para enterócitos e leucócitos, além de favorecer a absorção intestinal de eletrólitos (NEU *et al.*, 1997; BALL e HARDY, 2002; AVENELL, 2006).

Contudo, as concentrações plasmática e tecidual de glutamina estão diminuídas em situações clínicas e catabólicas, tais como: traumas, queimaduras, sepse, pós-operatório, diabetes não-controlado e após exercício exaustivo. Durante estas circunstâncias, a diminuição da concentração de glutamina plasmática ocorre devido à taxa de captação e utilização deste aminoácido por diversos tecidos ser superior à taxa de síntese e liberação pelo músculo esquelético (PARRY-BILLINGS *et al.*, 1989; MITTENDORFER *et al.*, 1999; ROGERO *et al.*, 2002b; PARIMI e KALHAN, 2007). Paralelamente, estas situações estão associadas ao aumento da suscetibilidade a infecções, sugerindo-se que isto pode ser parcialmente devido à diminuição do fornecimento de glutamina para células imunocompetentes, como macrófagos (ROWBOTTOM *et al.*, 1995; KEW *et al.*, 1999; revisado por ROGERO e TIRAPEGUI, 2003b; LI *et al.*, 2007). Essas situações levaram à modificação da classificação da glutamina de aminoácido não essencial ou dispensável para aminoácido condicionalmente essencial ou condicionalmente indispensável (SMITH, 1990).

Macrófagos apresentam papel chave tanto na resposta imune inespecífica quanto na adquirida, além de apresentarem alta taxa de utilização de glutamina, que é fundamental para o fornecimento de energia e nitrogênio. A ativação destas células — tanto por bacilos de Calmette Guérin (BCG) quanto por lipopolissacarídeos (LPS) — acarreta em aumento da síntese de RNA mensageiro (RNAm), a qual é mantida pelo aminoácido glutamina, que atua como precursor de bases nitrogenadas. O aumento do processo de transcrição de proteínas secretórias, tais como citocinas, permite a modulação

da resposta imune. Tanto citocinas quanto glicocorticóides estimulam a degradação protéica e a atividade da enzima glutamina sintetase no músculo esquelético durante um processo infeccioso. Em relação às citocinas, destaca-se o papel do fator de necrose tumoral (TNF)- α , o qual favorece a degradação protéica e promove o aumento da atividade da enzima muscular glutamina sintetase (NEWSHOLME *et al.*, 1987; SOUBA *et al.*, 1990; CALDER, 1995; CHAKRABARTI, 1998; WELLS *et al.*, 1999; BOELENIS *et al.*, 2001).

Estudos recentes demonstraram que o metabolismo da glutamina em macrófagos é essencial para a síntese de interleucinas (IL), tais como IL-1, IL-6 e IL-8 (NEWSHOLME e CALDER, 1997; MURPHY e NEWSHOLME, 1998; BELLOWS e JAFFE, 1999; NEWSHOLME, 2001). Segundo Murphy e Newsholme (1999), a síntese de TNF- α estimulada por LPS, a partir de macrófagos peritoniais de camundongos previamente inoculados com BCG, é dependente da concentração extracelular de glutamina. Além disso, a glutamina representa um precursor do aminoácido arginina na biossíntese de óxido nítrico, que é conhecido como uma substância efetora de atividades antibacterianas e antitumorais de macrófagos (MURPHY e NEWSHOLME, 1997; WELLS *et al.*, 1999).

Desse modo, a ativação de macrófagos durante um processo infeccioso, a qual acarreta em alteração do padrão de produtos secretados – que atuam na destruição de microrganismos e na regulação da resposta imune – pode ser influenciada pela concomitante diminuição da glutaminemia, que é decorrente do aumento da demanda corporal — que supera a taxa de síntese muscular e/ou o fornecimento exógeno, conforme assinalado anteriormente (COSTA ROSA *et al.*, 1994; NEWSHOLME *et al.*, 1996).

2. JUSTIFICATIVA

O período de crescimento e desenvolvimento entre o nascimento e o desmame é crucial para o bem-estar do organismo em longo prazo (REEDS *et al.*, 2000). Contudo, o desmame, período de transição entre a ingestão do leite materno e a ingestão de outros alimentos, representa, para bebês, o período de maior risco de desnutrição, prejuízo do crescimento e infecções (BLECHA *et al.*, 1983; WILSON *et al.*, 1989; YOO *et al.*, 1997; FILTEAU, 2000). Bebês são particularmente vulneráveis a infecções bacterianas como resultado de deficiências intrínsecas da sua resposta imune, sendo a septicemia uma das principais causas de morte em crianças (VEJCHAPIPAT *et al.*, 2002).

O leite materno é o melhor exemplo de alimento com reconhecidas propriedades imunonutritivas (LEVY, 1998), sendo o aleitamento materno um componente fundamental de programas de saúde infantil. Os benefícios do aleitamento em relação à prevenção do ciclo desnutrição-infecção são maiores especialmente em países menos desenvolvidos. Em países desenvolvidos a incidência de infecções é também menos prevalente em infantis alimentados com leite materno (FILTEAU, 2000).

O leite materno contém um *pool* de aminoácidos livres, os quais são caracterizados dentro da fração nitrogenada não-protéica do leite materno, que também inclui peptídeos, uréia, ácido úrico, amônia, creatinina, creatina, ácidos nucléicos, carnitina, amino-açúcares e outros compostos. Estes compostos têm sido considerados potencialmente funcionais, aliado ao fato do leite materno possuir uma quantidade de aminoácidos livres duas a cinco vezes maior quando comparado às formulas infantis comercializadas (AGOSTONI *et al.*, 2000a). A elevada concentração de aminoácidos livres no leite materno pode contribuir significativamente durante o período pós-natal, tanto nas alterações iniciais da concentração plasmática de aminoácidos livres, que ocorrem durante o período de amamentação, quanto no fornecimento de nitrogênio metabolizável para o *pool* corporal total de aminoácidos. Todavia, com a progressão do estágio de lactação, observa-se diminuição significativa da concentração da maioria dos aminoácidos livres presentes no leite materno, ao mesmo tempo em que a concentração de glutamina e glutamato aumenta aproximadamente 20 e 2,5 vezes, respectivamente, durante os três primeiros

meses de lactação, até alcançar 50% do total de aminoácidos livres no leite materno (AGOSTONI *et al.*, 2000a; AGOSTONI *et al.*, 2000b).

O significado desta alta concentração de glutamina livre no leite materno pode estar relacionado ao papel deste aminoácido como substrato energético para enterócitos e células do sistema imune (AGOSTONI *et al.*, 2000b). Além disso, estudos demonstram que tanto no colostro quanto no leite materno, dos aminoácidos ligados à proteína, glutamina e glutamato representam aqueles de maior concentração, sendo que o conteúdo destes no leite materno aumenta progressivamente com o decorrer do processo de amamentação (DAVIS *et al.*, 1993; DAVIS *et al.*, 1994a; WU e KNABE, 1994). Davis *et al.* (1994b) verificaram que a concentração de glutamina e glutamato (livre e ligado à proteína) no leite materno é superior a de outros aminoácidos, tanto em diversas espécies de primatas quanto de não-primatas.

Lactentes apresentam elevada necessidade de glutamina, a qual é, sob circunstâncias normais, atendida pela ingestão do leite materno. Em contraste, bebês nascidos a termo e desmamados precocemente ou bebês prematuros não amamentados são privados desta fonte exógena, o que lhes acarreta a dependência exclusiva da síntese endógena ou do fornecimento exógeno deste aminoácido. Além disso, observa-se que a concentração de glutamina em fórmulas infantis artificiais é extremamente baixa ou inexistente (WILSON *et al.*, 1989; YOO *et al.*, 1997; AGOSTONI *et al.*, 2000a; BALL e HARDY, 2002).

Concomitantemente ao desmame precoce e conseqüente menor fornecimento exógeno de glutamina, verifica-se aumento da suscetibilidade de bebês a infecções, que ocasionam diminuição da concentração plasmática e tecidual de glutamina, fato este que pode provocar alteração da funcionalidade de leucócitos, tais como macrófagos (NEWSHOLME *et al.*, 1999). Corroborando esses fatos, Neu *et al.* (1997) observaram que a suplementação com glutamina em neonatos de muito baixo peso ao nascer diminuiu a incidência de sepse e a morbidade em relação ao grupo controle, enquanto Becker *et al.* (2000) observaram que neonatos que apresentaram enterocolite necrosante (EN) demonstraram concentração plasmática de glutamina extremamente baixa, 10 dias anteriormente à detecção dos sinais clínicos desta doença, indicando que a deficiência de glutamina pode predispor ao surgimento de EN. Korkmaz *et al.* (2007) verificaram, em neonatos pré-termo e

com baixo peso ao nascer, que a suplementação enteral com glutamina (0,3 g/kg de massa corporal/dia), ao longo dos quatro primeiros meses de vida, promoveu significativa melhora no crescimento, por meio da avaliação de parâmetros como massa e estatura corporais e circunferências da cabeça, braço e coxa ao final do quarto mês de vida. Os resultados desse estudo indicam que o efeito da glutamina sobre os parâmetros de crescimento é dependente do tempo de suplementação em neonatos pré-termo e com baixo peso ao nascer.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Metabolismo da glutamina

A glutamina apresenta diversas funções únicas no organismo, o que reforça o papel relevante deste aminoácido tanto em estados normais como fisiopatológicos. Esse aminoácido está envolvido na transferência de nitrogênio e de cadeia carbônica entre órgãos; na detoxificação de amônia; na manutenção do balanço ácido-base durante a acidose; na regulação da síntese e da degradação protéica; no crescimento e diferenciação celular; no fornecimento de energia para células de rápida proliferação, como enterócitos e células do sistema imune; na promoção da melhora da permeabilidade e integridade intestinais; e no aumento da resistência à infecção pelo fornecimento de energia aos fibroblastos, aumentando a síntese de colágeno, e pelo aumento da função fagocitária. Além disso, a glutamina é precursora da ureogênese e gliconeogênese hepáticas e de mediadores, como o ácido gama aminobutírico (GABA) e o glutamato, ao mesmo tempo em que é doadora de nitrogênio para a síntese de nucleotídeos (KOYAMA *et al.*, 1998; VASCONCELOS e TIRAPEGUI, 1998; WALSH *et al.*, 1998a; revisado por ROGERO e TIRAPEGUI, 2000; YOUNG e AJAMI, 2001; CURI *et al.*, 2007).

As duas principais enzimas intracelulares envolvidas no metabolismo da glutamina são a glutamina sintetase e a glutaminase. A primeira é responsável pela reação que catalisa a conversão de glutamina a partir de amônia e glutamato, na presença de adenosina trifosfato (ATP), enquanto a segunda é responsável pela hidrólise da glutamina, convertendo-a em glutamato e amônia (MOSKOVITZ *et al.*, 1994). Quanto à localização intracelular, verifica-se que a glutamina sintetase é encontrada primariamente no citosol, enquanto que a glutaminase, na sua forma ativa, apresenta-se principalmente na mitocôndria. Essas localizações são compatíveis com as funções dessas enzimas: glutamina sintetase produzindo glutamina para síntese de proteínas citoplasmáticas e nucleotídeos e glutaminase catalisando a utilização de glutamina como fonte de energia (NEU *et al.*, 1996).

Dentre os órgãos envolvidos na síntese de glutamina incluem-se músculo esquelético, pulmões, fígado, cérebro e, possivelmente, tecido

adiposo, os quais contêm atividade da enzima glutamina sintetase. Por outro lado, tecidos que são primariamente consumidores de glutamina — células da mucosa intestinal, leucócitos e células do túbulo renal — contêm elevada atividade da enzima glutaminase (WALSH *et al.*, 1998b). Sob certas condições, tal como reduzido aporte de carboidratos, o fígado pode tornar-se um sítio consumidor de glutamina (ROWBOTTOM *et al.*, 1996; ROGERO *et al.*, 2006) (figura 1).

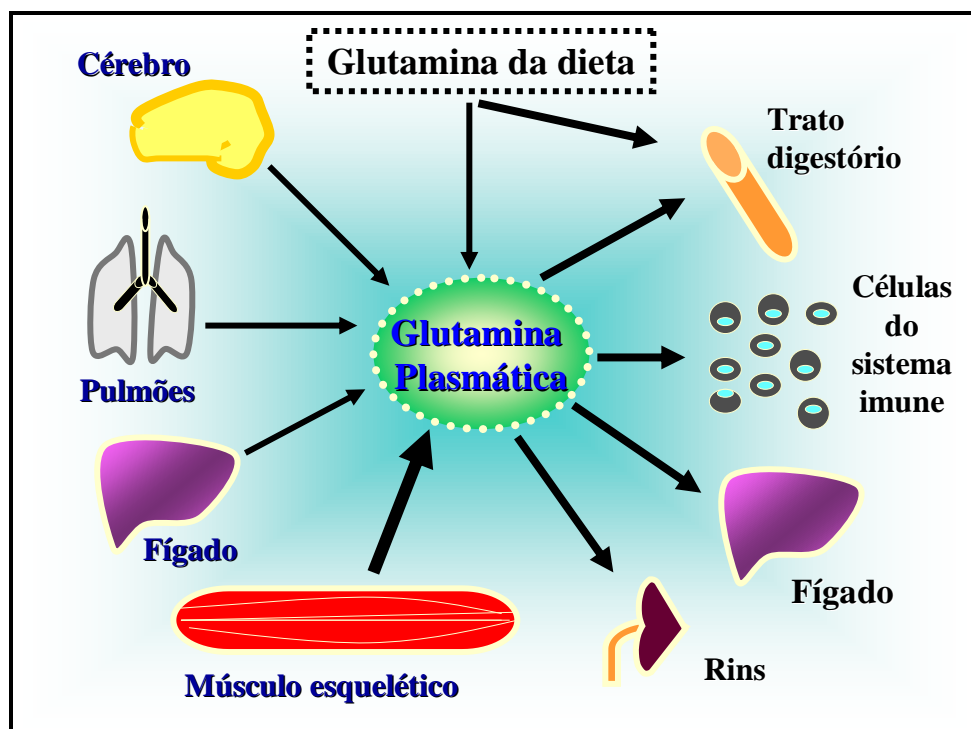


Figura 1. Síntese e utilização de glutamina por diversos tecidos e órgãos do organismo.

Modificado de Rogero e Tirapegui (2003a).

O trato digestório é o principal tecido de captação e metabolismo da glutamina do organismo. A glutamina necessária para o intestino é consumida primariamente pelas células da mucosa, que representam a maior massa de células de rápida proliferação do organismo de indivíduos normais (LACEY e WILMORE, 1990; revisado por ROGERO e TIRAPEGUI, 2003a). Células epiteliais da mucosa intestinal têm acesso à glutamina de duas maneiras: (i) após a refeição, quando a glutamina presente no lúmen intestinal atravessa a

membrana borda em escova do enterócito e (ii) por intermédio da glutamina presente no sangue arterial, que atravessa a membrana basolateral do enterócito. No estado absorptivo, a captação de glutamina pelo intestino ocorre por meio da membrana luminal e a quantidade deste aminoácido que alcança o sangue portal depende da concentração de glutamina presente no lúmen intestinal (WINDMUELLER e SPAETH, 1975; ROGERO e TIRAPGUI, 2003c; ROGERO *et al.*, 2004).

O estudo do metabolismo da glutamina está diretamente ligado ao músculo esquelético, que é quantitativamente o mais relevante local de estoque, síntese e liberação de glutamina, apesar da atividade da enzima glutamina sintetase ser relativamente baixa por unidade de massa no tecido muscular (ROGERO, 2002a). Além disso, a glutamina desempenha papel relevante na regulação da síntese e concentração de proteína no tecido muscular. O aumento da concentração intramuscular de glutamina estimula a taxa de síntese protéica, sendo este fato relacionado ao aumento do volume celular — que atua como um sinal anabólico intracelular —, uma vez que a glutamina é transportada para dentro da célula por meio de mecanismos dependentes de sódio. Segundo Low *et al.* (1997), o aumento do volume celular induzido osmoticamente é associado com aumento do transporte de glutamina por meio do sistema N^m presente no sarcolema, sendo esses fatos modulados pela enzima fosfatidil-inositol-3 quinase. O conhecimento desta função da glutamina é fundamental tanto no estudo de diversos estados clínicos e catabólicos, quanto em relação ao metabolismo de animais em fase de crescimento (LOBLEY *et al.*, 2001).

3.2 Macrófagos

Fagócitos mononucleares são a segunda maior população celular do sistema imune, sendo constituídos por células que apresentam como principal função a fagocitose (ROITT *et al.*, 1999). Monoblastos, os quais derivam de progenitores mielóides na medula óssea, amadurecem para monócitos, que migram para o sangue periférico. O monócito sangüíneo humano é uma célula grande (10 a 18 μ M de diâmetro), se comparada aos linfócitos, e, de modo geral, apresenta um núcleo chanfrado, freqüentemente com grânulos

azurofílicos pálidos, sendo a vida média destas células relativamente curta (<70 horas) (CALDER, 1995; GREER *et al.*, 2004). Do ponto de vista estrutural, os monócitos possuem membranas onduladas, um complexo de Golgi bem desenvolvido e muitos lisossomos intracitoplasmáticos. Estes lisossomos contêm peroxidase e várias hidrolases ácidas, importantes para a destruição intracelular de microrganismos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999). As células deste *pool* circulante migram através dos vasos sanguíneos para os vários órgãos e sistemas teciduais, onde se transformam em macrófagos, que constituem uma fase mais avançada na vida da célula mononuclear fagocitária (NEWSHOLME *et al.*, 1989).

Macrófagos são células maiores que monócitos (10 a 80 μM de diâmetro), com numerosos grânulos densos intracitoplasmáticos, vesículas endocíticas, mitocôndrias e lisossomos contendo enzimas hidrolíticas. Macrófagos têm, também, elevada emissão de pseudópodes, que se estendem a partir da superfície celular. Em contraste com a vida média curta de monócitos, macrófagos podem permanecer em tecidos por muitos meses — e talvez até anos. Essas células representam os principais fagócitos residentes de tecidos e cavidades serosas (CALICH e VAZ, 1988).

Os monócitos e macrófagos aderem fortemente às superfícies plásticas e de vidro e fagocitam ativamente material particulado e até células tumorais *in vitro*. Os processos de adesão celular e fagocitose ocorrem quando estas células ligam-se aos agentes agressores por meio de receptores especializados, que podem se ligar a determinados carboidratos da parede celular microbiana ou à imunoglobulina (Ig) G e ao complemento que, eventualmente, estejam recobrando o microrganismo (BORELLI *et al.*, 1998; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999). As propriedades endocíticas de macrófagos permitem a morte de microrganismos por meio dos processos de fagocitose e pinocitose, como também iniciam a resposta imune. Os antígenos insolúveis fagocitados e os antígenos solúveis pinocitados são ingeridos e degradados enzimaticamente em pequenos fragmentos, os quais são ligados com moléculas de classe II do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), sendo transportados para a superfície externa da membrana plasmática, o que permite que estes fragmentos sejam apresentados para linfócitos T (NEWSHOLME *et al.*, 1996). Além disso, macrófagos são caracterizados pela

sua alta atividade endocítica e também pela elevada capacidade de secretar grande número de compostos, incluindo enzimas, proteínas plasmáticas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, prostaglandinas e citocinas, o que reforça o papel dessas células em iniciar e regular a resposta imune (YASSAD *et al.*, 1997).

Os macrófagos são geralmente subclassificados, de acordo com o seu estado de ativação, em residentes, inflamatórios ou ativados. Os macrófagos residentes representam células teciduais que não foram expostas a substâncias estranhas, apresentando baixa atividade funcional, como, por exemplo, baixa taxa de secreção de proteinases ou síntese de espécies reativas de oxigênio. Quando macrófagos residentes são expostos a linfocinas ou à administração intraperitoneal de BCG, estas células demonstram taxas elevadas de síntese de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio; aumento da atividade antimicrobiana e da capacidade tumoricida; difusão mais rápida sobre a superfície de vidro; membrana plasmática mais proeminente; aumento do tamanho celular e do conteúdo de lisossomos; e maior taxa de fagocitose. Tais macrófagos são denominados ativados. Macrófagos que são obtidos de animais tratados com estímulos inflamatórios não-microbianos demonstram modelo de resposta similar aquele desencadeado por macrófagos ativados, porém com reduzida capacidade de síntese de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, o que acarreta em baixa atividade antimicrobiana e tumoricida. Estes macrófagos são denominados células inflamatórias (COHN, 1978; CALDER, 1995).

O *burst* respiratório é caracterizado pela ativação de uma oxidase associada à membrana concomitante ao aumento da captação de oxigênio, o qual é convertido em peróxido de hidrogênio. Esta oxidase é dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como doadora de elétrons. O sistema oxidase reduz o oxigênio molecular para ânion superóxido, que dismuta para peróxido de hidrogênio. As espécies reativas de oxigênio que são geradas sobre a (ou próximas da) superfície celular, e dentro do vacúolo fagocítico, exercem os efeitos antimicrobianos e antitumorais. O macrófago é protegido da toxicidade dessas espécies reativas de oxigênio pelas enzimas superóxido dismutase e glutatona peroxidase. A atividade da enzima glutatona peroxidase resulta na oxidação da glutatona, ao passo que a glutatona oxidada

sofre redução pela ação da enzima glutatona redutase, reação esta que utiliza NADPH como fonte de equivalentes redutores (NEWSHOLME *et al.*, 1996).

3.2.1 Mecanismos de ativação de macrófagos induzidos por lipopolissacarídeos (LPS)

O sistema imune inespecífico de mamíferos utiliza estratégias distintas para o reconhecimento de microrganismos, sendo uma dessas baseada no reconhecimento de modelos moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* — PAMP), os quais são produtos do metabolismo microbiano conservados ao longo da evolução das espécies e distribuídos amplamente entre os patógenos. Por exemplo, o modelo molecular do LPS é comum para todas as bactérias Gram-negativas, porém não é produzido pelo hospedeiro (MUSHEGIAN e MEDZHITOV, 2001; TSAN e GAO, 2004). Receptores do sistema imune inato que reconhecem PAMP são denominados receptores de reconhecimento de modelos, os quais induzem a expressão de citocinas pró-inflamatórias, ao mesmo tempo em que ativam mecanismos de defesa antimicrobianos do hospedeiro, como a síntese de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. O reconhecimento dos PAMP também pode acarretar na indução das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 na superfície de células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas (FUJIHARA *et al.*, 2003; KAWAI e AKIRA, 2005). A indução das moléculas co-estimulatórias, juntamente com a apresentação de pequenos peptídeos antigênicos ligados às moléculas de classes II do MHC na membrana das células apresentadoras de antígeno para linfócitos T CD4⁺, acopla o reconhecimento de patógenos pela imunidade inata com a ativação das respostas imunes adaptativas (MUSHEGIAN e MEDZHITOV, 2001).

O sistema imune inato reconhece PAMP por meio de receptores do tipo Toll (TLR), que compreendem uma família de proteínas transmembrana que desempenham papel fundamental na defesa do hospedeiro (LIOU, 2002). Os TLR são membros da superfamília do receptor de IL-1 (IL-1R) e apresentam significativa homologia em suas regiões citoplasmáticas, como o domínio Toll/IL-1R (TIR). Baseando-se na seqüência de aminoácidos e na estrutura genômica, os TLR podem ser divididos em cinco subfamílias: TLR2, TLR3,

TLR4, TLR5 e TLR9. A subfamília TLR2 é composta de TLR1, TLR2, TLR6 e TLR10, enquanto a subfamília TLR9 é composta de TLR7, TLR8 e TLR9 (TSAN e GAO, 2004; HOEBE *et al.*, 2006a). A principal função das proteínas TLR está relacionada ao controle das respostas inflamatórias e imunológicas. Como outros receptores de reconhecimento de antígenos, TLR medeia o reconhecimento de uma variedade de PAMP microbianos. O primeiro TLR caracterizado em humanos foi o TLR4, o qual é expresso predominantemente em células do sistema imune, incluindo macrófagos e células dendríticas (MEDZHITOV *et al.*, 1997; FUJIHARA *et al.*, 2003; KAWAI e AKIRA, 2005; BEUTLER *et al.*, 2006).

LPS é um componente estrutural integral e predominante da membrana externa de bactérias Gram-negativas, além de representar um dos mais potentes iniciadores microbianos da inflamação (DOBROVOLSKAIA e VOGEL, 2002). O LPS é um complexo glicolipídico composto de um polissacarídeo hidrofílico e um domínio hidrofóbico denominado lipídio A (figura 2). O LPS ativa monócitos e macrófagos para produzirem citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12, as quais, por sua vez, atuam como mediadoras endógenas da inflamação por meio de interações mediadas por receptores com diversas células alvo (BEUTLER e RIETSCHHEL, 2003; HOEBE *et al.*, 2006b). Macrófagos também secretam, em resposta ao LPS, vasta gama de outros mediadores biológicos, incluindo fator de ativação plaquetária, prostaglandinas, enzimas e espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, como ânion superóxido e óxido nítrico, respectivamente. A síntese de citocinas pró-inflamatórias e de mediadores biológicos por monócitos e macrófagos inibem o crescimento e impedem a disseminação de patógenos que eventualmente tenham invadido o organismo (FUJIHARA *et al.*, 2003).

O LPS inicialmente liga-se a uma proteína presente no sangue ou no espaço extracelular denominada proteína ligadora de LPS (*LPS-binding protein* — LBP). A LBP facilita a ligação do LPS na superfície da célula à molécula CD14, uma proteína que está ancorada à bicamada lipídica por meio de um grupo glicofosfatidilinositol e que está presente na maioria das células, com exceção das do endotélio. O CD14 pode também existir como uma proteína solúvel e, nesse caso, o mesmo pode carrear o LPS para a superfície celular (LANDMANN *et al.*, 2000; TRIANTAFILOU e TRIANTAFILOU, 2005). A

molécula de CD14 não apresenta domínios transmembrânicos e intracelular e, desse modo, não pode isoladamente iniciar o processo de transdução de sinal. Uma vez que o LPS liga-se ao CD14, o LBP dissocia-se e o complexo LPS-CD14 fisicamente associa-se com o receptor do tipo TLR4 (BEUTLER, 2003; FUJIHARA *et al.*, 2003). O TLR4 necessita de uma molécula adicional, a proteína acessória extracelular (MD-2), que forma um complexo com o domínio extracelular do TLR4 para o efetivo reconhecimento do LPS (figura 3) (TRIANTAFILOU e TRIANTAFILOU, 2002).

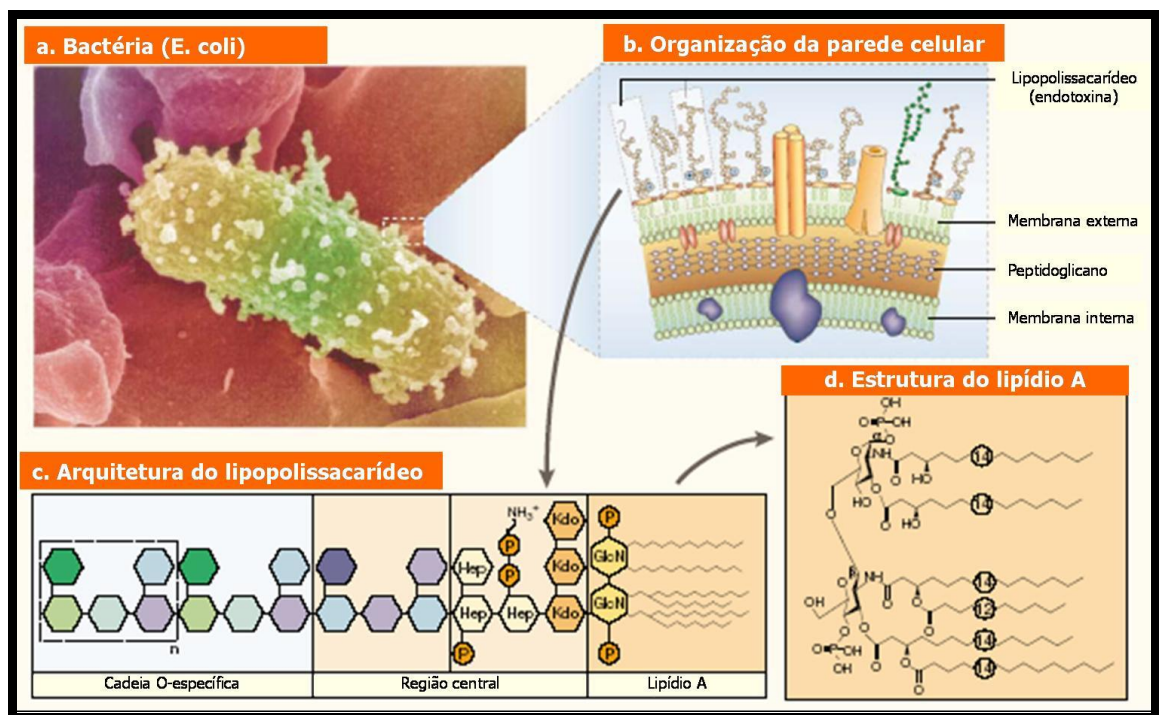


Figura 2. Bactéria Gram-negativa.

Eletromicrografia de *Escherichia coli* (a), juntamente com uma representação esquemática da localização do lipopolissacarídeo (LPS: endotoxina) na parede celular bacteriana (b) e a arquitetura do LPS (c). É demonstrada também a estrutura tóxica do LPS, o componente Lipídio A (d). Modificado de Beutler e Rietschel (2003).

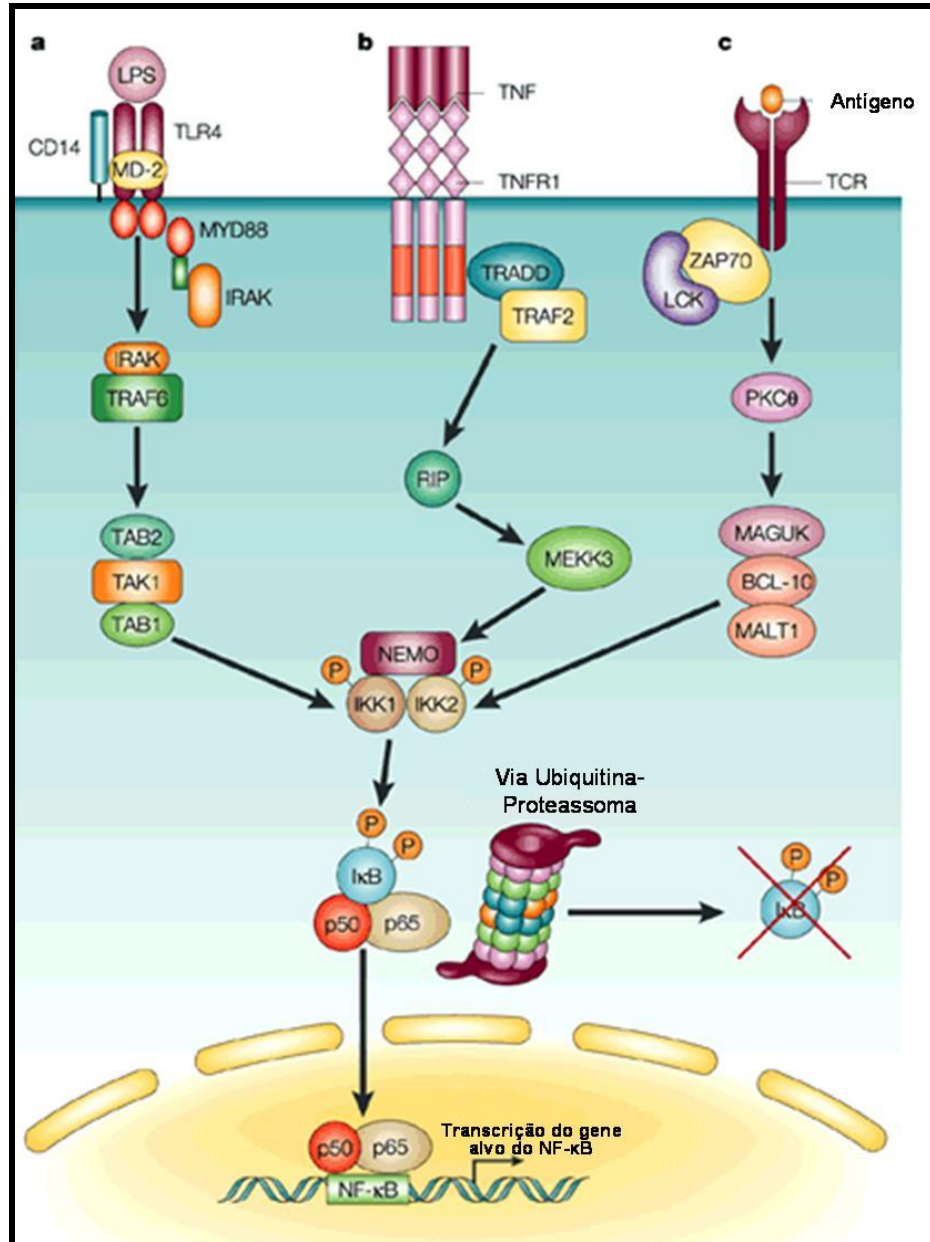


Figura 3. Vias de ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B).

A atividade do NF- κ B é estimulada por diversas vias, incluindo lipopolissacarídeos (LPS), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e sinalização mediada por receptores presentes em linfócitos T (TCR). As quinases IKK1 e IKK2 (também denominadas IKK α e IKK β , respectivamente) e o modulador essencial da subunidade regulatória do NF- κ B (NEMO) (também denominado IKK γ) são o ponto de convergência para todas as três vias. (ERK= quinase regulada por sinal extracelular; I κ B= Inibidor do NF- κ B; IKK= quinase inibidora do I κ B; IRAK= quinase associada ao receptor de interleucina 1; LCK= proteína com atividade tirosina quinase; MD-2= proteína acessória extracelular; MALT-1 e BCL-10= proteínas associadas ao linfoma do tecido linfóide associado à mucosa; MAP= proteína ativada por mitógenos; MEKK3= MAP/ERK quinase quinase 3; MAGUK= quinase guanilato associada à membrana; MYD88= proteína adaptadora citoplasmática; PKC θ = proteína quinase C θ ; RIP= quinase serina/treonina de interação com receptor; TLR4= receptor do tipo Toll 4; TNFR1= receptor 1 do TNF; TRAF2= fator 2 associado ao receptor de TNF; TRAF6= fator 6 associado ao receptor de TNF; TAB1= proteína ligadora de TAK1; TAB2= proteína ligadora de TRAF6 à TAK1; TAK1= quinase ativada pelo fator de transformação do crescimento β ; TRADD= receptor de TNF associado via domínio da morte; ZAP70= proteína quinase associada à cadeia ξ).

Modificado de Li e Verma (2002).

O reconhecimento por TLR de PAMP desencadeia a associação dependente do domínio do receptor Toll/IL-1 (TIR) com adaptadores contendo o domínio TIR, incluindo a proteína adaptadora citoplasmática (MyD88), a proteína adaptadora contendo o domínio TIR associada ao adaptador semelhante ao MYD88 (TIRAP-MAL), a proteína adaptadora contendo domínio TIR induzida por interferon beta (TRIF) e a molécula adaptadora relacionada ao TRIF (TRAM). A associação do TLR4 e MyD88 recruta membros da família quinase associada ao receptor de IL-1 (IRAK); dois membros, IRAK4 e IRAK1, são seqüencialmente fosforilados, o que promove a dissociação dos mesmos a partir do complexo receptor e a posterior associação desses com a proteína denominada fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6). A TRAF6 ativa quinases da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), as quais podem promover a ativação do ativador da proteína-1 (AP-1) por meio da MAPK (figura 3) (BEUTLER e RIETSCHER, 2003; BEUTLER, 2004; KAWAI e AKIRA, 2005).

No citoplasma de células não estimuladas, o fator de transcrição denominado fator nuclear- κ B (NF- κ B) — que se apresenta na forma de dímero — encontra-se na forma inativa devido a sua associação com proteínas denominadas inibidores κ B (I κ B). A família de proteínas I κ B inclui I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , Bcl-3, e as regiões carboxi-terminal do NF- κ B₁ (p105), NF- κ B₂ (p100). As proteínas I κ B ligam-se, com diferentes afinidades e especificidades, a dímeros do NF- κ B. Portanto, além da existência de diferentes dímeros de NF- κ B em um tipo celular específico, há também grande número de combinações entre o I κ B e os dímeros do NF- κ B (CAAMAÑO e HUNTER, 2002; LI e VERMA, 2002).

O TRAF6 promove a ativação do complexo I κ B quinases (IKK) (BEUTLER, 2004; KAWAI e AKIRA, 2005). Esse complexo é composto de duas subunidades catalíticas IKK α e IKK β e uma subunidade regulatória IKK γ e induz a fosforilação do I κ B. A fosforilação do I κ B resulta na sua poliubiquitinação, a qual, por sua vez, acarreta na sua degradação mediada pelo proteossoma 26S, o que permite, desse modo, que o NF- κ B se transloque para o interior do núcleo celular e ative a transcrição de diversos genes dependentes do κ B, como genes de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6 (figura 3). O NF- κ B também promove a estimulação da síntese do I κ B, uma vez que a região promotora do gene que codifica para o I κ B contém sítios

funcionais para o NF- κ B. Desse modo, o I κ B recém-sintetizado liga-se ao NF- κ B e suprime a sua atividade (HATADA *et al.*, 2000; MAGNANI *et al.*, 2000; DOBROVOLSKAIA e VOGEL, 2002; FUJIHARA *et al.*, 2003; KAWAI e AKIRA, 2005).

Em mamíferos, a família de fatores de transcrição NF- κ B apresenta cinco membros: NF- κ B₁ (p105/p50), NF- κ B₂ (p100/p52), RelA (p65), RelB e c-Rel, os quais podem dimerizar-se para formar homodímeros e heterodímeros, que estão associados a respostas específicas para diferentes estímulos e efeitos diferenciais sobre a transcrição. NF- κ B₁ (p50) e NF- κ B₂ (p52) não apresentam domínios de ativação transcricional e seus homodímeros atuam como repressores (CAAMAÑO e HUNTER, 2002; LI e VERMA, 2002). Por outro lado, Rel-A, Rel-B e c-Rel carregam domínios de ativação transcricional e, com exceção do Rel-B, são capazes de formar homodímeros e heterodímeros com os outros membros dessa família de proteínas. Conseqüentemente, o balanço entre os diferentes homodímeros e heterodímeros do NF- κ B regula o nível de atividade transcricional. Cabe ressaltar que essas proteínas são expressas em um modelo específico celular e tecidual, que acarreta em um nível adicional de regulação. Por exemplo, NF- κ B₁ (p50) e RelA são amplamente expressas e, desse modo, o heterodímero p50/RelA constitui o mais comum indutor da atividade de ligação do NF- κ B (CAAMAÑO e HUNTER, 2002; LI e VERMA, 2002).

3.3 Metabolismo da glutamina em macrófagos

Segundo Frisina *et al.* (1994) e Rowbottom *et al.* (1995), a taxa de utilização de glutamina por macrófagos é similar ou superior à de glicose. Contudo, apenas pequena parte dos carbonos da molécula de glicose (<10%) e do aminoácido glutamina (5-25%) são completamente oxidados por macrófagos em meio de cultura. Sendo assim, a maioria das moléculas de glicose é convertida em lactato (glicólise), enquanto grande parte da glutamina é convertida em glutamato, aspartato e lactato (glutaminólise) (NEWSHOLME *et al.*, 1999) (figura 4). Os processos de glicólise e glutaminólise fornecem intermediários metabólicos para vias biossintéticas de macromoléculas. A glicólise fornece glicose-6-fosfato para a formação de ribose-5-fosfato, a qual é

precursora da síntese de DNA e RNA; e glicerol-3-fosfato para a síntese de fosfolípidios. Paralelamente, a glutaminólise fornece amônia e aspartato para a síntese de purinas e pirimidinas, que são necessárias para a formação de DNA e RNA. Glutamina também fornece nitrogênio para a formação de glicosamina, guanosina trifosfato e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) (NEWSHOLME *et al.*, 1987; NEWSHOLME *et al.*, 1989; NEWSHOLME e CALDER, 1997).

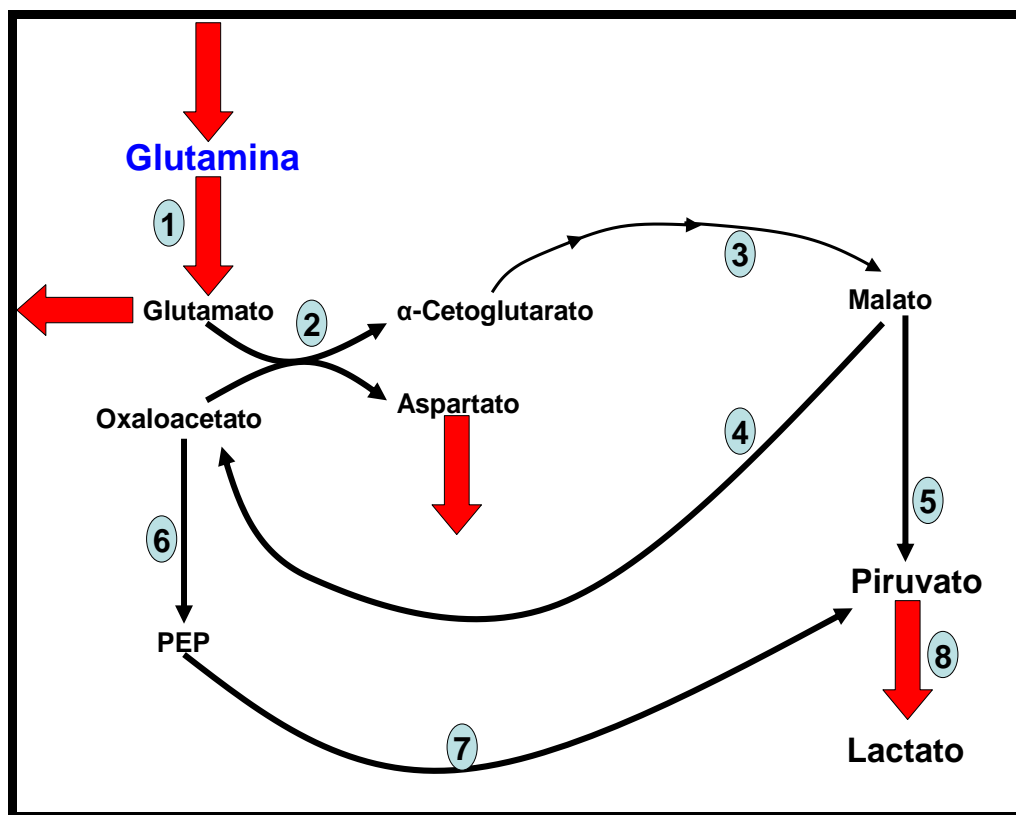


Figura 4. Metabolismo da glutamina em macrófagos.

Enzimas estão indicadas como: 1. glutaminase; 2. aspartato aminotransferase; 3. enzimas da metade esquerda do ciclo de Krebs; 4. malato desidrogenase NAD-dependente; 5. enzima málica; 6. fosfoenolpiruvato carboxiquinase; 7. piruvato quinase; 8. lactato desidrogenase; (PEP = fosfoenolpiruvato). Modificado de Calder (1995).

Macrófagos ativados apresentam aumento da síntese protéica, o que implica em maior demanda intracelular por aminoácidos. Nesse contexto, verifica-se que a constante utilização de glutamina por macrófagos promove o fornecimento de glutamato para reações de transaminação que possibilitam a

síntese de outros aminoácidos, ao mesmo tempo em que a glicose fornece o esqueleto de carbono na síntese desses aminoácidos. Após estimulação imunológica, macrófagos ativados também apresentam elevada taxa de síntese de RNAm, sendo a glutamina um dos precursores para a síntese de purinas e de pirimidinas, o que caracteriza papel relevante da glutamina na manutenção de elevadas taxas de transcrição (NEWSHOLME *et al.*, 1996).

De acordo com essa hipótese, alguns estudos têm investigado a relação entre a secreção de TNF- α , IL-1 e IL-6 — que são relevantes citocinas sintetizadas por macrófagos — e a concentração extracelular de glutamina, uma vez que macrófagos são dependentes da concentração extracelular de glutamina para realização de uma atividade secretória ótima (MURPHY e NEWSHOLME, 1999). Segundo Newsholme *et al.* (1999), macrófagos peritoniais de camundongos ativados com BCG e incubados em meio com ausência de arginina e presença de 2 mM de glutamina apresentam a capacidade de sintetizar TNF- α em altas taxas quando estimulados por LPS. Além disso, Wallace e Keast (1992) e Yassad *et al.* (1997) demonstraram que o aumento da secreção de IL-1 e IL-6 por macrófagos estimulados por LPS foi dependente da concentração de glutamina extracelular.

Dentre as evidências que comprovam o elevado consumo de glutamina por macrófagos, podem-se destacar: a elevada atividade catalítica máxima da enzima glutaminase, que é aproximadamente quatro vezes superior à de linfócitos; e a alta taxa de consumo de glutamina por macrófagos mantidos em meio de cultura, a qual fornece intermediários para a biossíntese de purinas e pirimidinas, que são necessárias para a síntese de RNAm em macrófagos (NEWSHOLME *et al.*, 1986; NEWSHOLME e CALDER, 1997). Alguns parâmetros de funcionalidade de macrófagos testados *in vitro*, tais como síntese de IL-1 e RNAm e atividade fagocitária, são dependentes do fornecimento de glutamina em concentrações superiores às fisiológicas (WALLACE e KEAST, 1992; YASSAD *et al.*, 1997; MURPHY e NEWSHOLME, 1998; BELLOWS e JAFFE, 1999; MURPHY e NEWSHOLME, 1999; WELLS *et al.*, 1999; YASSAD *et al.*, 2000; CURI *et al.*, 2005). A redução da concentração extracelular de glutamina de 2 para 0,2 mmol/L acarretou em diminuição de 40% da expressão de moléculas de classe II do MHC e em redução da capacidade de fagocitar *Escherichia coli* opsonizada por complemento

(SPITTLER *et al.*, 1995). Ao mesmo tempo, a ativação de macrófagos *in vivo* (via exposição ao BCG) ou *in vitro* (via exposição ao LPS) ocasionou aumento significativo da utilização de glutamina (COSTA ROSA *et al.*, 1994; NEWSHOLME, 2001).

Outra explicação para o aumento da utilização de glutamina por macrófagos ativados decorre da elevada demanda por arginina, que é a precursora imediata da síntese de óxido nítrico, sendo esta reação catalisada em macrófagos pela enzima óxido nítrico sintase induzida. Macrófagos são incapazes de utilizar a arginina extracelular após serem ativados, uma vez que a enzima arginase é rapidamente secretada por essas células sob estas condições, o que acarreta na depleção da concentração extracelular de arginina. Contudo, o aumento da taxa de síntese intracelular de arginina a partir de glutamina fornece condições para a ocorrência da síntese de óxido nítrico (NEWSHOLME *et al.*, 1999; WU *et al.*, 1999).

Segundo Newsholme *et al.* (1986), a taxa de utilização de glutamina por macrófagos incubados é aproximadamente 100 nmol/hora/mg de proteína, a qual é considerada menor que a atividade máxima da glutaminase (aproximadamente 152 nmol/hora/mg de proteína). Este resultado sugere que, sob condições, tais como aumento da atividade secretória, a taxa de utilização de glutamina poderia ser acentuadamente aumentada por macrófagos.

3.4 Metabolismo da glutamina durante a infecção

Durante um processo infeccioso no organismo ocorre ativação da função imunológica, o que causa alterações marcantes no metabolismo de leucócitos, particularmente linfócitos e macrófagos, mas provavelmente também em neutrófilos. Esse efeito é acompanhado pelo aumento no consumo de glutamina por essas células e, portanto, acarreta em maior síntese desse aminoácido pelo músculo esquelético, sem reduzir drasticamente a sua oferta para outros tecidos (CURI, 2000).

Uma das respostas iniciais frente ao estresse fisiológico é o aumento da concentração sérica de corticosteróides, que promove o aumento do efluxo de glutamina oriunda do *pool* de aminoácidos livres intramusculares para o leito esplâncnico e para o sistema imune. Devido à concentração de glutamina livre

intramuscular ser insuficiente para manter este aumento de efluxo muscular e demanda por outros tecidos, ocorre o aumento da degradação protéica muscular e síntese *de novo* de glutamina, a partir dos aminoácidos liberados, e que é catalisada pela enzima glutamina sintetase (NEWSHOLME e CALDER, 1997; GRIFFITHS, 2001). Segundo Labow *et al.* (1999), o aumento da expressão desta enzima no tecido muscular em resposta ao estresse fisiológico agudo ou à administração direta de glicocorticóides é decorrente do aumento da concentração muscular de RNAm para a enzima glutamina sintetase, contudo, sem ocasionar aumento proporcional na concentração desta proteína, sendo esse fato relacionado à regulação pós-transcricional da expressão da enzima glutamina sintetase exercida pela glutamina.

A citocina inflamatória, TNF- α , induz o aumento de 3 a 4 vezes na atividade da enzima glutamina sintetase no músculo esquelético por meio de regulação transcricional. Este fato indica a possível relação entre aumento da atividade de macrófagos e utilização de glutamina em locais com processos inflamatórios, concomitante ao aumento do metabolismo deste aminoácido no tecido muscular. Similarmente, a presença de endotoxinas aumenta a concentração de RNAm da enzima glutamina sintetase no tecido muscular (CHAKRABARTI, 1998; GRIFFITHS, 2001; LABOW *et al.*, 2001).

Todavia, com a continuidade do processo infeccioso, a proteólise reduz o estoque de proteínas mobilizáveis e a massa protéica muscular, causando perda de peso e caquexia, enquanto em animais jovens também provoca diminuição do crescimento e do desenvolvimento (SAMUELS e BARACOS, 1995). Nesta condição, as vias geradoras de glutamina entram em exaustão e, como consequência, ocorre redução do suprimento desse aminoácido ao organismo, alterando a funcionalidade de sistemas vitais nessas condições, como é o caso do sistema imune. O resultado disso é o agravamento do quadro infeccioso e das condições do paciente (CURI, 2000).

3.5 Leite materno

Extensivas pesquisas utilizando métodos epidemiológicos e modernas técnicas laboratoriais comprovam vantagens para crianças, mães, famílias e sociedade decorrentes do aleitamento materno. Dentre essas vantagens

destacam-se aspectos relacionados ao crescimento e ao desenvolvimento, além de aspectos nutricionais, imunológicos, psicológicos, sociais, econômicos e ambientais (GARTNER *et al.*, 2005).

O leite materno é específico para a espécie. Toda preparação alimentar substituta difere significativamente em relação ao leite materno, o que caracteriza que esse alimento é superior a qualquer fórmula infantil. O aleitamento materno exclusivo é o modelo de referência ou normativo frente ao qual qualquer método de alimentação alternativo deve ser avaliado com relação ao crescimento, saúde, desenvolvimento e todos os efeitos de curto e longo prazo. Além disso, bebês prematuros alimentados com leite materno beneficiam-se significativamente em comparação àqueles alimentados com fórmulas infantis em relação ao seu desenvolvimento e imunocompetência (GARTNER *et al.*, 2005). Em relação à imunocompetência de bebês amamentados, há fortes evidências de que o aleitamento materno diminui a incidência e/ou a gravidade de diversas doenças infecciosas, incluindo meningite bacteriana, bacteremia, diarreia, infecções do trato respiratório, urinário e digestório, enterocolite necrosante e otite média (DENNIS, 2002; KRAMER *et al.*, 2003; KRAMER e KAMURA, 2004; GARTNER *et al.*, 2005).

Aproximadamente 10,8 milhões de crianças com idade inferior a cinco anos morrem anualmente em todo o mundo, sendo que cerca de 63% dessas mortes poderiam ser evitadas se intervenções adequadas fossem realizadas. Aproximadamente, 41% dessas mortes ocorrem na África Subsaariana e 34% no sudeste Asiático. Cabe ressaltar que apenas seis países (Índia, Nigéria, China, Paquistão, Congo e Etiópia) respondem por metade das mortes de crianças com idade inferior a cinco anos em todo o mundo. Além disso, das 10,8 milhões de mortes de crianças por ano, 3,9 milhões ocorrem nos primeiros 28 dias de vida, ou seja, no período neonatal (BLACK *et al.*, 2003) (figura 5).

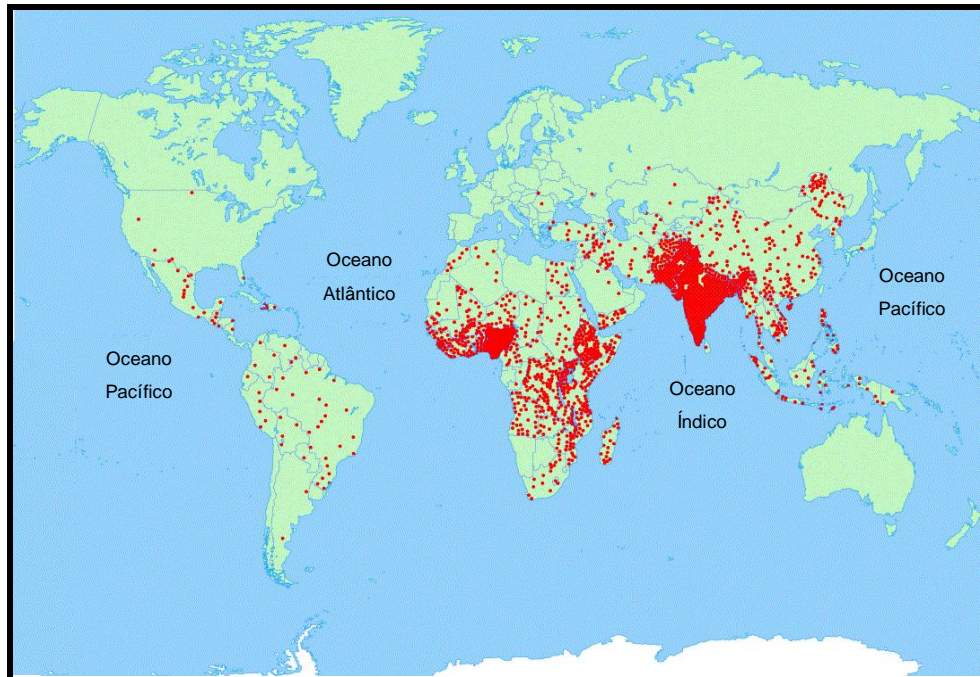


Figura 5. Distribuição mundial da mortalidade infantil.

Cada ponto representa 5.000 mortes. Modificado de Black *et al.* (2003).

Dentre os fatores de risco envolvidos na mortalidade infantil destacam-se a ingestão de água contaminada, disponibilidade inadequada de água para higiene e a falta de acesso ao saneamento básico, que acarretam em aproximadamente 1,5 milhões de crianças mortas e cerca de 88% das mortes por diarreia. Bebês com idades entre zero e cinco meses que não são amamentados apresentam aumento do risco de morte de 5 e 7 vezes para diarreia e pneumonia, respectivamente, quando comparadas com bebês que recebem aleitamento materno exclusivo. Em bebês da mesma faixa etária, o aleitamento materno não exclusivo resulta em risco de morte duas vezes maior a partir de episódios de diarreia ou pneumonia em comparação àquele exclusivo. Bebês com 6 a 11 meses de idade que não são amamentados também apresentam risco aumentado para tais mortes (BLACK *et al.*, 2003).

Jones *et al.* (2003) propõem que uma única medida preventiva, o aleitamento materno exclusivo até os seis meses de idade, e sua continuação até o primeiro ano de vida, poderia prevenir a morte de 13% das crianças, ou seja, 1,3 milhões de mortes anualmente. Cabe ressaltar que o aleitamento materno é a principal medida preventiva sobre a mortalidade infantil de crianças com idade inferior a cinco anos, sendo mais relevante que outras

medidas preventivas, como a suplementação com zinco (previne 4% das mortes) e com vitamina A (2%) ou como a vacinação contra *Haemophilus influenzae* tipo b (4%) e contra o tétano (2%).

O aleitamento materno no primeiro ano de vida representa um fator relevante na avaliação do padrão de crescimento infantil, uma vez que o padrão de crescimento de bebês amamentados ao seio difere daquele observado em bebês alimentados com fórmulas infantis (DEWEY *et al.*, 1995; HASCHKE e VAN'T HOF, 2000; DEWEY *et al.*, 2001; De ONIS, 2003; KRAMER e KAKUMA, 2004).

3.5.1 Características nutricionais e imunológicas do leite materno

O leite humano contém 88% de água e sua osmolaridade é similar àquela do plasma. O conteúdo total de proteína do leite humano é o menor entre todos os mamíferos, sendo a concentração de proteína do leite materno de aproximadamente 0,8 a 0,9 g/dL, incluindo elevada fração de nitrogênio não-protéico, correspondente a 20-25%. Dentre as proteínas presentes no leite materno destacam-se a caseína e a lactoalbumina. Lipídios são o componente mais variável do leite materno, correspondendo a 3-4 g/dL, ao mesmo tempo em que são a principal fonte de energia para o lactente, fornecendo de 35 a 50% da necessidade calórica diária. O leite humano é uma excelente fonte de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, os quais são essenciais para o desenvolvimento normal de lactentes. Destaca-se o papel do ácido graxo poliinsaturado de cadeia muito longa da série ômega (ω)-3, denominado docosaexaenóico (DHA), o qual é importante para o desenvolvimento do cérebro e da retina, e do ácido graxo araquidônico (ω -6), que atua como precursor de prostaglandinas e leucotrienos. O principal carboidrato presente no leite humano é a lactose, cuja concentração é de aproximadamente 7 g/dL, a qual é metabolizada em galactose, que atua como fonte primária da massa branca cerebral durante a fase de crescimento (ANDERSON *et al.*, 1999; UAUY e PEIRANO, 1999; BOUWSTRA *et al.*, 2003; NASCIMENTO e ISSLER, 2003).

Um aspecto extremamente relevante do leite materno — e diretamente relacionado ao presente trabalho — é a presença de aminoácidos livres, que

representam cerca de 3% a 5% do total de aminoácidos nesse alimento. Esta quantidade de aminoácidos livres é 100 vezes maior em relação àquela presente no *pool* intracelular (0,05%) de bebês, além de ser superior à concentração de aminoácidos livres plasmáticos. Dentre os aminoácidos livres ingeridos por bebês com aleitamento materno exclusivo, destacam-se a glutamina e o glutamato, que representam cerca de 50% dos aminoácidos livres presentes no leite humano (AGOSTONI *et al.*, 2000a; AGOSTONI *et al.*, 2000b).

A relação entre a função imune da glândula mamária e a imunocompetência do recém-nascido é resumidamente apresentada na tabela 1. Essas relações demonstram adaptações imunológicas únicas da glândula mamária em benefício do bebê, de tal modo que agentes antimicrobianos, antiinflamatórios e imunomodulatórios que estão presentes no leite materno são multifuncionais, agem sinergicamente e protegem o bebê durante o seu desenvolvimento (LABBOK *et al.*, 2004).

Dentre os fatores antimicrobianos incluem-se promotores de crescimento (glicoproteínas, glicopeptídeos) de bactérias entéricas com função protetora, como *Bifidobacterium bifidum*; enzimas (lisozima) que promovem a lise de bactérias; inibidores do metabolismo de patógenos, como a lactoferrina, que está presente em concentrações elevadas no leite humano; leucócitos; e imunoglobulinas (Ig), com destaque para a IgA secretora, que representa a principal Ig presente no leite humano. Cabe ressaltar que a molécula de IgA presente no leite materno é sintetizada por plasmócitos presentes na glândula mamária, os quais são oriundos de linfócitos B presentes no intestino delgado, o que evidencia a presença da circulação entero-mamária (LABBOK *et al.*, 2004; FIELD, 2005).

Um outro aspecto relevante do leite materno é a presença de leucócitos ($\sim 4 \times 10^9/L$ e $\sim 10^8-10^9/L$, presentes no colostro e no leite maduro, respectivamente), os quais atravessam o epitélio da glândula mamária e, desse modo, participam da sua composição. Os leucócitos que estão presentes no leite humano incluem neutrófilos (30-40% da população total de leucócitos), macrófagos (55-60%) e linfócitos (5-10%), sendo que a população de linfócitos do leite humano consiste principalmente de linfócitos T ativados (FIELD, 2005).

Tabela 1. Relações entre o sistema imune de bebês e a função imune do leite materno.

Agentes no leite materno	Efeitos imunológicos
IgA secretora, lactoferrina, lisozima, Interferon- γ , PAF-acetil-hidroxilase	Compensa diretamente o desenvolvimento tardio do sistema imune de bebês
Oligossacarídeos e nucleotídeos	Compensa indiretamente o desenvolvimento tardio do sistema imune de bebês
Fatores de crescimento epiteliais	Adaptação do trato digestório para a vida extra-uterina
PAF-acetil-hidroxilase, antioxidantes, IL-10 e TGF- β	Redução do risco de inflamação
Fatores de crescimento para bactérias comensais	Estabelece microbiota bacteriana comensal

(IgA= imunoglobulina A; IL-10= interleucina 10; PAF= fator de ativação plaquetário; TGF= fator de transformação do crescimento).
Modificado de Labbok *et al.* (2004).

O leite materno também contém agentes imunomoduladores que incluem prolactina, nucleotídeos — que aumentam a atividade de células *natural killer*, macrófagos e células T helper — e citocinas. Dentre as citocinas, verifica-se a presença de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) e antiinflamatórias (IL-10 e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β)), hormônios (eritropoietina, fator estimulador de colônias de granulócitos e fator estimulador de colônias de macrófagos), quimiocinas (IL-8, também denominada CXCL8) e citocinas indutoras da resposta tipo Th1 (interferon (IFN)- γ e IL-12) e da resposta tipo Th2 (IL-6 e IL-10) (ELLIS *et al.*, 1997; LABBOK *et al.*, 2004; FIELD, 2005).

3.5.2 Prevalência do aleitamento materno exclusivo

Pesquisas têm demonstrado diversos benefícios do aleitamento materno, como nutricional, imunológico, psicológico, social e econômico, além daqueles reportados sobre o crescimento e desenvolvimento do lactente (DENNIS, 2002).

A prevalência do aleitamento materno diminuíram rapidamente em diversas partes do mundo por razões sociais, econômicas e culturais. Com a introdução de tecnologias modernas e a adoção de novos estilos de vida, houve, em muitas sociedades, redução notável na importância atribuída a essa prática (MONTEIRO, 1997; CARVALHAES *et al.*, 1998).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) e o Ministério da Saúde do Brasil preconizam o aleitamento materno exclusivo até os seis meses de idade e, depois dessa idade, que os lactentes recebam alimentos complementares, apropriados, seguros e adequados, concomitante à continuação do aleitamento materno até os dois anos de vida ou mais (WHO, 2001a; BRASIL, 2002). Contudo, a prevalência do aleitamento materno exclusivo no Brasil e no mundo está significativamente abaixo da recomendação feita por esses órgãos. No último levantamento feito sobre a situação do aleitamento materno no Brasil, realizado em 1996, a mediana da amamentação exclusiva foi de um mês, variando conforme o nível educacional das mães (KUMMER *et al.*, 2000).

A partir da década de 1980 foram propostas diversas estratégias e campanhas visando aumentar a prevalência da amamentação no Brasil, o que resultou em incremento nos índices de aleitamento materno nas últimas duas décadas. Não obstante, esse incremento não é uniforme e varia conforme o local e as características da população (KUMMER *et al.*, 2000).

Em um estudo realizado com duas coortes de bebês nascidos no Hospital das Clínicas de Porto Alegre, uma em 1987 e outra em 1994, verificou-se que, ao final do primeiro mês de vida, apenas 17,8% dos bebês no estudo de 1987 e 27,8% no estudo posterior estavam recebendo leite materno como alimento exclusivo; ao final do quarto mês, as taxas de aleitamento materno exclusivo foram ainda menores — 5,4% e 5,8% no primeiro e no segundo estudos, respectivamente (KUMMER *et al.*, 2000).

Em estudo realizado em 111 municípios pertencentes ao Estado de São Paulo, no qual foram estudados 34.435 bebês com idade inferior a seis meses, constatou-se que a frequência de aleitamento materno exclusivo foi de 32% ao final dos 15 primeiros dias de vida, reduzindo para 12% com 90 dias de vida e para 4% ao redor de seis meses de vida (VENÂNCIO e MONTEIRO, 2006). Em outro estudo realizado no Estado de São Paulo, em 1998, foram estudadas 33.735 crianças menores de um ano de idade, das quais 11.482 eram menores de quatro meses. Essa população pertencia a 84 municípios. Foi constatado que apenas 27 municípios apresentaram prevalência superior a 20% de aleitamento materno exclusivo até quatro meses de vida, enquanto a prevalência de aleitamento materno predominante — bebês alimentados com leite materno associado à ingestão de água, chá ou suco — superior a 20%, alcançou 85,7% dos municípios estudados (VENÂNCIO *et al.*, 2002). Cabe ressaltar que a maior prevalência de aleitamento materno predominante no Brasil sugere um alerta às autoridades de saúde para que se subsidiem ações educativas às mães, com informações sobre os efeitos nocivos da administração de líquidos não-nutritivos nos primeiros seis meses de vida.

Volpini e Moura (2005), em estudo realizado em Campinas, verificaram que 63,6% dos bebês foram desmamados precocemente, ou seja, antes dos seis meses de idade, sendo a idade de desmame precoce de 76 ± 50 dias. No município de Botucatu, localizado na região Centro-Sul do Estado de São Paulo, investigou-se a situação do aleitamento materno de 1.509 crianças e constatou-se uma mediana de 17 dias para o aleitamento materno exclusivo e, para o aleitamento materno predominante, de 64 dias (CARVALHAES *et al.*, 1998), evidenciando que a situação do aleitamento materno nesse município está distante daquela preconizada pela OMS (WHO, 2001b).

Similarmente, em um estudo longitudinal em 479 bebês do município do Rio de Janeiro, que foram acompanhados durante os primeiros nove meses de vida, verificou-se que a duração mediana de amamentação predominante foi de 67 dias, sendo que 27% amamentaram predominantemente por um mês ou menos. Além disso, esse estudo constatou que prematuros apresentaram uma duração mediana de amamentação predominante de 21 dias, enquanto bebês nascidos a termo, de 90 dias (SPYRIDES *et al.*, 2005).

A elevada prevalência do desmame precoce em diversas regiões do Brasil é ainda mais acentuada na região Nordeste. Marques *et al.* (2001) conduziram um estudo em quatro cidades no interior do estado de Pernambuco, no qual observaram que água e chá eram oferecidos para 72% dos recém-nascidos no primeiro dia de vida, sendo que esse valor aumentou para 80% durante a primeira semana de vida; na quarta semana, o mesmo tinha aumentado para 88%. Outros tipos de leite foram introduzidos por 58% das mães durante o primeiro mês de vida. A proporção de bebês que eram amamentados exclusivamente aos quatro e seis meses de vida era de 1,5% e 0,6%, respectivamente. Cabe ressaltar que a idade mediana para o início da ingestão de outros tipos de leite era de 24 dias, sendo que a mediana de duração do aleitamento era de 65 dias para mães que introduziam outro tipo de leite dentro do primeiro mês de vida do bebê e de 165 dias para outras mães. Um resultado bastante relevante desse estudo é que 65% dos bebês aos seis meses de vida não eram mais amamentados. Similarmente, Assis *et al.* (1994) verificaram a prática do aleitamento materno em comunidades rurais do semi-árido baiano e constataram que das 226 crianças que integravam o estudo, 92 iniciaram a amamentação ao peito. A duração mediana do aleitamento total foi de 91 dias e o aleitamento exclusivo apresentou duração mediana de 0,1 dia.

Muitos são os fatores que afetam o modo como as mulheres alimentam seus filhos e o tempo durante o qual os amamentam. Esses fatores incluem: o meio em que vivem as mulheres, a situação econômica de suas famílias, o acesso à educação e à inserção no mercado de trabalho, a propaganda das fórmulas infantis e a atuação dos serviços de saúde. Em relação ao papel dos serviços de saúde no incentivo ao aleitamento materno, verifica-se a presença de orientações e condutas equivocadas sobre a alimentação infantil, o que favorece o desmame precoce (TOMA e MONTEIRO, 2001).

Desse modo, a OMS e o UNICEF emitiram, em 1992, declaração conjunta (“Os dez passos para o sucesso da amamentação”) para definir o que as maternidades deveriam fazer para proteger, promover e apoiar o aleitamento materno (tabela 2). Ao mesmo tempo, para implementar “Os dez passos”, foi desenvolvida a Iniciativa Hospital Amigo da Criança (IHAC) (OMS, 1989). Toma e Monteiro (2001) observaram em 45 hospitais do município de São Paulo, sendo 26 hospitais públicos e 19 privados, que mais de 1/4 dos

hospitais públicos e mais de 1/3 dos hospitais privados avaliados não cumpriam qualquer passo da IHAC. Em apenas dois hospitais, ambos públicos, observou-se a adoção de pelo menos sete dos “dez passos”. De modo geral, rotinas de proteção, promoção e apoio ao aleitamento materno foram encontradas com mais frequência nos hospitais públicos do que nos privados. Esse mesmo estudo constatou a alta frequência de práticas consideradas prejudiciais ao início e estabelecimento da amamentação em hospitais públicos e privados do município de São Paulo, como a separação desnecessária de mães e recém-nascidos, a restrição na duração e frequência das mamadas e o uso de alimentos pré-lácteos e suplementos.

Tabela 2. Os dez passos para o sucesso do aleitamento materno da Iniciativa Hospital Amigo da Criança.

-
1. Ter uma norma escrita sobre o aleitamento materno, que deve ser rotineiramente transmitida a toda a equipe de saúde.
 2. Treinar toda a equipe de saúde, capacitando-a para implementar essa norma.
 3. Orientar todas as gestantes sobre as vantagens e o manejo do aleitamento materno
 4. Ajudar as mães a iniciar o aleitamento materno na primeira meia hora após o nascimento do bebê
 5. Mostrar às mães como amamentar e como manter a lactação, mesmo se vierem a ser separadas de seus filhos
 6. Não dar ao recém-nascido nenhum outro alimento ou bebida além do leite materno, a não ser que tal procedimento tenha uma indicação médica
 7. Praticar o alojamento conjunto — permitir que mãe e bebê permaneçam juntos — 24 h por dia
 8. Encorajar o aleitamento materno sob livre demanda
 9. Não dar bicos artificiais ou chupetas a crianças amamentadas ao seio
 10. Encaminhar as mães, por ocasião da alta hospitalar, para grupos de apoio ao aleitamento materno na comunidade ou em serviços de saúde.
-

Modificado de Organização Mundial da Saúde (1989)

Em relação aos países da América do Norte também se verifica um quadro similar àquele observado no Brasil. A prevalência de mães que iniciam o aleitamento materno após o parto é de cerca de 79% no Canadá, enquanto nos Estados Unidos da América essa taxa é de 64%. Contudo, as taxas de aleitamento materno declinam rapidamente nesses países nas primeiras quatro a oito semanas pós-parto, com menos de 35% das mães amamentando exclusivamente aos quatro meses de vida. Apenas 30-40% das mães canadenses e 29% das mães norte-americanas continuam alguma forma de aleitamento até os seis meses pós-parto (DENNIS, 2002).

Europa e Austrália demonstram maior prevalência de mães — com bebês nascidos a termo — que iniciam o aleitamento imediatamente após o parto comparadas àquelas do Canadá e Estados Unidos da América. Por exemplo, prevalência de 74 a 99,5% das mães que iniciam o aleitamento materno após o parto foi observada na Europa, com a mais alta taxa verificada em Copenhague. Na Austrália, a prevalência de mães que iniciam o aleitamento materno após o parto varia entre 91 e 97%. Europa e Austrália também reportaram maior duração do aleitamento materno em bebês nascidos a termo quando comparado aos valores do Canadá e Estados Unidos da América. Na Europa, a duração do aleitamento materno aos três meses de vida varia entre 42 a 71% e, aos seis meses de vida, entre 19 a 52%. Na Austrália, o aleitamento materno aos três meses de vida varia de 44 a 68%, enquanto a duração do aleitamento materno aos seis meses de vida varia entre 50 e 52% (DENNIS, 2002; CALLEN e PINELLI, 2004).

Em estudo realizado por Cernadas *et al.* (2003), na Argentina, com 539 mães, verificou-se que no momento logo após o parto e um mês, quatro meses e seis meses pós-parto, a frequência do aleitamento materno exclusivo foi de 97%, 83%, 56% e 19%, respectivamente. Contudo, pesquisa realizada pela Sociedade de Pediatria Argentina, com mais de 5.000 mães em todo o país, demonstrou que 42,5% dos bebês com um mês de vida recebiam aleitamento materno exclusivo e, aos seis meses de vida, apenas 3,35% dos bebês eram alimentados com leite materno exclusivamente (AGEITOS e ORAZI, 1998).

3.6 Desmame, glutamina e imunocompetência

O metabolismo da glutamina apresenta papel relevante no desenvolvimento infantil devido a sua função nos processos de amoniogênese e gliconeogênese renal, que envolve a deaminação mitocondrial deste aminoácido pela glutaminase para formação de glutamato, que sofre, subseqüentemente, deaminação oxidativa. Durante o período de amamentação, devido ao limitado processo de gliconeogênese hepática, a partir de aminoácidos, a atividade da gliconeogênese renal, a partir da glutamina, torna-se relevante, podendo ser restrita a este aminoácido até o período de desmame (BALL e HARDY, 2002).

Durante o período de amamentação, o músculo esquelético é responsável por 60-80% da síntese protéica corporal. O maior fluxo e o *turnover* protéico durante a fase de crescimento podem acarretar em maior utilização de glutamina (BALL e HARDY, 2002). Evidências do potencial papel da glutamina para recém-nascidos foram relatadas por Agostoni *et al.* (2000b), que investigaram o conteúdo de aminoácidos livres presentes no leite materno obtido de mulheres saudáveis durante o período de lactação. Esses autores demonstraram que o conteúdo de glutamina aumentou 20 vezes, enquanto a concentração de glutamato, o mais prevalente aminoácido livre no leite humano, aumentou 2,5 vezes no decorrer de três meses de lactação, ao mesmo tempo em que a concentração dos demais aminoácidos permaneceu estável durante esse período.

Quais seriam as razões para a ocorrência desse fato durante o período de lactação? O aumento da concentração tanto de glutamina quanto de glutamato no leite materno não apenas representa uma fonte de nitrogênio para o organismo, mas, possivelmente, de neurotransmissores, aliado à função de proteção da mucosa intestinal e de melhora da resposta imune. Segundo Yoo *et al.* (1997), a proliferação de linfócitos em porcos desmamados precocemente e infectados com *Escherichia coli* foi significativamente maior no grupo de animais suplementados com 40 g de glutamina/kg de ração quando comparada àqueles que ingeriram a ração controle. A mesma quantidade de glutamina suplementada à ração de camundongos acarretou em aumento da síntese de IL-1 β , IL-6 e TNF- α por macrófagos peritoniais estimulados por LPS

(WELLS *et al.*, 1999). Similarmente, Suzuki *et al.* (1993) e Adjei *et al.* (1994) verificaram aumento da taxa de sobrevivência de camundongos infectados com *Staphylococcus aureus* quando suplementados com glutamina (40 g de glutamina/kg de ração).

Outro papel relevante da glutamina em bebês é devido a este aminoácido atuar como precursor da síntese de glutathione (GSH) via glutamato (NEU, 2007). Quantitativamente, a GSH é o principal antioxidante celular, que auxilia na prevenção de lesões oxidativas de estruturas celulares. Segundo Ball e Hardy (2002), a infusão parenteral ou enteral de glutamina estimula a síntese intestinal de GSH e preserva o conteúdo de GSH em células do sistema imune.

4. OBJETIVOS

O aminoácido glutamina é essencial para a funcionalidade de macrófagos, que apresentam aumento da utilização desse aminoácido durante processos infecciosos. Ao mesmo tempo, observa-se que a glutamina está presente em concentração significativa no leite materno, sendo o aumento de sua concentração nesse alimento diretamente proporcional ao período de aleitamento. Observa-se que bebês precocemente desmamados apresentam maior incidência de infecções, o que indica que a ausência de ingestão de alguns fatores presentes no leite materno possa influenciar esse fato. Diante dessas evidências, o presente trabalho pretendeu verificar os efeitos do desmame precoce e da suplementação com L-glutamina, *in vitro* e *in vivo*, sobre a funcionalidade de macrófagos peritoniais e o estado nutricional de camundongos. Para tanto, o trabalho foi dividido nas três seguintes etapas:

ETAPA 1

Avaliar o efeito do desmame precoce associado à ingestão de ração isenta e suplementada de glutamina sobre a funcionalidade de macrófagos peritoniais e o estado nutricional de camundongos.

ETAPA 2

Avaliar o efeito da suplementação com glutamina *in vitro* sobre a funcionalidade de macrófagos peritoniais de camundongos desmamados precocemente e alimentados com ração isenta de glutamina.

ETAPA 3

Verificar o efeito da suplementação crônica com glutamina *in vivo* sobre a funcionalidade de macrófagos peritoniais e o estado nutricional de camundongos desmamados precocemente e inoculados com BCG.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Condições experimentais

5.1.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss Webster*, machos, desmamados no 14^o e 21^o dias de vida, obtidos de colônias de produção e experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os animais lactentes e retirados da mãe no 14^o dia de vida foram mantidos em gaiolas de criação até o 21^o dia de vida (etapas 1 e 2) ou até o 28^o dia de vida (etapa 3), sob condições ambientais controladas, temperatura de 22 ± 2 °C, umidade relativa de $55 \pm 10\%$ e ciclo de iluminação 12h claro/12h escuro (luz acesa às 7:00 h). Os animais foram pesados diariamente, sendo o peso final dos animais verificado imediatamente antes do sacrifício.

Todos os procedimentos realizados com os camundongos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, de acordo com as normas do Colégio Brasileiro sobre Experimentação Animal (Anexo II).

5.1.2 Acasalamento, gestação e lactação

Visando padronizar o acasalamento, as condições relacionadas ao período de gestação e lactação e o nascimento dos animais utilizados no presente estudo, foram utilizadas fêmeas com 2 meses de idade e primíparas. O acasalamento realizado foi poligâmico (2 fêmeas e um macho) e após a constatação da prenhez, as fêmeas foram mantidas em gaiolas individuais durante todo o período de gestação. Cabe ressaltar que foram utilizados apenas os filhotes da primeira e da segunda crias de cada fêmea, uma vez que se constatou, em um estudo piloto anterior, que filhotes nascidos a partir da terceira gestação podem apresentar menor peso no 14^o dia de vida.

Após o nascimento dos filhotes, fez-se a sexagem dos neonatos para oito camundongos machos, que foram mantidos com a mãe durante o período

de 14 ou 21 dias de vida. Cabe ressaltar que a escolha por oito filhotes no momento do nascimento buscou garantir condições ideais de amamentação, com conseqüente redução do risco de desnutrição das crias (OLIVERIO *et al.*, 1975; CASTELLANO e OLIVERIO, 1976; BALONAN e SHENG, 2000).

No presente estudo, um grupo foi constituído de filhotes amamentados durante os primeiros 21 dias de vida (etapa 1), o que corresponde ao período normal de lactação em camundongos. Esses camundongos foram considerados como grupo controle (AMAM) durante a realização das etapas 1 e 2 do presente estudo. Os outros grupos experimentais, correspondentes às etapas 1, 2 e 3, foram desmamados no 14º dia de vida, o que caracterizou o desmame precoce. A escolha por desmamar os animais no 14º dia deve-se a três motivos: (i) camundongos abrem os olhos por volta do 10º-12º dias de vida; (ii) em um estudo piloto foi verificado que a maior taxa de mortalidade ocorre com camundongos com peso abaixo de 7 gramas, o qual é verificado entre o 11º-13º dias de vida; e (iii) no Brasil, o período de licença-maternidade corresponde a 120 dias (artigo 7º, inciso XVII, da Constituição da República Federativa do Brasil), enquanto a OMS (WHO, 2001a; WHO, 2001b) preconiza que o aleitamento materno exclusivo deva ocorrer durante os primeiros 180 dias pós-natal. Sendo assim, verifica-se que o período de licença-maternidade atualmente em vigor no Brasil representa apenas 2/3 do período de aleitamento materno exclusivo recomendado pela OMS. Desse modo, foi avaliado no presente estudo o efeito do desmame precoce em camundongos que foram desmamados após terem completado 2/3 do período de amamentação habitual.

No momento do desmame precoce (14º dia de vida) os animais foram cuidadosamente retirados da gaiola na qual estava a mãe e colocados em gaiolas contendo a ração isenta ou suplementada com glutamina. Foram colocados 2 animais por gaiola (constituída de polipropileno e com dimensões de 30x18x13 cm). No momento da colocação dos animais desmamados no 14º dia de vida na gaiola, os mesmos foram colocados próximos à ração visando facilitar o reconhecimento e o consumo da mesma pelos animais. Além disso, foram utilizados comedouros com abertura lateral, o que facilitou o acesso à ração por esses animais.

5.1.3 Grupos experimentais

Na **etapa 1** avaliou-se o efeito do desmame precoce associado à ingestão de uma ração isenta ou suplementada com glutamina sobre a funcionalidade de macrófagos peritoniais e o estado nutricional de camundongos. Para tanto, os animais foram distribuídos em três grupos experimentais:

- **AMAM:** grupo controle que foi desmamado e sacrificado no 21^o dia de vida.
- **DESM:** grupo que foi desmamado no 14^o dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina durante sete dias (tabelas 3 e 4). Esse grupo foi sacrificado no 21^o dia de vida.
- **GLN:** grupo que foi desmamado no 14^o dia pós-natal e alimentado com ração suplementada com glutamina durante sete dias (tabelas 3 e 4). Esse grupo foi sacrificado no 21^o dia de vida.

Na **etapa 2** avaliou-se o efeito da suplementação *in vitro* com glutamina sobre a funcionalidade de macrófagos peritoniais de camundongos desmamados precocemente e alimentados com ração isenta de glutamina. Nessa etapa foram utilizados dois grupos experimentais:

- **AMAM:** grupo controle que foi desmamado e sacrificado no 21^o dia de vida.
- **DESM:** grupo que foi desmamado no 14^o dia pós-natal e alimentado com ração isenta de glutamina durante sete dias (tabelas 3 e 4). Esse grupo foi sacrificado no 21^o dia de vida. Diferentemente da etapa 1, o meio de cultura utilizado nos testes de avaliação da funcionalidade dos macrófagos peritoniais obtidos dos animais do grupo DESM foi suplementado com quatro diferentes concentrações de glutamina. Desse modo, nessa etapa 2, o grupo DESM foi subdividido em quatro grupos:

- **DESM/0,5:** meio de cultura suplementado *in vitro* com 0,5 mmol/L de glutamina.
- **DESM/0,58:** meio de cultura suplementado *in vitro* com 0,58 mmol/L de glutamina.
- **DESM/1,0:** meio de cultura suplementado *in vitro* com 1,0 mmol/L de glutamina.
- **DESM/2,0:** meio de cultura suplementado *in vitro* com 2,0 mmol/L de glutamina.

Na **etapa 3** avaliou-se o efeito da ingestão crônica de ração suplementada com glutamina sobre a funcionalidade de macrófagos peritoniais e o estado nutricional de camundongos desmamados precocemente e inoculados com BCG. Para tanto, os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais:

- **-GLN/-BCG:** grupo que foi desmamado no 14^o dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina durante 14 dias (-GLN) (tabelas 3 e 4). Esse grupo foi sacrificado no 28^o dia de vida, porém não foi estimulado com BCG (-BCG).
- **-GLN/+BCG:** grupo que foi desmamado no 14^o dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina durante 14 dias (-GLN) (tabelas 3 e 4). Os animais desse grupo foram inoculados intraperitonealmente com BCG no 21^o dia de vida (+BCG) e sacrificados no 28^o dia de vida.
- **+GLN/-BCG:** grupo que foi desmamado no 14^o dia de vida e alimentado com ração suplementada com glutamina durante 14 dias (+GLN) (tabelas 3 e 4). Esse grupo foi sacrificado no 28^o dia de vida, porém não foi estimulado com BCG (-BCG).
- **+GLN/+BCG:** grupo que foi desmamado no 14^o dia de vida e alimentado com ração suplementada com glutamina durante 14 dias (+GLN) (tabelas 3 e 4). Os animais desse grupo foram inoculados intraperitonealmente com BCG no 21^o dia de vida (+BCG) e sacrificados no 28^o dia de vida.

5.1.4 Ração

Os animais pertencentes às etapas 1, 2 e 3, que foram desmamados no 14º dia de vida, foram alimentados *ad libitum* com água e ração elaborada para camundongos em crescimento, segundo o *American Institute of Nutrition* (AIN – 93G) (REEVES *et al.*, 1993), a partir do 14º até o 21º dia de vida (etapas 1 e 2) ou 28º dia de vida (etapa 3), totalizando períodos de sete ou 14 dias, respectivamente, durante os quais foi realizado, a cada 24 horas, o controle da ingestão de ração.

A fonte protéica da ração para camundongos em crescimento (AIN-93G) é a caseína, que apresenta aproximadamente 9,8 g de glutamina/100 g de caseína (WELLS *et al.*, 1999). A fim de tornar a ração isenta do aminoácido glutamina, a caseína foi substituída pela adição de cada um dos L-aminoácidos na sua forma livre (Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, Brasil), os quais estão presentes na caseína, com exceção do aminoácido glutamina (tabelas 3 e 4). A quantidade de nitrogênio correspondente à retirada do aminoácido glutamina foi repostada pelo aumento da adição dos seguintes aminoácidos dispensáveis: alanina, ácido aspártico, glicina, prolina e serina. Esses aminoácidos foram adicionados em quantidades equivalentes de nitrogênio, o que implica que a quantidade adicionada de cada um desses aminoácidos difere entre os mesmos, uma vez que esses aminoácidos apresentam pesos moleculares diferentes entre si. Cabe ressaltar que o aminoácido dispensável glutamato não foi utilizado no cálculo de reposição do nitrogênio correspondente à retirada do aminoácido glutamina, uma vez que esse aminoácido está diretamente envolvido com o metabolismo da glutamina corporal (MOUNDRAS *et al.*, 1993). Essa ração isenta de glutamina (**-GLN**) foi utilizada nas etapas 1, 2 e 3 do presente estudo.

Nas etapas 1 e 3 do presente trabalho, utilizou-se também uma ração preparada sem caseína, que foi substituída pela adição de cada um dos aminoácidos que estão presentes na caseína, e suplementada com glutamina (40 g de glutamina/kg de ração) (**+GLN**) (tabelas 3 e 4).

Tanto a ração isenta de glutamina (**-GLN**) quanto a ração suplementada com glutamina (**+GLN**) são isocalóricas e isonitrogenadas (tabela 3). Além disso, a quantidade de aminoácidos indispensáveis e a razão entre a

quantidade de nitrogênio oriundo de aminoácidos indispensáveis e de dispensáveis são iguais em ambas as rações (tabela 4).

Devido à retirada da caseína – que contribui com 1.440 mg de fósforo/kg de ração – da formulação da ração, o *mix* de mineral foi acrescido de 180,68 g de fosfato de potássio, o que propiciou o fornecimento recomendado de fósforo para camundongos em crescimento, ou seja, 3 g de fósforo/kg de ração (REEVES *et al.*, 1993).

Tabela 3. Formulação das rações experimentais ¹

Componentes (unidade/kg)	- GLN	+ GLN
Amido de milho (g)	542,406	562,046
Mistura de aminoácidos (g)	190,080	170,440
Sacarose (g)	100,000	100,000
Óleo de soja (g)	70,000	70,000
Fibra alimentar (g)	50,000	50,000
Mistura de minerais (g) ²	35,000	35,000
Mistura vitamínica (g)	10,000	10,000
Bitartarato de colina (g)	2,500	2,500
Tert-butilidroquinona (g)	0,014	0,014

¹ Ambas as rações (-GLN e +GLN) são isocalóricas (4.002 kcal/kg) e isonitrogenadas (24,46 g de nitrogênio/kg)

² Devido à retirada da caseína da formulação da ração, o *mix* de mineral foi acrescido de 180,68 g de fosfato de potássio, o que propicia o fornecimento de 3 g de fósforo/kg de ração.

-GLN = ração isenta de glutamina

+GLN = ração suplementada com glutamina

Tabela 4. Perfil de aminoácidos das rações isenta de glutamina (-GLN) e suplementada com glutamina (+GLN).

Aminoácido	-GLN	+GLN
Dispensáveis	g/kg de ração	
Alanina	8,84	2,61
Ácido aspártico	18,53	3,90
Ácido glutâmico	18,93	18,93
Glicina	6,77	2,20
Glutamina	—	40,00
Prolina	25,97	3,38
Serina	14,70	3,08
AAD – N ¹	11,52	11,52
Indispensáveis		
Arginina	6,40	6,40
Cistina	3,70	3,70
Fenilalanina	8,80	8,80
Histidina	4,60	4,60
Isoleucina	8,50	8,50
Leucina	15,40	15,40
Lisina-HCl	16,24	16,24
Metionina	4,60	4,60
Treonina	6,70	6,70
Tirosina	9,30	9,30
Triptofano	2,10	2,10
Valina	10,00	10,00
AAI – N ²	12,94	12,94
Razão AAI-N: AAD-N, g:g	1,12	1,12

¹ Nitrogênio a partir de aminoácidos dispensáveis

² Nitrogênio a partir de aminoácidos indispensáveis

-GLN = ração isenta de glutamina

+GLN = ração suplementada com glutamina

5.1.5 Curva de crescimento

Os animais estudados nas etapas 1 e 2 foram pesados diariamente desde o 14º até o 21º dia de vida, enquanto os animais da etapa 3 foram pesados diariamente desde o 14º até o 28º dia de vida, no intuito de estabelecer a curva de crescimento dos animais durante o período do protocolo. No momento da pesagem dos animais foi avaliado o consumo de ração dos mesmos.

5.1.6 Indução ao processo inflamatório

Os animais dos grupos **-GLN/+BCG** e **+GLN/+BCG**, que pertencem à etapa 3, foram inoculados no 21º dia de vida, intraperitonealmente, com 10^7 unidades viáveis de bacilos/700 µL de suspensão de ONCO-BCG (Bacilo de Calmette-Guérin, *Mycobacterium bovis* cepa Moreau). O ONCO-BCG foi produzido pelo Instituto Butantan (São Paulo, SP) e foi gentilmente cedido pela Dra. Ivone Kazuko Yamaguchi.

5.2 Obtenção do material biológico

Os animais foram previamente anestesiados com cloridrato de quetamina (100 mg/kg de massa corporal) associado ao cloridrato de xilazina (50 mg/kg de massa corporal), por via intraperitoneal, e só então sacrificados. O sacrifício foi realizado no período da manhã, entre 8 e 12 h.

O sangue foi coletado do plexo axilar utilizando-se heparina como anticoagulante para a determinação da concentração plasmática de glutamina. Amostras sem anticoagulante foram colhidas para a obtenção do soro, a partir do qual foram determinadas as concentrações de proteínas totais, de albumina e de ferro. Uma alíquota de sangue foi coletada com o sal sódico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (10%) para a realização do hemograma e da contagem de reticulócitos.

Para a determinação da concentração sérica de glicose, insulina, corticosterona e do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), os animais foram mantidos sem acesso ao leite materno (grupo AMAM) ou à

ração (grupos desmamados precocemente) por um período de oito horas antecedendo ao sacrifício. Posteriormente, os animais foram guilhotinados sem uso de anestésicos e o sangue coletado em tubo sem anticoagulante para a obtenção do soro. Esse procedimento foi realizado dentro do biotério no qual os animais foram mantidos até o momento do sacrifício. A utilização de guilhotina visou diminuir qualquer alteração na concentração sérica de corticosterona induzida pela utilização de anestésicos, enquanto a opção por sacrificar os animais dentro do biotério visou evitar o estresse provocado pela retirada do animal da gaiola e posterior deslocamento do mesmo até o laboratório de pesquisa, fato esse que também poderia influenciar na concentração sérica de corticosterona.

Posteriormente à coleta do sangue, o músculo gastrocnêmio, o fígado, o baço e o cérebro foram dissecados e imediatamente pesados e congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior determinação da concentração de proteína, de RNA e de DNA. O músculo gastrocnêmio e o fígado também foram utilizados para a determinação da concentração de glutamina e da atividade máxima da enzima glutamina sintetase.

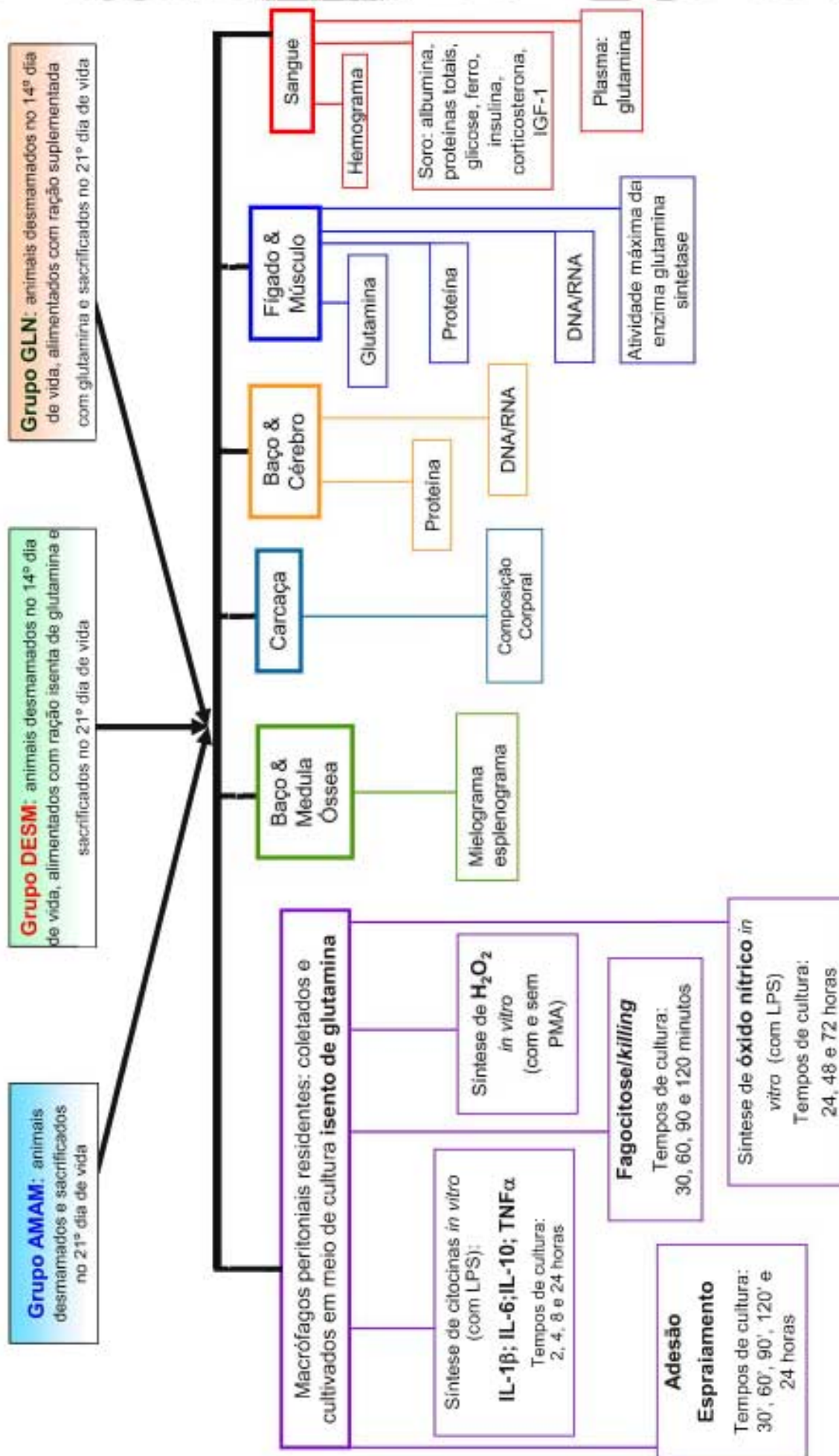
A partir da obtenção do baço e do fêmur foram realizados o esplenograma e o mielograma, respectivamente.

A partir da carcaça dos animais foi realizada a análise da composição química da mesma, ou seja, a quantificação de umidade, proteína, lipídios e cinzas presentes na carcaça.

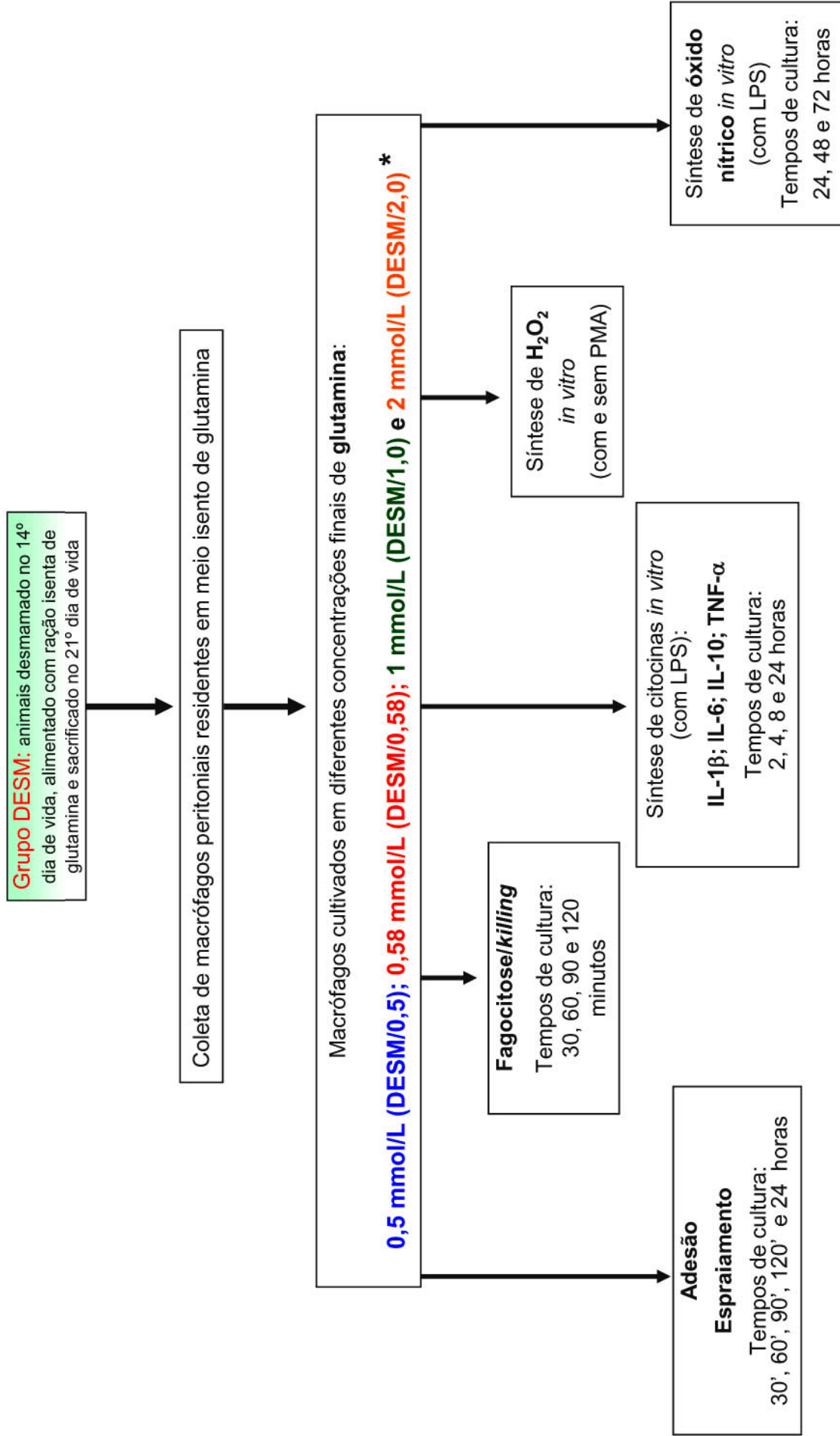
A partir da obtenção de macrófagos peritoniais determinaram-se os seguintes parâmetros de avaliação da funcionalidade dessas células: síntese de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, capacidade de adesão e de espraiamento, atividades fagocítica e fungicida e síntese de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α).

Cabe ressaltar que os animais da etapa 2 foram utilizados apenas para a obtenção de macrófagos peritoniais residentes para a avaliação dos parâmetros de funcionalidade acima descritos.

Nos esquemas 1, 2 e 3 encontram-se todas as análises relacionadas aos parâmetros plasmáticos, séricos, teciduais e de avaliação da funcionalidade de macrófagos peritoniais relativos às etapas 1, 2 e 3.

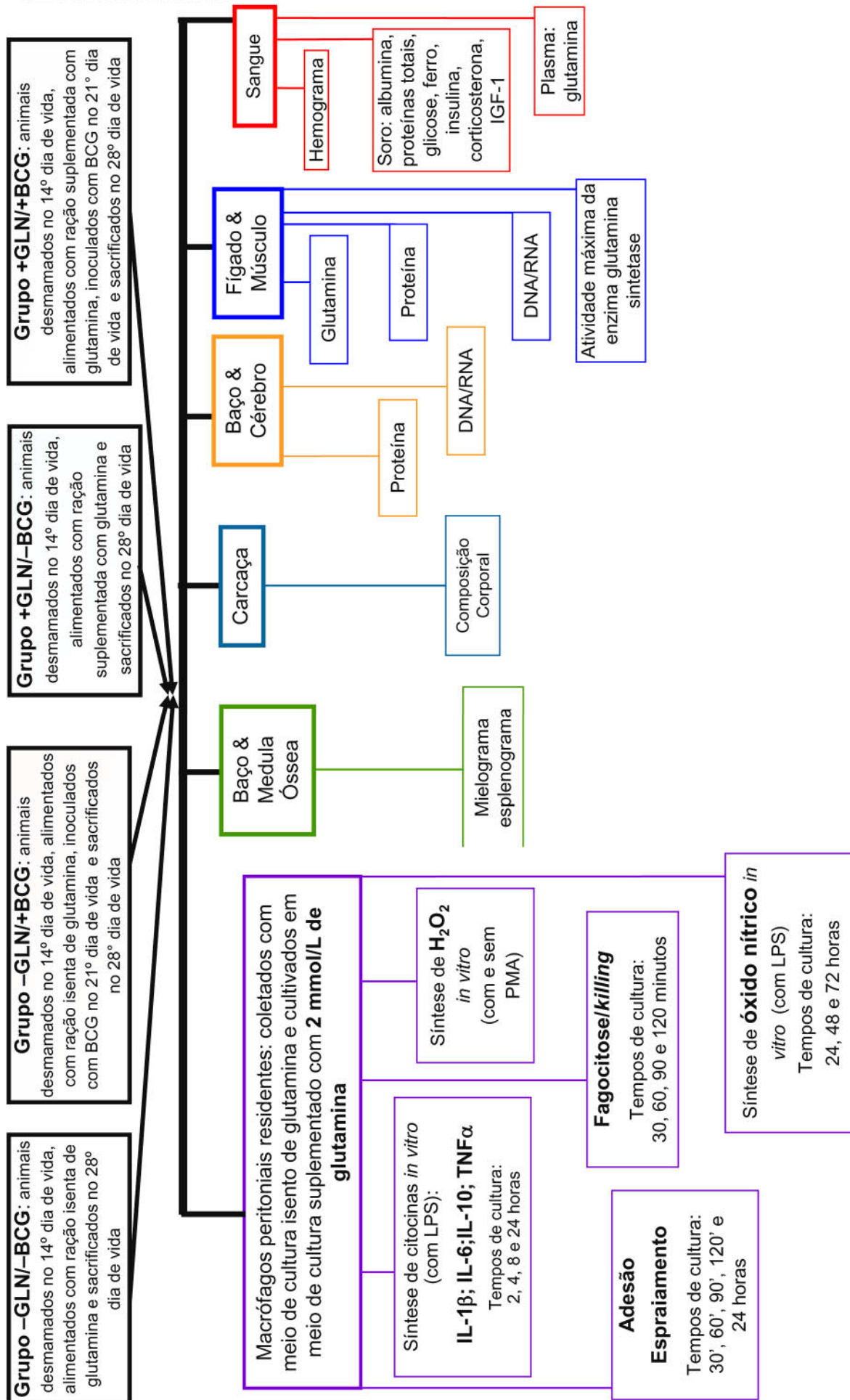


Esquema 1 - Determinações realizadas na etapa 1



Esquema 2 - Determinações realizadas na etapa 2

* Os resultados obtidos na etapa 2 foram comparados com o grupo AMAM (Etapa 1)



Esquema 3 - Determinações realizadas na etapa 3

5.3 Parâmetros plasmáticos e séricos

5.3.1 Determinação da concentração plasmática de glutamina

A determinação da concentração de glutamina plasmática foi realizada segundo a metodologia descrita por Lund (1985), que se baseia na conversão de NAD^+ para NADH , a qual é medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 340 nm, sendo esta determinação proporcional à quantidade de L-glutamina inicial. As amostras foram processadas em triplicata.

5.3.2 Determinação da concentração sérica de proteínas totais

A concentração sérica de proteínas totais foi determinada pelo método do Biureto (GORNAL *et al.*, 1948). As amostras foram processadas em duplicata e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 550 nm.

5.3.3 Determinação da concentração sérica de albumina

A dosagem da concentração sérica de albumina foi realizada pelo método do Verde de Bromo Cresol (DOUMAS, 1971), sendo as amostras processadas em duplicata e a leitura realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 630 nm.

5.3.4 Determinação da concentração sérica de glicose

A glicose plasmática foi quantificada pelo método de Bergmeyer (1974). A concentração de glicose foi determinada pela quantidade de quinonimina formada e medida a 505 nm (*Kit* LABTEST – Glicose GOD-ANA). As amostras foram processadas em duplicata.

5.3.5 Determinação da concentração sérica de ferro

Todo o material utilizado desde a coleta do sangue para a obtenção do soro até a análise para a determinação da concentração de ferro sérico foi previamente desmineralizado. A concentração de ferro sérico foi determinada pelo método descrito por Goodwin *et al.* (1966) utilizando o *kit* da empresa Labtest Diagnóstica[®]. Em meio ácido, o ferro ligado à transferrina se dissocia em íon férrico, que é reduzido à forma de íon ferroso por ação da hidroxilamina. Após a adição de Ferrozine[®] forma-se um complexo magenta brilhante cuja absorvância, medida a 560 nm, é proporcional à quantidade de ferro na amostra. As amostras foram processadas em duplicata.

5.3.6 Determinação da concentração sérica de insulina

A concentração sérica de insulina foi dosada por radioimunoensaio utilizando-se o *kit* Biotrak[™] (Amersham International, Buckinghamshire, UK). A leitura foi realizada em contador de cintilação gama (Beckman L600). As amostras foram processadas em duplicata.

5.3.7 Determinação da concentração sérica de corticosterona

A concentração sérica de corticosterona foi determinada por radioimunoensaio utilizando-se o *kit* Biotrak[™] (Amersham International, Buckinghamshire, UK). A leitura foi realizada em contador de cintilação gama (Beckman L600). As amostras foram processadas em duplicata.

5.3.8 Determinação da concentração sérica do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1)

A concentração de IGF-1 foi dosada por radioimunoensaio utilizando-se o *kit* Diagnostic Systems Laboratories, Inc. EUA. A leitura foi realizada em contador de cintilação gama (Beckman L600) durante 1 minuto. As amostras foram processadas em duplicata.

5.4 Parâmetros teciduais

5.4.1 Determinação das concentrações muscular e hepática de glutamina

A extração de glutamina muscular e hepática foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Sahlin *et al.* (1990). As amostras congeladas do músculo gastrocnêmio e fígado foram pulverizadas em placas de alumínio sob adição constante de nitrogênio líquido, pesadas e imediatamente homogeneizadas em ácido perclórico (PCA) (0,5 M) gelado. As amostras foram posteriormente centrifugadas a 3.000 rpm, a 4 °C, durante 15 minutos. O sobrenadante foi neutralizado com bicarbonato de potássio (KHCO₃) (0,5 M) e, posteriormente, determinou-se a concentração de glutamina segundo Lund (1985).

5.4.2 Extração de proteína, RNA e DNA no músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro

As amostras congeladas do músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro foram pulverizadas em placas de alumínio sob adição constante de nitrogênio líquido, pesadas e imediatamente homogeneizadas com 6 mL de ácido tricloroacético p.a. (TCA, Merck Chemical, Darmstadt, Alemanha), 10%, gelado, sendo, posteriormente, centrifugada a 3.000 rpm por 15 minutos, à temperatura de 4 °C.

Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso com 10 mL de PCA p.a. (Merck Chemical, Darmstadt, Alemanha), 2%, gelado, e centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos, à temperatura de 4 °C. Depois, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi, então, ressuspendido com 10 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,3 N e mantido em banho aquecido por 1 hora, à temperatura de 37 °C. Durante esse período foi utilizado um bastão de vidro que permitiu a dissolução de qualquer coágulo formado nos tubos. Em seguida, cerca de 0,5 mL foram retirados e congelados a -80 °C para posterior determinação de proteína.

O restante da solução foi resfriado em gelo durante 10 minutos. Posteriormente, foi acrescentado 2 mL de PCA (20%) gelado, homogeneizado com bastão de vidro e mantido em gelo por 10 minutos. Em seguida, foi

centrifugado por 15 minutos, 3.000 rpm, à temperatura de 4 °C. Uma parte do sobrenadante (5 mL) foi armazenada a -80 °C para posterior determinação da concentração de RNA, enquanto o restante do sobrenadante foi desprezado.

Em seguida, o precipitado foi ressuspenso com 10 mL de PCA (2%) gelado e centrifugado por 15 minutos, 3.000 rpm, à temperatura de 4 °C. Após esse procedimento, o sobrenadante foi desprezado, o precipitado foi ressuspenso com 10 mL de PCA (8%), mantido em banho aquecido por 45 minutos, à temperatura de 70 °C e, posteriormente, centrifugado por 15 minutos, 3.000 rpm, à temperatura de 4 °C. Uma alíquota do sobrenadante (4 mL) foi armazenada a -80 °C para a determinação da concentração de DNA.

5.4.3 Determinação da concentração de proteína no músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro

A concentração de proteína no músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro foi determinada segundo a metodologia descrita por Lowry *et al.* (1951). O princípio consiste na hidrólise alcalina das proteínas celulares com posterior adição do reagente colorimétrico de *Folin-Ciocalteu* (Merck Chemical, Darmstadt, Alemanha). A leitura foi realizada a 660 nm.

5.4.4 Determinação da concentração de RNA no músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro

A determinação da concentração de RNA do músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro foi realizada segundo a metodologia descrita por Munro e Fleck (1966). A concentração de RNA foi calculada utilizando a relação de um grau de extinção a 260 nm que corresponde a 32 µg de ácido ribonucléico por mililitro de solução analisada.

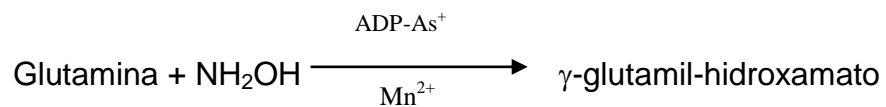
5.4.5 Determinação da concentração de DNA no músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro

A determinação da concentração de DNA do músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro foi realizada segundo a metodologia descrita por

Gendimenico *et al.* (1988), sendo os valores comparados à curva padrão de DNA obtido de timo de bezerro (SIGMA Chemical Company, EUA). A leitura foi realizada a 595 nm.

5.4.6 Determinação da atividade máxima da enzima glutamina sintetase no músculo gastrocnêmio e no fígado

A atividade máxima da enzima glutamina sintetase no músculo gastrocnêmio e no fígado foi determinada pela formação do produto da reação (γ -glutamil-hidroxamato), segundo a metodologia descrita por Minet *et al.* (1997), que consiste na atividade da enzima glutamina sintetase como uma transferase de grupos glutamil:



O músculo gastrocnêmio e o fígado foram homogeneizados em um meio de extração (50 mM de imidazole, pH 6,8), a 0 °C. O homogenato foi centrifugado a 4.500 g, por 15 minutos, e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio enzimático.

A mistura de ensaio consistiu de 50 mM de imidazole (pH 6,8), 50 mM L-glutamina, 25 mM de hidroxilamina, 25 mM de arsenato de sódio, 2 mM de cloreto de manganês (MnCl₂) e 0,16 mM de adenosina difosfato (ADP), sendo o volume final de 1 mL. Após incubação a 37 °C por 30 minutos, a reação foi bloqueada pela adição de 2 mL de uma solução de 2,42% de FeCl₃ e 1,45% de ácido tricloroacético em 1,82% de ácido clorídrico (HCl). O material insolúvel foi removido por centrifugação e a absorbância do sobrenadante foi medida espectrofotometricamente a 540 nm. Para cada ensaio, os valores foram corrigidos com um branco, que continha a mistura de incubação total, exceto o homogenato e a ADP.

5.5 Análise da composição química da carcaça

A composição corporal dos camundongos (umidade, lipídios, proteína e cinzas) foi determinada por meio de análise química da carcaça.

O conteúdo de umidade foi determinado por meio da secagem da carcaça em uma estufa ventilada (aproximadamente 70 °C) durante sete dias. O conteúdo de umidade presente na carcaça foi determinado por meio da diferença entre os valores obtidos na pesagem da carcaça antes e após a secagem da mesma.

Posteriormente, a carcaça foi triturada e envolta em gaze e papel de filtro para a determinação do conteúdo total de lipídios, que foi determinado por meio da técnica de extração por solvente utilizando um extrator Soxhlet e éter etílico como solvente.

O restante da carcaça — sem umidade e lipídios — foi completamente moído (IKA M20 grinder, Labortechnik) e, posteriormente, peneirado para a remoção de pêlos, os quais podem reduzir a homogeneidade da amostra. Esse processo resulta em um pó altamente homogêneo, que foi utilizado para a determinação do conteúdo de proteína da carcaça pelo método de micro-Kjeldahl (ALBANESE e ORTO, 1963).

Nesse pó homogêneo também foi realizada a determinação do conteúdo de cinzas, a partir de dois gramas do pó, que foram colocados em uma mufla por 12 horas, a 550 °C e, após ser resfriado, o peso das cinzas foi determinado.

A quantidade de massa magra foi calculada a partir da diferença entre a massa total da carcaça e a massa total de lipídios presentes na carcaça. Umidade, lipídios, proteína e cinzas foram expressos em valores absolutos bem como em valores percentuais em relação à massa total da carcaça.

5.6 Avaliação hematológica

5.6.1 Determinação do hemograma e da contagem de reticulócitos

Uma alíquota de sangue obtida conforme o procedimento descrito no item 5.2 foi colocada em um microtubo contendo 50 µL de EDTA (Merck

Chemical, Darmstadt, Alemanha) a 10%, como anticoagulante, e a partir desse material foram realizados o hemograma e a contagem de reticulócitos (DACIE e LEWIS, 1995).

O número de leucócitos foi determinado em câmara de Neubauer, utilizando-se a diluição de 1:20 em líquido de Turk (DACIE e LEWIS, 1995). Os valores relativos do número de leucócitos foram determinados em extensões sangüíneas realizadas imediatamente após a coleta do sangue e coradas pela coloração de May Grunwald-Giemsa modificada (ROSENFELD, 1947).

Para a determinação do volume hematócrito foi utilizado o método de Strumia, enquanto que a concentração de hemoglobina foi determinada pelo método da cianometahemoglobina (DACIE e LEWIS, 1995).

A contagem do número de eritrócitos foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se sangue total diluído 1:200 em líquido de Gower (LIMA *et al.*, 1992).

Os reticulócitos foram determinados, em extensão sangüínea, pela coloração supra vital com Novo Azul de Metileno (BRECHER, 1949).

5.6.2 Mielograma

O fêmur foi coletado após secção cutânea dos membros inferiores e retirada dos músculos anteriores e posteriores. As células da medula óssea foram obtidas por meio de lavagem da cavidade de um dos fêmures com meio McCoy's 5A modificado (Sigma Chemical Company, EUA). A suspensão celular foi colocada em tubos plásticos, cuidadosamente homogeneizada com pipeta tipo Pasteur e mantida em banho de gelo. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer, após diluição de 1: 50 em líquido de Turk — diluente composto por uma solução de 1% de ácido acético glacial. Para avaliação morfológica foram confeccionadas lâminas por citocentrifugação da suspensão de células, as quais foram coradas pela coloração de May Grunwald-Giemsa modificada (ROSENFELD, 1947), para identificação e quantificação dos diferentes tipos celulares, sendo analisadas 500 células por lâmina por animal.

5.6.3 Esplenograma

O baço foi retirado e transferido para placa de Petri de plástico, de 60 mm (Corning Glass Works, EUA), descartável, contendo 10 mL de meio McCoy's 5A modificado (Sigma Chemical Company, EUA). Na placa de Petri, a cápsula do baço foi dissociada mecanicamente, liberando-se o estroma esplênico. A suspensão celular foi homogeneizada e transferida para tubo cônico de plástico, mantida em banho de gelo por 10 minutos para sedimentação do estroma celular mais denso. Após a sedimentação, o sobrenadante foi transferido para tubo cônico de plástico e a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 1.200 rpm em centrífuga refrigerada (4 °C). Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultura McCoy's 5A modificado (Sigma Chemical Company, EUA). As células foram quantificadas em câmara de Neubauer, após diluição de 1:500 em líquido de Turk. Para avaliação morfológica foram confeccionadas lâminas por citocentrifugação da suspensão de células, as quais foram coradas pela coloração de May Grunwald-Giemsa modificada (ROSENFELD, 1947), para identificação e quantificação dos diferentes tipos celulares, sendo analisadas 300 células por lâmina por animal.

5.6.4 Critérios para classificação das células hemopoéticas

A classificação das células da linhagem granulocítica nos órgãos hemopoéticos de camundongos foi baseada na relação núcleo-citoplasma, afinidade tintorial do citoplasma, na presença ou não de granulações primária e secundária no citoplasma, no padrão de cromatina nuclear, na presença ou não de nucléolos, no diâmetro e segmentação ou não do núcleo. Na série granulocítica considera-se quatro etapas maturativas: blastos, envolvendo o hemocitoblasto e mieloblasto; formas jovens, englobando as etapas de promielócito e mielócito; formas em anel, correspondentes ao metamielócito e ao bastonete; segmentados, envolvendo as formas segmentadas a partir de 2 lóbulos nucleares (GARCIA, 1992).

Os precursores eritróides foram classificados em: eritroblastos jovens,

envolvendo proeritroblastos e eritroblastos basófilos; eritroblastos policromáticos, englobando todas as etapas em que as células apresentavam cromatina condensada e citoplasma policromático e eritroblastos ortocromáticos, incluindo células com núcleo apresentando cromatina picnótica e citoplasma eosinofílico. Quando as células apresentavam assincronismo maturativo, prevaleceu o aspecto da cromatina nuclear para identificação da etapa maturativa.

A identificação dos monoblastos e plasmoblastos seguiu os critérios morfológicos do padrão de cromatina nuclear e basofilia do citoplasma.

Promonócitos, monócitos e macrófagos foram reunidos em um grupo de células denominadas mono-macrofágicas.

As células da linhagem linfóide envolvendo prolinfócitos, linfócitos típicos ou atípicos foram agrupadas como linfócitos e as células da linhagem plasmocitária foram agrupadas como plasmócitos.

5.6.5 Relação grânulo-eritrocítica

A relação grânulo-eritrocítica (G/E) tanto medular quanto esplênica foi avaliada determinando-se a proporção entre os elementos granulocíticos e precursores eritróides contando-se, no mínimo, 500 e 300 células por lâmina relativa ao mielograma e esplenograma, respectivamente.

5.6.6 Relação linfo-eritrocítica

A relação linfo-eritrocítica (L/E) tanto medular quanto esplênica foi avaliada determinando-se a proporção entre os elementos linfóides e precursores eritróides contando-se, no mínimo, 500 e 300 células por lâmina relativa ao mielograma e esplenograma, respectivamente.

5.6.7 Relação grânulo-linfóide

A relação grânulo-linfóide (G/L) tanto medular quanto esplênica foi avaliada determinando-se a proporção entre os elementos granulocíticos e linfóides contando-se, no mínimo, 500 e 300 células por lâmina relativa ao mielograma e esplenograma, respectivamente.

5.7 Avaliação de aspectos funcionais de macrófagos peritoniais

Em todas as etapas (1, 2 e 3), a coleta dos macrófagos peritoniais foi realizada com meio de cultura estéril, apirogênico e isento de glutamina.

Na etapa 1, todos os ensaios relacionados aos parâmetros de avaliação da funcionalidade de macrófagos peritoniais foram realizados com meio de cultura sem o aminoácido glutamina.

Na etapa 2, todos os ensaios relacionados aos parâmetros de avaliação da funcionalidade de macrófagos peritoniais foram realizados em meio de cultura suplementado com quatro diferentes concentrações finais de glutamina durante o período de incubação celular:

- 0,5 mmol/L;
- 0,58 mmol/L;
- 1 mmol/L;
- 2 mmol/L.

A escolha pelas concentrações de glutamina de 0,5 e 0,58 mmol/L durante o período de cultura celular deveu-se ao fato dessas concentrações corresponderem àquelas observadas no plasma dos animais dos grupos DESM e AMAM, respectivamente, durante a etapa 1 do presente estudo. A escolha pela concentração de 1 mmol/L deveu-se ao fato da mesma representar o dobro da concentração plasmática de glutamina observada no grupo DESM durante a etapa 1 do presente trabalho. A concentração 2 mmol/L é uma concentração padrão em cultura de células e apesar desse valor estar acima das concentrações de glutamina *in vivo* (0,5-0,6 mmol/L), experimentalmente 2 mmol/L propiciaram melhores resultados em condições de incubação de células por períodos prolongados (24-72 horas) (EAGLE, 1955; EAGLE *et al.*, 1955).

Na etapa 3, todos os ensaios relacionados aos parâmetros de avaliação da funcionalidade de macrófagos peritoniais foram realizados com meio de cultura com concentração final de glutamina de 2 mmol/L.

Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar, em ambiente asséptico. Todo o material utilizado para a realização dos experimentos envolvidos na avaliação da funcionalidade de macrófagos peritoniais foi estéril e apirogênico.

5.7.1 Obtenção de macrófagos residentes

Os macrófagos residentes foram obtidos da cavidade peritoneal, imediatamente após os animais serem anestesiados com cloridrato de quetamina e cloridrato de xilazina, sacrificados e exsangüinados. Posteriormente, com a remoção da pele da região abdominal, 5 mL de meio RPMI 1640 (Cultilab – Campinas, Brasil), pH 7,4, estéril, apirogênico, contendo 10% de soro fetal bovino e isento de glutamina, foram injetados na cavidade peritoneal dos animais. O lavado peritoneal foi aspirado com a utilização de seringa e agulha (25x7), estéreis, após delicada massagem abdominal durante 30 segundos e acondicionado em tubos de polipropileno estéreis. A suspensão celular foi lavada 2 vezes com meio RPMI 1640, pH 7,4, estéril, apirogênico e isento de glutamina, em centrífuga a 4 °C, 1.500 rpm, durante 10 minutos. Após a última lavagem, o sedimento celular foi ressuspenso em 1 mL de meio RPMI 1640 (Cultilab – Campinas, Brasil), pH 7,4, estéril, apirogênico, contendo 10% de soro fetal bovino e isento de glutamina. Essa suspensão celular foi adicionada em placas de cultura de 24 poços, estéreis e apirogênicas, em uma concentração de 1×10^6 células por poço (volume total final de 1 mL). As células foram incubadas por uma hora, a 37 °C, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂, para que ocorresse a adesão dos macrófagos peritoniais à placa. Posteriormente, células não-aderentes foram removidas por meio da lavagem da placa com meio RPMI 1640, pH 7,4, estéril, apirogênico, com soro fetal bovino (10%) e isento de glutamina. Desse modo, macrófagos aderentes foram obtidos, os quais foram utilizados nos ensaios de avaliação da funcionalidade dessas células.

5.7.2 Viabilidade e número de células presentes no lavado peritoneal

A viabilidade de células presentes no lavado peritoneal foi avaliada por meio do teste de exclusão do Azul de Tripano (0,5%) (KING, 1959; FALLON, 1962; CZARNETZKY, 1975). O número de células obtidas da cavidade peritoneal foi determinado em câmara de Neubauer, enquanto os diferentes tipos celulares presentes foram avaliados pela análise morfológica realizada em lâminas obtidas de alíquotas do lavado peritoneal, previamente submetidas

à citocentrifugação (Incibras[®]) e coradas pelo método de May-Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947).

5.7.3 Avaliação da síntese de óxido nítrico por macrófagos peritoniais

Para a avaliação da síntese de óxido nítrico, macrófagos peritoniais, obtidos de acordo com o item 5.7.1, foram mantidos em cultura a 37 °C, 5% CO₂, em placas de cultura com 24 poços na concentração de 1x10⁶ macrófagos/poço, em meio RPMI 1640 (Cultilab – Campinas, Brasil), estéril, apirogênico e com soro fetal bovino (10%) (volume total final de 1 mL). Cabe ressaltar que a concentração final de glutamina no momento do ensaio diferiu entre as três etapas do estudo. Na etapa 1, o meio de cultura não foi suplementado com glutamina; na etapa 2, o meio de cultura foi suplementado com quatro diferentes concentrações (finais) de glutamina: 0,5; 0,58; 1 e 2 mmol/L; e na etapa 3, o meio de cultura foi suplementado com glutamina (2 mmol/L de concentração final). As células foram incubadas na ausência ou presença de 5 µg/mL/poço de LPS de *Escherichia coli*, sorotipo 055:B5 (Sigma Chemical Company, EUA). Após 24, 48 e 72 horas, o meio de cultura foi removido e congelado (-80 °C) para posterior análise da concentração de óxido nítrico.

A concentração de óxido nítrico foi determinada pelo analisador de óxido nítrico (NOA^{TM280}, Sievers INC., EUA). O nitrato presente no sobrenadante foi reduzido a óxido nítrico com vanádio (III) a 90 °C, e o óxido nítrico formado foi detectado por quimiluminescência em fase gasosa, após reação com o ozônio. A intensidade da quimiluminescência foi medida em mV e relacionada à de uma curva de calibração com concentrações de nitrato variando de 2 a 140 µM. As curvas de calibração foram realizadas com padrão externo utilizando-se o *software* Bag Program (versão 2.2, Sievers, EUA). As amostras foram processadas em quadruplicata.

5.7.4 Avaliação da síntese de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoniais

Para a dosagem do peróxido de hidrogênio foi utilizado o método de Pick e Mizel (1981). O método se baseia na conversão, dependente de peroxidase, do vermelho de fenol pelo peróxido de hidrogênio em composto colorido que absorve a luz a 620 nm.

Para a determinação da concentração de peróxido de hidrogênio, macrófagos peritoniais foram obtidos de acordo com o item 5.7.1. Foi preparada uma suspensão celular contendo 2×10^6 macrófagos peritoniais em 1 mL do meio de reação constituído por NaCl 140 mM, KH_2PO_4 1 mM, glicose 5 mM e contendo 0,56 mM do indicador vermelho de fenol acrescido de solução de peroxidase raiz forte tipo VI com concentração final de 20 UI/mL (Sigma Chemical Company, EUA). Foram adicionados 100 μL da suspensão celular em 8 poços, em placa de 96 poços. Foram acrescentados em apenas 4 poços 10 μL do estímulo solúvel forbol-12-acetato-13-miristato (PMA) (Sigma Chemical Company, EUA) na concentração de 20 nM. Paralelamente, foi feita uma curva padrão (0-7 μL) de peróxido de hidrogênio 1 mM (Riedel-de Haën, Seelze, Alemanha). Em seguida, incubou-se em estufa a 37 °C, com atmosfera de 5% de CO_2 , por uma hora. Cabe ressaltar que a concentração final de glutamina no momento do ensaio diferiu entre as três etapas do estudo. Na etapa 1, o meio de cultura não foi suplementado com glutamina; na etapa 2, o meio de cultura foi suplementado com quatro diferentes concentrações finais de glutamina (0,5; 0,58; 1 e 2 mmol/L); e na etapa 3, o meio de cultura foi suplementado com glutamina (2 mmol/L). Decorrida uma hora de incubação, a reação foi interrompida pela adição, em todos os poços, de 10 μL de NaOH 1 M, o qual eleva o pH até 12,5. O total de peróxido de hidrogênio formado foi quantificado espectrofotometricamente em leitor de ELISA em filtro com comprimento de onda de 620 nm. As amostras foram realizadas em quadruplicata.

5.7.5 Teste de adesão e de espraiamento de macrófagos peritoniais

Lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro, estéreis, foram distribuídas em poços de placas *multiwell* (24 poços). Foram colocados sobre as mesmas 200 μL contendo 3×10^5 da suspensão de macrófagos peritoniais, obtidos de acordo com o item 5.7.1, sendo as placas mantidas por 20 minutos à temperatura ambiente. A seguir, as lamínulas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) Dulbecco, pH 7,4, estéril, recobertas com 1 mL de meio RPMI 1640 (Cultilab – Campinas, Brasil), estéril, apirogênico e com soro fetal bovino (10%), e incubadas por 30, 60, 90, 120 minutos e 24 horas em estufa a 37 °C, com atmosfera contendo 5% de CO_2 . Após a incubação, as lamínulas foram novamente lavadas com solução tampão PBS Dulbecco, pH 7,4, estéril, e, a seguir, coradas pelo método de May-Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947).

Cabe ressaltar que a concentração final de glutamina no meio de cultura diferiu entre as três etapas do estudo, tanto no momento em que as células foram colocadas sobre as lamínulas de vidro, quanto no momento em que as células foram recobertas com 1 mL de meio de cultura. Na etapa 1, o meio de cultura não foi suplementado com glutamina; na etapa 2, o meio de cultura foi suplementado com quatro diferentes concentrações finais de glutamina (0,5; 0,58; 1 e 2 mmol/L); e na etapa 3, o meio de cultura foi suplementado com glutamina (2 mmol/L).

Após coloração, as células aderidas foram contadas e analisadas ao microscópio óptico pelo sistema de análise de imagens Image Pro Plus pertencente ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. O sistema de análise de imagem é composto de um microscópio óptico (Olympus, Japão), que está acoplado a uma câmera de vídeo (Sony, Japão) e a um microcomputador, provido do programa Image Pro Plus (Media Cybernetics). Os resultados foram expressos em número de células/ mm^2 , sendo que para a obtenção dos resultados foram contados no mínimo oito campos correspondentes a uma ocular de 10x e objetiva de 10x (WEIBEL, 1966).

Com auxílio de microscópio óptico foram contadas 200 células, diferenciando-se as células aderidas daquelas espraiadas, sendo o resultado

expresso percentualmente. Considerou-se como sendo células espalhadas aquelas que aderiram à superfície de vidro emitindo pseudópodes e, ao serem observadas ao microscópio óptico, lembraram a imagem de um “ovo frito” (RABINOVITCH e DESTEFANO, 1973).

5.7.6 Teste de fagocitose e da atividade fungicida, *in vitro*, de macrófagos peritoneais

5.7.6.1 Obtenção de soro homólogo normal

Foi coletado o sangue de 10 camundongos normais da linhagem Swiss Webster, machos, adultos de 2 a 3 meses, por punção do plexo sub-axilar e, após retração do coágulo, o sangue foi centrifugado (4 °C, 3.000 rpm, 15 minutos). O soro homólogo normal (SHN) foi separado, constituindo-se um *pool*, o qual foi aliquotado em volumes de 1 mL e congelado a -80 °C. Este *pool* foi utilizado para posterior opsonização da *Candida albicans*. Todo o processamento foi realizado em condições assépticas, sendo o material utilizado estéril e apirogênico.

5.7.6.2 Preparo e opsonização da suspensão de *Candida albicans*

As leveduras — *Candida albicans* da linhagem ATCC 537y — foram obtidas após cultura de 24 horas em meio de ágar-Sabouraud (Difco, Lawrence, Kansas, EUA). Após esse período, foi feita uma suspensão de leveduras em 3 mL de tampão PBS, pH 7,4, estéril, a qual foi mantida durante três minutos em repouso. Posteriormente, o sobrenadante (2 mL) foi retirado e as leveduras foram contadas em câmara de Neubauer e sua viabilidade avaliada por meio de solução aquosa de azul de metileno (1%), sendo utilizadas somente suspensões de leveduras que apresentaram viabilidade acima de 95%. Uma suspensão contendo $3,75 \times 10^6$ *Candida albicans*, 300 µL de SHN e PBS, pH 7,4, estéril, em volume final de 1,5 mL, foi incubada a 37 °C, 30 minutos, sob agitação contínua a 10 rpm (**suspensão A**).

5.7.6.3 Obtenção da suspensão de macrófagos peritoneais

Os macrófagos peritoneais foram obtidos conforme descrito no item 5.7.1. A suspensão de macrófagos teve sua concentração ajustada para $0,75 \times 10^6$ células/1,5 mL com meio RPMI 1640 (Cultilab – Campinas, Brasil), pH 7,4, estéril, apirogênico e com soro fetal bovino (10%), e mantida em banho de gelo (**suspensão B**).

5.7.6.4 Ensaio

Em tubos plásticos, estéreis, foram adicionados 250 μ L da suspensão de macrófagos (**suspensão B**) e 250 μ L da suspensão opsonizada de *Candida albicans* (**suspensão A**), mantendo-se uma proporção de 1 célula/5 leveduras, constituindo-se, assim, a **suspensão C**. Os tubos foram incubados a 37 °C, em sistema rotatório, à velocidade de 10 rpm, durante 30, 60, 90 e 120 minutos. O controle negativo da reação constou de tubos contendo 250 μ L de PBS Dulbecco, pH 7,4, estéril (**Suspensão D**), e 250 μ L da suspensão de macrófagos (**Suspensão E**). A concentração final de glutamina na **suspensão C** no momento da incubação de macrófagos com *Candida albicans* diferiu entre as três etapas do estudo. Na etapa 1, a **suspensão C** não foi suplementada com glutamina; na etapa 2, a **suspensão C** foi suplementada com quatro diferentes concentrações finais de glutamina (0,5; 0,58; 1 e 2 mmol/L); e na etapa 3, a **suspensão C** foi suplementada com glutamina (2 mmol/L).

Após os tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos, lâminas foram preparadas por citocentrifugação (Incibras[®]) de alíquotas com 80 μ L das **suspensões C, D e E**, imediatamente fixadas e coradas com May-Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947).

5.7.6.5 Avaliação da fagocitose

Para avaliação da fagocitose foram contados, no mínimo, 200 macrófagos. A atividade fagocítica foi expressa por meio de escore, conforme critério descrito e estabelecido por Corazzini (1993):

Resultado

	Escore
Nº de macrófagos sem <i>Candida albicans</i> fagocitada	X 0
Nº de macrófagos com 1 a 2 <i>Candida albicans</i> fagocitadas	X 1
Nº de macrófagos com 3 a 4 <i>Candida albicans</i> fagocitadas	X 2
Nº de macrófagos com mais de 4 <i>Candida albicans</i> fagocitadas	X 3

5.7.6.6 Avaliação da atividade fungicida

A atividade fungicida foi avaliada por meio da técnica de coloração proposta por Herscowitz (1981), modificada por Corazzini (1993). Nesta técnica, as leveduras vivas, intracelulares, coram-se em azul pelo corante de May-Grunwald-Giemsa, enquanto as leveduras mortas não se coram. A atividade fungicida foi avaliada contando-se, ao menos, 200 macrófagos que fagocitaram *Candida albicans*. Como o número de leveduras fagocitadas e mortas é variável de célula para célula, a atividade fungicida foi expressa por meio de escore, conforme critério estabelecido por Corazzini (1993) e abaixo descrito:

Resultado

	Escore
Nº de macrófagos sem <i>Candida albicans</i> morta	X 0
Nº de macrófagos com 1 a 2 <i>Candida albicans</i> mortas	X 1
Nº de macrófagos com 3 a 4 <i>Candida albicans</i> mortas	X 2
Nº de macrófagos com mais de 4 <i>Candida albicans</i> mortas	X 3

5.7.7 Avaliação da síntese de citocinas *in vitro*

Os macrófagos peritoniais foram obtidos conforme descrito no item 5.7.1. Os macrófagos foram mantidos em cultura a 37 °C, 5% de CO₂, em placas de cultura com 24 poços na concentração de 1x10⁶ macrófagos por poço, e volume total final de 1 mL. As células foram cultivadas na ausência ou presença de 5 µg/mL/poço de LPS de *Escherichia coli*, sorotipo 055:B5 (Sigma Chemical Company, EUA) em meio de cultivo celular (RPMI 1640) (Cultilab –

Campinas, Brasil), estéril, apirogênico e contendo soro fetal bovino (10%). Cabe ressaltar que a concentração final de glutamina no meio de cultura diferiu entre as três etapas do estudo. Na etapa 1, o meio de cultura não foi suplementado com glutamina; na etapa 2, o meio de cultura foi suplementado com quatro diferentes concentrações finais de glutamina (0,5; 0,58; 1 e 2 mmol/L); e na etapa 3, o meio de cultura foi suplementado com glutamina (2 mmol/L).

Após 2, 4, 8 e 24 horas, o sobrenadante da cultura celular foi removido e congelado (-80 °C) para posterior dosagem das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α . A determinação das concentrações de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α presentes no sobrenadante das culturas celulares foi realizada pelo método de ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) – kits R&D Systems.

O teste de ELISA foi realizado em placas de microtitulação de 96 cavidades (Nunc-Immuno™ Plate MaxSorp™ Surface, Brand Products, Denmark) que foram sensibilizadas com 100 μ L do anticorpo de captura por poço e incubadas em temperatura ambiente por 18 horas. Após este período, as placas foram lavadas 3 vezes com o tampão de lavagem contendo 0,05% de Tween 20 (300 μ L por poço) e incubadas em temperatura ambiente com o reagente diluente (1% de albumina de soro bovino) (300 μ L por poço) durante duas horas. Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes com o tampão de lavagem contendo 0,05% de Tween 20 (300 μ L por poço) e incubadas em temperatura ambiente com as amostras de sobrenadante de cultura celular (100 μ L por poço) e com os padrões, durante o período de duas horas. Após esse período, as placas foram lavadas 3 vezes com o tampão de lavagem contendo 0,05% de Tween 20 (300 μ L por poço) e incubadas com o anticorpo de detecção biotilado (100 μ L por poço), durante duas horas, em temperatura ambiente. Após um novo ciclo de lavagem com o tampão de lavagem contendo 0,05% de Tween 20, as placas receberam estreptavidina-peroxidase (100 μ L por poço) e foram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente. Após a lavagem das placas com o tampão de lavagem contendo 0,05% de Tween 20 (300 μ L por poço), as mesmas receberam a solução substrato, composta de peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina (1:1) (100 μ L por poço) e foram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente em ambiente escuro. A reação foi interrompida pela adição de 50 μ L

por poço da solução “stop” (H_2SO_4 , 2 N), sendo a densidade óptica determinada em espectrofotômetro a 450 nm.

5.7.8 Determinação da concentração de proteína celular em cultura de macrófagos peritoniais

A concentração de proteínas celulares presente em cada poço das culturas de macrófagos peritoniais foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), que se baseia na reação do corante Coomassie Blue G250, que, em meio fortemente ácido, liga-se à estrutura primária de cadeias polipeptídicas, formando um complexo que absorve intensamente a luz em filtro de comprimento de onda de 595 nm.

De modo sucinto, após a remoção do sobrenadante, cada poço foi lavado com PBS estéril, pH 7,4, e, posteriormente, foram adicionados em cada poço 200 μL de água destilada, sendo as placas congeladas a $-40\text{ }^\circ\text{C}$. O conteúdo de proteína foi determinado após um ciclo de congelamento e descongelamento (STAPLETON *et al.*, 2001).

Em uma placa de 96 poços foram colocados 180 μL por poço do reagente de Bradford e, em seguida, acrescentados 20 μL de cada amostra nos respectivos poços. Paralelamente foi feita uma curva padrão (0 a 15 μg de proteína) utilizando-se a solução padrão de albumina bovina (1 mg/mL) (Sigma Chemical Company, EUA). A leitura foi realizada em leitora ELISA com filtro de comprimento de onda de 595 nm, sendo as amostras processadas em triplicata.

Para controlar variações no número de células, foram utilizados equivalentes números de células para cada experimento e, após a etapa de adesão celular — uma hora de adesão das células presentes no lavado peritonal —, todos os resultados foram normalizados para o conteúdo de proteína celular.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão. Todos os resultados foram previamente submetidos ao teste de homogeneidade das variâncias (testes de Cochran C, Hartley, Bartlett). As comparações entre os grupos presentes em cada etapa foram inicialmente avaliadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, para identificação dos contrastes significantes. Utilizou-se o *software* Statistica versão 7.0 (StatSoft, Inc, OK, EUA) e adotou-se o valor de alfa de 0,05.

7. RESULTADOS

7.1 Resultados referentes à Etapa 1

7.1.1 Ganho de peso

A partir da tabela 5 verifica-se que não houve diferença significativa em relação ao peso corporal entre os grupos AMAM, DESM e GLN no 14º dia de vida, que correspondeu ao início do protocolo experimental. Todavia, o grupo DESM apresentou peso corporal significativamente menor em comparação ao grupo AMAM em todos os dias do período entre o 15º e o 21º dias de vida. Aliado a esse fato, verificou-se também que o grupo GLN apresentou menor peso corporal entre o 15º e 19º dias de vida em relação ao grupo AMAM (tabela 5).

Tabela 5. Ganho de peso (g) referente aos grupos da etapa 1.

	Dias de vida							
	14º	15º	16º	17º	18º	19º	20º	21º
AMAM	8,6 ± 0,8	9,2 ± 0,9 ^a	9,6 ± 0,8 ^a	9,9 ± 0,7 ^a	10,6 ± 0,9 ^a	11,3 ± 1,3 ^a	11,9 ± 0,7 ^a	12,9 ± 0,9 ^a
DESM	8,8 ± 0,4	8,5 ± 0,5 ^b	8,5 ± 0,8 ^b	9,1 ± 0,6 ^b	9,6 ± 0,6 ^b	10,4 ± 0,6 ^b	11,0 ± 0,7 ^b	12,0 ± 0,8 ^b
GLN	8,6 ± 0,5	8,2 ± 0,7 ^b	8,5 ± 0,9 ^b	9,1 ± 0,9 ^b	9,6 ± 1,0 ^b	10,5 ± 1,1 ^b	11,4 ± 1,2 ^{a,b}	12,4 ± 1,3 ^{a,b}

Resultados expressos em média ± desvio-padrão com n = 20/grupo.

Valores com diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes (P<0,05).

AMAM= grupo amamentado até o 21º dia de vida.

DESM= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida.

GLN= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada com glutamina até o 21º dia de vida.

7.1.2 Consumo diário de ração

A figura 6 mostra o consumo diário de ração dos grupos DESM e GLN entre o 14º e o 21º dias de vida, em cujo período não se observou diferença significativa entre os grupos quanto ao consumo de ração. Ambos os grupos apresentaram consumo de ração significativamente maior desde o 15º até o 21º dias de vida em comparação ao consumo de ração verificado no 14º dia de vida.

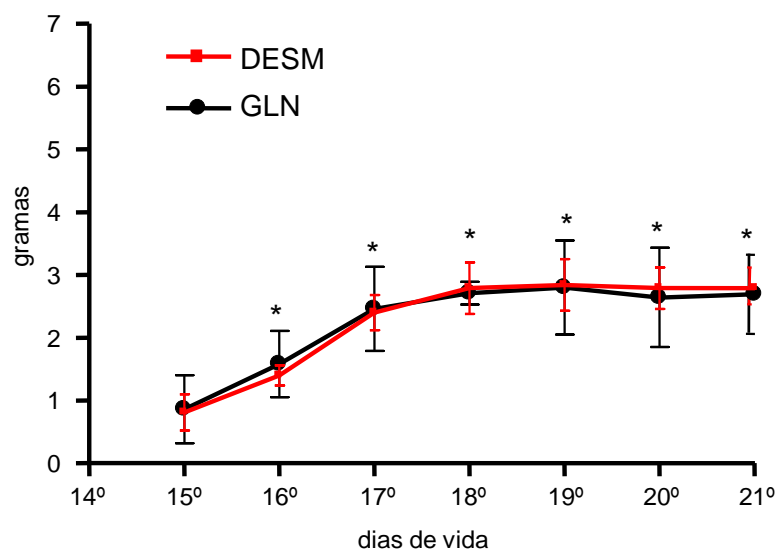


Figura 6. Consumo de ração de camundongos desmamados no 14º dia de vida e alimentados até o 21º dia de vida com ração isenta de glutamina (DESM) ou suplementada com glutamina (GLN).

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com $n = 16$ /grupo. * Diferença significativa em relação ao 14º dia de vida ($P < 0,05$).

7.1.3 Parâmetros plasmáticos e séricos

A partir da tabela 6 verifica-se que os grupos DESM e GLN apresentaram diminuição significativa de 14% e 15% na concentração plasmática de glutamina, respectivamente, em comparação ao grupo AMAM. Além disso, os grupos DESM e GLN tiveram redução significativa de 31% e 23% na concentração sérica de ferro, respectivamente, em relação ao grupo AMAM. Por outro lado, não houve diferença significativa entre os grupos

AMAM, DESM e GLN em relação às concentrações séricas de albumina, proteínas totais, glicose, corticosterona e IGF-1 (tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros plasmáticos e séricos dos grupos da etapa 1.

	AMAM	DESM	GLN
Glutamina plasmática ($\mu\text{mol/L}$)	579 \pm 37 ^a	498 \pm 30 ^b	494 \pm 26 ^b
Albumina sérica (g/dL)	2,88 \pm 0,21	2,87 \pm 0,24	2,94 \pm 0,09
Proteína total sérica (g/dL)	4,08 \pm 0,13	4,10 \pm 0,34	4,29 \pm 0,25
Glicose sérica (mg/dL)	150 \pm 18	150 \pm 17	157 \pm 24
Ferro sérico ($\mu\text{g/dL}$)	352 \pm 43 ^a	257 \pm 28 ^b	272 \pm 60 ^b
Corticosterona sérica (ng/mL)	84 \pm 20	90 \pm 34	84 \pm 13
IGF-1 (ng/mL)	185 \pm 56	174 \pm 51	188 \pm 45

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com n = 10/grupo.

Valores com diferentes letras na mesma linha são significativamente diferentes (P<0,05).

AMAM= grupo amamentado até o 21º dia de vida.

DESM= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida.

GLN= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada com glutamina até o 21º dia de vida.

7.1.4 Parâmetros teciduais

7.1.4.1 Peso de tecidos

Na figura 7 verifica-se que os grupos DESM e GLN apresentaram diminuição significativa (24% e 24%, respectivamente) do peso total do músculo gastrocnêmio em relação ao grupo AMAM. Os pesos totais do rim, cérebro, baço, coração e fígado não apresentaram diferença significativa entre os grupos AMAM, DESM e GLN (figura 7).

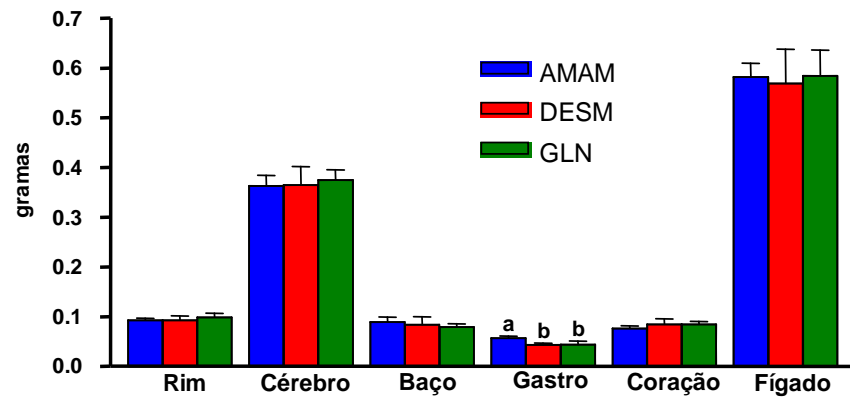


Figura 7. Pesos absolutos de tecidos referentes aos grupos da etapa 1.

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com $n = 8$ /grupo. Valores em cada tecido com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$). (Gastro = músculo gastrocnêmio; AMAM= grupo amamentado até o 21º dia de vida; DESM= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida; GLN= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada com glutamina até o 21º dia de vida).

7.1.4.2 Parâmetros teciduais relativos ao metabolismo da glutamina

O grupo DESM apresentou redução significativa (29%) na concentração de glutamina no músculo gastrocnêmio em relação ao grupo AMAM (tabela 7). Por outro lado, não se observou diferença significativa em relação à concentração de glutamina hepática entre os grupos AMAM, DESM e GLN (tabela 7).

A atividade máxima da enzima glutamina sintetase muscular, quando expressa em função do peso tecidual fresco, foi significativamente maior no grupo DESM em relação ao grupo AMAM (tabela 7). O grupo DESM apresentou atividade da enzima glutamina sintetase — quando expressa em função da concentração de proteína muscular — significativamente maior em comparação aos grupos AMAM e GLN. O grupo GLN apresentou atividade máxima da enzima glutamina sintetase hepática significativamente menor em comparação aos grupos AMAM e DESM (tabela 7).

Tabela 7. Parâmetros teciduais relativos ao metabolismo da glutamina dos grupos da etapa 1.

	AMAM	DESM	GLN
Glutamina muscular (µmol/g tecido fresco)	5,21 ± 0,70 ^a	3,69 ± 0,78 ^b	4,37 ± 0,52 ^{a,b}
Glutamina hepática (µmol/g tecido fresco)	3,96 ± 0,82	4,41 ± 0,73	3,52 ± 0,33
Atividade máxima da enzima GS muscular (nmol/h/mg tecido fresco)	105,6 ± 11,4 ^a	155,5 ± 33 ^b	129,9 ± 26,9 ^{a,b}
Atividade máxima da enzima GS muscular (nmol/h/mg proteína)	2.449 ± 392 ^a	3.871 ± 747 ^b	1.999 ± 624 ^a
Atividade máxima da enzima GS hepática (nmol/h/mg tecido fresco)	18,2 ± 2,2 ^a	16,8 ± 1,7 ^a	8,8 ± 1,3 ^b
Atividade máxima da enzima GS hepática (nmol/h/mg proteína)	552 ± 91 ^a	463 ± 79 ^a	220 ± 48 ^b

Resultados expressos em média ± desvio-padrão com n = 10/grupo.

Valores com diferentes letras na mesma linha são significativamente diferentes (P<0,05).

(GS = glutamina sintetase)

AMAM= grupo amamentado até o 21º dia de vida.

DESM= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida.

GLN= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada com glutamina até o 21º dia de vida.

7.1.4.3 Concentração de proteína no músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro

O grupo DESM apresentou diminuição significativa da concentração de proteína no músculo gastrocnêmio e no fígado em relação aos grupos AMAM e GLN (figura 8). Por outro lado, não se observou diferença significativa em relação à concentração de proteína no baço e cérebro entre os grupos AMAM, DESM e GLN (figura 8).

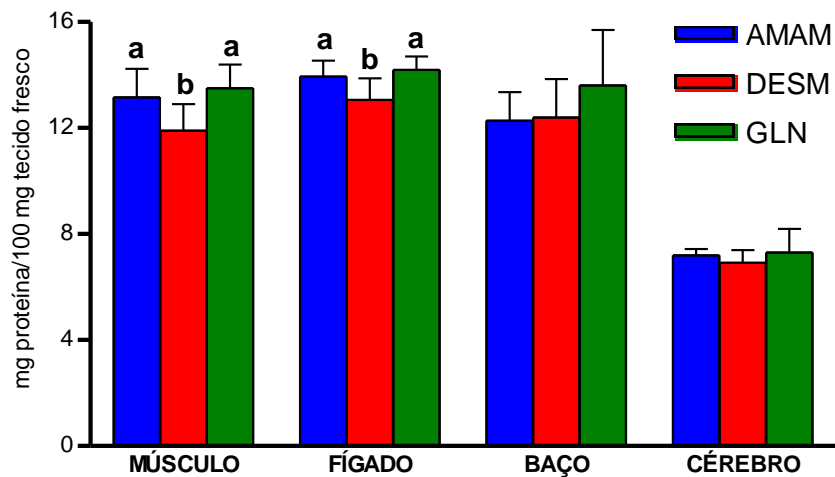


Figura 8. Concentração de proteína no músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro referente aos grupos da etapa 1.

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com $n = 8$ /grupo. Valores em cada tecido com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$). (AMAM= grupo amamentado até o 21º dia de vida; DESM= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida; GLN= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada com glutamina até o 21º dia de vida).

7.1.4.5 Concentração de RNA no músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro

Os grupos DESM e GLN apresentaram aumento significativo da concentração de RNA no músculo gastrocnêmio e no baço em relação ao grupo AMAM (figura 9). Por outro lado, não se observou diferença significativa em relação à concentração de RNA no fígado e cérebro entre os grupos AMAM, DESM e GLN (figura 9).

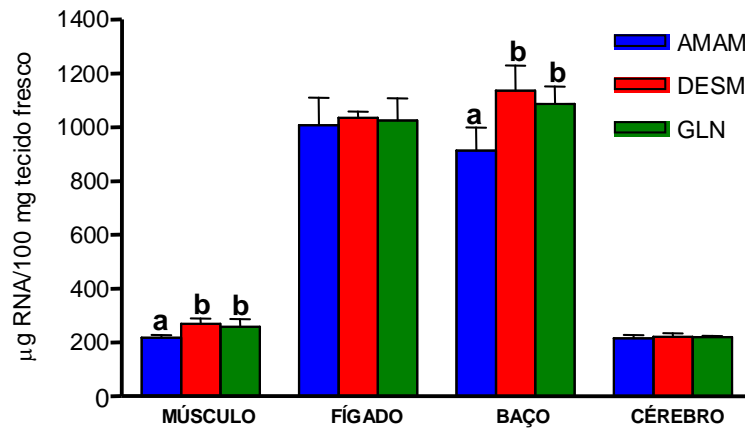


Figura 9. Concentração de RNA no músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro referente aos grupos da etapa 1.

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com $n = 8$ /grupo. Valores em cada tecido com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$). (AMAM= grupo amamentado até o 21º dia de vida; DESM= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida; GLN= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada com glutamina até o 21º dia de vida).

7.1.4.7 Razão entre as concentrações de proteína e de RNA no músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro

O grupo DESM apresentou diminuição da razão entre as concentrações de proteína e RNA no músculo gastrocnêmio e no baço em relação ao grupo AMAM (figura 10). O grupo GLN teve menor razão proteína:RNA no músculo gastrocnêmio em relação ao grupo AMAM, ao mesmo tempo em que essa razão foi significativamente maior em comparação ao grupo DESM. Por outro lado, não se observou diferença significativa em relação à razão proteína:RNA no fígado e cérebro entre os grupos AMAM, DESM e GLN (figura 10).

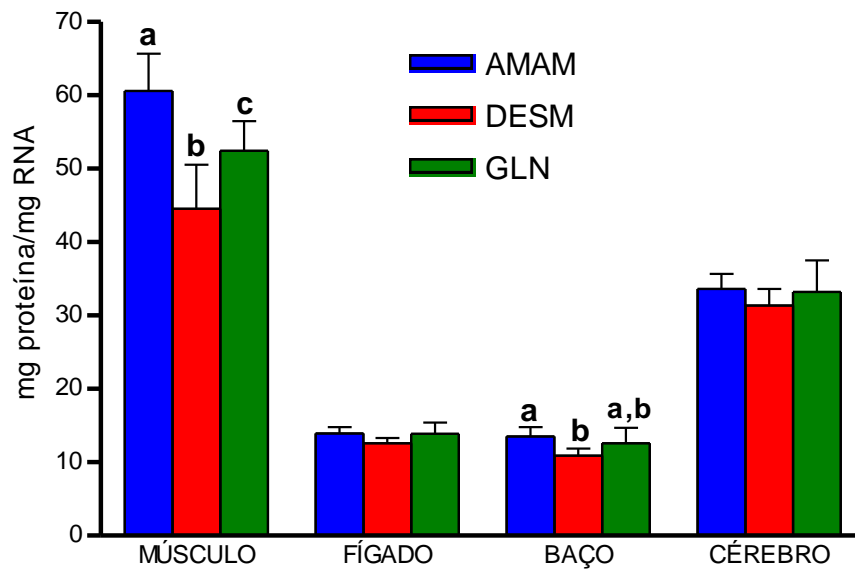


Figura 10. Razão entre as concentrações de proteína e de RNA no músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro referente aos grupos da etapa 1.

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com $n = 8$ /grupo. Valores em cada tecido com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$). (AMAM= grupo amamentado até o 21º dia de vida; DESM= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida; GLN= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada com glutamina até o 21º dia de vida).

7.1.4.8 Concentração de DNA no músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro

O desmame precoce associada à ausência de ingestão de glutamina acarretou em diminuição significativa da concentração de DNA no músculo gastrocnêmio e no fígado em comparação às concentrações observadas nos grupos AMAM e GLN (figura 11). Por outro lado, não se observou diferença significativa em relação à concentração de DNA no baço e cérebro entre os grupos AMAM, DESM e GLN (figura 11).

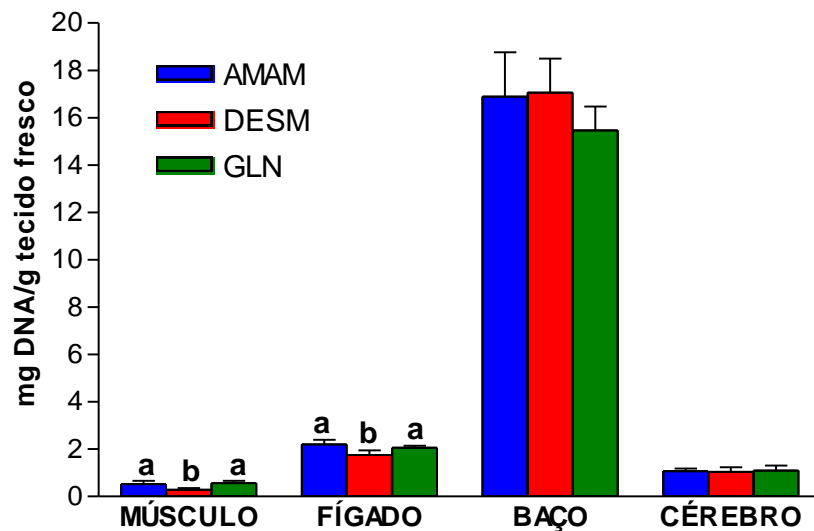


Figura 11. Concentração de DNA no músculo gastrocnêmio, fígado, baço e cérebro referente aos grupos da etapa 1.

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com $n = 8$ /grupo. Valores em cada tecido com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$). (AMAM= grupo amamentado até o 21º dia de vida; DESM= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida; GLN= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada com glutamina até o 21º dia de vida).

7.1.5 Massa e composição química da carcaça dos grupos experimentais da etapa 1

No que concerne à análise da composição química da carcaça, os grupos desmamados precocemente (DESM e GLN) apresentaram diminuição significativa da massa absoluta da carcaça, da massa magra e do conteúdo de proteína e de cinzas em relação ao grupo AMAM (tabela 8). O grupo DESM também apresentou menor quantidade de lipídios em relação aos grupos AMAM e GLN, enquanto o grupo GLN apresentou maior quantidade absoluta de umidade na carcaça em relação aos demais grupos (tabela 8).

Em relação aos valores percentuais relativos à análise da composição química da carcaça, verificou-se que os grupos DESM e GLN apresentaram percentual de umidade significativamente maior em relação ao grupo AMAM (tabela 9). Por outro lado, os grupos DESM e GLN apresentaram percentuais de proteína e de cinzas presentes na carcaça significativamente menores em relação ao grupo AMAM. O grupo DESM apresentou percentual de massa

magra significativamente maior e de lipídios significativamente menor em relação aos grupos AMAM e GLN (tabela 9).

Tabela 8. Massa e composição química da carcaça dos grupos da etapa 1.

	AMAM	DESM	GLN
	gramas		
Massa da carcaça	12,23 ± 0,86 ^a	10,19 ± 0,82 ^b	11,21 ± 0,18 ^b
Massa magra	11,23 ± 0,79 ^a	9,49 ± 0,70 ^b	10,32 ± 0,26 ^b
Umidade	6,81 ± 0,60 ^a	6,77 ± 0,63 ^a	7,65 ± 0,09 ^b
Lipídios	0,99 ± 0,14 ^a	0,69 ± 0,14 ^b	0,96 ± 0,19 ^a
Proteína	3,04 ± 0,22 ^a	1,68 ± 0,25 ^b	1,79 ± 0,13 ^b
Cinzas	0,64 ± 0,06 ^a	0,37 ± 0,06 ^b	0,40 ± 0,04 ^b

Resultados expressos em média ± desvio-padrão com n = 8/grupo.

Valores com diferentes letras na mesma linha são significativamente diferentes (P<0,05).

AMAM= grupo amamentado até o 21º dia de vida.

DESM= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida.

GLN= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada com glutamina até o 21º dia de vida.

Tabela 9. Valores percentuais relativos à composição química da carcaça dos grupos da etapa 1.

	AMAM	DESM	GLN
	%		
Massa magra	91,90 ± 0,95 ^a	93,22 ± 0,87 ^b	91,42 ± 1,56 ^a
Umidade	55,64 ± 1,91 ^a	66,48 ± 3,58 ^b	68,00 ± 1,67 ^b
Lipídios	8,10 ± 0,95 ^a	6,79 ± 0,87 ^b	8,58 ± 1,56 ^a
Proteína	24,91 ± 1,37 ^a	16,53 ± 2,04 ^b	15,88 ± 0,84 ^b
Cinzas	5,23 ± 0,49 ^a	3,65 ± 0,48 ^b	3,50 ± 0,28 ^b

Resultados expressos em média ± desvio-padrão com n = 8/grupo.

Valores com diferentes letras na mesma linha são significativamente diferentes (P<0,05).

AMAM= grupo amamentado até o 21º dia de vida.

DESM= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida.

GLN= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada com glutamina até o 21º dia de vida.

7.1.6 Avaliação hematológica

7.1.6.1 Eritrograma e contagem de reticulócitos

A contagem de eritrócitos e de reticulócitos, a concentração de hemoglobina e o volume hematócrito não demonstraram diferença significativa entre os grupos AMAM, DESM e GLN (tabela 10).

Tabela 10. Eritrograma e contagem de reticulócitos referente aos grupos da etapa 1.

	AMAM	DESM	GLN
Eritrócitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	5,89 \pm 0,49	6,07 \pm 0,88	5,91 \pm 0,70
Hemoglobina (g/dL)	12,2 \pm 1,3	11,2 \pm 2,1	11,0 \pm 1,0
Volume hematócrito (%)	32,8 \pm 2,7	31,2 \pm 4,2	32,1 \pm 3,4
Reticulócitos (%)	13,8 \pm 1,4	14,9 \pm 2,8	15,3 \pm 2,2

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com n = 10/grupo.

Não houve diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).

AMAM= grupo amamentado até o 21º dia de vida.

DESM= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida.

GLN= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada com glutamina até o 21º dia de vida.

7.1.6.2 Leucograma

A contagem total de leucócitos e o número total de linfócitos presentes no sangue periférico dos animais dos grupos DESM e GLN apresentaram diminuição significativa em relação ao grupo AMAM (tabela 11). A contagem de neutrófilos e de eosinófilos e o percentual de eosinófilos presentes no sangue periférico do grupo GLN foi significativamente menor em relação ao grupo AMAM (tabela 11). Não houve diferença significativa em relação à distribuição percentual de linfócitos e neutrófilos entre os grupos AMAM, DESM e GLN.

Tabela 11. Contagem total e diferencial de leucócitos presentes no sangue periférico referente aos grupos da etapa 1.

Parâmetros	AMAM	DESM	GLN
Leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	2,197 \pm 0,531 ^a	1,264 \pm 0,376 ^b	1,229 \pm 0,359 ^b
Linfócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	2,084 \pm 0,497 ^a	1,163 \pm 0,388 ^b	1,022 \pm 0,481 ^b
Neutrófilos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0,099 \pm 0,066 ^a	0,079 \pm 0,075 ^{a,b}	0,034 \pm 0,026 ^b
Eosinófilos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0,013 \pm 0,021 ^a	0,004 \pm 0,007 ^{a,b}	0,000 \pm 0,000 ^b
Linfócitos (%)	95,0 \pm 2,7	93,8 \pm 5,6	97,0 \pm 1,6
Neutrófilos (%)	4,4 \pm 2,3	6,0 \pm 5,7	3,0 \pm 1,6
Eosinófilos (%)	0,6 \pm 0,9 ^a	0,3 \pm 0,5 ^{a,b}	0,0 \pm 0,0 ^b

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com n = 10/grupo.

Valores com diferentes letras na mesma linha são significativamente diferentes (P<0,05).

AMAM= grupo amamentado até o 21º dia de vida.

DESM= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida.

GLN= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada com glutamina até o 21º dia de vida.

7.1.7 Mielograma

O grupo DESM apresentou redução significativa do número de células nucleadas presentes na medula óssea em comparação aos grupos AMAM e GLN (tabela 12). Em relação à contagem total de células da série granulocítica presentes na medula óssea, verificou-se aumento da contagem dessas em forma jovem e em anel do grupo GLN em comparação aos grupos AMAM e DESM. O grupo GLN apresentou aumento significativo da contagem de segmentados em relação ao grupo DESM (tabela 12). Em relação à série linfoplasmocitária, verificou-se significativa diminuição do número de linfócitos presentes na medula óssea dos animais dos grupos DESM e GLN quando comparados aos animais do grupo AMAM (tabela 12). A análise do setor eritrocitário da medula óssea demonstrou redução significativa da contagem de eritroblastos policromáticos e ortocromáticos do grupo DESM em relação aos demais grupos (tabela 12). O grupo DESM apresentou aumento significativo da relação grânulo-eritrocítica (G/E) na medula óssea em comparação ao grupo AMAM. O grupo GLN apresentou diminuição significativa da relação linfo-

eritrocitária (L/E) em relação ao grupo AMAM. A relação grânulo-linfóide no grupo GLN foi significativamente maior em relação aos demais grupos. Os grupos da etapa 1 não diferiram significativamente em relação à contagem de blastos, eosinófilos, macrófagos e eritroblastos jovens presentes na medula óssea (tabela 12).

Tabela 12. Mielograma referente aos grupos da etapa 1.

	AMAM	DESM	GLN
Células nucleadas totais (x 10 ⁶ cel/mL)	13,5 ± 3,6 ^a	7,9 ± 2,4 ^b	13,5 ± 4,0 ^a
Blastos (x 10 ⁵ cel/mL)	2,3 ± 1,2	1,2 ± 1,1	2,4 ± 1,9
Forma jovem (x 10 ⁵ cel/mL)	3,1 ± 1,8 ^a	2,9 ± 1,4 ^a	5,3 ± 3,1 ^b
Forma em anel (x 10 ⁵ cel/mL)	12,5 ± 7,0 ^a	13,3 ± 4,8 ^a	21,3 ± 10,7 ^b
Segmentados (x 10 ⁵ cel/mL)	12,9 ± 7,3 ^{a,b}	7,3 ± 3,6 ^a	18,2 ± 8,2 ^b
Eosinófilos (x 10 ⁵ cel/mL)	1,4 ± 1,0	0,7 ± 0,6	1,3 ± 1,1
Macrófagos (x 10 ⁵ cel/mL)	1,7 ± 1,6	1,0 ± 0,9	1,0 ± 1,0
Linfócitos/plasmócitos (x 10 ⁶ cel/mL)	3,9 ± 1,8 ^a	1,5 ± 0,6 ^b	1,7 ± 1,0 ^b
Eritroblastos jovens (x 10 ⁶ cel/mL)	1,3 ± 0,5	0,9 ± 0,7	1,3 ± 0,4
EPO/EOC* (x 10 ⁶ cel/mL)	4,9 ± 1,5 ^a	2,8 ± 1,3 ^b	5,5 ± 2,0 ^a
Relação grânulo-eritrocítica	0,5 ± 0,2 ^a	0,8 ± 0,4 ^b	0,7 ± 0,3 ^{a,b}
Relação linfo-eritrocítica	0,6 ± 0,3 ^a	0,5 ± 0,3 ^{a,b}	0,3 ± 0,2 ^b
Relação grânulo-linfóide	0,9 ± 0,5 ^a	1,9 ± 0,9 ^a	3,5 ± 2,3 ^b

Resultados expressos em média ± desvio-padrão com n = 10/grupo.

Valores com diferentes letras na mesma linha são significativamente diferentes (P<0,05).

* EPO/EOC= eritroblatos policromáticos e ortocromáticos.

AMAM= grupo amamentado até o 21º dia de vida.

DESM= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida.

GLN= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada com glutamina até o 21º dia de vida.

7.1.8 Esplenograma

A contagem de eosinófilos presentes no baço foi significativamente menor no grupo GLN em relação ao grupo AMAM (tabela 13). O grupo GLN

apresentou contagem de plasmócitos significativamente maior em comparação ao grupo DESM. A contagem de eritroblastos jovens dos grupos desmamados precocemente foi significativamente inferior àquela do grupo AMAM, ao mesmo tempo em que essa contagem no grupo GLN foi significativamente inferior a do grupo DESM (tabela 13). Os grupos AMAM, DESM e GLN não apresentaram valores significativamente diferentes em relação à contagem dos demais tipos celulares presentes no baço (tabela 13).

Tabela 13. Esplenograma referente aos grupos da etapa 1.

	AMAM	DESM	GLN
Células nucleadas totais ($\times 10^7$ cel/mL)	10,6 \pm 2,6	9,0 \pm 2,4	10,8 \pm 3,6
Blastos ($\times 10^5$ cel/mL)	4,0 \pm 1,9	2,5 \pm 2,9	2,7 \pm 1,9
Forma jovem ($\times 10^5$ cel/mL)	2,6 \pm 4,3	3,8 \pm 4,3	2,0 \pm 2,6
Forma em anel ($\times 10^5$ cel/mL)	8,6 \pm 5,9	14,5 \pm 11,2	18,6 \pm 8,8
Segmentados ($\times 10^5$ cel/mL)	35,4 \pm 15,1	30,0 \pm 11,8	35,7 \pm 23,3
Eosinófilos ($\times 10^5$ cel/mL)	24,6 \pm 24,8 ^a	11,2 \pm 9,0 ^{a,b}	7,4 \pm 7,5 ^b
Basófilos/Mastócitos	0,0 \pm 0,0	0,8 \pm 2,4	0,3 \pm 1,1
Monócitos/Macrófagos ($\times 10^5$ cel/mL)	13,1 \pm 9,6	9,6 \pm 8,3	6,2 \pm 5,6
Linfócitos ($\times 10^7$ cel/mL)	5,4 \pm 0,9	4,5 \pm 1,2	4,7 \pm 2,2
Plasmócitos ($\times 10^5$ cel/mL)	3,3 \pm 3,7 ^{a,b}	0,8 \pm 1,5 ^a	4,6 \pm 3,8 ^b
Eritroblastos jovens ($\times 10^5$ cel/mL)	40,8 \pm 12,6 ^a	27,9 \pm 10,8 ^b	16,6 \pm 7,0 ^c
EPO/EOC* ($\times 10^7$ cel/mL)	3,4 \pm 1,6	4,5 \pm 2,5	5,1 \pm 1,4
Relação grânulo-eritrocítica	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1
Relação linfo-eritrocítica	1,7 \pm 0,6	1,4 \pm 1,2	0,9 \pm 0,4
Relação grânulo-linfóide	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,1

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com n = 10/grupo.

Valores com diferentes letras na mesma linha são significativamente diferentes (P<0,05).

* EPO/EOC= eritroblastos policromáticos e ortocromáticos.

AMAM= grupo amamentado até o 21º dia de vida.

DESM= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida.

GLN= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada com glutamina até o 21º dia de vida.

7.1.9 Parâmetros de avaliação de aspectos funcionais de macrófagos peritoneais

7.1.9.1 Contagem total e diferencial de células do lavado peritoneal

A contagem total de células e de macrófagos presentes no lavado peritoneal do grupo DESM foi significativamente menor em comparação aos grupos AMAM e GLN (figura 12). Em relação à distribuição percentual de células presentes no lavado peritoneal, não houve diferença significativa entre os grupos da etapa 1 (figura 13).

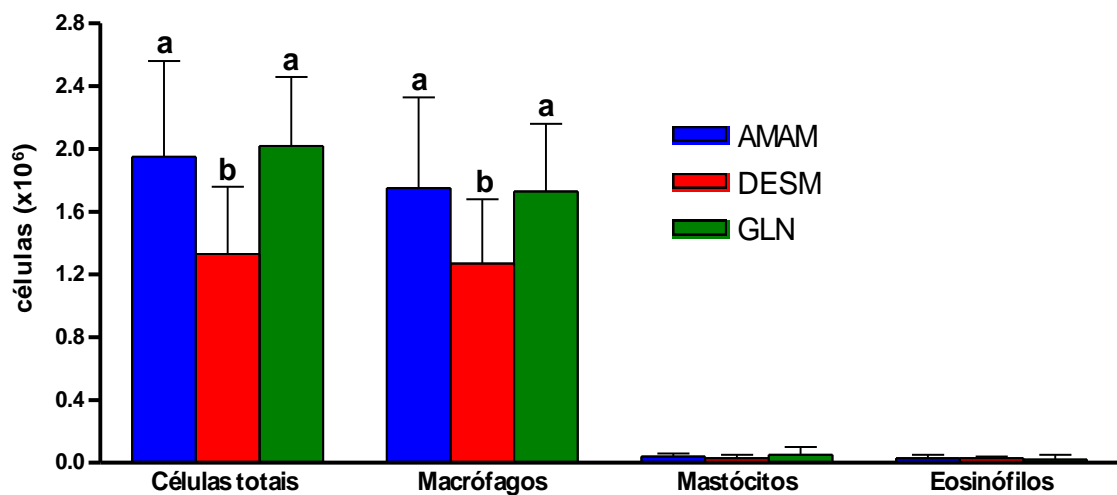


Figura 12. Contagem total e diferencial de células presentes no lavado peritoneal referente aos grupos da etapa 1.

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com $n = 8$ /grupo. Valores com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$). (AMAM= grupo amamentado até o 21^o dia de vida; DESM= grupo desmamado no 14^o dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 21^o dia de vida; GLN= grupo desmamado no 14^o dia de vida e alimentado com ração suplementada com glutamina até o 21^o dia de vida).

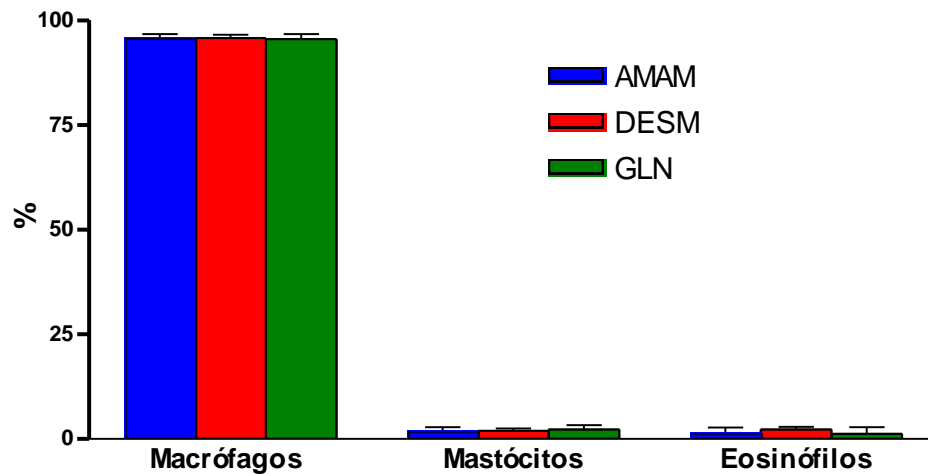


Figura 13. Distribuição percentual de células presentes no lavado peritoneal referente aos grupos da etapa 1.

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com $n = 8$ /grupo. Valores com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$). (AMAM= grupo amamentado até o 21º dia de vida; DESM= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida; GLN= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada com glutamina até o 21º dia de vida).

7.1.9.2 Teste de adesão de macrófagos peritoneais

Os grupos DESM e GLN apresentaram redução significativa da capacidade de adesão de macrófagos peritoneais após 30, 60, 90, 120 minutos e 24 horas em relação ao grupo AMAM (figura 14).

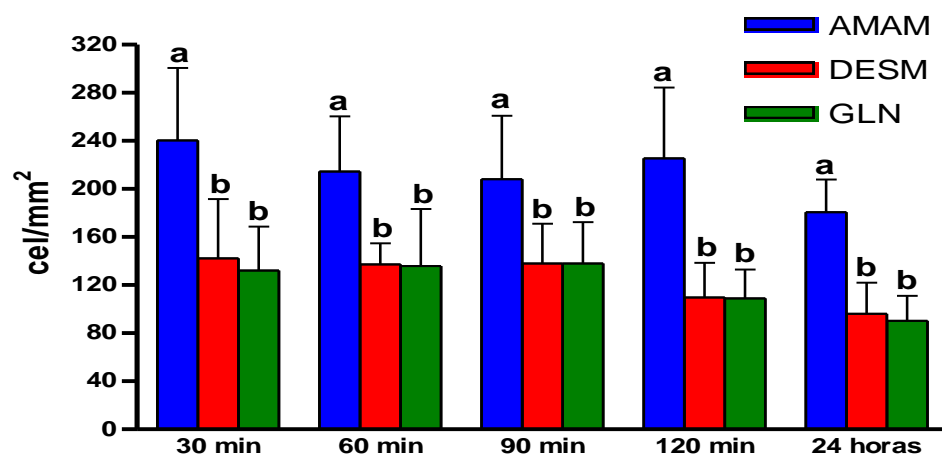


Figura 14. Capacidade de adesão de macrófagos peritoneais de camundongos da etapa 1.

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com $n = 8$ /grupo. Valores em cada intervalo de tempo com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$). (AMAM= grupo amamentado até o 21º dia de vida; DESM= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida; GLN= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada com glutamina até o 21º dia de vida).

7.1.9.3 Teste de espraçamento de macrófagos peritoneais

O grupo DESM apresentou redução significativa da capacidade de espraçamento de macrófagos peritoneais após 30, 60, 90, 120 minutos e 24 horas em comparação aos grupos AMAM e GLN (figura 15).

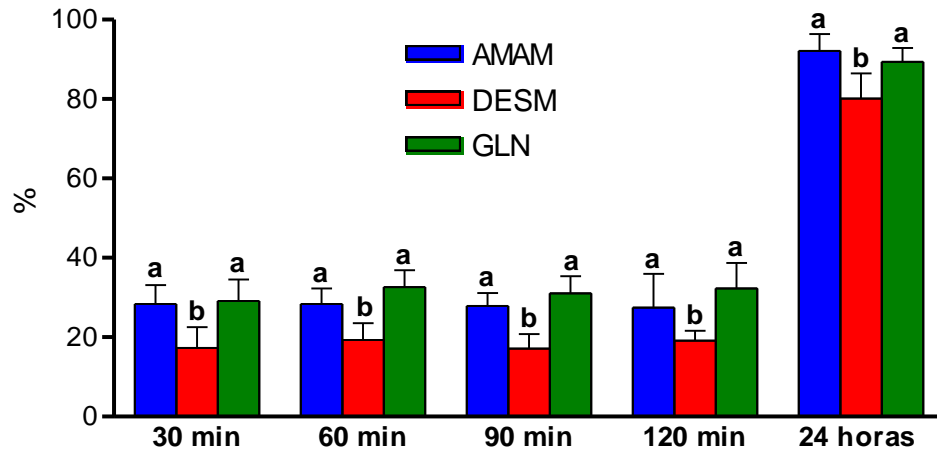


Figura 15. Teste de espraçamento de macrófagos peritoneais de camundongos da etapa 1.

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com $n = 8$ /grupo. Valores em cada intervalo de tempo com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$). (AMAM= grupo amamentado até o 21º dia de vida; DESM= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida; GLN= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada com glutamina até o 21º dia de vida).

7.1.9.4 Teste de fagocitose e atividade fungicida de macrófagos peritoneais

Os grupos DESM e GLN apresentaram redução significativa da capacidade de fagocitose aos 60, 90 e 120 minutos em relação ao grupo AMAM (figura 16A). Além disso, a atividade fagocítica do grupo GLN aos 60 e 90 minutos foi significativamente superior àquela do grupo DESM. Ao mesmo tempo, verificou-se que a atividade fungicida dos grupos DESM e GLN foi significativamente inferior à do grupo AMAM em todos os tempos analisados (figura 16B).

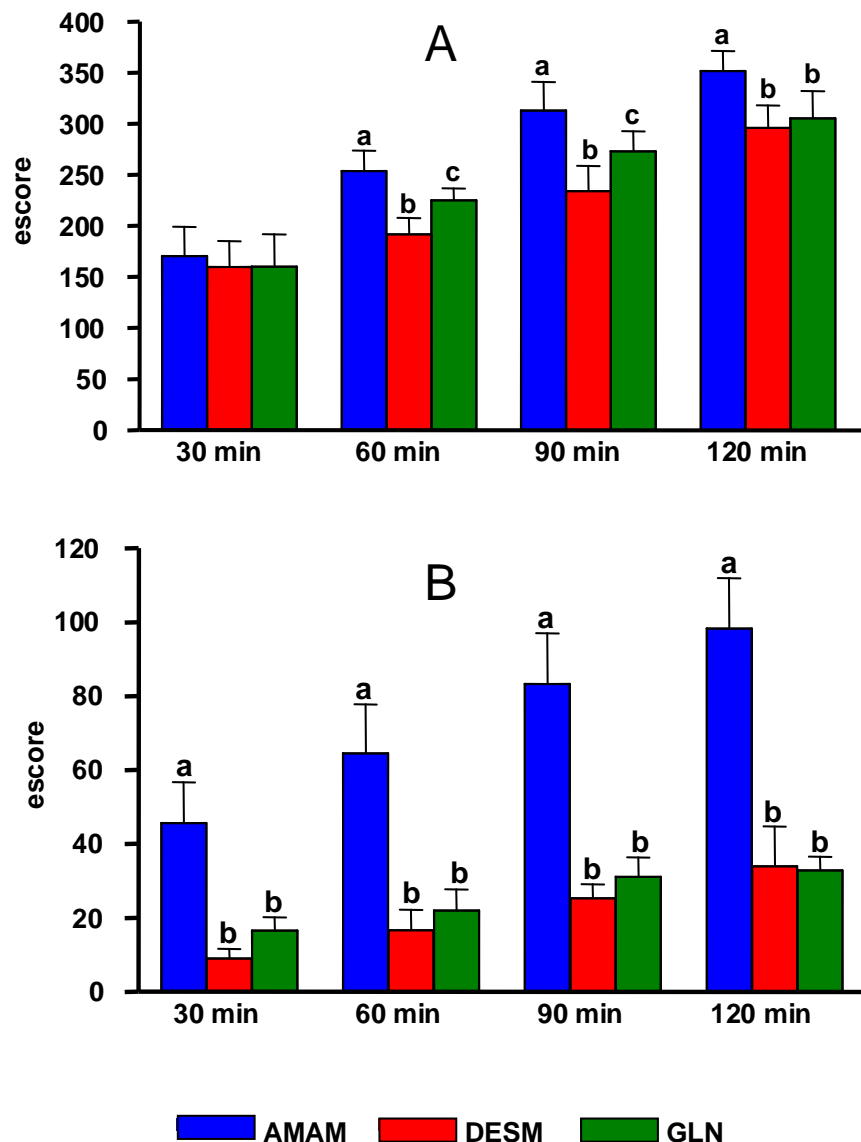


Figura 16. (A) Teste de fagocitose e (B) atividade fungicida de macrófagos peritoneais referentes aos grupos da etapa 1.

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com $n = 8$ /grupo. Valores em cada intervalo de tempo com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$). (AMAM= grupo amamentado até o 21º dia de vida; DESM= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida; GLN= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada com glutamina até o 21º dia de vida).

7.1.9.5 Síntese de peróxido de hidrogênio em cultura de macrófagos peritoneais

A produção de peróxido de hidrogênio *in vitro* a partir de macrófagos peritoneais estimulados com PMA foi significativamente menor no grupo DESM em relação aos grupos AMAM e GLN (figura 17). Não houve diferença entre os

grupos AMAM, DESM e GLN em relação à produção de peróxido de hidrogênio a partir de macrófagos peritoneais não estimulados com PMA (figura 17).

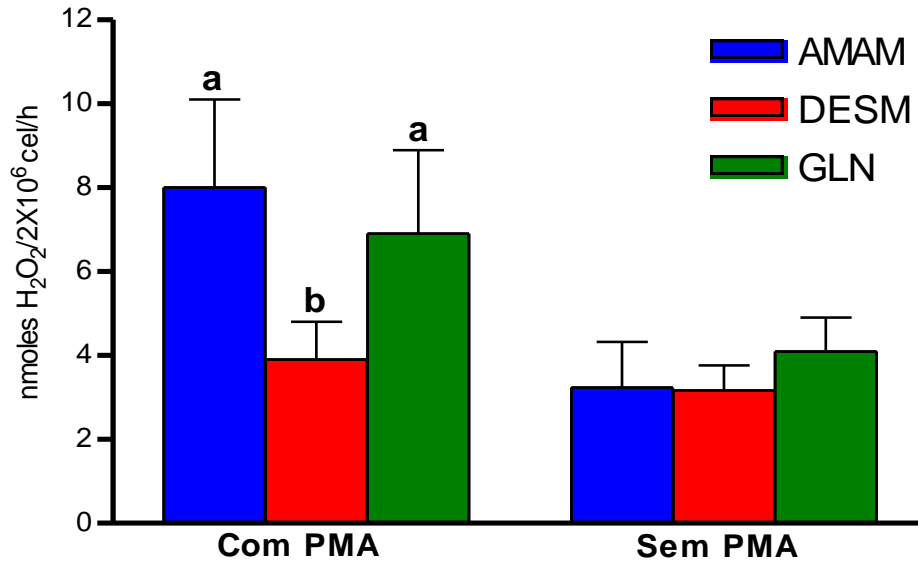


Figura 17. Síntese de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a partir de macrófagos peritoneais de camundongos da etapa 1.

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com $n = 8$ /grupo. Valores com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$). As células foram estimuladas *in vitro* com $10 \mu L$ de PMA por poço. (AMAM= grupo amamentado até o 21º dia de vida; DESM= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida; GLN= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada com glutamina até o 21º dia de vida; PMA= forbol-12-acetato-13-miristato).

7.1.9.6 Síntese de óxido nítrico em cultura de macrófagos peritoneais

O grupo DESM apresentou redução significativa da síntese de óxido nítrico *in vitro* em cultura de macrófagos peritoneais após 24 e 72 horas de cultura em relação aos grupos AMAM e GLN (figura 18 A). A síntese de óxido nítrico do grupo DESM com 48 h de cultura foi significativamente inferior àquela do grupo AMAM. A área sob a curva correspondente à cinética de síntese de óxido nítrico durante o período de 24 a 72 horas foi significativamente menor no grupo DESM em relação aos grupos AMAM e GLN (figura 18 B).

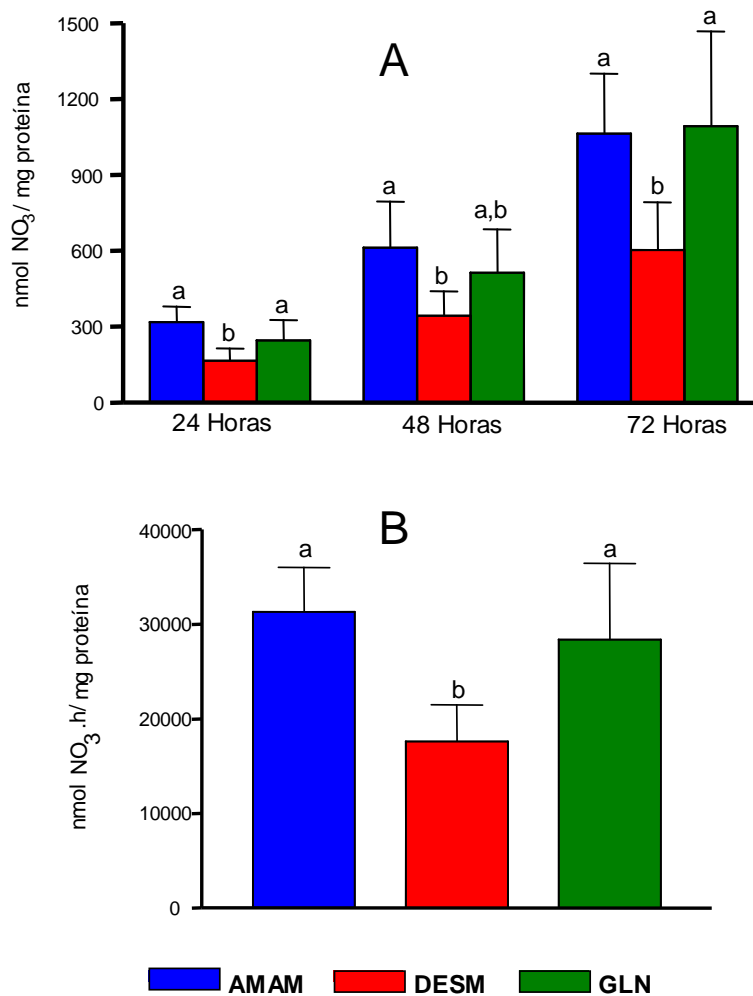


Figura 18. (A) Síntese de óxido nítrico e (B) área sob a curva correspondente à cinética de síntese de óxido nítrico em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos da etapa 1.

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com $n = 8$ /grupo. Valores em cada intervalo de tempo com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$). As células foram estimuladas *in vitro* com $5 \mu\text{g/mL}$ de LPS. (AMAM= grupo amamentado até o 21º dia de vida; DESM= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida; GLN= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada com glutamina até o 21º dia de vida).

7.1.9.7 Síntese de citocinas, *in vitro*, por macrófagos peritoneais

Os grupos DESM e GLN apresentaram redução significativa da síntese de TNF- α *in vitro*, a partir de macrófagos peritoneais estimulados com LPS, com 2, 4 e 8 horas de cultura celular em comparação ao grupo AMAM (figura 19A). O grupo DESM apresentou síntese de TNF- α com 24 horas de cultura de macrófagos significativamente inferior àquela observada nos grupos AMAM e

GLN. A síntese de TNF- α foi significativamente maior no grupo GLN em relação ao grupo DESM em todos os tempos de cultura celular (figura 19A).

O desmame precoce, associado ou não à ingestão de glutamina, promoveu diminuição significativa da síntese de IL-1 β *in vitro* a partir de macrófagos peritoniais estimulados com LPS, após 4 horas de cultura celular (figura 19B). O grupo DESM apresentou menor síntese de IL-1 β após 24 horas de cultura celular em relação aos grupos AMAM e GLN (figura 19B).

O grupo DESM apresentou redução significativa da síntese de IL-6 *in vitro*, a partir de macrófagos peritoniais estimulados com LPS, após 2, 4 e 24 horas em relação aos grupos AMAM e GLN (figura 19C). A concentração de IL-6 sintetizada pelo grupo GLN após 24 horas de cultura celular foi significativamente maior em relação àquela do grupo AMAM. O grupo GLN também apresentou síntese de IL-6 significativamente superior àquela do grupo DESM após 8 horas de cultura celular (figura 19C).

O grupo DESM apresentou aumento significativo da síntese de IL-10 *in vitro*, a partir de macrófagos peritoniais estimulados com LPS, após 2, 4, 8 e 24 horas em relação ao grupo AMAM, enquanto o grupo GLN apresentou maior concentração de IL-10, após 2, 8 e 24 h de cultura celular em relação ao grupo AMAM (figura 19D). O grupo DESM apresentou concentração de IL-10 significativamente maior em relação ao grupo GLN, após 2 e 4 horas de cultura celular (figura 19D).

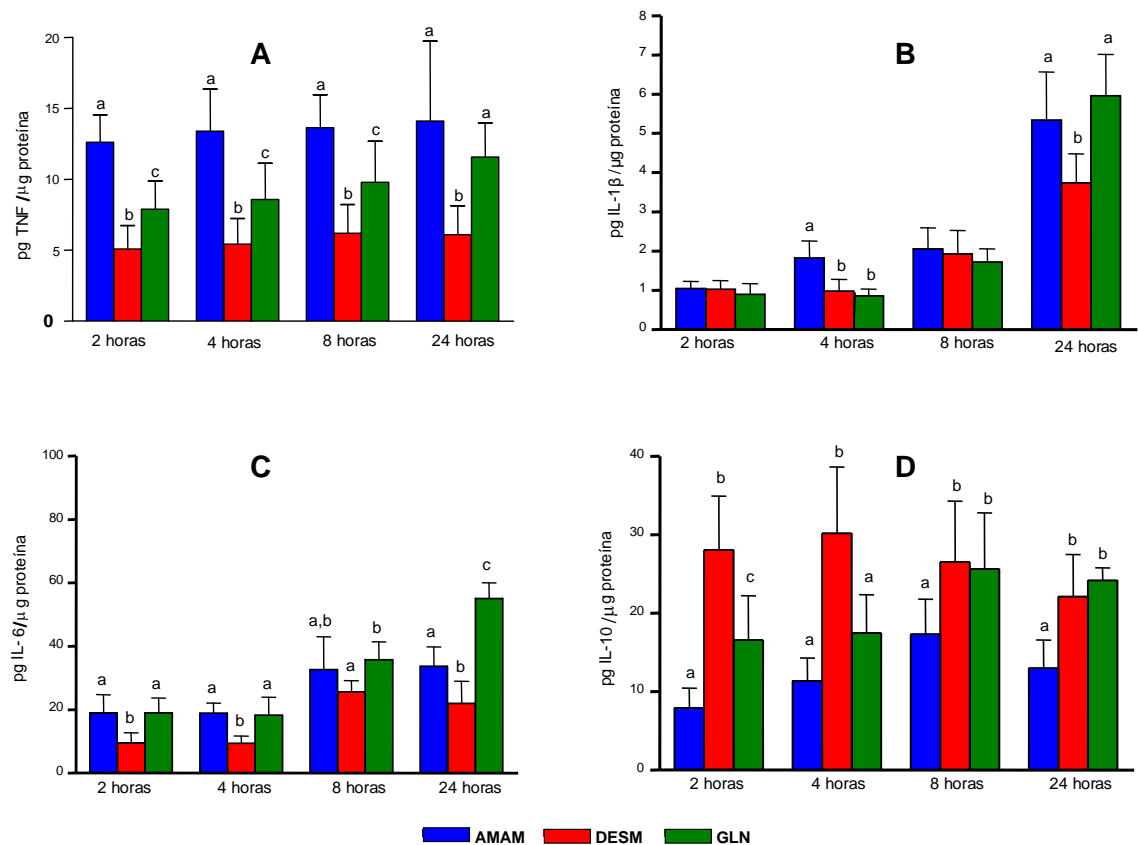


Figura 19. Síntese de (A) TNF- α , (B) IL-1 β , (C) IL-6 e (D) IL-10 em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos da etapa 1.

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com $n = 8$ /grupo. Valores em cada intervalo de tempo com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$). As células foram estimuladas *in vitro* com 5 $\mu\text{g/mL}$ de LPS. (AMAM= grupo amamentado até o 21 $^{\circ}$ dia de vida; DESM= grupo desmamado no 14 $^{\circ}$ dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 21 $^{\circ}$ dia de vida; GLN= grupo desmamado no 14 $^{\circ}$ dia de vida e alimentado com ração suplementada com glutamina até o 21 $^{\circ}$ dia de vida).

7.1.9.7.1 Área sob a curva correspondente à cinética de síntese de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 *in vitro*

A partir dos valores observados na cinética de síntese de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 em macrófagos peritoneais estimulados com LPS durante o período de 2 a 24 horas, foi possível calcular a área sob a curva correspondente à cinética de síntese de cada citocina dos grupos AMAM, DESM e GLN (figura 20).

A figura 20 mostra que o grupo DESM apresentou menor área sob a curva relativa à cinética de TNF- α , IL-1 β e IL-6 em relação aos grupos AMAM e GLN. Cabe ressaltar que o grupo GLN apresentou menor área sob a curva da síntese de TNF- α e maior área sob a curva relativa à síntese de IL-6 em

comparação ao grupo AMAM (figura 20). No que concerne à área sob a curva relativa à síntese de IL-10, verificou-se que os grupos desmamados precocemente, suplementados ou não com glutamina, apresentaram capacidade de síntese de IL-10 significativamente maior em relação ao grupo AMAM (figura 20).

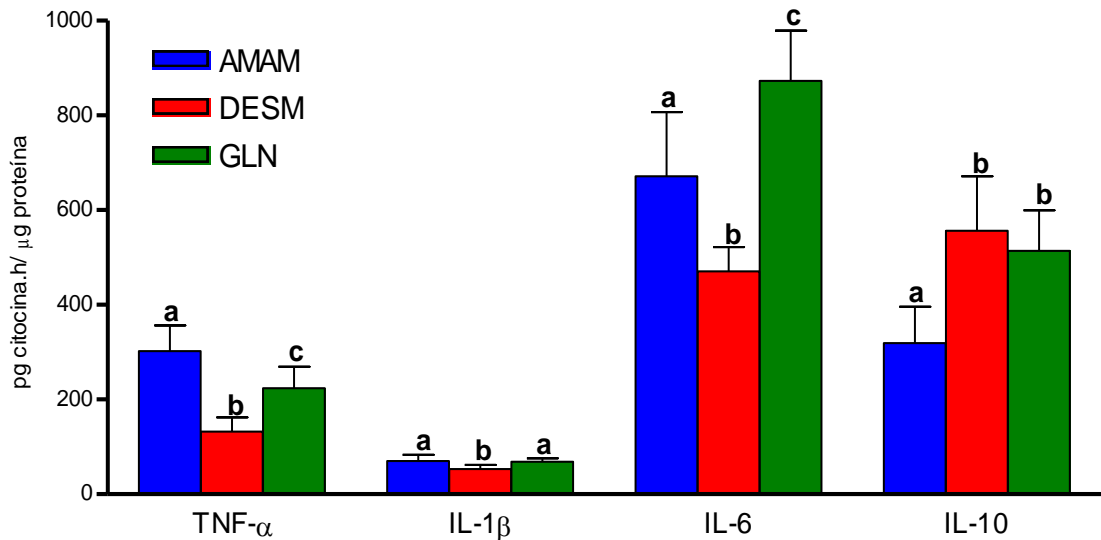


Figura 20. Área sob a curva correspondente à cinética de síntese de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 *in vitro* por macrófagos peritoneais de camundongos da etapa 1.

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com $n = 8$ /grupo. Valores para cada citocina com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$). As células foram cultivadas entre 2 e 24 horas. (AMAM= grupo amamentado até o 21º dia de vida; DESM= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida; GLN= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada com glutamina até o 21º dia de vida).

7.2 Resultados referentes à Etapa 2

7.2.1 Parâmetros de avaliação de aspectos funcionais de macrófagos peritoneiais

7.2.1.1 Teste de adesão de macrófagos peritoneiais

A partir da figura 21 verificou-se redução significativa da capacidade de adesão dos grupos DESM, DESM/0,5, DESM/0,58, DESM/1,0 e DESM/2,0, quando comparados ao grupo AMAM nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos. Também se observou que não houve diferença significativa em relação à capacidade de adesão entre os grupos suplementados com glutamina *in vitro* (DESM/0,5, DESM/0,58, DESM/1,0 e DESM/2,0) em comparação ao grupo DESM entre 30 e 120 minutos de ensaio.

Por outro lado, com 24 horas de adesão, verificou-se que a capacidade de adesão dos grupos DESM/1,0 e DESM/2,0 foi significativamente maior (68% e 82%, respectivamente) em comparação ao grupo DESM (figura 21). Além disso, verificou-se que os grupos suplementados com glutamina *in vitro* (DESM/0,5, DESM/0,58, DESM/1,0 e DESM/2,0) não diferiram significativamente entre si e em relação ao grupo AMAM com 24 horas de adesão (figura 21). O grupo DESM apresentou redução significativa da capacidade de adesão de macrófagos peritoneiais após 24 horas em relação ao grupo AMAM (figura 21).

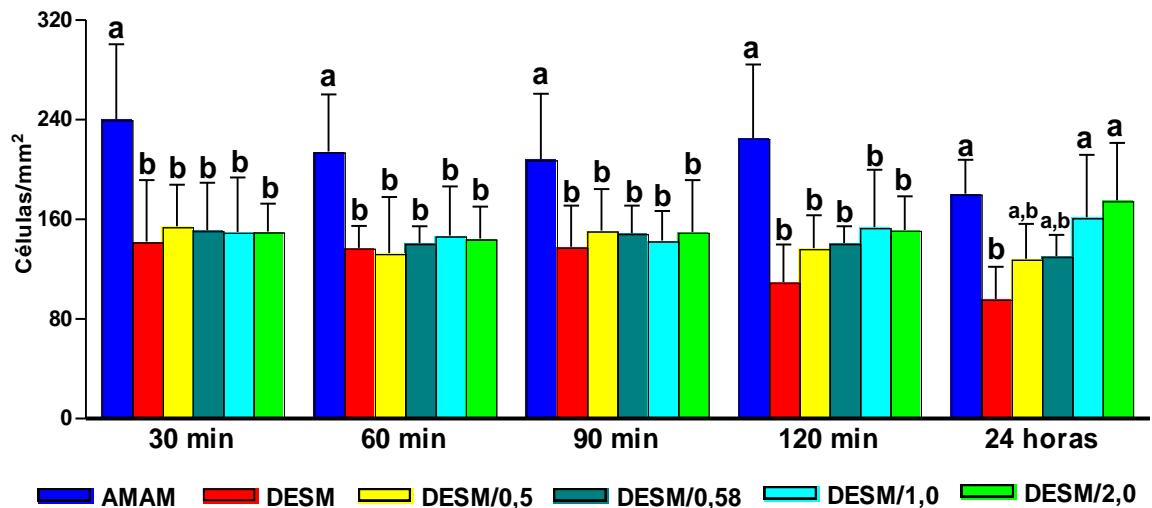


Figura 21. Teste de adesão de macrófagos peritoneais de camundongos amamentados até o 21º dia de vida (AMAM) ou desmamados no 14º dia de vida e alimentados com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida (DESM).

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com $n = 8$ /grupo. Valores em cada intervalo de tempo com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$). O meio de cultura adicionado à cultura de macrófagos peritoneais dos animais do grupo DESM foi suplementado com 0,5 mM (DESM/0,5), 0,58 mM (DESM/0,58), 1,0 mM (DESM/1,0) e 2,0 mM (DESM/2,0) de glutamina.

7.2.1.2 Capacidade de espraiamento de macrófagos peritoneais

O grupo DESM apresentou redução significativa da capacidade de espraiamento após 30, 60, 90, 120 minutos e 24 horas em comparação ao grupo AMAM (figura 22). A capacidade de espraiamento de macrófagos peritoneais suplementados *in vitro* com 0,5, 0,58, 1 e 2 mM de glutamina foi significativamente maior em comparação ao grupo DESM nos tempos 30, 60 e 90 minutos e 24 horas (figura 22). No tempo 120 minutos, os grupos suplementados *in vitro* com 0,58, 1 e 2 mM de glutamina apresentaram capacidade de espraiamento significativamente maior em relação ao grupo DESM (figura 22). Cabe ressaltar que os valores de capacidade de espraiamento dos macrófagos suplementados com glutamina, ou seja, DESM/0,5, DESM/0,58, DESM/1,0 e DESM/2,0, não diferiram significativamente em todos os tempos avaliados quando comparados ao grupo AMAM (figura 22).

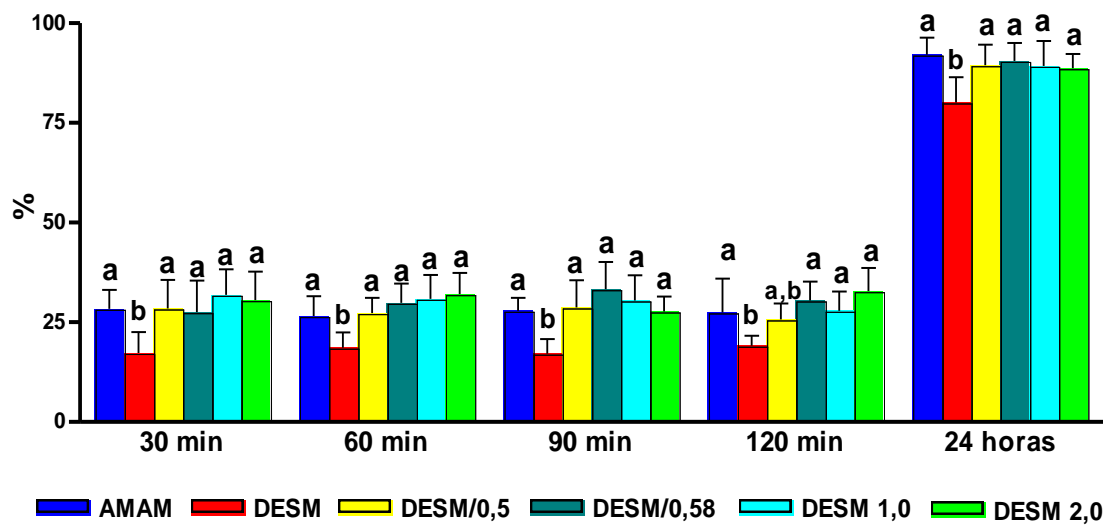


Figura 22. Capacidade de espraiamento de macrófagos peritoneais de camundongos amamentados até o 21º dia de vida (AMAM) ou desmamados no 14º dia de vida e alimentados com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida (DESM).

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com $n = 8$ /grupo. Valores em cada intervalo de tempo com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$). O meio de cultura adicionado à cultura de macrófagos peritoneais dos animais do grupo DESM foi suplementado com 0,5 mM (DESM/0,5), 0,58 mM (DESM/0,58), 1,0 mM (DESM/1,0) e 2,0 mM (DESM/2,0) de glutamina.

7.2.1.3 Teste de fagocitose e atividade fungicida de macrófagos peritoneais

O grupo DESM apresentou redução significativa da capacidade de fagocitose aos 60, 90 e 120 minutos em comparação ao grupo AMAM (figura 23A). A suplementação com glutamina (0,5 a 2,0 mM) no meio de cultura contendo macrófagos peritoneais de animais desmamados precocemente acarretou em aumento significativo da capacidade de fagocitose de *Candida albicans* em comparação ao grupo DESM nos tempos 60, 90 e 120 minutos. Além disso, não houve diferença significativa em relação à capacidade de fagocitose entre os grupos suplementados *in vitro* com glutamina (DESM/0,5, DESM/0,58, DESM/1,0 e DESM/2,0) em relação ao grupo AMAM em todos os tempos avaliados (figura 23A). Por outro lado, verificou-se redução significativa da atividade fungicida dos grupos DESM, DESM/0,5, DESM/0,58, DESM/1,0 e DESM/2,0 quando comparados ao grupo AMAM, em todos os tempos avaliados (figura 23B).

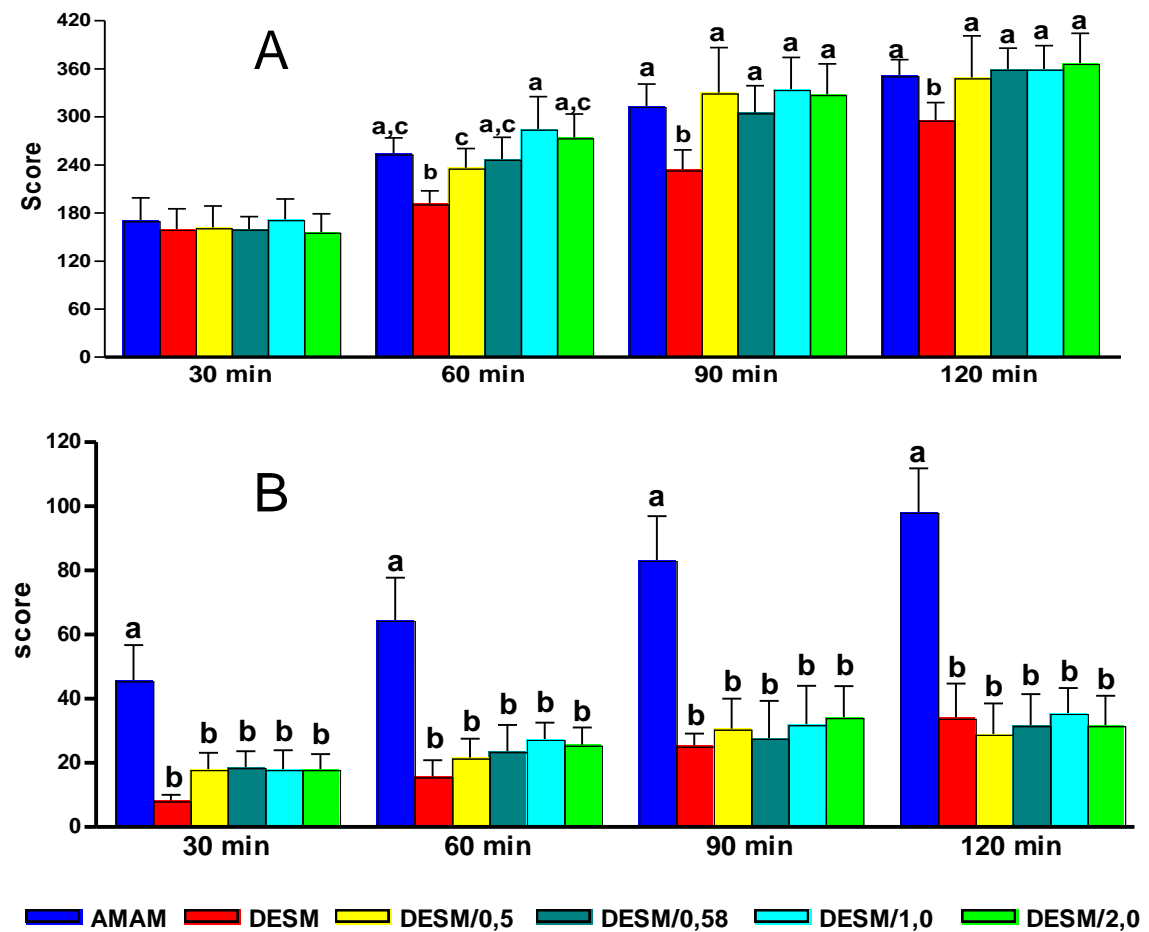


Figura 23. (A) Teste de fagocitose e (B) atividade fungicida de macrófagos peritoneais de camundongos amamentados até o 21^o dia de vida (AMAM) ou desmamados no 14^o dia de vida e alimentados com ração isenta de glutamina até o 21^o dia de vida (DESM).

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com $n = 8$ /grupo. Valores em cada intervalo de tempo com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$). O meio de cultura adicionado à cultura de macrófagos peritoneais dos animais do grupo DESM foi suplementado com 0,5 mM (DESM/0,5), 0,58 mM (DESM/0,58), 1,0 mM (DESM/1,0) e 2,0 mM (DESM/2,0) de glutamina.

7.2.1.4 Síntese de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais

O grupo DESM apresentou diminuição significativa da síntese de peróxido de hidrogênio em relação ao grupo AMAM (figura 24). Os grupos DESM/1,0 e DESM/2,0 apresentaram aumento significativo da síntese de peróxido de hidrogênio *in vitro* em relação ao grupo DESM (100% e 79%, respectivamente) (figura 24). Além disso, os grupos DESM/0,5, DESM/0,58, DESM/1,0 e DESM/2,0 não diferiram significativamente em relação à síntese de peróxido de hidrogênio, quando comparados ao grupo AMAM (figura 24).

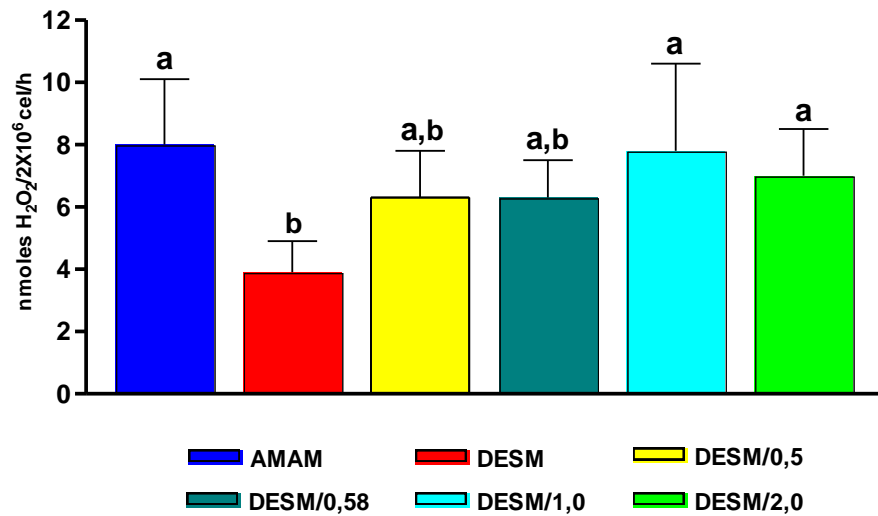


Figura 24. Síntese de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) *in vitro* a partir de macrófagos peritoneais de camundongos amamentados até o 21^o dia de vida (AMAM) ou desmamados no 14^o dia de vida e alimentados com ração isenta de glutamina até o 21^o dia de vida (DESM).

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com $n = 8$ /grupo. Valores com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$). O meio de cultura adicionado à cultura de macrófagos peritoneais dos animais do grupo DESM foi suplementado com 0,5 mM (DESM/0,5), 0,58 mM (DESM/0,58), 1,0 mM (DESM/1,0) e 2,0 mM (DESM/2,0) de glutamina.

7.2.1.5 Síntese de óxido nítrico por macrófagos peritoneais

O grupo DESM apresentou redução significativa da síntese de óxido nítrico em relação ao grupo AMAM em todos os tempos avaliados (figura 25A). Os grupos DESM/0,5, DESM/0,58, DESM/1,0 e DESM/2,0 apresentaram síntese de óxido nítrico significativamente maior em comparação ao grupo DESM com 24 horas de cultura celular (figura 25A). Além disso, os grupos DESM/0,5, DESM/0,58, DESM/1,0 e DESM/2,0 não diferiram significativamente em relação ao grupo AMAM em todos os tempos avaliados da síntese de óxido nítrico *in vitro* (figura 25A).

A área sob a curva correspondente à cinética de síntese de óxido nítrico *in vitro* do grupo DESM foi significativamente menor em relação àquela do grupo AMAM (figura 25B). A área sob a curva correspondente à cinética de síntese de óxido nítrico *in vitro* dos grupos DESM/0,5, DESM/0,58, DESM/1,0 e DESM/2,0 foi significativamente superior àquela do grupo DESM (figura 25B). Com exceção do grupo DESM/0,5, todos os grupos suplementados *in vitro* com

glutamina não diferiram do grupo AMAM em relação à área sob a curva correspondente à cinética de síntese de óxido nítrico *in vitro* (figura 25B).

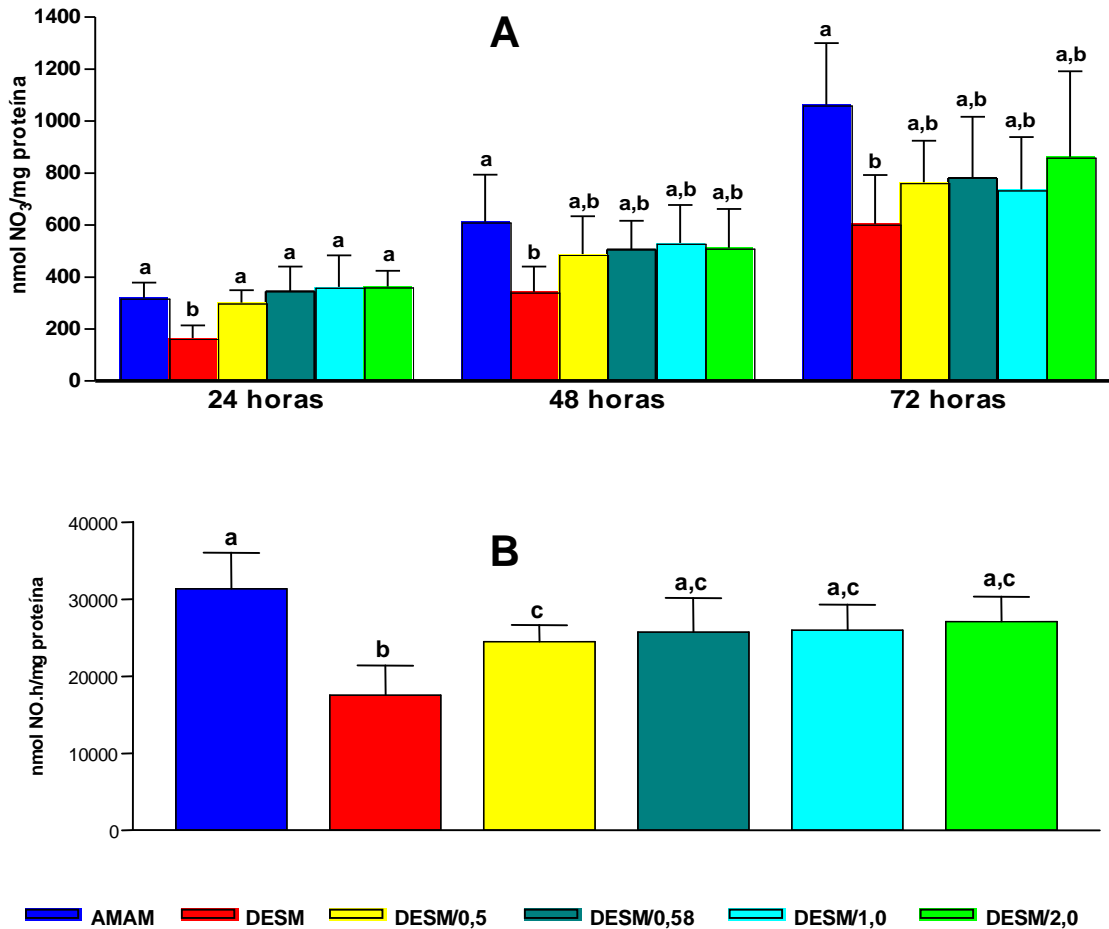


Figura 25. (A) Cinética e (B) área sob a curva relativas à síntese de óxido nítrico (NO) a partir de macrófagos peritoneais de camundongos amamentados até o 21º dia de vida (AMAM) ou desmamados no 14º dia de vida e alimentados com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida (DESM).

Resultados expressos em média ± desvio-padrão com n = 8/grupo. Valores em cada intervalo de tempo com diferentes letras são significativamente diferentes (P<0,05). O meio de cultura adicionado à cultura de macrófagos peritoneais dos animais do grupo DESM foi suplementado com 0,5 mM (DESM/0,5), 0,58 mM (DESM/0,58), 1,0 mM (DESM/1,0) e 2,0 mM (DESM/2,0) de glutamina. As células foram cultivadas entre 24 e 72 horas.

7.2.1.6 Síntese de citocinas *in vitro* por macrófagos peritoneais

7.2.1.6.1 Síntese de TNF- α *in vitro* por macrófagos peritoneais

Os grupos DESM, DESM/0,5, DESM/0,58, DESM/1,0 e DESM/2,0 apresentaram concentração de TNF- α significativamente menor em todos os

tempos de cultura celular em relação ao grupo AMAM (figura 26A). Ao mesmo tempo, verificou-se que os grupos DESM, DESM/0,5, DESM/0,58, DESM/1,0 e DESM/2,0 apresentaram redução da área sob a curva correspondente à cinética de síntese de TNF- α *in vitro* em comparação ao grupo AMAM (figura 26B).

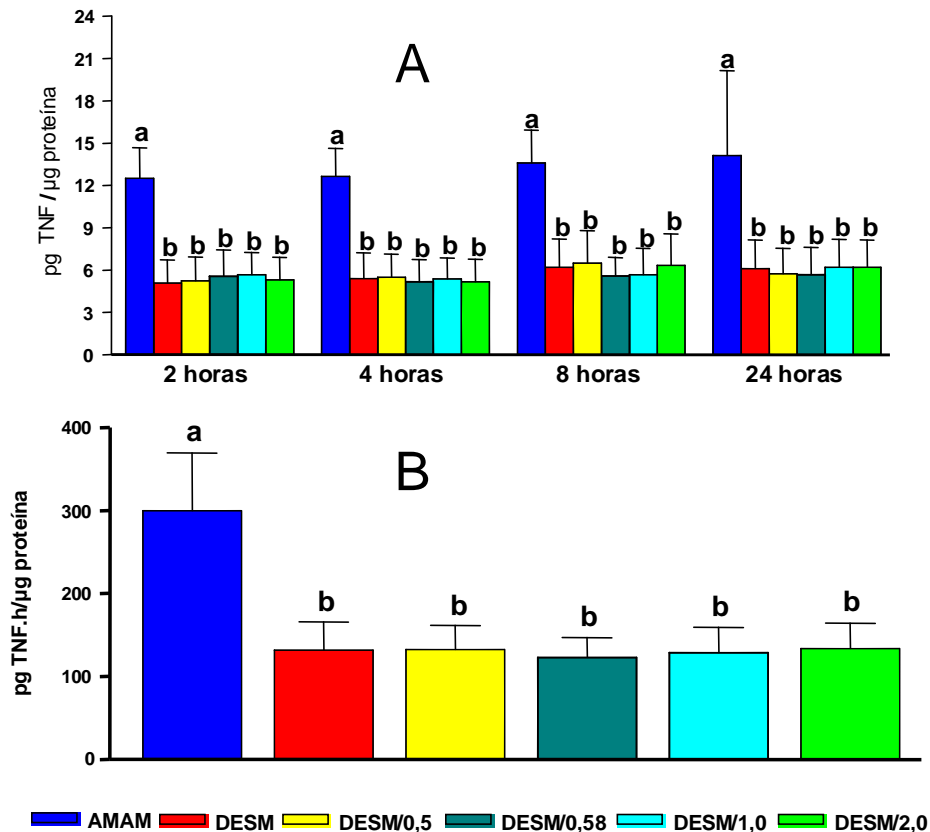


Figura 26. (A) Cinética e (B) área sob a curva relativas à síntese de TNF- α *in vitro* a partir de macrófagos peritoneais de camundongos amamentados até o 21^o dia de vida (AMAM) ou desmamados no 14^o dia de vida e alimentados com ração isenta de glutamina até o 21^o dia de vida (DESM).

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com n = 8/grupo. Valores em cada intervalo de tempo com diferentes letras são significativamente diferentes (P<0,05). O meio de cultura adicionado à cultura de macrófagos peritoneais dos animais do grupo DESM foi suplementado com 0,5 mM (DESM/0,5), 0,58 mM (DESM/0,58), 1,0 mM (DESM/1,0) e 2,0 mM (DESM/2,0) de glutamina. As células foram cultivadas entre 2 e 24 horas.

7.2.1.6.2. Síntese de IL-1 β *in vitro* por macrófagos peritoneais

O grupo DESM apresentou diminuição significativa da síntese de IL-1 β *in vitro* a partir de macrófagos peritoneais após 4 e 24 horas de cultivo (figura 27A) e menor área sob a curva correspondente à cinética de síntese de IL-1 β *in vitro*

em comparação ao grupo AMAM (figura 27B). Não se observou diferença significativa entre os grupos DESM, DESM/0,5, DESM/0,58, DESM/1,0 e DESM/2,0, em todos os tempos avaliados, em relação à síntese de IL-1 β (figura 27A), como também em relação à área sob a curva correspondente à cinética de síntese de IL-1 β *in vitro* (figura 27B). Os grupos suplementados com glutamina (DESM/0,5, DESM/0,58, DESM/1,0 e DESM/2,0) não diferiram significativamente em comparação ao grupo AMAM tanto em relação à síntese de IL-1 β quanto em relação à área sob a curva correspondente à cinética de síntese de IL-1 β *in vitro* (figuras 27A e 27B).

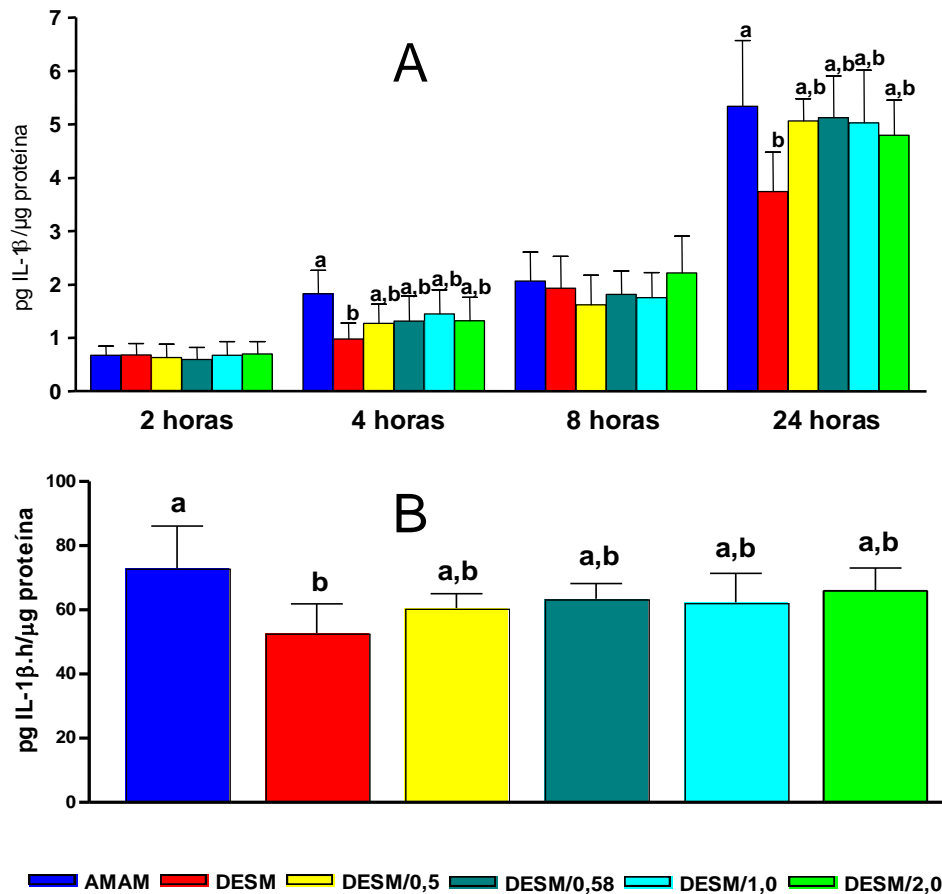


Figura 27. (A) Cinética e (B) área sob a curva relativas à síntese de IL-1 β *in vitro* a partir de macrófagos peritoneais de camundongos amamentados até o 21^o dia de vida (AMAM) ou desmamados no 14^o dia de vida e alimentados com ração isenta de glutamina até o 21^o dia de vida (DESM).

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com n = 8/grupo. Valores em cada intervalo de tempo com diferentes letras são significativamente diferentes (P < 0,05). O meio de cultura adicionado à cultura de macrófagos peritoneais dos animais do grupo DESM foi suplementado com 0,5 mM (DESM/0,5), 0,58 mM (DESM/0,58), 1,0 mM (DESM/1,0) e 2,0 mM (DESM/2,0) de glutamina. As células foram cultivadas entre 2 e 24 horas.

7.2.1.6.3 Síntese de IL-6 *in vitro* por macrófagos peritoneais

Os grupos DESM, DESM/0,5, DESM/0,58, DESM/1,0 e DESM/2,0 apresentaram concentração de IL-6 significativamente menor nos tempos 2 e 4 horas de cultura celular em relação ao grupo AMAM (figura 28A). O grupo DESM apresentou diminuição significativa da síntese de IL-6 *in vitro* com 24 horas de cultura em relação ao grupo AMAM, enquanto os grupos DESM/0,5, DESM/0,58, DESM/1,0 e DESM/2,0 não diferiram significativamente do grupo AMAM nesse tempo de cultura celular (figura 28A). Além disso, a síntese de IL-6 no tempo 24 horas dos grupos DESM/1,0 e DESM/2,0 foi significativamente maior em comparação àquela do grupo DESM (figura 28A). O grupo DESM apresentou diminuição significativa da área sob a curva correspondente à cinética de síntese de interleucina IL-6 *in vitro* em relação ao grupo AMAM (figura 28B). Os grupos DESM/0,5, DESM/0,58, DESM/1,0 e DESM/2,0 não diferiram em relação ao grupo DESM quanto à área sob a curva correspondente à cinética de síntese de interleucina IL-6 *in vitro* (figura 28B). Além disso, verificou-se que os grupos suplementados com glutamina não diferiram quanto à área sob a curva correspondente à cinética de síntese de interleucina IL-6 em comparação ao grupo AMAM (figura 28B).

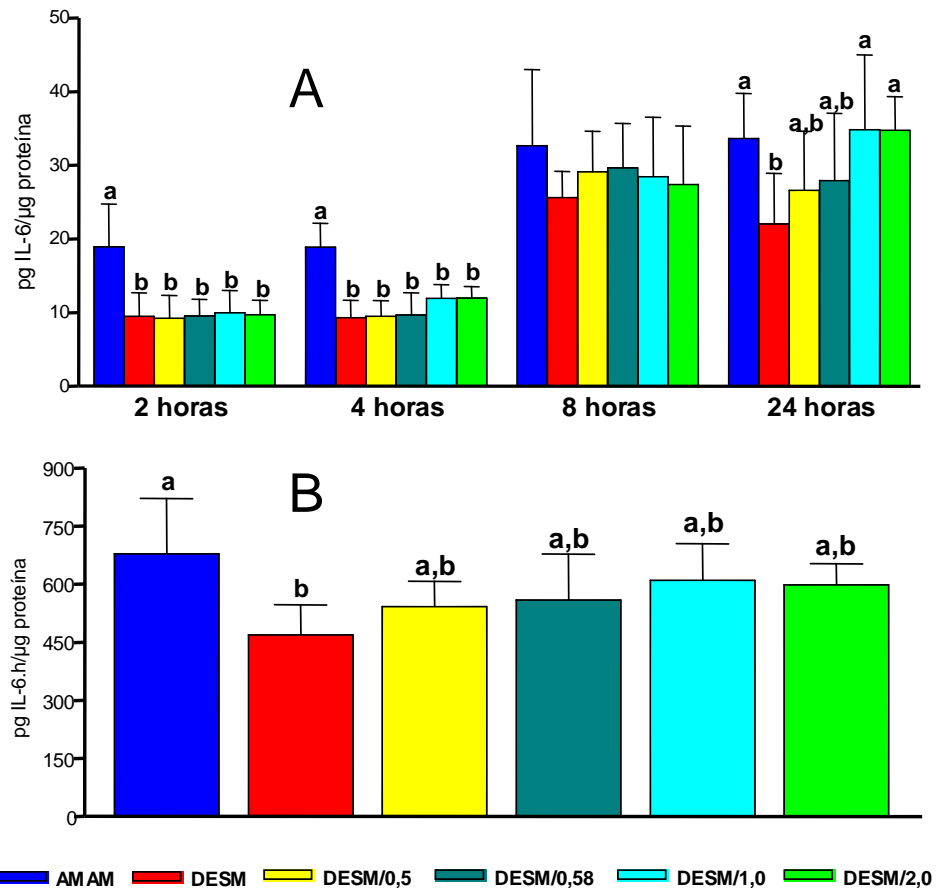


Figura 28. (A) Cinética e (B) área sob a curva relativas à síntese de IL-6 *in vitro* a partir de macrófagos peritoneais de camundongos amamentados até o 21º dia de vida (AMAM) ou desmamados no 14º dia de vida e alimentados com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida (DESM).

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com $n = 8$ /grupo. Valores em cada intervalo de tempo com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$). O meio de cultura adicionado à cultura de macrófagos peritoneais dos animais do grupo DESM foi suplementado com 0,5 mM (DESM/0,5), 0,58 mM (DESM/0,58), 1,0 mM (DESM/1,0) e 2,0 mM (DESM/2,0) de glutamina. As células foram cultivadas entre 2 e 24 horas.

7.2.1.6.4 Síntese de IL-10 *in vitro* por macrófagos peritoneais

A síntese de IL-10 *in vitro* em todos os tempos avaliados e a área sob a curva correspondente à cinética de síntese dessa citocina do grupo DESM foram significativamente maiores em relação ao grupo AMAM (figuras 29A e 29B). Os grupos DESM/0,5, DESM/0,58, DESM/1,0 e DESM/2,0 apresentaram cinética e área sob a curva correspondente à síntese de IL-10 significativamente menor em todos os tempos de cultura celular em relação ao grupo DESM (figura 29A).

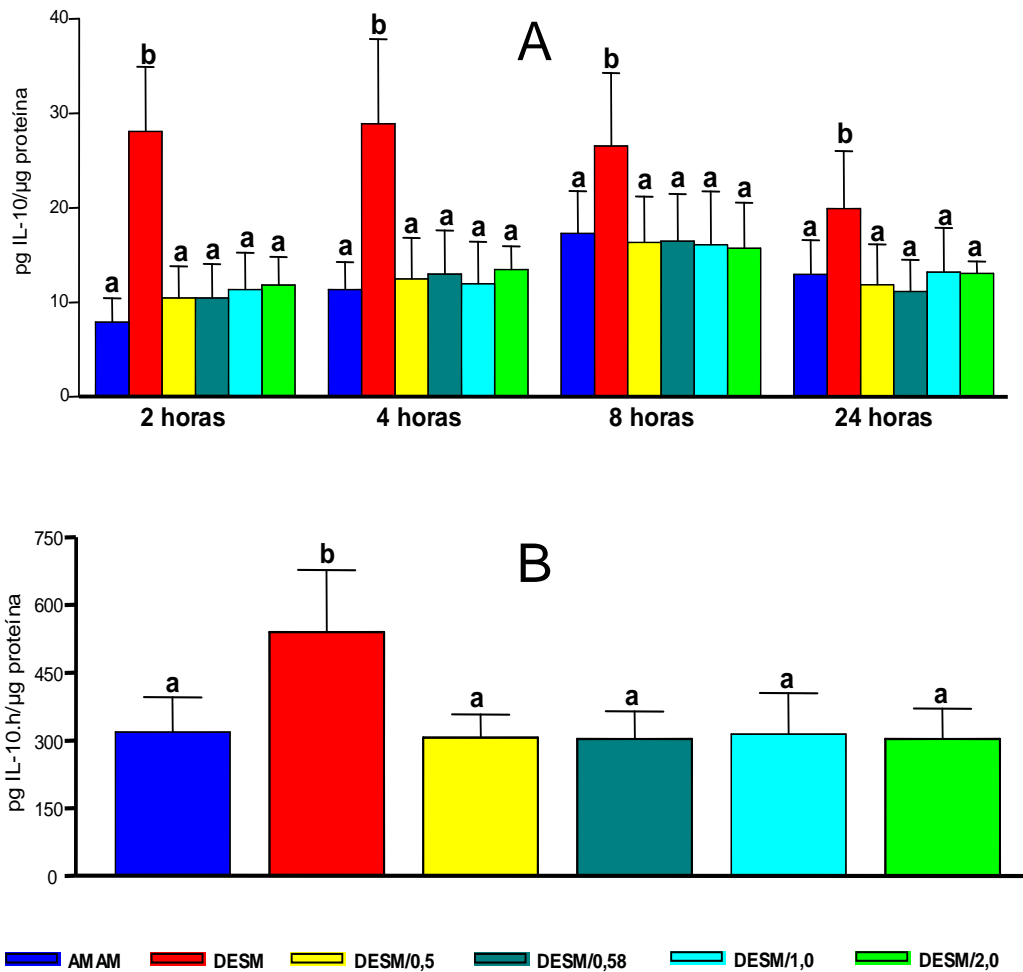


Figura 29. (A) Cinética e (B) área sob a curva relativas à síntese de (IL)-10 *in vitro* a partir de macrófagos peritoneais de camundongos amamentados até o 21º dia de vida (AMAM) ou desmamados no 14º dia de vida e alimentados com ração isenta de glutamina até o 21º dia de vida (DESM).

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com $n = 8$ /grupo. Valores em cada intervalo de tempo com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$). O meio de cultura adicionado à cultura de macrófagos peritoneais dos animais do grupo DESM foi suplementado com 0,5 mM (DESM/0,5), 0,58 mM (DESM/0,58), 1,0 mM (DESM/1,0) e 2,0 mM (DESM/2,0) de glutamina. As células foram cultivadas entre 2 e 24 horas.

7.3 Resultados referentes à Etapa 3

7.3.1 Peso corporal e consumo de ração

O peso inicial não foi significativamente diferente entre os grupos da etapa 3. Contudo, o peso final dos grupos inoculados com BCG foi significativamente menor em relação aos seus respectivos grupos não inoculados com BCG (tabela 14). Não se observou diferença significativa entre os grupos da etapa 3 em relação ao consumo de ração durante o período experimental (tabela 14).

Tabela 14. Peso corporal e consumo de ração dos grupos da etapa 3.

	-GLN/-BCG	-GLN/+BCG	+GLN/-BCG	+GLN/+BCG
Peso inicial (g)	8,4 ± 0,8	8,1 ± 0,6	8,2 ± 0,8	8,2 ± 0,5
Peso final (g)	19,1 ± 1,9 ^a	16,0 ± 2,5 ^b	19,9 ± 2,3 ^a	16,9 ± 2,4 ^b
Consumo de ração (g/dia)	2,4 ± 0,7	3,0 ± 0,9	2,2 ± 0,8	2,9 ± 1,1

Resultados expressos em média ± desvio-padrão com n = 10/grupo.

Valores na mesma linha seguidos pela mesma letra não diferem significativamente (P<0,05).

-GLN/-BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida.

-GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

+GLN/-BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida.

+GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

7.3.2 Parâmetros plasmáticos e séricos

A concentração plasmática de glutamina e a sérica de albumina, proteína total, glicose e corticosterona não diferiu significativamente entre os grupos da etapa 3 (tabela 15). Todavia, os grupos -GLN/+BCG e +GLN/+BCG apresentaram diminuição significativa da concentração sérica de ferro, de 33% e 28%, em relação aos grupos -GLN/-BCG e +GLN/-BCG, respectivamente (tabela 15). A concentração sérica de IGF-1 foi significativamente maior no grupo +GLN/+BCG em relação ao grupo -GLN/+BCG (tabela 15).

Tabela 15. Parâmetros plasmáticos e séricos dos grupos da etapa 3

	-GLN/-BCG	-GLN/+BCG	+GLN/-BCG	+GLN/+BCG
Glutamina plasmática (µmol/L)	524 ± 90	520 ± 77	567 ± 93	578 ± 56
Albumina sérica (g/dL)	3,26 ± 0,25	3,23 ± 0,28	3,48 ± 0,37	3,39 ± 0,22
Proteína total sérica (g/dL)	4,11 ± 0,32	4,27 ± 0,49	4,34 ± 0,33	4,19 ± 0,30
Glicose sérica (mg/dL)	109 ± 17	95 ± 14	87 ± 17	97 ± 18
Ferro sérico (µg/dL)	231 ± 63 ^a	155,3 ± 53 ^b	210 ± 37 ^a	152 ± 43 ^b
Corticosterona sérica (ng/mL)	93 ± 42	95 ± 24	112 ± 37	87 ± 33
IGF-1 (ng/mL)	278 ± 94 ^{a,b}	174 ± 33 ^a	275 ± 81 ^{a,b}	334 ± 87 ^b

Resultados expressos em média ± desvio-padrão com n = 8/grupo.

Valores na mesma linha seguidos pela mesma letra não diferem significativamente (P<0,05).

-GLN/-BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida.

-GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

+GLN/-BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida.

+GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

7.3.3 Parâmetros teciduais

7.3.3.1 Peso dos tecidos dos grupos da Etapa 3

Os grupos -GLN/+BCG e +GLN/+BCG apresentaram maior peso do baço ao final do experimento em relação aos grupos -GLN/-BCG e +GLN/-BCG, respectivamente (figura 30). Além disso, o peso do músculo gastrocnêmio foi significativamente menor no grupo +GLN/+BCG em comparação ao grupo +GLN/-BCG. Os grupos da etapa 3 não diferiram significativamente em relação ao peso do fígado e rim (figura 30).

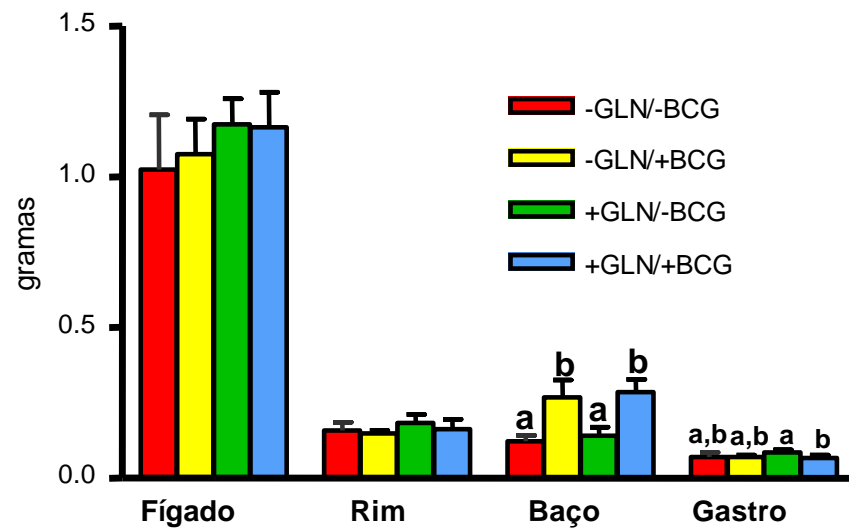


Figura 30. Pesos de tecidos dos grupos da etapa 3.

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com $n = 8$ /grupo. Valores com diferentes letras em cada tecido são significativamente diferentes ($P < 0,05$). (-GLN/-BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida; -GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida; +GLN/-BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida; +GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida).

7.3.3.2 Parâmetros teciduais relativos ao metabolismo da glutamina

A concentração muscular e hepática de glutamina e a atividade máxima da enzima glutamina sintetase muscular não foram significativamente diferentes entre os grupos da etapa 3 (tabela 16). Contudo, os grupos inoculados com BCG (-GLN/+BCG e +GLN/+BCG) apresentaram menor atividade máxima da enzima hepática glutamina sintetase em relação aos grupos que não foram inoculados com BCG (tabela 16).

Tabela 16. Parâmetros teciduais relativos ao metabolismo da glutamina referentes aos grupos da etapa 3.

	-GLN/-BCG	-GLN/+BCG	+GLN/-BCG	+GLN/+BCG
Glutamina muscular ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco)	3,91 \pm 0,84	3,94 \pm 0,50	4,16 \pm 0,56	3,76 \pm 0,55
Glutamina hepática ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco)	5,20 \pm 0,79	4,90 \pm 1,15	5,26 \pm 1,14	5,41 \pm 0,65
Atividade máxima da enzima glutamina sintetase muscular (nmol/h/mg proteína)	1.758 \pm 251	1.786 \pm 588	1.655 \pm 296	1.922 \pm 220
Atividade máxima da enzima glutamina sintetase muscular (nmol/h/mg tecido fresco)	92,1 \pm 11,9	102,2 \pm 12,4	89,2 \pm 8,7	94,5 \pm 12,4
Atividade máxima da enzima glutamina sintetase hepática (nmol/h/mg proteína)	1.418 \pm 417 ^a	455 \pm 46 ^b	1.272 \pm 409 ^a	442 \pm 207 ^b
Atividade máxima da enzima glutamina sintetase hepática (nmol/h/mg tecido fresco)	24,6 \pm 6,7 ^a	8,5 \pm 0,9 ^b	24,1 \pm 7,1 ^a	8,6 \pm 2,3 ^b

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com n = 8/grupo.

Valores na mesma linha seguidos pela mesma letra não diferem significativamente ($P < 0,05$).

-GLN/-BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida.

-GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

+GLN/-BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida.

+GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

7.3.3.3 Concentração tecidual de proteína, RNA e DNA

Em relação à concentração tecidual de proteína, verificou-se que o grupo +GLN/+BCG apresentou concentração muscular de proteína significativamente maior em relação ao grupo -GLN/+BCG (tabela 17). Os grupos inoculados com BCG apresentaram concentração hepática de DNA significativamente maior em relação aos seus respectivos grupos que não foram inoculados com BCG (tabela 17).

Tabela 17. Concentrações teciduais de proteína, RNA e DNA referentes aos grupos da etapa 3.

	-GLN/-BCG	-GLN/+BCG	+GLN/-BCG	+GLN/+BCG
Proteína (mg/100 mg)				
Fígado	12,9 ± 0,9	13,4 ± 0,9	13,5 ± 0,5	13,5 ± 1,1
Gastro	14,1 ± 1,0 ^{a,b}	14,0 ± 1,1 ^a	14,3 ± 1,2 ^{a,b}	15,9 ± 1,4 ^b
Baço	12,8 ± 0,8	13,6 ± 4,0	14,5 ± 1,8	13,4 ± 0,9
RNA (µg/100 mg de tecido)				
Fígado	1.023 ± 69 ^{a,b}	913 ± 110 ^a	1.076 ± 62 ^b	977 ± 115 ^{a,b}
Gastro	278 ± 28	242 ± 47	254 ± 14	254 ± 22
Baço	991 ± 76	940 ± 83	1.080 ± 145	984 ± 81
Proteína:RNA				
Fígado	12,7 ± 1,6	14,7 ± 1,2	12,6 ± 1,2	14,0 ± 1,6
Gastro	51,2 ± 4,8	59,8 ± 12,6	56,6 ± 5,2	63,0 ± 6,2
Baço	13,0 ± 1,4	14,6 ± 4,2	13,6 ± 2,7	13,7 ± 1,4
DNA (µg/mg de tecido)				
Fígado	2,0 ± 0,2 ^a	2,7 ± 0,3 ^b	2,1 ± 0,3 ^a	2,9 ± 0,7 ^b
Gastro	0,8 ± 0,1	2,0 ± 1,0	0,8 ± 0,1	1,8 ± 1,3
Baço	17,4 ± 1,7	15,1 ± 3,1	17,6 ± 5,0	14,2 ± 1,7

Resultados expressos em média ± desvio-padrão com n = 8/grupo.

Valores na mesma linha seguidos pela mesma letra não diferem significativamente (P<0,05).

-GLN/-BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida.

-GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

+GLN/-BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida.

+GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

(Gastro= músculo gastrocnêmio)

7.3.3.4 Análise da composição química da carcaça

O grupo +GLN/+BCG apresentou massa da carcaça e massa magra significativamente menores em relação ao grupo +GLN/-BCG (tabela 18). A quantidade de lipídios presente na carcaça do grupo +GLN/-BCG foi significativamente superior aos grupos -GLN/-BCG e +GLN/+BCG (tabela 18), enquanto o percentual de lipídios do grupo +GLN/-BCG foi significativamente maior em comparação ao grupo -GLN/-BCG (tabela 19). O percentual de

massa magra observado na carcaça do grupo +GLN/–BCG foi significativamente inferior ao grupo –GLN/–BCG (tabela 19).

Tabela 18. Massa e composição química da carcaça referentes aos grupos da etapa 3.

	–GLN/–BCG	–GLN/+BCG	+GLN/–BCG	+GLN/+BCG
	gramas			
Massa da carcaça	18,4 ± 2,1 ^{a,b}	16,2 ± 2,4 ^a	19,4 ± 2,0 ^b	16,1 ± 2,2 ^a
Massa magra	17,0 ± 2,2 ^{a,b}	14,1 ± 2,1 ^{a,b}	16,9 ± 1,8 ^a	14,3 ± 1,6 ^b
Umidade	11,6 ± 2,1	10,6 ± 1,7	12,5 ± 1,5	10,5 ± 1,3
Lipídios	1,3 ± 0,3 ^a	1,1 ± 0,4 ^a	1,8 ± 0,3 ^b	1,2 ± 0,2 ^a
Proteína	3,3 ± 0,4	2,9 ± 0,7	3,3 ± 0,4	2,8 ± 0,5
Cinzas	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,3	0,7 ± 0,3

Resultados expressos em média ± desvio-padrão com n = 8/grupo.

Valores com diferentes letras na mesma linha são significativamente diferentes (P<0,05).

–GLN/–BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida.

–GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

+GLN/–BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida.

+GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

Tabela 19. Percentual relativo à composição química da carcaça corporal referente aos grupos da etapa 3.

	–GLN/–BCG	–GLN/+BCG	+GLN/–BCG	+GLN/+BCG
	%			
Massa magra	93,1 ± 1,4 ^a	93,2 ± 2,0 ^a	91,0 ± 1,2 ^b	92,3 ± 1,0 ^{a,b}
Umidade	62,7 ± 5,2	65,7 ± 4,7	64,2 ± 3,8	65,6 ± 5,0
Lipídios	6,9 ± 1,4 ^a	6,8 ± 2,0 ^a	9,0 ± 1,2 ^b	7,7 ± 1,0 ^{a,b}
Proteína	18,3 ± 2,3	18,1 ± 2,8	16,9 ± 1,5	17,2 ± 1,7
Cinzas	4,4 ± 1,0	4,1 ± 0,7	4,0 ± 1,2	4,0 ± 1,0

Resultados expressos em média ± desvio-padrão com n = 8/grupo.

Valores com diferentes letras na mesma linha são significativamente diferentes (P<0,05).

–GLN/–BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida.

–GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

+GLN/–BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida.

+GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

7.3.4 Avaliação hematológica

7.3.4.1 Eritrograma e contagem de reticulócitos

Os grupos da etapa 3 não apresentaram diferença significativa em relação à contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina e volume hematócrito. A contagem de reticulócitos do grupo –GLN/+BCG foi significativamente maior em relação àquela do grupo –GLN/–BCG (tabela 20).

Tabela 20. Eritrograma e contagem de reticulócitos dos grupos da etapa 3.

	–GLN/–BCG	–GLN/+BCG	+GLN/–BCG	+GLN/+BCG
Eritrócitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	5,91 \pm 0,80	5,88 \pm 0,73	6,22 \pm 0,53	6,11 \pm 0,62
Hemoglobina (g/dL)	10,6 \pm 1,1	11,0 \pm 1,3	10,9 \pm 1,2	10,8 \pm 1,5
Volume hematócrito (%)	31,8 \pm 2,5	31,9 \pm 3,8	33,1 \pm 2,8	33,7 \pm 3,5
Reticulócitos (%)	11,3 \pm 1,5 ^a	16,6 \pm 5,7 ^b	10,8 \pm 3,7 ^a	14,6 \pm 2,4 ^{a,b}

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com n=10/grupo.

Não houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

–GLN/–BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida.

–GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

+GLN/–BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida.

+GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

7.3.4.2 Leucograma

A contagem de leucócitos e de linfócitos no sangue periférico do grupo +GLN/–BCG foi significativamente superior em comparação àquela observada no grupo –GLN/–BCG (56% e 55%, respectivamente) (tabela 21). Similarmente, verificou-se que a contagem de leucócitos e de linfócitos no sangue periférico do grupo +GLN/+BCG foi significativamente superior em comparação àquela observada no grupo –GLN/+BCG (33% e 36%,

respectivamente) (tabela 21). Os grupos –GLN/+BCG e +GLN/+BCG apresentaram percentual de linfócitos no sangue periférico significativamente inferior àquele observado nos grupos –GLN/–BCG e +GLN/–BCG, respectivamente (tabela 21). Por outro lado, os grupos –GLN/+BCG e +GLN/+BCG apresentaram percentual de neutrófilos no sangue periférico significativamente superior àquele observado nos grupos –GLN/–BCG e +GLN/–BCG, respectivamente (tabela 21).

Tabela 21. Leucograma dos grupos da etapa 3.

	–GLN/–BCG	–GLN/+BCG	+GLN/–BCG	+GLN/+BCG
Leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	1.655 \pm 477 ^a	2.112 \pm 703 ^{a,c}	2.582 \pm 841 ^{b,c}	2.816 \pm 766 ^b
Linfócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	1.488 \pm 444 ^a	1.671 \pm 566 ^a	2.310 \pm 716 ^b	2.270 \pm 575 ^b
Neutrófilos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	160 \pm 88 ^a	445 \pm 211 ^{b,c}	267 \pm 216 ^{a,c}	546 \pm 315 ^b
Linfócitos (%)	90 \pm 5 ^a	79 \pm 7 ^b	91 \pm 6 ^a	81 \pm 7 ^b
Neutrófilos (%)	10 \pm 5 ^a	21 \pm 7 ^b	9 \pm 6 ^a	19 \pm 7 ^b

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com n = 10/grupo.

Valores na mesma linha seguidos pela mesma letra não diferem significativamente (P < 0.05).

–GLN/–BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida.

–GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

+GLN/–BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida.

+GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

7.3.4.3 Mielograma

O grupo +GLN/+BCG apresentou contagem de células nucleadas totais e de células da série granulocítica de forma jovem na medula óssea significativamente maior em comparação ao grupo +GLN/–BCG (tabela 22). Os grupos inoculados com BCG apresentaram maior contagem de células da série granulocítica em forma em anel e de segmentados em relação aos seus respectivos grupos que não foram inoculados com BCG. O grupo –GLN/+BCG

apresentou contagem de eosinófilos significativamente maior em relação ao grupo –GLN/–BCG (tabela 22). O grupo +GLN/–BCG apresentou contagem de macrófagos na medula óssea significativamente maior em comparação aos grupos –GLN/–BCG e +GLN/+BCG. Em relação à contagem de linfócitos/plasmócitos, verificou-se que o grupo +GLN/–BCG apresentou contagem significativamente maior em relação aos grupos –GLN/–BCG e +GLN/+BCG, ao mesmo tempo em que essa contagem no grupo –GLN/+BCG foi significativamente menor em relação ao grupo –GLN/–BCG (tabela 22). Os grupos inoculados com BCG apresentaram contagem de eritroblastos policromáticos e ortocromáticos significativamente menor em relação aos seus respectivos grupos que não foram inoculados com BCG. Tanto a relação grânulo-eritrocitária quanto a grânulo-linfóide foram significativamente superiores nos grupos inoculados com BCG em relação aos seus respectivos grupos que não foram inoculados com BCG. A relação linfo-eritrocitária no grupo +GLN/–BCG foi significativamente maior em comparação aos grupos –GLN/–BCG e +GLN/+BCG (tabela 22).

Tabela 22. Mielograma dos grupos da etapa 3.

	-GLN/-BCG	-GLN/+BCG	+GLN/-BCG	+GLN/+BCG
Células nucleadas totais (x 10 ⁶ cel/mL)	12,4 ± 2,6 ^a	15,6 ± 4,8 ^{a,b}	14,9 ± 3,9 ^a	19,7 ± 6,5 ^b
Blastos (x 10 ⁵ cel/mL)	23,5 ± 13,0	36,3 ± 21,7	18,7 ± 10,4	37,8 ± 29,8
Forma jovem (x 10 ⁵ cel/mL)	6,4 ± 4,1 ^{a,b}	8,8 ± 5,2 ^{a,c}	3,5 ± 2,3 ^b	11,8 ± 6,2 ^c
Forma em anel (x 10 ⁵ cel/mL)	22,1 ± 6,5 ^a	55,2 ± 24,9 ^b	30,5 ± 11,5 ^a	62,6 ± 28,1 ^b
Segmentados (x 10 ⁵ cel/mL)	23,6 ± 12,4 ^a	51,6 ± 19,3 ^b	24,4 ± 10,1 ^a	67,0 ± 19,4 ^b
Eosinófilos (x 10 ⁵ cel/mL)	11,0 ± 13,5 ^a	39,5 ± 34,1 ^b	29,4 ± 25,1 ^{a,b}	43,2 ± 33,7 ^b
Macrófagos (x 10 ⁵ cel/mL)	0,5 ± 0,4 ^a	1,2 ± 0,6 ^a	3,4 ± 2,3 ^b	1,4 ± 1,6 ^a
Linfócitos/plasmócitos (x 10 ⁶ cel/mL)	2,3 ± 0,7 ^a	0,7 ± 0,5 ^b	3,7 ± 1,4 ^c	1,6 ± 1,8 ^{a,b}
Eritroblastos jovens (x 10 ⁶ cel/mL)	0,8 ± 0,4	0,7 ± 0,4	1,0 ± 0,5	0,8 ± 0,4
EPO/EOC * (x 10 ⁶ cel/mL)	3,5 ± 0,8 ^a	1,8 ± 0,8 ^b	3,6 ± 1,7 ^a	2,2 ± 1,1 ^b
Relação grânulo-eritrocítica	1,3 ± 0,5 ^a	5,5 ± 2,5 ^b	1,5 ± 0,6 ^a	5,2 ± 1,5 ^b
Relação linfo-eritrocítica	0,5 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,2 ^a	0,9 ± 0,4 ^b	0,5 ± 0,3 ^a
Relação grânulo-linfóide	2,7 ± 1,4 ^a	23,2 ± 16,8 ^b	1,9 ± 0,9 ^a	16,9 ± 19,1 ^b

Resultados expressos em média ± desvio-padrão com n = 10/grupo.

Valores na mesma linha seguidos pela mesma letra não diferem significativamente (P<0,05).

*EPO/EOC= eritroblastos policromáticos e ortocromáticos.

-GLN/-BCG= grupo desmamado no 14^o dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 28^o dia de vida.

-GLN/+BCG= grupo desmamado no 14^o dia de vida, alimentado com ração isenta de glutamina até o 28^o dia de vida e inoculado com BCG no 21^o dia de vida.

+GLN/-BCG= grupo desmamado no 14^o dia de vida e alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28^o dia de vida.

+GLN/+BCG= grupo desmamado no 14^o dia de vida, alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28^o dia de vida e inoculado com BCG no 21^o dia de vida.

7.3.4.4 Esplenograma

A contagem de células nucleadas totais e de granulócitos com forma em anel e segmentados presentes no baço foi significativamente maior nos grupos inoculados com BCG em comparação aos seus respectivos grupos que não foram inoculados com BCG, ao mesmo tempo em que essas contagens foram significativamente maiores no grupo +GLN/+BCG em comparação ao grupo –GLN/+BCG (tabela 23). A contagem de blastos e de células da série granulocítica em forma jovem foi significativamente maior no grupo +GLN/+BCG em relação ao grupo +GLN/–BCG (tabela 23).

A contagem de linfócitos do grupo +GLN/–BCG foi significativamente maior em comparação àquela do grupo –GLN/–BCG (tabela 23). No que concerne às células da série eritrocitária, verificou-se que a contagem de eritroblastos jovens e de eritroblastos policromáticos e ortocromáticos (EPO/EOC) foi significativamente maior nos grupos inoculados com BCG em relação aos seus respectivos grupos não inoculados com BCG (tabela 23). A relação grânulo-eritrocitária e grânulo-linfóide foi maior no grupo +GLN/+BCG em relação ao grupo +GLN/–BCG, enquanto a relação linfo-eritrocitária foi significativamente inferior nos grupos inoculados com BCG em relação aos seus respectivos grupos que não foram inoculados com BCG (tabela 23).

Tabela 23. Esplenograma dos grupos da etapa 3.

	-GLN/-BCG	-GLN/+BCG	+GLN/-BCG	+GLN/+BCG
Células nucleadas totais (x 10 ⁷ cel/mL)	9,8 ± 2,5 ^a	20,1 ± 5,4 ^b	15,4 ± 4,1 ^{a,b}	26,3 ± 6,1 ^c
Blastos (x 10 ⁵ cel/mL)	1,9 ± 1,9 ^a	5,8 ± 4,2 ^{a,b}	4,1 ± 3,2 ^a	10,5 ± 7,2 ^b
Forma jovem (x 10 ⁵ cel/mL)	1,5 ± 1,8 ^a	25,6 ± 18,3 ^{a,b}	8,5 ± 9,3 ^a	53,1 ± 46,5 ^b
Forma em anel (x 10 ⁵ cel/mL)	18 ± 11 ^a	172 ± 53 ^b	47 ± 21 ^a	278 ± 96 ^c
Segmentados (x 10 ⁵ cel/mL)	47 ± 22 ^a	205 ± 99 ^b	70 ± 19 ^a	342 ± 181 ^c
Eosinófilos (x 10 ⁵ cel/mL)	2,2 ± 2,8 ^a	5,9 ± 4,1 ^{a,b}	7,2 ± 6,7 ^{a,b}	10,7 ± 7,9 ^b
Monócitos/Macrófagos (x 10 ⁵ cel/mL)	1,3 ± 1,3	1,6 ± 0,9	2,7 ± 2,1	0,9 ± 0,8
Linfócitos (x 10 ⁷ cel/mL)	5,1 ± 1,0 ^a	5,7 ± 2,2 ^{a,b}	8,2 ± 2,4 ^b	7,3 ± 3,1 ^{a,b}
Plasmócitos (x 10 ⁵ cel/mL)	5,7 ± 5,5	9,6 ± 7,1	4,1 ± 4,8	8,6 ± 9,4
Eritroblastos jovens (x 10 ⁵ cel/mL)	8,0 ± 5,1 ^a	31,9 ± 12,7 ^{b,c}	23,5 ± 9,8 ^{a,c}	41,7 ± 22,0 ^b
EPO/EOC * (x 10 ⁷ cel/mL)	3,8 ± 1,9 ^a	9,7 ± 3,2 ^b	5,5 ± 2,2 ^a	11,2 ± 4,4 ^b
Relação grânulo-eritrocítica	0,2 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,2 ^{a,b}	0,3 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,3 ^b
Relação linfo-eritrocítica	1,6 ± 0,6 ^a	0,6 ± 0,2 ^b	1,6 ± 0,5 ^a	0,7 ± 0,3 ^b
Relação grânulo-linfóide	0,1 ± 0,1 ^a	0,8 ± 0,3 ^{a,b}	0,2 ± 0,1 ^a	1,4 ± 1,7 ^b

Resultados expressos em média ± desvio-padrão com n=10/grupo.

Valores na mesma linha seguidos pela mesma letra não diferem significativamente (P<0,05).

* EPO/EOC= eritroblatos policromáticos e ortocromáticos.

-GLN/-BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida.

-GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

+GLN/-BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida.

+GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

7.3.5 Parâmetros de avaliação de aspectos funcionais de macrófagos peritoneais

7.3.5.1 Contagem de células peritoneais

Os grupos inoculados com BCG apresentaram contagem de células peritoneais significativamente maior em relação aos seus respectivos grupos que não foram inoculados com BCG (figura 31). Ao mesmo tempo verificou-se que a contagem de células peritoneais foi significativamente maior no grupo +GLN/+BCG em comparação ao grupo -GLN/+BCG (figura 31). Em relação à distribuição percentual de células peritoneais, não se observou diferença significativa entre os grupos, sendo a contagem de macrófagos peritoneais superior a 95% em todos os grupos da etapa 3.

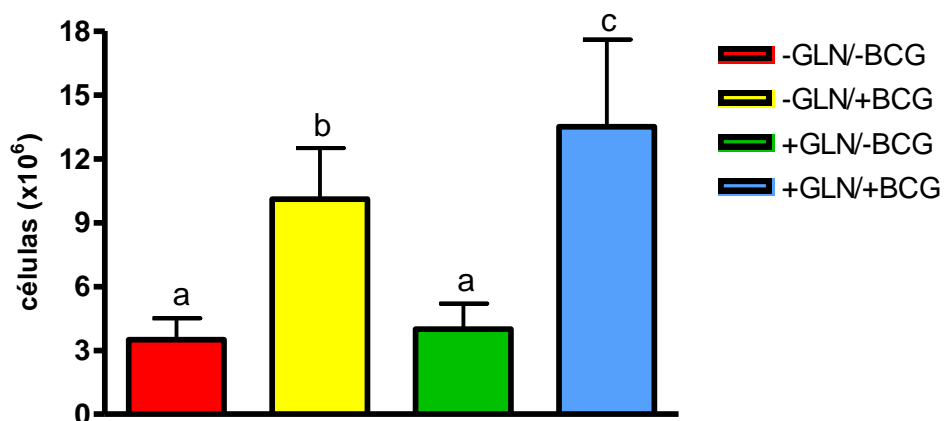


Figura 31. Contagem de células presentes no lavado peritoneal de camundongos dos grupos da etapa 3.

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com $n = 8$ /grupo.

Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente ($P < 0,05$).

-GLN/-BCG= grupo desmamado no 14^o dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 28^o dia de vida.

-GLN/+BCG= grupo desmamado no 14^o dia de vida, alimentado com ração isenta de glutamina até o 28^o dia de vida e inoculado com BCG no 21^o dia de vida.

+GLN/-BCG= grupo desmamado no 14^o dia de vida e alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28^o dia de vida.

+GLN/+BCG= grupo desmamado no 14^o dia de vida, alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28^o dia de vida e inoculado com BCG no 21^o dia de vida.

7.3.5.2 Teste de adesão de macrófagos peritoniais

O grupo +GLN/–BCG apresentou maior capacidade de adesão de macrófagos peritoniais aos 90 minutos de ensaio em relação ao grupo –GLN/–BCG (tabela 24). A capacidade de adesão de macrófagos peritoniais do grupo +GLN/+BCG com 120 minutos de ensaio foi significativamente superior àquela observada no grupo –GLN/+BCG (tabela 24).

Tabela 24. Capacidade de adesão de macrófagos peritoniais dos grupos da etapa 3.

	–GLN/–BCG	–GLN/+BCG	+GLN/–BCG	+GLN/+BCG
	células/mm ²			
30 minutos	109,0 ± 22,7 ^{a,b}	95,4 ± 19,1 ^a	143,5 ± 27,8 ^b	120,3 ± 28,4 ^{a,b}
60 minutos	114,7 ± 16,3 ^{a,b}	98,9 ± 9,2 ^a	154,6 ± 37,3 ^b	129,1 ± 22,1 ^{a,b}
90 minutos	106,9 ± 16,8 ^a	101,8 ± 23,2 ^a	155,8 ± 37,2 ^b	135,5 ± 21,7 ^{a,b}
120 minutos	106,0 ± 14,4 ^{a,b}	92,2 ± 10,7 ^a	142,7 ± 41,3 ^b	133,9 ± 21,7 ^b
24 horas	97,5 ± 10,6	104,8 ± 37,3	131,3 ± 34,9	119,5 ± 29,0

Resultados expressos em média ± desvio-padrão com n = 8/grupo.

Valores na mesma linha seguidos pela mesma letra não diferem significativamente (P<0,05).

–GLN/–BCG= grupo desmamado no 14^o dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 28^o dia de vida.

–GLN/+BCG= grupo desmamado no 14^o dia de vida, alimentado com ração isenta de glutamina até o 28^o dia de vida e inoculado com BCG no 21^o dia de vida.

+GLN/–BCG= grupo desmamado no 14^o dia de vida e alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28^o dia de vida.

+GLN/+BCG= grupo desmamado no 14^o dia de vida, alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28^o dia de vida e inoculado com BCG no 21^o dia de vida.

7.3.5.3 Capacidade de espraiamento de macrófagos peritoniais

O grupo +GLN/+BCG apresentou maior capacidade de espraiamento de macrófagos peritoniais em relação ao grupo –GLN/+BCG aos 30 e 120 minutos de ensaio (tabela 25). O grupo –GLN/+BCG apresentou capacidade de espraiamento de macrófagos peritoniais significativamente superior àquela observada no grupo –GLN/–BCG aos 60, 90 e 120 minutos de ensaio (tabela 25). A capacidade de espraiamento de macrófagos peritoniais do grupo +GLN/+BCG foi significativamente maior em comparação àquela observada no grupo +GLN/–BCG aos 30, 60, 90 e 120 minutos de ensaio (tabela 25).

Tabela 25. Capacidade de espraiamento de macrófagos peritoneais dos grupos da etapa 3.

	-GLN/-BCG	-GLN/+BCG	+GLN/-BCG	+GLN/+BCG
	%			
30 minutos	32,2 ± 5,6 ^a	42,0 ± 4,6 ^a	35,4 ± 8,0 ^a	58,6 ± 7,7 ^b
60 minutos	31,4 ± 7,7 ^a	63,5 ± 6,2 ^b	32,1 ± 5,5 ^a	61,7 ± 9,9 ^b
90 minutos	40,0 ± 7,6 ^a	58,8 ± 6,0 ^b	41,3 ± 8,4 ^a	65,4 ± 7,4 ^b
120 minutos	34,0 ± 4,4 ^a	56,2 ± 6,8 ^b	41,9 ± 5,9 ^a	69,4 ± 9,1 ^c
24 horas	80,4 ± 4,2	81,0 ± 8,6	82,1 ± 6,7	89,2 ± 2,9

Resultados expressos em média ± desvio-padrão com n = 8/grupo.

Valores na mesma linha seguidos pela mesma letra não diferem significativamente (P<0,05).

-GLN/-BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida.

-GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

+GLN/-BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida.

+GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

7.3.5.4 Capacidade de fagocitose e atividade fungicida de macrófagos peritoneais

De acordo com a tabela 26, verifica-se que não houve diferença em relação à capacidade de fagocitose de *Candida albicans* entre os grupos da etapa 3 quanto ao efeito da suplementação com glutamina ou da inoculação de BCG.

A atividade fungicida de macrófagos peritoneais do grupo +GLN/+BCG foi significativamente maior em relação àquela observada no grupo -GLN/+BCG aos 90 e 120 minutos de ensaio (tabela 27).

Tabela 26. Capacidade de fagocitose de macrófagos peritoneais dos grupos da etapa 3.

	-GLN/-BCG	-GLN/+BCG	+GLN/-BCG	+GLN/+BCG
	<i>score</i>			
30 minutos	82 ± 11 ^a	90 ± 14 ^{a,b}	93 ± 16 ^{a,b}	109 ± 19 ^b
60 minutos	127 ± 20	128 ± 11	131 ± 15	145 ± 30
90 minutos	148 ± 15	135 ± 14	162 ± 20	147 ± 21
120 minutos	145 ± 15 ^{a,b}	137 ± 22 ^a	166 ± 16 ^b	156 ± 14 ^{a,b}

Resultados expressos em média ± desvio-padrão com n = 8/grupo.

Valores na mesma linha seguidos pela mesma letra não diferem significativamente (P<0,05).

-GLN/-BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida.

-GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

+GLN/-BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida.

+GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

Tabela 27. Atividade fungicida de macrófagos peritoneais dos grupos da etapa 3.

	-GLN/-BCG	-GLN/+BCG	+GLN/-BCG	+GLN/+BCG
	<i>score</i>			
30 minutos	8,7 ± 2,1 ^a	9,5 ± 2,9 ^{a,b}	11,3 ± 2,7 ^{a,b}	13,2 ± 2,9 ^b
60 minutos	12,0 ± 4,4	12,5 ± 3,9	13,0 ± 4,5	17,5 ± 3,6
90 minutos	13,7 ± 3,3 ^a	13,8 ± 3,4 ^a	18,7 ± 2,9 ^{a,b}	22,2 ± 5,7 ^b
120 minutos	16,5 ± 4,5 ^a	17,5 ± 4,8 ^a	19,6 ± 5,0 ^{a,b}	27,3 ± 7,8 ^b

Resultados expressos em média ± desvio-padrão com n = 8/grupo.

Valores na mesma linha seguidos pela mesma letra não diferem significativamente (P<0,05).

-GLN/-BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida.

-GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

+GLN/-BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida.

+GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

7.3.5.5 Síntese de peróxido de hidrogênio e de óxido nítrico

A síntese de peróxido de hidrogênio (com ou sem PMA), bem como a área sob a curva e a cinética de síntese de óxido nítrico a partir de macrófagos peritoniais dos grupos –GLN/+BCG e +GLN/+BCG foram significativamente maiores em relação àquelas observadas nos grupos –GLN/–BCG e +GLN/–BCG, respectivamente (tabela 28). A síntese de peróxido de hidrogênio com PMA e a síntese de óxido nítrico, após 24 horas de cultura de macrófagos peritoniais do grupo +GLN/+BCG, foram significativamente superiores àquelas observadas no grupo –GLN/+BCG (tabela 28).

Tabela 28. Síntese de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de óxido nítrico (NO) a partir de macrófagos peritoniais dos grupos da etapa 3.

	–GLN/–BCG	–GLN/+BCG	+GLN/–BCG	+GLN/+BCG
nmoles H ₂ O ₂ /2x10 ⁶ células/h				
H ₂ O ₂ sem PMA	3,2 ± 1,1 ^a	35,2 ± 5,2 ^b	4,4 ± 1,3 ^a	38,9 ± 5,1 ^b
H ₂ O ₂ com PMA	4,4 ± 1,2 ^a	53,8 ± 7,5 ^b	7,8 ± 2,6 ^a	62,0 ± 4,2 ^c
nmol NO ₃ /mg proteína				
NO 24 horas	683 ± 201 ^a	2.978 ± 659 ^b	778 ± 194 ^a	4.062 ± 932 ^c
NO 48 horas	575 ± 156 ^a	5.460 ± 1144 ^b	639 ± 158 ^a	6.315 ± 1.803 ^b
NO 72 horas	533 ± 191 ^a	5.679 ± 1956 ^b	791 ± 267 ^a	5.873 ± 2.051 ^b
nmol NO ₃ .h/mg proteína				
ASC NO	28.382 ± 2.942 ^a	234.921 ± 36.739 ^b	34.161 ± 4.770 ^a	270.770 ± 70.177 ^b

Resultados expressos em média ± desvio-padrão com n = 8/grupo.

Valores na mesma linha seguidos pela mesma letra não diferem significativamente (P<0,05).

(PMA= forbol-12-acetato-13-miristato; ASC= área sob a curva; NO₃= nitrato).

–GLN/–BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida.

–GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

+GLN/–BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida.

+GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

7.3.5.6 Síntese de citocinas *in vitro* por macrófagos peritoneais

7.3.5.6.1 Síntese de TNF- α *in vitro* por macrófagos peritoneais

A cinética e a área sob a curva relativas à síntese de TNF- α a partir de macrófagos peritoneais dos grupos –GLN/+BCG e +GLN/+BCG em todos os tempos avaliados foram significativamente maiores em relação às aquelas observadas nos grupos –GLN/–BCG e +GLN/–BCG, respectivamente (tabela 29). Além disso, a síntese de TNF- α após 4 horas de cultura das células obtidas do grupo +GLN/+BCG foi significativamente maior em comparação ao grupo –GLN/+BCG (tabela 29).

Tabela 29. Síntese de TNF- α por macrófagos peritoneais dos grupos da etapa 3.

	–GLN/–BCG	–GLN/+BCG	+GLN/–BCG	+GLN/+BCG
	pg TNF/ μ g proteína			
2 horas	10,5 \pm 3,0 ^a	97,6 \pm 22,2 ^b	12,4 \pm 4,5 ^a	116,1 \pm 20,9 ^b
4 horas	10,6 \pm 2,6 ^a	116,2 \pm 29,1 ^b	11,8 \pm 4,3 ^a	145,0 \pm 20,4 ^c
8 horas	15,7 \pm 3,0 ^a	128,8 \pm 20,3 ^b	17,8 \pm 3,9 ^a	142,5 \pm 14,4 ^b
24 horas	12,8 \pm 5,1 ^a	130,1 \pm 7,1 ^b	13,7 \pm 4,9 ^a	131,3 \pm 17,7 ^b
	pg TNF.h/ μ g proteína			
ASC	299 \pm 57 ^a	2.778 \pm 292 ^b	335 \pm 56 ^a	3.031 \pm 291 ^b

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com n = 8/grupo.

Valores na mesma linha seguidos pela mesma letra não diferem significativamente (P<0,05).

As células foram estimuladas *in vitro* com 5 μ g/mL de LPS.

(ASC = área sob a curva).

–GLN/–BCG= grupo desmamado no 14^o dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 28^o dia de vida.

–GLN/+BCG= grupo desmamado no 14^o dia de vida, alimentado com ração isenta de glutamina até o 28^o dia de vida e inoculado com BCG no 21^o dia de vida.

+GLN/–BCG= grupo desmamado no 14^o dia de vida e alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28^o dia de vida.

+GLN/+BCG= grupo desmamado no 14^o dia de vida, alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28^o dia de vida e inoculado com BCG no 21^o dia de vida.

7.3.5.6.2 Síntese de IL-1 β *in vitro* por macrófagos peritoneais

A cinética de síntese com 2, 4 e 8 horas e a área sob a curva relativas à IL-1 β dos grupos –GLN/+BCG e +GLN/+BCG foram significativamente maiores em relação àquelas observadas nos grupos –GLN/–BCG e +GLN/–BCG, respectivamente (tabela 30). O grupo +GLN/+BCG apresentou concentração de IL-1 β significativamente superior àquela observada no grupo +GLN/–BCG com 24 horas de cultura celular (tabela 30).

Tabela 30. Síntese de IL-1 β por macrófagos peritoneais dos grupos da etapa 3.

	–GLN/–BCG	–GLN/+BCG	+GLN/–BCG	+GLN/+BCG
	pg IL-1 β / μ g proteína			
2 horas	0,20 \pm 0,08 ^a	1,07 \pm 0,38 ^b	0,15 \pm 0,06 ^a	1,02 \pm 0,34 ^b
4 horas	1,5 \pm 0,6 ^a	3,9 \pm 1,5 ^{b,c}	1,7 \pm 0,8 ^{a,c}	4,1 \pm 1,3 ^b
8 horas	4,1 \pm 0,7 ^a	10,4 \pm 3,3 ^b	3,3 \pm 1,0 ^a	11,4 \pm 3,1 ^b
24 horas	7,0 \pm 1,7 ^{a,b}	11,4 \pm 4,1 ^{a,c}	6,0 \pm 1,9 ^b	13,6 \pm 4,1 ^c
	pg IL-1 β .h/ μ g proteína			
ASC	102 \pm 12 ^a	208 \pm 38 ^b	86 \pm 23 ^a	241 \pm 30 ^b

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão com n = 8/grupo.

Valores na mesma linha seguidos pela mesma letra não diferem significativamente (P<0,05).

As células foram estimuladas *in vitro* com 5 μ g/mL de LPS. (ASC = área sob a curva).

–GLN/–BCG= grupo desmamado no 14^o dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 28^o dia de vida.

–GLN/+BCG= grupo desmamado no 14^o dia de vida, alimentado com ração isenta de glutamina até o 28^o dia de vida e inoculado com BCG no 21^o dia de vida.

+GLN/–BCG= grupo desmamado no 14^o dia de vida e alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28^o dia de vida.

+GLN/+BCG= grupo desmamado no 14^o dia de vida, alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28^o dia de vida e inoculado com BCG no 21^o dia de vida.

7.3.5.6.3 Síntese de IL-6 *in vitro* por macrófagos peritoneais

A cinética e a área sob a curva relativas à síntese de IL-6 a partir de macrófagos peritoneais dos grupos –GLN/+BCG e +GLN/+BCG em todos os tempos avaliados foram significativamente menores em relação às observadas nos grupos –GLN/–BCG e +GLN/–BCG, respectivamente (tabela 31). Além disso, a síntese de IL-6 com 2 e 4 horas de cultura de células obtidas do grupo +GLN/–BCG foi significativamente superior àquela do grupo –GLN/–BCG (tabela 31).

Tabela 31. Síntese de IL-6 por macrófagos peritoneais dos grupos da etapa 3.

	–GLN/–BCG	–GLN/+BCG	+GLN/–BCG	+GLN/+BCG
	pg IL-6/μg proteína			
2 horas	507 ± 140 ^a	62 ± 23 ^b	688 ± 170 ^c	101 ± 34 ^b
4 horas	676 ± 228 ^a	262 ± 98 ^b	995 ± 312 ^c	332 ± 109 ^b
8 horas	3.323 ± 439 ^a	495 ± 178 ^b	3.080 ± 369 ^a	528 ± 159 ^b
24 horas	2.967 ± 946 ^a	741 ± 273 ^b	2.965 ± 946 ^a	773 ± 271 ^b
	pg IL-6.h/μg proteína			
ASC	59.507 ± 6.941 ^a	11.732 ± 3.329 ^b	58.190 ± 7.340 ^a	12.559 ± 2.105 ^b

Resultados expressos em média ± desvio-padrão com n = 8/grupo.

Valores na mesma linha seguidos pela mesma letra não diferem significativamente (P<0,05).

As células foram estimuladas *in vitro* com 5 μg/mL de LPS.

(ASC = área sob a curva).

–GLN/–BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida.

–GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração isenta de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

+GLN/–BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida e alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida.

+GLN/+BCG= grupo desmamado no 14º dia de vida, alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28º dia de vida e inoculado com BCG no 21º dia de vida.

7.3.5.6.4 Síntese de IL-10 *in vitro* por macrófagos peritoniais

A área sob a curva e a cinética de síntese de IL-10 a partir de macrófagos peritoniais dos grupos –GLN/+BCG (2-24 h) e +GLN/+BCG (2-8 h) foram significativamente menores em relação àquelas observadas nos grupos –GLN/–BCG e +GLN/–BCG, respectivamente (tabela 32).

Tabela 32. Síntese de IL-10 por macrófagos peritoniais dos grupos da etapa 3.

	–GLN/–BCG	–GLN/+BCG	+GLN/–BCG	+GLN/+BCG
pg IL-10/μg proteína				
2 horas	19,6 ± 6,1 ^a	3,6 ± 1,4 ^b	17,5 ± 5,4 ^a	4,7 ± 1,3 ^b
4 horas	24,1 ± 4,7 ^a	7,8 ± 2,8 ^b	24,1 ± 8,7 ^a	9,0 ± 2,4 ^b
8 horas	32,7 ± 6,5 ^a	20,3 ± 7,6 ^b	35,7 ± 11,7 ^a	15,2 ± 5,1 ^b
24 horas	35,4 ± 11,0 ^a	20,5 ± 6,7 ^b	31,3 ± 9,8 ^{a,b}	21,4 ± 7,4 ^b
pg IL-10.h/μg proteína				
ASC	702 ± 136 ^a	394 ± 125 ^b	697 ± 166 ^a	355 ± 90 ^b

Resultados expressos em média ± desvio-padrão com n = 8/grupo.

Valores na mesma linha seguidos pela mesma letra não diferem significativamente (P<0,05).

As células foram estimuladas *in vitro* com 5 μg/mL de LPS.

(ASC = área sob a curva).

–GLN/–BCG= grupo desmamado no 14^o dia de vida e alimentado com ração isenta de glutamina até o 28^o dia de vida.

–GLN/+BCG= grupo desmamado no 14^o dia de vida, alimentado com ração isenta de glutamina até o 28^o dia de vida e inoculado com BCG no 21^o dia de vida.

+GLN/–BCG= grupo desmamado no 14^o dia de vida e alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28^o dia de vida.

+GLN/+BCG= grupo desmamado no 14^o dia de vida, alimentado com ração suplementada de glutamina até o 28^o dia de vida e inoculado com BCG no 21^o dia de vida.

Tabela 33. Resumo dos resultados observados na etapa 1 referentes à avaliação do estado nutricional.

Parâmetros	Desmame precoce + Ração isenta de glutamina *	Desmame precoce + Ração suplementada com glutamina *
Curva de crescimento	↓	↔
Glutamina plasmática	↓	↓
Albumina sérica	↔	↔
Proteína total sérica	↔	↔
Glicose sérica	↔	↔
Ferro sérico	↓	↓
Corticosterona sérica	↔	↔
IGF-1 sérico	↔	↔
<i>Peso de tecidos</i>		
- Rim	↔	↔
- Cérebro	↔	↔
- Baço	↔	↔
- Músculo gastrocnêmio	↓	↓
- Coração	↔	↔
- Fígado	↔	↔
Glutamina muscular	↓	Não Reverte
Glutamina hepática	↔	↔
Atividade glutamina sintetase muscular	↑	Reverte
Atividade glutamina sintetase hepática	↔	↓
Concentração de proteína muscular	↓	Reverte
Concentração de proteína hepática	↓	Reverte
Concentração de proteína no baço	↔	↔
Concentração de proteína no cérebro	↔	↔
Concentração de RNA muscular	↑	↑
Concentração de RNA hepático	↔	↔

* Todos os parâmetros foram comparados com o grupo AMAM.

↓ = Reduz; ↑ = Aumenta; ↔ = Sem diferença significativa

Reverte = quando os valores não diferiram significativamente do grupo AMAM, ao mesmo tempo em que diferiram significativamente do grupo DESM.

Tabela 33 (continuação). Resumo dos resultados observados na etapa 1 referentes à avaliação do estado nutricional.

Parâmetros	Desmame precoce + Ração isenta de glutamina *	Desmame precoce + Ração suplementada com glutamina *
Concentração de RNA no baço	↑	↑
Concentração de RNA no cérebro	↔	↔
Razão proteína/RNA muscular	↓	↓
Razão proteína/RNA hepático	↔	↔
Razão proteína/RNA no baço	↓	Não Reverte
Razão proteína/RNA no cérebro	↔	↔
Concentração de DNA muscular	↓	Reverte
Concentração de DNA hepático	↓	Reverte
Concentração de DNA no baço	↔	↔
Concentração de DNA no cérebro	↔	↔
<i>Composição corporal</i>		
- Massa magra	↓	↓
- Umidade	↔	↑
- Lipídios	↓	Reverte
- Proteínas	↓	↓
- Cinzas	↓	↓
Eritrograma	↔	↔
Leucograma	↓ (leucócitos e linfócitos)	↓ (leucócitos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos)
Mielograma	↑ (relação G/E) ↓ (células totais, linfócitos, EPO/EOC)	↑ (forma jovem e em anel, relação G/L) ↓ (linfócitos, relação L/E)
Esplenograma	↓ (eritroblasto jovem)	↓ (eosinófilos, eritroblasto jovem)
Contagem total de células do peritônio	↓	Reverte
Contagem diferencial de células do peritônio	↓ (macrófagos)	Reverte

* Todos os parâmetros foram comparados com o grupo AMAM.

↓ = Reduz; ↑ = Aumenta; ↔ = Sem diferença significativa

Reverte = quando os valores não diferiram significativamente do grupo AMAM, ao mesmo tempo em que diferiram significativamente do grupo DESM.

Tabela 34. Resumo dos resultados observados nas etapas 1 e 2 referentes à avaliação da funcionalidade de macrófagos peritoniais.

Parâmetro	Desmame precoce + Ração isenta de glutamina *	Desmame precoce + Ração suplementada com glutamina *	Efeito da suplementação <i>in vitro</i> com glutamina *
Adesão	↓	↓	Não reverte (30-120 min) Reverte (24 h; 1 e 2 mM)
Espraiamento	↓	Reverte	Não reverte (2 h; 0,5 mM) Reverte (30 min - 24 h)
Teste de fagocitose	↓ (60-120 min)	↓ (60-120 min)	Reverte (60 -120 min)
Atividade fungicida	↓	↓	Não reverte
Síntese de H ₂ O ₂	↓	Reverte	Não reverte (0,5 e 0,58 mM) Reverte (1 e 2 mM)
Síntese de NO	↓	Não reverte (48 h) Reverte (24 e 72 h)	Não reverte (48 e 72 h) Reverte (24 h)
ASC síntese de NO	↓	Reverte	Não reverte (0,5 mM) Reverte (0,58, 1 e 2 mM)
Cinética de síntese de TNF-α	↓	Não reverte (2-8 h) Reverte (24 h)	Não reverte
ASC síntese de TNF-α	↓	Não reverte	Não reverte
Cinética de síntese de IL-1β	↓ (4 e 24 h)	Não reverte (4 h) Reverte (24 h)	Não reverte (4 e 24 h)
ASC síntese de IL-1β	↓	Reverte	Não reverte
Cinética de síntese de IL-6	↓ (2, 4 e 24 h)	Reverte (2 e 4 h) ↑ (24 h)	Não reverte (2 e 4 h); Reverte (24 h; 1 e 2 mM)
ASC síntese IL-6	↓	↑	Não reverte
Cinética de síntese de IL-10	↑	↑ (2, 8 e 24 h)	Reverte
ASC síntese de IL-10	↑	↑	Reverte

* Todos os parâmetros foram comparados com o grupo AMAM.

↓= Reduz; ↑= Aumenta; Reverte = quando os valores não diferiram significativamente do grupo AMAM, ao mesmo tempo em que diferiram significativamente do grupo DESM.

(H₂O₂= peróxido de hidrogênio; NO= óxido nítrico; ASC= área sob a curva; TNF-α= fator de necrose tumoral-α; IL-1β= interleucina-1 β; IL-6= interleucina-6; IL-10= interleucina-10).

Tabela 35. Resumo dos resultados observados na etapa 3 referentes à avaliação do estado nutricional.

Parâmetros	Grupo +GLN/-BCG *	Grupo +GLN/+BCG **
Curva de crescimento	↔	↔
Glutamina plasmática	↔	↔
Albumina sérica	↔	↔
Proteína total sérica	↔	↔
Glicose sérica	↔	↔
Ferro sérico	↔	↔
Corticosterona sérica	↔	↔
IGF-1 sérico	↔	↑
<i>Peso de tecidos</i>		
- Rim	↔	↔
- Cérebro	↔	↔
- Baço	↔	↔
- Músculo gastrocnêmio	↔	↔
- Coração	↔	↔
- Fígado	↔	↔
Glutamina muscular	↔	↔
Glutamina hepática	↔	↔
Atividade glutamina sintetase muscular	↔	↔
Atividade glutamina sintetase hepática	↔	↔
Concentração de proteína muscular	↔	↑
Concentração de proteína hepática	↔	↔
Concentração de proteína no baço	↔	↔
Concentração de proteína no cérebro	↔	↔
Concentração de RNA muscular	↔	↔
Concentração de RNA hepático	↔	↔

* O grupo +GLN/-BCG foi comparado ao grupo -GLN/-BCG.

** O grupo +GLN/+BCG foi comparado ao grupo -GLN/+BCG.

↓ = Reduz; ↑ = Aumenta; ↔ = Sem diferença significativa

Tabela 35 (continuação). Resumo dos resultados observados na etapa 1 referentes à avaliação do estado nutricional.

Parâmetros	Grupo +GLN/-BCG *	Grupo +GLN/+BCG **
Concentração de RNA no baço	↔	↔
Concentração de RNA no cérebro	↔	↔
Razão proteína/RNA muscular	↔	↔
Razão proteína/RNA hepático	↔	↔
Razão proteína/RNA no baço	↔	↔
Razão proteína/RNA no cérebro	↔	↔
Concentração de DNA muscular	↔	↔
Concentração de DNA hepático	↔	↔
Concentração de DNA no baço	↔	↔
Concentração de DNA no cérebro	↔	↔
<i>Composição corporal</i>		
- Massa magra	↔	↔
- Umidade	↔	↔
- Lipídios	↑	↔
- Proteínas	↔	↔
- Cinzas	↔	↔
Eritrograma	↔	↔
Leucograma	↑ (leucócitos e linfócitos)	↑ (leucócitos, linfócitos)
Mielograma	↑ (macrófagos, linfócitos, relação L/E)	↔
Esplenograma	↑ (linfócitos)	↑ (células totais, forma em anel,segmentados)
Contagem total de células do peritônio	↔	↑

* O grupo +GLN/-BCG foi comparado ao grupo -GLN/-BCG.

** O grupo +GLN/+BCG foi comparado ao grupo -GLN/+BCG.

↓ = Reduz; ↑ = Aumenta; ↔ = Sem diferença significativa

Tabela 36. Resumo dos resultados observados na etapa 3 referentes à avaliação da funcionalidade de macrófagos peritoniais.

Parâmetro	Grupo +GLN/-BCG *	Grupo +GLN/+BCG **
Adesão	↑ (90 min)	↑ (120 min)
Espraiamento	↔	↑ (30 e 120 min)
Teste de fagocitose	↔	↔
Atividade fungicida	↔	↑ (90 e 120 min)
Síntese de H ₂ O ₂	↔	↑
Síntese de NO	↔	↑ (24 h)
ASC síntese de NO	↔	↔
Cinética de síntese TNF-α	↔	↑ (4 h)
ASC síntese de TNF-α	↔	↔
Cinética de síntese de IL-1β	↔	↔
ASC síntese de IL-1β	↔	↔
Cinética de síntese de IL-6	↑ (2 e 4 h)	↔
ASC síntese de IL-6	↔	↔
Cinética de síntese de IL-10	↔	↔
ASC síntese de IL-10	↔	↔

* O grupo +GLN/-BCG foi comparado ao grupo -GLN/-BCG.

** O grupo +GLN/+BCG foi comparado ao grupo -GLN/+BCG.

↓ = Reduz; ↑ = Aumenta; ↔ = Sem diferença significativa

(H₂O₂ = peróxido de hidrogênio; NO= óxido nítrico; ASC= área sob a curva; TNF-α= fator de necrose tumoral-α; IL-1 β = interleucina-1 β; IL-6 = interleucina-6; IL-10 = interleucina-10).

8. DISCUSSÃO

8.1 Etapa 1

No presente trabalho, em sua primeira etapa, foi proposta a investigação do efeito do desmame precoce associado à ingestão de ração isenta ou suplementada com glutamina sobre o estado nutricional e a funcionalidade de macrófagos peritoniais de camundongos. Para tanto, camundongos desmamados precocemente foram alimentados com ração elaborada para animais em crescimento, a qual teve como intuito principal simular a substituição do aleitamento materno pela utilização de fórmula infantil por bebês humanos. Cabe ressaltar que parte dos camundongos desmamados precocemente foi alimentada com ração isenta do aminoácido glutamina (grupo DESM), uma vez que a concentração de glutamina livre em fórmulas infantis artificiais é significativamente baixa ou inexistente (WILSON *et al.*, 1989; YOO *et al.*, 1997; AGOSTONI *et al.*, 2000a; BALL e HARDY, 2002).

Os resultados obtidos nessa primeira etapa do trabalho demonstraram que os camundongos desmamados precocemente no 14^o dia de vida (grupos DESM e GLN) apresentaram curva de crescimento (ganho de peso diário) significativamente inferior à do grupo AMAM, apesar do consumo de ração dos grupos DESM e GLN ter aumentado significativamente a cada dia entre o 14^o e o 21^o dias de vida. Sendo assim, essa diferença em relação ao ganho de peso entre os grupos da etapa 1 pode estar relacionada a dois fatores. Primeiro, o fator estresse associado ao desmame precoce (YAMAZAKI *et al.*, 2005), o qual pode diminuir o ganho de peso, fato este observado, principalmente, nos dois primeiros dias pós-desmame. Segundo, essa constatação pode estar relacionada à presença de diversos compostos no leite materno, que são fundamentais para o estímulo do crescimento e do desenvolvimento do bebê, como fatores de crescimento (fator de crescimento epidermal, IGF-1) e hormônios (hormônio de crescimento (GH)) (GROSVENOR *et al.*, 1993; FIELD, 2005). Estudos demonstram que crianças alimentadas com leite materno apresentam maior curva de crescimento em relação àquelas alimentadas com fórmulas infantis (KRAMER *et al.*, 2002; MARTIN *et al.*, 2002; KRAMER *et al.*, 2003; SPYRIDES *et al.*, 2005). Aliado à redução da curva de crescimento, o

desmame precoce também influenciou na composição corporal, uma vez que se observou redução significativa da quantidade absoluta de proteínas, cinzas e massa magra presente na carcaça dos animais dos grupos DESM e GLN.

Dentre os aminoácidos livres ingeridos por bebês com aleitamento materno exclusivo, destacam-se a glutamina e o glutamato, os quais compreendem aproximadamente 50% dos aminoácidos livres no leite materno. Além disso, com a progressão do aleitamento materno, verifica-se que a concentração de glutamina e glutamato no leite humano aumenta aproximadamente 20 e 2,5 vezes, respectivamente, durante os três primeiros meses de lactação, ao mesmo tempo em que a concentração dos demais aminoácidos livres diminui com a progressão da lactação (AGOSTONI *et al.*, 2000a; AGOSTONI *et al.*, 2000b). Cabe destacar que a glutamina representa importante fonte de carbono e nitrogênio para a síntese de intermediários metabólicos e macromoléculas, aliado ao fato de participar da síntese de nucleotídeos e atuar como substrato energético para células de rápida proliferação, como enterócitos e células do sistema imune (ROGERO e TIRAPEGUI, 2000). Desse modo, supõe-se que animais em crescimento apresentam elevada demanda metabólica em relação à glutamina para favorecer não apenas o anabolismo protéico, mas também para promover a adaptação e o crescimento de tecidos altamente especializados (AGOSTONI *et al.*, 2000; LABOW e SOUBA, 2000).

Na etapa 1 do presente estudo foi verificado que o desmame precoce associado à ingestão de ração isenta de glutamina diminuiu a concentração plasmática e muscular de glutamina em camundongos. Quantitativamente, o mais relevante tecido envolvido na síntese, estoque e liberação de glutamina é o músculo esquelético, que apresenta papel fundamental na manutenção da concentração plasmática de glutamina (ROGERO *et al.*, 2004). Sendo assim, a menor concentração de glutamina plasmática verificada no grupo DESM em relação ao grupo AMAM está relacionada à menor concentração de glutamina no tecido muscular. Cabe ressaltar que a concentração plasmática do grupo AMAM verificada neste estudo (579 $\mu\text{mol/L}$) é bastante similar àquela observada em neonatos humanos (581 $\mu\text{mol/L}$) (PARIMI *et al.*, 2002), o que, desse modo, favorece a extrapolação dos resultados do presente estudo para àqueles observados em humanos.

A suplementação com glutamina na ração não reverteu o efeito induzido pelo desmame precoce associado à ausência de ingestão de glutamina no que concerne à concentração plasmática de glutamina. Similarmente, outros estudos com camundongos (KEW *et al.*, 1999; WELLS *et al.*, 1999), ratos (SHEWCHUK *et al.*, 1997) e porcos (YOO *et al.*, 1997) suplementados com glutamina, por meio da ração, também demonstraram ausência de efeito dessa intervenção nutricional sobre a concentração plasmática desse aminoácido. Dentre os possíveis mecanismos envolvidos na ausência de efeito da suplementação com glutamina sobre a glutaminemia dos animais do grupo GLN, destacam-se a elevada utilização da glutamina ingerida na ração pela mucosa intestinal — que representa o principal tecido consumidor de glutamina no organismo — ou os mecanismos homeostáticos de manutenção da concentração plasmática de glutamina — por exemplo, diminuição da liberação de glutamina muscular quando esse aminoácido é fornecido pela dieta (PARRY-BILLINGS e NEWSHOLME, 1991). Cabe ressaltar que a concentração muscular de glutamina observada no grupo GLN não diferiu significativamente em relação tanto ao grupo AMAM quanto ao grupo DESM. Porém, apesar da ausência de diferença significativa, o grupo GLN apresentou concentração de glutamina muscular 19% superior em comparação ao grupo DESM, o que sugere que parte da glutamina ingerida possa ter influenciado no metabolismo muscular desse aminoácido no grupo GLN.

Apesar da glutamina constituir 50-60% do *pool* total de aminoácidos livres no músculo esquelético, esse percentual não representa completamente a quantidade de glutamina liberada pelo tecido muscular para a circulação sangüínea. Desse modo, a glutamina deve ser sintetizada a partir do glutamato e da amônia, em reação dependente de ATP catalisada pela enzima glutamina sintetase (NEWSHOLME e PARRY-BILLINGS, 1990; VAN STRAATEN *et al.*, 2006; MIGNON *et al.*, 2007). Nesse contexto, é provável que a suplementação com glutamina na ração tenha diminuído a síntese *de novo* de glutamina no tecido muscular. Em sustentação a essa possibilidade, observou-se que a atividade máxima da enzima glutamina sintetase muscular foi significativamente menor no grupo GLN em relação ao grupo DESM, indicando que a suplementação com glutamina influenciou sobre a síntese *de novo* muscular de glutamina. Esse efeito induzido pela suplementação com glutamina pela ração

é possível, uma vez que a expressão da enzima glutamina sintetase é regulada principalmente por dois mecanismos, ou seja, aumento da transcrição em resposta à ação hormonal e regulação da estabilidade da proteína em resposta à concentração intracelular de glutamina livre.

No tecido muscular, glicocorticóides podem aumentar a quantidade de RNAm para a enzima glutamina sintetase em processo dependente do receptor de glicocorticóides presente no citosol. Desse modo, posteriormente à ligação do glicocorticóide ao seu receptor citosólico, ocorre a translocação para o núcleo, onde esse complexo liga-se a regiões contendo elementos de resposta a glicocorticóides. Essas regiões promovem significativa indução da transcrição da enzima glutamina sintetase por meio da ativação da região promotora correspondente ao gene dessa enzima (MAX, 1990; NEU *et al.*, 1996; LABOW e SOUBA, 2000; LABOW *et al.*, 2001). Apesar da atividade da glutamina sintetase ser aumentada em resposta ao estresse fisiológico, o aumento da quantidade da proteína glutamina sintetase pode não ocorrer paralelamente àquele do RNAm, o que sugere que mecanismos de controle pós-transcricionais também regulam a expressão da enzima glutamina sintetase. Desse modo, a atividade da glutamina sintetase parece ser controlada pela concentração intracelular de glutamina, por meio de um mecanismo de controle pós-transcricional, que promove o aumento da atividade da enzima glutamina sintetase quando há diminuição da concentração intracelular de glutamina. Não obstante, verifica-se que a enzima glutamina sintetase é relativamente instável na presença de glutamina e, desse modo, o aumento da concentração intracelular de glutamina promove mais rapidamente a degradação da proteína glutamina sintetase. Além disso, os glicocorticóides e a depleção de glutamina intracelular agem sinergicamente, promovendo o aumento da expressão da glutamina sintetase em músculo de ratos (LABOW e SOUBA, 2000; LABOW *et al.*, 2001; CUNHA *et al.*, 2003).

Conforme descrito acima, o aumento da atividade da enzima glutamina sintetase observado no grupo DESM poderia estar relacionado ao aumento da concentração de glicocorticóides. Todavia, não houve diferença significativa entre os grupos AMAM, DESM e GLN em relação à concentração sérica de corticosterona, o que, desse modo, permite sugerir que a elevação da atividade da enzima glutamina sintetase muscular no grupo DESM esteja relacionada à

diminuição da concentração de glutamina intramuscular, uma vez que este aminoácido regula a estabilidade da enzima glutamina sintetase. O aumento da atividade da enzima glutamina sintetase muscular verificado no grupo DESM não foi capaz de manter a concentração plasmática de glutamina próxima aos valores observados no grupo AMAM, provavelmente devido tanto à ausência de ingestão de glutamina quanto à elevada demanda por esse aminoácido pelo intestino, sistema imune e outros órgãos (BALL e HARDY, 2002).

Uma vez que a suplementação com glutamina não ocasionou alteração da glutaminemia, é provável que parte da glutamina ingerida tenha sido utilizada pela mucosa intestinal devido a grande demanda desse tecido, principalmente em animais em fase de crescimento. Ao mesmo tempo, verificou-se que a suplementação com glutamina reverteu a diminuição significativa da concentração muscular de proteína e de DNA observada no grupo DESM. Este resultado, observado no grupo DESM, pode estar relacionado à sua menor concentração de glutamina muscular, uma vez que a mesma está diretamente associada à concentração protéica muscular (MACLENNAN *et al.*, 1987; JEPSON *et al.*, 1988; MACLENNAN *et al.*, 1988; MILLWARD *et al.*, 1989; RENNIE *et al.*, 1989; ROGERO *et al.*, 2004). Corroborar este fato um estudo de MacleNNan *et al.* (1987), que verificaram, em músculo gastrocnêmio de ratos, relação positiva entre a taxa de síntese protéica e a concentração muscular de glutamina até o limite de expansão do *pool* de glutamina intramuscular. Em outro estudo, foi observado que a concentração de glutamina intramuscular influenciou significativamente a degradação protéica muscular, uma vez que o aumento da concentração intramuscular de glutamina promoveu a inibição da proteólise muscular, preferivelmente de proteínas solúveis em relação às miofibrilares (MACLENNAN *et al.*, 1988).

O fígado ativamente participa da síntese e/ou degradação de glutamina, sendo a ocorrência desses processos dependente da região anatômica estudada nesse órgão, o que indica que o metabolismo da glutamina é compartimentalizado no fígado (CURI, 2000; HAUSSINGER e SCHLISS, 2007). O sangue portal inicialmente entra em contato com hepatócitos periportais, os quais contêm a enzima glutaminase e as enzimas do ciclo da uréia, que catalisam a hidrólise da glutamina para formação de glutamato e

amônia e para a síntese de uréia, respectivamente. A amônia que escapa desta região é captada por hepatócitos perivenosos, que contêm a enzima glutamina sintetase, que realiza a síntese de glutamina a partir de amônia e glutamato em uma reação dependente de ATP. Esta divisão de trabalho permite ao fígado funcionar como um tecido de captação ou de síntese de glutamina, dependendo da necessidade global do organismo (SMITH, 1990; LABOW e SOUBA, 2000). Desse modo, as enzimas glutaminase periportal e glutamina sintetase perivenosa operam simultaneamente no tecido hepático, resultando em um ciclo intercelular, com consumo de glutamina na região periportal e síntese desse aminoácido na região perivenosa, sendo o saldo destes o fator determinante do fluxo hepático de glutamina (LACEY e WILMORE, 1990; MOSKOVITZ *et al.*, 1994; HAUSSINGER e SCHLIESS, 2007).

A partir dos resultados observados no presente estudo, é possível supor que a ausência de alteração da concentração plasmática de glutamina no grupo GLN em relação ao grupo DESM também esteja relacionada ao aumento da captação e do metabolismo hepático da glutamina no grupo GLN, uma vez que foi verificada redução significativa da atividade máxima da enzima glutamina sintetase hepática no grupo GLN em relação aos grupos AMAM e DESM. Cabe ressaltar que, segundo Labow *et al.* (2001), parte da diminuição da atividade da enzima glutamina sintetase hepática no grupo GLN pode estar relacionada ao mecanismo de controle pós-transcricional relacionado à concentração intracelular de glutamina.

Dentre os parâmetros séricos indicativos do estado nutricional protéico visceral — albumina, proteínas totais e IGF-1 — não se observou diferença significativa entre os grupos AMAM, DESM e GLN. Contudo, a redução significativa da concentração hepática de proteína e de DNA verificada no grupo DESM em relação aos grupos AMAM e GLN permite concluir que o desmame precoce associado à ausência de ingestão de glutamina na ração prejudica o estado protéico visceral, porém esse efeito não foi acompanhado pela redução da concentração sérica de proteínas sintetizadas pelo tecido hepático — como albumina e IGF-1 — após o período do protocolo experimental (7 dias).

A glutamina é captada na membrana plasmática do hepatócito pelo sistema de transporte de aminoácidos dependente de Na^+ denominado sistema N. O acúmulo desse aminoácido dentro do hepatócito, juntamente com o co-transporte de Na^+ , cria um gradiente osmótico e um fluxo de água para o interior celular. Em fígado de rato perfundido com glutamina, o aumento do volume celular induzido por esse aminoácido é de 50% com concentração de glutamina no sangue portal de 0,7 mmol/L, e o aumento é máximo, com 2 mmol/L. Desse modo, flutuações fisiológicas da glutamina presente no sangue portal modulam a hidratação celular hepática (HAUSSINGER e SCHLISS, 2007). Este efeito da glutamina responde, em parte, pela capacidade desse aminoácido atuar como um potente inibidor da proteólise muscular e hepática (MORTIMORE e POSO, 1987). A partir desses fatos, sugere-se que a maior concentração hepática de proteína no grupo GLN em comparação ao grupo DESM indique que a suplementação com glutamina em camundongos desmamados precocemente está relacionada ao aumento do balanço protéico hepático. Além disso, uma vez que a glutamina doa nitrogênio para a síntese de bases nitrogenadas, sugere-se que a maior concentração de DNA hepático no grupo GLN em comparação ao grupo DESM seja decorrente da suplementação com glutamina pela ração.

Recentes estudos demonstram que o leite materno apresenta concentração significativa do hormônio eritropoetina e que células epiteliais mamárias representam uma fonte extra-renal de eritropoetina (ODDY, 2002; SEMBA e JUUL, 2002; FIELD, 2005). Cabe ressaltar que a concentração de eritropoetina no leite materno aumenta no decorrer dos primeiros meses de lactação, sendo esse hormônio absorvido no trato digestório de bebês. Uma vez absorvida, a eritropoetina promove a estimulação da eritropoese em lactentes durante a fase de amamentação (CARMICHAEL *et al.*, 1986). Verifica-se ainda que o receptor para eritropoetina é também expresso em vasta variedade de tecidos humanos, incluindo o trato digestório, células endoteliais, medula espinhal e cérebro, o que sugere que a eritropoetina presente no leite materno pode atuar, por exemplo, no desenvolvimento neural e na maturação do epitélio intestinal (GROSVENOR *et al.*, 1993; ODDY, 2002; SEMBA e JUUL, 2002).

A relação entre eritropoese e aleitamento materno também é devida à presença de ferro no leite humano, que é significativamente mais biodisponível (45-100%) quando comparado ao ferro presente em fórmulas infantis (10%) (LOENNERDAL *et al.*, 1981; FOMON *et al.*, 1993). Apesar da concentração de ferro no leite humano ser inferior à do leite de vaca, a biodisponibilidade desse mineral no leite humano é cerca de cinco vezes superior àquela no leite de vaca, sendo esse fato relacionado à presença de lactose e vitamina C associadas à baixa concentração de fósforo e proteína no leite materno (NASCIMENTO e ISSLER, 2003). Esses fatos, relacionados à maior biodisponibilidade do ferro presente no leite materno, justificam, em parte, a diminuição da concentração sérica de ferro observada nos grupos DESM e GLN no presente estudo.

A despeito do leite materno influenciar a eritropoese em lactentes, verificou-se no presente estudo que os grupos DESM e GLN não diferiram significativamente do grupo AMAM em relação aos valores do eritrograma. Apesar dos valores relacionados ao eritrograma não terem apresentado alteração com o desmame precoce, verificou-se diminuição da contagem total de leucócitos e de linfócitos no sangue periférico de animais do grupo DESM e GLN quando comparados ao grupo AMAM. Para melhor caracterizar as possíveis causas da leucopenia e linfopenia ocasionadas pelo desmame precoce foram realizados o mielograma e o esplenograma dos animais dos grupos AMAM, DESM e GLN.

Em relação ao grupo DESM, os resultados do mielograma constataram redução do número total de células nucleadas presentes na medula óssea, associada à diminuição da contagem de células das séries linfóide e eritróide em relação ao grupo AMAM. Desse modo, os resultados do mielograma associados aos do leucograma indicam diminuição da produção de células hematopoéticas no grupo DESM. Esse fato pode ser relevante em relação à funcionalidade do sistema imune de bebês, uma vez que o mesmo não está totalmente desenvolvido após o nascimento. Segundo alguns autores, o sistema imune de bebês pode ser considerado relativamente imunodeficiente, uma vez que, quando comparado ao de um adulto, apresenta diferenças em relação tanto aos aspectos quantitativos quanto funcionais (ADKINS, 1999; MARSHALL-CLARKE *et al.*, 2000; FIELD, 2005). Sendo assim, a diminuição do

número de leucócitos no sangue periférico, associada à redução de células progenitoras na medula óssea em animais do grupo DESM, pode acarretar em prejuízo da funcionalidade da resposta imune.

Ainda em relação aos valores observados no mielograma, pôde-se constatar significativa hipoplasia de células da linhagem eritróide, que aliada à diminuição significativa da concentração sérica de ferro, permite sugerir que a ausência de diferença significativa entre os valores observados no eritrograma e na contagem de reticulócitos entre os grupos AMAM e DESM foi decorrente do tempo reduzido do protocolo experimental (sete dias) utilizado na etapa 1 do presente trabalho, uma vez que a meia-vida de eritrócitos no sangue periférico de camundongos é de aproximadamente 45 dias (ANOSA, 1976). Desse modo, é possível que a ingestão de uma ração isenta de glutamina por animais desmamados precocemente — por um tempo mais prolongado do que aquele utilizado no presente estudo — acarretasse em alteração do eritrograma e da contagem de reticulócitos.

No tocante à produção de células do setor linfóide na medula óssea, verificou-se que o desmame precoce, independentemente da ausência de ingestão ou suplementação de glutamina na ração, acarretou em diminuição da contagem de linfócitos na medula óssea. Os mecanismos envolvidos na diminuição da linfopoiese na medula óssea em camundongos desmamados precocemente não estão elucidados, porém fatores presentes no leite materno que estão envolvidos na linfopoiese, como hormônio do crescimento, IGF-1 e hormônios da tireóide (T3 e T4), podem estar relacionados aos resultados observados no presente estudo (FOSTER *et al.*, 1998).

A análise do mielograma do grupo GLN demonstrou que a suplementação com glutamina reverteu a redução do número total de células nucleadas presentes na medula óssea, bem como a diminuição da contagem de células da série eritróide observadas no grupo DESM. Todavia, essa intervenção nutricional não foi eficaz em reverter a diminuição da produção de células da linhagem linfóide presentes na medula óssea, o que explica a linfopenia e a conseqüente leucopenia observadas também nesse grupo em relação ao grupo AMAM. Cabe ressaltar que parte dos efeitos da suplementação com glutamina, em comparação ao grupo DESM, foi relacionada ao aumento da produção de células da linhagem granulocítica.

Esse fato sugere que em animais desmamados precocemente, apesar da ausência de ingestão de fatores de crescimento oriundos do leite materno que atuam na granulopoese — como o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) —, os quais estimulam a proliferação clonal e a diferenciação de progenitores de neutrófilos (GROSVENOR *et al.*, 1993; CALHOUN *et al.*, 1999), a suplementação com glutamina foi capaz de manter, no período de tempo analisado, a capacidade de produção dessas células, bem como daquelas da linhagem eritróide na medula óssea.

Dentre os mecanismos de ação da glutamina nas células envolvidas na resposta hematológica, destaca-se que esse aminoácido é fundamental nos processos de divisão celular, uma vez que a glutamina participa da biossíntese de nucleotídeos (BULUS *et al.*, 1989; PARRY-BILLINGS *et al.*, 1989; NEWSHOLME e PARRY-BILLINGS, 1990). Como doadora de nitrogênio na formação do carbamoil-fosfato, a glutamina, em conjunto com o ácido aspártico, é necessária para a síntese de pirimidinas — formação do N-carbamoilaspartato. Uma reação de transaminação envolvendo a glutamina é utilizada na síntese do nucleotídeo citosina trifosfato, a partir da uridina trifosfato. Na via de biossíntese de purinas, a glutamina contribui com dois grupos amina em reações que promovem a síntese de inosina monofosfato (IMP) e doa um terceiro grupo amina na conversão do IMP para guanosina monofosfato (LABOW e SOUBA, 2000). Em um estudo com células da medula óssea de camundongos, que foram induzidas a sofrer diferenciação para granulócitos/macrófagos, por meio do GM-CSF, verificou-se que a glutamina foi um nutriente indispensável para a proliferação de células HL-60 ou de células diferenciadas da medula óssea de camundongos. Além disso, a glutamina foi superior em comparação à glicose em manter a proliferação e a diferenciação mielóide de células HL-60, sendo a taxa de diferenciação de células HL-60 diretamente relacionada à concentração de glutamina, o que demonstra, portanto, que a glutamina desempenha função relevante na mielopoiese (DASS *et al.*, 1984).

Todavia, apesar da suplementação com glutamina ter promovido maior contagem de células do setor granulocítico na medula óssea em relação ao grupo DESM, esse fato não acarretou em maior contagem de neutrófilos no

sangue periférico dos animais do grupo GLN em relação ao grupo DESM. A saída para o sangue periférico de granulócitos a partir da medula óssea é modulada por diversos fatores, como o G-CSF, o GM-CSF, o componente do sistema complemento denominado C3, os hormônios glicocorticóides, os esteróides androgênicos e as endotoxinas (BEUTLER, 2001). Alguns desses fatores estão presentes no leite materno, como o G-CSF e o GM-CSF, o que implica que a ingestão desse alimento pode atuar — diretamente ou indiretamente — sobre a liberação de células da medula óssea para o sangue periférico (GILMORE *et al.*, 1994; GASPARONI *et al.*, 1996; GAROFALO e GOLDMAN, 1998).

Diferentemente de indivíduos adultos, nos quais a resistência a infecções é dependente do equilíbrio entre a imunidade inata e adaptativa, bebês apresentam imunidade adaptativa não completamente desenvolvida. Um exemplo disso são as respostas dos linfócitos T, que podem ser funcionalmente limitadas devido a essas células apresentarem um fenótipo do tipo *naïve*, aliado à menor expressão de moléculas co-estimulatórias como CD40L. A inadequada função das células T influencia significativamente a eficiência da imunidade mediada por células. Conseqüentemente, durante os primeiros meses de vida, células do sistema imune inato, predominantemente macrófagos, neutrófilos e células *natural killer*, são, em grande parte, responsáveis pela eliminação de antígenos. Todavia, em bebês, fatores relacionados à funcionalidade de neutrófilos, como menor capacidade de aderência (para o endotélio vascular) e de quimiotaxia e reduzida atividade enzimática, contribuem para o maior risco de infecção sistêmica a partir de uma infecção local, quando comparados a indivíduos adultos. Além disso, monócitos e macrófagos de neonatos demonstram menor capacidade de síntese de G-CSF, IL-6 e IL-8 e de ativação induzida por IFN- γ , ao mesmo tempo em que apresentam maior suscetibilidade para determinados tipos de infecções virais, como vírus da imunodeficiência humana adquirida-1 (HIV-1), em comparação a células de adultos (JOHNSTON, 1998; KOVARIK e SIEGRIST, 1998; HASSAN e REEN, 2000; KELLY e COUTTS, 2000; MARSHALL-CLARKE *et al.*, 2000).

No presente estudo, se propôs a investigação da resposta imune inata de camundongos durante a fase de lactação, por meio da avaliação da

funcionalidade de macrófagos obtidos da cavidade peritoneal. Foi verificado que o desmame precoce associado à ausência de ingestão de glutamina (grupo DESM) afetou negativamente a capacidade de adesão e espraiamento, a atividade fagocítica e fungicida e a síntese de óxido nítrico, de peróxido de hidrogênio e de citocinas pró-inflamatórias a partir de macrófagos peritonias em relação ao grupo AMAM. Contudo, a suplementação com glutamina na ração de camundongos desmamados precocemente reverteu a diminuição da capacidade de espraiamento e de síntese de óxido nítrico (24 e 72 h), peróxido de hidrogênio, TNF- α (24 h), IL-1 β (24 h) e IL-6 (2, 4 e 24 h) em cultura de macrófagos peritonias. Nesse contexto, é fundamental ressaltar que a escolha pela suplementação com glutamina na ração dos camundongos desmamados precocemente deveu-se ao fato da glutamina estar envolvida na síntese de óxido nítrico (BELLOWS e JAFFE, 1999) e de citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF) (WALLACE e KEAST, 1992; YASSAD *et al.*, 1997; MURPHY e NEWSHOLME, 1998; MURPHY e NEWSHOLME, 1999; WELLS *et al.*, 1999; YASSAD *et al.*, 2000; NEWSHOLME, 2001; CURI *et al.*, 2005; KOMATSU *et al.*, 2007), na capacidade fagocítica e fungicida (PARRY-BILLINGS *et al.*, 1990; SPITTLER *et al.*, 1995; SPITTLER *et al.*, 1997; FURUKAWA *et al.*, 2000; YEH *et al.*, 2004) e na produção de espécies reativas de oxigênio (COSTA ROSA *et al.*, 1995; FURUKAWA *et al.*, 2000) a partir de macrófagos peritonias.

Duas questões surgiram ao se analisar os resultados do grupo DESM relacionados à funcionalidade de macrófagos peritonias: (i) se a ausência de ingestão do leite materno influenciou em todos os parâmetros de funcionalidade de macrófagos peritonias; ou (ii) se o desmame precoce afetou apenas um ou mais parâmetros, os quais podem influenciar de maneira sinérgica os outros parâmetros relacionados à funcionalidade de macrófagos peritonias. Até o presente momento, os estudos não são conclusivos quanto à influência do leite materno sobre os parâmetros de funcionalidade de macrófagos peritonias, contudo, alguns trabalhos indicam uma interdependência entre esses parâmetros de funcionalidade.

A capacidade de células interagirem com a matriz extracelular é um importante determinante da função celular. Macrófagos aderem constitutivamente a um substrato, como fibronectina, ou, quando ativados por ésteres de forbol, IFN- γ ou LPS, à laminina. Esses fatos estabelecem relação

causal entre a ativação de macrófagos e a adesão dessas células nas proteínas da matriz extracelular (MERCURIO e SHAW, 1988; SHAW e MERCURIO, 1989; SHAW *et al.*, 1990). Além disso, a capacidade de adesão está diretamente relacionada à atividade fagocítica de monócitos e macrófagos (BOHNSACK *et al.*, 1985). Segundo Newman e Tucci (1990), a adesão de monócitos promove aumento da fagocitose e do *killing* de bactérias opsonizadas, o que sugere que a aderência de monócitos à matriz extracelular durante o processo inflamatório pode rapidamente ativar essas células e, conseqüentemente, aumentar a atividade bactericida. Nesse contexto, tanto no grupo DESM quanto GLN, pode-se sugerir que a diminuição da atividade fagocítica e fungicida observada esteja relacionada à redução da capacidade de adesão de macrófagos peritoniais.

A produção de espécies reativas de oxigênio também está relacionada à capacidade de adesão de macrófagos peritoniais, uma vez que macrófagos estimulados com PMA apresentam maior síntese de ânion superóxido quando aderidos, em comparação a macrófagos não aderidos (KUNKEL e DUQUE, 1983). Além disso, a capacidade de adesão de monócitos e de macrófagos regula a sinalização intracelular mediada pela MAPK e modula a ativação do fenótipo pró-inflamatório dessas células (ROSENGART *et al.*, 2002). Segundo Bauer *et al.* (2000), macrófagos estimulados com LPS apresentam maior síntese de TNF- α quando aderidos em comparação a essas células não aderidas. Além disso, a adesão isoladamente não ativa a proteína quinase p38MAPK ou o fator de transcrição NF-kappa B, mas favorece o aumento da resposta de macrófagos, frente ao estímulo induzido pelo LPS, por meio da ativação da p38MAPK, do NF-kappa B e da síntese de TNF- α .

Desse modo, verifica-se, no presente estudo, que a redução da capacidade de adesão de macrófagos peritoniais observada no grupo DESM pode estar relacionada à diminuição dos outros parâmetros avaliados relativos à funcionalidade de macrófagos peritoniais. Contudo, é relevante ressaltar que os ensaios para determinação da síntese de citocinas e de óxido nítrico realizados com macrófagos peritoniais no presente trabalho foram normalizados para o conteúdo de proteína celular, o que visou controlar variações no número de células decorrentes das diferentes capacidades de adesão de macrófagos peritoniais entre os grupos estudados. Desse modo, a

diminuição da funcionalidade de macrófagos peritoniais de animais desmamados precocemente não é exclusivamente dependente da menor capacidade de adesão.

Integrinas são glicoproteínas heterodiméricas (α e β subunidades) presentes na superfície celular, que se ligam a proteínas da matriz extracelular como laminina e fibronectina. Integrinas também interagem, por meio de domínios citoplasmáticos, com componentes do citoesqueleto (actina) e moléculas de sinalização no interior celular (FU *et al.*, 2004). Cabe ressaltar que, em ensaios celulares *in vitro*, o meio de cultura isento de glutamina provoca redução da expressão da integrina $\alpha 5$, bem como inibe o remodelamento do citoesqueleto de actina durante o processo de espraiamento celular (FU *et al.*, 2004). Esse fato pode estar relacionado à reversão induzida pela suplementação com glutamina pela ração sobre a capacidade de espraiamento em camundongos desmamados precocemente, apesar da ausência de efeito dessa intervenção nutricional sobre a capacidade de adesão de macrófagos peritoniais.

No que concerne ao efeito da suplementação com glutamina pela ração revertendo a diminuição da síntese de óxido nítrico observada no grupo DESM, é relevante destacar que a glutamina atua em macrófagos como precursora de arginina, a qual, por sua vez, é a precursora da síntese de óxido nítrico em reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (MURPHY e NEWSHOLME, 1998). Além disso, a glutamina pode aumentar o transporte de arginina na membrana plasmática de macrófagos, bem como suprimir a atividade da enzima arginase, o que, desse modo, pode aumentar a concentração intracelular de arginina. Alternativamente, a glutamina pode modular a expressão gênica — em nível transcricional — e a atividade da enzima iNOS (BELLOWS e JAFFE, 1999). Ao mesmo tempo, o metabolismo intracelular da glutamina em macrófagos gera NADPH, que é fundamental na reação catalisada pela enzima iNOS (NEWSHOLME, 2001). Cabe destacar que durante a cultura de macrófagos peritoniais, o meio de cultura não continha glutamina, porém apresentava, na sua composição, arginina. Esse fato indica que a suplementação com glutamina *in vivo* pode ter modulado a expressão e/ou atividade da enzima iNOS em macrófagos peritoniais, o que, desse modo,

favoreceu a maior síntese de óxido nítrico no grupo GLN em relação ao grupo DESM.

No presente estudo buscou-se avaliar a capacidade fungicida de macrófagos peritoniais em relação à *Candida albicans*. Esse fungo é um patógeno oportunista, que comumente infecta indivíduos imunodeprimidos. A expressão de RNAm da enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS) tem sido associada à resistência a infecções com *Candida albicans* em camundongos, enquanto a inibição da síntese de óxido nítrico *in vivo* pode aumentar a suscetibilidade de camundongos para candidíase sistêmica (inoculação intravenosa) ou de mucosas. Além disso, a inibição da síntese de óxido nítrico reduz a capacidade fungicida de macrófagos murinos em relação à *Candida albicans* (VAZQUES-TORRES *et al.*, 1995). Desse modo, pode-se supor que a diminuição significativa da capacidade fagocítica e, principalmente, da capacidade fungicida de macrófagos peritoniais do grupo DESM, foi decorrente da redução da capacidade de síntese de óxido nítrico e de peróxido de hidrogênio. A suplementação com glutamina pela ração promoveu maior capacidade fagocítica de macrófagos peritoniais do grupo GLN em relação ao grupo DESM. Contudo, apesar dessa intervenção nutricional acarretar em aumento da síntese de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, a mesma não foi eficaz em reverter a diminuição da capacidade fungicida observada no grupo DESM, o que evidencia que outros mecanismos, além da síntese de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, estão envolvidos no prejuízo induzido pelo desmame precoce sobre a atividade fungicida de macrófagos.

Macrófagos podem secretar várias citocinas (por exemplo, IL-1, IL-6, TNF- α , IL-10), sendo que, quantitativamente, a síntese de TNF- α representa um dos mais relevantes produtos secretados por macrófagos, uma vez que essa citocina é importante para a regulação da atividade de linfócitos bem como para a estimulação autócrina de macrófagos e para a evolução da resposta inflamatória (MURPHY e NEWSHOLME, 1998; MURPHY e NEWSHOLME, 1999). No presente estudo verificou-se diminuição significativa na síntese das citocinas TNF- α , IL-1 e IL-6 do grupo DESM em relação ao grupo AMAM. Ao mesmo tempo verificou-se diminuição significativa da área sob a curva relacionada à cinética de síntese dessas citocinas, indicando que o desmame precoce associado à ausência de ingestão de glutamina influencia a

capacidade de síntese de citocinas pró-inflamatórias a partir de macrófagos peritoniais cultivados em meio de cultura isento de glutamina.

Dentre os possíveis mecanismos envolvidos no prejuízo da função de macrófagos induzido pelo desmame precoce aliado à ausência de ingestão de glutamina, destaca-se o papel da citocina IL-10, que é sintetizada por macrófagos peritoniais (CAVAILLON, 1994; SALEZ *et al.*, 2000), sendo que a síntese dessa citocina foi significativamente maior no grupo DESM em relação ao grupo AMAM no presente trabalho. Essa citocina, originalmente denominada fator inibitório da síntese de citocinas, foi descoberta como um produto de linfócitos do tipo Th2, os quais suprimem a produção de IFN- γ por linfócitos do tipo Th1. Entretanto, a IL-10 inibe linfócitos Th1 apenas na presença de outras células, como macrófagos. Esse fato sugere que a IL-10 age primariamente em macrófagos a fim de alterar o balanço entre produtos secretórios que agem inibindo ou estimulando linfócitos (NATHAN, 1987).

Bogdan *et al.* (1991) verificaram que a IL-10 murina recombinante atua como potente supressor da capacidade de síntese de TNF- α , peróxido de hidrogênio e óxido nítrico por macrófagos peritoniais de camundongos. Uma vez que o TNF- α atua como fator de crescimento e de diferenciação de linfócitos T, é possível que a IL-10 suprima a função de linfócitos. Além disso, a diminuição da atividade de macrófagos induzida por IL-10 pode ser permissiva para o crescimento de patógenos e células tumorais, desde que o TNF- α e as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio representem importantes produtos antimicrobianos e tumorocidas. Fiorentino *et al.* (1991) demonstraram que macrófagos peritoniais — ativados ou não com LPS — apresentaram menor capacidade de adesão e espraiamento na presença de IL-10; fato esse relevante com relação à inibição da função de macrófagos. Além disso, foi verificado que a expressão de RNAm e a síntese de IL-1 α , IL-6 e TNF- α — induzidas por LPS ou LPS e IFN- γ — foram também inibidas por IL-10. Outros estudos (GAZZINELLI *et al.*, 1992; OSWALD *et al.*, 1992; CENCI *et al.*, 1993) verificaram que a IL-10 age inibindo a síntese de óxido nítrico, além de diminuir a capacidade de *killing* de *Candida albicans* por macrófagos peritoniais, enquanto a utilização de anticorpos anti-IL-10 em camundongos altamente susceptíveis a infecções sistêmicas por *Candida albicans* (DBA/2) acarretou em maior síntese de óxido nítrico e maior atividade fungicida por macrófagos

peritoniais (ROMANI *et al.*, 1994). Recentemente, foi verificado que macrófagos peritoniais de camundongos deficientes em produzir IL-10 apresentavam, na presença de LPS, maior produção de TNF- α em relação àquela de macrófagos de camundongos não-mutantes (C57BL/6) (TAKAKURA *et al.*, 2002). Desse modo, pode-se sugerir que a maior síntese de IL-10 por macrófagos peritoniais do grupo DESM em relação ao grupo AMAM explicaria, em parte, a significativa redução de diversos parâmetros relacionados à funcionalidade dessas células.

A suplementação com glutamina *in vivo* reverteu a diminuição da capacidade de síntese de IL-1 (24 h), IL-6 (2, 4 e 24 h) e TNF- α (24 h), apesar dessa intervenção nutricional ter promovido aumento da síntese de IL-10 em relação ao grupo AMAM entre 8 e 24 horas de cultura de macrófagos. Contudo, ao menos durante as primeiras quatro horas de cultura, a capacidade de síntese de IL-10 por macrófagos peritoniais do grupo GLN foi parcialmente inibida, o que desse modo pode ter favorecido o aumento da secreção e/ou da expressão gênica das citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α . Nesse contexto, verifica-se que, em culturas de monócitos, a IL-10 promove o bloqueio da atividade do fator de transcrição NF- κ B, o qual está envolvido na modulação de genes que codificam para as citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α . A IL-10 pode atuar sobre os mecanismos de ação do NF- κ B de dois modos. Primeiro, por meio da supressão da atividade do complexo enzimático IKK (SCHOTTELIUS *et al.*, 1999). Esse complexo é composto de duas subunidades catalíticas IKK α e IKK β e uma subunidade regulatória IKK γ e induz a fosforilação do I κ B. A fosforilação do I κ B — proteína que inativa o heterodímero p50/p65 (NF- κ B) — resulta na sua poliubiquitinação, a qual, por sua vez, acarreta na sua degradação mediada pelo proteossoma 26S, o que permite, desse modo, que o NF- κ B se transloque para o interior do núcleo celular e ative a transcrição de diversos genes dependentes do κ B, como genes de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6 (HATADA *et al.*, 2000; MAGNANI *et al.*, 2000; DOBROVOLSKAIA e VOGEL, 2002; HANADA e YOSHIMURA, 2002; FUJIHARA *et al.*, 2003; KAWAI e AKIRA, 2005). Segundo, por meio da inibição da capacidade de ligação do fator de transcrição NF- κ B à região promotora de genes que codificam para proteínas envolvidas nos processos inflamatório e imunológico (SCHOTTELIUS *et al.*, 1999). Aliada a essa hipótese, relacionando os possíveis efeitos da suplementação com glutamina *in vivo* sobre a síntese

de IL-10 *in vitro* a partir de macrófagos peritoniais, deve-se também considerar o papel da glutamina na ativação do fator de transcrição NF- κ B, o qual ainda permanece para ser elucidado em macrófagos ativado com LPS.

Apesar da suplementação com glutamina, por meio da ração, ter revertido a redução da síntese de TNF- α com 24 h de cultura celular induzida pelo desmame precoce associado à ingestão de ração isenta de glutamina, é fundamental ressaltar que essa intervenção nutricional não reverteu a menor síntese de TNF- α com 2, 4 e 8 horas de cultura celular. Uma vez que o TNF- α está envolvido na aderência de neutrófilos às células endoteliais e às proteínas da matriz extracelular, no aumento da fagocitose e da citotoxicidade celular dependente de anticorpos e na indução da síntese de IL-1, IL-6 e prostaglandinas (MIRE-SLUIS e THORPE, 1998), pode-se sugerir que a suplementação com glutamina pela dieta não seja eficaz nos eventos iniciais do processo inflamatório e infeccioso em bebês precocemente desmamados.

Uma vez que na etapa 1 os testes de avaliação da funcionalidade de macrófagos foram realizados com ausência de glutamina, durante os ensaios *in vitro* para os grupos AMAM, DESM e GLN, pôde-se constatar que a suplementação com glutamina, por meio da ração, reverteu parcialmente, *in vivo*, as alterações induzidas pelo desmame precoce sobre a funcionalidade de macrófagos. Esse fato implica que o fornecimento exógeno de glutamina para camundongos desmamados precocemente atua na modulação da função de macrófagos. Todavia, cabe ainda elucidar se essa modulação exercida pela glutamina em macrófagos é decorrente da sua metabolização nessas células, que gera substratos para diversas vias bioquímicas, ou se decorre da ação, direta ou indireta, desse aminoácido sobre a expressão de genes regulatórios, relacionados, por exemplo, à função fagocitária ou ao processo inflamatório.

Cabe ressaltar que o desmame precoce *per se* privou os animais dos grupos DESM e GLN de diversos fatores bioativos presentes no leite materno, os quais influenciam a resposta imune em bebês e, desse modo, também estão envolvidos nos resultados observados na etapa 1. Dentre esses fatores, destacam-se citocinas (por exemplo, IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, TNF- α), hormônios (eritropoietina, cortisol, estrógeno, insulina), compostos antimicrobianos (lactoferrina, lactoperoxidase, IgA), fatores de crescimento (IGF-1, fator de crescimento neuronal, TGF- α , TGF- β), células do

sistema imune (neutrófilos, macrófagos, linfócitos) e a presença de nutrientes que modulam a resposta imune, como ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (GROSVENOR *et al.*, 1993; MILLER-GILBERT *et al.*, 2001; SEMBA e JULL, 2002; GERSTING *et al.*, 2003; FIELD, 2005).

Na etapa 1, a suplementação com glutamina *in vivo* reverteu parcialmente o prejuízo da função de macrófagos peritoniais induzido pelo desmame precoce associado à ausência de ingestão de glutamina. Contudo, uma vez que, durante os testes de avaliação da funcionalidade de macrófagos na etapa 1, o meio utilizado na cultura de macrófagos não continha glutamina, verifica-se que os resultados obtidos nessa etapa estão diretamente relacionados à modulação da função de macrófagos, *in vivo*, induzida pela ingestão de glutamina durante o período de 7 dias de vida. Sendo assim, propôs-se na etapa 2 do presente trabalho a investigação do papel da suplementação com glutamina *in vitro* na reversão, parcial ou total, do prejuízo da funcionalidade de macrófagos peritoniais induzido pelo desmame precoce associado à ingestão de ração isenta de glutamina.

8.2 Etapa 2

A partir dos resultados verificados na etapa 1 do presente trabalho, conclui-se que o desmame precoce associado à ingestão de ração isenta de glutamina (grupo DESM) diminui a funcionalidade de macrófagos peritoniais de camundongos, ao mesmo tempo em que a suplementação com glutamina por meio da ração reverte parcialmente o prejuízo sobre a função de macrófagos peritoniais verificado no grupo DESM. Uma vez que algumas alterações relacionadas à função de macrófagos poderiam ser decorrentes não apenas da ingestão de glutamina pela ração, mas da presença desse aminoácido durante o período de cultura de macrófagos peritoniais, foi proposta a avaliação do efeito da suplementação com glutamina *in vitro* sobre a função de macrófagos de camundongos do grupo DESM.

Na etapa 2 foi constatado que a suplementação *in vitro* com glutamina reverteu alguns dos efeitos induzidos pelo desmame precoce sobre a funcionalidade de macrófagos peritoniais, como a capacidade de adesão (24 h), de espraiamento e de fagocitose e a síntese de peróxido de hidrogênio, de óxido nítrico (24 h), de IL-6 (24 h) e de IL-10. Contudo, essa intervenção não foi eficiente em reverter a diminuição da capacidade de adesão — entre 30 e 120 minutos —, da atividade fungicida e da síntese de óxido nítrico (48 e 72 h), TNF- α , IL-1 (4 e 24 h) e IL-6 (2 e 4 horas) induzida pelo desmame precoce. Concomitantemente, foi avaliado se a suplementação *in vitro* com glutamina em concentrações iguais àquelas observadas no plasma dos grupos AMAM (0,58 mmol/L) e DESM (0,5 mmol/L) poderia influenciar na funcionalidade de macrófagos peritoniais do grupo DESM. No que concerne a esse fato, foi verificado que alguns parâmetros de funcionalidade de macrófagos do grupo DESM foram responsivos às diferentes concentrações extracelulares de glutamina utilizadas na etapa 2 (0,5; 0,58; 1 e 2 mmol/L). Nesse contexto, verificou-se que as concentrações de 0,5 e 0,58 mM de glutamina não possibilitaram a reversão da capacidade de adesão e de síntese de IL-6 com 24 h de ensaio, bem como essas concentrações não foram suficientes para a reversão da síntese de peróxido de hidrogênio, ao mesmo tempo em que a concentração de 0,5 mM — equivalente à concentração plasmática de glutamina do grupo DESM — não promoveu a reversão da área

sob a curva referente à cinética de síntese de óxido nítrico, sendo o valor dessa área nas culturas de macrófagos suplementados com 0,5 mmol/L de glutamina apenas significativamente maior em relação àquela do grupo DESM, porém significativamente inferior em relação ao grupo AMAM. Desse modo, esses resultados indicam relação entre a concentração plasmática de glutamina e a funcionalidade de macrófagos em camundongos desmamados precocemente.

Diferente dos linfócitos — que se caracterizam como células de divisão rápida —, macrófagos são células em estágio final de maturação, as quais perderam a sua capacidade de divisão. Não obstante, essas células são ativas e caracterizadas por elevadas taxas de secreção de proteínas e de *turnover* de estruturas presentes na membrana plasmática. A fagocitose é uma das relevantes funções desempenhadas por macrófagos, pela qual microorganismos, partículas estranhas e células tumorais são destruídos. Cabe destacar que a capacidade de fagocitose tanto de monócitos quanto de macrófagos é dependente da concentração extracelular de glutamina (PARRY-BILLINGS *et al.*, 1990; WALLACE e KEAST, 1992; SPITTLER *et al.*, 1995; SPITTLER *et al.*, 1997; FURUKAWA *et al.*, 2000). O processo de fagocitose por macrófagos permite que, após a digestão intracelular do antígeno, peptídeos resultantes desse processo sejam apresentados na membrana plasmática de macrófagos por meio das moléculas de classe II do MHC para linfócitos T *helper*. Esse fato é de extrema relevância, uma vez que macrófagos (imunidade inata) estimulam a proliferação de linfócitos T *helper* (imunidade adquirida), os quais, por sua vez, promovem a proliferação de linfócitos B (BEUTLER, 2004).

Na etapa 1 do presente estudo foi possível verificar associação entre a diminuição da concentração plasmática e muscular de glutamina e a redução da funcionalidade de macrófagos peritoniais em camundongos desmamados precocemente. Na etapa 2 foi investigada uma possível relação entre esses fatos, por meio da avaliação do efeito da concentração de glutamina presente no meio de cultura sobre a capacidade de fagocitose e atividade fungicida de macrófagos peritoniais. A suplementação *in vitro* com glutamina reverteu a diminuição da capacidade de fagocitose de *Candida albicans* verificada no grupo DESM. Esse resultado deve estar associado ao fato da diminuição da concentração extracelular de glutamina acarretar na diminuição da expressão

de moléculas de classe II do MHC, ao mesmo tempo em que provoca redução da expressão do receptor para a imunoglobulina IgG (FcγRI), dos receptores para complemento denominados CR3 (CD11b/CD18) e CR4 (CD11c/CD18) e da molécula de adesão intercelular-1 denominada ICAM-1 (CD54) (SPITTLER *et al.*, 1995). Outro aspecto relevante relacionado ao papel da glutamina no processo de fagocitose de macrófagos é que a diminuição da concentração de glutamina extracelular promove redução da concentração de ATP intracelular, o que, por sua vez, pode alterar a organização do citoesqueleto celular — rompimento de microfilamentos — e, desse modo, afetar a capacidade de fagocitose (HINSHAW *et al.*, 1993; SPITTLER *et al.*, 1995). Além disso, esse aminoácido atua na síntese de RNA, que é importante para a síntese de proteínas, incluindo proteínas de membranas, citocinas e enzimas lisossomais (WALLACE e KEAST, 1992).

O aumento da capacidade de fagocitose de macrófagos peritoniais do grupo DESM por meio da suplementação *in vitro* com glutamina está também relacionado ao aumento da capacidade de espraiamento dessas células induzido pela suplementação *in vitro* com glutamina, uma vez que o processo de fagocitose inicia-se com o espraiamento do macrófago — que representa um relevante mecanismo de interação entre o fagócito e a partícula a ser englobada — concomitante à redistribuição das organelas citoplasmáticas (RABINOVITCH e DESTEFANO, 1973; ADEREM e UNDERHILL, 1999; SAMPAIO *et al.*, 2001).

Apesar da suplementação tanto *in vivo* (etapa 1) quanto *in vitro* (etapa 2) com glutamina reverterem a diminuição da capacidade de fagocitose induzida pelo desmame precoce, verificou-se que essas intervenções não tiveram efeito sobre a atividade fungicida de macrófagos de camundongos desmamados precocemente durante o teste de fagocitose. Esse fato observado *in vitro* é de extrema importância quando extrapolado para situações *in vivo*, uma vez que infecções a partir de *Candida*, especialmente *Candida albicans*, são comuns em bebês (MARÓDI *et al.*, 1994). Tendo em vista que a suplementação com glutamina não reverte a diminuição da atividade fungicida induzida pelo desmame precoce, outros possíveis mecanismos estão relacionados a esse resultado.

Candida albicans podem estimular a síntese de TNF- α a partir de macrófagos peritoniais, uma vez que essa citocina é detectável em sobrenadante de co-culturas de *Candida albicans* e macrófagos e no soro de animais infectados com este patógeno. Louie *et al.* (1994) verificaram, em um modelo murino de candidíase sistêmica, que a síntese de TNF- α durante a infecção com *Candida albicans* aumentou a defesa do hospedeiro por meio da inibição do crescimento desse patógeno, ao mesmo tempo em que prolongou a sobrevivência. Desse modo, é possível que a menor concentração de TNF- α produzida por macrófagos peritoniais observada no grupo DESM — suplementados ou não com glutamina *in vitro* — tenha influenciado na redução da atividade fungicida de macrófagos peritoniais observada nesse grupo. Cabe ainda ressaltar que a estimulação de macrófagos com LPS promove a reorganização dos microfilamentos nessas células, sendo essa resposta do citoesqueleto envolvida na via de transdução de sinal para a síntese de citocinas (SHINJI *et al.*, 1993). Corroborando esse fato, Rosengart *et al.* (2002) verificaram que monócitos aderentes aumentam a transcrição e a síntese de TNF- α em resposta ao estímulo com LPS, sendo essa resposta específica para o processo de aderência. Diante desses fatos, pode-se sugerir que (no presente trabalho) a diminuição da capacidade de adesão (30-120 minutos) de macrófagos do grupo DESM favoreceu a diminuição da síntese de TNF- α (2-24 horas), a qual, por sua vez, está relacionada à redução da capacidade fungicida no grupo DESM, sendo essas alterações funcionais não revertidas pela suplementação *in vitro* com glutamina.

IFN- γ provoca potente ativação de macrófagos peritoniais, uma vez que essa citocina induz o aumento da capacidade bactericida e fungicida e da síntese de espécies reativas de oxigênio por essas células, ao mesmo tempo em que promove diminuição do pH intrafagolisossomal (WATANABE *et al.*, 1991). No presente estudo, apesar da concentração de IFN- γ no meio de cultura de macrófagos peritoniais não ter sido avaliada, é relevante ressaltar que essa citocina está envolvida na atividade fungicida de macrófagos peritoniais, sendo esse fator um dos possíveis mecanismos relacionados à menor atividade fungicida de macrófagos, tanto do grupo DESM quanto do grupo GLN (MARÓDI *et al.*, 1991; MARÓDI *et al.*, 1993; ASHMAN e PAPADIMITRIOU, 1995). Essa hipótese é relevante, uma vez que tanto a

suplementação com glutamina *in vivo* quanto *in vitro* não foram eficientes em reverter o prejuízo da atividade fungicida em camundongos desmamados precocemente.

Na etapa 2 foi verificado que a suplementação *in vitro* com glutamina acarretou em significativa diminuição da produção de IL-10 a partir de macrófagos peritoneais do grupo DESM em comparação àquela desse mesmo grupo quando não suplementado com glutamina. Cabe ressaltar que a síntese de IL-10 a partir de macrófagos peritoneais do grupo DESM quando suplementados *in vitro* com glutamina não diferiu significativamente em relação ao grupo AMAM. Esse efeito da suplementação *in vitro* com glutamina pode responder, em parte, pelo aumento de alguns parâmetros relativos à funcionalidade dessas células, uma vez que a citocina IL-10 age diminuindo significativamente a capacidade de síntese de IL-1, IL-6, TNF- α , peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, ao mesmo tempo em que reduz a atividade fungicida e a capacidade de adesão e de espraiamento de macrófagos peritoneais de camundongos (BOGDAN *et al.*, 1991; FIORENTINO *et al.*, 1991; GAZZINELLI *et al.*, 1992; OSWALD *et al.*, 1992; CENCI *et al.*, 1993; CAVAILLON *et al.*, 1994; ROMANI *et al.*, 1994; SALEZ *et al.*, 2000; TAKAKURA *et al.*, 2002). Todavia, apesar dessa diminuição da concentração de IL-10 nos grupos DESM suplementados com glutamina, esse fato não influenciou na produção de TNF- α , atividade fungicida e capacidade de adesão de macrófagos, o que implica que o desmame precoce altera esses parâmetros por mecanismos não dependentes da concentração de IL-10 ou da presença de glutamina extracelular em concentrações entre 0,5 e 2 mmol/L.

A partir da análise dos resultados da etapa 1 do presente estudo, verificou-se que a suplementação com glutamina *in vivo* também promoveu menor síntese de IL-10 em relação ao grupo DESM, porém apenas durante as quatro horas iniciais do período de cultura de macrófagos peritoneais. Uma vez que todos os ensaios com macrófagos peritoneais na etapa 1 foram realizados com meio de cultura isento de glutamina, esse fato corrobora a importância da concentração extracelular de glutamina na modulação da síntese de IL-10 a partir de macrófagos peritoneais de camundongos desmamados precocemente.

Durante a resposta inflamatória, macrófagos estimulados são capazes de sintetizar citocinas como IL-1 β e IL-6. Nessas células, a IL-1 β é sintetizada

como uma pró-forma, acumulando-se no citosol, sendo parte dessas processadas para uma forma madura, a qual é secretada. Por outro lado, a IL-6 é sintetizada na sua forma madura e, posteriormente, secretada (ARAI *et al.*, 1990). A glutamina pode modular a síntese de IL-1 β (WALLACE e KEAST, 1992; YASSAD *et al.*, 2000) e de IL-6 (YASSAD *et al.*, 1997; YASSAD *et al.*, 2000) em macrófagos peritoniais. Yassad *et al.* (2000) compararam a síntese e a secreção de IL-1 β e IL-6 em macrófagos peritoniais estimulados com LPS e o efeito da adição de glutamina ao meio de cultura. O estímulo com LPS promoveu aumento tanto do RNAm quanto da síntese de IL-1 β e IL-6. A IL-1 β acumulou-se principalmente no citosol e a IL-6 no meio de cultura. Esses autores verificaram que a adição de glutamina ao meio de cultura aumentou a síntese total (intra + extracelular) de IL-1 β (aumento de duas vezes) e de IL-6 (aumento de 1,3 vezes). Todavia, esses efeitos da glutamina não foram associados com correspondente aumento do RNAm para essas citocinas, uma vez que a glutamina induziu diminuição de 56 e 60% do RNAm com 3 horas de cultura para IL-1 β e IL-6, respectivamente, o que sugere que a glutamina deva estimular a síntese dessas citocinas em nível traducional. Diferentemente desse estudo, na etapa 2 do presente trabalho, verificou-se ausência de efeito da suplementação com glutamina *in vitro* sobre a síntese de IL-1 β a partir de macrófagos. Contudo, a suplementação com glutamina por meio da ração (etapa 1) promoveu a reversão do prejuízo da síntese de IL-1 β apenas com 24 horas de cultura de macrófagos peritoniais, o que pode implicar que essa intervenção nutricional promova aumento da tradução do RNAm e/ou da taxa de secreção dessa citocina. Diferentemente, a suplementação *in vitro* com glutamina não reverteu a diminuição da síntese de IL-6 com 2 e 4 horas de cultura verificada em macrófagos do grupo DESM, porém foi efetiva em reverter a diminuição da síntese dessa citocina com 24 horas de cultura, sendo esse efeito dependente da concentração extracelular de glutamina, uma vez que apenas as concentrações de 1 e 2 mM de glutamina propiciaram tal reversão.

Em macrófagos, a formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, como ânion superóxido e óxido nítrico, respectivamente, é dependente de NADPH, sendo essas reações catalisadas pelas enzimas NADPH oxidase e iNOS, respectivamente. NADPH é também necessário para

a formação de novas proteínas, DNA ou RNA. A glutamina, por meio da via catabólica envolvendo a enzima malato desidrogenase dependente de NADP⁺ [glutamina → glutamato → α-cetoglutarato → malato → piruvato] pode gerar NADPH para atender a demanda celular. A reação catalisada pela enzima malato desidrogenase dependente de NADP⁺ resulta na formação de piruvato, o qual pode ser convertido para lactato (citosol) ou para acetil-CoA (mitocôndria) e, desse modo, para CO₂. Portanto, dependendo da demanda de energia da célula, a glutamina pode ser parcialmente oxidada por meio da glutaminólise, ou pode ser completamente oxidada (ao menos em macrófagos); contudo, uma das conseqüências em qualquer uma dessas vias metabólicas é a síntese de NADPH (MURPHY e NEWSHOLME, 1998; NEWSHOLME *et al.*, 1999; NEWSHOLME *et al.*, 2003).

Na etapa 2 foi constatado que a suplementação com glutamina reverteu a diminuição da síntese de óxido nítrico induzida pelo desmame precoce associado à ingestão de ração isenta de glutamina. Uma importante questão que surge a partir desse resultado é como o fornecimento exógeno de glutamina pode aumentar a produção de óxido nítrico em macrófagos estimulados com LPS, uma vez que a síntese de óxido nítrico é catalisada pela enzima iNOS, que apresenta como substrato o aminoácido L-arginina (BELLOWS e JAFFE, 1999). Murphy e Newsholme (1998) verificaram que macrófagos peritoniais de camundongos apresentam a capacidade de utilizar glutamina em altas taxas, ao mesmo tempo em que contêm atividade suficiente de enzimas envolvidas na conversão de glutamina para citrulina e, subseqüentemente, citrulina para arginina.

Portanto, macrófagos têm a capacidade de converter glutamina em arginina, o que pode resultar na síntese de óxido nítrico. A síntese de NADPH a partir do metabolismo da glutamina também pode modular a síntese de óxido nítrico, uma vez que a enzima iNOS utiliza NADPH na reação de redução da L-arginina, que resulta na produção de óxido nítrico e citrulina (NEWSHOLME, 2001; NEWSHOLME *et al.*, 2003). Desse modo, a suplementação com glutamina *in vitro* no presente trabalho pode ter influenciado a síntese de óxido nítrico em macrófagos peritoniais por dois mecanismos. Primeiro, a atividade da enzima iNOS presente em macrófagos é dependente de NADPH, o qual pode ser oriundo do metabolismo da glutamina.

Segundo, macrófagos estimulados aumentam a secreção de arginase, o que diminui a concentração extracelular de arginina e, desse modo, aumenta a taxa de utilização intracelular de glutamina, que atua como precursor de arginina.

A análise dos resultados das etapas 1 e 2 demonstram alguns efeitos similares decorrentes das suplementações com glutamina *in vivo* e *in vitro*. Nesse contexto, verificou-se que ambas as intervenções reverteram a diminuição da capacidade de espraiamento e de síntese de óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e de IL-6. Contudo, a suplementação com glutamina por meio da ração se mostrou mais eficaz sobre a síntese das citocinas TNF- α e IL-1 β . Cabe ressaltar que ambas as intervenções não reverteram a diminuição da capacidade fungicida, bem como da capacidade de adesão (30-120 minutos). A suplementação com glutamina *in vivo* retardou o aumento da síntese de IL-10 durante as primeiras 4 horas de cultura de macrófagos, enquanto a suplementação com glutamina *in vitro* promoveu diminuição da síntese dessa citocina em macrófagos peritoniais do grupo DESM, o que indica que a concentração extracelular de glutamina representa um fator relevante na modulação da secreção, síntese e/ou expressão gênica de IL-10.

8.3 Etapa 3

Na etapa 3 do presente trabalho investigou-se o efeito da suplementação crônica com glutamina sobre o estado nutricional e a funcionalidade de macrófagos peritoniais de camundongos desmamados precocemente e infectados *in vivo* com BCG. Para tanto, foram utilizados apenas animais desmamados precocemente no 14º dia de vida, os quais foram submetidos à ingestão crônica de uma ração isenta ou suplementada com o aminoácido glutamina, que foi formulada para roedores em crescimento de acordo com o *American Institute of Nutrition* (REEVES *et al.*, 1993). Aliado a esse fato, também foi avaliado o efeito da inoculação intraperitoneal com BCG, que teve como intuito simular um quadro de infecção e promover a migração e ativação de macrófagos na região peritoneal.

Apesar do consumo de ração não ter diferido significativamente entre os grupos da etapa 3, verificou-se que os grupos inoculados com BCG apresentaram menor massa corporal ao final do protocolo experimental. Esse fato está relacionado principalmente à perda de massa corporal observada nas 48 horas posteriores à inoculação com BCG (21º dia de vida), ao mesmo tempo em que se verificou que o consumo de ração também foi reduzido significativamente por 24 horas após a inoculação com BCG. Esses fatos evidenciam que a infecção ocasionada pela inoculação do BCG é, de forma aguda, prejudicial para o crescimento do animal.

A resposta central do organismo frente à infecção é a ativação dos sistemas de defesa do hospedeiro e a concomitante mobilização de proteínas corporais, as quais fornecem aminoácidos que atendem a demanda da resposta hipermetabólica induzida pela infecção (SAMUELS e BARACOS, 1995). Nesse contexto, verifica-se, por exemplo, em animais em crescimento, que a infecção é manifestada por balanço nitrogenado negativo e perda de proteína corporal, sendo o músculo esquelético um relevante tecido envolvido no catabolismo protéico. A completa recuperação a partir da infecção envolve a recuperação dos estoques corporais e o retorno para a trajetória de crescimento original. Para a ocorrência de tal fato, é necessária que a taxa de crescimento dos animais infectados seja superior àquela esperada em animais saudáveis da mesma idade, o que é denominado de *catch-up growth*

(SAMUELS e BARACOS, 1992). Diante desses fatos, verificou-se, no presente estudo, que os animais inoculados com BCG apresentaram, após o prejuízo induzido pela inoculação com BCG sobre o crescimento corporal, aumento do balanço protéico corporal, o qual foi constatado pela ausência de diferença significativa no conteúdo de proteína presente na carcaça, o que evidencia um dos mecanismos envolvidos no *catch-up growth*.

Os animais do grupo +GLN/+BCG apresentaram maior concentração de proteína muscular em relação ao grupo -GLN/+BCG. Nesse contexto, é provável que apesar da ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos -GLN/+BCG e +GLN/+BCG em relação à concentração muscular de glutamina, a maior ingestão desse aminoácido cronicamente tenha favorecido a síntese de proteínas no músculo gastrocnêmio, uma vez que existe relação positiva entre a taxa de síntese protéica e a concentração muscular de glutamina até o limite de expansão do *pool* de glutamina intramuscular (MACLENNAN *et al.*, 1987; MILLWARD *et al.*, 1989). Além disso, a glutamina intramuscular influencia significativamente a degradação protéica muscular, uma vez que o aumento da concentração intramuscular de glutamina promove a inibição da proteólise muscular (MACLENNAN *et al.*, 1988). A maior concentração sérica de IGF-1 do grupo +GLN/+BCG em comparação ao grupo -GLN/+BCG também representa outro possível mecanismo relacionado à maior concentração de proteína muscular no grupo +GLN/+BCG em comparação ao grupo -GLN/+BCG, uma vez que o IGF-1 atua no organismo promovendo a proliferação celular e a síntese de proteoglicanos pelos tecidos cartilaginoso, conectivo e ósseo, ao mesmo tempo em que medeia o efeito anabólico e de promoção de crescimento linear exercido pelo GH hipofisário. A principal fonte de IGF-1 é o tecido hepático e é transportado para outros tecidos (ação endócrina), sendo também secretado por outros tecidos, incluindo as células cartilaginosas, onde age localmente (ação parácrina) (LARON, 2001; GOMES *et al.*, 2004).

Em relação aos parâmetros indicativos do estado nutricional, foi verificado que a infecção *in vivo* com BCG acarretou em menor concentração de ferro sérico. Esse fato está relacionado a uma das respostas iniciais do organismo frente a infecções bacterianas. Tem sido proposto que a citocina IL-1 induz a diminuição da concentração sérica de ferro como uma resposta de

fase aguda. A presença de ferro no organismo não é apenas relevante para a síntese de hemoglobina, uma vez que estudos demonstram que esse mineral atua na imunocompetência. O ferro participa da proliferação e maturação de células do sistema imune, bem como de células tumorais, bactérias e parasitas. Desse modo, sugere-se que a diminuição da concentração sérica de ferro é consequência do seqüestro desse mineral pelo organismo no intuito de controlar a proliferação bacteriana, ou seja, atuando como um mecanismo bacteriostático do organismo (WARD *et al.*, 1996; SUNDER-PLASSMANN *et al.*, 1999; BULLEN *et al.*, 2005). A diminuição da concentração sérica de ferro é devida às proteínas ligadoras deste mineral — transferrina e lactoferrina — estarem normalmente com apenas 30-40% de saturação com ferro e apresentarem alta constante de associação (10^{36}) com este elemento na sua forma férrica (BULLEN *et al.*, 2006). Cabe ressaltar que o crescimento de uma variedade de bactérias e fungos é inibido *in vitro* pela transferrina e lactoferrina (OPPENHEIMER, 2001).

Ainda em relação aos parâmetros indicativos do estado nutricional, não foram encontradas alterações relacionadas ao metabolismo da glutamina, como concentração plasmática e muscular desse aminoácido e atividade máxima da enzima glutamina sintetase no músculo gastrocnêmio. A ausência de alteração da concentração plasmática de glutamina nos grupos suplementados com esse aminoácido tem sido relatada em outros estudos (SHEWCHUK *et al.*, 1997; WELLS *et al.*, 1999). Dentre os possíveis mecanismos relacionados à ausência de alteração da concentração plasmática de glutamina observada entre os grupos da etapa 3 destaca-se o aumento da captação tecidual de glutamina, decorrente do aumento do fornecimento desse aminoácido a partir da circulação sangüínea. De acordo com Parry-Billings e Newsholme (1991), a manutenção da concentração plasmática de glutamina está relacionada ao ciclo de translocação entre os aminoácidos glutamina e glutamato no músculo esquelético, que envolve a captação e liberação de glutamina mediada por transportadores localizados na membrana plasmática dos miócitos. Desse modo, o aumento da concentração plasmática de glutamina induzida pela ingestão de glutamina promove o aumento da captação muscular de glutamina e, conseqüentemente, a diminuição na liberação de glutamina. Por outro lado, a redução da concentração plasmática

desse aminoácido promove menor taxa de captação e, conseqüentemente, aumento do efluxo de glutamina, fato este que auxilia na manutenção da concentração plasmática de glutamina. Cabe ressaltar que a taxa de liberação muscular de glutamina é independente da concentração intramuscular desse aminoácido. Além disso, outros estudos propõem que os limitados efeitos da suplementação com glutamina na ração sobre a concentração plasmática desse aminoácido provavelmente reflitam a utilização da glutamina pelo intestino e fígado (ROGERO *et al.*, 2004; ROGERO *et al.*, 2006).

Apesar da ausência de alteração da concentração plasmática e muscular de glutamina nos grupos suplementados com esse aminoácido na ração, verificou-se que a suplementação com glutamina atuou em células e tecidos altamente dependentes desse aminoácido. Desse modo, observou-se que a suplementação com glutamina acarretou em maior contagem total de leucócitos e de linfócitos no sangue periférico e elevação de alguns parâmetros relacionados à funcionalidade de macrófagos peritoniais. Cabe destacar que o grupo +GLN/-BCG apresentou maior contagem de linfócitos tanto na medula óssea quanto no baço em relação ao grupo -GLN/-BCG, o que indica que a suplementação com glutamina promove maior proliferação e/ou redução da apoptose de linfócitos em tecidos hematopoiéticos de camundongos. Nesse contexto, destaca-se que a glutamina é fundamental nos processos de divisão celular, incluindo a hemopoiese, na medula óssea, uma vez que esse aminoácido participa da biossíntese de nucleotídeos, como doador de nitrogênio para a síntese de pirimidinas e purinas (DASS *et al.*, 1984; BULUS *et al.*, 1989; PARRY-BILLINGS *et al.*, 1989; NEWSHOLME e PARRY-BILLINGS, 1990).

A hemopoese é controlada por fatores de crescimento, sendo alguns específicos, que atuam sobre as células em vários estágios na cascata hematopoiética para produzir células maduras tanto da linhagem mielóide quanto linfóide. Dentre esses fatores, destaca-se o G-CSF, proteína que atua sobre a linhagem mielóide, especialmente a neutrofílica, estimulando a proliferação e diferenciação de células progenitoras comprometidas, ao mesmo tempo em que promove a ativação de neutrófilos maduros. Vários tipos celulares sintetizam o G-CSF, incluindo macrófagos, monócitos, fibroblastos e células estromais e endoteliais e, desse modo, essas células estão envolvidas

no aumento da produção e da capacidade funcional de neutrófilos que ocorre em resposta à infecção local (URBASCHEK e URBASCHEK, 1983; MIRESLUIS e THORPE, 1998). Esse papel do G-CSF regulando a produção de neutrófilos pode estar envolvido com os resultados observados na etapa 3 do presente estudo, no qual se verificou, por meio da análise do leucograma, que os animais inoculados com BCG tiveram maior contagem de neutrófilos e, concomitantemente, menor contagem de linfócitos em relação aos seus respectivos grupos que não foram inoculados com BCG. No intuito de verificar se essa alteração observada no leucograma estava relacionada ao estímulo induzido pela inoculação com BCG sobre a concentração de G-CSF na medula óssea (BUHLES e SHIFRINE, 1978; SINGER E BERNSTEIN, 1978), foi realizado o mielograma dos animais da etapa 3, pelo qual se constatou que a contagem de células da linhagem granulocítica também foi maior nos grupos inoculados com BCG em relação aos grupos não inoculados. Desse modo, constata-se que a inoculação de BCG é também capaz de induzir estimulação da granulopoese em animais desmamados precocemente.

Aliado ao aumento da granulopoese induzida pela inoculação com BCG, verificou-se também que essa intervenção promoveu redução da contagem de células do setor eritróide na medula óssea em relação aos grupos não inoculados com BCG. Esse fato está relacionado à infecção com BCG — entre o 3º e o 7º dias após a inoculação — promover diminuição da população de células responsivas à eritropoietina (MARCHAL e MILON, 1986). Dentre os mecanismos envolvidos nesse fato, postula-se que, posteriormente ao processo de fagocitose de bacilos viáveis por macrófagos residentes da medula óssea e, conseqüente apresentação de determinantes de BCG no contexto das moléculas de classe II do MHC para linfócitos T, há o aumento de linfócitos T específicos para BCG, os quais alcançam o seu número máximo entre 5 e 6 dias após a inoculação. Dentro desse período, progenitores de células fagocíticas comprometidas podem sofrer modulação por linfócitos T, o que promove o aumento da produção de fagócitos. Nesse contexto, fatores hematopoiéticos derivados de células T (GM-CSF, IL-3) podem ligar-se em receptores de células progenitoras de fagócitos — os quais demonstram maior concentração de receptores para GM-CSF — preferivelmente do que em precursores eritróides (MARCHAL e MILON, 1981; MARCHAL e MILON, 1986).

No presente trabalho verificou-se que macrófagos peritoniais obtidos dos grupos inoculados com BCG apresentaram maior capacidade de síntese de TNF- α e IL-1 β em relação aos grupos não inoculados com BCG. Esse fato pode também elucidar os mecanismos envolvidos na redução da eritropoiese induzida pela inoculação com BCG, uma vez que as citocinas IL-1 e TNF- α apresentam efeito inibitório sobre os precursores eritróides presentes na medula óssea. O efeito inibitório do TNF- α sobre a eritropoiese é indireto, sendo parcialmente mediado pela síntese de IFN- β por células estromais da medula óssea. Igualmente indireto é o efeito inibitório da IL-1 sobre a eritropoiese, o qual é mediado pelo IFN- γ sintetizado por linfócitos T (BERTERO e CALIGARIS-CAPPIO, 1997). Neste contexto, verifica-se que o aumento da síntese de IFN- γ em linfócitos T, induzido pela inoculação *in vivo* com BCG, caracteriza a resposta do tipo Th1, que é fundamental na resposta imune mediada por células, que visa a eliminação de patógenos intracelulares, como vírus e bactérias (MOSMANN e SAD, 1996; MARCHANT *et al.*, 1999, SMITH, 2003).

Experimentalmente, macrófagos ativados podem ser obtidos quatro a sete dias após a infecção intraperitoneal com BCG (NEWSHOLME, 2001). A primeira interação do sistema imune com o BCG é por meio dos macrófagos residentes teciduais. Durante a fagocitose da bactéria, receptores de reconhecimento de modelos, como os receptores do tipo Toll, induzem uma variedade de modificações metabólicas no macrófago (BEUTLER e RIETSCHER, 2003; BEUTLER, 2004; KAWAI e AKIRA, 2005). Após as interações iniciais dos macrófagos residentes com o BCG, uma complexa série de eventos promove a ativação de macrófagos. Além disso, observa-se também o extravasamento de monócitos, de células *natural killer* e de linfócitos T para o local inflamado, bem como a interação dessas células com macrófagos e/ou produtos secretados por macrófagos. No local da infecção, células *natural killer* e linfócitos T ativados sintetizam citocinas — como IFN- γ —, que são relevantes para a ativação de macrófagos (MOSMANN e SAD, 1996; HAMERMAN e ADEREM, 2001). Estas células, quando ativadas por BCG, apresentam síntese elevada de ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio, fato esse que aumenta a capacidade microbicida e tumoricida dessas células. Cabe destacar que a ativação de macrófagos acarreta no

aumento do tamanho celular, do conteúdo dos lisossomos e da capacidade fagocitária dessas células, aliada a elevação da síntese e liberação de diversas citocinas, como TNF- α e aumento da expressão de moléculas de classe II do MHC. Além desses fatos, verifica-se que macrófagos apresentam transições funcionais durante a infecção *in vivo* com BCG. Macrófagos ativados com BCG apresentavam elevada capacidade fagocítica no 2º dia após a infecção, enquanto no 12º após a infecção essas células apresentavam elevada síntese de espécies reativas de nitrogênio e de RNAm para TNF- α e moléculas de classe II do MHC. Além disso, macrófagos caracterizam-se como células especializadas na captação fagocítica de patógenos no início da infecção com BCG, ao passo que no 12º dia da infecção tornam-se células especializadas no *killing* de patógenos internalizados (HAMERMAN e ADEREM, 2001).

Nesse contexto, verifica-se, a partir do presente trabalho, que macrófagos peritoniais de camundongos inoculados com BCG (-GLN/+BCG e +GLN/+BCG) apresentaram valores de capacidade de espraiamento e de síntese de TNF- α , IL-1 β , óxido nítrico e peróxido de hidrogênio significativamente superiores àqueles observados nos grupos não inoculados com BCG (-GLN/-BCG e +GLN/-BCG). Concomitantemente, verificou-se que os grupos submetidos à inoculação com BCG apresentam valores de síntese de IL-6 e IL-10 significativamente inferiores àqueles observados nos grupos não inoculados com BCG. A menor síntese de IL-10 verificada nos grupos inoculados com BCG em relação aos grupos não infectados demonstra que macrófagos ativados por BCG são induzidos para uma resposta do tipo Th1, uma vez que a citocina IL-10 inibe o desenvolvimento de linfócitos Th1, aliado ao fato da IL-10 ser considerada a principal citocina imunossupressiva em relação à imunidade mediada por células e à funcionalidade de macrófagos (SMITH, 2003). Portanto, de acordo com o padrão de citocinas observado no presente estudo, verificou-se que macrófagos ativados com BCG, independentemente da suplementação com glutamina, apresentam um padrão de resposta imunológica do tipo Th1, ou seja, no qual há aumento da ativação de macrófagos induzidos pela síntese de interferon- γ a partir de linfócitos T CD4⁺ (SMITH, 2003).

Em relação à maior produção de TNF- α a partir de macrófagos peritoniais dos grupos inoculados com BCG, destaca-se que essa citocina é

essencial para a ativação de uma resposta imune contra patógenos intracelulares. Além disso, o TNF- α está envolvido na formação de granulomas e sua síntese no período inicial da infecção contribui para a eliminação de bactérias, ao mesmo tempo em que, juntamente com a IL-12, induzem a síntese de IFN- γ a partir de linfócitos T (ATKINSON *et al.*, 2000). Além disso, estudos em murinos demonstraram que o TNF- α e o IFN- γ são necessários para a expressão da enzima iNOS, que desempenha papel relevante na morte intracelular de micobactérias (ATKINSON *et al.*, 2000), o que justifica, no presente estudo, o aumento da capacidade de síntese de óxido nítrico a partir de macrófagos peritoniais em ambos os grupos inoculados com BCG em comparação àqueles grupos não inoculados com BCG.

No presente estudo, a comparação entre os grupos submetidos à inoculação com BCG (-GLN/+BCG e +GLN/+BCG) no tocante à funcionalidade de macrófagos peritoniais demonstrou que o grupo suplementado com glutamina apresentou maior capacidade de adesão e de espraiamento, atividade fungicida e síntese de óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e TNF- α em relação ao grupo não suplementado com glutamina. Esses efeitos induzidos pela suplementação com glutamina estão associados às alterações metabólicas induzidas pelo processo de ativação de macrófagos com BCG, o qual promove aumento das alterações relacionadas ao metabolismo da glutamina — aumento da atividade máxima da enzima glutaminase e do consumo de glutamina — e da glicose — aumento da atividade máxima das enzimas hexoquinase e glicose-6-fosfato desidrogenase e do consumo de glicose (COSTA ROSA *et al.*, 1994). Sendo assim, uma vez que há aumento do consumo de glutamina por macrófagos ativados com BCG, sugere-se que a suplementação crônica com glutamina tenha favorecido a ativação da glutaminólise em macrófagos e, conseqüentemente, tenha promovido aumento da capacidade funcional de macrófagos do grupo +GLN/+BCG em relação ao grupo -GLN/+BCG.

É importante ressaltar que, em todos os ensaios *in vitro* de avaliação da funcionalidade de macrófagos peritoniais na etapa 3, o meio foi suplementado com glutamina (2 mmol/L), o que demonstra que qualquer alteração observada na funcionalidade de macrófagos não foi decorrente da privação de glutamina *in vitro*, sendo, portanto, relacionada à ausência de ingestão desse aminoácido

durante o período de 14 dias após o desmame. Nesse contexto, verificou-se que entre os grupos não inoculados com BCG, a suplementação com glutamina pela ração acarretou apenas em aumento da capacidade de adesão e da síntese de IL-6 a partir de macrófagos, evidenciando que a suplementação crônica com glutamina, por meio da ração, em camundongos desmamados precocemente, favoreceu principalmente a funcionalidade de macrófagos previamente ativados *in vivo* com BCG.

A adesão de macrófagos na matriz extracelular é um dos eventos iniciais relacionados à ativação dessas células, uma vez que favorece o aumento da capacidade de espraiamento, de fagocitose e do *killing* de bactérias opsonizadas (BOHNSACK *et al.*, 1985; MERCURIO e SHAW, 1988; SHAW e MERCURIO, 1989; McKINNEY e GALLIN, 1990; NEWMAN e TUCCI, 1990; SHAW *et al.*, 1990). Aliado a esses fatos, constata-se que a síntese de espécies reativas de oxigênio também está relacionada à capacidade de adesão de macrófagos peritoniais, uma vez que macrófagos estimulados com PMA apresentam maior síntese de ânion superóxido quando aderidos em comparação a macrófagos não aderidos (KUNKEL e DUQUE, 1983). Desse modo, verifica-se, no presente estudo, que a menor capacidade de adesão de macrófagos peritoniais observada no grupo -GLN/+BCG pode estar relacionada à diminuição da funcionalidade de macrófagos peritoniais, como redução da capacidade de espraiamento, atividade fungicida e produção de peróxido de hidrogênio quando comparada ao grupo +GLN/+BCG.

É relevante destacar que a capacidade de fagocitar *Candida albicans* não diferiu significativamente entre os grupos -GLN/+BCG e +GLN/+BCG, porém a atividade fungicida frente a esse patógeno foi maior no grupo +GLN/+BCG em comparação ao -GLN/+BCG. Uma vez que a síntese de TNF- α e de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio representa um dos principais fatores na morte de patógenos intracelulares (LOUIE *et al.*, 1994; NEWSHOLME *et al.*, 1996), é possível que a maior síntese de TNF- α , de peróxido de hidrogênio e de óxido nítrico, a partir de macrófagos peritoniais do grupo +GLN/+BCG em comparação àqueles do grupo -GLN/+BCG, tenha atuado como um dos fatores responsáveis por esse resultado.

9. CONCLUSÕES

A partir do presente estudo, conclui-se que:

- O desmame precoce associado à ingestão de ração isenta de glutamina prejudica o crescimento e a composição corporal de camundongos, sendo que a adição de glutamina na ração não reverte esse efeito.
- O desmame precoce associado à ingestão de ração isenta de glutamina diminui a concentração plasmática e muscular de glutamina, fato este que pode ter influenciado na redução da funcionalidade de macrófagos peritoniais de camundongos.
- A suplementação com glutamina pela ração reverte a redução das concentrações hepática e muscular de proteína e DNA induzida pelo desmame precoce associado à ingestão de ração isenta de glutamina em camundongos.
- O desmame precoce associado à ingestão de ração isenta de glutamina prejudica a resposta hematopoiética, o que ocasiona diminuição da contagem total de leucócitos e de linfócitos no sangue periférico de camundongos, sendo que a adição de glutamina na ração não reverte esse efeito.
- O desmame precoce associado à ingestão de ração isenta de glutamina prejudica a funcionalidade de macrófagos peritoniais, enquanto as suplementações, *in vivo* e *in vitro*, com glutamina revertem parcialmente esse efeito. Todavia, ambas as suplementações não são eficientes em reverter o prejuízo da atividade fungicida e da capacidade de síntese do fator de necrose tumoral a partir de macrófagos peritoniais de camundongos.
- A suplementação crônica com glutamina promove aumento da função de macrófagos peritoniais de camundongos previamente inoculados com BCG.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEREM, A.; UNDERHILL, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual Review of Immunology**, v.17, p.593-623, 1999.

ADJEI, A.A.; MATSUMOTO, Y.; OKU, T.; HIROI, Y.; YAMAMOTO, S. Dietary arginine and glutamine combination improves survival in septic mice. **Nutrition Research**, v.14, p.1591-1599, 1994.

ADKINS, B. T-cell function in newborn mice and humans. **Immunology Today**, v.20, p.330-335, 1999.

AGEITOS, M.L.; ORAZI, V. Informe sobre la Encuesta de Prevalencia de Lactancia Materna 1995. **Archivos Argentinos de Pediatría**, v.96, p.50-51, 1998.

AGOSTONI, C.; CARRAT, B.; BONIGLIA, C.; RIVA, E.; SANZINI, E. Free amino acid content in standard infant formulas: comparison with human milk. **Journal of the American College of Nutrition**, v.19, p.434-438, 2000a.

AGOSTONI, C.; CARRATU, B.; BONIGLIA, C.; RIVA, E.; SANZINI, E. Free glutamine and glutamic acid increase in milk through a three-month lactation period. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.31, p.508-512, 2000b.

ALBANESE, A.A.; ORTO, L.A. Protein and amino acids. In: ALBANESE, A.A., ed. **Newer methods of nutritional biochemistry: with applications and interpretations**. New York: Academic Press, 1963. v.1, p.84.

ANDERSON, J.W.; JOHNSTONE, B.M.; REMLEY, D.T. Breast-feeding and cognitive development: a meta-analysis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.70, p.525-535, 1999.

ANOSA, V.O. Postsplenectomy blood values, marrow cytology, erythrocyte life-span, and sequestration in mice. **American Journal of Physiology**, v.231, p.1254-1257, 1976

ARAI, K.I.; LEE, F.; MIYAJIMA, A.; MIYATAKE, S.; ARAI, N.; YOKOTA, T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. **Annual Review of Biochemistry**, v.59, p.783-836, 1990.

ASHMAN, R.B.; PAPADIMITRIOU, J.M. Production and function of cytokines in natural and acquired immunity to *Candida albicans* infection. **Microbiological Reviews**, v.59, p.646-672, 1995.

ASSIS, A.M.O.; PRADO, M.S.; FREITAS, M.C.S.; SILVA, R.C.R.; RAMOS, L.B.; MACHADO, A.D. Prática do aleitamento materno em comunidades rurais do semi-árido baiano. **Revista de Saúde Pública**, v.28, p.380-384, 1994.

ATKINSON, S.; VALADAS, E.; SMITH, S.M.; LUKEY, P.T.; DOCKRELL, H.M. Monocyte-derived macrophage cytokine responses induced by *M. bovis* BCG. **Tubercle and Lung Disease**, v.80, p.197-207, 2000.

AVENELL A. Glutamine in critical care: current evidence from systematic reviews. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.65, p.236-241, 2006.

BALL, P.A.; HARDY, G. Glutamine in pediatrics: where next? **Nutrition**, v.18, p.451-454, 2002.

BALONAN, L.C.; SHENG, H.P. Perinatal feedings adversely affect lipogenic activities but not glucose handling in adult rats. **Pediatric Research**, v.48, p.668-673, 2000.

BAUER, G.J.; ARBABI, S.; GARCIA, I.A.; DEHINGH, I.; ROSENGART, M.R.; MAIER, R.V. Adherence regulates macrophage signal transduction and primes tumor necrosis factor production. **Shock**, v.14, p.435-440, 2000.

BECKER, R.M.; WU, G.; GALANKO, J.A.; CHEN, W.; MAYNOR, A.R.; BOSE, C.L.; RHOADS, J.M. Reduced serum amino acid concentrations in infants with necrotizing enterocolitis. **Journal of Pediatrics**, v.137, p.785-793, 2000.

BELLOWS, C.F.; JAFFE, B.M. Glutamine is essential for nitric oxide synthesis by murine macrophages. **Journal of Surgical Research**, v.86, p.213-219, 1999.

BERGMEYER, H.U. Determination with glucose oxidase and peroxidase. In: _____, ed. **Methods of enzymatic analysis**. 2.ed. Weinheim: Verlag Chemie; New York: Academic Press, 1974. p.1205-1212.

BERTERO, M.T.; CALIGARIS-CAPPIO, F. Anemia of chronic disorders in systemic autoimmune diseases. **Haematologica**, v.82, p.375-381, 1997.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Molecular Immunology**, v.40, p.845-859, 2004.

BEUTLER, B. Science review: key inflammatory and stress pathways in critical illness - the central role of the Toll-like receptors. **Critical Care**, v.7, p.39-46, 2003.

BEUTLER, B.; JIANG, Z.; GEORGE, P.; CROZAT, K.; CROKER, B.; RUTSCHMANN, S.; DU, X.; HOEBE, K. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. **Annual Review of Immunology**, v.24, p.353-389, 2006.

BEUTLER, B.; RIETSCHEL, E.T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. **Nature Reviews Immunology**, v.3, p.169-176, 2003.

BEUTLER, E.; LICHTMAN, M.A.; COLLIER, B.S.; KIPPS, T.J. **Williams hematology**. 6 ed. London: McGraw-Hill, 2001. 1941p.

BLACK, R.E.; MORRIS, S.S.; BRYCE, J. Where and why are 10 million children dying every year? **Lancet**, v.361, p.2226-2234, 2003.

BLECHA, F.; POLLMANN, D.S.; NICHOLS, D.A. Weaning pigs at an early age decreases cellular immunity. **Journal of Animal Science**, v.56, p.396-400, 1983.

BOELEN, P.G.; NIJVELDT, R.J.; HOUDJIK, A.P.J.; MEIJER, S.; LEEUWEN, P.A. Glutamine alimentation in catabolic state. **Journal of Nutrition**, v.131, p.2569S-2577S, 2001.

BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. **Journal of Experimental Medicine**, v.174, p.1549-1555, 1991.

BOHNSACK, J.F.; KLEINMAN, H.K.; TAKAHASHI, T.; O'SHEA, J.J.; BROWN, E.J. Connective tissue proteins and phagocytic cell function. Laminin enhances complement and Fc-mediated phagocytosis by cultured human macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, v.161, p.912-923, 1985.

BORELLI, P.; SOUZA, I.P.; BOROJEVIC, R.; DAGLI, M.L.Z.; KANG, H.C. Protein malnutrition: some aspects of the *in vitro* adhesion of peritoneal mouse macrophages. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v.42, p.367-373, 1998.

BOUWSTRA, H.; BOERSMA, E.R.; BOEHM, G.; DIJCK-BROUWER, D.A.; MUSKIET, F.A.; HADDERS-ALGRA, M. Exclusive breastfeeding of healthy term infants for at least

6 weeks improves neurological condition. **Journal of Nutrition**, v.133, p.4243-4245, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia alimentar para crianças menores de 2 anos**. Brasília: Ministério da Saúde, Organização Pan-Americana de Saúde, 2002. 152p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos, n.107).

BRECHER, G. New methylene blue as a reticulocyte stain. **American Journal of Clinical Pathology**, v.19, p.895-895, 1949.

BUHLES, W.C.JR.; SHIFRINE, M. Increased bone marrow production of granulocytes and mononuclear phagocytes induced by mycobacterial adjuvants: improved recovery of leukopoiesis in mice after cyclophosphamide treatment. **Infection and Immunity**, v.20, p.58-65, 1978.

BULLEN, J.J.; ROGERS, H.J.; SPALDING, P.B.; WARD, C.G. Iron and infection: the heart of the matter. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.43, p.325-330, 2005.

BULLEN, J.J.; ROGERS, H.J.; SPALDING, P.B.; WARD, C.G. Natural resistance, iron and infection: a challenge for clinical medicine. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p.251-258, 2006.

BULUS, N.; CERSOSIMO, E.; GHISHAN, F.; ABUMRAD, N.N. Physiologic importance of glutamine. **Metabolism**, v.38, p.1-5, 1989.

CAAMANO, J.; HUNTER, C.A. NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, p.414-429, 2002.

CALDER, P.C. Fuel utilization by cells of the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.54, p.65-82, 1995.

CALHOUN, D.A.; LUNOE, M.; DU, Y.; STABA, S.L.; CHRISTENSEN, R.D. Concentrations of granulocyte colony-stimulating factor in human milk after *in vitro* simulations of digestion. **Pediatric Research**, v.46, p.767-771, 1999.

CALICH, V.L.G.; VAZ, C.A.C. **Imunologia básica**. São Paulo: Artes Médicas, 1988. 376p.

CALLEN, J.; PINELLI, J. Incidence and duration of breastfeeding for term infants in Canada, United States, Europe, and Australia: a literature review. **Birth**, v.31, p.285-292, 2004.

CARMICHAEL, R.D.; GORDON, A.S.; LOBUE, J. Effects of the hormone erythropoietin in milk on erythropoiesis in neonatal rats. **Endocrinologia Experimentalis**, v.20, p.167-188, 1986.

CARVALHAES, M.A.; PARADA, C.M.; MANOEL, C.M.; VENANCIO, S.Y. Assessing breastfeeding status in an urban area of Southeastern Brazil: use of a simplified methodology. **Revista de Saúde Pública**, v.32, p.430-436, 1998.

CASTELLANO, C.; OLIVERIO, A. Early malnutrition and postnatal changes in brain and behavior in the mouse. **Brain Research**, v.101, p.317-325, 1976.

CAVAILLON, J.M. Cytokines and macrophages. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.48, p.445-453, 1994.

CENCI, E.; ROMANI, L.; MENCACCI, A.; SPACCAPELO, R.; SCHIAFFELLA, E.; PUCCHETTI, P.; BISTONI, F. Interleukin-4 and interleukin-10 inhibit nitric oxide-dependent macrophage killing of *Candida albicans*. **European Journal of Immunology**, v.23, p.1034-1038, 1993.

CERNADAS, J.M.; NOCEDA, G.; BARRERA, L.; MARTINEZ, A.M.; GARSD, A. Maternal and perinatal factors influencing the duration of exclusive breastfeeding during the first 6 months of life. **Journal of Human Lactation**, v.19, p.136-144, 2003.

CHAKRABARTI, R. Transcriptional regulation of the rat glutamine synthetase gene by tumor necrosis factor- α . **European Journal of Biochemistry**, v.254, p.70-74, 1998.

COHN, Z.A. The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy, and future. **Journal of Immunology**, v.121, p.813-816, 1978.

CORAZZINI, R. **Avaliação morfo-fisiológica de macrófagos peritoniais de camundongos submetidos ao choque térmico**. São Paulo, 1993. 156p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo.

COSTA ROSA, L.F.; CURI, R.; MURPHY, C.; NEWSHOLME, P. Effect of adrenaline and phorbol myristate acetate or bacterial lipopolysaccharide on stimulation of pathways of macrophage glucose, glutamine and O₂ metabolism. Evidence for cyclic AMP-dependent protein kinase mediated inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase and activation of NADP⁺-dependent 'malic' enzyme. **Biochemical Journal**, v.310, p.709-714, 1995.

COSTA ROSA, L.F.B.P.; SAFI, D.A.; CURI, R. Effect of thioglycollate and BCG stimuli on glucose and glutamine metabolism in rat macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v.56, p.10-14, 1994.

CUNHA, W.D.; FRIEDLER, G.; VAISBERG, M.; EGAMI, M.I.; COSTA ROSA, L.F. Immunosuppression in undernourished rats: the effect of glutamine supplementation. **Clinical Nutrition**, v.22, p.453-457, 2003.

CURI, R., coord. **Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte**. Rio de Janeiro: Sprint, 2000. 261p.

CURI, R.; LAGRANHA, C.J.; DOI, S.Q.; SELLITTI, D.F.; PROCOPIO, J.; PITHON-CURI, T.C.; CORLESS, M.; NEWSHOLME, P. Molecular mechanisms of glutamine action. **Journal of Cellular Physiology**, v.204, p.392-401, 2005.

CURI, R.; NEWSHOLME, P.; PROCOPIO, J.; LAGRANHA, C.; GORJAO, R.; PITHON-CURI, T.C. Glutamine, gene expression, and cell function. **Frontiers in Bioscience**, v.12, p.344-357, 2007.

CZARNETZKY, B.M.; COWAN, D.H.; BELCHER, R.W. The effects of polyanions on NBT reduction hexose monophosphat shunt activity and ultrastructure of polymorphonuclear leucocytes. **American Journal of Clinical Pathology**, v.64, p.34-40, 1975.

DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. **Practical haematology**. 8.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995. p.57-58.

DASS, P.D.; MURDOCH, F.E.; WU, M.C. Glutamine promotes colony formation in bone marrow and HL-60 cells; accelerates myeloid differentiation in induced HL-60 cells. **In Vitro**, v.20, p.869-875, 1984.

DAVIS, T.A.; FIOROTTO, M.L.; REEDS, P.J. Amino acid compositions of body and milk protein change during the suckling period in rats. **Journal of Nutrition**, v.123, p.947-956, 1993.

DAVIS, T.A.; NGUYEN, H.V.; GARCIA-BRAVO, R.; FIOROTTO, M.L.; JACKSON, E.M.; REEDS, P.J. Amino acid composition of the milk of some mammalian species changes with stage of lactation. **British Journal of Nutrition**, v.72, p.845-853, 1994a.

DAVIS, T.A.; NGUYEN, H.V.; GARCIA-BRAVO, R.; FIOROTTO, M.L.; JACKSON, E.M.; LEWIS, D.S.; LEE, D.R.; REEDS, P.J. Amino acid composition of human milk is not unique. **Journal of Nutrition**, v.124, p.1126-1132, 1994b.

DE ONIS, M.; ONYANGO, A.W. The Centers for Disease Control and Prevention 2000 growth charts and the growth of breastfed infants. **Acta Paediatrica**, v.92, p.413-419, 2003.

DENNIS, C.L. Breastfeeding initiation and duration: a 1990-2000 literature review. **JOGN Nursing: Journal of Obstetric, Gynecologic, and Neonatal Nursing**, v.31, p.12-32, 2002.

DEWEY, K.G.; COHEN, R.J.; BROWN, K.H.; RIVERA, L.L. Effects of exclusive breastfeeding for four versus six months on maternal nutritional status and infant motor development: results of two randomized trials in Honduras. **Journal of Nutrition**, v.131, p.262-267, 2001.

DEWEY, K.G.; PEERSON, J.M.; BROWN, K.H.; KREBS, N.F.; MICHAELSEN, K.F.; PERSSON, L.A.; SALMENPERA, L.; WHITEHEAD, R.G.; YEUNG, D.L.; WORLD HEALTH ORGANIZATION WORKING GROUP ON INFANT GROWTH. Growth of breast-fed infants deviates from current reference data: a pooled analysis of US, Canadian, and European data sets. **Pediatrics**, v.96, p.495-503, 1995.

DOBROVOLSKAIA, M.A.; VOGEL, S.N. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. **Microbes and Infection**, v.4, p.903-914, 2002.

DOUMAS, T. Albumin standards and measurement of serum albumin with bromocresol green. **Clinica Chimica Acta**, v.31, p.87-95, 1971.

EAGLE, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue cultures. **Science**, v.122, p.501-504, 1955.

EAGLE, H.; OYAMA, V.I.; LEVY, M. The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v.218, p.607-617, 1955.

ELLIS, L.A.; MASTRO, A.M.; PICCIANO, M.F. Do milk-borne cytokines and hormones influence neonatal immune cell function? **Journal of Nutrition**, v.127, p.985S-988S, 1997.

FALLON, H.J.; FREI, E.; DAVISON, J.D.; TRIER, J.S.; BURK, D. Leukocyte preparations from human blood: evaluation of their morphologic and metabolic state. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.59, p.779-791, 1962.

FIELD, C.J. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. **Journal of Nutrition**, v.135, p.1-4, 2005.

FILTEAU, S.M. Role of breast-feeding in managing malnutrition and infectious disease. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.59, p.565-572, 2000.

FIORENTINO, D.F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T.R.; HOWARD, M.; O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **Journal of Immunology**, v.147, p.3815-3822, 1991.

FOMON, S.J.; ZIEGLER, E.E.; NELSON, S.E. Erythrocyte incorporation of ingested ⁵⁸Fe by 56-day-old breast-fed and formula-fed infants. **Pediatric Research**, v.33, p.573-576, 1993.

FOSTER, M.; MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; CLARK, R.; DORSHKIND, K. Regulation of B and T cell development by anterior pituitary hormones. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.54, p.1076-1082, 1998.

FRISINA, J.P.; GAUDIERI, S.; CABLE, T.; KEAST, D.; PALMER, T.N. Effects of acute exercise on lymphocyte subsets and metabolic activity. **International Journal of Sports Medicine**, v.15, p.36-41, 1994.

FU, Y.M.; ZHANG, H.; DING, M.; LI, Y.Q.; FU, X.; YU, Z.X.; MEADOWS, G.G. Specific amino acid restriction inhibits attachment and spreading of human melanoma via modulation of the integrin/focal adhesion kinase pathway and actin cytoskeleton remodeling. **Clinical & Experimental Metastasis**, v.21, p.587-598, 2004.

FUJIHARA, M.; MUROI, M.; TANAMOTO, K.; SUZUKI, T.; AZUMA, H.; IKEDA, H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. **Pharmacology & Therapeutics**, v.100, p.171-194, 2003.

FURUKAWA, S.; SAITO, H.; INOUE, T.; MATSUDA, T.; FUKATSU, K.; HAN, I.; IKEDA, S.; HIDEMURA, A. Supplemental glutamine augments phagocytosis and reactive oxygen intermediate production by neutrophils and monocytes from postoperative patients *in vitro*. **Nutrition**, v.16, p.323-329, 2000.

GARCIA, P.B. **Inflamação em camundongos submetidos à desnutrição protéica: análise da mobilização celular e da hematopoese**. São Paulo, 1992. 2v. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo.

GAROFALO, R.P.; GOLDMAN, A.S. Cytokines, chemokines, and colony-stimulating factors in human milk: the 1997 update. **Biology of the Neonate**, v.74, p.134-142, 1998.

GARTNER, L.M.; MORTON, J.; LAWRENCE, R.A.; NAYLOR, A.J.; O'HARE, D.; SCHANLER, R.J.; EIDELMAN, A.I.; AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS SECTION ON BREASTFEEDING. Breastfeeding and the use of human milk. **Pediatrics**, v.115, p.496-506, 2005.

GASPARONI, A.; CHIRICO, G.; DE AMICI, M.; RAVAGNI-PROBIZER, M.; CIARDELLI, L.; MARCHESI, M.E.; RONDINI, G. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in human milk. **European Journal of Pediatrics**, v.155, p.69, 1996.

GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; HIENY, S.; JAMES, S.L.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **European Journal of Immunology**, v.22, p.2501-2506, 1992.

GENDIMENICO, G.J.; BOUQUIN, P.L.; TRAMPOSCH, K.M. Diphenylamine-colorimetric method for DNA assay: a shortened procedure by incubating samples at 50 degrees C. **Analytical Biochemistry**, v.173, p.45-48, 1988.

GERSTING, J.A.; KOTTO-KOME, C.A.; DU, Y.; CHRISTENSEN, R.D.; CALHOUN, D.A. Bioavailability of granulocyte colony-stimulating factor administered enterally to suckling mice. **Pharmacological Research**, v.48, p.643-647, 2003.

GILMORE, W.S.; MCKELVEY-MARTIN, V.J.; RUTHERFORD, S.; STRAIN, J.J.; LOANE, P.; KELL, M.; MILLAR, S. Human milk contains granulocyte colony stimulating factor. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.48, p.222-224, 1994.

GOMES, M.R.; PIRES, I.S.O.; CASTRO, I.A.; TIRAPEGUI, J. Effect of moderate physical exercise on plasma and tissue levels of insulin-like growth factor-1 in adult rats. **Nutrition Research**, v.24, p.555-564, 2004.

GOODWIN, J.F.; MURPHY, B.; GUILLEMETTE, M. Direct measurement of serum iron and binding capacity. **Clinical Chemistry**, v.12, p.47-57, 1966.

GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum protein by means of the biuret reactions. **Journal of Biological Chemistry**, v.177, p.751-766, 1948.

GREER, J.P.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.N.; RODGERS, G.M.; PARASKEVAS, F.; GLADER, B. **Wintrobe's clinical hematology**. 11.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. v.1, 1508p.

GRIFFITHS, R.D. The evidence for glutamine use in the critically-ill. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.60, p.403-410, 2001.

GROSVENOR, C.E.; PICCIANO, M.F.; BAUMRUCKER, C.R. Hormones and growth factors in milk. **Endocrine Reviews**, v.14, p.710-728, 1993.

HAMERMAN, J.A.; ADEREM, A. Functional transitions in macrophages during in vivo infection with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin. **Journal of Immunology**, v.167, p.2227-2233, 2001.

HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.13, p.413-421, 2002.

HASCHKE, F.; VAN'T HOF, M.A. Euro-growth references for BF boys and girls: influence of breast-feeding and solids on growth until 36 months of age. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.31, p.S60-S71, 2000.

HASSAN, J.; REEN, D.J. T-cell function in the human newborn. **Immunology Today**, v.21, p.107-108, 2000.

HATADA, E.N.; KRAPPMANN, D.; SCHEIDEREIT, C. NF-kappaB and the innate immune response. **Current Opinion in Immunology**, v.12, p.52-58, 2000.

HAUSSINGER, D.; SCHLIESS, F. Glutamine metabolism and signaling in the liver. **Frontiers in Bioscience**, v.12, p.371-391, 2007.

HERSCOWITZ, H.B.; HOLDEN, H.T.; BELLANTI, J.A.; GHAFAR, A., eds. **Manual of macrophage methodology**: collection, characterization and function. New York: Marcel Dekker, 1981. cap.8, p.272-275. (Immunology series, v.13).

HINSHAW, D.B.; BURGER, J.M.; MILLER, M.T.; ADAMS, J.A.; BEALS, T.F.; OMANN, G.M. ATP depletion induces an increase in the assembly of a labile pool of polymerized actin in endothelial cells. **American Journal of Physiology**, v.264, p.C1171-C1179, 1993.

HOEBE, K.; JIANG, Z.; GEORGEL, P.; TABETA, K.; JANSSEN, E.; DU, X.; BEUTLER, B. TLR signaling pathways: opportunities for activation and blockade in pursuit of therapy. **Current Pharmaceutical Design**, v.12, p.4123-4134, 2006a.

HOEBE, K.; JIANG, Z.; TABETA, K.; DU, X.; GEORGEL, P.; CROZAT, K.; BEUTLER, B. Genetic analysis of innate immunity. **Advances in Immunology**, v.91, p.175-226, 2006b.

JEPSON, M.M.; BATES, P.C.; BROADBENT, P.; PELL, J.M.; MILLWARD, D.J. Relationship between glutamine concentration and protein synthesis in rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, v.255, p.E166-E172, 1988.

JOHNSTON Jr., R.B. Function and cell biology of neutrophils and mononuclear phagocytes in the newborn infant. **Vaccine**, v.16, p.1363-1368, 1998.

JONES, G.; STEKETEE, R.W.; BLACK, R.E.; BHUTTA, Z.A.; MORRIS, S.S.; BELLAGIO, CHILD SURVIVAL STUDY GROUP. How many child deaths can we prevent this year? **Lancet**, v.362, p.65-71, 2003.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 427p.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. **Current Opinion in Immunology**, v.17, p.338-344, 2005.

KELLY, D.; COUTTS, A.G. Early nutrition and the development of immune function in the neonate. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.59, p.177-185, 2000.

KEW, S.; WELLS, S.M.; YAQOUB, P.; WALLACE, F.A.; MILES, E.A.; CALDER, P.C. Dietary glutamine enhances murine T-lymphocyte responsiveness. **Journal of Nutrition**, v.129, p.1524-1531, 1999.

KING, W.; PAULSON, S.R.; PUCKETT, N.L.; KREBS, A.T. Cell death: the effect of injury on the entrance of vital dye in Erlich tumor cells. **American Journal of Pathology**, v.35, p.1067-1075, 1959.

KOMATSU, W.; MAWATARI, K.; MIURA, Y.; YAGASAKI, K. Restoration by dietary glutamine of reduced tumor necrosis factor production in a low-protein-diet-fed rat model. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.71, p.352-357, 2007.

KORKMAZ, A.; YURDAKOK, M.; YIGIT, S.; TEKINALP, G. Long-term enteral glutamine supplementation in very low birth weight infants: effects on growth parameters. **Turkish Journal of Pediatrics**, v.49, p.37-44, 2007.

KOVARIK, J.; SIEGRIST, C.A. Immunity in early life. **Immunology Today**, v.19, p.150-152, 1998.

KOYAMA, K.; KAYA, M.; TSUJITA, J.; HORI, S. Effects of decrease plasma glutamine concentrations on peripheral lymphocyte proliferation in rats. **European Journal of Applied Physiology**, v.77, p.25-31, 1998.

KRAMER, M.S.; GUO, T.; PLATT, R.W.; SEVKOVSKAYA, Z.; DZIKOVICH, I.; COLLET, J.P.; SHAPIRO, S.; CHALMERS, B.; HODNETT, E.; VANILOVICH, I.; MEZEN, I.; DUCRUET, T.; SHISHKO, G.; BOGDANOVICH, N. Infant growth and

health outcomes associated with 3 compared with 6 mo of exclusive breastfeeding. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.78, p.291-295, 2003.

KRAMER, M.S.; GUO, T.; PLATT, R.W.; SHAPIRO, S.; COLLET, J.P.; CHALMERS, B.; HODNETT, E.; SEVKOVSKAYA, Z.; DZIKOVICH, I.; VANILOVICH, I.; PROBIT STUDY GROUP. Breastfeeding and infant growth: biology or bias? **Pediatrics**, v.110, p.343-347, 2002.

KRAMER, M.S.; KAKUMA, R. The optimal duration of exclusive breastfeeding: a systematic review. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.554, p.63-77, 2004.

KUMMER, S.C.; GIUGLIANI, E.R.; SUSIN, L.O.; FOLLETTTO, J.L.; LERMEN, N.R.; WU, V.Y.; SANTOS, L.; CAETANO, M.B. Evolution of breastfeeding pattern. **Revista de Saúde Pública**, v.34, p.143-148, 2000.

KUNKEL, S.L.; DUQUE, R.E. The macrophage adherence phenomenon: its relationship to prostaglandin E2 and superoxide anion production and changes in transmembrane potential. **Prostaglandins**, v.26, p.893-904, 1983.

LABBOK, M.H.; CLARK, D.; GOLDMAN, A.S. Breastfeeding: maintaining an irreplaceable immunological resource. **Nature Reviews Immunology**, v.4, p.565-572, 2004.

LABOW, B.I.; SOUBA, W.W. Glutamine. **World Journal of Surgery**, v.24, p.1503-1513, 2000.

LABOW, B.I.; SOUBA, W.W.; ABCOUWER, S.F. Glutamine synthetase expression in muscle is regulated by transcriptional and posttranscriptional mechanisms. **American Journal of Physiology**, v.276, p.E1136-E1145, 1999.

LABOW, B.I.; SOUBA, W.W.; ABCOUWER, S.F. Mechanisms governing the expression of the enzymes of glutamine metabolism--glutaminase and glutamine synthetase. **Journal of Nutrition**, v.131, p.2467S-2474S, 2001.

LACEY, J.M.; WILMORE, D.W. Is glutamine a conditionally essential amino acid? **Nutrition Reviews**, v.48, p.297-309, 1990.

LANDMANN, R.; MULLER, B.; ZIMMERLI, W. CD14, new aspects of ligand and signal diversity. **Microbes and Infection**, v.2, p.295-304, 2000.

LARON Z. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. **Molecular Pathology**, v.54, p.311-316, 2001.

LEVY, J. Immunonutrition: the pediatric experience. **Nutrition**, v.14, p.641-647, 1998.

LI, Q.; VERMA, I.M. NF-kappaB regulation in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v.2, p.725-734, 2002.

LI, Z.H.; WANG, D.H.; DONG, M. Effect of parenteral glutamine supplementation in premature infants. **Chinese Medical Journal**, v.120, p.140-144, 2007.

LIMA, A.O.; SOARES, J.B.; CALIZZI, J.; CANÇADO, J.R. **Métodos de laboratório aplicados a clínica: técnica e interpretação**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 400p.

LIOU, H.C. Regulation of the immune system by NF-kappaB and IkappaB. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v.35, p.537-546, 2002.

LOBLEY, G.E.; HOSKIN, S.O.; MCNEIL, C.J. Glutamine in animal science and production. **Journal of Nutrition**, v.131, p.2525S-2531S, 2001.

LONNERDAL, B.; KEEN, C.L.; HURLEY, L.S. Iron, copper, zinc and maganese in milk. **Annual Review of Nutrition**, v.1, p.149-174, 1981.

LOUIE, A.; BALTCH, A.L.; SMITH, R.P.; FRANKE, M.A.; RITZ, W.J.; SINGH, J.K.; GORDON, M.A. Tumor necrosis factor alpha has a protective role in a murine model of systemic candidiasis. **Infection and Immunity**, v.62, p.2761-2772, 1994.

LOW, S.Y.; RENNIE, M.J.; TAYLOR, P.M. Signaling elements involved in amino acid transport responses to altered muscle cell volume. **FASEB Journal**, v.11, p.1111-1117, 1997.

LOWRY, O.H.; ROSEBRUOGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

LUND, P. Determination of glutamine with glutaminase and glutamate dehydrogenase. In: BERGMAYER, H.U.; GRASSL, M., eds. **Methods of enzymatic analysis**. Weinheim: Verlag Chemie; London: Academic Press, 1985. p. 1719-1722.

MACLENNAN, P.A.; BROWN, R.A.; RENNIE, M.J. A positive relationship between protein synthetic rate and intracellular glutamine concentration in perfused rat skeletal muscle. **FEBS Letters**, v.215, p.187-191, 1987.

MACLENNAN, P.A.; SMITH, K.; WERYK, B.; WATT, P.W.; RENNIE, M.J. Inhibition of protein breakdown by glutamine in perfused rat skeletal muscle. **FEBS Letters**, v.237, p.133-136, 1988.

MAGNANI, M.; CRINELLI, R.; BIANCHI, M.; ANTONELLI, A. The ubiquitin-dependent proteolytic system and other potential targets for the modulation of nuclear factor-kB (NF-kB). **Current Drug Targets**, v.1, p.387-399, 2000.

MARCHAL, G.; MILON, G. Decreased erythropoiesis: the origin of the BCG induced anaemia in mice. **British Journal of Haematology**. v.48, p.551-560, 1981.

MARCHAL, G.; MILON, G. Control of hemopoiesis in mice by sensitized L3T4+ Lyt2- lymphocytes during infection with bacillus Calmette-Guerin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.83, p.3977-3981, 1986.

MARCHANT, A.; GOETGHEBUER, T.; OTA, M.O.; WOLFE, I.; CEESAY, S.J.; DE GROOTE, D.; CORRAH, T.; BENNETT, S.; WHEELER, J.; HUYGEN, K.; AABY, P.; MCADAM, K.P.; NEWPORT, M.J. Newborns develop a Th1-type immune response to Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin vaccination. **Journal of Immunology**, v.163, p.2249-2255, 1999.

MARODI, L.; FOREHAND, J.R.; JOHNSTON Jr., R.B. Mechanisms of host defense against Candida species. II. Biochemical basis for the killing of Candida by mononuclear phagocytes. **Journal of Immunology**, v.146, p.2790-2794, 1991.

MARODI, L.; KAPOSZTA, R.; CAMPBELL, D.E.; POLIN, R.A.; CSONGOR, J.; JOHNSTON Jr., R.B. Candidacidal mechanisms in the human neonate. Impaired IFN-gamma activation of macrophages in newborn infants. **Journal of Immunology**, v.153, p.5643-5649, 1994.

MARODI, L.; SCHREIBER, S.; ANDERSON, D.C.; MACDERMOTT, R.P.; KORCHAK, H.M.; JOHNSTON Jr., R.B. Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon-gamma. Increased phagocytosis, killing, and calcium signal mediated by a decreased number of mannose receptors. **Journal of Clinical Investigation**, v.91, p.2596-2601, 1993.

MARQUES, N.M.; LIRA, P.I.; LIMA, M.C.; SILVA, N.L.; BATISTA FILHO, M.; HUTTLY, S.R.; ASHWORTH, A. Breastfeeding and early weaning practices in northeast Brazil: a longitudinal study. **Pediatrics**, v.108, p.E66, 2001.

MARSHALL-CLARKE, S.; REEN, D.; TASKER, L.; HASSAN, J. Neonatal immunity: how well has it grown up? **Immunology Today**, v.21, p.35-41, 2000.

MARTIN, R.M.; SMITH, G.D.; MANGTANI, P.; FRANKEL, S.; GUNNELL, D. Association between breast feeding and growth: the Boyd-Orr cohort study. **Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition**, v.87, p.193-201, 2002.

MAX, S.R. Glucocorticoid-mediated induction of glutamine synthetase in skeletal muscle. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v.22, p.325-330, 1990.

MCKINNEY, L.C., GALLIN, E.K. Effect of adherence, cell morphology, and lipopolysaccharide on potassium conductance and passive membrane properties of murine macrophage J774.1 cells. **Journal of Membrane Biology**, v.116, p.47-56, 1990.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY Jr., C.A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v.388, p.394-397, 1997.

MERCURIO, A.M.; SHAW, L.M. Macrophage interactions with laminin: PMA selectively induces the adherence and spreading of mouse macrophages on a laminin substratum. **Journal of Cell Biology**, v.107, p.1873-1880, 1988.

MIGNON, M.; LEVEQUE, L.; BONNEL, E.; MEYNIAL-DENIS, D. Does glutamine supplementation decrease the response of muscle glutamine synthesis to fasting in muscle in adult and very old rats? **JPEN, Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.31, p.26-31, 2007.

MILLER-GILBERT, A.L.; DUBUQUE, S.H; DVORAK, B.; WILLIAMS, C.S.; GRILLE, J.G.; WOODWARD, S.S.; KOLDOVSKY, O.; KLING, P.J. Enteral absorption of erythropoietin in the suckling rat. **Pediatric Research**, v.50, p.261-267, 2001.

MILLWARD, D.J.; JEPSON, M.M.; OMER, A. Muscle glutamine concentration and protein turnover *in vivo* in malnutrition and in endotoxemia. **Metabolism**, v.38, p.6-13, 1989.

MINET, R.; VILLIE, F.; MARCOLLET, M.; MEYNIAL-DENIS, D.; CYNOBER, L. Measurement of glutamine synthetase activity in rat muscle by a colorimetric assay. **Clinica Chimica Acta**, v.268, p.121-132, 1997.

MIRE-SLUIS, A.R.; THORPE, R. **Cytokines**. San Diego: Academic Press, 1998. 584p.

MITTENDORFER, B.; GORE, D.C.; HERNDON, D.N.; WOLFE, R.R. Accelerated glutamine synthesis in critically ill patients cannot maintain normal intramuscular free glutamine concentration. **JPEN, Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.23, p.243-252, 1999.

MONTEIRO, C.A. O panorama da nutrição infantil nos anos 90. **Cadernos de Políticas Sociais**, v.1, p.11-12, 1997.

MORTIMORE, G.E.; POSO, A.R. Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply. **Annual Review of Nutrition**, v.7, p.539-564, 1987.

MOSKOVITZ, B.; KATZ, Y.; SINGER, P.; NATIV, O.; ROSENBERG B. Glutamine metabolism and utilization: relevance to major problems in health care. **Pharmaceutical Research**, v.30, p.61-71, 1994.

MOSMANN, T.R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2, and more. **Immunology Today**, v.17, p.138-146, 1996.

MOUNDRAS, C.; RÉMÉSY, C.; BERCOVICI, D.; DEMIGNÉ, C. Effect of dietary supplementation with glutamic acid or glutamine on the splanchnic and muscle metabolism of glucogenic amino acids in the rat. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.4, p.222-228, 1993.

MUNRO, N.N.; FLECK, A. The determination of nucleic acids. **Methods of Biochemical Analysis**, v.14, p.113-176, 1966.

MURPHY, C.J.; NEWSHOLME, P. Glutamine as a possible precursor of L-arginine and thus nitric oxide synthesis in murine macrophages. **Biochemical Society Transactions**, v.25, p.404S, 1997.

MURPHY, C.J.; NEWSHOLME, P. Importance of glutamine metabolism in murine macrophages and human monocytes to L-arginine biosynthesis and rates of nitrite or urea production. **Clinical Science**, v.95, p.397-407, 1998.

MURPHY, C.J.; NEWSHOLME, P. Macrophage-mediated lysis of a β -cell line, TNF- α release from BCG-activated murine macrophages and IL-8 release from human monocytes are dependent on extracellular glutamine concentration and glutamine metabolism. **Clinical Science**, v.96, p.89-97, 1999.

MUSHEGIAN, A.; MEDZHITOV, R. Evolutionary perspective on innate immune recognition. **Journal of Cell Biology**, v.155, p.705-710, 2001.

NASCIMENTO, M.B.; ISSLER, H. Breastfeeding: making the difference in the development, health and nutrition of term and preterm newborns. **Revista do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, v.58, p.49-60, 2003.

NATHAN, C.F. Secretory products of macrophages. **Journal of Clinical Investigation**, v.79, p.319-326, 1987.

NEU, J.; ROIG, J.C.; MEETZE, W.H.; VEERMAN, M.; CARTER, C.; MILLSAPS, M.; BOWLING, D.; DALLAS, M.J.; SLEASMAN, J.; KNIGHT, T.; AUESTAD, N. Enteral glutamine supplementation for very low birth weight infants decreases morbidity. **Journal of Pediatrics**, v.131, p.691-699, 1997.

NEU, J.; SHENOY, V.; CHAKRABARTI, R. Glutamine nutrition and metabolism: where do we go from here? **FASEB Journal**, v.10, p.829-837, 1996.

NEU, J.; LI, N. Pathophysiology of glutamine and glutamate metabolism in premature infants. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v.10, p.75-79, 2007.

NEWMAN, S.L.; TUCCI, M.A. Regulation of human monocyte/macrophage function by extracellular matrix. Adherence of monocytes to collagen matrices enhances phagocytosis of opsonized bacteria by activation of complement receptors and enhancement of Fc receptor function. **Journal of Clinical Investigation**, v.86, p.703-714, 1990.

NEWSHOLME, E.A.; CALDER, P.C. The proposed role of glutamine in some cells of the immune system and speculative consequences for the whole animal. **Nutrition**, v.13, p.728-730, 1997.

NEWSHOLME, E.A.; NEWSHOLME, P.; CURI, R.; CRABTREE, B.; ARDAWI, M.S.M. Glutamine metabolism in different tissues: its physiological and pathological importance. In: KINNEY, J.M.; BORUM, P.R. **Perspectives in clinical nutrition**. Munich: Urban and Schwarzenberg, 1989. p.71-98.

NEWSHOLME, E.A.; PARRY-BILLINGS, M. Properties of glutamine release from muscle and its importance for the immune system. **JPEN, Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.14, p.63S-67S, 1990.

NEWSHOLME, P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? **Journal of Nutrition**, v.131, p.2515S-2522S, 2001.

NEWSHOLME, P.; COSTA ROSA, L.F.B.P.; NEWSHOLME, E.A.; CURI, R. The importance of fuel metabolism to macrophage function. **Cell Biochemistry and Function**, v.14, p.1-10, 1996.

NEWSHOLME, P.; CURI, R.; CURI, T.C.P.; MURPHY, C.J.; GARCIA, C.; MELO, M.P. Glutamine metabolism by lymphocytes, macrophages, and neutrophils: its importance in health and disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.10, p.316-324, 1999.

NEWSHOLME, P.; CURI, R.; GORDON, S.; NEWSHOLME, E.A. Metabolism of glucose, glutamine, long-chain fatty acids and ketone bodies by murine macrophages. **Biochemical Journal**, v.239, p.121-125, 1986.

NEWSHOLME, P.; GORDON, S.; NEWSHOLME, E.A. Rates of utilization and fates of glucose, glutamine, pyruvate, fatty acids and ketone bodies by mouse macrophages. **Biochemical Journal**, v.242, p.631-636, 1987.

NEWSHOLME, P.; PROCOPIO, J.; LIMA, M.M.; PITHON-CURI, T.C.; CURI, R. Glutamine and glutamate—their central role in cell metabolism and function. **Cell Biochemistry and Function**, v.21, p.1-9, 2003.

ODDY, W.H. The impact of breastmilk on infant and child health. **Breastfeed Review**, v.10, p.5-18, 2002.

OLIVERIO, A.; CASTELLANO, C.; ALLEGRA, S.P. Effects of genetic and nutritional factors on post-natal reflex and behavioral development in the mouse. **Experimental Aging Research**, v.1, p.41-56, 1975.

OPPENHEIMER, S.J. Iron and its relation to immunity and infectious disease. **Journal of Nutrition**, v.131, p.616S-635S, 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Proteção, promoção e apoio ao aleitamento materno**: o papel especial dos serviços materno-infantis. Genebra: OMS, UNICEF, 1989. 32p. (Declaração conjunta OMS/UNICEF).

OSWALD, I.P.; GAZZINELLI, R.T.; SHER, A.; JAMES, S.L. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity. **Journal of Immunology**, v.148, p.3578-3582, 1992.

PARIMI, P.S.; DEVAPATLA, S.; GRUCA, L.; O'BRIEN, A.M.; HANSON, R.W.; KALHAN, S.C. Glutamine and leucine nitrogen kinetics and their relation to urea nitrogen in newborn infants. **American Journal of Physiology**, v.282, p.E618-E625, 2002.

PARIMI, P.S.; KALHAN, S.C. Glutamine supplementation in the newborn infant. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v.12, p.19-25, 2007.

PARRY-BILLINGS, M.; EVANS, J.; CALDER, P.C.; NEWSHOLME, E.A. Does glutamine contribute to immunosuppression after major burns? **Lancet**, v.336, p.523-525, 1990.

PARRY-BILLINGS, M.; LEIGHTON, B.; DIMITRIADIS, G.; VASCONCELOS, P.R.L.; NEWSHOLME, E.A. Skeletal muscle glutamine metabolism during sepsis in the rat. **International Journal of Biochemistry**, v.21, p.419-423, 1989.

PARRY-BILLINGS, M., NEWSHOLME, E.A. The possible role of glutamine substrate cycles in skeletal muscle. **Biochemical Journal**, v.279, p.327-328, 1991.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunological Methods**, v.46, p.211-226, 1981.

RABINOVITCH, M.; DESTEFANO, M.J. Macrophage spreading *in vitro*. I. Inducers of spreading. **Experimental Cell Research**, v.77, p.323-334, 1973.

REEDS, P.J.; BURRIN, D.G.; DAVIS, T.A.; FIOROTTO, M.L.; STOLL, B.; GOUDOEVER, J.B.V. Protein nutrition of the neonate. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.59, p.87-97, 2000.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY Jr.; G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of nutrition "ad hoc" writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v.123, p.1939-1951, 1993.

RENNIE, M.J.; MACLENNAN, P.A.; HUNDAL, H.S.; WERYK, B.; SMITH, K.; TAYLOR, P.M.; EGAN, C.; WATT, P.W. Skeletal muscle glutamine transport, intramuscular glutamine concentration, and muscle-protein turnover. **Metabolism**, v.38, p.47-51, 1989.

ROGERO, M.M. **Efeitos do exercício e da suplementação com L-glutamina e L-alanil-L-glutamina sobre as concentrações de glutamina no plasma, músculo e fígado em ratos**. São Paulo, 2002a. 121p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

ROGERO, M.M.; PEDROSA, R.G.; TIRAPEGUI, J.; CASTRO, I.A.; PIRES, I.S.O. Effect of L-alanyl-L-glutamine supplementation on plasma, liver and muscle concentration of glutamine in rats submitted exhaustive exercise. **Nutrition**, v.22, p.564-571, 2006.

ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre glutamina e exercício. **Nutrição em Pauta**, v.11, p.34-40, 2003a.

ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre glutamina, atividade física e sistema imune. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.36, p.201-212, 2000.

ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J. Aspectos nutricionais sobre glutamina e exercício físico. **Nutrire**, v.25, p.101-126, 2003b.

ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J. Considerações nutricionais e bioquímicas da suplementação de glutamina em atletas: controvérsias e aspectos atuais. **Journal of Metabolism and Nutrition**, v.7, p.106-117, 2003c.

ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J.; PEDROSA, R.G.; CASTRO, I.A.; PIRES, I.S.O.; OLIVEIRA, A.A.M.; SALGADO, M.M.; PINTO, A.R.; UEDA, M. Efeito da suplementação com L-alanil-L-glutamina sobre a resposta de hipersensibilidade do tipo tardio em ratos submetidos ao treinamento intenso. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, p.487-497, 2002b.

ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J.; PEDROSA, R.G.; CASTRO, I.A.; PIRES, I.S.O. Plasma and tissue glutamine response to acute and chronic supplementation with L-glutamine and L-alanyl-L-glutamine in rats. **Nutrition Research**, v.24, p.261-270, 2004.

ROITT, I.M.; BROSTOFF, J.; MALE, D.K. **Imunologia**. 5.ed. São Paulo: Manole, 1999. 423p.

ROMANI, L.; PUCCHETTI, P.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; SPACCAPELO, R.; TONNETTI, L.; GROHMANN, U.; BISTONI, F. Neutralization of IL-10 up-regulates nitric oxide production and protects susceptible mice from challenge with *Candida albicans*. **Journal of Immunology**, v.152, p.3514-3521, 1994.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. **Memórias do Instituto Butantan**, v.20, p.315-328, 1947.

ROSENGART, M.R.; ARBABI, S.; BAUER, G.J.; GARCIA, I.; JELACIC, S.; MAIER, R.V. The actin cytoskeleton: an essential component for enhanced TNF α production by adherent monocytes. **Shock**, v.17, p.109-113, 2002.

ROWBOTTOM, D.G.; KEAST, D.; GOODMAN, C.; MORTON, A.R. The haematological, biochemical profile of athletes suffering from the overtraining syndrome. **European Journal of Applied Physiology**, v.70, p.502-509, 1995.

ROWBOTTOM, D.G.; KEAST, D.; MORTON, A.R. The emerging role of glutamine as an indicator of exercise stress and overtraining. **Sports Medicine**, v.21, p.80-97, 1996.

SAHLIN, K.; KATZ, A.; BROBERG, S. Tricarboxylic acid cycle intermediates in human muscle during prolonged exercise. **American Journal of Physiology**, v.259, p.C834-C841, 1990.

SALEZ, L.; SINGER, M.; BALLOY, V.; CREMINON, C.; CHIGNARD, M. Lack of IL-10 synthesis by murine alveolar macrophages upon lipopolysaccharide exposure: comparison with peritoneal macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v.67, p.545-552, 2000.

SAMPAIO, S.C.; SOUSA E SILVA, M.C.C.; BORELLI, P.; CURI, R.; CURY, Y. Crotalus durissus terrificus snake venom regulates macrophage metabolism and function. **Journal of Leukocyte Biology**, v.70, p.551-558, 2001.

SAMUELS, S.E.; BARACOS, V.E. Catch-up growth following *Escherichia coli* infection in weanling rats. **Metabolism**, v.41, p.208-215, 1992.

SAMUELS, S.E.; BARACOS, V.E. Tissue protein turnover is altered during catch-up growth following *Escherichia coli* infection in weanling rats. **Journal of Nutrition**, v.125, p.520-530, 1995.

SCHOTTELIUS, A.J.; MAYO, M.W.; SARTOR, R.B.; BALDWIN Jr., A.S. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. **Journal of Biological Chemistry**, v.274, p.31868-31874, 1999.

SEMBA, R.D.; JUUL, S.E. Erythropoietin in human milk: physiology and role in infant health. **Journal of Human Lactation**, v.18, p.252-261, 2002.

SHAW, L.M.; MERCURIO, A.M. Interferon gamma and lipopolysaccharide promote macrophage adherence to basement membrane glycoproteins. **Journal of Experimental Medicine**, v.169, p.303-308, 1989.

SHAW, L.M.; MESSIER, J.M.; MERCURIO, A.M. The activation dependent adhesion of macrophages to laminin involves cytoskeletal anchoring and phosphorylation of the alpha 6 beta 1 integrin. **Journal of Cell Biology**, v.110, p.2167-2174, 1990.

SHEWCHUK, L.D.; BARACOS, V.E.; FIELD, C.J. Dietary L-glutamine supplementation reduces the growth of the Morris Hepatoma 7777 in exercise-trained and sedentary rats. **Journal of Nutrition**. v.127, p.158-66, 1997.

SHINJI, H.; AKAGAWA, K.S.; YOSHIDA, T. Cytochalasin D inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 54, p. 336-342, 1993.

SINGER, J.W.; BERNSTEIN, I.D. Granulopoietic increase by BCG in mice. **Experimental Hematology**, v.6, p.760-766, 1978.

SMITH, L.L. Overtraining, excessive exercise, and altered immunity: is this a T helper-1 versus T helper-2 lymphocyte response? **Sports Medicine**, v.33, p.347-364, 2003.

SMITH, R.J. Glutamine metabolism and its physiologic importance. **JPEN, Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.14, p.40S-44S, 1990.

SOUBA, W.W.; KLIMBERG, V.S.; PLUMPLEY, D.A.; SALLOUM, R.M.; FLYNN, T.C.; BLAND, K.I.; COPELAND, E.M. The role of glutamine in maintaining a healthy gut and supporting the metabolic response to injury and infection. **Journal of Surgical Research**, v.48, p.383-391, 1990.

SPITTLER, A.; HOLZER, S.; OEHLER, R.; BOLTZ-NITULESCU, G.; ROTH, E. A glutamine deficiency impairs the function of cultured human monocytes. **Clinical Nutrition**, v.16, p.97-99, 1997.

SPITTLER, A.; WINKLER, S.; GOTZINGER, P.; OEHLER, R.; WILLHEIM, M.; TEMPFER, C.; WEIGEL, G.; FUGGER, R.; BOLTZ-NITULESCU, G.; ROTH, E. Influence of glutamine on the phenotype and function of human monocytes. **Blood**, v.86, p.1564-1569, 1995.

SPYRIDES, M.H.; STRUCHINER, C.J.; BARBOSA, M.T.; KAC, G. Breastfeeding practices and infant growth: a longitudinal study in Rio de Janeiro, Brazil, 1999/2001. **Cadernos de Saúde Pública**, v.21, p.756-766, 2005.

STAPLETON, P.P.; FUJITA, J.; MURPHY, E.M.; NAAMA, H.A.; DALY, J.M. The influence of restricted calorie intake on peritoneal macrophage function. **Nutrition**, v.17, p.41-45, 2001.

SUNDER-PLASSMANN, G.; PATRUTA, S.I.; HORL, W.H. Pathobiology of the role of iron in infection. **American Journal of Kidney Diseases**, v.34, p.S25-S29, 1999.

SUZUKI, I.; MATSUMOTO, Y.; ADJEI, A.A.; ASATO, L.; SHINJO, S.; YAMAMOTO, S. Effect of a glutamine supplemented diet on response to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in mice. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.39, p.405-410, 1993.

TAKAKURA, R.; KIYOHARA, T.; MURAYAMA, Y.; MIYAZAKI, Y.; MIYOSHI, Y.; SHINOMURA, Y.; MATSUZAWA, Y. Enhanced macrophage responsiveness to lipopolysaccharide and CD40 stimulation in a murine model of inflammatory bowel disease: IL-10-deficient mice. **Inflammation Research**, v.51, p.409-415, 2002.

TOMA, T.S.; MONTEIRO, C.A. Assessment of the promotion of breastfeeding in public and private maternities of Sao Paulo city, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v.35, p.409-414, 2001.

TRANTAFILOU, M.; TRANTAFILOU, K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. **Trends in Immunology**, v.23, p.301-304, 2002.

TRANTAFILOU, M.; TRANTAFILOU, K. The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. **Journal of Endotoxin Research**, v.11, p.5-11, 2005.

TSAN, M.F.; GAO, B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. **Journal of Leukocyte Biology**, v.76, p.514-519, 2004.

UAUY, R.; PEIRANO, P. Breast is best: human milk is the optimal food for brain development. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.70, p.433-434, 1999.

URBASCHEK, R.; URBASCHEK, B. Ability of post-endotoxin serum from BCG-infected mice to induce nonspecific resistance and stimulation of granulopoiesis. **Infection and Immunity**, v.39, p.1488-1490, 1983.

VAN STRAATEN, H.W.; HE, Y.; VAN DUIST, M.M.; LABRUYERE, W.T.; VERMEULEN, J.L.; VAN DIJK, P.J.; RUIJTER, J.M.; LAMERS, W.H.; HAKVOORT, T.B. Cellular concentrations of glutamine synthetase in murine organs. **Biochemistry and Cell Biology**, v.84, p.215-231, 2006.

VASCONCELOS, M.I.L.; TIRAPEGUI, J. Importância nutricional da glutamina. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.35, p.207-215, 1998.

VAZQUEZ-TORRES, A.; JONES-CARSON, J.; BALISH, E. Nitric oxide production does not directly increase macrophage candidacidal activity. **Infection and Immunity**, v.63, p.1142-1144, 1995.

VEJCHAPIPAT, P.; EATON, S.; FUKUMOTO, K.; PARKES, H.G.; SPITZ, L.; PIERRO, A. Hepatic glutamine metabolism during endotoxemia in neonatal rats. **Nutrition**, v.18, p.293-297, 2002.

VENANCIO, S.I.; ESCUDER, M.M.L.; KITOKO, P.; REA, M.F.; MONTEIRO, C.A. Freqüência e determinantes do aleitamento materno em municípios do Estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v.36, p.313-318, 2002.

VENANCIO, S.I.; MONTEIRO, C.A. Individual and contextual determinants of exclusive breast-feeding in Sao Paulo, Brazil: a multilevel analysis. **Public Health Nutrition**, v.9, p.40-46, 2006.

VOLPINI, C.C.A.; MOURA, E.C. Determinantes do desmame precoce no distrito noroeste de Campinas. **Revista de Nutrição**, v.18, p.311-319, 2005.

WALLACE, C.; KEAST, D. Glutamine and macrophages function. **Metabolism**, v.41, p.1016-1020, 1992.

WALSH, N.P.; BLANNIN, A.K.; CLARK, A.M.; COOK, L.; ROBSON, P.J.; GLEESON, M. The effects of high-intensity intermittent exercise on the plasma concentrations of glutamine and organic acids. **European Journal of Applied Physiology**, v.77, p.434-438, 1998a.

WALSH, N.P.; BLANNIN, A.K.; ROBSON, P.J.; GLEESON, M. Glutamine, exercise and immune function: links and possible mechanisms. **Sports Medicine**, v.26, p.177-191, 1998b.

WARD, C.G.; BULLEN, J.J.; ROGERS, H.J. Iron and infection: new developments and their implications. **Journal of Trauma**, v.41, p.356-364, 1996.

WATANABE, K.; KAGAYA, K.; YAMADA, T.; FUKAZAWA, Y. Mechanism for candidacidal activity in macrophages activated by recombinant gamma interferon. **Infection and Immunity**, v.59, p.521-528, 1991.

WEIBEL, E.R.; KISTLER, G.S.; SCHERLE, W.F. Practical stereological methods for morphometric cytology. **Journal of Cell Biology**, v.30, p.23-38, 1966.

WELLS, S.M.; KEW, S.; YAQOUB, P.; WALLACE, F.A.; CALDER, P.C. Dietary glutamine enhances cytokine production by murine macrophages. **Nutrition**, v.15, p.881-884, 1999.

WILSON, A.D.; STOKES, C.R.; BOURNE, J. Effect of age on absorption and immune responses to weaning or introduction of novel dietary antigens in pigs. **Research in Veterinary Science**, v.46, p.180-186, 1989.

WINDMUELLER, H.G.; SPAETH, A.E. Intestinal metabolism of glutamine and glutamate from the lumen as compared to glutamine from blood. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.171, p.662-672, 1975.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The optimal duration of exclusive breastfeeding. Note for the press n.7, April 2, 2001a. Disponível em: <http://www.who.int/inf-pr-2001/en/note2001-07.html>. Acesso em: 20 jun 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; UNICEF. **Global strategy for infant and young child feeding**. Geneva: WHO, 2001b. 30p.

WU, G.; FLYNN, S.P.; JOLLY, C.A.; DAVIS, P.K. Dietary protein or arginine deficiency impairs constitutive and inducible nitric oxide synthesis by young rats. **Journal of Nutrition**, v.129, p.1347-1354, 1999.

WU, G.; KNABE, D.A. Free and protein-bound amino acids in sow's colostrum and milk. **Journal of Nutrition**, v.124, p.415-424, 1994.

YAMAZAKI, A.; OHTSUKI, Y.; YOSHIHARA, T.; HONMA, S.; HONMA, K. Maternal deprivation in neonatal rats of different conditions affects growth rate, circadian clock,

and stress responsiveness differentially. **Physiology & Behavior**, v.86, p.136-144, 2005.

YASSAD, A.; HUSSON, A.; BION, A.; LAVOINNE, A. Synthesis of interleukin 1beta and interleukin 6 by stimulated rat peritoneal macrophages: modulation by glutamine. **Cytokine**, v.12, p.1288-1291, 2000.

YASSAD, A.; LAVOINNE, A.; BION, A.; DAVEAU, M.; HUSSON, A. Glutamine accelerates IL-6 production by rat peritoneal macrophages in culture. **FEBS Letters**, v.413, p.81-84, 1997.

YEH, S.L.; LAI, Y.N.; SHANG, H.F.; LIN, M.T.; CHEN, W.J. Effects of glutamine supplementation on innate immune response in rats with gut-derived sepsis. **British Journal of Nutrition**, v.91, p.423-429, 2004.

YOO, S.S.; FIELD, C.J.; MCBURNEY, M.I. Glutamine supplementation maintains intramuscular glutamine concentrations and normalizes lymphocyte function in early weaned pigs. **Journal of Nutrition**, v.127, p.2253-2259, 1997.

YOUNG, V.R.; AJAMI, A.M. Glutamine: the emperor or his clothes? **Journal of Nutrition**, v.131, p.2449-2459, 2001.



Of. CEEA nº 13

ANEXO 1

CERTIFICADO

*Certificamos que o Projeto “Efeito da suplementação com L-glutamina sobre a funcionalidade de macrófagos peritoniais de camundongos desmamados precocemente e inoculados com BCG (bacilo de Calmette-Guérin)” (Protocolo nº14), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). **Marcelo Macedo Rogero** e do orientador(a) **Júlio Orlando Tirapegui Toledo**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 02/06/2003.*

São Paulo, 03 de junho de 2003.

Elfriede Bacchi

*Prof. Assoc. Elfriede Marianne Bacchi
Coordenadora da CEEA*