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

Efeito da suplementação com L-glutamina livre e na forma de dipeptídeo sobre eixo glutamina-glutathiona, sistema imune, sistema inflamatório e vias de sinalização proteica em camundongos submetidos à endotoxemia

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Vinicius Fernandes Cruzat

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

Co-orientador:
Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.

São Paulo
2013

Vinicius Fernandes Cruzat

Efeito da suplementação com L-glutamina livre e na forma de dipeptídeo sobre eixo glutamina-glutathiona, sistema imune, sistema inflamatório e vias de sinalização proteica em camundongos submetidos à endotoxemia

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo
Presidente

Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno
1º. Titular

Prof. Dr. Ricardo A. Fock
2º. Titular

Prof^a. Dr^a. Ana Lydia Sawaya
3º. Titular

Prof^a. Dr^a. Luciana Mirotti
4º. Titular

São Paulo, 14 de Março de 2013.

CRUZAT, VF.

“Que homem é um homem se não torna o mundo melhor?”.

Jan Guillou em As Cruzadas

DEDICATÓRIA

*D*edico esta obra a meus pais Rosa e Patrício que novamente e de todas as formas tornaram este sonho uma realidade. Também dedico este trabalho a todos meus amigos que me ajudaram e fizeram acreditar que ele era possível, aceitando se privar de minha companhia pelos estudos, concedendo a mim a oportunidade de me realizar mais uma vez como profissional e como pessoa.

AGRADECIMENTOS

A meus pais Rosa Cruzat e Patrício Cruzat e a meu padrasto Ênio Lucchesi pelo apoio e por ter me dado a base de minha educação, coisas que a escola não ensina.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo, pelos ensinamentos, paciência e oportunidade de ter mostrado meu trabalho novamente.

Ao meu co-orientador e amigo Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr., pelos ensinamentos, credibilidade e valorosa construção no meu conhecimento, como profissional e como pessoa.

Aos membros e amigos do laboratório de Fisiologia Celular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FisCel), em especial Aline Bittencourt, Rossana Rosa Porto, Sofia Scomazzon, Thiago Gomes Heck e pelo excepcional trabalho em conjunto e produção científica.

Aos amigos Lucas Carmitatti Pantaleão, pela ajuda e companheirismo nas análises moleculares e ao Prof. Dr. José Donato Júnior e Marcelo Macedo Rogero por terem me incentivado e propiciado meu crescimento científico no início desta caminhada acadêmica e ainda até os dias de hoje.

A todos da Secretaria de Pós-Graduação e do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Universidade de São Paulo pelo trabalho de suma importância aos alunos, tais como eu.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) que, mais uma vez, financiou este projeto (Processo: 09/52853-1) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela essencial bolsa concedida.

A todas as pessoas das quais por ventura eu tenha esquecido de aqui citar e, de alguma forma, me auxiliaram nesta pesquisa e caminhada de vida.

CRUZAT, VF.

CRUZAT, V.F. Efeito da suplementação com L-glutamina livre e na forma de dipeptídeo sobre eixo glutamina-glutationa, sistema imune, sistema inflamatório e vias de sinalização proteica em camundongos submetidos à endotoxemia [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP; 2013. 169 p.

RESUMO

A sepse é a principal causa de morte em unidades de terapia intensiva (UTIs) no mundo. A reduzida disponibilidade do aminoácido mais abundante do organismo, a glutamina contribui para o complicado estado catabólico da sepse. No presente estudo investigamos os efeitos da suplementação oral com L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA), ambos na forma livre e como dipeptídeo, L-alanil-L-glutamina (DIP), sobre o eixo glutamina-glutationa (GSH), sistema imune, inflamação, proteínas de choque térmico (HSPs) e expressão de genes envolvidos com vias de sinalização proteica em animais endotoxêmicos. Camundongos C57/B6 foram submetidos à endotoxemia (*Escherichia coli* LPS, 5 mg.kg⁻¹, grupo LPS) e suplementados por 48 horas com L-glutamina (1 g.kg⁻¹) e L-alanina (0,61 g.kg⁻¹, grupo GLN+ALA-LPS) ou 1,49 g.kg⁻¹ de DIP (grupo DIP-LPS). A endotoxemia promoveu depleção da concentração de glutamina no plasma (71%), músculo esquelético (50%) e fígado (49%), quando comparado ao grupo CTRL, sendo restauradas nos grupos DIP-LPS e GLN+ALA-LPS (P<0,05), fato que atenuou a redução da GSH e o estado redox (taxa GSSG/GSH) em eritrócitos circulantes, músculo e fígado (P<0,05). A suplementação em animais endotoxêmicos resultou em uma *upregulation* dos genes GSR, GPX1 e GCLC no músculo e fígado. A concentração das citocinas plasmáticas TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10 foi atenuada pelas suplementações, bem como a expressão de mRNAs envolvidos com a resposta inflamatória,

CRUZAT, VF.

ativadas pela via do NF- κ B ($P<0,05$). Concomitantemente, verificou-se aumento da capacidade proliferativa de linfócitos T e B circulantes nos grupos GLN+ALA-LPS e DIP-LPS. A expressão de mRNAs e a concentração de HSPs no tecido muscular foi restabelecida pelas suplementações, contudo, a expressão mRNAs relacionados às vias de síntese e degradação proteica foi somente estimulada no tecido hepático ($P<0,05$). Os resultados do presente estudo demonstram que a suplementação por via oral com GLN+ALA ou DIP podem ser utilizados clinicamente como métodos nutricionais em reverter o quadro de depressão da disponibilidade de glutamina corporal da sepse induzida por LPS, tendo impacto no eixo glutamina-glutationa, sistema imune e inflamatório.

Palavras-Chave: Sepse. Glutamina. GSH. HSP. NF- κ B.

CRUZAT, V.F. Effects of dietary supplementation with L-glutamine in the free and dipeptide forms on glutamine-glutathione axis, immune system, inflammatory system and protein signaling pathways in mice submitted to endotoxemia [Doctoral Thesis]. São Paulo: Faculty of Pharmaceutical Sciences of USP; 2013. 169 p.

ABSTRACT

Sepsis is the leading cause of death in intensive care units (ICUs) in the world. The availability of the most abundant amino acid in the body, glutamine, is reduced in this situation, fact that contribute to the complicated catabolic state of sepsis. In the present study, we investigated the effects of oral supplementation with L-glutamine and L-alanine (GLN+ALA), both in their free form and as a dipeptide, L-alanyl-L-glutamine (DIP) on glutamine-glutathione axis (GSH), immune and inflammatory system, heat shock proteins (HSPs) expression and gene expressions involved in protein signaling pathways during endotoxemia. C57/B6 mice were subjected to endotoxemia (*Escherichia coli* LPS, 5 mg.kg⁻¹, LPS group) and supplemented for 48 hours with L-glutamine (1 g.kg⁻¹) plus L-alanine (0.61 g.kg⁻¹, GLN+ALA-LPS group) or 1.49 g.kg⁻¹ of DIP (DIP-LPS group). Endotoxemia promoted depletion glutamine concentration in plasma (71%), skeletal muscle (50%) and liver (49%), when compared to the CTRL group, and was restored in the DIP-LPS e GLN+ALA-LPS (P<0.05), fact that attenuate the reduction of GSH and the redox state (GSSG/GSH rate) in circulating erythrocytes, liver and muscle (P<0.05). Supplementations in endotoxemic mice resulted in upregulation of GSR, GCLC and GPX1 genes in muscle and liver. Plasma concentration of TNF- α , IL-6, IL-1 β and IL-10 were attenuated by supplementation as well as the expression of mRNAs involved in the inflammatory response, activated by NF- κ B pathway (P <0.05). At the same

CRUZAT, VF.

time, high proliferative capacity of circulating T and B lymphocytes GLN+ALA-LPS e DIP-LPS were observed. HSPs (protein and mRNAs) and in muscle were restored by the supplements, however, the mRNAs expression related to the synthesis and degradation of protein pathways was only stimulated in the liver ($P < 0.05$). Our results demonstrate that oral supplementation with GLN+ALA or DIP can be used as clinically nutritional methods to reverse the depression of body glutamine availability during sepsis induced by LPS, impacting on the glutamine-glutathione axis, immune and inflammatory system

Key-words: Sepsis. Glutamine. GSH. HSP. NF- κ B.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Síntese de glutamato e glutamina.....	21
Figura 2 - Hidrólise de glutamina á glutamato.....	23
Figura 3 - Predominância na síntese e degradação de glutamina em condições de saúde.....	24
Figura 4 - Destinos e funções da glutamina.....	28
Figura 5 - Métodos de identificação de patógenos.....	32
Figura 6 - Relação de desenvolvimento e agravamento da sepse a partir de diversas causas.....	34
Figura 7 - Risco de mortalidade hospitalar em pacientes com sepse grave.....	37
Figura 8 - Predominância na síntese e degradação de glutamina em situações patológicas.....	40
Figura 9 - Proliferação de linfócitos depende da concentração de glutamina no meio extracelular.....	43
Figura 10 - Transporte de aminoácidos e peptídeos na célula intestinal.....	48
Figura 11 - Representação esquemática da captação de glutamina por enterócitos.....	50
Figura 12 - Percentual de sobrevivência após injeção de LPS.....	62
Figura 13 - Peso corporal no período de até 48 horas.....	87
Figura 14 - Consumo de ração no período de até 48 horas.....	88
Figura 15 - Concentração plasmática de TNF- α e IL-6.....	91
Figura 16 - Concentração plasmática de IL-1 β e IL-10.....	92
Figura 17 - Proliferação de linfócitos totais por 48 horas.....	93

Figura 18 - Proliferação de linfócitos T por 48 horas.....	94
Figura 19 - Proliferação de linfócitos B por 48 horas.....	95
Figura 20 - Concentração de TBARS no músculo gastrocnêmio.....	101
Figura 21 - Concentração da HSP90 no músculo gastrocnêmio.....	102
Figura 22 - Concentração da HSP70 no músculo gastrocnêmio.....	103
Figura 23 - Concentração da HSP27 no músculo gastrocnêmio.....	104
Figura 24 - Concentração do NF- κ B <i>p65</i> no músculo gastrocnêmio.....	105
Figura 25 - Concentração da forma fosforilada do I κ B- α/β no músculo gastrocnêmio.....	106
Figura 26 - Conjunto 1 de expressões de mRNAs (RT-qPcR) no músculo gastrocnêmio.....	107
Figura 27 - Conjunto 2 de expressões de mRNAs (RT-qPcR) no músculo gastrocnêmio.....	108
Figura 28 - Conjunto 3 de expressões de mRNAs (RT-qPcR) no músculo gastrocnêmio.....	110
Figura 29 - Concentração de TBARS no tecido hepático.....	115
Figura 30 - Conjunto 1 de expressões de mRNAs (RT-qPcR) no tecido hepático.....	116
Figura 31 - Conjunto 2 de expressões de mRNAs (RT-qPcR) no tecido hepático.....	118
Figura 32 - Conjunto 3 de expressões de mRNAs (RT-qPcR) no tecido hepático.....	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de glutamina e glutamato em diversos tipos de fibras musculares esqueléticas no estado de repouso.....	25
Tabela 2 - Transportadores de aminoácidos livres em enterócitos.....	46
Tabela 3 - Estudos de suplementação com L-glutamina livre e como dipeptídeo na NPT.....	55 e 56
Tabela 4 - Camundongos B6 adultos submetidos a diferentes doses de LPS.....	62
Tabela 5 - Lista genes utilizados na expressão mRNAs.....	79
Tabela 6 - Peso corporal dos animais no período de até 48 horas.....	86
Tabela 7 - Consumo de ração dos animais no período de até 48 horas.....	88
Tabela 8 - Composição corporal dos animais.....	89
Tabela 9 - Concentração de glutamina, glutamato, glicose e amônio plasmáticos.....	90
Tabela 10 - Concentração de GSH e GSSG em hemácias.....	96
Tabela 11 - Concentração de glutamina e glutamato no músculo gastrocnêmio.....	98
Tabela 12 - Concentração de GSH e GSSG no músculo gastrocnêmio.....	99
Tabela 13 - Concentração de glutamina e glutamato hepáticos.....	112
Tabela 14 - Concentração de GSH e GSSG hepáticos.....	114

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. OBJETIVO GERAL.....	18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1. METABOLISMO, DESTINOS E FUNÇÕES DA GLUTAMINA	19
3.2. PATOFISIOLOGIA E EPISTEMOLOGIA DA SEPSE	29
3.3. METABOLISMO DA GLUTAMINA NA SEPSE	38
3.4. ABSORÇÃO INTESTINAL DE GLUTAMINA NA FORMA LIVRE E COMO DIPEPTÍDEO.....	44
3.5. GLUTAMINA: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO EM ESTADOS CATABÓLICOS	53
4. MATERIAL E MÉTODOS	61
4.1. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	61
4.1.1. Animais	61
4.1.2. Protocolo de endotoxemia	61
4.1.3. Dieta e suplementação.....	63
4.1.4. Grupos experimentais	64
4.2. COLETAS DE SANGUE E TECIDOS	64
4.2.1. Parâmetros plasmáticos e séricos.....	65
4.2.1.1. Glutamina e glutamato	65
4.2.1.2. Amônio plasmático	66
4.2.1.3. Glicose plasmática	66
4.2.1.4. Glutathione reduzida (GSH) e dissulfeto de glutathione (GSSG) eritrocitária.....	67
4.2.1.5. Citocinas plasmáticas.....	68
4.2.1.6. Separação de linfócitos plasmáticos.....	69
4.2.1.7. Capacidade proliferativa de linfócitos	70
4.2.2. Parâmetros teciduais.....	71
4.2.2.1. Glutamina e glutamato	71
4.2.2.2. Glutathione reduzida (GSH) e dissulfeto de glutathione (GSSG).....	72
4.2.2.3. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	74
4.2.2.4. Eletroforese e protocolo de <i>Western Blot</i>	74
4.2.2.5. Extração de RNA total e quantificação	76
4.2.2.6. Transcrição reversa	77
4.2.2.7. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR)	78
4.3. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CORPORAL	80
4.3.1. Umidade.....	80
4.3.2. Lipídeo	81
4.3.3. Proteína e massa magra	81
4.3.4. Cinzas	84
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	85
5. RESULTADOS.....	86
5.1. PARÂMETROS BIOMÉTRICOS.....	86
5.1.1. Peso corporal	86
5.1.2. Consumo de ração.....	88
5.1.3. Composição corporal.....	89

5.2. PARÂMETROS PLASMÁTICOS E SÉRICOS.....	90
5.2.1. Concentração de glutamina, glutamato, glicose e amônio plasmáticos	90
5.2.2. Concentração de citocinas plasmáticas	91
5.2.3. Capacidade proliferativa de linfócitos plasmáticos	93
5.2.4. Concentração de GSH e GSSG em hemácias.....	96
5.3. PARÂMETROS TECIDUAIS.....	98
5.3.1. Concentração de glutamina e glutamato no músculo gastrocnêmio.....	98
5.3.2. Concentração de GSH e GSSG no músculo gastrocnêmio.....	99
5.3.3. Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no músculo gastrocnêmio	101
5.3.4. Concentração de proteínas no músculo gastrocnêmio	102
5.3.5. Expressão de mRNAs (RT-qPcR) no músculo gastrocnêmio	107
5.3.6. Concentração de glutamina e glutamato hepáticos.....	112
5.3.7. Concentração de GSH e GSSG no tecido hepático	114
5.3.8. Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no tecido hepático	115
5.3.9. Expressão de mRNAs (RT-qPcR) no tecido hepático.....	116
6. DISCUSSÃO.....	121
7. CONCLUSÃO	141
8. REFERÊNCIAS.....	142
9. ANEXOS	168

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares isquêmicas, os acidentes vasculares encefálicos e o câncer lideram as taxas de mortalidade no mundo, independentemente de se considerar a renda da população. Nos países de baixa renda as diarreias ocupam o segundo lugar como causa de mortalidade (OMS, 2011) sendo precedidas por doenças pulmonares. Estas doenças necessitam de um tratamento intensivo, levando ao aparecimento da sepse, razão pela qual muitos autores consideram a sepse como a principal causa de morte (DELLINGER, 2008; TELES *et al.*, 2008).

A sepse, síndrome clínica que decorre de infecção associada à inflamação sistêmica e lesão tecidual, conhecida como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) pode se desenvolver a partir de qualquer situação patológica (REMICK, 2007). A SIRS, que pode ou não ser ocasionada por uma infecção, manifesta-se, geralmente, como uma combinação de irregularidades de sinais vitais (BONE *et al.*, 1992; JAESCHKE, BROŽEK, DELLINGER, 2008). Dependendo da gravidade da doença, a sepse severa é definida como sepse com falência de órgãos, enquanto a síndrome da disfunção múltipla de órgãos (MODS) indica o mau funcionamento de mais de um órgão. A infecção relacionada ao mau funcionamento de mais de um órgão está relacionada a quadros de encefalopatia aguda, trombocitopenia e hipoxemia arterial como um sinal de disfunção pulmonar, hipotensão arterial, falência renal e acidose metabólica (SILVA, VELASCO, 2007; STEPHANIE, STEPHAN, 2009).

A contaminação por patógenos, tais como vírus, fungos, parasitas e, principalmente bactérias, agravam a SIRS, levando o paciente a um desequilíbrio sistêmico e perda da homeostasia, fato que compromete as CRUZAT, VF.

chances de recuperação e expõem o ser humano a um elevado risco de morte (PICARD *et al.*, 2006; BAPTISTE, 2007).

A elevada e descontrolada resposta inflamatória promovida pelo organismo, somada à infecção levam o indivíduo a apresentar falência múltipla de órgãos (DELLINGER *et al.*, 2008). Concomitantemente ao agravamento da SIRS e sepse o paciente torna-se atrofiado e propenso a perda de massa muscular, fato que contribui ainda mais para elevar o risco de morte (SZULC *et al.*, 2010; CONSTANTIN *et al.*, 2011). Isso ocorre por um aumento da ativação de vias de degradação proteica e inibição da síntese, que culmina em apoptose celular e atrofia (TISDALE, 2005).

No Brasil, a taxa de mortalidade pelo desenvolvimento de sepse e seu estado mais grave, a sepse severa e o choque séptico em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) é de cerca de 55%, superando taxas de países como Austrália, Índia, Canadá e Argentina (TELES *et al.*, 2008). Além disso, dados tanto do Brasil, quanto dos Estados Unidos mostram que os pacientes com SIRS ou sepse possuem custo de hospitalização bastante elevado (ANGUS *et al.*, 2001; SOGAYAR *et al.*, 2008). Considerando-se as premissas anteriores, pode-se inferir que é importante o desenvolvimento de estratégias economicamente viáveis que possam contribuir para reduzir a mortalidade são bastante importantes.

Uma das estratégias nutricionais mais divulgadas na área da nutrição é a utilização do aminoácido L-glutamina como um suplemento nutricional em situações de elevado catabolismo (D'SOUZA, TUCK, 2004; CRUZAT *et al.*, 2007). A glutamina está envolvida com a doação de nitrogênio para a formação de ácidos nucléicos, contribui para o equilíbrio ácido-base e aminogênese, CRUZAT, VF.

fornece substrato energético e auxilia a síntese de proteínas intracelulares, entre outras funções, principalmente ligadas ao metabolismo intermediário de aminoácidos (NEWSHOLME *et al.*, 2003; CRUZAT, PETRY, TIRAPEGUI, 2009).

A suplementação com L-glutamina por via oral ou enteral, em situações catabólicas, contudo, exhibe resultados contraditórios quanto à forma de administração, seja esta como aminoácidos livre ou na forma de dipeptídeo (KOZJEK *et al.*, 2011; MARWOOD *et al.*, 2011). Por outro lado, a maioria de estudos com glutamina por via parenteral promove benefícios na recuperação de pacientes oriundos de diferentes patologias e processos catabólicos (WANG *et al.*, 2010). Estudos em modelos animais submetidos a estresses metabólicos, tais como exercícios físicos exaustivos verificaram que tanto a suplementação com dipeptídeos de glutamina (L-alanil-L-glutamina) e L-glutamina livre, em conjunto com L-alanina demonstraram atenuar a redução da disponibilidade de glutamina corporal (CRUZAT, TIRAPEGUI, 2009). Adicionalmente, o sistema antioxidante, mediado pela glutathione (GSH) foi potencializado, fato que influenciou a redução do processo lesivo inflamatório nos animais (CRUZAT, TIRAPEGUI, 2009; CRUZAT, ROGERO, TIRAPEGUI, 2010). Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da suplementação oral com L-glutamina e L-alanina, ambas na forma livre ou com o dipeptídeo, L-alanil-L-glutamina sobre o sistema antioxidante, mediado pelo eixo glutamina-GSH, sistema imunitário e inflamatório, bem como sobre vias de sinalização proteica em camundongos submetidos a um modelo de sepse, conhecido como endotoxemia.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo geral investigar os efeitos da suplementação com L-glutamina e L-alanina, ambas na forma livre e na forma de dipeptídeo (L-alanil-L-glutamina) sobre o sistema antioxidante, sistema imunoinflamatório e vias de sinalização proteica em camundongos submetidos a um modelo de sepse, conhecido como endotoxemia.

2.2. Objetivos Específicos

Avaliar o efeito das intervenções nutricionais sobre:

- 2.1.1. Peso corporal, consumo de ração e composição corporal.
- 2.1.2. Eixo glutamina e glutatona.
- 2.1.3. Peroxidação lipídica muscular e hepática.
- 2.1.4. Citocinas plasmáticas e via do NF- κ B (RT-qPcR e *Western Blot*).
- 2.1.5. Proliferação de linfócitos circulantes.
- 2.1.6. Expressão de mRNAs (RT-qPcR) e concentração de proteínas de choque térmico musculares (*Western Blot*).
- 2.1.7. Expressão de mRNAs (RT-qPcR) musculares e hepáticos de síntese e degradação proteica.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Metabolismo, destinos e funções da glutamina

Os primeiros relatos científicos a considerar a glutamina como sendo uma molécula com propriedades biologicamente importantes datam do século XVIII. Pesquisadores como Hlasiwetz e Habermann, Schulze e Bosshard e, Damodaran e seus colaboradores contribuíram de forma significativa na caracterização e compreensão do metabolismo da glutamina. Entretanto, foi a partir dos trabalhos de *sir* Hans Krebs, que mostrou a capacidade de células sintetizar ou degradar glutamina, em 1935, que diversos pesquisadores despertaram maior interesse sobre o assunto (ARDAWI, NEWSHOLME, 1983; ARDAWI, NEWSHOLME, 1985; CURI, 2000).

Após o período que envolveu a segunda guerra mundial, estudos desenvolvidos por Eagle mostraram que a glutamina é importante para o crescimento e manutenção celular (EAGLE, 1955; EAGLE *et al.*, 1956). Em cultura, células utilizam glutamina em quantidades superiores a de qualquer outro aminoácido (CURI *et al.*, 2005). Este fato já havia sido verificado por Eagle *et al.* (1956) que observaram a degeneração da estrutura de fibroblastos isolados de camundongos e cultivados em meios sem glutamina, seguindo-se da morte celular. Outros trabalhos com diferentes tipos de células, tais como linfócitos (ARDAWI, NEWSHOLME, 1982), macrófagos (ARDAWI, NEWSHOLME, 1983; ARDAWI, NEWSHOLME, 1985), enterócitos (YAMAUCHI *et al.*, 2002) e células HeLa (EAGLE, 1959) mostraram que tanto a desenvolvimento celular pode ser aumentado, quanto a manutenção das estruturas e funções celulares pode ser mantida, em meios de cultura contendo

glutamina. Em todas as células, a glutamina pode ceder átomos de nitrogênio para a síntese de purinas, pirimidinas e aminoaçúcares (NEWSHOLME *et al.*, 2003b). Tais resultados evidenciam a importância da glutamina para um grande número de vias metabólicas e esses mecanismos, dependentes de glutamina, passaram a ser denominados como vias glutaminolíticas (LACEY, WILMORE, 1990).

Bioquimicamente, a glutamina ($C_5H_{10}N_2O_3$) é um L- α -aminoácido, com peso molecular de aproximadamente 146,15 kilodaltons e pode ser sintetizada por todos os tecidos do organismo (CURI, 2000; NEWSHOLME *et al.*, 2003b). Fazem parte de sua composição química nas seguintes quantidades: carbono (41,09%), oxigênio (32,84%), nitrogênio (19,17%) e hidrogênio (6,90%) (LACEY, WILMORE, 1990). De acordo com seu grupamento R, a glutamina é não carregada, mas é polar, o que significa uma característica mais hidrofílica, sendo facilmente hidrolisada por ácidos ou bases (YOUNG, AJAMI, 2001). De acordo com suas propriedades físico-químicas, a glutamina pode servir para a síntese de diversos compostos, entre os quais outros aminoácidos ou mesmo diversos homólogos e análogos de 4 a 6 carbonos (SANDBERG *et al.*, 1998). Os homólogos neutros que compõem o que pode ser chamada de família de compostos da glutamina podem ser considerados moléculas termodinamicamente estáveis. Como sua função é transportar e doar nitrogênio pela sua porção amino terminal, então se pode dizer que eles são os compostos mais adequados para fazê-lo sob a maior diversidade de condições na evolução molecular (YOUNG, AJAMI, 2001).

Como o organismo pode sintetizar glutamina, esta é nutricionalmente classificada como um aminoácido dispensável ou não essencial (LACEY, CRUZAT, VF.

WILMORE, 1990). Esta classificação, entretanto, depende da homeostasia corporal e se considerarmos a família de compostos da glutamina, em situações catabólicas tais como sepse (PARRY-BILLINGS *et al.*, 1989), infecções (ROGERO *et al.*, 2008), cirurgias (HAYASHI *et al.*, 2002), traumas (FLÄRING *et al.*, 2003) e exercícios físicos intensos e prolongados (CRUZAT, TIRAPEGUI, 2009), a síntese de glutamina não supre a demanda exigida pelo organismo. Em tais casos de carências, a glutamina assume o papel de um aminoácido condicionalmente essencial.

Duas são as enzimas responsáveis pela síntese de glutamina, a partir do glutamato ou por sua degradação, também em glutamato, a saber a glutamina sintetase (GS) e a glutaminase (GA), respectivamente (NEU, SHENOY, CHAKRABARTI, 1996). Cabe ressaltar que o glutamato, por sua vez é sintetizado a partir do alfa-cetoglutarato, intermediário do ciclo de Krebs e amônia (Figura 1).

Figura 1. Síntese de glutamato pela ação da enzima glutamato desidrogenase (A) e síntese de glutamina catalisada pela enzima glutamina sintetase (B).

Catalisando a conversão de glutamato em glutamina, utilizando amônia como fonte de nitrogênio e com gasto de trifosfato de adenosina (ATP), a GS é a enzima chave para a síntese da glutamina e para a regulação do metabolismo celular do nitrogênio (Figura 1). A GS é uma amidotransferase com distribuição generalizada entre os organismos vivos, sendo sua atividade fundamental para a manutenção da vida de microrganismos e de animais (CHAKRABARTI *et al.*, 1995; CURI, 2000).

Diversos são os fatores que regulam a atividade da GS, tais como glicocorticóides, hormônios tireoidianos, hormônio do crescimento e insulina. Diferentes funções são atribuídas às ações da GS (LABOW, SOUBA, ABCOUWER, 2001). No encéfalo, é utilizada como um importante agente na redução da concentração de amônia, com consequente desintoxicação e síntese de glutamina para nova síntese de glutamato (SOLBU *et al.*, 2010). No pulmão e no músculo esquelético (HE *et al.*, 2010), é responsável pela manutenção da concentração de glutamina plasmática, sendo essencial em situações patológicas ou de estresse (PINEL *et al.*, 2006). Nos rins, a GS é imprescindível para o controle do metabolismo do nitrogênio e manutenção do pH no organismo (LABOW, SOUBA, ABCOUWER, 2001). Cabe lembrar que em todos estes órgão e tecidos, a GS é encontrada no citosol (LABOW, SOUBA, ABCOUWER, 2001).

Diferentemente da GS, a GA é a enzima que catalisa a hidrólise de glutamina em glutamato e íon amônio (Figura 2). Outras denominações para esta enzima são: glutaminase fosfato-dependente, glutaminase ativada por fosfato, glutaminase 1 ou glutaminase mitocondrial (NEU, SHENOY, CHAKRABARTI, 1996). A hidrólise da glutamina representa o primeiro passo

CRUZAT, VF.

na sua utilização a partir da síntese do glutamato. Outras reações podem ocorrer principalmente na via que permite o consumo de glutamina no ciclo do ácido tricarboxílico (NEU, SHENOY, CHAKRABARTI, 1996; RENNIE *et al.*, 2001).

Figura 2. Hidrólise de glutamina á glutamato pela enzima glutaminase (Adaptado de CURI, 2000).

A GA está envolvida em diversos processos metabólicos e pode ser encontrada em bactérias, plantas e animais. Em mamíferos, a GA pode ser encontrada sob duas isoformas, uma (menos abundante) no fígado e outra nos demais tecidos, tais como rins, cérebro, leucócitos e trato gastrointestinal (CURI, 2000). Contudo, a sua forma mais ativa apresenta-se principalmente nas mitocôndrias (NEU, SHENOY, CHAKRABARTI, 1996).

Indivíduos considerados saudáveis, pesando aproximadamente 70 Kg, apresentam cerca de 70 - 80 g de glutamina, distribuída por diversos tecidos corporais. No sangue, a concentração de glutamina é em torno de 500 - 700 $\mu\text{mol/L}$ (D'SOUZA, TUCK, 2004). Tanto a concentração tecidual, quanto a concentração sanguínea de glutamina podem ser influenciadas de acordo com a atividade da GS ou da GA. Alguns tipos de células, tais como células do sistema imune, rins e intestino, apresentam elevada atividade da GA, sendo assim considerados tecidos predominantemente consumidores de glutamina

(VAN DE POLL *et al.*, 2004). Por outro lado, os músculos esqueléticos, os pulmões, o fígado, o cérebro e, possivelmente, o tecido adiposo apresentam elevada atividade da enzima GS, sendo assim considerados tecidos predominantemente sintetizadores de glutamina (Figura 3).

Figura 3. Predominância (flechas espessas) na síntese e degradação de glutamina por diversos tecidos e órgãos em condições normais e de saúde. Abreviaturas: SNS = Sistema nervoso central, NH_3 = Amônia, GLN = Glutamina. Adaptado de Rowbottom, Keast e Morton (1996).

O tecido com maior capacidade de síntese de glutamina é o fígado. Entretanto, quantitativamente, o principal tecido de síntese, estoque e liberação de glutamina é o tecido muscular esquelético. Este apresenta elevada atividade das enzimas GS e aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (ACR) (VAN DE POLL *et al.*, 2004). Embora possa variar, a taxa de síntese de glutamina no músculo esquelético é de aproximadamente 50 mmol/h, sendo CRUZAT, VF.

maior em relação a qualquer outro aminoácido (NEWSHOLME *et al.*, 2003a). Além disso, a elevada capacidade de síntese e liberação de glutamina, principalmente em situações em que há aumento na sua demanda por outros órgãos e tecidos, confere ao músculo esquelético um papel metabólico essencial na homeostasia corporal.

A predominância do tipo de fibra muscular pode influenciar a síntese de glutamina (WALSH *et al.*, 1998). De acordo com a tabela 1, fibras do tipo 1 podem apresentar cerca de três vezes mais estoques de glutamina em comparação a fibras do tipo 2 (ROWBOTTOM, KEAST, MORTON, 1996; CURI, 2000). Atribui-se este fato à maior atividade da GS e à maior disponibilidade de ATP para a síntese de glutamina. Dependendo do músculo estudado, quando a síntese *de novo* da glutamina é inibida, os estoques intramusculares podem ser depletados em aproximadamente 7 horas (RENNIE *et al.*, 2001).

Tabela 1. Concentração de alanina, glutamina e glutamato e o tipo de fibras predominantes em músculos esqueléticos no repouso (Modificado de Graham e MacLean, 1998).

Aminoácidos	Tecidos		
	Vasto lateral (Humano)	Gastrocnêmio (Rato)	Solear (Rato)
Alanina ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco)	1,7 - 3,2	0,8 - 2,7	1,1 - 2,3
Glutamina ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco)	12,8 - 18,2	2,6 - 5,2	7,8 - 17,3
Glutamato ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco)	2,3 - 4,8	0,8 - 2,1	3,6 - 11,0

A síntese da glutamina no músculo esquelético, durante o estado pós-absortivo ocorre por meio da captação de glutamato, a partir da circulação sanguínea. O glutamato é responsável por 40% da síntese de glutamina (NEWSHOLME *et al.*, 2003a; NEWSHOLME *et al.*, 2003b). O catabolismo

proteico leva à produção de glutamina de forma direta e também à síntese de outros aminoácidos (ROGERO, TIRAPEGUI, 2000). Os esqueletos de carbono destes aminoácidos são utilizados para a síntese *de novo* de glutamina (NEWSHOLME *et al.*, 2003a; CRUZAT, PETRY, TIRAPEGUI, 2009).

Estudos em ratos demonstram que os ACR são transaminados, quase que exclusivamente com α -cetoglutarato para formar glutamato, o qual pode fornecer seu grupo amino para formar piruvato, gerando alanina, ou incorporar amônia livre, dando origem a glutamina (RUTTEN *et al.*, 2005). Entretanto, os ACR não são completamente metabolizados, porque a enzima chave de controle da sua taxa de oxidação (2-oxoisovalerato desidrogenase) apresenta-se quase totalmente na forma inativa no músculo esquelético. Consequentemente, no tecido muscular, os ACR captados inicialmente são utilizados como fornecedores de nitrogênio na formação de glutamina e alanina (NEU, SHENOY, CHAKRABARTI, 1996; MEIJER, 2003).

Hormônios como a insulina e os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) estimulam o transporte de glutamina para o meio intracelular, ao passo que glicocorticóides estimulam a liberação de glutamina para o meio extracelular (WINDMUELLER, 1982; ROGERO, TIRAPEGUI, 2003b). Considerando-se que o gradiente transmembrana através da célula muscular é elevado para a glutamina, sua difusão livre através da membrana celular é restrita (BODE, 2001; ROGERO, TIRAPEGUI, 2003b). Desta forma, a glutamina necessita ser transportada de forma ativa para o interior das células, por meio de um sistema dependente de sódio (Na^+), que resulta em gasto de ATP (WINDMUELLER, 1982; BODE, 2001). Cabe salientar que o transporte de

glutamina através da membrana da célula muscular é o mais veloz dentre todos os vinte aminoácidos (NEWSHOLME *et al.*, 2003a).

A glutamina, ao ser transportada para dentro da célula, promove, concomitantemente, a absorção de água e a liberação de potássio (K^+), fato que aumenta o estado de hidratação celular e influencia o seu volume (Figura 4) (WINDMUELLER, 1982; PARRY-BILLINGS *et al.*, 1991). O aumento no volume celular pode estimular a síntese protéica, o que é considerado como um sinal anabólico (HÄUSSINGER, LANG, GEROK, 1994; ROWBOTTOM, KEAST, MORTON, 1996; MEIJER, 2003).

A glutamina está envolvida em uma série de vias bioquímicas e celulares e intercelulares. Dentre as funções bioquímicas pode-se salientar a doação de nitrogênio para a formação de ácidos nucleicos, a essencial contribuição para o equilíbrio ácido-base e aminogênese, o fornecimento de substrato energético e o auxílio na síntese de proteínas intracelulares (Figura 4). Dentre as funções celulares pode-se destacar a participação na divisão de células do sistema imune, processos de recuperação de estresses fisiológicos, tais como cirurgias, ferimentos, jejum prolongado, entre outros (DÉCHELOTTE *et al.*, 1991; JACKSON, CARROLL, RUSSEL-JONES, 2000). Quando hidrolisada no citosol ou nas mitocôndrias, a glutamina torna-se fornecedora de glutamato. Dependendo do órgão ou tipo celular envolvido, o glutamato é substrato para a síntese de ácido gama-aminobutírico (GABA) no sistema nervoso central, glicose nos rins, ureia no fígado entre outros metabólitos (NEWSHOLME *et al.*, 2003a). A figura 4 ilustra algumas funções da glutamina e glutamato dentro das células. Uma das funções ainda a serem mais bem elucidadas está no fato da disponibilidade de glutamato aumentar a síntese do principal e em maior

CRUZAT, VF.

3.2. Patofisiologia e epistemologia da sepse

Desde os tempos mais antigos, o ser humano busca por meio da ciência e medicina reduzir os problemas de saúde que assustam a humanidade e elevam a sua taxa de mortalidade. Documentos de antigas civilizações, tais como a grega e a romana, na época de Hipócrates (460 a 377 a.C.), descreviam a ocorrência de diversas enfermidades, muitas delas contagiosas que levavam o indivíduo a morte. Uma destas era chamada de sepse, derivada da palavra grega “*sepsís*”. A sepse era descrita como um estado físico e mental perigoso que o ser humano desenvolvia, apresentando decomposição biológica, feridas purulentas e putrefação de tecidos corpóreos (MAJNO, 1991).

Os gregos acreditavam que a sepse era uma forma de decomposição biológica que poderia ocorrer dentro do organismo, principalmente no cólon de intestinos, uma vez que neste órgão havia perigosos seres capazes de causar autointoxicação. Aristoteles e posteriormente os romanos propuseram que o estado de sepse era um processo de decomposição similar ao de pântanos em putrefação, onde criaturas vivas e invisíveis se reproduziam (BARON, BARON, PERRELLA, 2006). No intuito de explicar de onde estas criaturas vivas vinham, a teoria do pesquisador Francisco Redi (1684) sobre a “geração espontânea” de animais pequenos e perigosos guiou as iniciativas de saúde pública nas cidades romanas e ainda em outras cidades da Mesopotâmia, dado que eram crescentes os problemas associados a enchentes, higiene e falta de alimentos. A teoria de que microrganismos vivos poderiam nascer espontaneamente foi refutada cerca de 200 anos depois de sua invenção, contudo a sepse continuou crescer em razão dos mesmos motivos (BARON, BARON, PERRELLA, 2006).

CRUZAT, VF.

O desenvolvimento e a etiologia da sepse se tornaram mais evidentes a partir do século XIX pelos pesquisadores Ignaz Semmelweiss, Louis Pasteur e Joseph Lister, que estabeleceram definitivamente que os processos de infecção e supuração eram causados por organismos vivos microscópicos. Desta forma, a palavra sepse se tornou sinônimo de graves infecções invasivas. Na realidade, dicionários médicos que datam de 1972 definem sepse como a “presença de pus formado a partir de organismos estranhos na corrente sanguínea” (MARSHALL, 2004). A evolução do conhecimento sobre a sepse e outros tipos de contaminações foi crescendo através dos séculos (Figura 5). Mais recentemente, as técnicas de biologia molecular, por exemplo, vêm auxiliando a compreensão dos principais genes envolvidos com o desenvolvimento da sepse, fato que pode ajudar no desenvolvimento de novas terapias de tratamento e diagnóstico precoce (VINCENT, ABRAHAM, 2006). Entretanto, a sepse ainda parece ser uma síndrome de grande complexidade, envolvendo mecanismos genéticos e epigenéticos, alterando a expressão de uma variedade de genes e ainda de difícil tratamento (CORNELL *et al.*, 2010).

Algumas descobertas científicas reduziram significativamente a taxa de mortalidade em populações. Entre 1930 e 1950, a pasteurização do leite e posteriormente a descoberta da penicilina e desenvolvimento de antibióticos promoveu uma queda significativa nas taxas de mortalidade em todo o mundo. Países como os EUA viram suas taxas de mortalidade cair de cerca de 800 mortes em 100,000 habitantes ao ano, para aproximadamente 70 mortes em 100,000 habitantes (MARSHALL, 2004). A introdução de políticas públicas de saúde, a imunização e a introdução de terapias antimicrobianas proporcionaram taxas de mortalidade mais baixas em populações por todo o

mundo. Contudo, após estas ações, ainda nos dias de hoje, pouco sucesso se teve em reduzir as taxas de mortalidade em unidades de terapias intensivas (UTIs). Apesar dos avanços tecnológicos e progressos moleculares a incidência de sepse associada à mortalidade se mantém elevada. Adicionalmente, verifica-se elevado risco de morte por desenvolvimento de sepse em crianças e neonatos advindos de partos prematuros ou mesmo de desmame precoce em diversos países, incluindo o Brasil (CORNELL *et al.*, 2010; MANGIA *et al.*, 2011). Embora o termo sepse seja utilizado e definido há bastante tempo como um estado crítico resultante de infecção, acompanhado pela síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) (BONE *et al.*, 1992), uma definição específica e conceitos básicos de sua gênese ainda são constantemente criticados (MARSHALL, 1999; MARSHALL, 2004; JAESCHKE, BROŽEK, DELLINGER, 2008).

Figura 5. Métodos de identificação de patógenos a partir do século XIX até os dias de hoje. Modificado de Baron, Baron, Perrella (2005).

Em 1992 foi publicado um consenso de definição da sepse, que coloca a presença de infecção (ou suspeita) e de outros dois ou mais sintomas: (1) temperatura corporal maior do que 38°C ou menor do que 36°C, (2) frequência cardíaca de mais de 90 batimentos por minuto, (3) frequência respiratória maior que 20 inspirações por minuto e (4) contagem total de leucócitos maior do que 12.000 células por microlitro (μL) ou menor do que 4.000/ μL ou ainda mais de 10% de células imaturas (BONE *et al.*, 1992; VINCENT, ABRAHAM, 2006). Em 2006, especialistas das sociedades de terapia intensiva norte-americana e europeia propuseram novos critérios diagnósticos de sepse, que incluem presença de infecção e “alguns” critérios de SIRS, que devem ser avaliados por uma equipe multidisciplinar de especialistas para adequado diagnóstico

(NGUYEN *et al.*, 2006). A evolução da sepse, chamada sepse grave é definida como a presença de sepse acrescentada de uma ou mais disfunções em órgãos vitais, como injúria pulmonar aguda, falência renal, hepática ou cardíaca e hipoperfusão com acidose láctica (LEVY *et al.*, 2003). Se a infecção continua a se alastrar, o paciente entra em choque séptico, caracterizado por hipotensão induzida pela sepse (pressão arterial sistólica menor do que 90 mm Hg) e falência cardíaca (NGUYEN *et al.*, 2006). A bacteremia é encontrada em 50% dos casos de sepse severa e choque séptico, enquanto 20 a 30% dos pacientes não têm causa definida de qualquer fonte (BONE *et al.*, 1992).

A taxa de mortalidade por sepse no mundo se mantém relativamente estável, assim como no Brasil. Contudo, ao passo que os valores mundiais são em torno de 30%, no Brasil ela é de cerca de 56% ao total, sendo 42% para hospitais privados e de cerca de 66% para hospitais públicos (LATIN AMERICAN SEPSIS INSTITUTE, 2011). Em países desenvolvidos, tais como Austrália, Canadá e Alemanha, a taxa de mortalidade é cerca de 30% e, em países em desenvolvimento, tais como a Índia e a Argentina, a taxa é de 45% (TELES *et al.*, 2008). O desenvolvimento do estado de sepse e seu agravamento para sepse severa e choque séptico envolve praticamente qualquer situação patológica, sendo ela traumática ou não. A figura 6 exemplifica algumas situações que expõem indivíduos oriundos de diversas patologias à sepse.

Além de possuir elevados índices de mortalidade por sepse, o Brasil possui um elevado custo de tratamento. De acordo com alguns dados nacionais, o custo médio global de cada paciente internado em UTIs por 10 dias é de cerca de \$10,595 dólares, em torno de \$1,028 dólares por dia, não CRUZAT, VF.

diferindo significativamente entre instituições públicas e privadas (TELES *et al.*, 2008). Apesar da média de custo total de pacientes que sobrevivem à sepse ser maior se comparado a não sobreviventes, em razão do aumento do número de dias de internação, o valor diário de não sobreviventes é significativamente mais elevado, se comparado a sobreviventes (SOGAYAR *et al.*, 2008). Esta diferença se deve ao fato das múltiplas tentativas de reverter o quadro fatal da sepse e salvar a vida do paciente. Considerando tais premissas é importante salientar que estratégias médicas e nutricionais economicamente viáveis devam ser estudadas não só por razões econômicas, mas principalmente por razões humanitárias.

Figura 6. Relação de desenvolvimento e agravamento da sepse a partir de diversas causas. Abreviaturas: SIRS = Síndrome da resposta inflamatória sistêmica. Adaptado de Bone *et al.* (1992).

A maioria das terapias utilizadas em UTIs a fim de deter o agravamento do estado de sepse para sepse severa ou choque séptico e, a consequente morte do paciente tem início quando são observadas alterações de desequilíbrios fisiológicos. Nestes desequilíbrios se incluem a redução dos níveis de hemoglobina, hipóxia ou redução da resistência sistêmica vascular, temperatura corporal acima de 38° ou abaixo de 36° entre outros (BONE *et al.*, 1992; PICARD *et al.*, 2006). Estes parâmetros, associados à presença de patógenos diagnosticam a instalação do quadro de sepse. Embora de ano em ano sejam apresentadas novas terapias e recomendações de diagnóstico, a sepse continua a ter elevada taxa de mortalidade. Há que se concordar que ainda mais importante que o tratamento mais adequado é a velocidade de identificação da sepse (JAESCHKE, BROŽEK, DELLINGER, 2008). O fator tempo e a terapia a ser empregada têm influência direta no risco de morte (BENJAMIM, HOGABOAM, KUNKEL, 2004; DELLINGER *et al.*, 2008). Quanto mais rápido for o diagnóstico menor é a possibilidade de o paciente sofrer um infarto do miocárdio ou outras complicações (REMICK, 2007; DELLINGER *et al.*, 2008).

Em um estudo observacional em pacientes internados com diagnóstico de choque séptico o tempo médio de aplicação da terapia antimicrobiana foi de cerca de seis horas. Neste estudo, 50% dos pacientes receberam a terapia antimicrobiana antes de seis horas e outros 50% após este período. Os resultados demonstraram que a aplicação correta de antimicrobianos na primeira hora após o diagnóstico foi associada a uma taxa de 21,1% de mortalidade. Em contrapartida, pacientes que receberam a correta terapia antimicrobiana por tempos acima de uma hora apresentaram elevado risco de

CRUZAT, VF.

morte (KUMAR *et al.*, 2006). Aproximadamente a cada hora de atraso no início da terapia antimicrobiana ocorre um aumento de 7% no risco de morte (Figura 7).

Embora as técnicas científicas tenham se aprimorado, principalmente no campo molecular da medicina, os casos de sepse somam mais de 700.000 ao ano (MARTIN *et al.*, 2003; TELES *et al.*, 2008). Diversos modelos de sepse em animais têm sido desenvolvidos e utilizados no intuito de compreender melhor esta grave síndrome. A maioria dos modelos se utiliza de injeção intra-abdominal para dar início ao processo inflamatório. Dois métodos nesta linha de pesquisa têm se destacado, a injeção ou liberação de fezes na cavidade peritoneal e a aplicação de bactérias ou componentes bacterianos, tal como lipopolissacarídeos (LPS), também no peritônio ou diretamente na circulação sanguínea (RITTIRSCH, HOESEL, WARD, 2007). Estas formas patofisiológicas de mimetizar o estado de sepse promovem alterações semelhantes às observadas em pacientes humanos com sepse, englobando a resposta à bacteremia, o que pode evoluir para a SIRS e o choque séptico, com disfunção múltipla de órgãos e, posterior morte do animal.

A administração de endotoxinas na corrente sanguínea, assim como na cavidade peritoneal, permite que se observe a capacidade de resposta inflamatória e suas consequências, bem como a recuperação do processo patofisiológico, de forma similar a sepse ocorrida em humanos (RITTIRSCH, HOESEL, WARD, 2007). O principal componente biologicamente ativo das endotoxinas é o LPS. LPS são moléculas de grandes dimensões constituídas de um lipídio e um polissacarídeo ligados por uma ligação covalente e formam a maior parte da estrutura das membranas externas de bactérias gram-
CRUZAT, VF.

negativas. Os sintomas promovidos pela administração de LPS são bastante parecidos com os sintomas de pacientes em sepse, apresentando inclusive alterações hematológicas (REMICK *et al.*, 2000). A produção de citocinas pró-inflamatórias séricas é estimulada com a utilização de LPS, sendo ainda correlacionada com a severidade da sepse, fato que também observado em pacientes humanos (RITTIRSCH, HOESEL, WARD, 2007). O TNF- α e as interleucinas (IL-) 1 β , IL-6 e IL-10 estão entre as citocinas mais estudadas, pois se elevam tanto em trabalhos *in vivo* de sepse, quanto em modelos animais submetidos a injeção com LPS (COHEN, 2002; NATHAN, 2002; BENJAMIM, HOGABOAM, KUNKEL, 2004).

Figura 7 - Mortalidade (%) hospitalar entre os pacientes cujo efetivo tratamento antimicrobiano foi iniciado em um dado intervalo de tempo em horas (h). Adaptado de Kumar *et al.* (2006).

Em situações de elevado estresse fisiológico, entre as quais esta a prática de exercícios físicos exaustivos, por exemplo, é observado o aumento inicial de síntese das citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-1 β , que, por sua vez, estimulam a síntese de IL-6 (PETERSEN, PEDERSEN, 2005). A IL-6, neste caso atua como mediador primário da reação de fase aguda, estimulando a produção hepática de proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa (PCR) e inibidores de proteases (por exemplo, inibidor de protease α -1). Este efeito da IL-6 restringe a extensão da resposta inflamatória por aumentar a síntese de outras citocinas anti-inflamatórias, tais como a IL-1RA e a IL-10. A resposta de fase aguda restabelece proteínas diminuídas ou lesadas e reverte os efeitos prejudiciais da resposta inflamatória inicial (PETERSEN, PEDERSEN, 2005; CRUZAT *et al.*, 2007). Vista desse ângulo, a IL-6 se secretada por células musculares pode desempenhar um papel mais restaurativo do que pró-inflamatório também atuando possivelmente como sensor energético das células em situações de elevado catabolismo (PEDERSEN, 2012). O papel da IL-6 precisa ser mais bem esclarecido em doenças crônicas ou na sepse.

3.3. Metabolismo da glutamina na sepse

A perda de peso e a fadiga do organismo em fases de estresse metabólico e processos infecciosos representam parte de um problema ainda não resolvido em pacientes agudamente enfermos, tais como a sepse e outros traumas. A redução da massa muscular durante o estado de sepse ocorre por um desequilíbrio no balanço da síntese e da degradação proteica, alterando a concentração de proteínas totais no organismo, promovendo balanço

CRUZAT, VF.

nitrogenado negativo (LANG, FROST, VARY, 2007). Este efeito parece estar associado a um déficit energético associado à redução da eficiência mitocondrial (FREDRIKSSON *et al.*, 2006), com desequilíbrios periféricos e de sistema nervoso central (KHAN *et al.*, 2006).

A glutamina é o aminoácido mais abundante do organismo, tanto no plasma quanto em tecidos. No músculo esquelético de indivíduos saudáveis a concentração de glutamina é em torno de 20 mM, a qual supera inclusive a concentração de glicose, que é de 6 mM (WILMORE, SHABERT, 1998). Em estados de elevado catabolismo, contudo, o metabolismo da glutamina (KARINCH *et al.*, 2001) e seu sítio quantitativamente de maior síntese e liberação, o músculo esquelético, se tornam reduzidos (ROTH, 2008). A figura 8 apresenta a predominância e tentativa de manutenção da glutaminemia via fluxo interórgãos de substratos.

Figura 8. Predominância (flechas espessas) na síntese e degradação de glutamina por diversos tecidos e órgãos em estados infecciosos ou de doenças, o que inclui o estado de sepse. Abreviaturas: SNS = Sistema nervoso central, NH_3 = Amônia, GLN = Glutamina.

Um dos primeiros estudos a demonstrarem a redução de glutamina no músculo esquelético no estado de sepse foi publicado em 1982, onde esta deficiência foi correlacionada à redução na taxa de sobrevivência dos pacientes (ROTH *et al.*, 1982). Curiosamente, a severa diminuição dos níveis de glutamina muscular em pacientes gravemente enfermos (redução em média de 80% do normal) (ROTH *et al.*, 1982; ROTH, 2008) é acompanhada por um aumento na síntese e liberação de glutamina a partir do músculo esquelético (AUSTGEN *et al.*, 1992). Isto se deve ao fato do mRNA e da atividade da enzima glutamina sintetase estar aumentada no músculo esquelético durante a endotoxemia (AUSTGEN *et al.*, 1992). É provável que esta seja uma tentativa

exaustiva do organismo de manter a glutaminemia. No entanto, além de não conseguir manter os níveis de glutamina, a concentração da glutamina no tecido muscular torna-se reduzida, bem como suas funções dependentes da hidrólise deste aminoácido, uma vez que visto que neste tecido não são observadas alterações na enzima glutaminase (KARINCH *et al.*, 2001). A menor captação de glutamina e sua hidrólise intramuscular altera o estado de hidratação, o qual é importante mediador da ativação dos processos catabólicos e anabólicos.

O aumento no volume celular, medido a partir de seu conteúdo de água intracelular estimula a síntese proteica, o que é considerado como um sinal anabólico (HÄUSSINGER, LANG, GEROK, 1994). Estudos demonstram que o reduzido estado de hidratação celular do músculo esquelético em pacientes em estado catabólico crítico, está correlacionado com baixos níveis de glutamina, o que promove um balanço nitrogenado negativo (HÄUSSINGER *et al.*, 1993; ROTH, 2008).

A alteração no metabolismo da glutamina durante a sepse também ocorre nos rins (AUSTGEN *et al.*, 1991b). Nestas condições, os rins passam de órgão predominantemente consumidor de glutamina para predominantemente sintetizador de glutamina, apresentando elevação de mais de 50% na atividade da glutamina sintetase (AUSTGEN *et al.*, 1991b). É provável que este efeito tenha a mesma função do tecido muscular, ou seja, uma tentativa de manter a glutaminemia às células, principalmente as do sistema imune, a fim de combater a infecção. Porém, esta inversão de papel exercida pelos rins, diminui a sua capacidade de eliminar amônia (NH_3) e manter o equilíbrio ácido-base do organismo, promovendo lesão renal (PARRY, BROSNAN, 1978; CRUZAT, VF.

KARINCH *et al.*, 2001; HU *et al.*, 2012). A figura 8 ilustra a inversão de papéis de órgãos como os rins em estados infecciosos ou de doença, incluindo a sepse.

Durante a endotoxemia, o tecido intestinal diminui a captação de glutamina a partir da circulação (AUSTGEN *et al.*, 1991a). Concomitantemente, o tecido hepático aumenta em mais de dez vezes sua captação e transporte transepato celular de glutamina. Em um estudo *in vivo*, a sepse por endotoxemia com LPS resultou em aumento na quantidade de proteínas transportadoras na membrana de hepatócitos, fato que elevou a capacidade de transporte de glutamina por meio do sistema N de transporte, o qual é dependente de sódio (INOUE, PACITTI, SOUBA, 1993). Diversos são os componentes promotores do aumento da captação hepática de glutamina na sepse, incluindo o elevado processo inflamatório, mediado pela elevação do TNF- α , as prostaglandinas e os glicorticóides (INOUE, BODE, SOUBA, 1994; KARINCH *et al.*, 2001). Em outro estudo, a IL-6 e o TNF- α tiveram baixo impacto no aumento da captação de glutamina em hepatócitos de humanos em cultura. Porém o tratamento prévio com dexametasona aumentou os efeitos de ambas citocinas, resultando em uma capacidade de captação de glutamina acima de duas vezes a normal (FISCHER *et al.*, 1996).

Em estados infecciosos, a manutenção ou melhora da resposta imune é fundamental para a sobrevivência do paciente. Linfócitos do tipo T, por exemplo, necessitam aumentar sua proliferação para responder a estímulos antigênicos, produzindo citocinas importantes para a propagação da resposta imune. Como pode ser observado na figura 9, a proliferação de linfócitos é regulada pela disponibilidade de glutamina. Adicionalmente, a diferenciação de linfócitos do

tipo B necessita de diferenciação para produzir anticorpos, contudo, esta função é dependente exclusivamente da concentração de glutamina, não podendo ser mimetizada por qualquer outro aminoácido (NEWSHOLME, 2001).

Figura 9 - Proliferação de linfócitos depende da concentração de glutamina no meio extracelular. Experimento com linfócitos obtidos a partir do baço de ratos e incubados em meio RPMI contendo antibióticos. As células foram expostas a estímulo mitogênico de linfócitos T (Concanavalina A) e incubados a diversas concentrações de glutamina. A proliferação é expressa mediante aumento da radioatividade medida pela incorporação de timidina ao DNA durante 18 a 66 horas de incubação. Adaptado de Yaqoob e Calder (1997).

Em estados inflamatórios, incluindo traumas e a sepse, o consumo de glutamina tanto por linfócitos quanto por outras células do sistema imune, tais como neutrófilos e macrófagos aumenta intensamente (NEWSHOLME, 2001). A atividade da glutaminase em linfócitos, por exemplo, está aumentada em diversas vezes durante a sepse em modelo animal, se comparada a ratos saudáveis (SARANTOS, OCKERT, SOUBA, 1993).

CRUZAT, VF.

O aumento da demanda de glutamina por células do sistema imune, em conjunto com a elevação da utilização do mesmo aminoácido por outros tecidos leva a um déficit de glutamina no organismo. Este fato permite classificar, do ponto de vista nutricional classificar a glutamina como um aminoácido condicionalmente essencial. Como resultado da menor disponibilidade de glutamina células do sistema imune tem sua capacidade de proliferação, diferenciação e funções limitadas. Estima-se que quando a concentração de glutamina plasmática baixa próxima a 0,4 mmol (normal é 0,6 mmol) o sistema imunológico tem suas funções comprometidas (WILMORE, SHABERT, 1998).

3.4. Absorção intestinal de glutamina na forma livre e como dipeptídeo

Mediante a absorção de aminoácidos e pequenos peptídeos oriundos da dieta, animais, dentre os quais o homem, satisfazem suas necessidades nutricionais proteicas. O processo envolve a digestão de proteínas no lúmen intestinal, para gerar produtos menores que são absorvidos pelos enterócitos (ADIBI, 2003). Os produtos finais da digestão das proteínas da dieta são uma mistura de aminoácidos livres (40%) e pequenos dipeptídeos e tripeptídeos (60%) (BROER, 2008). A partir do lúmen intestinal, os enterócitos apresentam eficientes mecanismos de transporte para absorver estes dipeptídeos e tripeptídeos (CASPARY, 1992; GANAPATHY, BRANDSCH, LEIBACH, 1994; TEMPLE *et al.*, 1998).

Em humanos, estudos de perfusão jejunal demonstraram que a competição entre aminoácidos livres durante o processo de captação era

CRUZAT, VF.

evitada ou reduzida, quando os aminoácidos estavam na forma de dipeptídeos (GARDNER, 1975; TEMPLE *et al.*, 1998). Em outros estudos houve aumento da absorção de aminoácidos a partir de soluções de dipeptídeos comparada a soluções contendo aminoácidos livres de equivalente composição (GANAPATHY, BRANDSCH, LEIBACH, 1994; GRIMBLE, 1994).

Os mecanismos de absorção de aminoácidos e dipeptídeos advindos da dieta podem ser divididos da seguinte forma:

a) aminoácidos livres liberados pela digestão no trato gastrointestinal ou na membrana borda luminal escova de enterócitos são absorvidos via sistemas de transporte específicos para aminoácidos livres (Figura 10 e Tabela 2).

b) dipeptídeos que permanecem após a digestão por peptidases luminiais e ligados à membrana borda luminal, podem ser absorvidos intactos pelo intestino delgado de duas maneiras: 1) transportados como dipeptídeos intactos ou clivados por peptidases dentro do citoplasma das células da mucosa; 2) clivados em aminoácidos livres por hidrolases de peptídeos presentes na membrana borda luminal de enterócitos e posteriormente transportados para dentro do citoplasma das células intestinais como aminoácidos (Figura 10) (CASPARY, 1992; ADIBI, 2003).

A capacidade absorptiva de dipeptídeos é maior no intestino delgado proximal em relação ao intestino delgado distal, sendo o jejuno a parte de maior importância absorptiva tanto para aminoácidos livres quanto para pequenos peptídeos (BROER, 2008). Observa-se, também, que peptidases citosólicas que atuam sobre dipeptídeos apresentam mais atividade no segmento proximal do intestino delgado, local onde a capacidade absorptiva de dipeptídeos é muito elevada. Por outro lado, a capacidade absorptiva de

aminoácidos é maior no intestino delgado distal do que no intestino delgado proximal (GANAPATHY, BRANDSCH, LEIBACH, 1994; ADIBI, 2003).

Tabela 2 - Transportadores de aminoácidos livres em enterócitos.

Sistema	Aminoácidos Alvo	Íons cotransporte	Afinidade	Localização
ASC	Ala, Ser, Cys, Thr, Gln	Na ⁺ (A)	Alta	MA
B⁰⁺	Aas Neutros e Básicos, β-Ala	Na ⁺ (S), Cl ⁻ (S)	Alta	MA
B⁰	Aas Neutros	Na ⁺ (S)	Baixa	MA
b⁰⁺	Arg, Lys, Ornit, Cistina	Na ⁺ (A), Cl ⁻ (A)	Alta	MA
IMINO	Pro, Hidroxi-Pro	Na ⁺ e Cl ⁻ (S)	Média	MA
PAT	Pro, Gli, Ala, GABA, β-Ala	H ⁺ (S)	Baixa	MA
X_{AG}⁻	Glu e Asp	Na ⁺ (S), H ⁺ (S), K ⁺ (A)	Alta	MA
L	Aas Neutros, exceto Pro	Na ⁺ (A), Cl ⁻ (A)	Média	MB
T	Phe, Tyr, Trp	H ⁺ (U)	Baixa	MB
Y⁺L	Lys, Arg, Gln, Met, His, Leu, Ala, Cys	Na ⁺ (S) junto com Aas Neutros	Alta	MB
A	Gly, Pro, Ala, Ser, Cys, Gln, Asn, His, Met	Na ⁺ (S)	Média	MA e MB
X_c⁻	Glu, Cistina	Na ⁺ (A), H ⁺ (A), K ⁺ (A)	Alta	MA e MB
Y⁺	Arg, Lys, Ornit, His	Na ⁺ (U), H ⁺ (U), K ⁺ (U)	Média	MA e MB

Abreviaturas: MA = Membrana apical, MB = Membrana basolateral, A = Anteporte, S = Simporte, U = Uniporte, Aas = Aminoácidos. Adaptado de Broer (2008).

Antigamente, acreditava-se que as proteínas eram completamente hidrolisadas no lúmen intestinal e então absorvidas como aminoácidos em sua forma livre. Há mais de 40 anos estudos revelaram que o principal produto da digestão eram dipeptídeos e tripeptídeos e não somente aminoácidos livres. Contudo, em 1994 uma pesquisa identificou e clonou a proteína transportadora de oligopeptídeos (PepT-1) dependente de H⁺, a qual possui uma ampla especificidade por substratos e transporta de forma ativa dipeptídeos e

CRUZAT, VF.

tripeptídeos pelo intestino de humanos e animais (FEI *et al.*, 1994). Estima-se que o PepT-1 transporte cerca de 400 tipos de dipeptídeos e mais de 8.000 tripeptídeos, bem como uma variedade de fármacos com estruturas dipeptídicas e tripeptídicas, incluindo antibióticos e inibidores enzimáticos da conversão de angiotensina (BRANDSCH, KNÜTTER, DOENECKE, 2008).

O PepT-1 está localizado exclusivamente na membrana borda em luminal intestinal, também conhecida como membrana apical e está ausente na membrana basolateral (Figura 10) (THAMOTHARAN *et al.*, 1999; BROER, 2008). A presença do PepT-1 representa a principal via de absorção dos produtos finais da digestão de proteínas, permitindo que dipeptídeos sejam transportados da mucosa intestinal, que apresenta muito pouca ou nenhuma atividade de hidrolases contra peptídeos (5% a 12% da atividade total), para o citosol, onde as peptidases apresentam uma elevada atividade (80% a 95% da atividade celular total) (YANG, DANTZIG, PIDGEON, 1999; ADIBI, 2003). Já na membrana basolateral encontra-se outro transportador de pequenos peptídeos dependente de sódio (Na^+), responsável pelo transporte dos peptídeos até a corrente sanguínea (ADIBI, 2003). Em situações catabólicas, entretanto, como na presença de LPS de bactérias pode haver redução na expressão do mRNA do Pept-1, fato que altera a capacidade absorptiva dos enterócitos (SHU *et al.*, 2002). Em situações de privação de proteínas oriundas da dieta por 40 a 84 dias resultou em aumento da capacidade de transporte de dipeptídeos no jejuno de ratos, mas não no transporte de aminoácidos livres (LIS, MATTHEWS, CRAMPTON, 1972).

Figura 10 - Transporte de aminoácidos e peptídeos na célula intestinal. Abreviaturas: DIP = Dipeptídeos, TRIP = Tripeptídeos, AA = Aminoácidos livres, Penta = Penta peptídeos, H^+ = Íons hidrogênio, Na^+ = Íons sódio, Trans AA e PP = Transportador de aminoácidos e pequenos peptídeos, NHE-3 = Antiporte 3 sódio-hidrogênio, Gli = Glicose, SGLT1 = Proteína transportadora sódio-glicose, GAP Junction = Junções comunicantes e de ligação, Tight junction = Junções de hiato. H_2O = Água. Adaptado de Gilbert, Wong e Webb (2008).

O transporte de peptídeos e aminoácidos do lúmen até a membrana basolateral ocorre através de transporte ativo ou diretamente através da membrana dos enterócitos ou ainda por endocitose, por meio de uma proteína denominada clatrina (Figura 10). É chamado de transporte transcelular, já que atravessa o interior do enterócito (GILBERT, WONG, WEBB, 2008). O transporte entre as células intestinais é denominado paracelular ou intercelular (PAPENHEIMER, 2001) (Figura 10).

Os aminoácidos liberados pelas dipeptidases citosólicas no meio intracelular dos enterócitos podem ser utilizados pela própria célula ou liberados para a circulação portal, mediante transportadores de aminoácidos localizados na membrana basolateral (Figura 11). Em relação ao metabolismo da glutamina no intestino, estudos demonstram que quando comparada à glicose, a glutamina é quantitativamente mais importante, servindo como substrato respiratório (BOELEN *et al.*, 2001). Taxas acima de 50% do total de L-glutamina absorvida a partir do lúmen intestinal são subsequentemente metabolizadas pelo intestino e fígado (DÉCHELOTTE *et al.*, 1991; D'SOUZA, TUCK, 2004). Em situações em que não haja suficiente quantidade de glutamina a partir do lúmen intestinal, torna-se aumentada a utilização deste aminoácido, presente no sangue arterial, graças a transportadores específicos localizados na membrana basolateral (Tabela 2) (LEIBACH, GANAPATHY, 1996). Entretanto, é a partir do lúmen intestinal que ocorre maior capacidade de absorção de L-glutamina. Quando disponível em concentrações semelhantes a do estado pós prandial (6,0 mM), a captação de glutamina sanguínea diminui em cerca de 40% (ADIBI, 2003).

Figura 11 - Representação esquemática da captação de glutamina por enterócitos. Abreviaturas: GLN = L-glutamina, ALA = L-alanina, DIP = Dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, Trans AA e PP = Transportador de aminoácidos e pequenos peptídeos.

Quando dipeptídeos estão presentes em altas concentrações no lúmen intestinal após uma refeição, por exemplo, uma parte pode escapar da hidrólise intracelular e ser liberada diretamente para a circulação, mediante transportadores de peptídeos localizados também na membrana basolateral (ADIBI, 2003). Em alguns trabalhos, utilizando dipeptídeos de glutamina marcados radioativamente observa-se que cerca de 90% da radioatividade estava acumulada no citosol de forma intacta (ADIBI, SCHENKER, MORSE, 1996; ADIBI, 2003). Além disso, utilizando técnicas *in vivo* e *in vitro*, foi verificado que, especificamente, o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina no intestino

CRUZAT, VF.

delgado é preferivelmente absorvido como dipeptídeo intacto do que quando hidrolisado na membrana luminal (MINAMI, MORSE, ADIBI, 1992).

A membrana basolateral dos enterócitos também possui outros sistemas de transportes de aminoácidos, que são responsáveis pela saída destes para a circulação sanguínea. Estudos demonstram que existem ao menos cinco sistemas de transporte de aminoácidos na membrana basolateral, sendo dois deles dependentes de Na^+ e três independentes de Na^+ . Os sistemas dependentes de Na^+ apresentam papel importante no fornecimento de aminoácidos para as células do próprio intestino, enquanto os independentes de Na^+ são responsáveis pelo transporte de aminoácidos para a circulação sanguínea, fato que caracteriza absorção do tipo transcelular de aminoácidos a partir do lúmen intestinal (GANAPATHY, BRANDSCH, LEIBACH, 1994).

De acordo com modelo proposto por Yang, Dantzig e Pidgeon (1999) o gradiente e o potencial de membrana fornecem a força motriz para a captação de peptídeos pelas células epiteliais intestinais, mediante transportadores de peptídeos dependentes de prótons localizados na membrana apical (Figura 11). Os peptídeos que são resistentes à hidrólise por peptidases intracelulares são transportados através da membrana basolateral via transportadores de peptídeos (transporte facilitado). O processo de troca acoplada Na^+/H^+ gera e mantém o gradiente de prótons sobre a superfície luminal, enquanto a bomba Na^+/K^+ -ATPase, presente na membrana basolateral mantém baixa a concentração intracelular de Na^+ (BAIRD *et al.*, 2004). Este mecanismo de cotransporte de prótons é denominado sistema de transporte “ativo terciário” ou cotransporte de peptídeos dependente de H^+ (YANG, DANTZIG, PIDGEON, 1999).

Embora a captação de glutamina por enterócitos a partir do lúmen intestinal seja prioritária, acredita-se que a presença de outros aminoácidos, tais como a alanina possa alterar esse mecanismo. Quando a glutamina foi oferecida por via oral em conjunto com a alanina, ambas na forma livre, verifica-se efeito metabólico similar à administração com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (CRUZAT, TIRAPEGUI, 2009; CRUZAT, ROGERO, TIRAPEGUI, 2010). Alguns estudos similares, apesar do cálculo da quantidade de glutamina oferecida ser igual, não havia uma equivalência de aminoácidos entre os grupos (KLASSEN *et al.*, 2000; ROGERO *et al.*, 2004; ROGERO *et al.*, 2006).

Em nossos estudos (CRUZAT, TIRAPEGUI, 2009; CRUZAT, ROGERO, TIRAPEGUI, 2010), é provável que a adição de L-alanina livre à solução tenha elevado sua concentração no plasma rapidamente, uma vez que seu transporte através da célula epitelial intestinal ocorre de forma preferencial pelo transportador (BROER, 2008). Estudos avaliando o transporte de L-alanina em células do epitélio intestinal verificaram que sua absorção pode ser reduzida quando em conjunto com alguns aminoácidos neutros, contudo, dentre estes aminoácidos não estava incluída a L-glutamina (SIGRIST-NELSON, MURER, HOPFER, 1975). A forma em que a L-glutamina é oferecida por via oral é um fator importante a ser considerado no aumento da disponibilidade de glutamina corporal, entretanto, de acordo com nossos resultados, a presença do aminoácido L-alanina deve também contribuir, de alguma forma, para o efeito do dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (CRUZAT, TIRAPEGUI, 2009; CRUZAT, ROGERO, TIRAPEGUI, 2010). Recentemente, um estudo verificou nossa hipótese, onde indivíduos foram submetidos a suplementação com L-glutamina na forma livre, como dipeptídeo (L-alanil-L-glutamina) ou L-glutamina

CRUZAT, VF.

associadas a outra fonte proteica, tal como proteína do glúten. Os resultados demonstraram que tanto a L-alanil-L-glutamina, quanto a L-glutamina associada a proteína do glúten foram eficazes em elevar a glutaminemia, não havendo diferença entre estes grupos, contudo ambos promoveram uma resposta significativamente superior, quando comparados a L-glutamina isolada (HARRIS *et al.*, 2012).

3.5. Glutamina: efeitos da suplementação em estados catabólicos

Estudos *in vitro* com diversos tipos de células, tais como células musculares, da mucosa intestinal, do sistema imune, neurônios específicos do Sistema Nervoso Central, hepatócitos, células β -pancreáticas, entre outras, têm demonstrado que a glutamina, quando adicionada a um meio de cultura, pode alterar uma variedade de funções celulares (NEWSHOLME *et al.*, 2003b; CURI *et al.*, 2005; LAGRANHA *et al.*, 2005; CORLESS *et al.*, 2006).

A partir de diversos aminoácidos, sejam eles essenciais ou não essenciais a glutamina pode ser sintetizada pelo organismo. Em estados de elevado catabolismo, entretanto, o que inclui diversas doenças, processos infecciosos e exercícios exaustivos o metabolismo da glutamina é alterado (PARRY-BILLINGS *et al.*, 1989; NEWSHOLME, 2001; CRUZAT, PETRY, TIRAPEGUI, 2009). Em condições inflamatórias, como na sepse, o consumo de glutamina por células, principalmente do sistema imune aumenta (SARANTOS, OCKERT, SOUBA, 1993; NEWSHOLME, 2001). Por outro lado, este aumento da demanda não é suprido pelos principais sítios de síntese (ANDREASEN *et al.*, 2009; LIANG *et al.*, 2009). Como resultado, a concentração de glutamina no sangue e tecidos torna-se reduzida (PARRY-CRUZAT, VF.

BILLINGS *et al.*, 1989; NEWSHOLME, 2001; CRUZAT, PETRY, TIRAPEGUI, 2009). Esse efeito tem motivado, direcionado e evidenciado a importância de estudos verificando os efeitos da suplementação com L-glutamina em diversos campos do conhecimento.

Diversos estudos realizados desde a década de 90 com pacientes pós-cirúrgicos verificaram que soluções de nutrição parenteral total (NPT) que foram acrescidas com L-glutamina, seja na forma livre ou como dipeptídeo puderam atenuar os efeitos do processo inflamatório excessivo, melhorando a capacidade de recuperação do paciente, beneficiando o balanço nitrogenado (Tabela 3). Alguns trabalhos também demonstraram que a suplementação com L-glutamina por via parenteral melhorou as condições clínicas de indivíduos transplantados de medula óssea (ZIEGLER *et al.*, 1992), diminuiu risco de atrofia muscular durante o estresse metabólico promovido pela cirurgia (HICKSON, CZERWINSKI, WEGRZYN, 1995), reduziu incidência de infecção hospitalar (DÉCHELOTTE *et al.*, 2006), melhorou o balanço nitrogenado e abaixou o custo hospitalar (MACBURNEY *et al.*, 1994).

O papel da suplementação com L-glutamina via NPT pode atenuar as consequências indesejáveis de pacientes críticos, tais como a degradação do tecido intestinal, regulando a expressão de proteínas de choque térmico (HSP), atenuando a apoptose celular e a inflamação mediada pela ativação do fator kappa B nuclear (NF- κ B) (WISCHMEYER, 2008). A suplementação por via oral ou enteral, entretanto, ainda necessita de maiores investigações, uma vez que apresenta resultados contraditórios em indivíduos em estados de elevado catabolismo.

Tabela 3 - Estudos de suplementação com L-glutamina livre e como dipeptídeo na NPT.

Referência	Amostra	Tipo de Glutamina	Dose	Tempo de administração	Controle	Resultados
Hammarqvist <i>et al.</i> (1989)	22 pacientes pós cirúrgicos	GLN	0,285 g/Kg peso/dia	NPT por 3 dias	Grupos isocalóricos/ isonitrogenados	Atenuou a redução da glutamina muscular e o balanço nitrogenado
Scheltinga <i>et al.</i> (1991)	20 pacientes com inflamação intestinal e problemas hematológicos	GLN	0,57 g/Kg peso/dia	NPT por 27 dias	Grupos isocalóricos/ isonitrogenados	Manutenção de fluidos extracelulares e em compartimentos celulares, bem como no total de água corporal.
Griffiths <i>et al.</i> (1997)	84 pacientes em estado crítico	GLN	18 g/dia e 21 g/dia	NPT por 5 dias e NPT por 15 dias	NPT padrão vs. suplementada	Aumentou a taxa de sobrevida em 6 meses e reduziu o custo hospitalar
Powell-Tuck <i>et al.</i> (1999)	168 pacientes com indicação clínica de receber NPT	GLN	20 g/dia	NPT por 8 dias	NPT padrão vs. suplementada	Redução do tempo de hospitalização em pacientes submetidos a cirurgias
Morlion <i>et al.</i> (1998)	28 pacientes pós cirúrgicos	ALA-GLN	0,3 g/kg/dia	NPT por 5 dias	Grupos isocalóricos/ isonitrogenados	Sem efeitos adversos, aumentou o balanço nitrogenado, aumentou o número de linfócitos na recuperação, aumentou a síntese de leucotrienos ligados a cisteínas, menor tempo de hospitalização
Jiang <i>et al.</i> (1999)	120 pacientes pós cirúrgicos	ALA-GLN	0,5 g/kg/dia	NPT por 6 dias	NPT padrão vs. suplementada. Grupos isocalóricos/ isonitrogenados	Seguro. Aumentou o balanço nitrogenado, preservando a permeabilidade intestinal e reduziu o tempo de hospitalização

Abreviaturas: GLN, glutamina livre; ALA-GLN, dipeptídeo L-alanil-L-glutamina; GLI-GLN, dipeptídeo L-glicil-L-glutamina; NPT, Nutrição Parenteral Total; GSH, Glutathiona.

Tabela 3 - Estudos de suplementação com L-glutamina livre e como dipeptídeo na NPT (Continuação).

Referência	Amostra	Tipo de Glutamina	Dose	Tempo de administração	Controle	Resultados
Jacobi <i>et al.</i> (1999)	34 pacientes pós cirúrgicos gastrintestinais	ALA-GLN	0,4 g/kg/dia	NPT por 5 dias	NPT padrão vs. suplementada. Grupos isocalóricos/isonitrogenados	Rápida redução em complicações pós-operatórias e menor supressão imune
Lin <i>et al.</i> (2002)	48 pacientes pós cirúrgicos abdominais em estado grave (de acordo com APACHE 2)	ALA-GLN	0,417 g/kg/dia	NPT por 6 dias	Grupos isocalóricos/isonitrogenados	Resposta imunes estimuladas, atenuou a perda de nitrogênio em pacientes com baixo resultado de APACHE 2
Grau <i>et al.</i> (2011)	117 pacientes recebendo NPT em UTI	ALA-GLN	0,5 g/kg peso/dia	NPT por 9 dias	Grupos isocalóricos/isonitrogenados	Melhora da glicemia e redução de complicações infecciosas
Flaring <i>et al.</i> (2003)	17 pacientes submetidos a cirurgias	GLI-GLN	0,56 g/Kg peso/dia	NPT por 3 dias	NPT padrão vs. suplementada. Grupos isocalóricos/isonitrogenados	Atenuou a redução da GSH muscular
Brown <i>et al.</i> (1998)	34 pacientes submetidos a transplante de medula	GLI-GLN	50 g/dia	NPT por 27 dias	Grupos isonitrogenados com mistura de aminoácidos não essenciais	Atenuou a redução da albumina e melhorou funções hepáticas

Abreviaturas: GLN, glutamina livre; ALA-GLN, dipeptídeo L-alanil-L-glutamina; GLI-GLN, dipeptídeo L-glicil-L-glutamina; NPT, Nutrição Parenteral Total; GSH, Glutathione.

O guia norte-americano para manejo do paciente crítico recomenda a suplementação de L-glutamina em indivíduos fazendo uso de NPT, com objetivos de atenuar o estresse oxidativo, manter a integridade intestinal, estimulando a proliferação celular em queimados, pós-cirúrgicos e indivíduos em estado de sepse. Já a suplementação por via enteral tem demonstrado exercer efeito principalmente na manutenção no epitélio intestinal (MCCLAVE *et al.*, 2009). Cabe lembrar que a forma da glutamina suplementada é diferente na nutrição parenteral e na enteral. Ao passo que na NPT a L-glutamina é comumente adicionada à solução como dipeptídeo (L-alanil-L-glutamina ou L-glicil-L-glutamina), em virtude de sua maior solubilidade e estabilidade (FUENTES-OROZCO *et al.*, 2004; DÉCHELOTTE *et al.*, 2006), na via enteral a L-glutamina utilizada é na forma livre e misturada com água em quantidade suficiente para passar pela sonda, sendo fornecida de 1 a 3 vezes ao dia na quantidade aproximada de 0,3 a 0,5 g/kg/dia tendo como valor máximo 1g/kg/dia (D'SOUZA, TUCK, 2004; WERNERMAN, 2008).

Estudos em modelos animais com a suplementação aguda e oral com L-glutamina, na forma livre e como dipeptídeo, demonstraram aumento na concentração plasmática de glutamina de 30 a 120 minutos pós-suplementação (ROGERO *et al.*, 2002; ROGERO *et al.*, 2004). A concentração de glutamina e a área sob a curva do grupo suplementado agudamente com o dipeptídeo foi 26% superior à do grupo suplementado com L-glutamina livre, 30 minutos após a suplementação (ROGERO *et al.*, 2002). Este resultado pode ser explicado pela elevada presença do transportador de dipeptídeos Pept-1 e das dipeptidases intracitoplasmáticas no enterócito, o que favorece o aumento da liberação de glutamina e alanina decorrente da suplementação aguda com

CRUZAT, VF.

L-alanil-L-glutamina e, conseqüentemente, promove maior liberação para a circulação (BROER, 2008). Em outro estudo, foram avaliados os efeitos da suplementação crônica oral com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina e L-glutamina livre sobre as concentrações plasmática, muscular e hepática de glutamina em ratos sedentários (ROGERO *et al.*, 2004). Os resultados demonstraram que o grupo suplementado com o dipeptídeo apresentou maior concentração de glutamina muscular e hepática. Desse modo, conclui-se que a suplementação aguda com L-alanil-L-glutamina e L-glutamina livre promovem maior aumento da glutaminemia, enquanto a suplementação crônica promove aumento dos estoques musculares e hepáticos de glutamina.

A utilização de animais submetidos a exercícios físicos exaustivos, sob o ponto de vista inflamatório e do estresse oxidativo é considerado um modelo experimental semelhante ao que ocorre no estado de sepse (SHEPHARD, 2001; CRUZAT, TIRAPEGUI, 2012a). Nesse sentido, o efeito da suplementação crônica com L-alanil-L-glutamina e L-glutamina livre em animais submetidos a estresses metabólicos, tais como exercícios físicos exaustivos, foram avaliados (ROGERO *et al.*, 2006; CRUZAT, TIRAPEGUI, 2009). Em um estudo, a suplementação crônica com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina promoveu maior concentração de glutamina nos músculos sóleo e gastrocnêmio imediatamente após um teste de exercício físico até a exaustão (ROGERO *et al.*, 2006).

Apesar disso, a hipótese de que a composição do dipeptídeo pudesse influenciar sua mais eficiente absorção e posterior liberação para o sangue, não havia sido testada. Nesse sentido, o efeito da suplementação com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina e uma solução contendo L-glutamina e CRUZAT, VF.

L-alanina, ambas na forma livre em ratos submetidos a treinamento e a exercício de longa duração foi verificada (CRUZAT, TIRAPEGUI, 2009; CRUZAT, ROGERO, TIRAPEGUI, 2010). No primeiro estudo, foi observado que ambas as suplementações foram eficazes em aumentar a concentração de glutamina e glutamato muscular e hepática, o que elevou a concentração tecidual do antioxidante GSH, atenuando o estresse oxidativo induzido pelo exercício físico de longa duração (CRUZAT *et al.*, 2007; CRUZAT, TIRAPEGUI, 2009) Posteriormente a mesma suplementação com L-glutamina atenuou a liberação de creatina quinase e citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α e a prostaglandina E2 (PgE2) (CRUZAT, ROGERO, TIRAPEGUI, 2010).

A hipótese de que ambas as suplementações pudessem alterar a expressão gênica de proteínas de choque térmico (HSPs) e fator de choque térmico 1 (HSF-1) em ratos submetidos a exercícios físicos em esteira rolante foi testada por Petry *et al.* (2012). Neste estudo, os autores verificaram que ambas as suplementações atenuaram o estresse oxidativo e a redução dos estoques de glutamina muscular e hepática, fato que envolveu a expressão tanto da família da HSP70, quanto o HSF-1. O estudo de soluções com o dipeptídeo de glutamina é importante para que se possa atenuar o processo inflamatório descontrolado e a redução da glutaminemia em estados de elevado catabolismo. Apesar dos resultados encontrados nos estudos, tanto experimentais como em humanos, sabe-se que na prática muitas vezes o uso do dipeptídeo em nível de saúde pública torna-se inviável devido ao custo extremamente elevado. Neste contexto, formas alternativas de suplementação de L-glutamina por via oral, tais como sua forma livre em conjunto com L-

alanina ou outros aminoácidos em condições de estresse metabólico, devem ser mais intensamente pesquisadas.

Em modelos experimentais submetidos a exercícios físicos exaustivos, onde se verifica elevado estado inflamatório e a glutamina está diminuída foram testadas as suplementações por via oral com L-alanil-L-glutamina ou a L-glutamina na forma livre em conjunto com L-alanina livre (CRUZAT, TIRAPEGUI, 2009; CRUZAT, ROGERO, TIRAPEGUI, 2010; PETRY *et al.*, 2012). A partir destes estudos com exercício físico pode-se pensar que o oferecimento da mesma suplementação por via oral possa ajudar em processos patológicos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Condições Experimentais

4.1.1. Animais

O presente estudo foi realizado em camundongos adultos (60 dias), machos, isogênicos da linhagem tipo B6.₁₂₉F2/J (C57BL/6), com peso médio de $24 \pm 0,6$ g, cedidos pelo Biotério do Conjunto das Químicas localizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, Protocolo CEUA/FCF/249 (Anexos). Os animais foram agrupados e mantidos em caixas apropriadas para sua acomodação, sob temperatura de $22 \pm 2^\circ$ C, umidade relativa do ar de 60% e obedecendo a um ciclo de 12 horas claro e 12 horas escuro (luz acesa às 7:00 horas). Os animais foram pesados diariamente durante o período de experimento até o dia da morte. O método de morte utilizado foi a venosecção sob anestesia (80 mg/kg de quetamina e 15 mg/kg de xilazina). Durante o experimento o consumo de ração foi calculado diariamente. Todos os animais foram alimentados de forma *ad libitum* com ração comercial para roedores adultos, a qual contém 54% de carboidrato, 22,5% de proteína, 4,3% de gordura (NUVILAB CR1, Nuvital Nutrientes Ltda., Curitiba, Brasil) e água *ad libitum*.

4.1.2. Protocolo de endotoxemia

Os animais submetidos à endotoxemia receberam injeção por via intraperitoneal contendo lipopolissacarídeo (LPS) de bactéria *Escherichia Coli* (cepa 0127:B8), fabricado por Sigma-Aldrich Diagnostics Inc., Saint Louis, CRUZAT, VF.

Missouri, EUA. A quantidade de LPS administrada a cada animal foi de 5 mg/kg de peso corporal. Esta dose foi escolhida depois de ter sido realizado teste de dose media de resposta e mortalidade (*Little Dose*). Neste teste foram utilizadas quantidades de LPS de 5, 10, 20 e 30 mg/kg de peso, sendo avaliada a taxa de sobrevivência (Tabela 4 e Figura 12). Os animais do grupo controle receberam a mesma quantidade de água por meio de injeção intraperitoneal. Os animais foram mortos 48 horas após a aplicação do LPS.

Tabela 4. Camundongos B6 adultos submetidos a diferentes doses de LPS (mg/Kg de peso). A letalidade foi mensurada por até 48 horas após exposição ao LPS.

LPS (mg/Kg de peso)	Número de animais (morte/total)
5	1 / 8
10	3 / 8
20	5 / 8
30	8 / 8

Figura 12. Percentual de sobrevivência após injeção intraperitoneal de LPS de *Escherichia Coli* (cepa 0127:B8).

4.1.3. Dieta e suplementação

Os animais dos grupos suplementados receberam o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (1,49 g/Kg de peso/dia) ou os aminoácidos L-glutamina (1 g/Kg de peso/dia) e L-alanina (0,61 g/Kg de peso/dia) na forma livre por via oral. O dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, fabricado por Cláris - Produtos Farmacêuticos do Brasil Ltda. foi fornecido pela empresa Fórmula Medicinal - Suporte Nutricional e Manipulação Ltda., São Paulo, Brasil. Os aminoácidos L-glutamina e L-alanina foram fabricados e cedidos pela Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda. do Brasil. Durante o protocolo experimental de endotoxemia, que teve duração de 48 horas, os animais receberam três doses de suplementação, uma por dia pela parte da manhã, sendo a primeira durante o pico inflamatório, cerca de 2 horas após a injeção de LPS. A última dose de suplementação foi realizada 3 horas antes que se completasse 48h, após indução da endotoxemia. O cuidado com a prévia suplementação é baseado na cinética da glutamina, a qual cerca de 180 minutos após administração se encontra em níveis plasmáticos basais (ROGERO *et al.*, 2006). Todos os animais receberam as suplementações por meio de sonda gástrica (gavagem). A quantidade do dipeptídeo administrada foi calculada, para que o total de glutamina fosse o mesmo administrado na sua forma livre, ou seja, 1 g de glutamina/kg de peso corporal/dia. O grupo controle recebeu o mesmo volume de solução salina por meio de gavagem. A divisão dos animais em grupos foi feita de forma randomizada e aleatória evitando mudar os animais de seu ambiente e convivência natural desde o nascimento.

4.1.4. Grupos experimentais

- **CTRL** - Camundongos sem LPS, submetidos à gavagem com água (n = 12).
- **GLN+ALA** - Camundongos sem LPS, submetidos à gavagem com glutamina e alanina, ambos na forma livre (n = 12).
- **DIP** - Camundongos sem LPS, submetidos à gavagem com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (n = 12).
- **LPS** - Camundongos com LPS, submetidos à gavagem com água (n = 12).
- **GLN+ALA-LPS** - Camundongos com LPS, submetidos à gavagem com glutamina e alanina, ambos na forma livre (n = 12).
- **DIP-LPS** - Camundongos com LPS, submetidos à gavagem com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (n = 12).

4.2. Coletas de sangue e tecidos

Todos os animais foram mortos 48 horas após injeção intraperitoneal de LPS ou solução salina (PBS). O sangue foi coletado para a determinação de glutamina, glutamato, amônio, glicose, eritrócitos (para glutathione reduzida e dissulfeto de glutathione), citocinas plasmáticas e linfócitos. O fígado e o músculo gastrocnêmio foram removidos e imediatamente congelados utilizando um “*freeze-clamp*”, sendo posteriormente colocados em nitrogênio líquido. Estes tecidos foram utilizados para determinação da concentração de glutamina, glutamato, proteínas totais, glutathione reduzida e dissulfeto de glutathione, substâncias reativas ao ácido tiobartúrico, concentração proteica (Western Blot) e expressão de mRNAs (RT-qPCR).

4.2.1. Parâmetros plasmáticos e séricos

4.2.1.1. Glutamina e glutamato

A determinação de glutamina e glutamato plasmáticos foram realizadas por meio do kit comercial para glutamina/glutamato (Sigma-Aldrich Diagnostics Inc., Saint Louis, Missouri, EUA), que recomenda a metodologia descrita por Lund (1986). Amostras de sangue dos animais foram coletadas em tubos de 1,5 mL contendo heparina e congeladas a -80°C , para garantir a estabilidade. No dia da determinação dos conteúdos de glutamina e/ou glutamato os plasmas foram misturados com ácido tricloroacético (TCA) a 5% na proporção de 1:1 em homogeneizador (Ultra Turrax). Imediatamente após a homogeneização em TCA foi feita a neutralização dos plasmas utilizando 6 μL de Na_2CO_3 para cada 100 μL de sobrenadante coletado posteriormente a centrifugação a $16.000 \times g$ por 2 min., a 4°C , sendo o sobrenadante transferido para outro tubo de 1,5 mL. O volume de Na_2CO_3 utilizado foi suficiente para trazer o pH das amostras para cerca de 6,5. Para o ensaio foram utilizados 20 μL dos sobrenadantes em triplicata.

A primeira reação do ensaio de glutamina/glutamato consiste na desaminação enzimática da L-glutamina, por meio da enzima glutaminase (GA), gerando quantidades estequiométricas de amônio (NH_4^+) e L-glutamato. Em seguida, o L-glutamato é desidrogenado e convertido a α -cetoglutarato (2-oxoglutarato) via glutamato desidrogenase (GDH), na presença de NAD^+ . As quantidades de L-glutamina e/ou glutamato das amostras são proporcionais à quantidade de NADH formado, medido a 340 nm em leitoras de microplaca de

ELISA (Biorad Benchmark Microplate Reader 340-750nm UV/VIS, Califórnia, EUA).

Reação 1: $\text{L-glutamina} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{L-glutamato}^- + \text{NH}_4^+$

*Glutaminase** e H^+

Reação 2: $\text{L-glutamato}^- + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{2-oxoglutarato}^- + \text{NH}_4^+ + \text{NADH}$

*Glutamato Desidrogenase***

* L-glutamina amidoidrolase, EC 3.5.1.2

** L-glutamato: NAD(P)⁺ oxidorreductase (desaminante), EC 1.4.1.3 (**GDH**)

4.2.1.2. Amônio plasmático

A determinação de amônio plasmático foi realizada por meio do kit comercial para determinação de amônio (Raichem Diagnostics, San Diego, Califórnia, EUA), que segue a metodologia descrita por Neeley e Phillipson (1988). A amônia reage com o 2-oxoglutarato e a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) para formar glutamato e NADP, na reação catalisada pela enzima glutamato desidrogenase. A quantidade de NADPH oxidada é igual ao conteúdo de amônio da amostra em absorbância de 340 nm em leitora de microplaca de ELISA (Biorad Benchmark Microplate Reader 340-750nm UV/VIS, Califórnia, EUA). A diminuição na quantidade de densidade óptica é proporcional à concentração de amônio plasmática.

4.2.1.3. Glicose plasmática

A determinação de glicose plasmática foi realizada por meio do kit comercial para determinação de Glicose PAP (Labtest, Brasil), que segue CRUZAT, VF.

metodologia descrita por Bergmeyer (1974). O H_2O_2 formado com a adição da enzima glicose oxidase reage com a 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, por meio da reação oxidativa de acoplamento formando um antipirilquinonimina vermelha. A intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra. A leitura foi feita a 505 nm em leitora de microplaca de ELISA (Biorad Benchmark Microplate Reader 340-750nm UV/VIS, Califórnia, EUA).

4.2.1.4. Glutathiona reduzida (GSH) e dissulfeto de glutathiona (GSSG) eritrocitária

A determinação de GSH e GSSG em eritrócitos foi realizada utilizando a papa de hemácias dos plasmas dos animais, de acordo com metodologia descrita por Akerboom e Sies (1985). Para tanto, foi coletado 1 mL de sangue e separado o plasma heparinizado. A papa de hemácias obtida (cerca de 0,5 mL) foi homogeneizada com 5 volumes de ácido meta-fosfórico (MPA) (2,5 mL). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 4°C em microcentrífuga (15.000 x g) sendo coletado o sobrenadante para as determinações.

Para o ensaio de GSSG, as amostras foram tratadas com N-etilmaleimida (NEM), a qual se conjuga com a GSH sem oxidá-la, ocorrendo em $pH \geq 6,0$. Contudo, uma vez que a GSH é oxidada nestes valores de pH foi adicionada solução tamponante em pH 6,0 (Pipes), contendo o agente neutralizador hidróxido de potássio (KOH). Nesta reação haverá transformação de GSH em GSSG. Na sequência, o excesso de NEM foi extraído com solvente orgânico (acetato de etila) para evitar que reaja com as novas moléculas de CRUZAT, VF.

GSH que são formadas durante o ensaio de reciclagem com a GSSG redutase. O excesso de solvente, o qual inibe o ensaio da redutase foi removido por secagem em SpeedVac (Thermo Savant, modelo SPD131DDA) (SILVEIRA *et al.*, 2007).

As determinações das concentrações de GSH e GSSG foram realizadas em uma placa de ELISA, sendo pipetados 10 µl por amostra. Posteriormente, nas amostras foi adicionado 10 mM de ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), 0,17 mM de β -NADPH (Sigma, dissolvido em 0,5% (W/v) de NaHCO₃) e 0,5 U/ml de GSSG redutase (EC 1.6.4.2, Sigma-Aldrich Diagnostics Inc., Saint Louis, Missouri, EUA) (SILVEIRA *et al.*, 2007). As concentrações de GSH e GSSG foram medidas a 415 nm em leitora de microplaca de ELISA (Biorad Benchmark Microplate Reader 340-750nm UV/VIS, Califórnia, EUA).

4.2.1.5. Citocinas plasmáticas

Para determinação da concentração plasmática do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e das interleucinas (IL)-1 β , IL-6 e IL-10 foi utilizado o kit de imunoensaio Milliplex[®] Map. Este ensaio envolve um processo que cora internamente microesferas de poliestireno com dois fluorocromos espectrais distintos. Utilizando uma proporção destes dois fluorocromos, são criados conjuntos de esferas. Cada esfera é conjugada a um anticorpo analito específico. Estas microesferas são combinadas em um único poço de reação. Os ensaios se fundamentam na metodologia “sanduíche” convencional de dois-sítios, onde a mistura de microesferas é incubado com padrões e amostras em formato de placa de 96 poços, utilizando anticorpo biotinilado e incubados com o conjugado reporter estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE). As microesferas são CRUZAT, VF.

lidas no equipamento Luminex 200 (Millipore, EUA) através de sistema duplo de lasers que incide sob as microesferas, à medida que estas fluem através do fluxo celular. Um feixe de laser detecta a microesfera (o código de cor específico para o ensaio) e o outro laser quantifica o sinal de repórter em cada microesfera. As microesferas passam através do fluxo celular Luminex, e cada microesfera é identificada e o sinal SA-PE associado a elas é quantificado.

4.2.1.6. Separação de linfócitos plasmáticos

A separação de linfócitos plasmáticos foi feita pela técnica de Ficoll-Hypaque 1,084, utilizando como anticoagulante heparina sódica a 5% (BOYUM *et al.*, 2002). Após a coleta, o sangue foi diluído 1:1 com PBS e centrifugado por 10 minutos a 400 x g em tubos cônicos de 15 mL, contendo 3 mL de solução de Ficoll-Hypaque 1,084. Neste procedimento ocorre a separação em gradiente descontínuo de polissacarose Ficoll 400, o qual se agrega aos eritrócitos e granulócitos precipitando-os durante a centrifugação na presença de diatrizoato de sódio (Hypaque), o que garante a densidade do gradiente. Nesta concentração (10,24%), o diatrizoato fornece uma solução ligeiramente hipertônica (311 mOsm/kg H₂O) o que torna possível a posterior coleta e separação de linfócitos, enquanto que eritrócitos e granulócitos tendem a precipitar com o Ficoll.

Por método de aspiração com o auxílio de uma pipeta Pasteur de plástico foi coletada a nuvem de linfócitos e monócitos. Uma vez coletadas, as amostras foram transferidas para outro tubo de 15 mL e diluídas com PBS para um volume de cerca de 10 vezes o volume de mononucleares obtido, sendo centrifugadas a 1000 x g por 10 minutos, à temperatura ambiente para CRUZAT, VF.

precipitar as células. Ao término da centrifugação o PBS é aspirado retirando as plaquetas ainda restantes na nuvem de leucócitos. Uma vez que as células de interesse eram os linfócitos circulantes, a preparação final (após as lavagens com PBS) foi ressuspensa em meio de cultura (RPMI1640, Sigma-Aldrich, R4130-50, contendo SFB a 10%, v/v) e incubada por 1 hora a 37°C, fato que promoveu a adesão de monócitos ao fundo da placa de cultura. Depois deste período, as células presentes no sobrenadante (que se constituem essencialmente de linfócitos) foram coletadas para o ensaio de proliferação.

4.2.1.7. Capacidade proliferativa de linfócitos

A capacidade proliferativa de linfócitos totais, T e B foi realizada em placas de 96 poços (Sigma-Aldrich M0156). Neste ensaio as células foram incubadas/cultivadas por 24 e 48 horas, à razão de 5×10^5 células por poço em meio de cultura (RPMI1640 Sigma-Aldrich, R4130-50) contendo soro fetal bovino (SFB, 10% v/v, Sigma-Aldrich, F6178) inativado pelo calor (200 µL de volume final) e 0,1% de antibiótico (penicilina 10.000 U/mL e estreptomicina 10 mg/L). A concentração de células descrita acima se mostrou a mais adequada para a avaliação de incorporações em linfócitos (estimulados ou não com mitógenos), macrófagos e várias linhagens tumorais mantidos em atmosfera de 95% de ar e 0,5% de CO₂ (BITTENCOURT *et al.*, 1993; BITTENCOURT *et al.*, 1994).

Para as amostras em que se desejou verificar a capacidade proliferativa de linfócitos T foi adicionada a quantidade de 10 µL da lectina Concanavalina A

estéril (Con A, Sigma-Aldrich, L7647). As amostras em que se desejou verificar a capacidade proliferativa de linfócitos B foi adicionada a quantidade de 10 µL de LPS (Sigma-Aldrich, 0111:B4, L3024), enquanto que as células controle (quiescentes) receberam quantidades idênticas do mesmo meio de cultura (RPMI1640 Sigma-Aldrich, R4130-50). A mensuração da capacidade proliferativa dos linfócitos foi medida por técnica colorimétrica utilizando 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio brometo (MTT) de acordo com metodologia descrita por Hay e Westwood (2002). A leitura dos resultados do ensaio de MTT é feita a 570 nm em leitora de microplacas ELISA (Biorad Benchmark Microplate Reader 340-750nm UV/VIS, Califórnia, EUA).

4.2.2. Parâmetros teciduais

4.2.2.1. Glutamina e glutamato

A determinação de glutamina e glutamato muscular (gastrocnêmio) e hepático foram realizadas por meio do kit comercial para glutamina/glutamato (Sigma-Aldrich Diagnostics Inc., Saint Louis, Missouri, EUA), que recomenda a metodologia descrita por Lund (1986). Após a obtenção cirúrgica, os tecidos foram congelados com auxílio de um “*freeze-clamp*” e pesados em seguida. Imediatamente após a pesagem, os tecidos foram congelados e mantidos em freezer -80°C por cerca de um dia. Cabe salientar que amostras podem ser mantidas por cerca de dois meses nesta temperatura (LUND, 1986). O processamento e análise foi realizado a temperatura de 4°C, onde os tecidos, ainda congelados, foram homogeneizados em TCA 5% à razão de 6 mL por grama de tecido. Para tal um homogeneizador de facas (Ultra Turrax) foi

utilizado. Imediatamente após a homogeneização em TCA foi feita a neutralização dos plasmas utilizando 6 µL de Na₂CO₃ para cada 100 µL de sobrenadante coletado posteriormente a centrifugação a 16.000 x g por 2 min., a 4°C, sendo o sobrenadante transferido para outro tubo de 1,5 mL. O volume de Na₂CO₃ utilizado é suficiente para trazer o pH das amostras para cerca de 6,5. Para o ensaio foram utilizados 20 µL dos sobrenadantes em triplicata.

A primeira reação consiste na desaminação enzimática da L-glutamina, por meio da enzima glutaminase (GA), gerando quantidades estequiométricas de amônio (NH₄⁺) e L-glutamato. Em seguida, o L-glutamato é desidrogenado e convertido a α-cetoglutarato (2-oxoglutarato) via glutamato desidrogenase (GDH), na presença de NAD⁺. As quantidades de L-glutamina e/ou glutamato das amostras são proporcionais à quantidade de NADH formado, medido a 340 nm em leitora de microplacas ELISA (Biorad Benchmark Microplate Reader 340-750nm UV/VIS, Califórnia, EUA).

* L-glutamina amidoidrolase, EC 3.5.1.2

** L-glutamato: NAD(P)⁺ oxidorreductase (desaminante), EC 1.4.1.3 (**GDH**)

4.2.2.2. Glutathiona reduzida (GSH) e dissulfeto de glutathiona (GSSG)

As determinações de GSH e GSSG nos tecidos muscular (gastrocnêmio) e hepático foram realizadas de acordo com metodologia descrita por Akerboom

e Sies (1985). Para tanto, os tecidos obtidos cirurgicamente e imediatamente pesados e congelados utilizando um freeze-clamp em nitrogênio líquido foram homogeneizados em MPA 5% à razão de 1 mL/g de tecido. Depois da homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 15.000 x g, por 5 min a 4°C, sendo coletado o sobrenadante para as determinações.

Para o ensaio de GSSG, as amostras foram tratadas com N-etilmaleimida (NEM), a qual se conjuga com a GSH sem oxidá-la, ocorrendo em $\text{pH} \geq 6,0$. Contudo, uma vez que a GSH é oxidada nestes valores de pH foi adicionada solução tamponante em pH 6,0 (Pipes), contendo o agente neutralizador hidróxido de potássio (KOH). Nesta reação haverá transformação de GSH em GSSG. Na sequência, o excesso de NEM foi extraído com solvente orgânico (acetato de etila) para evitar que reaja com as novas moléculas de GSH que são formadas durante o ensaio de reciclagem com a GSSG redutase. O excesso de solvente, o qual inibe o ensaio da redutase foi removido por secagem em SpeedVac (Thermo Savant, modelo SPD131DDA) (SILVEIRA *et al.*, 2007).

A determinação das concentrações de GSH e GSSG foram realizadas em uma placa de ELISA, sendo pipetados 10 µl por amostra. Posteriormente, nas amostras foi adicionado 10 mM de ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), 0,17 mM de β-NADPH (Sigma, dissolvido em 0,5% (W/v) de NaHCO₃) e 0,5 U/ml de GSSG redutase (EC 1.6.4.2, Sigma-Aldrich Diagnostics Inc., Saint Louis, Missouri, EUA) (SILVEIRA *et al.*, 2007). As concentrações de GSH e GSSG foram medidas a 415 nm em leitora de microplaca de ELISA (Biorad Benchmark Microplate Reader 340-750nm UV/VIS, Califórnia, EUA).

4.2.2.3. Substancias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação das TBARS foi realizada nos tecidos muscular (gastrocnêmio) e hepático homogeneizados em TCA 15%, contendo 15 µl de hidroxitolueno butilado (BHT) 29,5 mM por ml., como descrito por Draper *et al.* (1993). A proporção da mistura ao tecido foi de 5 ml por grama de tecido fresco. Posteriormente, as amostras foram fervidas em banho-maria a 100°C por 30 minutos e centrifugadas por 10 minutos a 2500 x g a 4 °C, sendo coletado o sobrenadante. A amostra coletada foi misturada em ácido tiobarbitúrico (TBA) na proporção de 1:1 em microplaca de ELISA e feita a leitura a 535 nm (Biorad, modelo Benchmark Microplate Reader 340-750nm UV/VIS, Califórnia, EUA).

4.2.2.4. Eletroforese e protocolo de *Western Blot*

Quantidades iguais de proteína celular (40 µg), determinadas por metodologia descrita por Bradford (1976), foram carregadas em gel de poliacrilamida (10%) dodecil sulfato de sódio para eletroforese (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970) em cuba Mini-Protean-II Tetra Cell (Bio-Rad, California, EUA). O tampão de corrida foi constituído de Tris a 25 mM, glicina a 192 mM e SDS a 1% (m/v), em pH 8,3, utilizando-se de 1 cm de gel de entrada 4% (m/v) e gel de separação a 10% (m/v). Nos géis de corrida foram aplicada as amostras contendo Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerol 10% (m/v), SDS 2% (v/v) e 2-mercaptoetanol a 5%. O controle da corrida foi feito utilizando um marcador de peso molecular colorido (Bio-Rad, California, EUA). A corrida no gel de poliacrilamida separa as moléculas de misturas complexas de acordo com seu

peso molecular e carga. O resultado são bandas, separadas de moléculas individuais. Aproximadamente após 4 horas de corrida, com amperagem constante de 15 mA por gel, as amostras foram submetidas ao procedimento de *Western Blotting*, sendo transferidas para membranas de nitrocelulose (GE Health Care-Amersham) em sistema de eletro transferência em cuba mini Trans-Blot Eletrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, California, EUA). A etapa da transferência foi realizada por um período de 2 horas com voltagem constante de 100 v.

Uma solução de vermelho Ponceau (Sigma-Aldrich Diagnostics Inc., Saint Louis, Missouri, EUA) e sal de sódio 3% (m/v) em TCA a 3% foi utilizada para verificar o sucesso da transferência para as membranas de nitrocelulose. A retirada do vermelho Ponceau foi feita com tampão de TEN-Tween 20 (Tris-EDTA-NaCl) 0,1% (81,55 µmol/L) até que as membranas permanecessem límpidas novamente.

O processo de *Western Blot* foi realizado utilizando aparelho específico com uso de sistema de vácuo SNAP i.d. (Millipore). Esta metodologia otimiza o tempo de reação dos anticorpos. De acordo com o protocolo, primeiramente é realizada uma incubação instantânea a vácuo com tampão de bloqueio com leite em pó desnatado (Molico desnatado) a 0,5% em TEN-Tween 0,1%, seguindo incubação por 15 minutos com anticorpo monoclonal e posteriormente três lavagens instantâneas a vácuo com 15 mL TEN-Tween 0,1%. Após, segue-se incubação com segundo anticorpo por 15 minutos com e três lavagens instantâneas a vácuo com 15 mL de TEN-Tween 0,1%. A imunodeteção foi realizada por quimioluminescência com uso de solução de ECL PLUS (Amersham, GE Health Care), sendo a quimioluminescência CRUZAT, VF.

fotodocumentada (60 fotos, 1foto/10seg) em sistema automático e motorizado ImageQuant 400 (GE Health Care). A análise do conteúdo celular de β -Actina foi utilizada como normalizador, utilizando os mesmos métodos e instrumentos para a incubação com anticorpo anti β -actina contendo peroxidase (1:1000 Santa Cruz Biotechnology). Anticorpos específicos foram utilizados para as seguintes expressões proteicas: HSP-90 (1:1000 Cell Signaling Technology), HSP-70 (1:1000 Santa Cruz Biotechnology), HSP-27 (1:1000 Cell Signaling Technology), NF- κ B-p65 (1:1000 Cell Signaling Technology) e I κ B- α/β fosforilado (1:1000 Cell Signaling Technology).

As imagens foram quantificadas com uso do ImageQuant 400, sendo os resultados expressos em unidades arbitrárias da razão anticorpo específico/ β -actina. Após este procedimento os resultados foram expressos em relação ao grupo controle do estudo (CTRL) e de acordo com a intervenção nutricional.

4.2.2.5. Extração de RNA total e quantificação

Para isolamento do RNA total, amostras pesando aproximadamente 100 mg do músculo gastrocnêmio e fígado foram dissecadas e submetidas a homogeneização em 1 mL de reagente *Qiazol*® (*Qiagen*, USA), seguindo as recomendações do fabricante e com o auxílio de homogeneizador *Polytron*®.

Após a primeira etapa, foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio ao homogenado e, posteriormente, realizou-se uma centrifugação a 12.000 g para recuperação da fase aquosa superior. A esta se adicionaram 0,5 mL de isopropanol e nova centrifugação a 12.000 g foi feita para obtenção do precipitado. Descartou-se o sobrenadante e, ao sedimentado, 1 mL de etanol 75% foi adicionado, procedimento seguido de centrifugação a 7500 g. O CRUZAT, VF.

sobrenadante foi novamente descartado e o procedimento de lavagem com etanol foi repetido. O precipitado final, sem resíduo de etanol, foi ressuspenso em 100 a 200 µl de água nanopura.

A quantificação espectrofotométrica de RNA foi realizada com 1 µl da solução da amostra a 260 nm, utilizando sistema NanoDrop, modelo 2000c (Thermo Scientific, USA). Para averiguação da pureza da solução de ácido nucleico, foram feitas leituras adicionais a 230 e a 280 nm para cálculo das razões 260/230 e 260/280. A amostra foi também submetida à corrida em gel desnaturante para análise qualitativa (Anexos). Imediatamente após a leitura de concentração, a solução de RNA foi submetida à purificação com o *kit* comercial RNeasy mini Kit (Qiagen, USA), seguindo-se rigorosamente o protocolo fornecido pelo fabricante.

4.2.2.6. Transcrição reversa

As amostras contendo 1 µg de RNA total foram submetidas à reação de transcrição reversa com “*primers*” randômicos. Para tanto, foram adicionados em cada amostra 10 µL do mix de transcrição reversa RT2 First Strand Kit (Qiagen, USA) em volume final de 10 µL. As reações foram incubadas por 15 minutos a 42 °C, seguida de aquecimento à 95 °C por 5 minutos para desnaturação da enzima. Posteriormente, como manda o protocolo do kit foram adicionados 91 µL de água nanopura livre de RNase para cada reação. Em seguida as amostras foram congeladas para posterior reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR)

4.2.2.7. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR)

Seguiram-se criteriosamente as recomendações do fabricante do RT2 Profiler PCR Array (Qiagen, USA) customizado para genes avaliados, arbitrariamente, como de interesse para o presente estudo. Assim, foram realizados os experimentos de PCR em tempo real nas condições controle (CTRL) e tratado (LPS) e suplementado (GLN+ALA-LPS e DIP-LPS), utilizando kits para RT2 SYBR Green Mastermix (Qiagen, USA). Brevemente, prepararam-se soluções “*master mix*” contendo 1350 μL de Tampão SYBR (Contendo a Taq Polimerase e o fluoróforo SYBR Green), 1248 μL de água nanopura e 102 μL de amostra. As ciclagens e a captação de fluorescência foram realizadas em equipamento qPCR 7500 (Applied Biosystems) e a análise dos resultados foi feita utilizando o software disponibilizado pelo fabricante. Resumidamente, para cada condição acima descrita, foram calculados os valores de ΔCt de cada gene de interesse ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct gene de interesse} - \text{Ct média geométrica dos genes constitutivos}$). Em seguida, tomando-se como referência os valores de ΔCt média geométrica CTRL, calculou-se os valores de $\Delta\Delta\text{Ct}$, resultados da subtração $\Delta\text{Ct CTRL} - \Delta\text{Ct Tratamento}$. Os “*primers*” previamente disponibilizados pelo fabricante (Qiagen, USA) e utilizados estão descritos na tabela 5.

Tabela 5 - Lista genes utilizados na expressão mRNAs

Sigla do gene	Código Gene Bank	Nome completo	Ref. Qiagen
CASP1	NM_009807	Caspase 1	PPM02921
CASP3	NM_009810	Caspase 3	PPM02922
EIF4E	NM_007917	Fator de iniciação da tradução eucariótica 4e	PPM05111
EIF4EBP1	NM_007918	Proteína ligante 1 do fator de iniciação da tradução eucariótica 4e	PPM05118
FOXO3	NM_019740	Caixa Forkhead O3	PPM03393
GCLC	NM_010295	Glutamato-cisteína ligase, subunidade catalítica	PPM05283
GLS	NM_001081081	Glutaminase	PPM35275
GLUD1	NM_008133	Glutamato desidrogenase 1	PPM25606
GPX1	NM_008160	Glutathione peroxidase 1	PPM04345
GSR	NM_010344	Glutathione redutase	PPM04362
HSF1	NM_008296	Fator de choque térmico 1	PPM02939
HSPA1A	NM_010479	Gene 1A de proteínas de choque térmico	PPM04801
HSPA1B	NM_010478	Gene 1B de proteínas de choque térmico	PPM04792
IRAK1	NM_008363	Quinase associada ao receptor de interleucina 1	PPM03201
MTOR	NM_020009	Alvo da rapamicina em mamíferos serina/treonina quinases	PPM05092
MYD88	NM_010851	Gene 88 da resposta primária de diferenciação mielóide	PPM03399
NFKB1	NM_008689	Fator nuclear kappa B, polipeptídio de cadeia leve	PPM02930
NFKBIA	NM_010907	Fator nuclear kappa B, polipeptídio de cadeia leve, gene inibidor alfa	PPM02943
SLC38A2	NM_175121	Família 38 de carreadores solúveis, membro 2 (transportador de aminoácidos dependentes de Na ⁺)	PPM29397
TRIM63	NM_001039048	Tripartite contendo-motif 63	PPM61645
GAPDH	NM_008084	Desidrogenase de gliceraldeído 3 fosfato	PPM02946

4.3. Determinação da composição corporal

A composição corporal dos animais foi determinada a partir da análise química da carcaça, a qual avaliou a quantidade absoluta e o percentual de umidade, proteína, lipídeo e cinzas, presentes na carcaça.

A carcaça consistiu de todo o corpo do animal, incluindo a cabeça, com exceção da amostra de sangue (aproximadamente 1 mL), do fígado e do músculo gastrocnêmio (ambas as patas), removidos para análises teciduais. Como já mencionado, o conteúdo gastrintestinal foi limpo e lavado em solução salina, antes de ser incluído à carcaça.

4.3.1. Umidade

A umidade foi determinada a partir da secagem de toda a carcaça em estufa ventilada (aproximadamente 70 °C) durante 7 dias. Para tanto, as carcaças foram colocadas individualmente em embalagens de papel alumínio. O tórax e o abdômen dos animais foram abertos ao máximo, para permitir uma secagem eficiente. As carcaças foram pesadas antes de serem colocadas na estufa e depois de terem sido dessecadas. A diferença entre os pesos é o valor absoluto de umidade (g). O percentual de umidade corporal foi calculada a partir do valor absoluto de umidade (g) dividido pelo peso corporal final (g).

$$\% \text{ umidade corporal} = \text{umidade absoluta (g)} \div \text{peso corporal final (g)}$$

4.3.2. Lipídeo

Toda a carcaça seca foi então picada, embrulhada em gaze e envolvida por papel filtro (Whatman). Por meio da técnica de extração, com éter etílico (Synth) como solvente, foi removido todo o lipídeo da carcaça, utilizando-se o aparelho de Soxhlet. Essa técnica consiste em colocar a amostra em um tubo extrator, adicionar éter etílico em um balão coletor que está agregado ao extrator e aquecer o balão com a finalidade de fazer o éter evaporar. O éter atinge a amostra e condensa, pois o tubo extrator é resfriado externamente com água corrente. Ao condensar, o éter lava a amostra, extraíndo lipídeo que se acumula no balão coletor.

Depois de dois dias, o solvente foi eliminado por evaporação e o balão pesado. A diferença entre o peso do balão limpo, previamente determinado, e o balão com lipídeo forneceu o valor absoluto de gordura presente em toda a carcaça do animal. O percentual de gordura corporal foi calculada dividindo-se a quantidade de gordura na carcaça (g) pelo peso corporal final (g).

$$\% \text{ gordura corporal} = \text{gordura absoluta (g)} \div \text{peso corporal final (g)}$$

4.3.3. Proteína e massa magra

O restante da carcaça, sem umidade nem lipídeo, foi totalmente moído (moinho Ika Labortechnik M20). A amostra moída foi peneirada, apenas para remoção dos pelos que poderiam reduzir sua homogeneidade. Esse processo resultou em um pó bastante uniforme, representando o conteúdo proteico de toda a carcaça.

A proteína na carcaça foi analisada por meio do método de Kjeldahl (CECCHI, 1999), que determina o teor de nitrogênio de origem orgânica de uma amostra. Essa técnica também foi utilizada para a determinação do conteúdo proteico e como teste da homogeneidade das rações. Em ambos os casos, as análises foram realizadas em quadruplicata.

Este método baseia-se na digestão da amostra com ácido sulfúrico, na presença do catalisador sulfato de cobre e de sulfato de potássio. Durante esse processo, o nitrogênio da proteína é reduzido em sulfato de amônia. Posteriormente, adiciona-se NaOH concentrado na amostra. O sulfato de amônia é destilado, ocorrendo liberação da amônia dentro de um volume conhecido de solução de ácido bórico (na presença de solução indicadora), formando borato de amônia. O borato de amônia formado é titulado com solução de ácido clorídrico (HCL). A normalidade do ácido foi de 0,1 N para a análise da carcaça e 0,02 N para a determinação do conteúdo de nitrogênio das rações.

Tanto para a ração (caseína como fonte de proteína) quanto para a carcaça, o percentual de nitrogênio encontrado foi multiplicado pelo fator arbitrário 6,25, para obtenção do percentual de proteína nas amostras, uma vez que o teor de nitrogênio, em ambos os casos, aproxima-se de 16% do conteúdo proteico total.

$$\% N = [(mL \text{ HCL amostra} - mL \text{ HCL branco}) \times N \times \\ FC \times 14,007] \div mg \text{ amostra}$$

- % N = percentual de nitrogênio da amostra

- mL HCL = volume gasto de ácido clorídrico
- N = normalidade do HCl. Ração – 0,02 N; carcaça – 0,1 N
- FC = fator de correção do ácido
- 14,007 = peso equivalente do nitrogênio
- mg amostra = massa da amostra analisada

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ N} \times 6,25$$

- % Proteína = percentual de proteína da amostra
- % N = percentual de nitrogênio da amostra
- 6,25 = fator arbitrário indicativo do conteúdo de nitrogênio da amostra proteica (aproximadamente 16% do total)

O conteúdo absoluto de proteína na carcaça foi calculado de acordo com a seguinte formula:

$$\text{Proteína absoluta (g)} = [\text{carcaça seca (g)} - \text{lipídeo total (g)}]$$

$$\times \% \text{ Proteína}$$

Deve-se notar que o % proteína não indica o percentual de proteína corporal, mas sim o percentual de proteína na amostra da carcaça moída (base seca). O percentual de proteína corporal foi calculado a partir da massa de proteína absoluta (g) dividida pelo peso corporal final (g).

$$\% \text{ proteína corporal} = \text{proteína absoluta (g)} \div \text{peso corporal final (g)}$$

O valor absoluto da massa magra foi calculado a partir da diferença entre o peso corporal final (g) e o valor absoluto de lipídeo (g). O percentual de massa magra é a divisão entre seu valor absoluto pelo peso corporal final (g).

$$\text{Massa magra} = \text{peso corporal final (g)} - \text{gordura total (g)}$$

$$\% \text{ massa magra} = \text{massa magra (g)} \div \text{peso corporal final (g)}$$

4.3.4. Cinzas

O mesmo pó utilizado na determinação de proteína, proveniente da moagem da carcaça seca e sem gordura, foi utilizado para a obtenção da amostra de cinzas. Para tanto, aproximadamente 2 g do pó foram pesados em um cadinho, que foi colocado dentro de uma mufla à 550 °C, durante 12 horas. Posteriormente, o cadinho foi colocado dentro de um dessecador até atingir a temperatura ambiente, quando então o peso da amostra de cinzas foi determinado, a partir da diferença do peso da amostra antes de ter sido colocada na mufla. A determinação de cinzas foi realizada em duplicata. O percentual de cinzas foi calculado a partir da massa de cinzas absoluta (g) dividida pelo peso corporal final (g).

$$\% \text{ cinzas} = \text{massa de cinzas (g)} \div \text{peso corporal final (g)}$$

4.4. Análise estatística

Os parâmetros serão apresentados segundo os objetivos citados na presente pesquisa. As médias dos resultados foram primeiramente submetidas à análise de ANOVA multivariada (MANOVA); tal procedimento permite a redução do número de testes simultâneos e, conseqüentemente diminui a chance de erros tipo 1 (HAIR *et al.*, 2005). Para verificar a validade das suposições das MANOVAs, uma série de controles foi adotada para cada variável dependente. Os resultados foram escaneados por dados discrepantes com técnicas estatísticas assim como por inspeção visual da distribuição dos resultados. O teste de Levene foi utilizado para detectar desvios de homocedasticidade entre os grupos do estudo.

Após a verificação das significâncias das ANOVAs (*one way*), foram realizadas comparações por tratamento. Quando uma ANOVA resultou em um valor de p menor do que 0,05, diferenças estatisticamente significativas foram identificadas pelo procedimento para comparação múltipla de Tukey (Tukey HSD, de *Honestly Significant Difference*). Todos os testes foram realizados utilizando o programa de software SPSS, versão 18.0.

5. RESULTADOS

5.1. Parâmetros Biométricos

5.1.1. Peso corporal

Tabela 6 - Peso corporal (g) dos animais no período de até 48 horas.

	0 h	24 h	48 h
CTRL	23,8 ± 1,3	23,6 ± 1,0	23,7 ± 1,1
GLN+ALA	23,8 ± 0,8	23,9 ± 0,7	24,1 ± 0,7
DIP	24,2 ± 0,6	24,3 ± 0,6	24,3 ± 0,6
LPS	23,7 ± 0,8	20,0 ± 0,7 [†]	18,9 ± 0,7 [†]
GLN+ALA-LPS	23,5 ± 0,5	21,5 ± 0,9	20,6 ± 0,4 [†]
DIP-LPS	24,1 ± 0,3	21,8 ± 0,3	20,8 ± 0,2 [†]

Camundongos B6 (*n* = 12 *por grupo*) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL, GLN+ALA e DIP). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

† Diferença estatística se comparado ao grupo CTRL, GLN+ALA e DIP ($p < 0,05$ *Tukey HSD*).

Figura 13 - Peso corporal de camundongos B6 ($n = 12$ por grupo) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL, GLN+ALA e DIP). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

† Diferença estatística se comparado ao grupo CTRL, GLN+ALA e DIP ($p < 0,05$ Tukey HSD).

De acordo com a tabela 6 e a figura 13, não houve diferença significativa no peso corporal dos grupos não submetidos à endotoxemia, GLN+ALA e DIP, se comparado ao grupo CTRL. Entretanto, o grupo LPS apresentou redução significativa do peso corporal em 24 e 48 horas após indução da endotoxemia, em relação ao grupo CTRL (18% e 25%, respectivamente). Já os grupos endotoxêmicos e suplementados, GLN+ALA-LPS e DIP-LPS apresentaram redução significativa do peso corporal, 48 horas após indução da endotoxemia, se comparado ao grupo CTRL (15% e 14%, respectivamente).

5.1.2. Consumo de ração

Tabela 7 - Consumo de ração (g) dos animais no período de até 48 horas.

	0 h	24 h	48 h
CTRL	3,0 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,9 ± 0,0
GLN+ALA	3,4 ± 0,0	3,4 ± 0,1	4,0 ± 0,2
DIP	3,4 ± 0,0	3,4 ± 0,0	4,0 ± 0,2
LPS	3,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1 [†]	0,5 ± 0,1 [†]
GLN+ALA-LPS	3,3 ± 0,0	0,5 ± 0,1 [†]	0,5 ± 0,1 [†]
DIP-LPS	3,3 ± 0,0	0,5 ± 0,1 [†]	0,6 ± 0,1 [†]

Camundongos B6 (*n* = 12 *por grupo*) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL, GLN+ALA e DIP). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

† Diferença estatística se comparado ao grupo CTRL, GLN+ALA e DIP (*p* < 0,05 *Tukey HSD*).

Figura 14 - Consumo de ração de camundongos B6 (*n* = 12 *por grupo*) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL,

GLN+ALA e DIP). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

† Diferença estatística se comparado ao grupo CTRL, GLN+ALA e DIP ($p < 0,05$ Tukey HSD).

De acordo com a tabela 7 e a figura 14, não houve diferença significativa no consumo de ração dos grupos não submetidos à endotoxemia, GLN+ALA e DIP, se comparado ao grupo CTRL. Os grupos LPS, GLN+ALA-LPS e DIP-LPS apresentaram redução (cerca de 6 vezes) significativa no consumo de ração em 24 e 48 horas, após indução da endotoxemia, se comparados ao grupo CTRL do estudo.

5.1.3. Composição corporal

Tabela 8. Composição corporal

Variáveis	Grupos Experimentais			
	CTRL	LPS	GLN+ALA-LPS	DIP-LPS
Composição corporal				
Massa magra (%)	86,49 ± 0,8	89,95 ± 2,8	91,13 ± 1,3	89,31 ± 3,1
Massa adiposa (%)	13,51 ± 0,8	10,05 ± 2,8	8,87 ± 1,3	10,69 ± 3,1

Camundongos B6 ($n = 6$ por grupo) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

De acordo com a tabela 8, nenhuma diferença significativa foi observada nos grupos do estudo em relação a composição corporal dos animais.

5.2. Parâmetros plasmáticos e séricos

5.2.1. Concentração de glutamina, glutamato, glicose e amônio plasmáticos

Tabela 9. Glutamina, glutamato, glicose e amônio plasmáticos

Variáveis	Grupos Experimentais					
	CTRL	GLN+ALA	DIP	LPS	GLN+ALA-LPS	DIP-LPS
Glutamina (mmol/L)	0,66 ± 0,07	0,67 ± 0,04	0,65 ± 0,05	0,19 ± 0,04 †	0,65 ± 0,12 *	0,58 ± 0,08 *
Glutamato (mmol/L)	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01
Glutamina/ Glutamato	6,54 ± 0,27	6,79 ± 1,08	6,12 ± 0,21	2,69 ± 0,71 †	6,53 ± 0,98 *	5,89 ± 0,59 *
Glicose (mmol/L)	5,30 ± 1,2	5,36 ± 1,94	5,38 ± 1,85	5,44 ± 0,6	5,40 ± 2,2	5,35 ± 2,6
Amônio (μmol/mL)	0,45 ± 0,04	0,42 ± 0,04	0,44 ± 0,05	0,55 ± 0,11	0,55 ± 0,06	0,54 ± 0,05

Camundongos B6 ($n = 12$ por grupo) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL, GLN+ALA e DIP). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

† Diferença estatística se comparado ao grupo CTRL, GLN+ALA e DIP ($p < 0,05$ Tukey HSD).

* Diferença estatística se comparado ao grupo LPS ($p < 0,05$ Tukey HSD).

De acordo com a tabela 9, o grupo LPS apresentou redução significativa na concentração de glutamina plasmática e na razão entre a concentração de glutamina e glutamato plasmáticos, se comparado ao grupo CTRL (3,4 vezes e 2,4 vezes, respectivamente). Os grupos GLN+ALA-LPS e DIP-LPS apresentaram restauração da concentração de glutamina plasmática e de sua CRUZAT, VF.

razão por glutamato. Não houve diferença significativa na concentração de glutamina e glutamato, bem como na razão entre a concentração de glutamina e glutamato plasmáticos dos grupos não submetidos à endotoxemia, GLN+ALA e DIP, se comparado ao grupo CTRL. Não houve diferença significativa entre os grupos do estudo em relação à concentração de glutamato, glicose e amônio plasmáticos.

5.2.2. Concentração de citocinas plasmáticas

Figura 15 - Concentração plasmática do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e de interleucina 6 (IL-6) de camundongos B6 ($n = 8$ por grupo) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Resultados expressos em média e erro padrão da média. † Diferença estatística se comparado ao grupo CTRL ($p < 0,05$ Tukey HSD). * Diferença estatística se comparado ao grupo LPS ($p < 0,05$ Tukey HSD).

De acordo com a figura 15, o grupo LPS apresentou aumento significativo na concentração plasmática de TNF- α e IL-6, se comparado aos grupos CTRL (53 e 7 vezes, respectivamente), GLN+ALA-LPS (5 e 2 vezes, respectivamente) e DIP-LPS (3 e 2 vezes, respectivamente). O grupo DIP-LPS apresentou aumento significativo na concentração plasmática de TNF- α , se comparado ao grupo CTRL (5 vezes). Na concentração plasmática de IL-6, os grupos GLN+ALA-LPS e DIP-LPS apresentaram aumento (cerca de 4 vezes) significativo, quando comparados ao grupo CTRL do estudo.

Figura 16 - Concentração plasmática de interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina-10 (IL-10 x10⁻²) de camundongos B6 (*n* = 8 por grupo) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Resultados expressos em média e erro padrão da média.
[†] Diferença estatística se comparado ao grupo CTRL (*p*<0,05 Tukey HSD).
^{*} Diferença estatística se comparado ao grupo LPS (*p*<0,05 Tukey HSD).

De acordo com a figura 16, o grupo LPS apresentou aumento significativo na concentração plasmática de IL-1 β e IL-10, se comparado aos grupos CTRL (10 e 113 vezes, respectivamente), GLN+ALA-LPS (2,5 e 1,8 vezes, respectivamente) e DIP-LPS (2 e 2,2 vezes, respectivamente). Quando comparados ao grupo CTRL, os grupos suplementados, GLN+ALA-LPS e DIP-LPS apresentaram aumento (60 e 50 vezes, respectivamente) significativo na concentração plasmática de IL-10.

5.2.3. Capacidade proliferativa de linfócitos plasmáticos

Figura 17 - Proliferação de linfócitos totais mantidos em meio de cultura (RPMI1640, contendo soro fetal bovino) por 48 horas após a coleta de sangue em camundongos B6 ($n = 8$ por grupo) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Resultados expressos em média e erro padrão da média corrigida.

† Diferença estatística se comparado ao grupo CTRL ($p < 0,05$ Tukey HSD).

* Diferença estatística se comparado ao grupo LPS ($p < 0,05$ Tukey HSD).

De acordo com a figura 17, os grupos GLN+ALA-LPS e DIP-LPS apresentaram aumento significativo na proliferação de linfócitos totais plasmáticos, incubados em meio de cultura por 24 e 48 horas, se comparado aos grupos CTRL e LPS. Esta diferença de aumento foi de cerca de 100% em 24 horas para ambos os grupos suplementados. Em 48 horas, a diferença de aumento foi de 260%, para o grupo GLN+ALA-LPS e de 200% para o grupo DIP-LPS.

Figura 18 - Proliferação de linfócitos T, estimulados com Concanavalina A (ConA) e mantidos em meio de cultura (RPMI1640, contendo soro fetal bovino) por 48 horas após a coleta de sangue em camundongos B6 ($n = 8$ por grupo) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Resultados expressos em média e erro padrão da média corrigida.

† Diferença estatística se comparado ao grupo CTRL ($p < 0,05$ Tukey HSD).

* Diferença estatística se comparado ao grupo LPS ($p < 0,05$ Tukey HSD).

De acordo com a figura 18, os grupos GLN+ALA-LPS e DIP-LPS apresentaram aumento significativo na proliferação de linfócitos T plasmáticos, incubados em meio de cultura por 24 e 48 horas, se comparado aos grupos CTRL e LPS. Esta diferença de aumento foi de cerca de 100% em 24 horas para ambos os grupos suplementados. Em 48 horas, a diferença de aumento foi de 300%, para o grupo GLN+ALA-LPS e de 200% para o grupo DIP-LPS.

Figura 19 - Proliferação de linfócitos B, estimulados com Lipopolissacarídeo (LPS) e mantidos em meio de cultura (RPMI1640, contendo soro fetal bovino) por 48 horas após a coleta de sangue em camundongos B6 ($n = 8$ por grupo) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Resultados expressos em média e erro padrão da média corrigida por 48 horas após a coleta. Resultados expressos em média e erro padrão da média corrigida.

† Diferença estatística se comparado ao grupo CTRL ($p < 0,05$ Tukey HSD).

* Diferença estatística se comparado ao grupo LPS ($p < 0,05$ Tukey HSD).

De acordo com a figura 19, os grupos GLN+ALA-LPS e DIP-LPS apresentaram aumento significativo na proliferação de linfócitos B plasmáticos, incubados em meio de cultura por 24 e 48 horas, se comparado aos grupos CTRL e LPS. Esta diferença de aumento foi de cerca de 100% em 24 horas para ambos os grupos suplementados. Em 48 horas, a diferença de aumento foi de 300%, para o grupo GLN+ALA-LPS e de 200% para o grupo DIP-LPS.

5.2.4. Concentração de GSH e GSSG em hemácias

Tabela 10. Concentração de GSH e GSSG em hemácias

Varáveis	Grupos Experimentais			
	CTRL	LPS	GLN+ALA-LPS	DIP-LPS
Eritrócitos				
GSH ($\mu\text{mols/mL}$)	83,39 $\pm$ 3,73	18,22 $\pm$ 1,74 †	28,89 $\pm$ 1,44 †*	33,13 $\pm$ 1,82 †*
GSSG ($\mu\text{mols/mL}$)	4,89 $\pm$ 0,35	7,94 $\pm$ 0,23 †	5,70 $\pm$ 0,30 †*	5,66 $\pm$ 0,41 *
GSSG/GSH	0,06 $\pm$ 0,01	0,45 $\pm$ 0,08 †	0,20 $\pm$ 0,01 †*	0,17 $\pm$ 0,01 †*

Camundongos B6 ($n = 12$ por grupo) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

† Diferença estatística se comparado ao grupo CTRL ($p < 0,05$ Tukey HSD).

* Diferença estatística se comparado ao grupo LPS ($p < 0,05$ Tukey HSD).

De acordo com a tabela 10, o grupo LPS apresentou redução significativa na concentração de GSH em hemácias, se comparado aos grupos CTRL (4,5 vezes), GLN+ALA-LPS (1,5 vezes) e DIP-LPS (1,8 vezes). Em relação ao grupo CTRL, os grupos GLN+ALA-LPS e DIP-LPS demonstraram redução significativa (cerca de 3 vezes) na concentração de GSH em

hemácias. Já na concentração de GSSG em hemácias, o grupo LPS apresentou aumento significativo, se comparado aos grupos CTRL (1,6 vezes), GLN+ALA-LPS (1,3 vezes) e DIP-LPS (1,3 vezes). O estado redox celular, mensurado pela razão de GSSG/GSH foi significativamente aumentado no grupo LPS, se comparado aos grupos CTRL (7,5 vezes), GLN+ALA-LPS (2 vezes) e DIP-LPS (2 vezes). Embora os valores da razão de GSSG/GSH nos grupos GLN+ALA-LPS e DIP-LPS não tenham sido tão elevados quanto no grupo LPS, os grupos suplementados tiveram aumento significativo deste parâmetro em relação ao grupo CTRL do estudo (cerca de 3 vezes para ambos os grupos suplementados).

5.3. Parâmetros teciduais

5.3.1. Concentração de glutamina e glutamato no músculo gastrocnêmio

Tabela 11. Concentração de glutamina e glutamato no músculo esquelético gastrocnêmio.

Variáveis	Grupos Experimentais					
	CTRL	GLN+ALA	DIP	LPS	GLN+ALA-LPS	DIP-LPS
Músculo gastrocnêmio						
Glutamina (µmol/g tecido fresco)	4,56 ± 0,17	4,89 ± 0,32	4,53 ± 0,24	2,56 ± 0,19 †	5,50 ± 0,46 *	5,19 ± 0,32 *
Glutamato (µmol/g tecido fresco)	0,39 ± 0,06	0,41 ± 0,05	0,43 ± 0,07	0,41 ± 0,08	0,55 ± 0,07	0,45 ± 0,04
Glutamina/Glutamato	11,99 ± 0,83	12,49 ± 1,17	10,81 ± 1,33	6,33 ± 0,61 †	13,11 ± 1,58 *	11,09 ± 0,50 *
Glutamina (nmol/mg proteína)	62,69 ± 2,12	61,67 ± 3,31	58,09 ± 4,84	26,64 ± 1,81 †	67,73 ± 6,12 *	62,88 ± 4,48 *
Glutamato (nmol/mg proteína)	5,63 ± 0,30	5,58 ± 0,40	5,79 ± 0,28	4,44 ± 0,57	5,74 ± 0,23	5,24 ± 0,30
Glutamina/Glutamato	11,19 ± 0,25	11,05 ± 0,31	10,04 ± 0,61	6,24 ± 0,42 †	11,73 ± 0,62 *	11,97 ± 0,31 *

Camundongos B6 ($n = 12$ por grupo) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL, GLN+ALA e DIP). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

† Diferença estatística se comparado ao grupo CTRL, GLN+ALA e DIP ($p < 0,05$ Tukey HSD).

* Diferença estatística se comparado ao grupo LPS ($p < 0,05$ Tukey HSD).

De acordo com a tabela 11, não houve nenhuma diferença significativa no metabolismo muscular da glutamina nos grupos não submetidos à endotoxemia, GLN+ALA e DIP, se comparado ao grupo CTRL do estudo. Já a endotoxemia promoveu redução significativa (média de 50%) na concentração de glutamina muscular ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco e nmol/mg proteína) e nas razões entre a concentração de glutamina e glutamato musculares ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco e nmol/mg proteína), se comparado ao grupo CTRL do estudo. Ambas as suplementações reverteram significativamente este quadro de deficiência de glutamina. Não houve diferença significativa entre os grupos do estudo em relação à concentração de glutamato muscular.

5.3.2. Concentração de GSH e GSSG no músculo gastrocnêmio

Tabela 12. Concentração de GSH e GSSG no músculo esquelético gastrocnêmio

Variáveis	Grupos Experimentais			
	CTRL	LPS	GLN+ALA-LPS	DIP-LPS
Músculo gastrocnêmio				
GSH ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco)	$3,05 \pm 0,44$	$1,40 \pm 0,14 \uparrow$	$2,59 \pm 0,10 *$	$3,01 \pm 0,38 *$
GSSG ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco)	$0,43 \pm 0,03$	$0,67 \pm 0,06 \uparrow$	$0,46 \pm 0,04 *$	$0,41 \pm 0,05 *$
GSSG/GSH	$0,16 \pm 0,04$	$0,52 \pm 0,06 \uparrow$	$0,18 \pm 0,01 *$	$0,14 \pm 0,01 *$
GSH (nmol/mg proteína)	$38,75 \pm 0,52$	$16,61 \pm 1,22 \uparrow$	$33,88 \pm 2,10 *$	$37,23 \pm 3,19 *$
GSSG (nmol/mg proteína)	$5,17 \pm 0,16$	$8,12 \pm 0,31 \uparrow$	$5,15 \pm 0,16 *$	$5,06 \pm 0,40 *$
GSSG/GSH	$0,13 \pm 0,01$	$0,51 \pm 0,02 \uparrow$	$0,15 \pm 0,01 *$	$0,14 \pm 0,01 *$

Camundongos B6 ($n = 12$ por grupo) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

† Diferença estatística se comparado ao grupo CTRL ($p < 0,05$ *Tukey HSD*).

* Diferença estatística se comparado ao grupo LPS ($p < 0,05$ *Tukey HSD*).

De acordo com a tabela 12, o grupo LPS apresentou redução (média de 50%) significativa na concentração de GSH ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco e nmol/mg proteína) no musculo esquelético gastrocnêmio, se comparado aos grupos CTRL e GLN+ALA-LPS e DIP-LPS. Na mesma tabela é possível verificar aumento (média acima de 52%) significativo na concentração de GSSG ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco e nmol/mg proteína) no musculo esquelético gastrocnêmio do grupo LPS, se comparado aos grupos CTRL, GLN+ALA-LPS e DIP-LPS. O grupo LPS também apresentou aumento (média de 4 vezes) significativo no estado redox celular, mensurado pela razão entre a concentração de GSSG e GSH ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco e nmol/mg proteína) do musculo esquelético gastrocnêmio, se comparado aos grupos CTRL, GLN+ALA-LPS e DIP-LPS.

5.3.3. Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no músculo gastrocnêmio

Figura 20 - Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no músculo gastrocnêmio de camundongos B6 ($n = 12$ por grupo) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Resultados expressos em média e erro padrão da média.
 † Diferença estatística se comparado ao grupo CTRL ($p < 0,05$ Tukey HSD).
 * Diferença estatística se comparado ao grupo LPS ($p < 0,05$ Tukey HSD).

De acordo com a figura 20, o grupo LPS apresentou aumento significativo na concentração de TBARS muscular, se comparado aos grupos CTRL (3,9 vezes), GLN+ALA-LPS (3 vezes) e DIP-LPS (2,5 vezes).

5.3.4. Concentração de proteínas no músculo gastrocnêmio

Figura 21 - Concentração da proteína de choque térmico de 90 kDa (HSP90) no músculo gastrocnêmio de camundongos B6 ($n = 6$ por grupo) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

† Diferença estatística se comparado ao grupo CTRL ($p < 0,05$ Tukey HSD).

* Diferença estatística se comparado ao grupo LPS ($p < 0,05$ Tukey HSD).

De acordo com a figura 21, o grupo LPS apresentou aumento significativo na concentração muscular de HSP90, se comparado aos grupos CTRL (73%), GLN+ALA-LPS (86%) e DIP-LPS (147%).

Figura 22 - Concentração da proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70 = HSP73+HSP72) no músculo gastrocnêmio de camundongos B6 ($n = 6$ por grupo) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

† Diferença estatística se comparado ao grupo CTRL ($p < 0,05$ Tukey HSD).

* Diferença estatística se comparado ao grupo LPS ($p < 0,05$ Tukey HSD).

De acordo com a figura 22, o grupo LPS apresentou aumento significativo na concentração muscular de HSP70 (HSP73+HSP72), se comparado aos grupos CTRL (57%), GLN+ALA-LPS (86%) e DIP-LPS (190%). O grupo DIP-LPS apresentou redução (46%) significativa na concentração muscular de HSP70, se comparado ao grupo CTRL do estudo.

Figura 23 - Concentração da proteína de choque térmico de 27 kDa (HSP27) no músculo gastrocnêmio de camundongos B6 ($n = 6$ por grupo) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Resultados expressos em média e erro padrão da média.
 † Diferença estatística se comparado ao grupo CTRL ($p < 0,05$ Tukey HSD).
 * Diferença estatística se comparado ao grupo LPS ($p < 0,05$ Tukey HSD).

De acordo com a figura 23, o grupo LPS apresentou aumento significativo na concentração muscular de HSP27, se comparado aos grupos CTRL (71%), GLN+ALA-LPS (72%) e DIP-LPS (134%).

Figura 24 - Concentração do fator nuclear-kappa B *p65* (NF-κB *p65*) no músculo gastrocnêmio de camundongos B6 ($n = 6$ por grupo) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Resultados expressos em média e erro padrão da média.
[†] Diferença estatística se comparado ao grupo CTRL ($p < 0,05$ Tukey HSD).
^{*} Diferença estatística se comparado ao grupo LPS ($p < 0,05$ Tukey HSD).

De acordo com a figura 24, o grupo LPS apresentou aumento significativo na concentração muscular do NF-κB *p65*, se comparado aos grupos CTRL (53%), GLN+ALA-LPS (61%) e DIP-LPS (104%).

Figura 25 - Concentração do fator inibidor kappa B- α/β (I κ B- α/β) fosforilado no músculo gastrocnêmio de camundongos B6 ($n = 6$ por grupo) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Resultados expressos em média e erro padrão da média.
 † Diferença estatística se comparado ao grupo CTRL ($p < 0,05$ Tukey HSD).
 * Diferença estatística se comparado ao grupo LPS ($p < 0,05$ Tukey HSD).

De acordo com a figura 25, o grupo LPS apresentou aumento significativo na concentração muscular do I κ B- α/β na forma fosforilada, se comparado aos grupos CTRL (cerca de 3 vezes), GLN+ALA-LPS (cerca de 3 vezes) e DIP-LPS (2,4 vezes).

5.3.5. Expressão de mRNAs (RT-qPcR) no músculo gastrocnêmio

Figura 26 - Expressão de mRNAs por RT-qPcR no músculo esquelético gastrocnêmio de camundongos B6 ($n = 6$ por grupo) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Após os tratamentos e morte, os tecidos foram removidos cirurgicamente e imediatamente congelados em nitrogênio líquido para as reações de transcrição reversa e PCR em *tempo real*. Resultados expressos em média (gráfico e “Clustergram”) e erro padrão da média. GSR, Glutathione redutase; GPX1, Glutathione peroxidase 1; GLS, Glutathione S-transferase 1, fosfato dependente; GCLC, Glutathione S-transferase ligase subunidade catalítica; GLUD1, Glutathione desidrogenase 1; SLC38A2, Família 38 de transportadores solúveis, membro 2 (transportador de aminoácidos dependentes de Na^+).

† Diferença estatística se comparado ao grupo CTRL ($p < 0,05$ Tukey HSD).

* Diferença estatística se comparado ao grupo LPS ($p < 0,05$ Tukey HSD).

De acordo com a figura 26, o grupo LPS apresentou aumento significativo na expressão de mRNAs dos genes GSR e GLS, se comparado ao

grupo CTRL (cerca de 3 e 2 vezes, respectivamente). A expressão de mRNAs do gene GPX1, no grupo LPS se apresentou significativamente reduzida (média de 2 vezes) quando comparada aos grupos CTRL, GLN+ALA-LPS e DIP-LPS. Os mRNAs dos genes GSR, GCLC e SLC38A2 exibiram aumento significativo nos grupos GLN+ALA-LPS e DIP-LPS, quando comparados ao grupo CTRL (média de 2,5 vezes) e LPS (média de 1,5 vezes). A expressão do gene GLUD1 não diferiu significativamente entre os grupos do estudo.

Figura 27 - Expressão de mRNAs por RT-qPcR no músculo esquelético gastrocnêmio de camundongos B6 ($n = 6$ por grupo) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Após os tratamentos e morte, os tecidos foram removidos cirurgicamente e imediatamente congelados em nitrogênio líquido para as reações de transcrição reversa e PCR em *tempo real*. Resultados expressos em média (gráfico e “Clustergram”) e erro padrão da média. NFKBIA, Fator

nuclear kappa B polipeptídico de cadeia leve, gene de aumento inibidor, alfa; NFKB1, Fator nuclear kappa B polipeptídico de cadeia leve; MYD88, Resposta primária mielóide de diferenciação gene 88; HSPA1A, Proteína de choque térmico 1A; HSPA1B, Proteína de choque térmico 1B; HSF1, Fator de choque térmico 1; IRAK1, quinase associada ao receptor de interleucina 1.

† Diferença estatística se comparado ao grupo CTRL ($p < 0,05$ *Tukey HSD*).

* Diferença estatística se comparado ao grupo LPS ($p < 0,05$ *Tukey HSD*).

De acordo com a figura 27, o grupo LPS apresentou redução significativa na expressão de mRNAs do gene NFKB1A, se comparado aos grupos CTRL (2,2 vezes), GLN+ALA-LPS (2 vezes) e DIP-LPS (2,2 vezes). Nos mRNAs dos genes NFKB1, MYD88, HSPA1A, HSPA1B, HSF1 e IRAK1 o grupo LPS apresentou aumento (acima de 1,6 vezes) significativo, quando comparado ao grupo CTRL do estudo. Estes mesmos genes no grupo LPS, quando comparados aos grupos GLN+ALA-LPS e DIP-LPS apresentaram redução acima de 40% na expressão de mRNAs. Por outro lado, os grupos GLN+ALA-LPS e DIP-LPS demonstraram aumento significativo na expressão de mRNAs do gene IRAK1, quando comparado ao grupo CTRL (78% e 61%, respectivamente). Os mRNAs do gene MYD88 apresentaram aumento (2,6 vezes) significativo no grupo GLN+ALA-LPS, em relação ao grupo CTRL.

Figura 28 - Expressão de mRNAs por RT-qPcR no músculo esquelético gastrocnêmio de camundongos B6 ($n = 6$ por grupo) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Após os tratamentos e morte, os tecidos foram removidos cirurgicamente e imediatamente congelados em nitrogênio líquido para as reações de transcrição reversa e PCR em *tempo real*. Resultados expressos em média (gráfico e “Clustergram”) e erro padrão da média. MTOR, Alvo da rapamicina em mamíferos; EIF4E, Fator de iniciação eucariótica 4E; EIF4EBP1, Proteína ligante 1 do fator de iniciação eucariótica 4E; FOXO3A, Complexo forkhead O3; TRIM63, Tripartite contendo-motif 63; CASP1, Caspase 1; CASP3, Caspase 3.

† Diferença estatística se comparado ao grupo CTRL ($p < 0,05$ Tukey HSD).

* Diferença estatística se comparado ao grupo LPS ($p < 0,05$ Tukey HSD).

De acordo com a figura 28, os grupos LPS, GLN+ALA-LPS e DIP-LPS apresentaram redução (acima de 44%) significativa na expressão de mRNAs dos genes MTOR e EIF4E, se comparados ao grupo CTRL. Houve aumento (acima de 3 vezes) significativo nos mRNAs dos genes EIF4EBP1, TRIM63,

CASP1 e CASP3 dos grupos LPS, GLN+ALA-LPS e DIP-LPS, se comparados ao grupo CTRL. A expressão de mRNAs do gene FOXO3A foi aumentada significativamente no grupo LPS, se comparado ao grupo CTRL (2,2 vezes), GLN+ALA-LPS (1,5 vezes) e DIP-LPS (1,6 vezes).

5.3.6. Concentração de glutamina e glutamato hepáticos

Tabela 13. Concentração de glutamina e glutamato hepáticos.

Variáveis	Grupos Experimentais					
	CTRL	GLN+ALA	DIP	LPS	GLN+ALA-LPS	DIP-LPS
<i>Tecido hepático</i>						
Glutamina ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco)	6,18 $\pm$ 0,32	6,08 $\pm$ 0,38	6,15 $\pm$ 0,20	3,13 $\pm$ 0,10 †	6,72 $\pm$ 0,41 *	6,37 $\pm$ 0,49 *
Glutamato ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco)	3,73 $\pm$ 0,41	3,66 $\pm$ 0,34	3,35 $\pm$ 0,42	2,90 $\pm$ 0,37	3,65 $\pm$ 0,36	3,35 $\pm$ 0,34
Glutamina/Glutamato	1,84 $\pm$ 0,12	1,85 $\pm$ 0,22	1,86 $\pm$ 0,19	1,18 $\pm$ 0,15 †	2,01 $\pm$ 0,10 *	2,13 $\pm$ 0,15 *
Glutamina (nmol/mg proteína)	26,29 $\pm$ 1,07	25,35 $\pm$ 2,26	25,76 $\pm$ 1,23	13,80 $\pm$ 0,51 †	27,01 $\pm$ 1,44 *	27,30 $\pm$ 1,30 *
Glutamato (nmol/mg proteína)	13,74 $\pm$ 0,49	12,44 $\pm$ 0,59	13,03 $\pm$ 0,69	12,07 $\pm$ 1,28	14,84 $\pm$ 1,21	14,50 $\pm$ 0,76
Glutamina/Glutamato	1,91 $\pm$ 0,05	2,04 $\pm$ 0,07	1,98 $\pm$ 0,11	1,18 $\pm$ 0,10 †	1,82 $\pm$ 0,07 *	1,89 $\pm$ 0,04 *

Camundongos B6 ($n = 12$ por grupo) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL, GLN+ALA e DIP). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

† Diferença estatística se comparado ao grupo CTRL, GLN+ALA e DIP ($p < 0,05$ Tukey HSD).

* Diferença estatística se comparado ao grupo LPS ($p < 0,05$ Tukey HSD).

Na tabela 13, o grupo LPS apresentou redução (média de 48%) significativa na concentração de glutamina hepática ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco e nmol/mg proteína), se comparado ao grupo CTRL. Ambos os grupos suplementados apresentaram reversão deste quadro de deficiência de glutamina, quando comparados ao grupo LPS. Não houve diferença significativa na concentração de glutamato hepático ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco e nmol/mg proteína), assim a razão entre a concentração de glutamina e glutamato hepático ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco e nmol/mg proteína) do grupo LPS apresentou redução significativa, quando comparado ao grupo CTRL (média de 37%). Os grupos suplementados apresentaram reversão da razão entre a concentração de glutamina e glutamato hepático ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco e nmol/mg proteína), quando comparados ao grupo LPS. Não houve nenhuma diferença significativa no metabolismo da glutamina hepático dos grupos GLN+ALA e DIP se comparados ao grupo CTRL.

5.3.7. Concentração de GSH e GSSG no tecido hepático

Tabela 14. Concentração de GSH e GSSG hepáticos.

Variáveis	Grupos Experimentais			
	CTRL	LPS	GLN+ALA-LPS	DIP-LPS
Tecido hepático				
GSH ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco)	$3,01 \pm 0,12$	$1,09 \pm 0,16 \uparrow$	$2,25 \pm 0,30^*$	$2,48 \pm 0,25^*$
GSSG ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco)	$1,05 \pm 0,12$	$1,46 \pm 0,12 \uparrow$	$1,30 \pm 0,02$	$0,99 \pm 0,06^*$
GSSG/GSH	$0,34 \pm 0,04$	$1,47 \pm 0,31 \uparrow$	$0,59 \pm 0,05^*$	$0,41 \pm 0,07^*$
GSH (nmol/mg proteína)	$12,2 \pm 0,50$	$5,03 \pm 0,50 \uparrow$	$10,93 \pm 0,60^*$	$12,13 \pm 0,50^*$
GSSG (nmol/mg proteína)	$4,05 \pm 0,18$	$7,03 \pm 0,52 \uparrow$	$5,63 \pm 0,14 \uparrow^*$	$4,07 \pm 0,12^{* \#}$
GSSG/GSH	$0,32 \pm 0,02$	$1,41 \pm 0,05 \uparrow$	$0,52 \pm 0,04 \uparrow^*$	$0,34 \pm 0,01^{* \#}$

Camundongos B6 ($n = 12$ por grupo) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

† Diferença estatística se comparado ao grupo CTRL ($p < 0,05$ Tukey HSD).

* Diferença estatística se comparado ao grupo LPS ($p < 0,05$ Tukey HSD).

Diferença estatística se comparado ao grupo GLN+ALA-LPS ($p < 0,05$ Tukey HSD).

De acordo com a tabela 14, o grupo LPS apresentou redução significativa na concentração de GSH ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco e nmol/mg proteína) no tecido hepático, se comparado aos grupos CTRL (média de 60%), GLN+ALA-LPS (média de 50%) e DIP-LPS (média de 57%). Na mesma tabela, verifica-se aumento significativo na concentração de GSSG ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco e nmol/mg proteína) no tecido hepático do grupo LPS, se comparado ao grupo CTRL (média de 60%) e DIP-LPS (média de 60%). A concentração de GSSG (nmol/mg proteína) foi significativamente menor no grupo GLN+ALA-LPS, quando comparado ao grupo LPS (24%) e maior quando comparado ao CRUZAT, VF.

grupo DIP-LPS (38%) e CTRL (39%). O estado redox celular no tecido hepático, mensurado pela razão entre a concentração de GSSG e GSH ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco e nmol/mg proteína) foi significativamente maior no grupo LPS, se comparado aos grupos CTRL (cerca de 4 vezes), GLN+ALA-LPS (cerca de 3 vezes) e DIP-LPS (cerca de 4 vezes). Adicionalmente, o grupo GLN+ALA-LPS apresentou aumento da mesma razão (nmol/mg proteína), quando comparado aos grupos DIP-LPS (53%) e CTRL (53%).

5.3.8. Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no tecido hepático

Figura 29 - Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) do tecido hepático de camundongos B6 ($n = 12$ por grupo) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

† Diferença estatística se comparado ao grupo CTRL ($p < 0,05$ Tukey HSD).

* Diferença estatística se comparado ao grupo LPS ($p < 0,05$ Tukey HSD).

De acordo com a figura 29, o grupo LPS apresentou aumento significativo na concentração de TBARS, se comparado aos grupos CTRL (2,8 vezes), GLN+ALA-LPS (2,2 vezes) e DIP-LPS (2 vezes).

5.3.9. Expressão de mRNAs (RT-qPcR) no tecido hepático

Figura 30 - Expressão de mRNAs por RT-qPcR no tecido hepático de camundongos B6 ($n = 6$ por grupo) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Após os tratamentos e morte, os tecidos foram removidos cirurgicamente e imediatamente congelados em nitrogênio líquido para as reações de transcrição reversa e PCR em *tempo real*. Resultados expressos em média (gráfico e “Clustergram”) e erro padrão da média. GSR, Glutathione redutase; GPX1, Glutathione peroxidase 1; GLS, Glutaminase tipo 1, fosfato dependente; GCLC, Glutamato-cisteína ligase subunidade catalítica; GLUD1, Glutamato desidrogenase 1;

SLC38A2, Família 38 de carreadores solúveis, membro 2 (transportador de aminoácidos dependentes de Na^+).

† Diferença estatística se comparado ao grupo CTRL ($p < 0,05$ *Tukey HSD*).

* Diferença estatística se comparado ao grupo LPS ($p < 0,05$ *Tukey HSD*).

De acordo com a figura 30, o grupo LPS apresentou aumento (acima de 50%) significativo na expressão de mRNAs dos genes GLS e GLUD1 hepáticos, se comparado aos grupos CTRL, GLN+ALA-LPS e DIP-LPS. A expressão de mRNAs dos genes GSR, GPX1 e GCLC no tecido hepático do grupo LPS se apresentou significativamente reduzida (acima de 39%), quando comparada aos grupos CTRL, GLN+ALA-LPS e DIP-LPS. No gene SLC38A2 do tecido hepático, os grupos GLN+ALA-LPS e DIP-LPS exibiram aumento significativo, quando comparados aos grupos CTRL (média de 97% para ambos os grupos suplementados) e LPS (média de 73% para ambos os grupos suplementados). Somente os mRNAs do gene GPX1, nos grupos GLN+ALA-LPS e DIP-LPS exibiram redução significativa, se comparado ao grupo CTRL (33% e 43, respectivamente).

Figura 31 - Expressão de mRNAs por RT-qPcR no tecido hepático de camundongos B6 ($n = 6$ por grupo) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Após os tratamentos e morte, os tecidos foram removidos cirurgicamente e imediatamente congelados em nitrogênio líquido para as reações de transcrição reversa e PCR em *tempo real*. Resultados expressos em média (gráfico e “Clustergram”) e erro padrão da média. NFKBIA, Fator nuclear kappa B polipeptídeo de cadeia leve, gene de inibidor alfa; NFKB1, Fator nuclear kappa B polipeptídeo de cadeia leve; MYD88, Resposta primária mielóide de diferenciação gene 88; HSPA1A, Proteína de choque térmico 1A; HSPA1B, Proteína de choque térmico 1B; HSF1, Fator de choque térmico 1; IRAK1, quinase associada ao receptor de interleucina 1.

† Diferença estatística se comparado ao grupo CTRL ($p < 0,05$ Tukey HSD).

* Diferença estatística se comparado ao grupo LPS ($p < 0,05$ Tukey HSD).

De acordo com a figura 31, o grupo LPS apresentou aumento (acima de 58%) significativo na expressão de mRNAs hepáticos dos genes NFKB1, HSPA1A, HSPA1B, HSF1 e IRAK1, se comparado aos grupos CTRL, GLN+ALA-LPS e DIP-LPS. A expressão hepática de mRNAs do gene NFKBIA

CRUZAT, VF.

no grupo LPS foi significativamente reduzida (acima de 50%), quando comparada aos grupos CTRL, GLN+ALA-LPS e DIP-LPS. Os mRNAs do gene MYD88 hepático não apresentaram alteração significativa em nenhum dos grupos do estudo.

Figura 32 - Expressão de mRNAs por RT-qPcR no tecido hepático de camundongos B6 ($n = 6$ por grupo) submetidos à endotoxemia (LPS) ou injeção intraperitoneal com PBS (CTRL). Animais suplementados de forma oral (por 48 horas após injeção de LPS) com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP-LPS) ou solução contendo L-glutamina e L-alanina (GLN+ALA-LPS), ambas na forma livre. Grupos CTRL e LPS receberam quantidades equivalentes de solução salina por sonda gástrica nos mesmos períodos. Após os tratamentos e morte, os tecidos foram removidos cirurgicamente e imediatamente congelados em nitrogênio líquido para as reações de transcrição reversa e PCR em *tempo real*. Resultados expressos em média (gráfico e “Clustergram”) e erro padrão da média. MTOR, Alvo da rapamicina em mamíferos; EIF4E, Fator de iniciação eucariótica 4E; EIF4EBP1, Proteína ligante 1 do fator de iniciação eucariótica 4E; FOXO3A, Complexo forkhead O3; CASP1, Caspase 1; CASP3, Caspase 3.

De acordo com a figura 32, o grupo LPS exibiu redução (acima de 40%) significativa na expressão dos mRNAs hepáticos dos genes MTOR e EIF4E, quando comparado aos grupos CTRL, GLN+ALA-LPS e DIP-LPS. Os mRNAs hepático dos genes EIF4EBP1, FOXO3A, CASP1 e CAPS3 foram significativamente aumentados (acima de 40%) no grupo LPS, quando comparado aos grupos CTRL, GLN+ALA-LPS e DIP-LPS.

6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que a suplementação por via oral com L-glutamina, tanto na forma de dipeptídeo, L-alanil-L-glutamina, quanto na forma livre, em conjunto com o aminoácido L-alanina são eficazes em atenuar a redução dos estoques de glutamina corporal durante a endotoxemia. Este efeito está associado ao aumento da capacidade de defesa antioxidante, mediada pelo eixo glutamina/glutathione, menor processo inflamatório, o qual envolve a via do NF- κ B e, estímulo na proliferação de células do sistema imune. Os grupos não endotoxêmicos e suplementados tanto com L-alanil-L-glutamina ou L-glutamina e L-alanina livres (grupos DIP e GLN+ALA, respectivamente) não demonstraram efeitos na glutaminemia, sugerindo que a suplementação prévia a um estímulo catabólico não oferece benefícios cumulativos.

A taxa de mortalidade por sepse no mundo é de cerca de 30%, contudo, no Brasil ela é de 56%, sendo 42% para hospitais privados e de 66% para hospitais públicos (LATIN AMERICAN SEPSIS INSTITUTE, 2011). O fator tempo e a terapia nutricional a ser empregada na sepse têm influência direta no risco de morte (BENJAMIM, HOGABOAM, KUNKEL, 2004; DELLINGER *et al.*, 2008). Desta forma, o presente estudo investigou os efeitos de duas formas de terapia nutricional contendo L-glutamina por via oral durante 48 horas após indução de sepse por LPS da bactéria *E. Coli*, modelo conhecido como endotoxemia. A endotoxemia é um modelo de sepse e, portanto possui diferenças em relação à sepse diagnosticada em humanos hospitalizados em UTIs, principalmente no que se refere às múltiplas complicações orgânicas.

Entretanto, muitos estudos utilizam a endotoxemia por ativar a rede inflamatória e promover estresse oxidativo de forma semelhante à sepse humana (REMIC *et al.*, 2000; RITTIRSCH, HOESEL, WARD, 2007).

A fim de configurar adequadamente o processo endotoxêmico, foram testadas diferentes doses intraperitoneais de LPS. No modelo do presente estudo a quantidade de LPS administrada (5 mg/Kg de peso corporal) foi suficiente para disparar uma severa resposta inflamatória, semelhante ao processo de sepse humana. Doses acima demonstraram maior letalidade nos animais, fugindo dos objetivos do trabalho. Adicionalmente, os animais submetidos ao protocolo de endotoxemia apresentaram redução significativa no peso corporal, fato comumente observado em pacientes no estado de sepse (FREDRIKSSON *et al.*, 2006; LANG, FROST, VARY, 2007). A perda de peso em humanos com elevado catabolismo, incluindo o câncer e a sepse é em torno de 10 a 15%, podendo chegar a 30% (FEARON, 1992). Em nosso modelo experimental a redução de peso foi de aproximadamente 20% $\pm$ 4%, após 48 horas da indução da sepse. Cabe salientar que a literatura apresenta diferentes doses e protocolos de endotoxemia, com resultados variados, principalmente em relação a taxa de sobrevivência (RITTIRSCH, HOESEL, WARD, 2007; NEZIC *et al.*, 2009). A avaliação da taxa de sobrevivência demonstrou que a dose de LPS utilizada promoveu baixa letalidade com indução do processo inflamatório, bem como de estresse oxidativo.

Um dos problemas bastante graves ocorridos na sepse, bem como em outros estados de elevado catabolismo é a menor disponibilidade do aminoácido mais abundante do organismo, a glutamina (ROTH *et al.*, 1982; KARINCH *et al.*, 2001; CRUZAT, TIRAPEGUI, 2009). No presente estudo CRUZAT, VF.

verificou-se que a endotoxemia promoveu redução tanto da disponibilidade de glutamina no plasma, quanto dos seus principais sítios de síntese no organismo, tais como músculos esqueléticos e fígado. O elevado processo inflamatório na endotoxemia, mediado pela elevação do TNF- α , prostaglandinas, glicorticóides (INOUE, BODE, SOUBA, 1994; KARINCH *et al.*, 2001) entre outros, invertem o papel do fígado, que deixa de ser um órgão predominantemente produtor de glutamina e passa a ser um tecido predominantemente consumidor deste aminoácido. Esta inversão de papéis ocorre pela participação intensa do fígado no metabolismo intermediário de aminoácidos e síntese de glicose para manutenção da glicemia e oferta destes substratos a outros tecidos, tais como o encéfalo (ROTH, OEHLER, 2010).

A menor disponibilidade de glutamina no organismo compromete o fornecimento de glutamato para a síntese do mais importante e em maior concentração antioxidante celular não enzimático do organismo, a γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina (GSH). Composto por resíduos de cisteína, ácido glutâmico e glicina, a GSH é encontrada em elevadas concentrações nas células, podendo reagir diretamente com as Espécies Reativas do Oxigênio (ERO) em reações não enzimáticas, bem como pode atuar como doadora de elétrons na redução de peróxidos catalisada pela enzima glutathione peroxidase (GPx) (MACDONALD, GALLEY, WEBSTER, 2003; CRUZAT *et al.*, 2007).

Na sepse, assim como em outros estados patológicos e catabólicos, um elevado estresse oxidativo pode ser observado, uma vez que ocorre desvio do estado redox intracelular (MACDONALD, GALLEY, WEBSTER, 2003). Este desvio é dado pela razão entre as concentrações intracelulares de dissulfeto de glutathione (GSSG) e GSH, isto é, da relação $[GSSG]/[GSH]$, no sentido da CRUZAT, VF.

redução de GSH e aumento das quantidades de GSSG (LI *et al.*, 1998; GALLEY, 2011). No presente estudo, a menor disponibilidade de glutamina no grupo LPS reduziu a capacidade de defesa antioxidante mediada pela GSH, promovendo estresse oxidativo, inferido pela elevada razão GSSG/GSH tanto em tecidos, tais como músculo e fígado, quanto em hemácias. Adicionalmente, a concentração de TBARS no grupo LPS foi superior à dos grupos controle e suplementados, indicando que houve aumento na formação de peróxidos lipídicos e, conseqüentemente, estresse oxidativo nestes tecidos.

Os resultados da suplementação por via oral com L-alanil-L-glutamina ou L-glutamina livre em conjunto com L-alanina nos grupos de animais endotoxêmicos demonstram que ambas as soluções nutricionais foram eficazes em manter a glutaminemia e a concentração de glutamina no músculo esquelético e fígado. Estes resultados estão de acordo com outros estudos em que a suplementação crônica por via oral manteve os estoques de glutamina nestes tecidos, seja de animais submetidos a exercícios físicos exaustivos (CRUZAT, TIRAPEGUI, 2009) ou inoculados com bactérias (ROGERO *et al.*, 2008). A suplementação oral aguda com L-glutamina na forma livre ou como dipeptídeo demonstra pico de aumento na concentração plasmática em média 30 minutos após a suplementação, retornando aos valores homeostáticos cerca de 120 minutos após (ROGERO *et al.*, 2002; ROGERO *et al.*, 2004). Uma vez que os animais foram mortos 180 minutos após a última suplementação, os efeitos observados no presente estudo refletem o efeito crônico das intervenções nutricionais. Ambas as suplementações com L-glutamina mantiveram a concentração plasmática de glutamina em animais endotoxêmicos, provavelmente em razão da manutenção dos estoques

musculares e hepáticos deste aminoácido. Uma vez que a concentração de glutamato permaneceu inalterada nos grupos endotoxêmicos e suplementados, a taxa de glutamina/glutamato no plasma e tecidos obrigou o equilíbrio da reação enzimática, mediada pela glutaminase (GLS) e o consumo de glutamato por meio da via do glutamato alfa-cetoglutarato, envolvendo a glutamato desidrogenase (GLUD1) e desviando o mesmo para a síntese de GSH nos tecidos metabolicamente ativos. Dentre estes tecidos se incluem o músculo esquelético e o fígado, como observado em outras alterações metabólicas que promovam elevado consumo de glutamina (Ex.: acidose em células corticais renais) (WELBOURNE *et al.*, 2001).

O estado redox das células está consequentemente relacionado com as concentrações de GSH, que, por sua vez, também são influenciadas pela disponibilidade de aminoácidos (ROTH *et al.*, 2002). A maior relação glutamina/glutamato reforça a disponibilidade de substratos para a GSH. Este mecanismo é dado pela observação do metabolismo da GSH em hemácias, células musculares e hepáticas, a qual apresentou disponibilidade comprometida nos animais endotoxêmicos e significativamente equilibrada em ambos os grupos suplementados, GLN+ALA-LPS e DIP-LPS. Além disso, a melhora do estado redox celular ($[GSSG]/[GSH]$) explica a atenuada peroxidação lipídica muscular e hepática, dada pela concentração de TBARS nestes tecidos dos grupos endotoxêmicos e suplementados tanto com L-alanil-L-glutamina, quanto com L-glutamina e L-alanina livres. A GSSG é enzimaticamente reconvertida a GSH pela enzima glutathione redutase (GSR), que utiliza NADPH como fonte de poder redutor. A GSH protege a membrana das células, mantendo a concentração de muitas proteínas e seus

grupamentos sulfidrilas (-SH) na forma reduzida, que são necessárias à homeostasia das células (VALENCIA, MARIN, HARDY, 2002; CRUZAT, TIRAPEGUI, 2012b). O expressivo aumento na concentração de GSH, promovido pelas suplementações (59-82% em relação ao grupo LPS) e a taxa de reconversão da GSSG à GSH promoveu o balanço do estado redox em hemácias. Uma vez que cada hemácia circula pelos tecidos corporais, o estado da GSH deve refletir o estado redox geral do organismo, o que implica que as suplementações com L-glutamina foram capazes de manter atenuada a razão GSSG/GSH em tecidos (SILVEIRA *et al.*, 2007).

Embora o presente estudo não permita elucidar os mecanismos pelos quais a L-glutamina e a L-alanina (livres ou como dipeptídeo) aumentam o conteúdo de GSH em hemácias de animais endotoxêmicos, é cientificamente verificado que em situações de extremo catabolismo, tais como estados hipoproteinêmicos, a atividade da GLS é aumentada, de forma a metabolizar o glutamato (AGARWAL *et al.*, 1981), fato que parece ser o caso dos animais endotoxêmicos. Adicionalmente, um estudo recente demonstrou que a glutamina plasmática, em conjunto com a alanina derivada do alfa-cetoglutarato são os substratos principais para o fornecimento de glutamato para a síntese de GSH em eritrócitos (WHILLIER *et al.*, 2011), uma vez que o glutamato é impermeável à membrana das células, eritrócitos tendem a equilibrar as concentrações de glutamina e alanina no plasma e em tecidos (FELIG, 1975).

A análise do eixo glutamina-glutationa no tecido muscular e hepático permite o estudo dos mecanismos envolvidos nos efeitos das suplementações com GLN+ALA e DIP. As suplementações reverteram a depleção dos estoques de glutamina promovidos pela endotoxemia (aproximadamente 50%).

CRUZAT, VF.

Considerando que a expressão de mRNA para a GLS foi cerca do dobro após a injeção com LPS, sem alteração no padrão de expressão da GLUD1, o metabolismo mitocondrial da glutamina deve ter sido desviado para o citosol, a fim de fornecer substratos para a defesa celular, baseada na GSH, a qual foi severamente comprometida pelo processo endotoxêmico. As suplementações também foram capazes de restaurar os estoques de GSH, mesmo na redução da expressão de mRNA da GLS (igual ao controle), sem alterar os níveis de mRNA da GLUD1, fato que leva a proposição de que a L-alanina (presente em ambos suplementos na mesma quantidade) pode ser o franco aminoácidos doador de glutamato para a GCLC, de forma a aumentar o conteúdo de GSH muscular. Isso é particularmente importante, uma vez que a GCLC e a GSR foram estimuladas nos grupos suplementados, permitindo ao tecido muscular sustentar elevada demanda de GSH, sob aumentados níveis de GPx.

Estudos com as mesmas formas de suplementações por via oral (CRUZAT, TIRAPEGUI, 2009; CRUZAT, ROGERO, TIRAPEGUI, 2010) indicam que a adição de L-alanina livre à solução pode elevar sua concentração no plasma rapidamente, uma vez que seu transporte através da célula epitelial intestinal ocorre de forma preferencial pelos transportadores A, ASC, PAT e Y⁺L (BROER, 2008; GILBERT, WONG, WEBB, 2008). Ao avaliar o transporte de L-alanina em células do epitélio intestinal, evidências experimentais verificaram que sua absorção pode ser reduzida quando em conjunto com alguns aminoácidos neutros, contudo, dentre estes aminoácidos não estava incluída a L-glutamina (SIGRIST-NELSON, MURER, HOPFER, 1975). A forma em que a L-glutamina é oferecida por via oral é um fator importante a ser considerado no aumento da disponibilidade de glutamina

corporal, entretanto, a presença do aminoácido L-alanina contribui, de alguma forma, para o efeito do dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (CRUZAT, TIRAPEGUI, 2009; CRUZAT, ROGERO, TIRAPEGUI, 2010). Recentemente, um estudo verificou esta hipótese, onde indivíduos foram submetidos a suplementação com L-glutamina na forma livre, como dipeptídeo (L-alanil-L-glutamina) ou L-glutamina associadas a outra fonte proteica, tal como proteína do glúten. Os resultados demonstraram que tanto a L-alanil-L-glutamina, quanto a L-glutamina associada a proteína do glúten foram eficazes em elevar a glutaminemia, não havendo diferença entre estes grupos, contudo ambos promoveram uma resposta significativamente superior, quando comparados a L-glutamina isolada (HARRIS *et al.*, 2012).

A preferência pela utilização de dipeptídeos de glutamina, tais como a L-alanil-L-glutamina se devem ao fato que esta pode promover aumento estequiométrico dos aminoácidos glutamina e alanina no plasma (KLASSEN *et al.*, 2000). Enterócitos apresentam eficientes mecanismos de absorção de dipeptídeos, o que inclui principalmente o PepT-1. Dependente de H^+ , o PepT-1 possui ampla especificidade por substratos e transporta de forma ativa dipeptídeos e tripeptídeos pelo intestino de humanos e animais (FEI *et al.*, 1994). A presença do PepT-1 representa a principal via de absorção dos produtos finais da digestão de proteínas, permitindo que dipeptídeos sejam transportados da mucosa intestinal, que apresenta muito pouca ou nenhuma atividade de hidrolases contra peptídeos (5% a 12% da atividade total), para o citosol, onde as peptidases apresentam uma elevada atividade (80% a 95% da atividade celular total) (YANG, DANTZIG, PIDGEON, 1999; ADIBI, 2003).

Na membrana basolateral encontra-se outro transportador de pequenos peptídeos dependente de sódio (Na^+), responsável pelo transporte dos peptídeos até a corrente sanguínea (ADIBI, 2003). Em situações catabólicas, entretanto, como na presença de LPS de bactérias ocorre redução na expressão do mRNA do Pept-1, fato que altera a capacidade absorptiva dos enterócitos (SHU *et al.*, 2002; GILBERT, WONG, WEBB, 2008). Nesse sentido, no presente modelo experimental de endotoxemia diferentes transportes epiteliais intestinais podem estar envolvidos, tais como o transporte transcelular por endocitose (Ex.: proteína clatrina) ou transporte paracelular (GARDNER, 1975; BROER, 2008). Estes mecanismos explicariam os efeitos encontrados nos grupos endotoxêmicos e suplementados tanto com L-alanil-L-glutamina, quanto L-glutamina e L-alanina livres. Adicionalmente, a expressão de mRNAs do gene que regula os transportadores de aminoácidos dependentes de Na^+ (SLC38A2) demonstrou aumento no músculo esquelético e fígado dos animais suplementados, o que indica que houve uma *upregulation* deste gene pelas intervenções nutricionais. Isso reforça o aumento da capacidade, tanto musculares, quanto hepáticas em captar a maior oferta de glutamina e até de outros aminoácidos do metabolismo intermediário, incluindo a arginina, a citrulina e a ornitina (TOMLINSON *et al.*, 2011).

Ao mesmo tempo, a alteração metabólica promovida por ambas suplementações pode atenuar o consumo de glicose através do desvio da pentose-6-fosfato, permitindo que a glicose seja utilizada na glicólise e produção de ATP, em vez de produzir NADPH para reduzir o excesso de GSSG, formado em situações de estresse oxidativo (Ex.: indução de endotoxemia). O resultado destas alterações promovidas pelas

CRUZAT, VF.

suplementações permite que a disponibilidade de glutamina possa ser mantida no sistema circulatório, de forma a ser consumida por células do sistema imune (linfócitos, neutrófilos e macrófagos). De fato, a maior oferta dos aminoácidos L-glutamina e L-alanina aumentaram a capacidade de proliferação de linfócitos, tanto totais, quanto diferenciados em B e T no presente estudo.

Análises hepáticas revelaram que a endotoxemia promoveu redução de aproximadamente 50% na concentração de glutamina. Este efeito foi acompanhado pelo aumento concomitante na expressão de mRNAs da GLS e GLUD1, sugerindo que no fígado a glutamina pode ter sido rapidamente convertida em glutamato para ser utilizada na síntese de GSH citosólica e alfa-cetoglutarato dentro das mitocôndrias. Este mecanismo pode ser bastante vantajoso, uma vez que a NADP⁺-dependente de GLUD1 pode produzir NADPH dentro das mitocôndrias, fornecendo substrato para reações de redução dependentes de GPx. A atividade de diversas enzimas, incluindo a própria GPx, é determinada pela taxa de substratos, que são também modulados pela concentração de GSSG e GSH (VALENCIA, MARIN, HARDY, 2001). Os efeitos promovidos pelas suplementações tanto no fígado quanto no musculo esquelético, apresentados neste estudo demonstram um efeito positivo na pressão do eixo glutamina-glutationa (forçando o $\Delta G < 0$ para a utilização de glutamina e glutamato), o qual tem impacto favorável nos níveis de GSH e estresse oxidativo por todo o organismo.

Embora análises proteicas e ensaios enzimáticos sejam necessários para confirmar os presentes dados e mecanismos, a análise da expressão de mRNAs sugere a possibilidade destas vias, uma vez que os níveis de mRNA de enzimas demonstram intrínseca associação com a tradução da proteína e CRUZAT, VF.

função *per se* (BRASSE-LAGNEL, LAVOINNE, HUSSON, 2009). Esta relação entre a expressão de mRNA e a tradução proteica também pode ser observada no presente estudo com relação a família das HSPs e disparo da via do NF- κ B.

O estresse oxidativo promovido pelo desequilíbrio entre a síntese e a remoção de ERO estimula vias inflamatórias e consequentemente aumento do processo inflamatório sistêmico (MCMILLAN, QUADRILATERO, 2011). Além disso, endotoxinas tais como o LPS atuam diretamente na superfície de membranas de macrófagos, células endoteliais e sistemas complemento, causando a liberação de citocinas, incluindo o TNF- α , a IL-6, a IL-1 β e a IL-10 (BAPTISTE, 2007). Cabe salientar que se secretada por células musculares, a IL-6 em modelos de exercício físico pode desempenhar um papel mais restaurativo do que pró-inflamatório, também atuando possivelmente como sensor energético das células em situações de elevado catabolismo (KRAUSE *et al.*, 2012; PEDERSEN, 2012). Porém, em doenças tais como na sepse é possível que a IL-6 exerça um papel pró-inflamatório (BORGE *et al.*, 2009). Outro papel desempenhado pela IL-6 e IL-10 envolve a proliferação de linfócitos, principalmente B (BAPTISTE, 2007), fato também observado no presente estudo.

Independentemente do papel da IL-6, sua elevada concentração no sistema circulatório, associada a outras citocinas indicam elevado processo inflamatório e este é correlacionado com a severidade da sepse, tanto em modelos animais de endotoxemia, quanto em pacientes humanos (COHEN, 2002; NATHAN, 2002; BENJAMIM, HOGABOAM, KUNKEL, 2004; RITTIRSCH, HOESEL, WARD, 2007). A elevada e descontrolada resposta inflamatória

promovida pelo organismo, somada à infecção levam o indivíduo a apresentar falência múltipla de órgãos (DELLINGER *et al.*, 2008).

De acordo com os resultados do presente estudo, verificou-se que a endotoxemia promoveu elevado efeito inflamatório, disparando a síntese e a liberação de TNF- α , IL-1 β , IL-10 e IL-6. O principal mecanismo envolvido com esta sinalização envolve a ativação do NF- κ B (BAPTISTE, 2007). Após a ligação a receptores de membrana, como o receptor semelhante ao *Toll* do tipo 4 (TLR4) ou o complexo de domínio 14 (CD14), o NF- κ B é ativado por uma série de fosforilações na família de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (WRIGHT, 1995; LIEN, INGALLS, 2002). Quando fosforilados, tanto em resíduos de treonina quanto de serina, os membros da família da MAPK, incluindo a C-Jun N terminal quinase (JNK) e a p38 ativam o NF- κ B, localizado na matriz extracelular.

O NF- κ B é um fator de transcrição nuclear que repousa em sua forma inativa no citossol, associado a proteínas inibitórias, conhecidas como I κ Bs (LI, VERMA, 2002). Em sua forma ativa, o NF- κ B promove o disparo da transcrição de genes que exercem função essencial no controle de processos apoptóticos e respostas imunológicas tanto a inata quanto a adaptativa (LI, VERMA, 2002). Estímulos celulares, os quais incluem ERO e citocinas pró-inflamatórias promovem a fosforilação e a ubiquitinação dos I κ B's, principalmente do I κ B- α , que posteriormente pode ser degradado pelo proteossoma 26S (ZAMANIAN-DARYOUSH *et al.*, 2000). A análise muscular da expressão do gene NF κ B α , que regula a síntese do I κ B α demonstra que o grupo LPS apresentou menor expressão quando comparado aos grupos controle e suplementados, fato que se correlaciona com o maior perfil inflamatório e estresse oxidativo do mesmo.

CRUZAT, VF.

Na ausência de seus inibidores, o NF- κ B torna-se ativo e pode se translocar para o núcleo da célula onde se liga à região regulatória de vários genes envolvidos com a inflamação, apoptose e divisão celular. Adicionalmente, o grupo LPS apresentou maior concentração do NF- κ B *p65* e maior fosforilação dos I κ B α/β , o que indica um maior potencial inflamatório quando comparado aos demais grupos do estudo.

Genes envolvidos com a resposta viral ou microbiana, imunorreceptores, moléculas de adesão, citocinas, fatores de crescimento, proteínas de fase aguda e proteínas antiapoptóticas, entre outros, são influenciados pelo NF- κ B (REID, LI, 2001; SILVEIRA *et al.*, 2007). A atividade do NF- κ B está frequentemente associada a doenças, as quais incluem a artrite reumatóide, esclerodermas, caquexia, sepse e câncer (ZHANG *et al.*, 2000; LI, VERMA, 2002). Alguns genes influenciados pela via do NF- κ B incluem o fator de diferenciação mielóide (MyD88), a quinase associada ao receptor de interleucina 1 (IRAK1) e o próprio gene do NF- κ B (NF κ B1) todos envolvidos com a resposta inflamatória e apresentando elevados níveis pela indução da endotoxemia. No tecido muscular, a expressão de mRNAs destes genes foi revertida pelas suplementações, fato que atenua a exacerbada e cíclica resposta inflamatória ocorrida na sepse (BREALEY *et al.*, 2002). A via do NF- κ B e MyD88 foi analisada em estudo similar, o qual encontrou a mesma relação inflamatória, porém em células renais (HU *et al.*, 2012).

O elevado estresse oxidativo produzido em situações de elevado catabolismo, o que inclui a endotoxemia promove diversos efeitos que culminam em estímulos pró-apoptóticos. As ERO tanto radicalares quanto não radicalares sequestram elétrons de minerais, membranas fosfolipídicas, CRUZAT, VF.

proteínas, entre outros compostos importantes para a homeostasia celular (GALLEY, 2011). A célula na tentativa de recuperar suas funções e se proteger dos efeitos danosos das ERO elevam a síntese das proteínas de choque térmico (HSPs). As HSPs são proteínas com funções reparadoras, também chamadas de chaperonas (HECK, SCHOLER, BITTENCOURT, 2011).

No presente estudo, o grupo LPS apresentou aumento da expressão da HSP-90, HSP-70 e HSP27 no músculo esquelético, uma vez que o mRNA destas proteínas estava aumentado (HSPA1A e HSPA1B). Esse efeito se correlaciona com o elevado estresse oxidativo e perfil inflamatório encontrados nos animais endotoxêmicos. A expressão do mRNA do fator transcricional de choque térmico-1 (HSF-1) corresponde a um dos mecanismos reguladores da capacidade da célula em ativar as HSPs em resposta a vários tipos de estresse (GABAI, SHERMAN, 2002). A endotoxemia no grupo LPS promoveu aumento da expressão do gene do HSF-1, fato que estimulou a expressão tanto dos genes reguladores das HSPs (HSPA1A e HSPA1B), quanto a expressão proteica das mesmas.

O HSF-1 é um fator transcricional encontrado na sua forma inativa, ou seja, não ligado ao DNA. A ativação do HSF-1 se dá por meio de uma variedade de estímulos de estresse que desencadeiam a fosforilação de monômeros latentes inativos deste fator transcricional, encontrados no citoplasma da célula. Quando fosforilados, estes monômeros se combinam, convertendo-se em um oligômero homotrímero (WISCHMEYER, 2008). Os homotrímeros do HSF-1, ao serem ativados, se translocam para o núcleo da célula e se ligam a locais específicos da região promotora dos genes das HSPs, denominados elementos de choque térmico (HSEs) (CRUZAT, PETRY, CRUZAT, VF.

TIRAPEGUI, 2009). Este mecanismo permite que sinais específicos iniciem o processo de síntese, transcrição e tradução do mRNA das HSPs (AHN, THIELE, 2003).

A menor ativação de vias de sinalização intracelular, tais como a do NF- κ B também têm sido indicadas como mecanismos envolvidos na proteção anti-apoptótica desempenhada pelas HSPs (YOO, LEE, LEE, 2000). Os mecanismos de ativação do NF- κ B são dependentes do estado redox celular (WERNERMAN, HAMMARQVIST, 1999). Como já mencionado, a GSH é influenciada pela disponibilidade de glutamina e glutamato intracelular (CRUZAT *et al.*, 2007). Nesse sentido, a ativação do NF- κ B pode ser modulada pela glutamina (LIBONI, SCUMPIA, NEU, 2005; SINGLETON, BECKEY, WISCHMEYER, 2005). Em animais sépticos, a maior disponibilidade de glutamina atenuou a ativação da via do NF- κ B, por meio da inibição da fosforilação e posterior degradação de sua proteína inibidora, o I κ B- α (SINGLETON, BECKEY, WISCHMEYER, 2005).

Estudos demonstram que a administração com glutamina promove aumento dose dependente da expressão da HSP-70, por exemplo, fato que inibe a ativação do NF- κ B (SINGLETON, BECKEY, WISCHMEYER, 2005; SINGLETON, WISCHMEYER, 2007). Entretanto, em nosso estudo a expressão de HSPs (mRNA e proteína) não foi aumentada pela maior disponibilidade de glutamina, promovida pelas suplementações. Isso se deve ao desvio metabólico da glutamina para a síntese de GSH. A maior proteção celular promovida pelas suplementações na endotoxemia, mediada pela GSH, manteve baixa a síntese de HSPs e, provavelmente, a sua menor exportação para o plasma sanguíneo. Quando produzidas e mantidas no meio intracelular

CRUZAT, VF.

as HSPs estão relacionadas a tentativa da célula em reparar e restaurar a homeostasia perdida. Entretanto, sob condições de elevado catabolismo, como na hipertermia e na sepse, a elevada síntese de HSPs obriga a célula a exportar estas proteínas para o plasma sanguíneo, provavelmente por meio de difusão entre a bicamada fosfolipídica, após ligação com fosfatidil serina citosólica (VEGA *et al.*, 2008). O aumento da concentração de HSPs no plasma tem sido fortemente correlacionado a uma depressão dos sinais de saúde, levando o indivíduo séptico ao óbito (GELAIN *et al.*, 2011).

A quantidade de massa muscular é fator essencial na manutenção da qualidade de vida e longevidade. Em resposta a estímulos químicos e mecânicos, células apresentam expressão de mRNAs, níveis proteicos e homeostasia alteradas (LLOVERA *et al.*, 1997; HEINEMEIER *et al.*, 2009). Em diversas situações catabólicas, tais como sepse, caquexia, câncer, diabetes e insuficiência renal, o equilíbrio dos processos anabólicos e catabólicos não são mantidos, o que resulta em balanço nitrogenado negativo, o que inclui a redução da massa muscular (TISDALE, 2005; HU *et al.*, 2012). Em alguns tipos de câncer, por exemplo, a redução no peso corporal, que pode ser de aproximadamente 30%, é, na sua maioria (75%), consequência da perda de massa muscular, situação que contribui para uma maior morbidade do paciente (FEARON, 1992). Além disso, a diminuição da quantidade de massa muscular contribui para a redução na mobilidade corporal, com consequente desenvolvimento de atrofia muscular (DU, HU, MITCH, 2005). No presente estudo a análise da carcaça não revelou redução de massa muscular nos animais endotoxêmicos, embora os animais tenham apresentado redução no peso corporal. Nesse sentido, acreditamos provavelmente ocorreu perda de

CRUZAT, VF.

massa muscular, contudo, a técnica de análise não foi suficientemente precisa para detectar alterações significativas.

A redução na quantidade de proteínas contráteis pode ocorrer tanto pelo aumento na sua taxa de degradação quanto pela redução na sua taxa de síntese (TISDALE, 2005). No presente estudo, levantamos a hipótese de que a maior concentração de glutamina no tecido muscular, decorrente da suplementação com L-glutamina seja na forma livre ou como dipeptídeo, durante a endotoxemia, pudesse atenuar a ativação de vias que culminam em redução da massa muscular. Considerando-se que o estado redox intracelular ($[GSSG]/[GSH]$) regula a atividade dos fatores NF- κ B e que a síntese *de novo* de GSH (γ -glu-cis-gli) depende da disponibilidade intracelular de glutamato, o fornecimento de glutamina para sua posterior conversão em glutamato é decisivo para a manutenção do estado redox muscular e, conseqüentemente, para o balanço entre proteólise e síntese proteica.

Dentre as proteínas da família “*Forkhead box*” (FOXO), a FOXO3A recebe maior atenção devido a sua expressão estar aumentada em várias condições patológicas (GREER, BRUNET, 2005). Em sua forma inativa, quando o fator de transcrição FOXO3A está fosforilado, este encontra-se ligado à proteína 14-3-3 no citoplasma de células. Estímulos proteolíticos induzidos, por exemplo, por citocinas ou ERO fazem com que a FOXO3A seja desfosforilada, desligando-se do complexo proteico 14-3-3, o que a torna ativa e permite sua translocação para o núcleo celular. Este processo estimula a degradação de proteínas, dentre as quais miofibrilares (CROSSLAND *et al.*, 2008). As caspases, principalmente a 1 e 3 são responsáveis em grande parte por processo de degradação proteica sendo essenciais na apoptose celular

(TISDALE, 2005). De acordo com os resultados do presente estudo, a endotoxemia promoveu elevada expressão de mRNAs musculares tanto das caspases quanto da FOXO3A, bem como do tripartite contendo-motif 63 (TRIM63), uma E3 ligase que ao se ligar a proteínas no citosol leva a sua degradação no proteassoma 26S (ELEY, TISDALE, 2007). Uma das proteínas influenciadas pela atividade do proteassoma 26S são os I κ B α / β do complexo NF- κ B, fato que estaria relacionado a elevada ativação inflamatória observada no grupo LPS (TISDALE, 2005). Contudo, ambas as suplementações nutricionais não foram capazes de atenuar os elevados níveis de mRNAs de degradação proteica no músculo esquelético.

Em situações de elevado catabolismo muscular, tão importante quanto atenuar os mecanismos de degradação proteica, são os mecanismos envolvidos na estimulação da síntese de novas proteínas (ELEY, TISDALE, 2007). Um dos genes importantes para a síntese proteica é o gene da proteína ligante do fator de iniciação eucariótico 4E (Eif4Ebp), o qual inibe que seu fator, o Eif4E, se ligue ao Eif4G e ao mRNA, que em última reação não é traduzido por ribossomos (PROUD, 2005).

Em nosso estudo, observamos que não houve diferença estatística entre os grupos suplementados e o grupo LPS na expressão de mRNAs que são traduzidos no Eif4Ebp (Eif4Ebp1). Os grupos suplementados endotoxêmicos, sejam eles suplementados ou não com L-glutamina apresentaram maior expressão deste gene, se comparado ao grupo controle do estudo. Adicionalmente, o gene do próprio Eif4E e da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), uma proteína de essencial controle da síntese proteica (CROSSLAND *et al.*, 2008) apresentou menor expressão tanto no grupo LPS, CRUZAT, VF.

quanto dos suplementados GLN+ALA-LPS e DIP-LPS, o que indica inibição da síntese proteica muscular. Este conjunto de resultados de expressão de mRNAs pode contribuir para o catabolismo muscular e processo inflamatório da sepse.

Alternativamente, no fígado, o padrão de expressão de mRNAs relacionados a síntese e degradação proteica foi modificado pelas intervenções nutricionais de maneira a estimular a síntese e atenuar a degradação. Em estudo recente foi verificado efeito similar da glutamina em células renais de camundongos em estado de sepse por ligação e perfuração do ceco (CLP) (HU *et al.*, 2012). A expressão de mRNAs de outros genes, tais como o GLUD1 e a GSR também se apresentaram diferentes no tecido hepático, quando comparado a mesma expressão no músculo esquelético. É possível que o motivo desta diferença esteja no fato do fígado participar de forma mais importante no metabolismo intermediário de aminoácidos (NEWSHOLME *et al.*, 2003a), fato que envolveria um padrão de resposta alternativo, quando comparado ao tecido muscular.

Os mecanismos envolvidos com diferentes respostas orgânicas às suplementações ainda devem ser mais bem elucidados. Apesar disso, de acordo com as evidências experimentais apresentadas em nosso estudo, é possível verificar um importante efeito das suplementações nutricionais, feitas de forma oral, sobre as vias de síntese e degradação proteica hepática, bem como sobre prováveis diferentes destinos da glutamina em órgãos importantes para a manutenção da homeostasia, tais como o fígado. Este efeito no tecido hepático pode ter relação com a menor concentração de citocinas plasmáticas e o metabolismo intermediário de aminoácidos, favorecendo, por exemplo, o CRUZAT, VF.

sistema antioxidante, mediado pela GSH, auxiliando o organismo a tentar recuperar a homeostasia perdida na complicada patogênese que envolve a sepse.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra que a suplementação por via oral com L-glutamina e L-alanina na forma livre ou como dipeptídeo, L-alanil-L-glutamina pode ser clinicamente utilizada em estados de sepse, tais como a indução por LPS, promovendo resultados favoráveis em pacientes com redução da disponibilidade de glutamina, a qual é um dos fatores mais graves nesta patologia e representa fator de risco independente para a mortalidade em UTIs. Desde que possíveis ambas as suplementações por via oral são mais fisiológicas que fórmulas parenterais, contudo, uma notável diferença entre as suplementações é o custo das mesmas, onde misturas de L-glutamina e L-alanina na forma livre são muito menos dispendiosas que a sua quantidade equivalente como dipeptídeo, L-alanil-L-glutamina, fato que tem impacto clínico nos sistemas de saúde pública em todo o mundo.

8. REFERÊNCIAS

ADIBI, S.A. Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) in health and disease. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.285, p.G779-G788, 2003.

ADIBI, S.A.; SCHENKER, S.; MORSE, E. Mechanism of clearance and transfer of dipeptides by perfused human placenta. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v. 271, p. E535-E540, 1996.

AGARWAL, K.N.; BHATIA, B.D.; BATTAL, R.K.; SINGLA, P.N.; SHANKAR, R. Erythrocytic enzymes and amino acids related to glutamic acid metabolism in childhood hypoproteinemic states. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.34, p.924-927, 1981.

AHN, S.G.; THIELE, D. Redox regulation of mammalian heat shock 1 is essential for HSP gene activation and protection from stress. **Genes & Development**, v.17, p.516-528, 2003.

AKERBOOM T.P.M.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods Enzymology**, v.77, p.373-382, 1981.

ANDREASEN, A.S.; PEDERSON-SKOVSGAARD, T.; MORTENSEN, O.H.; VAH HALL, G.; MOSELEY, P.L.; PEDERSEN, B.K. The effect of glutamine infusion on the inflammatory response and HSP70 during human experimental endotoxaemia. **Critical Care**, v.13, p.R7-R14, 2009.

ANGUS, D.C.; LINDE-ZWIRBLE, W.T.; LIDICKER, J.; CLERMONT, G.; CARCILLO, J.; PINSKY, M.R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical Care Medicine**, v.29, p.1303-1310, 2001.

ARDAWI, M.S.M.; NEWSHOLME, E.A. Fuel utilization in colonocytes of the rat **Biochemistry Journal**, v.231, p.713-719, 1985.

CRUZAT, VF.

ARDAWI, M.S.M.; NEWSHOLME, E.A. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. **Biochemistry Journal**, v.212, p.835-842, 1983.

ARDAWI, M.S.M.; NEWSHOLME, E.A. Maximum activities of some enzymes of glycolysis, the tricarboxylic acid cycle and ketone-body and glutamine utilization pathways in lymphocytes of the rat. **Biochemistry Journal**, v.208, p.743-748, 1982.

AUSTGEN, T.R.; CHAKRABARTI, R.; CHEN, M.K.; SOUBA, W.W. Adaptive regulation in skeletal muscle glutamine metabolism in endotoxin-treated rats. **Journal of Trauma**, v.32, p.600-607, 1992.

AUSTGEN, T.R.; CHEN, M.K.; DUDRICK, P.S.; COPELAND, E.M.; SOUBA, W.W. Cytokine regulation of intestinal glutamine utilization. **American Journal of Surgery**, v.163, p.174-180, 1991a.

AUSTGEN, T.R.; CHEN, M.K.; MOORE, W.; SOUBA, W.W. Endotoxin and renal glutamine metabolism. **Archives of Surgery**, v.126, p.23-27, 1991b.

BAIRD, F.E.; BEATTIE, K.J.; HYDE, A.R.; GANAPATHY, V.; RENNIE, M.J.; TAYLOR, P.M. Bidirectional substrate fluxes through the System N (SNAT5) glutamine transporter may determine net glutamine flux in rat liver. **Journal of Physiology**, v.559, p.367-381, 2004.

BAPTISTE, E.J. Cellular mechanisms in sepsis. **Journal of Intensive Care Medicine**, v.22, p.63-72, 2007.

BARON, R.M.; BARON, M.J.; PERRELLA, M.A. Pathobiology of sepsis. are we still asking the same questions? **American Journal Respiratory Cell Molecular Biology**, v.34. p.129-134, 2006.

BENJAMIM, C.F.; HOGABOAM, C.M.; KUNKEL, S.L. The chronic consequences of severe sepsis. **Journal of Leukocyte Biology**, v.75, p.408-412, 2004.

CRUZAT, VF.

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

BITTENCOURT, P.I.H.JR.; PERES, C.M.; YANO, M.M.; HIRATA, M.H.; CURI, R. Pyruvate is a lipid precursor for rat lymphocytes in culture. Evidence for a lipid exporting capacity. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v.30, p.631-641, 1993.

BITTENCOURT, P.I.H.JR.; YANO, M.M.; HIRATA, M.H.; WILLIAMS, J.F.; CURI, R. Evidence that prostaglandins modulate lipogenesis in cultured lymphocytes - a comparison with its effect on macrophages and tumor cells. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v.33, p.463-475, 1994.

BODE, B.P. Recent molecular advances in mammalian glutamine transport. **Journal of Nutrition**, v.131, p.2475S-2485S, 2001.

BOELEN, P.G.; MELIS, G.C.; VAN LEEUWEN, P.A.; TEM HAVE, G.A.; DEUTZ, N.E. Route of administration (enteral or parenteral) affects the contribution of L-glutamine to de novo l-arginine synthesis in mice: a stable-isotope study. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v.291, p.E683-E690, 2006.

BONE, R.C.; BALK, R.A.; CERRA, FB.; DELLINGER, R.P.; FEIN, A.M.; KNAUS, W.A.; SCHEIN, R. M.; SIBBALD, W.J. Definitions for Sepsis and organ failure and Guidelines for the use of innovative therapies in Sepsis. **Chest**, v.101, p.1644-1655, 1992.

BORGE, B.A.; KALLAND, K.H.; OLSEN, S.; BLETSA, A.; BERGGREEN, E.; WIIG, H. Cytokines are produced locally by myocytes in rat skeletal muscle during endotoxemia. **American Journal of Physiology: Heart Circulation Physiology**, v.296, p.H735-H744, 2009.

CRUZAT, VF.

BOYUM, A.; FJERDINGSTAD, H.B.; MARTINSEN, I.; LEA, T.; LOVHAUG, D. Separation of human lymphocytes from citrated blood by density gradient (Nycoprep) centrifugation: monocyte depletion depending upon activation of membrane potassium channels. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.56, p.76-84, 2002.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRANDSCH, M.; KNÜTTER, I.; DOENECKE, E.B. Pharmaceutical and pharmacological importance of peptide transporters. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.60, p.543-585, 2008.

BRASSE-LAGNEL, C.; LAVOINNE, A.; HUSSON, A. Control of mammalian gene expression by amino acids, especially glutamine. **FEBS Journal**, v.276, p.1826-1844, 2009.

BREALEY, D.; BRAND, M.; HARGREAVES, I.; HEALES, S.; LAND, J.; SMOLENSKI, R.; DAVIES, N.A.; COOPER, C.E.; SINGER, M. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. **Lancet**, v.360, p. 219-223, 2002.

BROER, S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. **Physiological Reviews**, v.88, p.249-286, 2008.

BROWN, S.A.; GORINGE, A.; FEGAN, C.; DAVIES, S.V.; GIDDINGS, J.; WHITTAKER, J.A.; BURNETT, A.K.; POYNTON, C.H. Parenteral glutamine protects hepatic function during bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, v.22, p.281-284, 1998.

CASPARY, W.F. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.55, p.299S-308S, 1992.

CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Campinas: Unicamp, 1999.

CRUZAT, VF.

CHAKRABARTI, R.; MCCracken JR., J.B.; CHAKRABARTI, D.; SOUBA, W.W. Detection of a functional promoter/enhancer in an intron-less human gene encoding a glutamine synthetase-like enzyme. **Gene**, v.153, p.163-199, 1995.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v.420, p.885-891, 2002.

CONSTANTIN, D.; MCCULLOUGH, J.; MAHAJAN, R.P.; GREENHAFF, P.L. Novel events in the molecular regulation of muscle mass in critically ill patients. **Journal of Physiology**, v.589, p.3883-3895, 2011.

CORLESS, M.; KIELY, A.; MCCLENAGHAN, N.H.; FLATT, P.R.; NEWSHOLME, P. Glutamine regulates expression of key transcription factor, signal transduction, metabolic gene, and protein expression in a clonal pancreatic β -cell line. **Journal of Endocrinology**, v.190, p. 719-727, 2006.

CORNELL, T.T.; WYNN, J.; SHANLEY, T.P.; WHEELER, D.S.; WONG, H.R. Mechanisms and regulation of the gene-expression response to sepsis. **Pediatrics**, v.125, p.1248-1258, 2010.

CROSSLAND, H.; CONSTANTIN-TEODOSIU, D.; GARDINER, S.M.; CONSTANTIN D.; GREENHALF P. L. A potential role for Akt/FOXO signaling in both protein loss and the impairment of muscle carbohydrate oxidation during sepsis in rodent skeletal muscle. **Journal of Physiology**, v.586, p.5589-5600, 2008.

CRUZAT, V.F.; PETRY, E.R.; TIRAPEGUI, J. Glutamina: aspectos bioquímicos, metabólicos, moleculares e suplementação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.15, p.392-397, 2009.

CRUZAT, V.F.; ROGERO, M.M.; BORGES, M.C.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, p. 336-342, 2007.

CRUZAT, VF.

CRUZAT, V.F.; ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J. Effects of supplementation with free glutamine and the dipeptide alanyl-glutamine on parameters of muscle damage and inflammation in rats submitted to prolonged exercise. **Journal of Cell Biochemistry and Function**, v.28, p.24-30, 2010.

CRUZAT, V.F.; TIRAPEGUI, J. Effects of oral supplementation with glutamine and alanyl-glutamine on glutamine, glutamate, and glutathione status in trained rats and subjected to long-duration exercise. **Nutrition**, v.25, p.428-435, 2009.

CRUZAT, V.F.; TIRAPEGUI, J. Estresse oxidativo e alimentação. In: **Nutrição: fundamentos e aspectos atuais**. São Paulo: Atheneu, 2012a. No prelo.

CRUZAT, V.F.; TIRAPEGUI, J. Estresse oxidativo na atividade física. In: **Nutrição, metabolismo e suplementação na atividade física**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2012b. p.291-309.

CURI, R. **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.

DÉCHELOTTE, P.; DARMAUN, D.; RONGIER, M.; HECKETSWEILER, B.; RIGAL, O.; DESJEUX, J. Absorption and metabolic effects of enterally administered glutamine in humans. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.260, p.G677-G682, 1991.

DÉCHELOTTE, P.; HASSELMANN, M.; CYNOBER, L.; ALLAOUCHICHE, B.; COEFFIER, M.; HECKETSWEILER, B.; MERLE, V.; MAZEROLLES, M.; SAMBA, D.; GUILLOU, Y.M.; PETIT, J.; MANSOOR, O.; COLAS, G.; COHENDY, R.; BARNOUD, D.; CZERNICHOW, P.; BLEICHNER G. L-alanyl-L-glutamine dipeptide-supplemented total parenteral nutrition reduces infectious complications and glucose intolerance in critically ill patients: the French controlled, randomized, double-blind, multicenter study. **Critical Care Medicine**, v.34, p.598-604, 2006.

DELLINGER, R.P.; LEVY, M.M.; CARLET, J.M.; BION, J.; PARKER, M.M.; JAESCHKE, R.; REINHART, K.; ANGUS, D.C.; BRUN-BUISSON, C.; BEALE, R.; CALANDRA, T.; DHAINAUT, J.F.; GERLACH, H.; HARVEY, M.; MARINI, J.J.; MARSHALL, J.; RANIERI, M.; RAMSAY, G.; SEVRANSKY, J.; THOMPSON, B.T.; TOWNSEND, S.; VENDER, J.S.; ZIMMERMAN, J.L. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. **Intensive Care Medicine**, v.34, p.17-60, 2008.

DRAPER, H.H.; SQUIRES, E.J.; MAHMOODI, H.; WU, J.; AGARWAL, S.; HADLEY, M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radical Biology and Medicine**, v.15, p.353-363, 1993.

D'SOUZA, R.; TUCK, J.P. Glutamine supplements in the critically ill. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v.97, p.425-427, 2004.

DU, J.; HU, Z.; MITCH, W. E. Molecular mechanisms activating muscle protein degradation in chronic kidney disease and other catabolic conditions. **European Journal of Clinical Investigation**, v.35, p.157-163, 2005.

EAGLE, H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. **Science**, v.130, p.432-437, 1959.

EAGLE, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue cultures. **Science**, v.122, p.501-504, 1955.

CRUZAT, VF.

EAGLE, H.; OYAMA, V.I.; LEVY, M.; HORTON, C.L.; FLEISCHMAN, R. The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-Glutamic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v.218, p.607-616, 1956.

ELEY, H.L.; TISDALE, M. Skeletal muscle atrophy, a link between depression of protein synthesis and increase in degradation. **Journal of Biological Chemistry**, v.282, p.7087-7097, 2007.

FEARON, K.C.H. The mechanisms and treatment of weight loss in cancer. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.51, p.251-265, 1992.

FEI, Y.J.; KANAI, Y.; NUSSBERGER, S. GANAPATHY, V.; LEIBACH, F.H.; ROMERO, M.F.; SINGH, S.K.; BORON, W.F.; HEDIGER, M.A. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. **Nature**, v.398, p.563-566, 1994.

FELIG, P. Amino acid metabolism in man. **Annual Review of Biochemistry**, v.44, p.933-955, 1975.

FISCHER, C.; BODE, B.P.; TAKAHASHI, T.; TANABE, K.; SOUBA, W.W. Glucocorticoid-induction of IL-6 receptor expression in human hepatocytes facilitates IL-6 stimulation of amino acid transport. **Annals of Surgery**, v.223, p.610-619, 1996.

FLÄRING, U.B.; ROOYACKERS, O.E.; WERNERMAN, J.; HAMMARQVIST, F. Glutamine attenuates post-traumatic glutathione depletion in human muscle. **Clinical Science**, v.104, p.275-282, 2003.

FREDRIKSSON, K.; HAMMARQVIST, F.; STRIGARD, K.; HULTENBY, K.; LJUNGQVIST, O.; WERNERMAN, J.; ROOYACKERS, O. Derangements in mitochondrial metabolism in intercostal and leg muscle of critically ill patients with sepsis induced multiple organ failure. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v.291, p.E1044-E1050, 2006.

CRUZAT, VF.

FUENTES-OROZCO, C.; ANAYA-PRADO, R.; GONZALEZ-OJEDA, A.; ARENAS-MÁRQUES, H.; CABRERA-PIVARAL, C.; CAREVANTES-GUEVARRA, G.; BARRERA-ZEPEDA, L.M. L-alanyl-L-glutamine-supplemented parenteral nutrition improves infectious morbidity in secondary peritonitis. **Clinical Nutrition**, v.23, p.13-21, 2004.

GABAI, V.L.; SHERMAN, M.Y. Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. **Journal of Applied Physiology**, v.92, p.1743-1748, 2002.

GALLEY, H.F. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. **British Journal of Anaesthesia**, v.107, p.57-64, 2011.

GANAPATHY, V.; BRANDSCH, M.; LEIBACH, F.H. Intestinal transport of amino acid and peptides. In: JOHNSON, L.R.; ALPERS, D.H., eds. **The physiology of the gastrointestinal tract**. 3.ed. New York: Raven Press, 1994. p.1773-1793.

GARDNER, M.L.G. Absorption of amino acids and peptides from a complex mixture in the isolated small intestine of the rat. **Journal of Physiology**, v.253, p.233-256, 1975.

GELAIN, D.P.; PASQUALI, M.A.B.; COMIM, C.M.; GRUNWALD, M.S.; RITTER, C.; TOMASI, C.D.; ALVES, S.C.; QUEVEDO, J.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J.C. Serum heat shock protein 70 levels, oxidant status, and mortality in sepsis. **Shock**, v. 35, p. 466-470, 2011.

GILBERT, E.R.; WONG, E.A.; WEBB, K.E. Peptide absorption and utilization: implications for animal nutrition and health. **Journal of Animal Science**, v.86, p.2125-2155, 2008.

GRAHAM, T.E.; MACLEAN, D.A. Ammonia and amino acid metabolism in skeletal muscle: human, rodent and canine models. **Medicine Science and Sports Exercise**, v.30, p.34-46, 1998.

CRUZAT, VF.

GRAU, T.; BONET, A.; MINAMBRES, E.; PINEIRO, L.; IRLES, J.A.; ROBLES, A.; ACOSTA, J.; HERRERO, I.; PALACIOS, V.; LOPEZ, J.; BLESA, A.; MARTÍNEZ, P. The effect of L-alanyl-L-glutamine dipeptide supplemented total parenteral nutrition on infectious morbidity and insulin sensitivity in critically ill patients. **Critical Care Medicine**, v.39, p.1263-1268, 2011.

GREER, E.L.; BRUNET, A. Foxo transcriptional factors at the interface between longevity and tumor suppression. **Oncogene**, v.24, p.7410-7425, 2005.

GRIFFITHS, R.D.; JONES, C.; PALMER, T.E. Six-month outcome of critically ill patients given glutamine-supplemented parenteral nutrition. **Nutrition**, v.13, p.295-302, 1997.

GRIMBLE, G.K. The significance of peptides in clinical nutrition. **Annual Review of Nutrition**, v.14, p.419-447, 1994.

HAIR JUNIOR, J.F.; ANDERSON, R.E.; TATHAM, R.L.; BLACK, W.C. **Análise multivariada de dados**. São Paulo: Artmed, 2006. 600p.

HAMMARQVIST, F.; WERNERMAN, J.; ALI, R.; VON DER DECKEN, A.; VINNARS, E. Addition of glutamine to total parenteral nutrition after elective abdominal surgery spares free glutamine in muscle, counteracts the fall in muscle protein synthesis and improves nitrogen balance. **Annals of Surgery**, v.209, p.455-461, 1989.

HARRIS, R.C.; HOFFMANB, J.R.; ALLSOPP, A.; ROUTLEDGE, N.B.H. L-glutamine absorption is enhanced after ingestion of L-alanylglutamine compared with the free amino acid or wheat protein. **Nutrition Research**, v.32, p.272-277, 2012.

HAUSSINGER, D.; LANG, F.; GEROK, W. Regulation of cell function by the cellular hydration state. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v.267, p.E343-E355, 1994.

CRUZAT, VF.

HAUSSINGER, D.; ROTH, E.; LANG, F.; GEROK, W. Cellular hydration state: an important determinant of protein catabolism in health and disease. **Lancet**, v.341, p.1330-1332, 1993.

HAY, F.C.; WESTWOOD, O.M.R. **Practical immunology**. 4.ed. Oxford: Blackwell, 2002. 400p.

HAYASHI, Y.; SAWA, Y.; FUKUYAMA, N.; NAKAZAWA, H.; MATSUDA, H. Preoperative glutamine administration induces heat-shock protein 70 expression and attenuates cardiopulmonary bypass-induced inflammatory response by regulating nitric oxide synthase activity. **Circulation**, v.106, p.2601-2607, 2002.

HE, Y.; HAKVOORT, T.B.; KOEHLER, S.E.; VERMEULEN, J.L.; DE WAART, D.R.; DE THEIJE, C.; TEN HAVE, G.A.; VAN EIJK, H.M.; KUNNE, C.; LABRUYERE, W.T.; HOUTEN, S.M.; SOKOLOVIC, M.; RUIJTER, J.M.; DEUTZ, N.E.; LAMERS W.H. Glutamine synthetase in muscle is required for glutamine production during fasting and extrahepatic ammonia detoxification. **Journal of Biological Chemistry**, v.285, p.9516 -9524, 2010.

HECK, T.G.; SCHÖLER, C.M.; BITTENCOURT, P.I.H. HSP70 expression: does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain? **Cell Biochemistry and Function**, v.29, p.215-226, 2011.

HEINEMEIER, K.M.; OLESEN, J.L.; HADDAD, F.; SCHJERLING, P.; BALDWIN, K.M.; KJAER, M. Effect of unloading followed by reloading on expression of collagen and related growth factors in rat tendon and muscle. **Journal of Applied Physiology**, v.106, p.178-186, 2009.

HICKSON, R.C.; CZERWINSKI, S.M.; WEGRZYN, L.E. Glutamine prevents down regulation of myosin heavy chain synthesis and muscle atrophy from glucocorticoids. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v.268, p.E730-E734, 1995.

CRUZAT, VF.

HU, Y.M.; PAI, M.H.; YEH, C.L.; HOU, Y.C.; YEH, S.L. Glutamine administration ameliorates sepsis-induced kidney injury by down regulating the high-mobility group box protein-1-mediated pathway in mice. **American Journal of Physiology: Renal Physiology**, v.302, p.F150-F158, 2012.

INOUE, Y.; BODE, B.P.; SOUBA, W.W. Antibody to TNF- α blocks LPS-stimulated hepatic amino acid transport. **Surgery**, v.116, p.356-366, 1994.

INOUE, Y.; PACITTI, A.; SOUBA, W.W. Endotoxin increases hepatic glutamine transport activity. **Journal of Surgical Research**, v.54, p.393-400, 1993.

JACKSON, N.C.; CARROLL, P.V.; RUSSEL-JONES, D.L. Effect of glutamine supplementation, GH, and IGF-I on glutamine metabolism in critically ill patients. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v.278, p.E226-E233, 2000.

JACOBI, C.A.; ORDEMANN, J.; ZUCKERMANN, H.; DOCKE, W.; VOLK, H. D.; MULLER, J.M. The influence of alanyl-glutamine on immunologic functions and morbidity in postoperative total parenteral nutrition: preliminary results of a prospective randomized trial. **Zentralblatt fur chirurgie**, v.124, p.199-205, 1999.

JAESCHKE, R.Z.; BROŹEK, J.L.; DELLINGER, R.P. 2008 update of international guidelines for the management of severe sepsis and septic shock: should we change our current clinical practice? **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**, v.118, p.92-95, 2008.

JIANG, Z.M.; CAO, J.D.; ZHU, X.G.; ZHAO, W.X.; YU, J.C.; MA, E.L.; WANG, X.R.; ZHU, M.W.; SHU, H.; LIU, Y.W. The impact of alanyl-glutamine on clinical postoperative patients: a randomized, double-blind, controlled study of 120 patients. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.23, p.S62-S66, 1999.

KARINCH, A.M.; PAN, M.; LIN, C.; STRANGE, R.; SOUBA, W.W. Glutamine metabolism in sepsis and infection. **Journal of Nutrition**, v.131, p.2535S-2538S, 2001.

CRUZAT, VF.

KHAN, J.; HARRISON, T.B.; RICH, M.M.; MOSS, M. Early development of critically illness myopathy and neuropathy in patients with severe sepsis. **Neurology**, v.67, p.1421-1425, 2006.

KLASSEN, P.; MAZARIEGOS, M.; SOLOMONS, N.W.; FÜRST, P. The pharmacokinetic responses of human to 20 g of alanyl-glutamine dipeptide differ with the dosing protocol but not with gastric acidity or in patients with acute dengue fever. **Journal of Nutrition**, v.130, p.177-182, 2000.

KOZJEK, N.R.; KOMPAN, L.; SOETERS, P.; OBLAK, I.; MASTNAK, D.M.; MOZINA, B.; ZADNIK, V.; ANDERLUH, F.; VELENIK, V. Oral glutamine supplementation during preoperative radiochemotherapy in patients with rectal cancer: a randomized double blinded, placebo controlled pilot study. **Clinical Nutrition**, v.30, p.567-570, 2011.

KRAUSE, M.S.; BITTENCOURT, A.; BITTENCOURT, P.I.H.JR.; MCCLENAGHAN, N.H.; FLATT, P.R.; MURPHY, C.; NEWSHOLME, P. Physiological concentrations of interleukin-6 directly promote insulin secretion, signal transduction, nitric oxide release, and redox status in a clonal pancreatic β -cell line and mouse islets. **Journal of Endocrinology**, v.214, p.301-311, 2012.

KUMAR, A.; ROBERTS, D.; WOOD, K.E.; LIGHT, B.; PARRILLO, J.E.; SHARMA, S.; SUPPES, R.; FEINSTEIN, D.; ZANOTTI, S.; TAIBERG, L.; GURKA, D.; KUMAR, A.; CHEANG, M. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. **Critical Care Medicine**, v.34, p.1589-1596, 2006.

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.

CRUZAT, VF.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LAGRANHA, C.J.; LIMA, T.M.; SENNA, S.M.; DOI, S.Q.; CURI, R.; PITHON-CURI, T.C. The effect of glutamine supplementation on the function of neutrophils from exercised rats. **Cell Biochemistry and Function**, v.23, p.101-107, 2005.

LANG, C.H.; FROST, R.A.; VARY, T.C. Regulation of muscle protein synthesis during sepsis and inflammation. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v.293, p.E453-E459, 2007.

LATIN AMERICAN SEPSIS INSTITUTE: Campanha sobrevivendo a sepse. Relatório nacional. Disponível em: <http://www.sepsisnet.org>. Acesso em: 13 dez. 2012.

LEIBACH, F.H.; GANAPATHY, V. Peptide transporters in the intestine and kidney. **Annual Review of Nutrition**, v.16, p.99-119, 1996.

LEVY, M.M.; FINK, M.P.; MARSHALL, J.C.; ABRAHAM, E.; ANGUS, D.; COOK, D.; COHEN, J.; OPAL, S.M.; VINCENT, J.L.; RAMSAY, G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Critical Care Medicine**, v.31, p.1250-1256, 2003.

LI, Q.; VERMA, I.M. NF-kappa B regulation in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v.2, p.725-34, 2002.

LI, Y-P.; SCHWARTZ, J.R.; WADDELL, I.D.; HOLLOWAY, B.R.; REID, M.B. Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kB activation in response to tumor necrosis factor α . **FASEB Journal**, v.12, p.871-880, 1998.

LIANG, M.; WANG, X.; YUAN, Y.; ZHOU, Q.; TONG, C.; JIANG, W. Different effect of glutamine on macrophage tumor necrosis factor- α release and heat shock protein 72 expression in vitro and in vivo. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v.41, p.171-177, 2009.

CRUZAT, VF.

LIBONI, K.C.; LI, N.; SCUMPIA, P.O.; NEU, J. Glutamine modulates LPS-induced IL-8 production through I κ B/NF- κ B in human fetal and adult intestinal epithelium. **Journal of Nutrition**, v.135, p.245-251, 2005.

LIEN, E.; INGALLS, R.R. Toll-like receptors. **Critical Care Medicine**, v.30, p.S1-S11, 2002.

LIS, M.T.; MATTHEWS, D.M.; CRAMPTON, R.F. Effects of dietary restriction and protein deprivation on intestinal absorption of protein digestion products in the rat. **British Journal of Nutrition**, v.28, p.443-446, 1972.

LLOVERA, M.; GARCIA-MARTINEZ, C.; AGELL, N.; LOPEZ-SORIANO, F.J.; ARGILES, J.M. TNF can directly induce the expression of ubiquitin-dependent proteolytic system in rat soleus muscles. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**, v.230, p.238-241, 1997.

LUND, P. L-Glutamine and L-Glutamate: UV-Method with Glutaminase and Glutamate Dehydrogenase. In: BERGMEYER, H.U., ed. **Methods of enzymatic analysis**. 3.ed. Weinheim: Verlag Chemie, 1986. v.8, p.357-363.

MACBURNEY, M.; YOUNG, L.S.; ZIEGLER, T.R.; WILMORE, D.W. A cost-evaluation of glutamine-supplemented parenteral nutrition in adult bone marrow transplant patients. **Journal of the American Dietetic Association**, v.94, p.1263-1266, 1994.

MACDONALD, J.; GALLEY, H.F.; WEBSTER, N.R. Oxidative stress and gene expression in sepsis. **British Journal of Anaesthesia**, v.90, p.221-232, 2003.

MAJNO, G. The ancient riddle of sepsis. **Journal of Infectious Diseases**, v.163, p.937-945, 1991.

MANGIA, C.M.F.; KISSOON, N.; BRANCHINI, O.A.; ANDRADE, M.C.; KOPELMAN, B.I.; CARCILLO, J. Bacterial Sepsis in Brazilian Children: a trend analysis from 1992 to 2006. **PLoS ONE**, v.6, p. e14817, 2011.

CRUZAT, VF.

MARSHALL, J.C. Rethinking sepsis: from concepts to syndromes to diseases. **Sepsis**, v.3, p.5-10, 1999.

MARSHALL, J.C. Sepsis: current status, future prospects. **Current Opinion in Critical Care**, v.10, p.250-264, 2004.

MARTIN, G.S.; MANNINO, D.M.; EATON, S.; MOSS, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **New England Journal of Medicine**, v.348, p.1546-1554, 2003.

MARWOOD, S.; JACK, S.; PATEL, M.; WALKER, P.; BOWTELL, J.; CALVERLEY, P. No effect of glutamine ingestion on indices of oxidative metabolism in stable COPD. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v.177, p.41-46, 2011.

MCCLAVE, S.A.; MARTINDALE, R.G.; VANEK, V.W.; MCCARTHY, M.; ROBERTS, P.; TAYLOR, B.; OCHOA, J.B.; NAPOLITANO, L.; CRESCI, G.; A.S.P.E.N. BOARD OF DIRECTORS; AMERICAN COLLEGE OF CRITICAL CARE MEDICINE. Guidelines for the provision and assessment of nutrition support therapy in the adult critically ill patient: Society of Critical Care Medicine (SCCM) and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (A.S.P.E.N.). **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.33, p.277-316, 2009.

MCMILLAN, E.M.; QUADRILATERO, J. Differential apoptosis-related protein expression, mitochondrial properties, proteolytic enzyme activity, and DNA fragmentation between skeletal muscles. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.300, p.R531-R543, 2011.

MEIJER, A.J. Amino acids as regulators and components of nonproteinogenic pathway. **Journal of Nutrition**, v.133, p.2057S-2062S, 2003.

MINAMI, H.; MORSE, E.L.; ADIBI, S.A. Characteristics and mechanism of glutamine-dipeptide absorption in human intestine. **Gastroenterology**, v.103, p.3-11, 1992.

CRUZAT, VF.

MORLION, B.J.; STEHLE, P.; WACHTLER, P.; SIEDHOFF, H.P.; KOLLER, M.; KONIG, W.; FURST, P.; PUCHSTEIN, C. Total parenteral nutrition with glutamine dipeptide after major abdominal surgery: a randomized, double-blind, controlled study. **Annals of Surgery**, v.227, p.302-308, 1998.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v.420, p.846-852, 2002.

NEELEY, W.E.; PHILLIPSON, J. Automated enzymatic method for determining ammonia in plasma, with 14-day reagent stability. **Clinical Chemistry**, v.34, p.1868-1869, 1988.

NEU, J.; SHENOY, V.; CHAKRABARTI, R. Glutamine nutrition and metabolism: where do we go from here? **FASEB Journal**, v.10, p.829-837, 1996.

NEWS. MED.BR: notícias e informações sobre saúde. **OMS divulga as dez principais causas de morte no mundo**. Disponível em: <http://www.news.med.br/p/saude/222530/oms-divulga-as-dez-principais-causas-de-morte-no-mundo.htm>. Acesso em: 8 jun. 2012.

NEWSHOLME, P. Why is l-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, post injury, surgery or infection? **Journal of Nutrition**, v.131, p.2515S-2522S, 2001.

NEWSHOLME, P.; LIMA, M.M.R.; PROCOPIO, J.; PITHON-CURI, T.C.; DOI, S.Q.; BAZOTTE, R.B.; CURI, R. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, p.153-163, 2003a.

NEWSHOLME, P.; PROCOPIO, J.; LIMA, M.M.R.; 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, 2003b.

CRUZAT, VF.

NEZIC, L.; SKRBIC, R.; DOBRIC, S.; STOJILJKOVIC, M.P.; SATARA, S.S.; MILOVANOVIC, Z.A.; STOJAKOVIC, C. Effect of simvastatin on proinflammatory cytokines production during lipopolysaccharide-induced inflammation in rats. **General Physiology and Biophysics**, v.28, p.119-126, 2009.

NGUYEN, H.B.; RIVERS, E.P.; ABRAHAMIAN, F.M.; MORAN, G.J.; ABRAHAM, E.; TRZECIAK, S.; HUANG, D.T.; OSBORN, T.; STEVENS, D.; TALAN, D.A. Emergency Department Sepsis Education Program and Strategies to improve survival (ED-sepsis) Working Group. Severe sepsis and septic shock: review of the literature and emergency department management guidelines. **Annals of Emergency Medicine**, v.48, p.28-54, 2006.

PAPENHEIMER, L.R. Intestinal absorption of hexoses and amino acids: from apical cytosol to villus capillaries. **Journal of Membrane Biology**, v.184, p.233-239, 2001.

PARRY, D.M.; BROSNAN, J.T. Glutamine metabolism in the kidney during induction of, and recovery from, metabolic acidosis in the rat. **Biochemical Journal**, v.174, p.387-396, 1978.

PARRY-BILLINGS, M.; BEVAN, S.J.; OPARA, E.; NEWSHOLME, E.A. Effects of changes in cell volume on the rates of glutamine and alanine release from rat skeletal muscle *in vitro*. **Biochemical Journal**, v.276, p.559-561, 1991.

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.

PEDERSEN, B.K. Muscular interleukin-6 and its role as an energy sensor. **Medicine Science Sports and Exercise**, v.44, p.392-396, 2012.

PETERSEN, A.M.W.; PEDERSEN, B.K. The anti-inflammatory effect of exercise. **Journal of Applied Physiology**, v.98, p.1154-1162, 2005.

CRUZAT, VF.

PETRY, É.R.; CRUZAT, V.F.; ALVARENGA, M.L.; HECK, T.G.; ROSA, T.G.; BITTENCOURT, P.I.H.; TIRAPEGUI, J. Glutamine supplements attenuate muscle damage and oxidative stress: HSP70 involvement. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, 2012. Submetido.

PICARD, K.M.; O'DONOGHUE, S.C.; YOUNG-KERSHAW, D.A.; RUSSELL, K.J. Development and implementation of a multidisciplinary sepsis protocol. **Critical Care Nurse**, v.26, p.43-54, 2006.

PINEL, C.; COXAM, V.; MIGNON, M.; TAILLANDIER, D.; CUBIZOLLES, C.; LEBECQUEA, P.; DARMAUN, D.; MEYNIAL-DENIS, D. Alterations in glutamine synthetase activity in rat skeletal muscle are associated with advanced age. **Nutrition**, v.22, p.778-785, 2006.

POWELL-TUCK, J.; JAMIESON, C.P.; BETTANY, G.E.; OBEID, O.; FAWCETT, H.V.; ARCHER, C.; MURPHY, D.L. A double-blind, randomized, controlled trial of glutamine supplementation in parenteral nutrition. **Gut**, v.45, p.82-88, 1999.

PROUD, G.C. The eukaryotic initiation factor 4E-binding proteins and apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, v.12, p.541-546, 2005.

REID, M.B.; LI, Y.-P. Cytokines and oxidative signalling in skeletal muscle. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.171, p.225-232, 2001.

REMICK, D.G. Pathophysiology of sepsis. **American Journal of Pathology**, v.170, p.1435-1444, 2007.

REMICK, D.G.; NEWCOMB, D.E.; BOLGOS, G.L.; CALL, D.R. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. **Shock**, v.13, p.110-116, 2000.

RENNIE, M.J.; BOWTELL, J.L.; BRUCE, M.; KHOGALI, S.E.O. Interaction between glutamine availability and metabolism of glycogen, tricarboxylic acid cycle intermediates and glutathione. **Journal of Nutrition**, v.131, p.2488S-2490S, 2001.

CRUZAT, VF.

RITTIRSCH, D.; HOESEL, L.M.; WARD, P.A. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. **Journal of Leukocyte Biology**, v.81, p.137-143, 2007.

ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J.O. Aspectos atuais sobre glutamina, atividade física e sistema imune. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.36, p.202-212, 2000.

ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J.O. Considerações nutricionais e bioquímicas da suplementação de glutamina em atletas: controvérsias e aspectos atuais. **Journal of Metabolism and Nutrition**, v.7, p.106-117, 2003.

ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J.O.; PEDROSA, R.G.; CASTRO, I.A.; PIRES, I.S.O. Effect of L-alanyl-L-glutamine supplementation on the plasma and tissue concentrations of glutamine in rats submitted to exhaustive exercise. **Nutrition**, v.22, p.564-571, 2006.

ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J.O.; 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, 2002.

ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J.O.; PEDROSA, R.G.; PIRES, I.S.O.; CASTRO, I.A. 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.

ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J.O.; VINOLO, M.A.R.; BORGES, M.C.; CASTRO, I.A.; PIRES, I.S.O.; BORELLI, P. Dietary glutamine supplementation increases the activity of peritoneal macrophages and hemopoiesis in early-weaned mice inoculated with mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin. **Journal of Nutrition**, v.138, p.1343-1348, 2008.

CRUZAT, VF.

ROTH, E. Non-nutritive effects of glutamine. **Journal of Nutrition**, v.138, p.2025S-2031S, 2008.

ROTH, E.; FUNOVICS, J.; MUHLBACHER, F.; SCHEMPER, M.; SPORN, P.; FRITSCH, A. Metabolic disorders in severe abdominal sepsis: glutamine deficiency in skeletal muscle. **Clinical Nutrition**, v.1, p.25-41, 1982.

ROTH, E.; OEHLER, R. Hypothesis: Muscular glutamine deficiency in sepsis - a necessary step for a hibernation-like state? **Nutrition**, v.26, p.571-574, 2010.

ROTH, E.; OEHLER, R.; MANHART, N.; EXNER, R.; WESSNER, B.; STRASSER, E.; SPITTLER, A. Regulative potential of glutamine-regulation to glutathione metabolism. **Nutrition**, v.18, p.217-221, 2002.

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.

RUTTEN, E.P.; ENGELEN, M.P.; SCHOLS, A.M.; DEUTZ, N.E. Skeletal muscle glutamate metabolism in health and disease: state of the art. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v.8, p.41-51, 2005.

SANDBERG, M.; ERIKSSON, L.; JOHSSON, J.; SJOSTROM, M.; WOLD, S.; New chemical descriptors relevant for the design of biologically active peptides. A multivariate characterization of 87 amino acids. **Journal Medicine Chemistry**, v.41, p.2481-2491, 1998.

SARANTOS, P.; OCKERT, K.; SOUBA, W.W. Endotoxin stimulates lymphocyte glutaminase expression. **Archives of Surgery**, v.128, p.920-924, 1993.

SCHELTINGA, M.R.; YOUNG, L.S.; BENFELL, K.; BYE, R.L.; ZIEGLER, T.R.; SANTOS, A.A.; ANTIN, J.H.; SCHLOERB, P.R.; WILMORE, D.W. Glutamine-enriched intravenous feedings attenuate extracellular fluid expansion after a standard stress. **Annals of Surgery**, v.214, p.385-393, 1991.

CRUZAT, VF.

SHABERT, J.K.; WINSLOW, C.; LACEY, J.M.; WILMORE, D.W. Glutamine-antioxidant supplementation increases body cell mass in aids patients with weight loss: a randomized, double-blind controlled trial. **Nutrition**, v.15, p.860-864, 1999.

SHEPHARD, R.J. Sepsis and mechanisms of inflammatory response: is exercise a good model? **British Journal of Sports Medicine**, v.35, p.223-230, 2001.

SHU, H.J.; TAKEDA, H.; SHINZAWA, H.; TAKAHASHI, T.; KAWATA, S. Effect of lipopolysaccharide on peptide transporter 1 expression in rat small intestine and its attenuation by dexamethasone. **Digestion**, v.65, p.21-29, 2002.

SIGRIST-NELSON, K.; MURER, H.; HOPFER, U. Active alanine transport in isolated brush border Membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v.250, p.5674-5680, 1975.

SILVA, F.P.; VELASCO, I.T. **Sepse**. São Paulo: Manole, 2007. 484p.

SILVEIRA, E.M.S.; RODRIGUES, M.F.; KRAUSE, M.S.; VIANNA, D.R.; ALMEIDA, B.S.; ROSSATO, J.S.; OLIVEIRA JUNIOR L.P.; CURI, R.; BITTENCOURT, P.I.H.JR. Acute exercise stimulates macrophage function: possible role of NF-kB pathways. **Cell Biochemistry and Function**, v.25, p.63-73, 2007.

SINGLETON, K.D.; BECKEY, V.E.; WISCHMEYER, P.E. Glutamine prevents activation of NF-kB and stress kinase pathways, attenuates inflammatory cytokine release, and prevents acute respiratory distress syndrome (ARDS) following sepsis. **Shock** v.24, p.583-589, 2005.

SINGLETON, K.D.; WISCHMEYER, P.E. Glutamine protection against sepsis and lung injury is dependent on heat shock protein 70 expression. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.292, p.R1839-R1845, 2007.

CRUZAT, VF.

SOGAYAR, A.M.; MACHADO, F.R.; REA-NETO, A.; DORNAS, A.; GRION, C.M.; LOBO, S.M.; TURA, B.R.; SILVA, C.L.; CAL, R.G.; BEER, I.; MICHELS, V.; SAFI, J.; KAYATH, M.; SILVA, E.; Costs Study Group - Latin American Sepsis Institute. A multicenter, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. **Pharmacoeconomics**, v.26, p.425-434, 2008.

SOLBU, T.T.; BJORKMO, M.; BERGHUIS, P.; HARKANY, T.; CHAUDHRY, F.A. SAT1, a glutamine transporter, is preferentially expressed in GABAergic neurons. **Frontiers Neuroanatomy**, v.4, p.1-13, 2010.

STEPHANIE, W.; STEPHAN, W. **Sepsis on the death certificate** - Is a change to rule 3 necessary? Disponível em: <http://www.who.int/classifications/network>. Acesso em: 10 out 2010.

SZULC, P.; MUNOZ, F.; MARCHAND, F.; CHAPURLAT, R.; DELMAS, P.D. Rapid loss of appendicular skeletal muscle mass is associated with higher all-cause mortality in older men: the prospective MINOS study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.91, p.1227-1236, 2010.

TELES, J.M.; SILVA, E.; WESTPHAL, G.; FILHO, R.C.; MACHADO, F.R. Surviving sepsis campaign in Brazil. **Shock**, v.30, p.47-52, 2008.

TEMPLE, C.S.; STEWART, A.K.; MEREDITH, D.; LISTER, N.A.; MORGAN, K.M.; COLLIER, I.D.; VAUGHAN-JONES, R.D.; BOYD, C.A.R.; BAILEY, P.D.; BRONK J.R. Peptide mimics as substrates for the intestinal peptide transporter. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.20-22, 1998.

THAMOTHARAN, M.; BAWANI, S.Z.; ZHOU, X.; ADIBI, S.A. Functional and molecular expression of intestinal oligopeptide transporter (pept-1) after a brief fast. **Metabolism**, v.48, p.681-684, 1999.

TISDALE, M.J. Molecular pathways leading to cancer cachexia. **Physiology**, v.20, p.340-348, 2005.

CRUZAT, VF.

TOMLINSON, C.; RAFII, M.; BALL, R.O.; PENCHARZ, P. Arginine synthesis from enteral glutamine in healthy adults in the fed state. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v. 301, p.E267-E273, 2011.

VALENCIA, E.; MARIN, A.; HARDY, G. Glutathione: nutritional and pharmacological viewpoints: part II. **Nutrition**, v.17, p.485-486, 2001.

VALENCIA, E.; MARIN, A.; HARDY, G. Impact of L-glutamine on glutathione, glutamine, and glutamate blood levels in volunteers. **Nutrition**, v.18, p.367-370, 2002.

VAN DE POLL, M.C.G.; SOETERS, P.B.; DEUTZ, N.E.P.; FEARON, K.C.H.; DEJONG, C.H.C. Renal metabolism of amino acids: its role in interorgan amino acid exchange. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, p.185-197, 2004.

VEGA, V.L.; RODRÍGUEZ-SILVA, M.; FREY, T.; GEHRMANN, M.; DIAZ, J.C.; STEINEM, C.; MULTHOFF, G.; ARISPE, N.; DE MAIO, A. Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages **Journal of Immunology**, v.180, p.4299-4307, 2008.

VINCENT, J.-L.; ABRAHAM, E. Centennial review: the last 100 years of sepsis. **American Journal Respiratory and Critical Care Medicine**, v.173, p.256-263, 2006.

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 organics acids. **European Journal of Applied Physiology**, v.77, p.434-438, 1998.

CRUZAT, VF.

WANG, Y.; JIANG, Z.M.; NOLAN, M.T.; JIANG, H.; HAN, H.E.; YU, K.; LI, H.L.; JIE, J.; LIANG, X.K. The impact of glutamine dipeptide - supplemented parenteral nutrition on outcomes of surgical patients: a meta-analysis of randomized clinical trials. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.34, p.521-529, 2010.

WELBOURNE, T.; ROUTH, R.; YUDKOFF, M.; NISSIM, I. The glutamine/glutamate couplet and cellular function. **News in Physiological Science**, v.16, p.157-160, 2001.

WERNERMAN, J. Clinical use of glutamine supplementation. **Journal of Nutrition**, v.138, p.2040S-2044S, 2008.

WERNERMAN, J.; HAMMARQVIST, F. Modulation of endogenous glutathione availability. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 2, p. 487-492, 1999.

WHILLIER, S.; GARCIA, B.; CHAPMAN, B.E.; KUCHEL, P.W.; RAFTOS, J.E. Glutamine and α -ketoglutarate as glutamate sources for glutathione synthesis in human erythrocytes. **FEBS Journal**, v.278, p.3152-3163, 2011.

WILMORE, D.W.; SHABERT, J.K. The role of glutamine in immunologic responses. **Nutrition**, v.14, p. 618-626, 1998.

WINDMUELLER, H.G. Glutamine utilization by the small intestine. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v.53, p.201-237, 1982.

WISCHMEYER, P.E. Glutamine and heat shock protein expression. **Nutrition**, v.18, p.225-228, 2002.

WISCHMEYER, P.E. Glutamine: role in critical illness and ongoing clinical trials. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.24, p.190-197, 2008.

WRIGHT, S.D. CD14 and innate recognition of bacteria. **Journal of Immunology**, v.155, p.6-8, 1995.

CRUZAT, VF.

YAMAUCHI, K.; KOMATSU, T.; KULKARNI, A.D.; OHMORI, Y.; MINAMI, H.; USHIYAMA Y.; NAKAYAMA, M.; YAMAMOTO, S. Glutamine and arginine affect Caco-2 cell proliferation by promotion of nucleotide synthesis. **Nutrition**, v.18, p.329-333, 2002.

YANG, C.Y.; DANTZIG, A.H.; PIDGEON, C. Intestinal peptide transport systems and oral drug availability. **Pharmaceutical Research**, v.16, p.1331-1343, 1999.

YAQOOB, P.; CALDER, P.C. Glutamine requirement of proliferating T-lymphocytes. **Nutrition**, v.13, p.646-651, 1997.

YOO, C.G.; LEE, S.; LEE, C.T. Anti-inflammatory effect of heat shock protein induction is related to estabilization of I κ B- α through preventing I κ B kinase activation in respiratory epithelial cells. **Journal of Immunology**, v.164, p.5416-5420, 2000.

YOUNG, V.R.; AJAMI, A.M. Glutamine: the emperor or his clothes? **Journal of Nutrition**, v.131, p.2449S-2459S, 2001.

ZAMANIAN-DARYOUSH, M.; MOGENSEN, T.H.; DIDONATO, J.A.; WILLIAMS, B.R.G. NF- κ B activation by double-stranded-RNA-activated protein kinase (PKR) is mediated through NF- κ B-inducing kinase and I κ B kinase. **Molecular and Cellular Biology**, v.20, p.1278-1290, 2000.

ZHANG, F.; PATERSON, A.J.; HUANG, P.; WANG, K.; KUDLOW, J.E. Metabolic control of proteasome function. **Physiology**, v.22, p.373-379, 2007.

ZIEGLER, T.R.; YOUNG, L.S.; BENFELL, K.; SCHELTINGA, M.; HORTOS, K.; BYE, R.; MORROW, F.D.; JACOBS, D.O.; SMITH, R.J.; ANTIN, J.H. Clinical and metabolic efficacy of glutamine-supplemented parenteral nutrition after bone marrow transplantation. **Annals of Internal Medicine**, v.116, p.821-828, 1992.

CRUZAT, VF.

9. ANEXOS

Gel de agarose para verificar a pureza dos mRNAs.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/103/2012

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto "Efeito da suplementação com glutamina livre e na forma de dipeptídeo sobre vias de sinalização protéica e sistema imunitário em ratos submetidos à sepse" de responsabilidade do pesquisador **Vinicius Fernandes Cruzat**, sob a orientação do Prof. Julio Orlando Tirapegui Toledo (Protocolo CEUA/FCF/249), foi aprovado em 10 de agosto de 2009.

Certificamos, ainda, que as alterações e o título do projeto que passou a ser denominado "**Efeito da suplementação com glutamina livre e na forma de dipeptídeo sobre vias de sinalização protéica e sistema imunitário em camundongos submetidos a endotoxemia**", foram aprovados em reunião de 9 de agosto de 2010 e estão de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

São Paulo, 05 de outubro de 2012.

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP