

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM
ZOOTECNIA**

**AVALIAÇÃO DA GLUTAMINA SINTETASE E DA CONCENTRAÇÃO
DA GLUTAMINA NO TERÇO FINAL DA GESTAÇÃO E NA
LACTAÇÃO DE CAMUNDONGOS FÊMEAS E MATRIZES SUÍNAS
PRIMÍPARAS**

HELENA EMÍLIA CAVALCANTI DA COSTA CORDEIRO MANSO
Zootecnista
Doutor em Nutrição Animal

**FORTALEZA – CE
DEZEMBRO - 2006**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM
ZOOTECNIA**

**AVALIAÇÃO DA GLUTAMINA SINTETASE E DA CONCENTRAÇÃO
DA GLUTAMINA NO TERÇO FINAL DA GESTAÇÃO E NA
LACTAÇÃO DE CAMUNDONGOS FÊMEAS E MATRIZES SUÍNAS
PRIMÍPARAS**

HELENA EMÍLIA CAVALCANTI DA COSTA CORDEIRO MANSO

**FORTALEZA - CE
DEZEMBRO - 2006**

HELENA EMÍLIA CAVALCANTI DA COSTA CORDEIRO MANSO

**AVALIAÇÃO DA GLUTAMINA SINTETASE E DA CONCENTRAÇÃO
DA GLUTAMINA NO TERÇO FINAL DA GESTAÇÃO E NA
LACTAÇÃO DE CAMUNDONGOS FÊMEAS E MATRIZES SUÍNAS
PRIMÍPARAS**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, da Universidade Federal do Ceará, do qual participam a Universidade Federal da Paraíba e Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Nutrição Animal

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Luiz Euquerio de Carvalho – Orientador

Prof. Dr. Malcolm Watford – Co-orientador

Prof. Dr. Nominando de Andrade

Prof. Dr. Ilka Maria Vasconcelos

Prof. Dr. Gastão Barreto Espíndola

Prof. Dr. Alberto Neves Costa

**FORTALEZA – CE
DEZEMBRO - 2006**

Ficha catalográfica elaborada pelo Bibliotecário Hamilton Rodrigues Tabosa CRB-3/888

M249a Manso, Helena Emília Cavalcanti da Costa Cordeiro

Avaliação da glutamina sintetase e da concentração da glutamina no terço final da gestação e na lactação de camundongos fêmeas e matrizes suínas primíparas / Helena Emília C. C. C. Manso

107 f. il., color., enc.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

Orientador: Dr. Luiz Euquério de Carvalho

Co-orientador: Dr. Malcolm Watford

Área de concentração: Nutrição Animal

1. Aminoácido 2. Proteólise 3. Catabolismo 4. Reprodução animal

I. Carvalho, Luiz Euquério de II. Universidade Federal do Ceará – Doutorado em Zootecnia III. Título

CDD 636.08

HELENA EMÍLIA CAVALCANTI DA COSTA CORDEIRO MANSO

**AVALIAÇÃO DA GLUTAMINA SINTETASE E DA CONCENTRAÇÃO
DA GLUTAMINA NO TERÇO FINAL DA GESTAÇÃO E NA
LACTAÇÃO DE CAMUNDONGOS FÊMEAS E MATRIZES SUÍNAS
PRIMÍPARAS**

Tese defendida e aprovada pela Comissão Examinadora em 01 de dezembro de 2006

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Nominando de Andrade
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Departamento de Agropecuária

Prof^a. Dr^a. Ilka Maria Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará
Departamento de Biologia Molecular e Bioquímica

Prof. Dr. Gastão Barreto Espíndola
Universidade Federal da Ceará
Departamento de Zootecnia

Prof. Dr. Alberto Neves Costa
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária

Prof. Dr. Luiz Euquerio de Carvalho
Universidade Federal do Ceará
Departamento de Zootecnia
Presidente

**FORTALEZA-CE
DEZEMBRO – 2006**

Dedido:

Aos meus pais, Pedro e Clélia, pelo incentivo, orientação e apoio incondicional durante toda minha vida profissional.

Ao meu esposo Hélio Manso Filho, aos meus filhos, Pedro Neto, Luís Henrique, a este que se encontra com 7 meses de vida uterina e a minha enteada, Eliana, que durante todo o curso foram testemunha e apoio nos momentos mais estressantes na busca deste título

10 coisas que fazem as pessoas realmente comprometidas !!

Uma pessoa comprometida procura sempre se colocar no lugar das outras; sentir o que as outras sentem;

Uma pessoa comprometida faz tudo com atenção aos detalhes. Ela põe atenção em tudo o que faz, no detalhe do detalhe;

Uma pessoa comprometida termina o que começa e não deixa as atividades pela metade;

Uma pessoa comprometida vem com soluções e não com mais problemas, quando tem uma tarefa a cumprir;

Uma pessoa comprometida pergunta o que não sabe e demonstra vontade de aprender. Vai fundo até dominar o que não sabe e deveria saber;

Uma pessoa comprometida cumpre prazos e horários;

Uma pessoa comprometida não vive dando desculpas por seus atos e não fica procurando culpados pelos seus erros cometidos;

Uma pessoa comprometida não vive reclamando da vida e falando mal das pessoas. Ela age para modificar a realidade;

Uma pessoa comprometida não desiste facilmente. Ela não descansa até quando não tenha resolvido um problema. Ela vai atrás da solução;

Uma pessoa comprometida está sempre pronta a colaborar com as outras. Ela participa. Dá idéias. Você pode contar com ela.

Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a DEUS e minha FAMÍLIA: Pedro e Clélia (pais), Hélio (esposo), Pedro Neto, Luis Henrique, e a este que se encontra no sétimo mês de vida uterina (filhos), Eliana (enteada), Aline, Andréa e Costinha (irmãos), Alexandre, Gustavo, Katiane, Ricardo e Maria Teresa (cunhados), Alexandre Filho, Manuela, Lívia e Ricardo Filho (sobrinhos) e Dr. Hélio (sogro) por terem me dado força, atenção e apoio incondicional, não só durante o curso mas em toda minha vida profissional.

Meus eternos agradecimentos vão para meus orientadores, Dr. Malcolm Watford (RUTGERS University) e Dr. Luiz Euquerio de Carvalho (UFC) pelo carinho e atenção a mim dispensados. Agradeço também aos membros do meu comitê, Dr. Nominando de Andrade, Dra. Ilka M. Vasconcelos, Dr. Alberto Neves Costa e Dr. Gastão B. Espíndola.

Aos meus professores que durante meu curso souberam me ensinar e dividir as experiências enriquecedoras deste trabalho aqui finalizado, em especial aos doutores da Rutgers University: Kenneth McKeever, Sarah Ralston, Juan Pablo Advis, Henry John-Alder, Carol Bagnell, Yaxin Wang, Rosely Golfetti, Gary Merrill; da Texas A&M University: Dr. Guoyao Wu; da University of Medicine and Dentistry of New Jersey: Drs. Marco e Leticia Brotto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo suporte financeiro e pela oportunidade de estudar e aprender novas tecnologias aplicadas à Produção Animal no decorrer do curso nos Estados Unidos da América. Assim como à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, pelo suporte financeiro nos últimos meses do meu curso e também à Universidade Federal Rural de

Pernambuco e Universidade Federal do Ceará, pelo apoio incondicional em investir na melhoria da qualificação de seus professores.

Ao Departamento de Animal Sciences e ao Setor de Animal Care da Rutgers University por terem cedido as instalações, os animais e todo o apoio na execução do experimento. Não posso deixar de agradecer a Ms. Linda Haberl e Mr. Anthony Sacchetti que sempre estiveram dispostos a contribuir para o bom andamento dos experimentos.

A Ajinomoto Biolatina, em especial ao Dr. Eduardo Nogueira por ter acreditado, financiado e me apoiado na segunda fase do meu curso aqui no Brasil.

À Fundação Apolômio Sales –FADURPE, em especial à Solange Leitão, Patrícia, Giselda, Christiane e Ivanilda Barbosa pela orientação e dedicação na compra de material de pesquisa.

A Granja Tangureira, em especial a pessoa do Sr. Allan Xerez, por ter cedido as matrizes suínas para o experimento e aos funcionários da granja pela ajuda nas coletas de campo.

Aos meus “labmates” e amigos: Yifang Huang, William Lagakos, Ynzul, André Luís S. Santiago, Francismá Gomes Júnior, Silvana Bastos, Helena C. de Oliveira e Roseane M. Ferreira de Souza, pelo apoio na execução do experimento e nas árduas horas de laboratório em busca de resultados.

À Prof.^a Dr.^a. Ilka Vasconcelos por ter aberto as portas do seu laboratório e aos seus orientados: Andréa, Geórgia, Henrique, Silvinha, Janne Keila, Hermógenes, Mirela e Juliana, pelo carinho e dedicação em tirar minhas dúvidas e me orientar.

Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado dando força e apoio durante todo o meu curso e durante a adaptação de minha vida nos Estados

Unidos: Luiz Antônio e Izabel Siano, Sílvia e Cecília Duarte, Rosely Golfetti, Leticia e Diogo Andrade, Mara e Tibérius Bonates, Álvaro Aroja, Leticia e Marco Brotto, Juliana e Cristiano Rêgo Barros, Ana Paula e José Henrique César, Lúcia Maia Ferreira, Catarina e Márcio Xavier, Cedric e Georgia Black, e a Luciana e Paulo Lisboa.

Agradeço também ao Prof. Dr. Breno Magalhães Freitas, Prof^a. Maria Elizimar Felizardo Guerreiro, Prof.^a Dr^a. Sônia Maria Pinheiro de Oliveira, George G. Gomes, e Francisca Beserra, que muito contribuíram para a execução da segunda fase de meu experimento em Fortaleza.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Helena Emília Cavalcanti da Costa Cordeiro Manso, nascida em 14 de outubro de 1969, natural de Recife-PE, filha mais velha dos 4 filhos de Pedro e Clélia. De família de fornecedores de cana-de-açúcar na Zona da Mata Norte do estado de Pernambuco, passou os onze primeiros anos de sua vida no Engenho Salgado, município de Nazaré da Mata, onde iniciou os estudos primários no Colégio Santa Cristina.

Em 1981, mudou-se para Recife e começou os estudos na 6ª série do Colégio das Damas da Instrução Cristã, onde concluiu os estudos em 1986. Em 1987 ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, tendo sido aprovada com a terceira maior nota.

Em 1990, nasceu o primeiro filho, Pedro Neto e logo em seguida, 1991, nasceu o segundo filho Luis Henrique, culminando com a conclusão do curso de Zootecnia, tendo sido laureada de turma e agraciada com o Prêmio Lauro Ramos Bezerra.

Em 1993, iniciou o curso de pós-graduação em nível de Mestrado no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), tendo como orientador Prof. Dr. Alberto Neves Costa, concluindo o curso em maio de 1996.

Em 1996 casou-se com o médico veterinário Hélio Cordeiro Manso Filho e, em 1997 foi aprovada no concurso de provas e títulos para professor efetivo no Departamento de Zootecnia da UFRPE, para a disciplina Cunicultura e Animais de Biotério.

Durante os anos de 2001 e 2002 atuou como Researcher Associated no Departamento de Nutritional Sciences da Rutgers University no estado de New Jersey- EUA, sob orientação do Dr. Malcolm Watford. Em 2003, iniciou o curso de pós- graduação em nível de Doutorado no Departamento de Animal Sciences da Rutgers University, sob a orientação do Dr. Malcolm Watford.

Em 2005, transferiu o curso de doutorado para o Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, atuando sob orientação conjunta dos Doutores Malcolm Watford e Luiz Euquerio de Carvalho.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Tabelas.....	<i>xv</i>
Lista de Figuras.....	<i>xvi</i>
Resumo Geral.....	<i>xviii</i>
Abstract.....	<i>xix</i>
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	20
CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA	23
1 ATIVIDADE DA GLUTAMINA SINTETASE: ASPECTOS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES E SEU PAPEL NO METABOLISMO ANIMAL.....	
1.1 Características físico-químicas da glutamina sintetase (GS).....	24
1.2 Expressão da glutamina sintetase (GS) e sua função no metabolismo animal.....	24
1.2.1 Expressão da glutamina sintetase (GS) no fígado.....	25
1.2.2 Expressão da glutamina sintetase (GS) no cérebro.....	25
1.2.3 Expressão da glutamina sintetase (GS) nos rins.....	26
1.2.4 Expressão da glutamina sintetase (GS) no músculo esquelético.....	26
1.2.5 Expressão da glutamina sintetase (GS) no trato gastro-intestinal.....	27
1.2.6 Expressão da glutamina sintetase (GS) nos pulmões.....	27
1.2.7 Expressão da glutamina sintetase (GS) no tecido adiposo.....	28
1.3 Regulação da expressão da glutamina sintetase (GS).....	28
1.3.1 Inibidores sintéticos da glutamina sintetase (GS).....	29
2 ASPECTOS BIOQUÍMICOS DA GLUTAMINA (GLN).....	30
2.1 Caracterização e importância da glutamina.....	30
2.2 Síntese da glutamina.....	36
2.3 Degradação da glutamina.....	37
2.4 Metabolismo da glutamina em homeostasia.....	40
2.5 Metabolismo da glutamina durante o estado catabólico.....	42
2.6 Glutamina como nutriente.....	44
3 CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES	45

4 REFERÊNCIAS.....	46
CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DA GLUTAMINA SINTETASE (GS) E DA CONCENTRAÇÃO DA GLUTAMINA (GLN) NO TERÇO FINAL DA GESTAÇÃO E NA LACTAÇÃO DE CAMUNDONGOS FÊMEAS PRIMÍPARAS	
Resumo.....	49
Abstract.....	50
1 INTRODUÇÃO.....	51
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.1 Local do experimento.....	55
2.2 Animais experimentais.....	55
2.3 Protocolo experimental.....	55
2.4 Variáveis estudadas.....	56
2.4.1 Amostras de sangue.....	56
2.4.2 Amostras dos tecidos.....	56
2.5 Protocolo experimental para análise das concentração de glutamina (Gln) e de glutamato (Glu) e alanina (Ala).....	57
2.6 Protocolo experimental para análise da expressão de glutamina sintetase (GS) e glutamato desidrogenase (GDH).....	58
2.7 Análise estatística.....	59
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
3.1 Variação do peso vivo de camundongos fêmeas primíparas.....	60
3.2 Expressão da glutamina sintetase (GS) no músculo esquelético de camundongos fêmeas primíparas.....	62
3.3 Expressão da glutamina sintetase (GS) e da glutamato desidrogenase (GDH) no fígado de camundongos fêmeas primíparas.....	63
3.4 Expressão da glutamina sintetase (GS) na glândula mamária de camundongos fêmeas primíparas.....	66
3.5 Concentração de glutamato (Glu), glutamina (Gln), e alanina (Ala) no sangue de camundongos fêmeas primíparas.....	68

3.6 Concentração de glutamato (Glu) e glutamina (Gln) no músculo esquelético de camundongos fêmeas primíparas.....	70
4 CONCLUSÕES.....	72
5 REFERÊNCIAS	73
CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA GLUTAMINA SINTETASE (GS) E DA CONCENTRAÇÃO DA GLUTAMINA (GLN) EM MATRIZES SUÍNAS PRIMÍPARAS SUPLEMENTADAS COM GLUTAMINA	
Resumo.....	75
Abstract.....	76
1 INTRODUÇÃO.....	77
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	81
2.1 Animais experimentais.....	81
2.2 Dietas experimentais.....	81
2.3 Suplementação das matrizes suínas primíparas.....	83
2.4 Coleta das amostras.....	84
2.4.1 Coleta e análise do músculo.....	84
2.4.2 Coleta e análise do sangue.....	85
2.4.3 Coleta e análise do leite.....	85
2.4.4 Avaliação do peso vivo.....	86
2.4.5 Avaliação da espessura de toucinho.....	87
2.5 Análise estatística.....	87
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
3.1 Concentração da glutamina (Gln) muscular de matrizes suínas primíparas.....	89
3.2 Concentração da glutamina (Gln) sanguínea de matrizes suínas primíparas.....	91
3.3 Concentração da glutamina (Gln) no leite de matrizes suínas primíparas.....	92
3.4 Avaliação do peso vivo de matrizes suínas primíparas.....	95
3.5 Avaliação da espessura de toucinho de matrizes suínas primíparas..	97

4 CONCLUSÕES.....	99
5 REFERÊNCIAS	100
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103
Anexo.....	105

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Características cinéticas das glutaminases.....	38
2. Composição química e participação dos ingredientes (%) nas rações comerciais.....	82

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Glutamina sintetase (GS) expressa no cérebro dos ratos.....	24
2. Esquema prático do metabolismo da glutamina na fase pós-absortiva.....	33
3. Genes regulados pela glutamina (Gln).....	35
4. Síntese da glutamina em tecidos animais.....	37
5. Principais órgãos consumidores e sintetizadores da glutamina durante o catabolismo.....	39
6. Metabolismo da glutamina entre os órgãos.....	43
7. Variação do peso vivo de camundongos fêmeas primíparas da cobertura ao desmame.....	60
8. Expressão da glutamina sintetase (GS) no músculo esquelético de camundongos fêmeas primíparas dos 3 dias antes parto ao desmame.....	62
9. Expressão da glutamina sintetase (GS) no fígado de camundongos fêmeas primíparas dos 3 dias antes do parto ao desmame.....	64
10. Expressão da glutamato desidrogenase (GDH) no fígado de camundongos fêmeas primíparas dos 3 dias antes do parto ao desmame.....	65
11. Expressão da glutamina sintetase (GS) no fígado de camundongos filhotes do nascimento ao desmame.....	66
12. Expressão da glutamina sintetase (GS) na glândula mamária de camundongos fêmeas primíparas dos 3 dias antes do parto ao desmame.....	67
13. Concentração sanguínea de glutamato (Glu), glutamina (Gln) e alanina (Ala) de camundongos fêmeas primíparas dos 3 dias antes do parto ao desmame.....	68
14. Concentração de glutamato (Glu) e glutamina (Gln) no músculo esquelético de camundongos fêmeas primíparas dos 3 dias antes do parto ao desmame.....	70

15. Comedouro individual automático para fornecimento da ração na fase de gestação de matrizes suínas primíparas.....	82
16. Distribuição do suplemento em comedouros individuais na fase de lactação de matrizes suínas primíparas.....	83
17. Biópsia muscular em matrizes suínas primíparas.....	84
18. Coleta do leite em matrizes suínas primíparas.....	86
19. Mensuração da espessura de toucinho com o emprego da ultrassom.....	87
20. Concentração da glutamina (Gln) muscular de matrizes suínas primíparas dos 30 dias antes do parto ao desmame.....	89
21. Concentração da glutamina (Gln) no sangue de matrizes suínas primíparas dos 30 dias antes do parto ao desmame.....	91
22. Concentração da glutamina (Gln) no leite de matrizes suínas primíparas do parto ao desmame.....	92
23. Avaliação do peso vivo de matrizes suínas primíparas dos 30 dias antes do parto ao desmame.....	95
24. Avaliação da espessura de toucinho de matrizes suínas primíparas dos 30 dias antes do parto ao desmame.....	97

RESUMO GERAL

A glutamina (Gln), aminoácido por ser não-essencial, não é tradicionalmente incluído nas rações animais. As propriedades metabólicas da Gln fazem dela um aminoácido condicionalmente essencial em períodos de estresse e catabolismo, quando o organismo não tem a habilidade de suprir em tempo hábil sua demanda nutricional. A presente pesquisa foi dividida em 2 partes, a primeira delas teve por objetivo de avaliar o metabolismo da glutamina (Gln) e da glutamina sintetase (GS) no período lactacional de camundongos fêmeas primíparas, a segunda parte teve o objetivo de avaliar os efeitos da suplementação da Gln na dieta, fornecida em 2 formas, uma delas, pura (L-glutamina) e uma outra associada ao ácido glutâmico (AminoGut® Ajinomoto) para matrizes suínas primíparas. No primeiro experimento caracterizou-se a importância da GS e da Gln e evidenciou-se o seu importante papel no metabolismo, quando o animal se encontrava em catabolismo. No segundo experimento, a glutamina mais uma vez demonstrou sua importância na manutenção da higidez da matriz. Mais estudos devem ser feitos no intuito de estabelecer níveis adequados de suplementação e de avaliar a subsequente performance reprodutiva de matrizes suínas assim como o desempenho dos leitões após o desmame.

ABSTRACT

The glutamine (Gln), a non-essential amino acid, normally it isn't included in the animal feed. The metabolic properties of glutamine made it an essential conditionally amino acid during stress and catabolism, when the body has no ability to attend the nutritional requirements. The present research was divided in two parts; the first one had the objective to characterize the glutamine (Gln) and the glutamine synthetase (GS) during lactation of primiparous mice and the second one, the aim was to evaluate the effects of glutamine supplementation, given in two forms, pure (L-glutamine) and in association with glutamic acid (AminoGut® by Ajinomoto) for primiparous gilts. In the first experiment was characterized the importance of GS and Gln, and the important role on the animal metabolism during a catabolism. In the second experiment was demonstrated the importance of Gln to maintain the gilt health. More studies should have to establish the adequate level of Gln supplementation and to evaluate the reproductive performance of gilts as well as the piglets development after weaning.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Nas últimas décadas, a produção animal tem evoluído consideravelmente com o intuito de obter animais cada vez mais prolíficos e produtivos e de minimizar os custos com alimentação que correspondem, na maioria das vezes, a 70% do custo final de produção.

As novas linhas de pesquisas que visam uma associação entre a produção animal tradicional e as técnicas de biologia molecular vêm melhorando a qualidade e a confiabilidade dos resultados obtidos, pois, agora não só temos parâmetros subjetivos, mas também dados da biologia molecular, dados estes que representam o que acontece em nível celular sobre cada parâmetro a ser analisado.

A glutamina sintetase (GS) e a glutamina (Gln) foram objetos de estudo pelas suas características metabólicas e bioquímicas. A GS, por ser a única enzima capaz de sintetizar a Gln em condições de homeostasia e sem referências científicas com relação ao seu comportamento durante o catabolismo. Por sua vez, a Gln pela sua importância na maioria dos processos metabólicos, principalmente no que diz respeito ao mecanismo de regulação de genes importantes e de seu papel fundamental durante o catabolismo, onde se questiona sua classificação bioquímica de aminoácido não-essencial para aminoácido condicionamente essencial durante o estresse.

As fases produtivas escolhidas foram a gestação e lactação, por serem importantes na cadeia produtiva e por se tratar de estudos fisiológicos com exigências aminoacídicas ainda pouco estudadas devido ao alto custo.

A presente pesquisa foi dividida em duas etapas. Na primeira etapa objetivou-se avaliar a expressão da GS e a concentração da Gln no terço final da gestação e durante a lactação de fêmeas primíparas. O modelo experimental escolhido foi o camundongo.

Foram coletadas amostras de sangue, músculo, fígado, glândula mamária e peso vivo de camundongos fêmeas aos 3 dias antes do parto, no dia do parto, 1^o, 3^o, 6^o e 16^o dias de lactação. As amostras de músculo e glândula mamária foram utilizadas para análise da expressão da glutamina sintetase; as amostras de fígado foram utilizadas para análise da expressão da GS e glutamato desidrogenase; as

amostras de sangue foram utilizadas para avaliar a concentração da Gln, glutamato e alanina.

A partir desses resultados pode-se verificar a importância da GS e da Gln durante o período de transição que vai do final da gestação à lactação. Este período de transição é caracterizado por um período de catabolismo, com grande perda de massa muscular das fêmeas e que pode trazer consequências desastrosas para o ciclo produtivo, como por exemplo, um longo período de intervalo entre o desmame e o próximo cio.

Apesar da glutamina ser um aminoácido não-essencial, mas não dispensável, pois vimos que apesar do organismo ter a capacidade fisiológica de suprir a demanda nutricional durante a homeostasia, esse comportamento não é o mesmo durante o período de estresse e/ou catabolismo. O organismo chega a um limite fisiológico que não consegue mais atender a demanda para manutenção de massa corporal e produção láctea

A partir desses resultados, a segunda parte da pesquisa foi feita com o objetivo de avaliar a expressão da GS e da concentração da Gln sob a condição de suplementação. O modelo experimental utilizado foi com leitoas primíparas, nos mesmos períodos produtivos ao anterior, ou seja, no terço final da gestação e durante a lactação, sob duas formas de suplementação. Uma forma de suplementação com L-glutamina (pura) em nível de 2,5% do total da dieta e uma outra forma de suplementação, o AminoGut, produto comercial da Ajinomoto, constituído de uma associação de L-glutamina e ácido glutâmico na forma de dipeptídeo, em nível de 2,5% do total da dieta.

Foram coletadas amostras de sangue, leite, músculo, sendo também determinado o peso vivo e espessura de toucinho aos 30 dias antes do parto, no dia do parto e no 7^o e 21^o dias de lactação. As amostras de sangue, leite e músculo foram utilizadas para determinação da concentração da Gln.

Estes resultados demonstraram mais uma vez a importância da Gln durante o catabolismo. Evidenciou-se a importância da suplementação em manter o status nutricional das fêmeas, assim como, a importância de elevar a concentração da Gln no leite para benefício futuro da sanidade dos leitões.

CAPÍTULO I

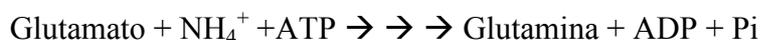
REVISÃO DE LITERATURA

1 ATIVIDADE DA GLUTAMINA SINTETASE: ASPECTOS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES E SEU PAPEL NO METABOLISMO ANIMAL

A glutamina sintetase (GS; [EC 6.3.1.2]) é uma enzima que cataliza uma reação dependente da adenosina trifosfato (ATP) com a amônia e o glutamato, formando a glutamina. Nos mamíferos, a GS é expressa em todos os tecidos para produção de glutamina e síntese de purinas e açúcares aminados. Porém, a GS é expressa em maior intensidade nos tecidos com altas concentrações de amônia e/ou desintoxicação do glutamato (Watford, 2004).

A GS é a única enzima capaz de promover a síntese *do novo* da glutamina em tecidos animais da seguinte forma:5

GS



Em condições normais e em repouso os seres humanos produzem aproximadamente 90 mmoles por dia de glutamina, 90% derivado do sistema portal e 10% dos rins. A amônia produzida pelo intestino é removida depois da passagem do sangue pelo fígado. A biosíntese celular da glutamina é importante por permitir o transporte de nitrogênio não-tóxico entre os tecidos do corpo. Pelos motivos acima citados e por muitos outros, a glutamina é um importante mediador do catabolismo dos aminoácidos, servindo como substrato para a síntese de uréia hepática e amoniagênese renal, mantendo o equilíbrio ácido-base (Lie-Venema, 1997).

O objetivo desta revisão foi retratar os aspectos bioquímicos e moleculares da glutamina sintetase, assim como o seu papel no metabolismo animal.

1.1 Características físico-químicas da glutamina sintetase (GS)

Os genes da glutamina sintetase (GS) têm sido clonados em muitas espécies animais. Existem três tipos principais de GS: GS-I, GS-II e GS III. A GS-I é encontrada apenas em procariotes e consiste em 12 subunidades idênticas em 2 anéis. A GS-II é encontrada tanto nos procariotes como nos eucariotes e possui oito subunidades (dois anéis com quatro subunidades) com a ausência do terminal-C na porção do GS-I. A GS-III, constituída de seis subunidades é encontrada em 3 espécies de bactérias. Nos mamíferos a GS é uma enzima citoplasmática (Lie-Venema, 1997).

A glutamina sintetase possui 45 kDa, e tem sido bem caracterizada através de técnicas de Western blot (Figura 1).

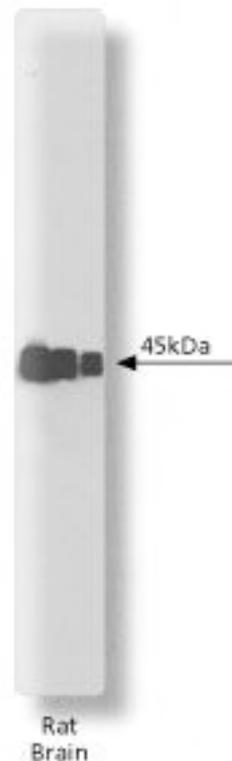


Figura 1 – Glutamina sintetase expressa no cérebro de ratos.

1.2 Expressão da glutamina sintetase (GS) e sua função no metabolismo animal

A GS é expressa em níveis baixos em todos os tecidos, porém algumas células possuem mais de 500 mil moléculas de GS, contribuindo, aproximadamente, com 3,5% das proteínas celulares (Lie-Venema *et al.*, 1995).

1.2.1 Expressão da glutamina sintetase (GS) no fígado

A atividade específica da GS no fígado dos mamíferos é de aproximadamente $12 \mu\text{mol.mg prote\u00edna}^{-1}.\text{min}^{-1}$. As células pericentrais do fígado contêm aproximadamente 7 mg de enzima por grama, 160 μM ou 3,5% de proteína celular. A expressão nas células pericentrais se desenvolve nos períodos finais da vida fetal. No fígado dos roedores adultos, a expressão da GS é idêntica tanto em nível de mRNA quanto em nível de proteína, indicando a regulação pré-translacional em posição específica (Lie-Venema, 1997).

Dependendo da posição nos hepatócitos, a GS é mais ou menos abundante. A área na parte de baixo da posição pericentral dos hepatócitos possui maior acúmulo de GS, quando comparada com a área acima da posição central dos hepatócitos, onde a glutaminase é mais abundante (Lie-Venema *et al.*, 1995).

A principal função da GS no fígado é manter a homeostasia da amônia e do bicarbonato no corpo. Normalmente, a glutamina vem dos tecidos periféricos até os tecidos esplânticos e serve como combustível para a mucosa intestinal e síntese de uréia (Lie-Venema, 1997).

1.2.2 Expressão da glutamina sintetase (GS) no cérebro

A GS está presente na porção protoplasmática dos astrócitos da massa cinzenta e corresponde a cinco vezes ou 40 μM a concentração total do cérebro. Sua distribuição é mais pronunciada no homem do que no rato, onde o baixo nível de GS é também achado na massa branca do cérebro. Dentro dos astrócitos, a GS é concentrada dentro da mitocôndria, perto das sinapses glutamatoenergéticas, refletindo seu papel no metabolismo do glutamato. A célula glial, produtora de mielina, também expressa a GS, só que em níveis mais baixos do que nos astrócitos (Lie-Venema, 1997).

A glutamina no cérebro representa um papel importante como precursora do glutamato neuronal, maior neurotransmissor excitatório e do ácido gama-aminobutírico (GABA), maior neurotransmissor inibitório. A glutamina é sintetizada através do glutamato e da amônia existente nos astrócitos e é transportada até os neurônios (Lie-Venema, 1997). Este mecanismo é conhecido

como glutamato-glutamina “shuttle”, pois a glutamina sintetizada neste compartimento não contribui para o metabolismo do corpo como um todo.

1.2.3 Expressão da glutamina sintetase (GS) nos rins

A glutamina é expressa nos rins de ratos, camundongos, hamsters, porcos da Índia, coelhos e ovelhas, mas não é encontrada nos rins de suínos, cães, gatos, macacos, homens e galinhas. A razão para esta diferenciação não é bem entendida, porém pode estar associada com a excreção de urina mais ácida, seguida de maior excreção de NH_4^+ , e tem sido associada à ausência de GS. Os mais altos níveis de GS estão presentes na porção distal-proximal dos túbulos renais de ratos e camundongos. Nos coelhos, a GS é expressa em maiores níveis na parte proximal dos túbulos renais. A concentração de GS nas células epiteliais tubulares é de aproximadamente 30 μM (Lie-Venema, 1997).

Nos rins dos animais que não expressam GS, os seus nefrões são consumidores de glutamina, já para os animais que expressam GS, os nefrões são produtores ou consumidores dependendo do balanço ácido-base. Uma situação é unânime, para os dois grupos, a acidose é combatida redirecionando o fluxo da glutamina para outros órgãos (Lie-Venema *et al.*, 1995).

A glutamina é o maior substrato da amoniogênese durante a acidose metabólica, onde encontra-se uma maior concentração da glutamina na circulação, em torno de 40% (Lie-Venema, 1997).

1.2.4 Expressão da glutamina sintetase (GS) no músculo esquelético

A GS no músculo tem uma importância fundamental. Devido à quantidade de massa muscular em relação ao corpo, a GS muscular é o principal responsável pelo fornecimento de glutamina para o corpo. Juntamente com os aminoácidos de cadeia ramificada, a glutamina muscular é o principal doador do grupo amino (Lie-Venema, 1997).

As fibras musculares vermelhas de contração lenta (FVCL) possuem baixa concentração de GS, seguidas das fibras musculares vermelhas de contração rápida (FVCR) e das fibras musculares brancas de contração rápida (FBCR). A diferença entre a concentração de GS entre FVCL e FBCR chega a ser o dobro. A

atividade da GS no músculo é de aproximadamente $0.5 \mu\text{M.g tecido}^{-1}.\text{min}^{-1}$ e a concentração celular é de $1 \mu\text{M}$. O mRNA no músculo aumenta de acordo com a síntese protéica, indicando assim uma regulação pós-transcricional. No entanto, a GS no músculo cardíaco é baixa (Lie-Venema, 1997).

1.2.5 Expressão da glutamina sintetase (GS) no trato gastro-intestinal

A expressão da GS pelo trato digestório não é homogênea. Nos roedores, ruminantes e galinhas, mRNA-GS celular e proteína possuem os maiores níveis no estômago e cólon, e níveis mais baixos no intestino delgado. Para roedores e ovelhas, os níveis mais altos são na porção distal do estômago, na parte mais ácida. Para os ratos e camundongos, o mRNA GS e a proteína estão localizados nas criptas intestinais (Lie-Venema, 1997).

A mucosa intestinal é o principal sítio de catabolismo da glutamina, que é liberada para os outros tecidos, embora os enterócitos contribuam com 30 - 35% na biossíntese. O catabolismo da glutamina é linearmente relacionado com as concentrações plasmáticas da glutamina; sendo que o intestino diminui o consumo quando há pouca glutamina circulante. Esta mesma situação ocorre com o excesso de glucocorticóides, privação alimentar, acidose metabólica e diabetes (Lie-Venema, 1997).

1.2.6 Expressão da glutamina sintetase (GS) nos pulmões

Nos pulmões de ratos e camundongos, a GS e mRNA podem ser visualizados no epitélio dos brônquios com uma atividade de $0.5 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Levando-se em consideração que o epitélio respiratório representa 15% da massa dos pulmões, a concentração de GS neste órgão é de aproximadamente $6 \mu\text{M}$. Juntamente com o músculo, o pulmão é quantitativamente importante para a biossíntese da glutamina (Lie-Venema, 1997).

1.2.7 Expressão da glutamina sintetase (GS) no tecido adiposo

A concentração citoplasmática da GS no tecido adiposo é de sete μM . A atividade da GS aumenta em até duas vezes quando submetida à baixas temperaturas, mas apenas o tecido adiposo branco parece ser sensível à alimentação. O tecido adiposo juntamente com músculo e pulmão são os principais órgãos produtores de glutamina (Lie-Venema, 1997).

1.3 Regulação da expressão da glutamina sintetase (GS)

A regulação da GS em tecidos de mamíferos é feita por 2 mecanismos: aumento da transcrição em resposta a ação hormonal e regulação da estabilidade da proteína em resposta à concentração da glutamina (Labow *et al.*, 2001).

A relação proteína GS: mRNA é similar no cérebro, rins e fígado e até 10 vezes mais baixa no intestino delgado, pulmão e músculo. No músculo, as fibras brancas (glicolíticas) possuem duas vezes menos proteína GS: mRNA do que as fibras vermelhas (oxidativas). O tratamento com glucocorticóides diminui em duas vezes a relação proteína GS: mRNA nos pulmões (Lie-Venema, 1997)

Os glucocorticóides são reconhecidamente os indutores da GS. No fígado e nos rins, o hormônio do crescimento aumenta a expressão da GS e o AMP cíclico suprime a expressão (Lie-Venema, 1997).

A resposta transcricional da GS em ratos tratados com glucocorticóides tem sido atribuída a duas regiões: uma perto de 6kb, acima do sítio que se inicia a transcrição, e uma outra dentro do primeiro gene intron (Labow *et al.*, 2001).

Apesar da resposta transcricional, a GS nem sempre aumenta com a mRNA-GS, o que sugere uma regulação pós-transcricional. Estudos com células musculares tipo L2 mostraram que a concentração de glutamina não afetou a expressão de mRNA-GS (Labow *et al.*, 2001).

A regulação pós-transcricional depende do tempo de meia vida da proteína. No fígado e no cérebro, o tempo de meia vida da GS é de quatro a cinco dias. Em cultura celular, a GS tem o tempo de meia vida menor, sendo de 24 horas nas células adiposas (Lie-Venema, 1997).

A presença de glutamina regula a expressão da GS via pós-transcrição na qual a taxa de degradação da proteína é alterada. Por outro lado, a concentração da glutamina é capaz de promover a síntese protéica. Foi o que constatou Labow *et al.* (2001), demonstraram o efeito do dexametasona (DEX) no aumento da expressão da GS. Quando a concentração da glutamina diminuiu de 2 para 0,5 mmol/l, a expressão da GS duplicou e o aumento da expressão foi de até 10 vezes com a concentração zero de glutamina.

Os íons metálicos, tais como Fe^{2+} e Cu^{2+} , se ligam ao Mg^{2+} nos sítios da GS e, em seguida, reagem com H_2O_2 ou O_2 liberando radicais livres e oxidando a histidina. Essa reação diminui a expressão da GS (Lie-Venema, 1997).

O tempo de meia vida do mRNA-GS é de aproximadamente duas horas em células adiposas e de aproximadamente seis horas em células musculares. A estabilidade do mRNA-GS não foi afetada pelos glucocorticóides nem pela insulina, mas diminuiu em torno 50% na presença de AMP cíclico (Lie-Venema, 1997).

1.3.1 Inibidores sintéticos da glutamina sintetase (GS)

Os inibidores da GS têm sido estudados amplamente, para que se possa entender os mecanismos cinéticos, com o objetivo de caracterizar a regulação da enzima. A metionina sulfoxaxina (MSO) é um dos mais conhecidos inibidores da GS e também o mais estudado. O MSO compete com o glutamato pela ligação no sítio ativo. Na presença de ATP, a GS é fosforilada pelo MSO resultando numa enzima essencialmente irreversível (Eisenberg *et al.*, 2000).

2 ASPECTOS BIOQUÍMICOS DA GLUTAMINA (GLN)

A glutamina é um aminoácido não-essencial em condições de homeostasia e condicionalmente essencial no catabolismo intenso. No pH fisiológico, o grupo carboxil da glutamina é carregado negativamente e o grupo amino é carregado positivamente, com carga líquida zero, conseqüentemente um aminoácido neutro.

Devido aos inúmeros processos metabólicos em que a glutamina participa, e ao seu papel na recuperação de animais doentes ou que passaram por uma situação de estresse, pesquisas têm se intensificado bastante nas últimas décadas, no intuito de estabelecer a glutamina como um aminoácido condicionamente essencial à saúde.

O objetivo desta revisão foi abordar os aspectos bioquímicos da glutamina, tais como: caracterização, importância, funções, síntese e degradação.

2.1 Caracterização e importância da glutamina

A glutamina é o α aminoácido livre mais abundante no nosso organismo, variando de 0,5 a 0,8 mM no plasma até 20 mM no músculo esquelético, sendo que 98% da glutamina distribuída no interior da célula. Seu *turnover* é muito rápido e a maioria da glutamina dietética é sintetizada pelo intestino delgado. Muitos autores o chamam de: o essencial “não-essencial” aminoácido (Watford, 2004).

A glutamina é classificada como um aminoácido não-essencial, porém existem várias controvérsias quanto a sua essencialidade. A classificação de não-essencial diz respeito à independência do nosso organismo em sintetizá-lo, o que não significa que ele não seja essencial ou menos importante que os outros (Watford, 2004).

Como funções específicas, a glutamina é utilizada como fonte de energia para a síntese dos nucleotídeos e, mais especificamente, para todas as células de crescimento rápido, tais como os enterócitos e as células do sistema imunológico (macrófagos, linfócitos e tímócitos). Quando ocorre uma deficiência na disponibilidade de glutamina, pode ocorrer uma atrofia nas vilosidades intestinais e uma diminuição nas defesas do organismo. Segundo Loble *et al.* (2001), essa

exigência da glutamina pelas células de crescimento rápido poderá envolver o papel da glutamina como fornecedora de metade da exigência de N para síntese de purina e pirimidina via ação da carbamoilfosfato sintetase II do citosol.

No cérebro, a glutamina é substrato para a produção tanto dos neurotransmissores excitatório como inibitório (glutamato e ácido gamaaminobutírico – GABA, respectivamente) e, também, como importante fonte de energia para o cérebro, em tempo de escassez de glucose, além de proteger o corpo e o cérebro da toxicidade da amônia e manter a homeostasia do pH. A glutamina possui poder tamponante. Quando o pH do sangue está muito ácido, mais glutamina é liberada pelos rins, liberando os íons bicarbonato e corrigindo a acidose. Se o pH do sangue estiver muito alcalino, mais glutamina é enviada para o fígado, onde íons hidrogênio são liberados, corrigindo a alcalinidade do sangue (Watford, 2004).

Devido ao seu sistema de transporte na parede celular ser sódio dependente, a glutamina é um dos aminoácidos que controla o volume de água na célula e, conseqüentemente, regula a pressão osmótica (Watford, 2004). A glutamina também regula a expressão de certos genes, e a biossíntese do DNA e do RNA. Recentemente, O'Connell e Keegan (2006) descobriram que a adenosina desaminase atua como RNA (ADARs) e converte adenosina em inosina em dupla hélice. Essa adenosina específica na posição de transcrição *GlnR-B* da glutamina /arginina possui grande influência na tradução de proteínas.

Um fato importante é que a glutamina é um aminoácido não essencial, sintetizado de acordo com a necessidade do organismo. Porém, em situações de estresse, doenças infecciosas, queimaduras e outras situações que ocasionam um catabolismo intenso, como por exemplo a lactação, a glutamina não é produzida em quantidade suficiente apesar de sua condição de aminoácido não-essencial. Por isso, existe a indicação de se chamar a glutamina de aminoácido condicionalmente essencial, pois, dependendo do estado fisiológico ou da higidez do animal deverá ocorrer a suplementação com glutamina (Wu, 2005).

No sistema imunológico, a glutamina é o substrato da glutathione, um tripeptídeo que desempenha um papel fundamental como antioxidante, aumentando a resposta imunológica. A suplementação de 40 g de glutamina pode ser usada para manter o equilíbrio do sistema imunológico de pacientes com AIDS e câncer. A ativação dos macrófagos estimula o consumo de glutamina

devido a uma maior demanda de arginina pelos macrófagos que foram ativados (Newsholme, 2001).

Como um importante doador de nitrogênio e carbono, a glutamina desempenha papel fundamental na produção de massa muscular, assim como ajuda a repor as reservas de glicogênio após o exercício. O papel da glutamina nos músculos parece ser mais acentuado no caso de levantamento de peso, que normalmente provoca danos nas fibras musculares; com isso a glutamina ajuda a sintetizar mais proteína e recompor o músculo que sofreu dano muscular. A glutamina não é sintetizada apenas no músculo, visto que pode facilmente doar nitrogênio em qualquer parte do corpo (Watford, 2004).

No músculo cardíaco, a glutamina representa uma importante fonte energética. A glutamina é convertida para glutamato, o qual entra no ciclo de Krebs e produz ATP. É também por esta razão que a glutamina é tão importante durante o exercício. A glutamina pode induzir o crescimento e a maturação dos cardiomiócitos através do aumento de mRNAs das proteínas contráteis, tais como a α -miosina de alto peso molecular (α MHC) e α -actina cardíaca. Essas proteínas estão associadas fisiologicamente à hipertrofia muscular cardíaca (Curi *et al.*, 2004).

A glutamina pode entrar no ciclo de Krebs e servir como uma fonte de energia sem ser proveniente do carboidrato. Em caso de escassez de glucose, ou seja falta de alimento, a glutamina é rapidamente catabolizada no fígado e mais glucose é disponibilizada para o metabolismo. Junto com a alanina, glicina e treonina, a glutamina é a mais importante fonte gluconeogênica. Com isso, menos tecido muscular será catabolizado para suprir a demanda de glucose necessária para a homeostase do animal (Watford, 2004).

A glutamina é metabolizada dentro dos enterócitos e os produtos finais são: CO₂, alanina, prolina, lactato, citrulina e amônia. Com isso disponibiliza energia (ATP) para os enterócitos e previne a liberação de grande quantidade de glutamato. Na fase pós-absortiva, a glutamina é usada como energia respiratória (Watford, 2004).

De modo geral, o intestino e os rins são os principais órgãos consumidores de glutamina enquanto que o fígado, pulmões, músculo esquelético e tecido adiposo são os principais órgãos sintetizadores de glutamina (Figura 2).

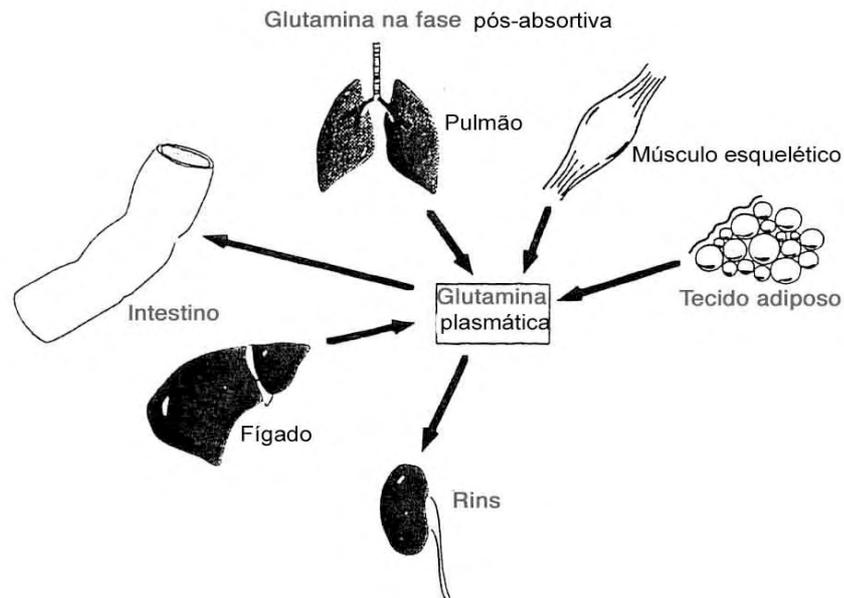


Figura 2 - Esquema prático do metabolismo da glutamina na fase pós-absortiva (Watford, 2004).

Segundo Watford (2004) e Wu (2005), algumas funções da glutamina podem ser assim resumidas:

- Servir como combustível respiratório para as células e tecidos de divisão rápida;
- Participação na gluconeogênese, como substrato e importante regulador da expressão da fosfenolpiruvato quinase;
- Participação na ureagênese, como importante substrato e regulador da expressão da argininosuccinato sintase (ASS) e disponibilidade de N-acetil glutamato (NAG);
- Participação na produção renal da amônia, regulando assim o balanço ácido-base;
- Participação na síntese de purinas e pirimidinas, importantes na proliferação celular;
- Participação na síntese da glutatona, importante antioxidante;

- Participação na síntese de amino açúcares;
- Regulação da homeostasia celular através da inibição da apoptose;
- Participação na síntese de proteína muscular e na inibição da degradação da proteína muscular dependente da ubiquitina;
- Participação na formação da matriz celular, ajudando no crescimento e remodelagem dos tecidos;
- Participação na síntese de proteínas de choque térmico, como mecanismo de defesa celular;
- Participação na síntese de aminoácidos: alanina, citrulina, prolina e arginina no intestino delgado;
- Regulação da síntese de óxido nítrico (NO) a partir da arginina em células endoteliais controlando o fluxo sanguíneo e a absorção de nutrientes;
- Participação na expressão de iNOS nos macrófagos (produção de NO pela iNOS);
- Estimulação da secreção da insulina pelas células β do pâncreas;
- Inibição da produção de glicocorticóides pela glândula suprarrenal;
- Modulação da ação da insulina no tecido adiposo e musculatura esquelética através da detecção da glucosamina;
- Estimulação da secreção do hormônio de crescimento;
- Participação na produção das citocinas;

Curi et al. (2004) citaram vários genes os quais a glutamina atua na regulando a expressão genética e a ativação de proteínas (Figura 3).

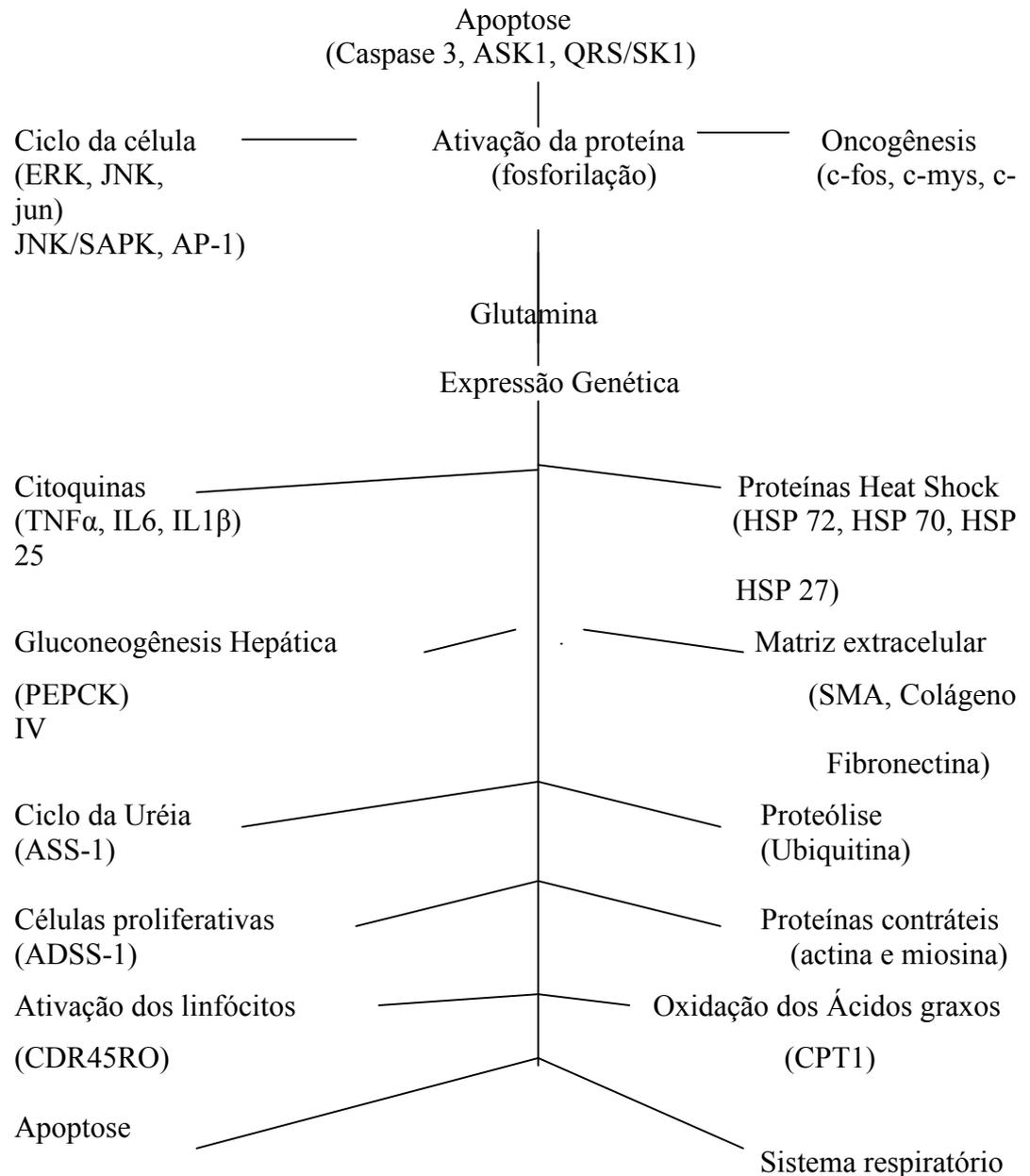


Figura 3 – Genes regulados pela glutamina (Gln) (Curi et al., 2004).

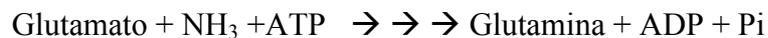
Durante o exercício, a glutamina também exerce um papel importante na imunodepressão pós-exercício. No plasma, a glutamina diminui em torno de 25% depois de um exercício prolongado e exaustivo, como por exemplo, nos corredores de maratona. Essa diminuição é transitória, em torno de seis horas após

a corrida. Já para atletas, submetidos a exercícios de curta duração, a concentração plasmática de glutamina aumenta. Outra informação importante é que os ciclistas em repouso, possuem altas concentrações de glutamina no plasma em relação a qualquer outro esporte; também foi encontrado uma correlação inversa entre a concentração plasmática de glutamina e a proteína dietética relativa à massa corporal (Castell e Newsholme, 2001).

2.2 Síntese da glutamina

Os principais órgãos de síntese da glutamina são: músculo, fígado, tecido adiposo e rins. O caminho exato dos precursores imediatos não está completamente elucidado. Segundo Watford (2004), o carbono da valina e da isoleucina são convertidos no carbono da glutamina do músculo. Contudo, a glutamina sintetase (GS) cataliza a reação final. Essa reação é irreversível e requer energia.

GS



Milman *et al.* (1975) fizeram uma avaliação histoquímica da atividade da GS de acordo com a concentração da glutamina em cultura celular de hamster chineses, e encontraram que a atividade da GS é inversamente proporcional a concentração da glutamina. A atividade da GS aumentou de oito a 10 vezes na ausência da glutamina. Quando a glutamina foi acrescida na solução, a atividade enzimática da GS foi suprimida rapidamente. A actomicina D tem pouco efeito na indução ou supressão indicando que essa regulação não acontece durante a síntese de RNA mensageiro. A cicloheximida bloqueou a indução, mas não a supressão, indicando, assim, que durante a síntese de proteína foi requerido o aumento e não a diminuição da atividade enzimática da GS.

A glutamina no plasma e tecidos dos suínos é derivada principalmente da síntese endógena. Segundo Wu (2005) o nitrogênio da glutamina é transferido dos aminoácidos de cadeias ramificadas (leucina, isoleucina e valina), principalmente no músculo esquelético, no tecido adiposo e na placenta (Figura 4).

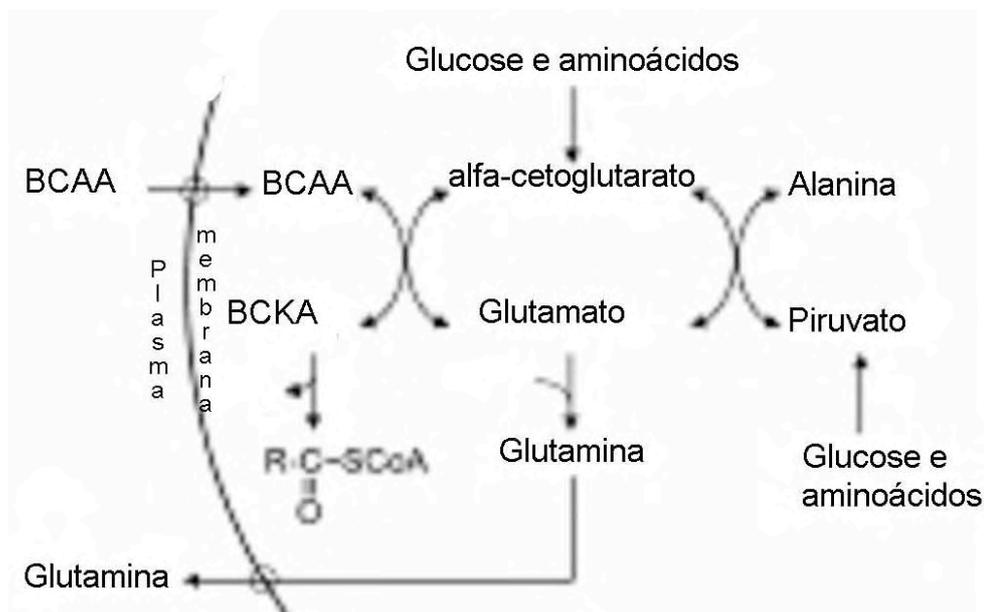


Figura 4: Síntese da glutamina em tecidos animais (Wu, 2005).

Haberle *et al.* (2005) relataram que existe uma deficiência congênita da glutamina ocasionada por uma mutação da glutamina sintetase. A inativação da glutamina sintetase ocorreu pela mudança no alelo R341C, causando a mutação. A glutamina era totalmente ausente no plasma, mas o nível de glutamato era normal.

No músculo esquelético, a GS foi sensível aos glucocorticóides e, em resposta ao estresse; a GS teve sua atividade aumentada e a glutamina foi liberada na corrente sanguínea, diminuindo, assim, a sua concentração intracelular e aumentando a proteólise muscular (Newsholme, 2001).

2.3 Degradação da glutamina

A maior rota de utilização da glutamina inicia-se com a glutaminase que é uma enzima que depende do fosfato para ser ativada. Essa enzima existe em duas isoformas, no fígado e nos rins, e em outros tecidos. No fígado, a amônia é liberada diretamente para a síntese da uréia (Watford, 2004).

As isoformas da glutaminase diferem não apenas no pH e na inibição pelo glutamato, mas em outras características cinéticas e na estrutura da proteína (Tabela 1). Nos rins, temos a glutaminase que é encontrada na maioria dos tecidos, incluindo o fígado dos fetos, mas que não está presente no fígado após o nascimento (Watford, 1993).

Tabela 1- Características cinéticas das glutaminases

	Fígado	Rins
K _{0.5} glutamina	8-40 mM	2-5 mM
K _{0.5} Pi	28 mM	74 mM
Inibição pelo glutamato	Não	Sim
Ativação pela NH ₃	Sim	Não
Polimerização no borato	Não	Sim
Tamanho	58 kDa	68 e 65 kDa
mRNA	2.8 kb	6.0 e 3.4 kb

Fonte: Watford (1993)

Em situações de estresse, o trato gastrointestinal é o principal órgão de consumo e utilização da glutamina. A mucosa intestinal contém células secretórias, imunes e neuro-endócrinas, além dos inúmeros enterócitos absorptivos. Portanto, o intestino percebe o ambiente nutricional e antigênico e atua na triagem imunológica e na defesa (Burrin *et al.*, 2000).

Durante o catabolismo, podemos observar que o músculo esquelético passa a ser o principal órgão sintetizador de glutamina, juntamente com pulmão e o tecido adiposo (Figura 5).

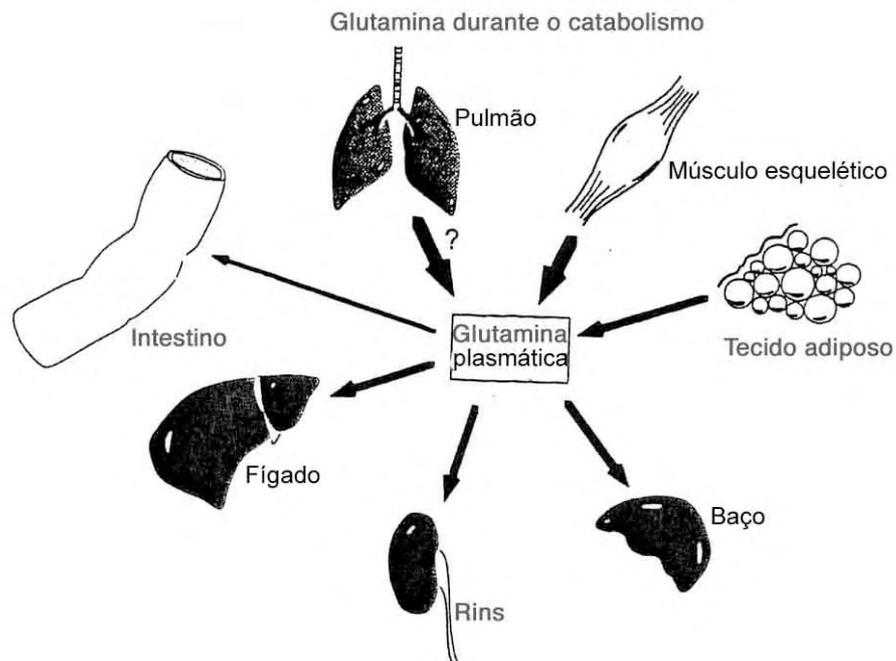


Figura 5 - Principais órgãos consumidores e sintetizadores da glutamina durante o catabolismo (Watford, 2004).

Sob a regulação a curto prazo, a glutaminase renal produz mais amônia durante a acidose, aumentando a utilização do α -cetogluturato (pela ativação da α -cetogluturato desidrogenase ou pela elevação da fosfenolpiruvato kinase) para baixar as concentrações intracelulares do α -cetogluturato e, conseqüentemente, do glutamato. Com baixos níveis de glutamato, ocorre uma menor inibição da glutaminase e altas taxas de produção de amônia. No fígado, a ativação da glutaminase parece ser devida à mudança no volume da mitocôndria. A longo prazo, a atividade da glutaminase renal é aumentada pela acidose e diminuída pela alcalinidade metabólica, respectivamente. A glutaminase hepática é pouco estudada devido a sua atividade estar relacionada à quantidade de enzima existente e devido a esta enzima no fígado funcionar em equilíbrio (Watford, 1993).

Lobley *et al.* (2001) relataram que em condições de elevada degradação de proteína, a glutamina pode atuar como um regulador metabólico para aumentar a síntese de proteína e reduzir o catabolismo protéico. Estas circunstâncias podem incluir infecção, inflamação, início de lactação ou subnutrição.

A utilização pós-operatória acelerada da glutamina circulante foi relatada por Souba e Wilmore (1983), onde depois do estresse de uma laparotomia, o consumo de glutamina pelo trato intestinal aumentou em 75% e culminou com a diminuição da utilização da glicose circulante. Segundo Newsholme (2001), essa utilização acelerada pode ter tido como objetivo suprir as exigências de energia e de nitrogênio do intestino quando o consumo de alimentos foi interrompido. Este mesmo autor salientou que a liberação da glutamina excede a síntese no músculo esquelético quando há estresse, resultando em uma redução da concentração intracelular de glutamina e taxas crescentes de degradação de proteína.

2.4 Metabolismo da glutamina em homeostasia

A divisão bioquímica do metabolismo da glutamina reflete uma compartimentalização intracelular, pois a síntese de purina, pirimidina e de açúcares aminados ocorre no citoplasma, enquanto que o metabolismo do esqueleto carbono da glutamina se inicia por sua deaminação pela glutaminase dependente de fosfato na mitocôndria (Curthoys e Watford, 1995).

A glutamina dietética é absorvida e metabolizada nos enterócitos promovendo energia para os mesmos. A liberação de grande quantidade de amônia dentro do sistema portal não é perigosa e é rapidamente desintoxicada no fígado. O que não está claro é a preferência dos enterócitos pela glutamina. É possível que quando a glutamina seja catabolizada no intestino, diminua o fluxo de aminoácido em direção ao fígado e com isso menos ATP seja gerado. Porém, não se sabe, também, porque uma variedade de outras células prefere a glutamina como principal fonte energética. Como exemplo pode-se citar as células do sistema imunológico, muitos tecidos fetais e muitas células cancerígenas. Essas células usam uma grande quantidade de glutamina e, normalmente, liberam amônia e aspartato como produtos finais (Watford, 2004).

O intestino delgado cataboliza amplamente a glutamina arterial e enteral. Os suínos extraem cerca de 30% da glutamina arterial na primeira passagem, na pós-absorção, e degradam a maior parte da glutamina fornecida pela alimentação enteral (Wu, 1998).

O nitrogênio amida da glutamina é utilizado para a síntese de purinas, pirimidinas e de açúcares aminados. O carbono e o α amino grupo são encaminhados para a síntese de outros aminoácidos, principalmente, prolina, ornitina e arginina (Wu, 1998).

No fígado, a glutamina é absorvida e hidrolizada, sendo que o carbono é usado para gluconeogênese e o nitrogênio vai para a síntese de uréia. O fígado é também capaz de sintetizar a glutamina e o metabolismo desta ocorre em equilíbrio com a ação da glutaminase e da glutamina sintetase. Devido ao fato desta reação ocorrer em equilíbrio, é difícil a compreensão de como a glutamina sintetizada no fígado pode contribuir para os níveis de glutamina circulante (Watford, 2004). O grupo amido recebe atenção particular por causa do envolvimento com a desintoxicação da amônia e na homeostasia ácido-base (Lobley *et al.*, 2001).

Os rins, durante o processo da acidose metabólica, excretam uma grande quantidade de íons amônio e outros cátions. A amônia é gerada do catabolismo da glutamina dentro dos rins e os carbonos da glutamina são usados para sintetizar a glucose e bicarbonato, conseqüentemente, mantendo a homeostasia ácido-base (Watford, 2004). Durante a acidose, os roedores têm a habilidade de mudar o metabolismo da glutamina, da síntese de uréia para a síntese de glutamina no fígado (May *et al.*, 1992).

Apesar do cérebro não liberar glutamina na circulação, a importância da glutamina neste órgão se dá pelo seu metabolismo interno. As células gliais sintetizam e liberam a glutamina e, em seguida, é absorvida pelos neurônios, e por sua vez, é hidrolizada para glutamato e, em seguida, liberado. Depois de sintetizado o glutamato, este volta para as células gliais e resintetiza a glutamina. Parte do glutamato é também utilizada para a síntese do neurotransmissor inibitório, ácido α -aminobutírico (GABA), via descarboxilação (Watford, 2004).

A glândula mamária possui altos níveis de utilização da glutamina, e neste caso, a glutamina é secretada no leite como aminoácido livre.

A necessidade de glutamina no sistema imunológico difere entre as espécies. Para os linfócitos *in vitro* da espécie bovina, a glutamina promove apenas 30% do ATP proveniente da glucose. Nos roedores, a preferência do ATP proveniente da glutamina é igual ao da glucose (Wu *et al.*, 1991). Nos suínos, a

situação é similar à espécie bovina, com a glicose promovendo três vezes mais ATP do que a glutamina (Dugan *et al.*, 1994).

A glutamina é o principal precursor da gluconeogênese renal e alanina é o principal precursor da gluconeogênese hepática. Juntos eles regulam a proteólise muscular culminando com a formação da glicose nos rins e no fígado (Garber *et al.*, 1976).

2.5 Metabolismo da glutamina durante o estado catabólico

O estado catabólico é conhecido pelo balanço energético negativo. Durante o catabolismo, os níveis plasmáticos de glutamina são insuficientes para atender a demanda. O estresse catabólico compromete o sistema imunológico, requerendo um aumento na mobilização do nitrogênio muscular para manter a homeostasia.

A resposta ao estresse consiste em uma série de eventos neurohormonais, mediados pelo sistema nervoso simpático, glucagon, cortisol, insulina, hormônio do crescimento, citocinas e lipídios mediadores (Figura 6). A resposta se inicia pela diminuição do metabolismo e do consumo de oxigênio, e mobilização da energia apenas para os órgãos vitais. A energia é suprida pelo aumento da glicose no sangue recrutada pelas reservas de glicogênio no fígado e músculo através da glucogenólise e, em menor parte, pelo catabolismo das proteínas, fornecendo aminoácidos para a gluconeogênese. Com 60 horas após o trauma, as reservas de glicogênio se acabam e a gluconeogênese passa a ser o caminho mais importante para suprir as necessidades energéticas. Adicionalmente, uma grande quantidade de aminoácido é liberada pelos músculos para atender a demanda de energia e, conseqüentemente, ocorre uma perda de proteína muscular, aumento da ureagênese e um balanço negativo do nitrogênio. Com 14 dias após o trauma, o hipercatabolismo pode resultar na perda de proteínas essenciais e o desenvolvimento de sérias complicações, até mesmo falência dos órgãos (Wilmore, 1983).

A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no corpo, sendo formada principalmente no músculo esquelético e depois liberada em grandes quantidades durante o catabolismo para suprir as demandas energéticas nas áreas esplânticas, fígado e células do sistema imunológico. Durante o estado catabólico,

a glutamina é importante para o intestino, pois os enterócitos e os linfócitos usam a glutamina como principal fonte energética, mantendo a integridade da mucosa intestinal. O nível baixo de glutamina reduz a sua utilização pelos macrófagos e linfócitos, diminuindo, assim, os níveis de citrulina e reduzindo a síntese de arginina (Boelens *et al.*, 2001).

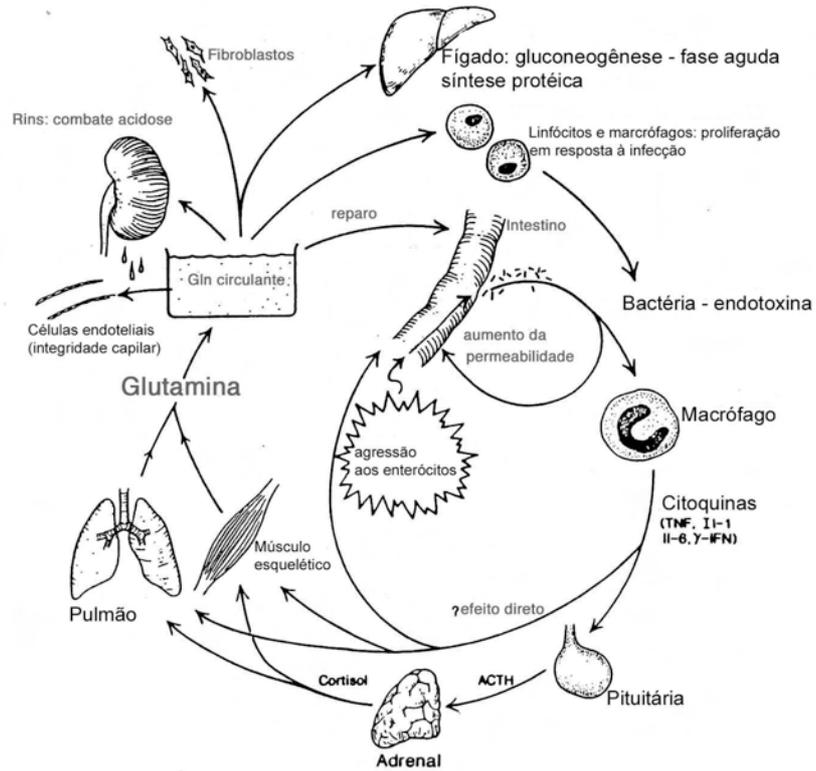


Figura 6 – Metabolismo da glutamina entre os órgãos (Newsholme, 2001).

2.6 Glutamina como nutriente

Um crescente número de pesquisas tem sido feito sobre a utilização da glutamina em situações clínicas, principalmente em estado de catabolismo intenso, e mais recentemente, como suplemento utilizado para atletas em competição. A idéia da suplementação com glutamina tem como objetivo principal fornecer ao fígado uma quantidade adequada de aminoácido para a fase aguda do catabolismo e reparar os tecidos e órgãos, principalmente ao músculo esquelético. Curi (2005) relatou que a glutamina desempenha importantes funções no metabolismo, proliferação celular, secreção de hormônios, modulação da função imune e homeostasia do corpo inteiro.

O mais intrigante no metabolismo da glutamina é que ela desempenha papéis diferentes de acordo com as condições de higiene do animal. Watford (2001) descreveu um experimento no qual usaram a ^{15}N glutamina em suínos e registrou que o intestino se apresentou em boas condições e que pouquíssima amônia foi produzida a partir da glutamina. Assim como foi sugerido que quando os animais estão alimentados, existe uma abundância de nutrientes para os enterócitos e que a exigência de altos níveis de glutamina dietética pelos enterócitos não seria como fonte de energia e sim de outros componentes, por exemplo, do grupo amido. Ainda este mesmo autor mencionou que uma dieta com baixo teor de proteína inibe a oxidação da glutamina e induz uma maior regulação da oxidação dos lipídios, não afetando o consumo da glutamina proveniente da circulação. Com esta informação, ele sugeriu que em dietas com baixo teor de proteína, os enterócitos usam a glutamina nos processos anabólicos e não simplesmente para fazer parte do catabolismo.

3 CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES

Há muito ainda o que se estudar sobre os mecanismos de regulação da glutamina sintetase (GS) nos animais. Aprendendo como a enzima é regulada pode-se, num futuro próximo, desenvolver animais transgênicos para melhor estudar as qualidades cinéticas desta enzima e poder manipula-lá em benefício dos animais.

A caracterização da GS sob o efeito da suplementação é algo que também precisa ser investigado, uma vez que a abundância de glutamina é capaz de diminuir a expressão muscular da GS, o que supostamente se espera que diminua a proteólise muscular.

O benefício da atividade da GS na homeostasia do animal, principalmente em tempo de estresse, doenças, lactação e outros estados catabólicos, torna a GS um componente chave importante no metabolismo gluconeogênico dos animais.

A glutamina já pode ser considerada como um aminoácido condicionalmente essencial. De acordo com essa revisão, o papel da glutamina no metabolismo celular é de suma importância para todos os seres vivos. Como próximos passos, torna-se necessário que se estabeleça a quantidade econômica e produtiva da glutamina, e qual o período adequado para se realizar a suplementação, com vistas a um melhor desempenho zootécnico.

4 REFERÊNCIAS

BOELENS, P.G.; NIJVELDT, R.J.; HOUDIJK, P.J.; et al. Glutamine alimentation in catabolic state. **Journal of Nutrition**, v.131, p. 2569S-2577S, 2001.

BURRIN, D.G.; STOLL, B.; JIANG, R. et al. Minimal enteral nutrient requirements for intestinal growth in neonatal pigs: how much is enough. **American Journal Clinical Nutrition**, v.71, p.1603-1610, 2000.

CASTELL, L.M. ; NEWSHOLME, E.A. The relation between glutamine and the immunodepression observed in exercise. **Amino Acid**, v.20, p. 49-61, 2001.

CURI, R.; LAGRANHA, C. J.; DOI, S. et al. Glutamine-dependent changes in gene express and protein activity. **Cell Biochemistry and Function**. 2004.

CURI, R. Molecular mechanisms of glutamine action. **Journal of Cell Physiology**, v.204, p.392-401, 2005.

CURTHOYS, N.P.; WATFORD, M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. **Annual Review Nutrition**, v.15, p.133-159, 1995.

DUGAN, M.E.R.; KNABE, D.A.; WU, G. Glutamine and glucose metabolism in intraepithelial lymphocytes from pre- and pos-weaning pigs. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.109B, p.675-681, 1994.

EISENBERG, D.; GILL, H.S.; PFLUEGL, G.M.U.; ROTSTEIN, S.H. Structure-function relationships of glutamine synthetase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1477, p.122-145, 2000.

GARBER, A.J.; KARL, I.E.; KIPNIS, D.M. Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle. II The precursor role of amino acids in alanine and glutamine synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v.251, p.836-843, 1976.

HABERLE, J.; GORG, B.; RUTSCH, F.; SCHMIDT, E.; TOUTAIN, A. Congenital glutamine deficiency with glutamine synthetase mutations. **The New England Journal of Medicine**, v.353, p.1926-1933, 2005.

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.

LOBLEY, G.E.; HOSKIN, S.O.; McNEIL, C.J. Glutamine in animal science and production. **Journal of Animal Sciences**, v.131, p.2525S-2531S, 2001.

LIE-VENEMA, H.; LABRUYÈRE, W.T.; ROONS, vanM.A. et al. The spatio-temporal control of the expression of glutamine synthetase in the liver is mediated by its 5'-enhancer. **The Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.28251-28256, 1995.

LIE-VENEMA, H. Spatio-temporal regulation of the gene expression of the glutamine synthetase gene. 192p. **Dissertation** (PhD in Molecular Biology and Biochemistry) - Universiteit van Amsterdam, Amsterdam, Holland, 1997.

MAY, R.C.; MASUD, T.; LOGUE, B. et al. Chronic metabolic acidosis accelerates whole body proteolysis and oxidation in awake rats. **Kidney International**, v.41, p.1535-1542, 1992.

MILMAN, G.; PORTNOFF, L.S.; TIEMEIER, D.C. Immunochemical evidence for glutamine-mediated degradation of glutamine synthetase in cultured chinese hamster cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.250, p.1393-1399, 1975.

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

O'CONNELL, M.A.; KEEGAN, L.P. Drosha versus ADAR: wrangling over pri-miRNA. **Nature Structural & Molecular Biology**, v.13, p.3-4, 2006.

SOUBA, W.W.; WILMORE, D.W. Postoperative alteration of arteriovenous exchange of amino acids across the gastrointestinal tract. **Surgery**, v. 94, p.342-350, 1983.

WATFORD, M. Hepatic glutaminase expression: relationship to kidney-type glutaminase and to the urea cycle. **FASEB Journal**, v.7, p.1468-1474, 1993.

_____. Glutamine Metabolism: Nutritional and clinical significance. **Journal of Nutrition**, v.131, p.2523S-2524S, 2001.

_____. Keep your brain happy. **Lectures Notes**, Rutgers University, New Jersey, United States of America, 82p., 2004.

WILMORE, D.W. Alterations in protein, carbohydrate and fat metabolism in injured and sepsis patients. **Journal American College Nutrition**, v.2, p.3-13, 1983.

WU, G.; FIELD, C.J.; MARLISS, E.B. Glutamine and glucose metabolism in rats splenocytes and mesenteric lymph node lymphocytes. **American Journal of Physiology**, v.260, p.E141-E147, 1991.

WU, G.; POND, W.G.; OTT, T.L.; BAZER, F.W. Maternal dietary protein deficiency decreases amino acid concentrations in fetal plasma and allantoic fluid of pigs. **Journal of Nutrition**, v.128, p.894-902, 1998.

WU, G. Intestinal mucosal amino acid catabolism. **Journal of Nutrition**, v.128, p.1249-1252, 1998.

WU, G.; SELF, T.A. Amino acids: metabolism and functions. **Encyclopedia of Animal Science**, p.9-12, 2005.

WU, G. **Nutrição da glutamina em suínos**: da pesquisa básica à suinocultura. Disponível em: <www.lisina.com.br>. Acesso em: 26 de dez. 2005.

RESUMO

A glutamina é um aminoácido não-essencial que vem chamando atenção dos nutricionistas devido ao seu metabolismo no período de estresse e/ou em catabolismo. Vários estudos foram feitos no intuito de caracterizar o comportamento da glutamina sintetase (GS) e da glutamina (GLN) em humanos e, mais recentemente, alguns estudos estão sendo feitos em animais de reprodução. O objetivo neste trabalho foi caracterizar a expressão da glutamina sintetase no músculo e na glândula mamária, e determinar a concentração da glutamina no sangue e músculo esquelético de camundongos fêmeas primíparas. O experimento foi conduzido no Setor de Animal Care do Departamento de Animal Sciences da Rutgers University em New Jersey nos Estados Unidos da América. Foram utilizados 28 camundongos fêmeas primíparas, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em 7 períodos (3 dias antes do parto, 1 dia antes do parto, dia do parto, 1, 3, 6 e 16 dias após o parto). As variáveis estudadas foram a expressão da glutamina sintetase no músculo esquelético e na glândula mamária, e a concentração da glutamina no sangue e no músculo esquelético. As análises de variância foram analisadas pelo programa SIGMA STAT[®]. Houve um aumento linear ($P < 0,05$) na expressão da glutamina sintetase no músculo durante a lactação, enquanto que a glutamina sintetase na glândula mamária manteve-se estável durante o período da lactação. A concentração sanguínea da glutamina manteve-se estável enquanto para a concentração da glutamina no músculo houve uma redução de 70% no decorrer da lactação. Concluiu-se pela importância da glutamina em manter a homeostasia o durante o período de estresse e/ou catabolismo, sinalizando para uma nova classificação, o de um aminoácido condicionalmente essencial.

ABSTRACT

Glutamine is a non essential amino acid that is claimed for nutritionists because of its metabolism during stress period and/ or catabolism. Many studies were made to characterize the behavior of glutamine synthetase (GS) and glutamine (Gln) in humans, and more recently few studies having made with reproductive animals. The aim of these studies was to characterize the expression of glutamine synthetase in the muscle and mammary gland, and to determine the glutamine concentration on the blood and on the muscle of female primiparous mice. The experiment was on Animal Care Facility of the Animal Sciences Department, Rutgers University, New Jersey, United States. We utilized 28 female mice primiparous distributed in seven periods (3 days before parturition, 1 day before parturition, parturition day, and, 1, 3, 6 and 16 days after parturition). The variables studied were expression of glutamine synthetase on the muscle and mammary gland, and glutamine concentration on the blood and on the muscle. We had a linear increase on GS'expression on the muscle during lactation and a stable GS'expression on mammary gland for the same period. Glutamine supplementation on the blood was stable and on the muscle they had a decrease of 70% during the lactation. In conclusion, the importance of glutamine to maintain the homeostasis during stress and/ or catabolism, and to signalize a new classification, the amino acid conditionally essential.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DA GLUTAMINA SINTETASE (GS) E DA CONCENTRAÇÃO DA GLUTAMINA (GLN) NO TERÇO FINAL DA GESTAÇÃO E NA LACTAÇÃO DE CAMUNDONGOS FÊMEAS PRIMÍPARAS

1 INTRODUÇÃO

Em plena era da tecnologia, a glutamina tenta se estabelecer como um aminoácido condicionalmente essencial em períodos de intenso catabolismo. A cada dia, pesquisadores e produtores tentam usar o máximo de conhecimento científico para minimizar os custos de produção e melhorar a produtividade e a prolificidade dos animais de produção.

Um dos papéis mais importantes da glutamina na produção animal é a habilidade em manter a homeostasia do corpo durante os casos de catabolismo, quer seja por uma lactação, doenças infecciosas ou qualquer outro quadro no qual possa ser caracterizado que o animal entrou em catabolismo. Ou seja, quando a energia ofertada é menor do que a demanda energética necessária para manter o equilíbrio das funções metabólicas normais do corpo.

Devido à importância da glutamina sintetase (GS) no metabolismo animal, as pesquisas em nível molecular vêm se intensificando cada vez mais, no intuito de conhecer e manipular a regulação da GS para benefício do animal. O músculo esquelético, o pulmão e o tecido adiposo são os principais órgãos reguladores e sintetizadores da glutamina sintetase.

Os mecanismos de regulação da enzima ainda não estão completamente elucidados, porém há algumas constatações feitas por Labow *et al.* (1999), que estudaram dois mecanismos de regulação da expressão da glutamina sintetase (GS) no músculo esquelético de ratos: transcricional e pós-transcricional. Os resultados mostraram que a concentração da glutamina afetou a expressão da GS no músculo de forma diferente e de acordo com diferentes níveis de estresse. Quanto maior o estresse, maior é a expressão da GS. Durante a fase de estresse

agudo os glucocorticóides aumentaram a transcrição muscular da GS-mRNA rapidamente, porém a tradução da proteína-GS foi limitada.

Juntamente com o músculo esquelético, o pulmão é o segundo órgão de maior aumento da expressão da glutamina sintetase (GS) em tempo de estresse. Chandrasekhar *et al.* (1999) identificaram o local onde se encontra o elemento resposta da transcrição da GS em células epiteliais de pulmões de ratos em resposta ao efeito dos glucocorticóides. Eles identificaram duas regiões no genoma de ratos (gGS3): uma em torno de 6kb acima do local onde se inicia a transcrição e outra dentro do primeiro gene intron. Estes mesmos autores encontraram regiões diferentes em células adiposas de camundongos durante a diferenciação; estas regiões estavam localizadas no primeiro gene intron, entre as bases +1600 e +1900. Porém, é importante salientar que esta região não respondeu apenas aos glucocorticóides.

Apesar do pulmão também contribuir para a homeostasia da glutamina, Labow *et al.* (1998) afirmaram que sua contribuição é de forma diferente da contribuição muscular. O pulmão contribui com a síntese *do novo* da glutamina a partir do glutamato e da amônia catabolizada pela glutamina sintetase (GS), enquanto que o músculo possui maior concentração de glutamina. Com isso, estes mesmos autores evidenciaram que os glucocorticóides aumentaram a expressão do mRNA da GS, porém tiveram efeito limitado na proteína-GS, o que sugere outro mecanismo de regulação na GS. É importante o aumento da expressão mRNA-GS porém é também importante que se aumente a proteína-GS que parece estar regulada pela concentração da glutamina.

Referindo-se aos pontos de regulação da GS, Lie-Venema *et al.* (1995) foram mais específicos e disseram que no fígado existem duas regiões que estimulam a transcrição: uma entre a -2520 e -2149 bp e outra dentro do primeiro intron, entre a +259 e 950 bp, distante do local que se inicia a transcrição. Topograficamente, a GS se desenvolve na região pericentral do fígado e sua expressão aumenta após o nascimento.

A maioria dos trabalhos publicados na literatura visa investigar os mecanismos de regulação da glutamina sintetase (GS), porém poucos estudos foram feitos com animais estudando a expressão da GS. Apesar dela ser responsável pela síntese endógena da glutamina, o que menos se quer é que se aumente a expressão da mesma e com isso aumente a proteólise muscular. O que

se espera é que a glutamina ao ser suplementada, diminua a atividade da GS promovida pela suplementação exógena da glutamina.

Em camundongos, a atividade da GS aumentou gradativamente após o nascimento, sendo de aproximadamente 1.3 U.g^{-1} no nascimento (Lamers *et al.*, 1999). Estes mesmos autores afirmaram que de modo geral, em animais adultos, a atividade da GS nos mamíferos e aves é de $\sim 12 \text{ U.mg}^{-1}$ proteína.

A expressão da GS na placenta equina, no corno gestante, foi $\sim 2,7$ maior do que no corno não-gestante. A glutamina foi o segundo aminoácido mais abundante no fluido amniótico e o terceiro na placenta. A presença de GS na placenta aumentou a liberação da glutamina do sangue materno para o sangue fetal, mantendo a concentração no sangue fetal maior do que no sangue materno (Manso Filho, 2005).

No período de transição entre a lactação e gestação, as éguas perdem muita massa muscular. Esse período parece está caracterizado por um período catabólico, pois a quantidade de proteína muscular na gestação é menor do que a quantidade de proteína após o desmame. Foi o que Manso Filho (2005) caracterizou durante da gestação e a lactação de éguas e não observou mudanças nas concentrações musculares de glutamina, porém houve uma diminuição na concentração de glutamina no leite no decorrer da lactação. Houve uma mudança significativa na abundância de GS entre o terceiro e o sexto mês de lactação.

van Straaten *et al.* (2006) estudaram a concentração da GS em diferentes órgãos de camundongos e encontraram uma diferença de 100 vezes de mRNA-GS. No que diz respeito à relação proteína:atividade enzimática entre os órgãos, houve uma diferença de 20 vezes entre a relação proteína-GS: mRNA, sugerindo uma forte regulação transcricional. No entanto, houve uma menor diferença na relação atividade enzima: proteína, sugerindo que a regulação pós-translacional é de menor importância.

Outro estudo feito por Manso Filho (2005), foi a caracterização da GS em diferentes tecidos eqüinos. Como resultado o mesmo encontrou que o fígado, a glândula mamária, o tecido adiposo e os rins foram os órgãos de maior expressão da GS.

Sabe-se que durante o estresse ou em períodos de catabolismo intenso, a glutamina é um importante substrato para manter a homeostasia do corpo e que é

a glutamina muscular que atende a demanda corporal. Porém, durante o catabolismo intenso, como em períodos de privação alimentar, doenças e período transicional, como gestação-lactação, a concentração de glutamina livre no músculo não é suficiente para atender a demanda e com isso o organismo inicia a síntese endógena da glutamina a partir da glutamina sintetase.

Segundo Wu e Self (2005), a glutamina tem funções específicas na atividade intestinal, aumentando a absorção da glicose, lipídios e íons, estimulando a síntese de poliaminas, mantendo a massa e a integridade intestinal e evitando a atrofia intestinal, em condições de estresse.

Diante da importância da glutamina sintetase e da glutamina no metabolismo animal, faz-se necessário caracterizar o comportamento da enzima e da glutamina durante o período do terço final da gestação e da lactação para que possamos formular estratégias nutricionais que visem uma menor perda de massa muscular e um menor intervalo de retorno ao cio após o desmame da matriz.

Os objetivos desta pesquisa foram determinar a expressão da glutamina sintetase no músculo e na glândula mamária durante a gestação e lactação, além das concentrações de glutamina no músculo e no sangue de camundongos fêmeas primíparas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do experimento

O experimento foi conduzido no setor de Animal Care do Departamento de Animal Sciences da Rutgers University, na cidade de New Brunswick, estado de New Jersey nos Estados Unidos da América.

2.2 Animais experimentais

Foram utilizadas 28 camundongos (*Mus musculus*^L) fêmeas primíparas da linhagem Black swiss, com peso médio à cobertura de 20 g. As fêmeas foram acasaladas em gaiolas individualizadas, para que se obtivesse o dia exato da cobertura e uma melhor aproximação da data provável do parto.

A cobertura foi reconhecida pela presença do “plug” nas grades da estante e, em alguns casos, na vagina das fêmeas. Após a confirmação da prenhez, as fêmeas foram transferidas para novas gaiolas individualizadas, para acompanhamento da gestação. As fêmeas receberam ração de acordo com as exigências nutricionais da idade e estado fisiológico, além de água à vontade, em bebedouros automáticos.

2.3 Protocolo experimental

Foram utilizadas 4 fêmeas por grupo, distribuídas aleatoriamente em sete dias de coleta. Os dias de coleta foram assim distribuídos: três dias antes do parto, um dia antes do parto, no dia do parto, e nos dias um, três, seis e 16 dias depois do parto. Nos dias de coleta, as fêmeas foram anestesiadas com injeção intraperitoneal de ketamina (Pfizer, Piscataway/USA) e, em seguida, feita a laparotomia pela linha alba para colheita de sangue na veia cava.

Após a coleta de sangue, foram colhidas amostras de fígado, músculo semitendinoso, semimembranoso e quadríceps, e glândula mamária para análise da expressão da glutamina sintetase (GS) e da concentração da glutamina [Gln] e do glutamato [Glu].

2.4 Variáveis estudadas

As variáveis estudadas foram as concentrações de glutamina no sangue e no músculo e a expressão da glutamina sintetase (GS) no músculo, fígado e glândula mamária.

2.4.1 Amostras de sangue

O sangue das fêmeas foi coletado nos dias acima citados com ajuda de seringa e transferidos para tubos com heparina (Sigma, 84020-50VL-S). O sangue foi imediatamente desproteinizado com ácido perclórico (PCA) a 10% e, em seguida neutralizado com 1,0 M de hidróxido de potássio (KOH). As amostras foram estocadas à -80°C, até serem analisadas para determinação das concentrações da glutamina [Gln] e do glutamato [Glu]. O glutamato foi analisado uma vez que o protocolo de análise é conjunta com a glutamina, porém não foi objeto do estudo do presente experimento.

2.4.2 Amostras de tecidos

As amostras de músculo, fígado e glândula mamária foram separadas em duas alíquotas. A primeira parte dos tecidos foi coletada e imediatamente congelada em gelo seco para análise da expressão da GS e da glutamato desidrogenase (GDH), à exceção do músculo. O músculo não possui GDH. Novamente, a GDH não foi o objeto de estudo, a expressão da GDH foi registrada mas não estudada no presente experimento.

A segunda parte das amostras dos tecidos foi homogeneizada com ácido perclórico (PCA) a 10% e, em seguida, neutralizada com 1,0 M de hidróxido de

potássio (KOH). As amostras foram estocadas à -80°C, até serem analisadas para determinação das concentrações de glutamina [Gln] e glutamato [Glu].

2.5 Protocolo experimental para análise das concentrações de glutamina (Gln), glutamato (Glu) e alanina (Ala)

As concentrações de Gln e Glu foram expressas em $\mu\text{mol/mL}$ de sangue e $\mu\text{mol/g}$ de músculo. As amostras desproteinizadas-neutralizadas foram usadas para medir as concentrações de Gln e Glu segundo técnica descrita por Kowalski *et al.*, 1997. Inicialmente, 0,20 mL da amostra desproteinizada foi misturada com 0,25 mL de água, 0,50 mL de acetato de sódio (0,5 M, pH 5) e 0,05 mL de glutaminase (SIGMA, G-8880 - 10 units)

Em seguida, esta solução foi misturada e incubada em banho-maria durante uma hora à 37°C, com o objetivo de converter toda a glutamina em glutamato. Paralelamente, 0,5 mL da amostra foi misturada à 1,5 mL de uma solução tampão (Tris 0,2 M, pH 9; 15 mL água; 0,3 mL de hidrazina e 0,09 mM de NAD^+). As amostras misturadas às soluções foram transferidas para os cubetes e lidas no espectrofotômetro em 340 nm. A glutamato desidrogenase foi acrescentada a solução e feito uma nova leitura no intervalo de 30 minutos. Para determinar a alanina, a mesma amostra foi incubada por mais 30 minutos com 5 μL de alanina desidrogenase. Uma terceira leitura foi feita após 30 minutos.

A diferença entre a primeira e a segunda leitura representou o total de glutamina e glutamato e o total de glutamato. A concentração de glutamina foi obtida através da subtração entre o total de glutamato e o total de glutamina e glutamato. A concentração da alanina foi obtida através a subtração entre a segunda e terceira leitura. Estes resultados foram multiplicados pelos fatores de diluição de cada amostra neutralizada.

2.6 Protocolo experimental para análise da expressão da glutamina sintetase (GS) e glutamato desidrogenase (GDH)

As amostras dos tecidos foram homogeneizadas com o TISSUE TEAROR® , com uma solução tampão (100 mM Tris, 1,0 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 1,0 mM dichorodiphenyltrichloroethano (DTT) em pH 8) e, em seguida, foi acrescentado um coquetel de inibidores de proteases set III (Calbiochem, # 539134, [5,0 µL para cada mL de solução]). Depois de homogeneizadas, foram centrifugadas durante 10 minutos a 2000 rpm.

O sobrenadante foi determinado no espectrofotômetro através da técnica descrita por Manso Filho (2005), usando o kit comercial (BIO-RAD, Hercules, CA). A mesma quantidade de 20 µg de proteína homogeneizada foi solubilizada e colocada para correr o gel de sulfato de sódio dodecyl em polyacrylamida (SDS 4-12% PAGE) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA), em eletroforese, durante 50 minutos. Em seguida, a proteína foi eletroforéticamente transferida para uma membrana de nitrocelulose (BIO-RAD caixa de transferência) durante 150 minutos.

Após a transferência das proteínas, as membranas foram coradas com uma solução Ponceus (1,0% em ácido acético). Em seguida, a membrana foi incubada durante a noite com uma solução de TBS-T (Tris 2,42 g , NaCl 8 g, Tween 20 1,0 mL e 1,0 L de água em pH 8), acrescida de 5,0 % de leite desnatado. No dia seguinte, as membranas foram lavadas durante 20 minutos com TBS-T mais 0,3 % de BSA e incubadas durante 60 minutos com o primeiro anticorpo contra a glutamina sintetase (BD Laboratories, # 610517). Depois, as membranas foram novamente lavadas durante 20 minutos com TBS-T mais 0,3% de BSA e incubada com o segundo anticorpo, IgG de cabra anti-IgG de camundongo (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Finalmente, para visualizar a proteína GS, as membranas foram colocadas em uma solução reveladora, ECL Western blotting (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, # RPN2108) e expostas em filme cassete (MR, Kodak, Rochester, NY). A autobiografia da proteína foi escaneada e quantificada usando o National Institute of Health Image Software (SCION® Image). A expressão da glutamina

sintetase foi apresentada em unidade relativa de desintometria, na qual representa a intensidade da coloração para cada ponto.

2.7 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Todas as variáveis estudadas foram analisadas a partir de dados de 28 fêmeas distribuídas em 7 períodos estudados (3 dias antes do parto (-3), 1 dia antes do parto (-1), parto (P), 1, 3, 6 e 16 dias depois do parto). Para a análise da expressão da glutamina sintetase no músculo utilizou-se 3 fêmeas distribuídas nos mesmos períodos acima citados. Os dados foram analisados pelo programa SigmaStat versão 3.0, Jandel Scientific, San Rafael, CA (2003), usando a análise de variância com medidas repetidas. Em seguida, as médias foram identificadas através do teste Tukey em nível de 5%.

O modelo estatístico utilizado está representado abaixo:

$$Y_{ij} = \mu + P_i + e_{ij}$$

Onde:

Y_{ij} = características estudadas;

μ = média;

P_i = efeito do i -ésimo período ($P = 1 \dots 7$);

e_{ij} = erro residual.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Variação do peso vivo de camundongos fêmeas primíparas

Os dados de peso vivo de camundongos fêmeas primíparas estão representados na Figura 7.

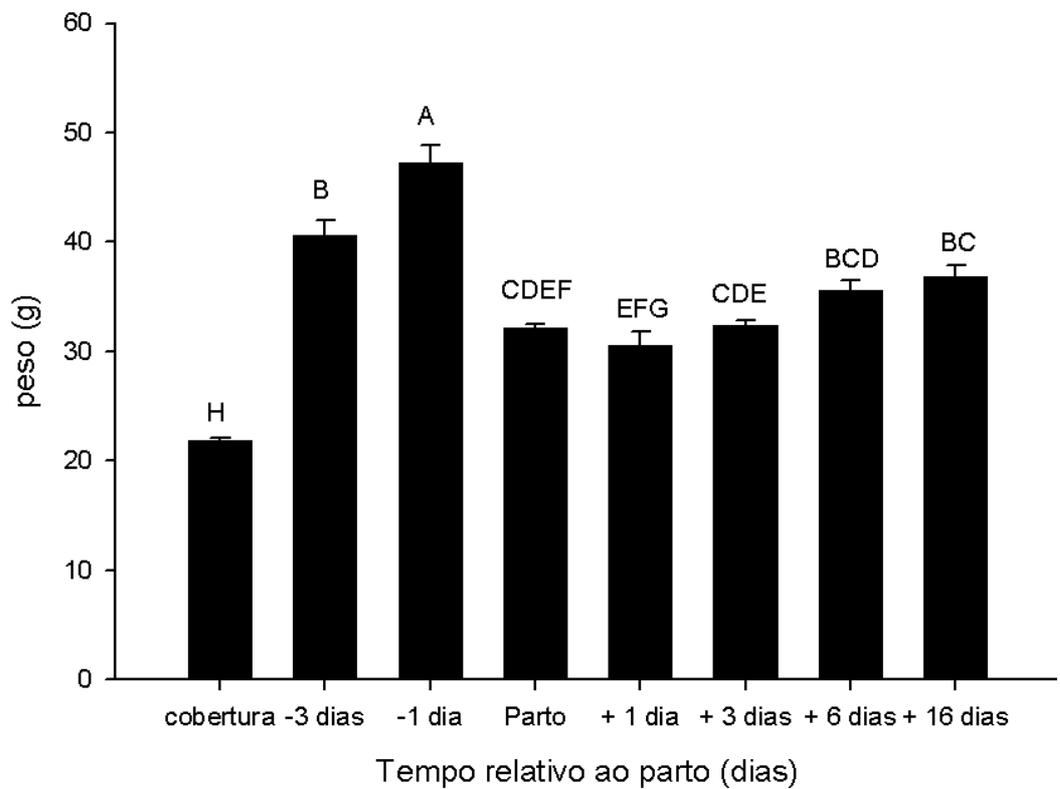


Figura 7 – Variação do peso vivo de camundongos fêmeas primíparas da cobertura ao desmame

* médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($P < 0,01$)

** cobertura (dia da cobertura), -3 dias (3 dias antes do parto), -1 dia (1 dia antes do parto), parto (dia do parto), +1 dia (1 dia após o parto), +3 dias (3 dias após o parto), +6 dias (6 dias após o parto) e +16 dias (16 dias após o parto).

Estas fêmeas foram cobertas com peso médio de 20 g, sendo na média de peso estatisticamente diferente em todos os períodos estudados. No dia do parto, a média de peso vivo chegou a 32 g ($P < 0,01$). Após o parto, as fêmeas

estabilizaram o peso, em uma média de 32 g até os dezesseis dias de lactação, não havendo diferença estatística entre os pesos dos animais neste período.

A perda de massa muscular representa uma variável produtiva para a qual se tenta minimizar seu efeito através do fornecimento de rações cada vez mais balanceadas e adequadas para períodos de produção intensa. Em diferentes espécies domésticas, foi observada uma perda de massa corporal durante a lactação, sendo estes dados semelhantes aos encontrados nos camundongos. Para Meijer *et al.* (1995), a mudança na concentração dos aminoácidos musculares, no período da gestação para a lactação, é característica que se descreve como estado catabólico nos mamíferos. Eles ainda sugeriram que a proteína muscular foi degradada para suplementação de aminoácido para a produção de leite.

Apesar do peso dos animais estar associado à redução da massa livre de gordura, Hasselgren (2000) argumentou que a proteólise muscular é benéfica logo após o trauma ou nos períodos iniciais de catabolismo, tendo como objetivo fornecer aminoácidos para a gluconeogênese e síntese protéica. Porém períodos prolongados de catabolismo podem trazer conseqüências severas. A glutamina é o mais importante aminoácido liberado pelo músculo durante o catabolismo, sendo uma relevante fonte de energia para os enterócitos e sistema imunológico.

As matrizes são colocadas em reprodução mais precocemente e muitas delas não estão fisiologicamente preparadas para o início da gestação. Existem correntes científicas que levam em consideração a idade ao primeiro cio, outras o peso no segundo ou no terceiro cio e há ainda quem defenda uma associação de idade e peso. Idade e peso no início da vida reprodutiva são características importantíssimas na vida de uma reprodutora e irão se refletir por toda a vida útil da fêmea. Após o primeiro parto, elas devem estar em boas condições nutricionais para garantir a lactação, e em seguida, desmamar em boas condições corporais para a gestação subsequente.

Um longo período de catabolismo muscular durante a lactação pode afetar o retorno ao cio das fêmeas, ocasionando o seu prolongamento e, conseqüentemente, um prejuízo à criação. Esse catabolismo muscular excessivo poderá ocorrer por um desbalanço nutricional da ração, pelo excesso de filhotes ou até mesmo pelo estresse lactacional. Um programa nutricional adequado é aquele que permite que a fêmea além ter boa prolificidade e produtividade, tenha um curto intervalo desmama-cio e um baixo índice de repetição de cios.

3.2 Expressão da glutamina sintetase (GS) no músculo esquelético de camundongos fêmeas primíparas

A Figura 8 ilustra a expressão da glutamina sintetase no músculo esquelético de camundongos fêmeas primíparas no terço final da gestação e durante a lactação. A unidade relativa de densitometria é representada pela intensidade de pontos pretos revelados e impressos através dos resultados da técnica de Western blot. Quanto mais escuro a banda, maior será a concentração da enzima.

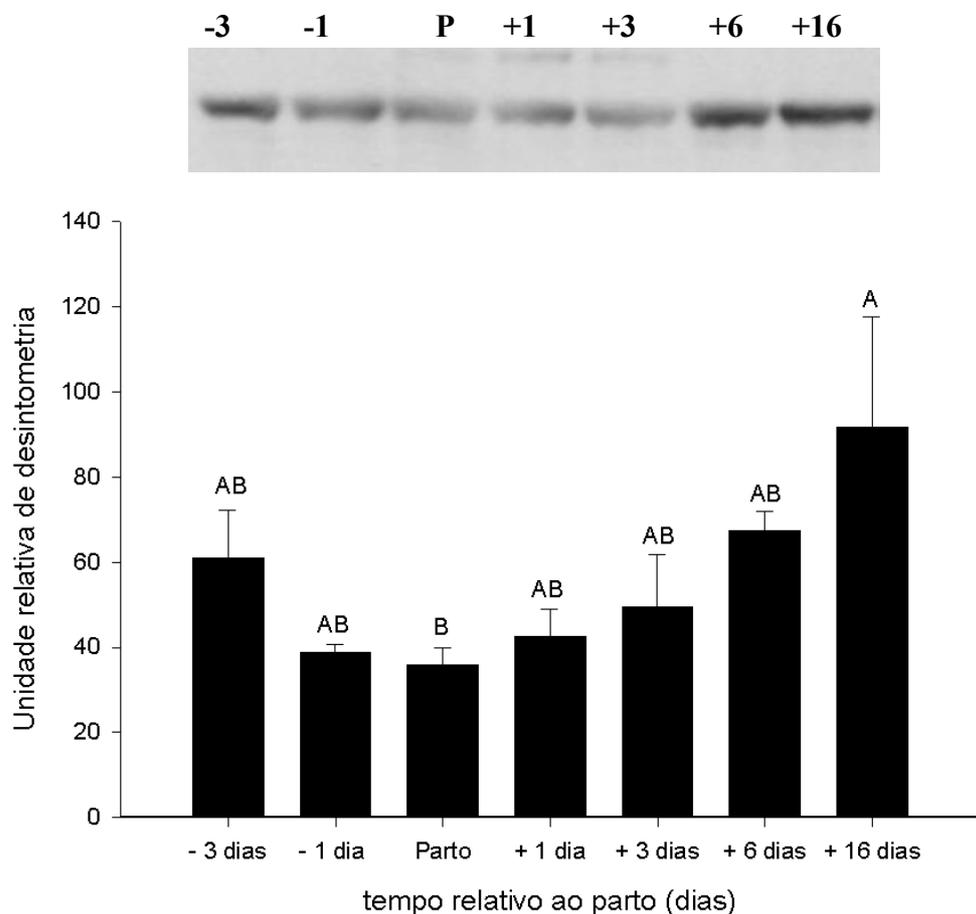


Figura 8 – Expressão da glutamina sintetase (GS) no músculo esquelético de camundongos fêmeas primíparas dos 3 dias antes do parto ao desmame

* médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($P < 0,01$)

** -3 dias (3 dias antes do parto), -1 dia (1 dia antes do parto), parto (dia do parto), +1 dia (1 dia após o parto), +3 dias (3 dias após o parto), +6 dias (6 dias após o parto) e +16 dias (16 dias após o parto).

Os resultados obtidos através da análise de variância mostram que houve diferença significativa ($P < 0,01$) na expressão da GS entre o dia do parto, com uma menor expressão, e os 16 dias de lactação, com uma maior expressão.

Os resultados do presente trabalho foram semelhantes aos de Remesar *et al.* (1982) que utilizaram diferentes tecidos de ratos durante a gestação e a lactação, quando registraram um aumento da atividade da GS no músculo no terço médio da gestação e após a lactação, porém uma menor atividade da enzima foi verificada no 20º dia de lactação.

Em éguas lactantes, a glutamina sintetase apresentou mudanças significativas ($P < 0,05$). No terceiro mês de lactação, a glutamina sintetase (GS) apresentou os mais altos níveis quando comparados aos 6 meses de lactação (Manso Filho, 2005).

3.3 Expressão da glutamina sintetase (GS) e da glutamato desidrogenase (GDH) no fígado de camundongos fêmeas primíparas

A expressão da GS no fígado está representada na Figura 9. Os resultados obtidos mostram que houve diferença significativa entre a gestação e a lactação ($P < 0,05$), que foi estatisticamente igual durante toda lactação, para expressão da GS no fígado das fêmeas. Estes resultados demonstram que a expressão da GS, no fígado, tende a não sofrer efeitos do metabolismo corporal como um todo; é como se no fígado a GS se comportasse em um sistema em homeostasia.

Dependendo da posição nos hepatócitos, a GS é mais ou menos abundante. A área na parte de baixo da posição pericentral dos hepatócitos possui maior acúmulo de GS quando comparada com a área acima da posição central dos hepatócitos, onde a glutaminase é mais abundante. No fígado, a glutamina sintetase tem como função principal manter a homeostasia da amônia e do bicarbonato no corpo. Normalmente, a glutamina vem dos tecidos periféricos até os tecidos esplânticos e serve como combustível para a mucosa intestinal e síntese da uréia (Lie-Venema, 1997).

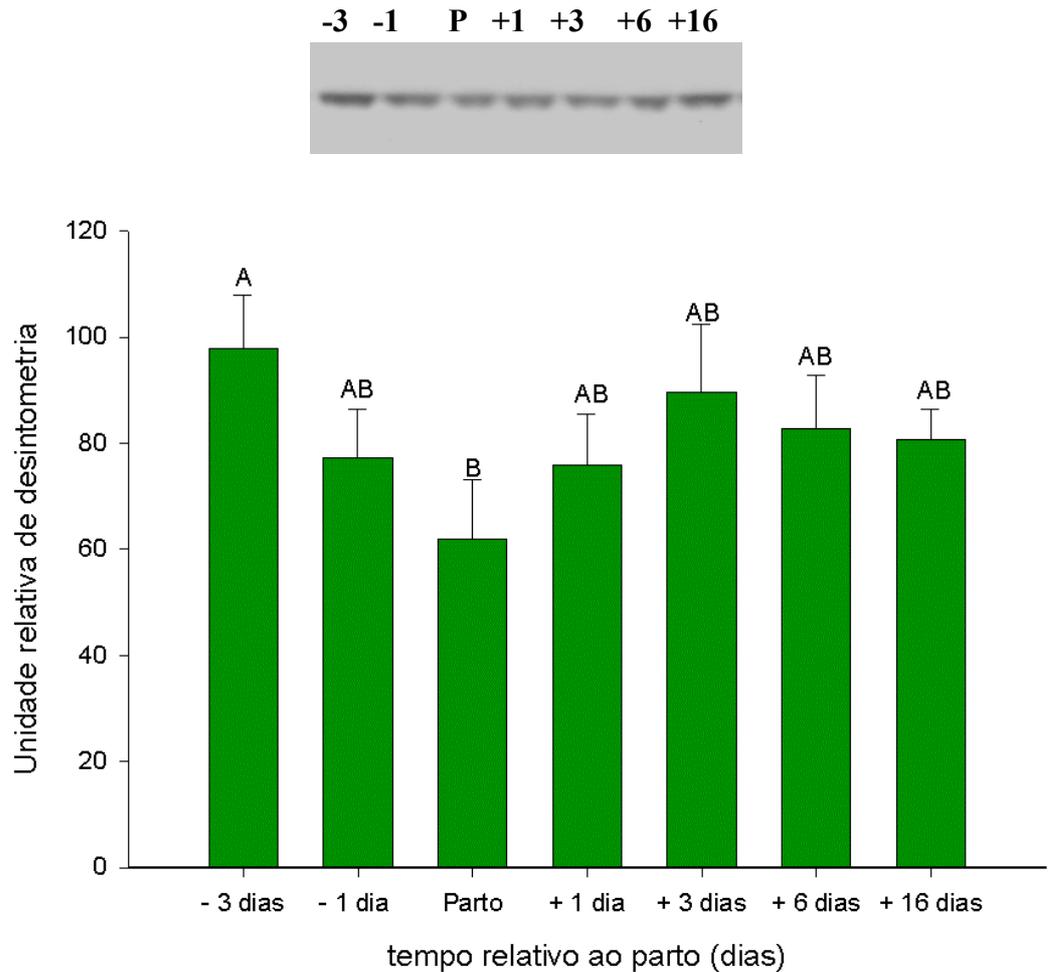


Figura 9 - Expressão da glutamina sintetase (GS) no fígado de camundongos fêmeas primíparas dos 3 dias antes do parto ao desmame

* médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($P < 0,05$)

** -3 dias (3 dias antes do parto), -1 dia (1 dia antes do parto), parto (dia do parto), +1 dia (1 dia após o parto), +3 dias (3 dias após o parto), +6 dias (6 dias após o parto) e +16 dias (16 dias após o parto).

É importante lembrar que esse metabolismo especial do fígado deve-se ao fato deste órgão possuir ainda atividade da glutaminase e da glutamato desidrogenase (GDH). Esta última enzima (GDH) é outra enzima que atua no metabolismo da glutamina e encontra-se em equilíbrio com o complexo glutamina sintetase (GS) / glutaminase, não estando sujeita a ação enzima-substrato. Por isso ela se apresenta em equilíbrio no fígado, e sem diferença estatística (NS) durante o terço final da gestação e até o 16º dia de lactação (Figura 10).

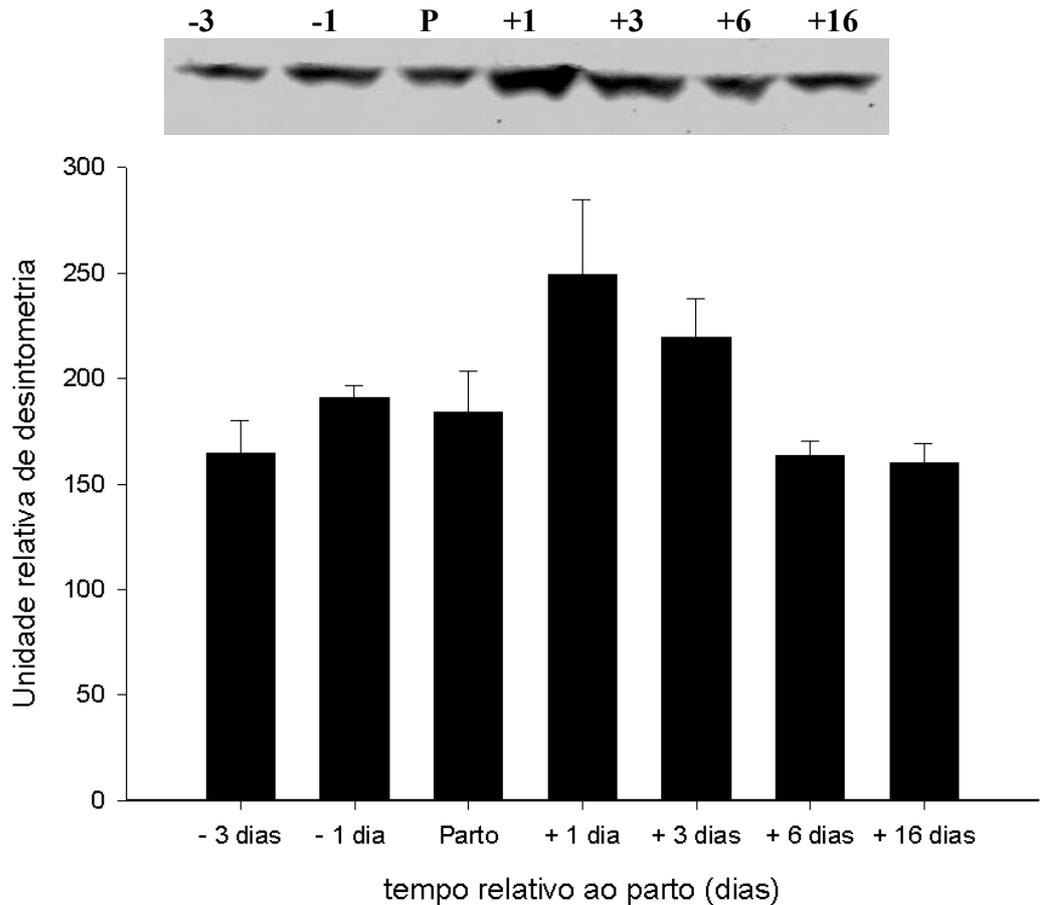


Figura 10– Expressão da glutamato desidrogenase (GDH) no fígado de camundongos fêmeas primíparas dos 3 dias antes do parto ao desmame

* -3 dias (3 dias antes do parto), -1 dia (1 dia antes do parto), parto (dia do parto), + 1 dia (1 dia após o parto), + 3 dias (3 dias após o parto), + 6 dias (6 dias após o parto) e + 16 dias (16 dias após o parto).

A expressão da GS no fígado de camundongos filhotes estão representados na Figura 11.

A expressão da GS foi estatisticamente igual nos dias que antecederam o parto se estendendo até sua ocorrência. Após o parto e até os 6 dias de lactação a expressão da enzima foi estatisticamente igual. Porém, para o 16^o e 21^o dias de lactação a expressão da enzima apresentou diferenças significativas, quando comparadas com os períodos anteriores ($P < 0,01$).

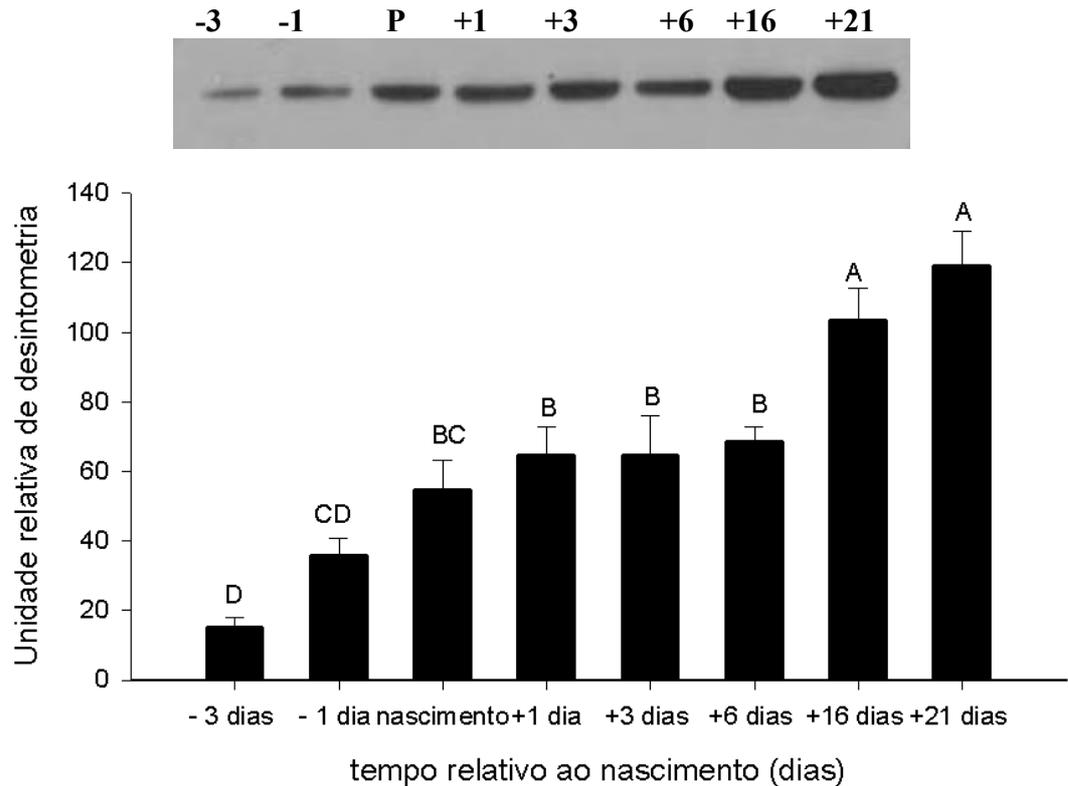


Figura 11 – Expressão da glutamina sintetase (GS) no fígado de camundongos filhotes do nascimento ao desmame

* médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($P < 0,01$)

** -3 dias (3 dias antes do nascimento), -1 dia (1 dia antes do nascimento), nascimento (dia do nascimento), +1 dia (1 dia após o nascimento), +3 dias (3 dias após o nascimento), +6 dias (6 dias após o nascimento), +16 dias (16 dias após o nascimento) e +21 dias (21 dias após o nascimento).

Estes resultados foram semelhantes aos citados por Lie-Venema, 1997 quando afirmou que a expressão da glutamina só se desenvolve após o nascimento atendendo a uma demanda fisiológica.

3.4 Expressão da glutamina sintetase (GS) na glândula mamária de camundongos fêmeas primíparas

Na glândula mamária, a expressão da GS apresentou-se nos níveis mais altos. Diferenças estatísticas significativas foram observadas quando compara-se a

expressão da enzima nos 3 dias antes do parto e aos 3 e 6 dias de lactação ($P < 0,05$) (Figura 12).

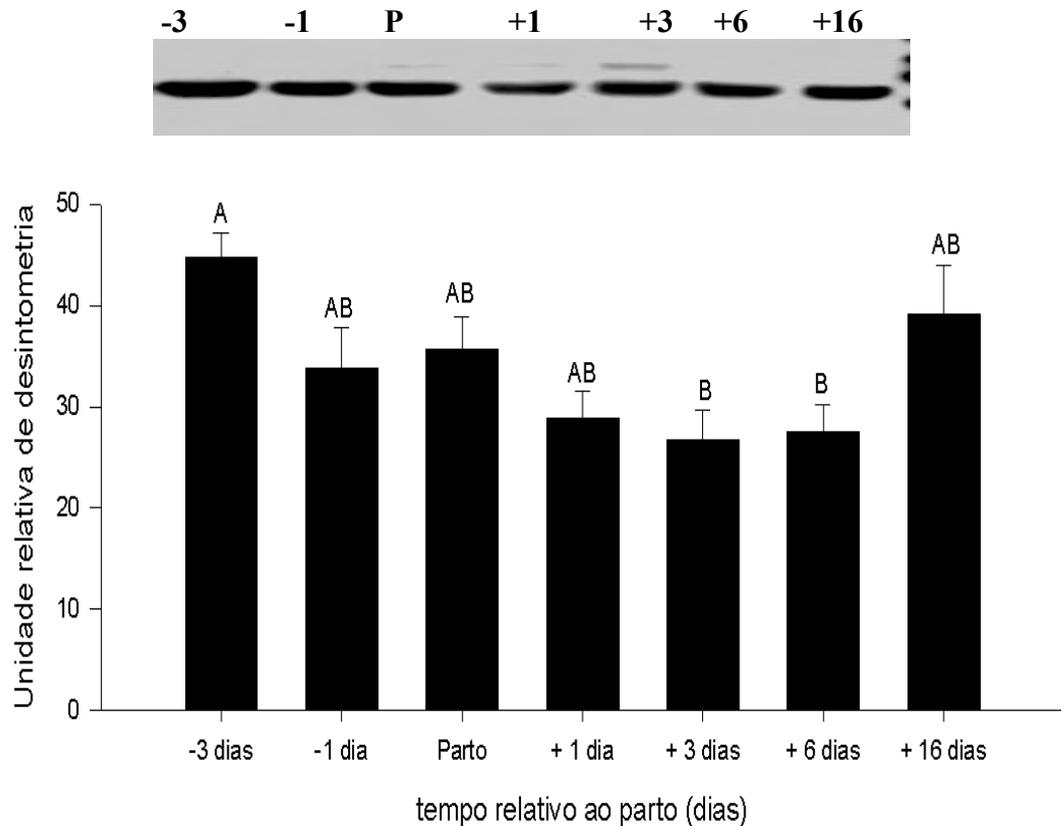


Figura 12 - Expressão da glutamina sintetase (GS) na glândula mamária de camundongos fêmeas primíparas dos 3 dias antes do parto ao desmame

* médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($P < 0,05$)

** -3 dias (3 dias antes do parto), -1 dia (1 dia antes do parto), parto (dia do parto), + 1 dia (1 dia após o parto), + 3 dias (3 dias após o parto), + 6 dias (6 dias após o parto) e + 16 dias (16 dias após o parto).

Esta alta expressão da glutamina sintetase (GS) na glândula mamária pode ser devida ao fornecimento de glutamina (Gln) para leite. Contudo, não foi possível coletar o leite dos camundongos fêmeas para a confirmação dessa hipótese.

A expressão da GS no 3^o dia antes do parto foi estatisticamente semelhante ($P > 0,05$) ao 1^o dia antes do parto, parto, 1^o dia após o parto e ao 16^o dia.

A falta de dados científicos em relação à expressão da GS na glândula mamária de animais, impossibilita que comparações possam ser feitas acerca da expressão desta enzima em diferentes períodos de lactação.

3.5 Concentração de glutamato (Glu), glutamina (Gln), e alanina (Ala) no sangue de camundongos fêmeas primíparas

As concentrações sanguíneas da glutamina, glutamato e alanina estão representadas na Figura 13.

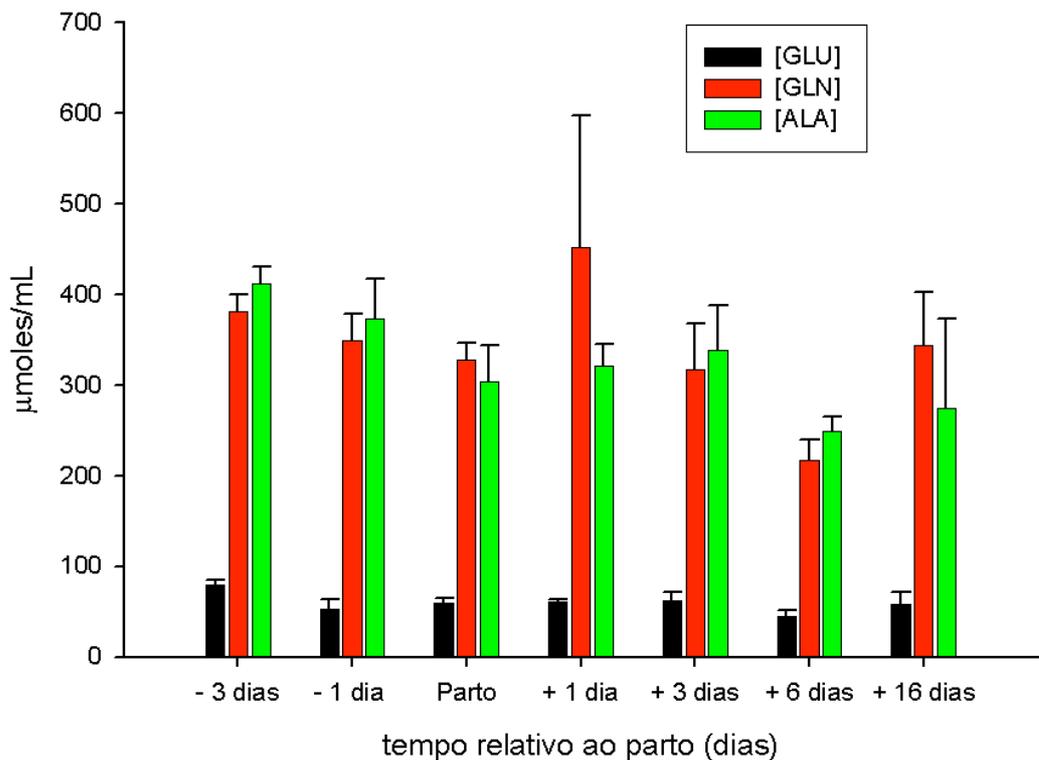


Figura 13 - Concentração sanguínea do glutamato (Glu), glutamina (Gln), e alanina (Ala) de camundongos fêmeas primíparas dos 3 dias antes do parto ao desmame

* -3 dias (3 dias antes do parto), -1 dia (1 dia antes do parto), parto (dia do parto), + 1 dia (1 dia após o parto), + 3 dias (3 dias após o parto), + 6 dias (6 dias após o parto) e + 16 dias (16 dias após o parto).

Não houve diferença estatística nas concentrações de Glu, Gln, e Ala dos três dias antes do parto até os 16 dias de lactação. A glutamina se apresentou em níveis mais elevados no primeiro dia após o parto, em torno de 451 μ moles/mL de sangue e em níveis mais baixos no 6^o dia após o parto, com cerca de 216 μ moles/mL.

Esses resultados demonstraram comportamento semelhante aos encontrados em éguas lactantes por Manso Filho (2005) onde 1 dia após o parto e no pico de lactação, de cada espécie, culminou com as mais altas concentrações sangüíneas de Gln. Este mesmo autor registrou uma concentração plasmática de glutamina relativamente estável de 222 +/- 22 mmol/L aos 10 meses de gestação. O nível plasmático de glutamina cresceu drasticamente para 433 +/- 43 mmol/L imediatamente após o parto e em seguida diminuiu lentamente no curso da lactação até o nível de 184 +/- 22 mmol/L após a 12^a semana.

Em éguas, a maior concentração de glutamina plasmática foi encontrada no dia do parto, de aproximadamente 504 mmoles/L, sendo que a mesma permaneceu alta até o 7^o dia após o parto (432 mmoles/L). As concentrações mais baixas de glutamina plasmática foram encontradas entre a 3^a e 6^a semana de lactação, com uma concentração plasmática média de 330 mmoles/L durante toda a lactação (Manso Filho, 2005).

Em outra investigação conduzida por Meijer *et al.* (1995) com matrizes bovinas leiteiras, foi encontrada uma redução de 25% na concentração plasmática de Gln entre a 6^a e a 15^a semana de lactação.

De modo geral, mesmo em espécies diferentes, a concentração da glutamina no sangue se comporta de maneira similar durante a lactação, porém em diferentes concentrações. A concentração da glutamina atinge o patamar mais elevado no dia do parto e continua até o final da primeira semana pós-parto, para em seguida voltar ao nível basal no período do desmame.

Os altos níveis de glutamina no plasma de éguas foi discutido por Manso Filho (2005). Segundo este autor tais níveis podem estar associado à remoção da placenta no parto, assim como de outros tecidos fetais, além da hemoconcentração observada no momento do parto. Porém, durante o pós-parto, vários tecidos produzem a glutamina, principalmente o músculo esquelético.

Não se pode deixar de salientar o pico de cortisol no momento do parto; como a glutamina sintetase é regulada pelos glucocorticóides, ao parto o cortisol

pode ter estimulado um aumento da atividade da glutamina sintetase e, conseqüentemente, elevado a concentração de glutamina na circulação sanguínea.

Tanto a alanina como o glutamato compõem o resultado mas não foram objeto da presente pesquisa. A concentração da alanina foi coletada por ser principal aminoácido formador da gluconeogênese hepática e o glutamato foi coletado por fazer parte do protocolo de análise da Gln.

3.6 Concentração de glutamato (Glu) e glutamina (Gln) no músculo esquelético de camundongos fêmeas primíparas

As concentrações de glutamato e glutamina no músculo de camundongos fêmeas primíparas estão representadas na Figura 14.

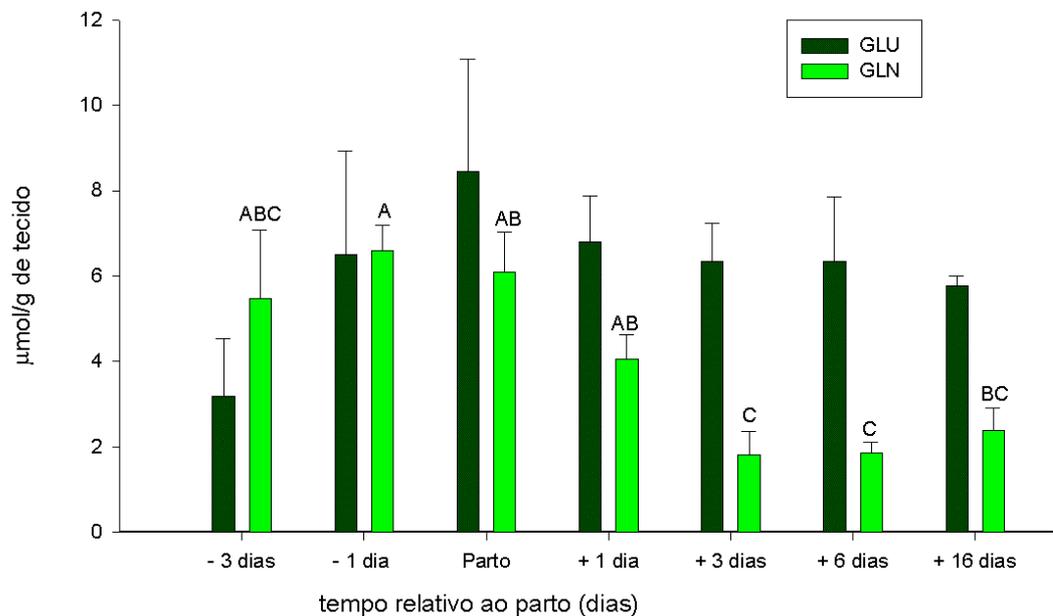


Figura 14 – Concentração de glutamato (Glu) e glutamina (Gln) no músculo esquelético de camundongos fêmeas primíparas dos 3 dias antes do parto ao desmame

* médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($P < 0,01$)

** -3 dias (3 dias antes do parto), -1 dia (1 dia antes do parto), parto (dia do parto), +1 dia (1 dia após o parto), +3 dias (3 dias após o parto), +6 dias (6 dias após o parto) e +16 dias (16 dias após o parto).

As concentrações de glutamina no músculo das fêmeas apresentaram os maiores valores no terceiro e primeiro dia antes do parto, no dia do parto e com 1 dia após o parto, não apresentando diferença estatística significativa entre si para este período. Porém, após o parto, a concentração de glutamina diminuiu de 6 $\mu\text{mol/g}$ de músculo no dia do parto para 2,5 $\mu\text{mol/g}$ de músculo aos 16 dias de lactação, sendo estes valores com diferença significativa ($P < 0,01$). Para as concentrações de glutamato não houve diferenças estatísticas para o mesmo período considerado.

Em matrizes bovinas leiteiras, durante a lactação, ocorreu uma diminuição de Gln livre no músculo, acima de 25% , sendo essa redução maior do que a de qualquer outro aminoácido (Meijer *et al.*, 1995).

Em éguas, não houve diferenças estatísticas significativas nas concentrações de glutamina e glutamato na lactação. Durante o período de lactação, a concentração de glutamina foi 20% menor no terceiro mês, quando comparada com àquela do sexto mês (Manso Filho, 2005).

4 CONCLUSÕES

A expressão da glutamina sintetase (GS) é demandada de forma crescente ao longo da lactação com o objetivo de suprir este aminoácido para o leite de camundongos fêmeas primíparas.

A expressão da glutamina sintetase (GS) na glândula mamária manteve-se estável e limitada até certo ponto durante toda a lactação, refletindo a grande demanda da enzima em suprir glutamina para o leite dos camundongos fêmeas primíparas.

A GS é eficiente na manutenção do nível de glutamina sanguíneo constante durante a lactação de camundongos fêmeas primíparas.

A concentração da glutamina no músculo diminuiu na ordem de 70% ao longo da lactação, demonstrando uma regulação (substrato-enzima) à expressão da glutamina sintetase no músculo de camundongos fêmeas primíparas.

5 REFERÊNCIAS

CHANDRASEKHAR, S.; SOUBA, W. W.; ABCOUWER, S. F. Identification of glucocorticoid-responsive elements that control transcription of rat glutamine synthetase. **American Journal of Physiology- Lung Cellular and Molecular Physiology**, v.276, p.319-331, 1999.

HASSELGREN, P. Catabolic response to stress and injury: Implications for regulations. **World Journal of Surgery**, v.24, p.1452-1459, 2000.

KOWALSKI, T.T.; WU, G.; WATFORD, M. Rat adipose tissue amino acid metabolism in vivo as assessed by microdialysis and arteriovenous techniques. **American Journal Physiology**, v. 273, p. E617-E622, 1997.

LABOW, B. I.; ABCOUWER, S. F.; LIN, C-M. et al. Glutamine synthetase expression in rat lung is regulated by protein stability. **American Journal of Physiology- Lung Cellular and Molecular Physiology**, v.275, p.877-886, 1998.

LABOW, B. I.; SOUBA, W. W.; ABCOUWER, S. F. Glutamine synthetase expression in muscle is regulated by transcriptional and posttranscriptional mechanisms. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v.276, p.1136-1145, 1999.

LAMERS, W. H.; BOON, L.; van HEMERT, F. J. et al. Glutamine synthetase expression in perinatal spiny liver. **European Journal of Biochemistry**, v.262, p.803-809, 1999.

LIE-VENEMA, H.; LABRUYÈRE, W.T.; ROONS, vanM.A.; et al. The spatio-temporal control of the expression of glutamine synthetase in the liver is mediated by its 5'-enhancer. **The Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.28251-28256, 1995.

LIE-VENEMA, H. Spatio-temporal regulation of the gene expression of the glutamine synthetase gene. 192p. **Dissertation** (PhD in Molecular Biology and Biochemistry) - Universiteit van Amsterdam, Amsterdam, Holland, 1997.

MANSO FILHO, H. C. Skeletal muscle metabolism en growing foals and transition mares. 177p. **Dissertation** (PhD in Animal Sciences) - Rutgers University, New Brunswick, USA, 2005.

MEIJER, G.A.L.; van der MEULEN, J; BAKKER, J.G.M. et al. Free amino acids in plasma and muscles of high yielding dairy cows in early lactation. **Journal Dairy Sciences**, v.78, p.1131-1141, 1995.

REMESAR, X.; AROLA, L.; PALOU, A. et al. Glutamine synthetase activity in rat tissues during pregnancy and lactation. **Hormone Metabolism Research**, v.14, p.419-421, 1982.

SIGMA STAT Software, versão 3.0, Jandel Scientific, San Rafael, CA 337p., 2003.

STRAATEN, van H.W.; DUIST, van M. M.; LABRUYERE, W. T. et al. Cellular concentration of glutamine synthetase in murine organs. **Biochemistry Cellular Biology**, v.84, p.215-231, 2006.

WU, G.; Self, T. A. Amino acids: metabolism and functions. **Encyclopedia of Animal Science**, p. 9-12, 2005.

RESUMO

A glutamina, aminoácido não-essencial desempenha papel importante nos períodos de catabolismo e estresse devido as suas características metabólicas de rápida absorção e por ser uma aminoácido neutro, sendo transportado livremente entre as barreiras celulares. A suplementação com a glutamina vem sendo amplamente investigada em humanos e, mais recentemente, em animais de reprodução. O objetivo neste estudo foi avaliar as concentrações sanguíneas, musculares e lácteas de glutamina em matrizes suínas primíparas submetidas a uma suplementação com glutamina. O experimento foi realizado na Granja Tangureira, no município de Maranguape, região metropolitana de Fortaleza-CE, Brasil e foram utilizadas 45 matrizes suínas primíparas distribuídas em 3 tratamentos: T1 (controle), T2 (2,5% L-glutamina) e T3 (2,5% AminoGut®). As matrizes iniciaram a suplementação 30 dias antes do parto continuando até o desmame. As variáveis estudadas foram as concentrações de glutamina no sangue, músculo, leite, e o peso vivo e a espessura de toucinho em 4 períodos distintos: aos 30 dias antes do parto, ao parto, no 7^o e 21^o dia após o parto. As leitegadas foram uniformizadas para 11 leitões e os dados médios obtidos das leitoas foram analisadas pelo programa SIGMA STAT[®] ficando 5 leitoas (T1), 6 (T2) e 8 (T3). De acordo com a análise de variância não houve diferença estatística para a concentração de glutamina no músculo e no sangue dos grupos experimentais para os períodos estudados ($P > 0,05$). Porém foram diferente do parto à lactação as concentrações sanguíneas e musculares nos grupos suplementados, que apresentaram um % de glutamina maior do que o grupo controle. Com relação a concentração de glutamina no leite, no 7^o dia de lactação as leitoas do T2 apresentou uma maior concentração de glutamina enquanto que aos 21 dias de lactação as matrizes suínas primíparas do grupo T3 apresentaram uma maior concentração de glutamina no leite ($P < 0,01$). Outros estudos deverão ser feitos para se avaliar diferentes níveis de suplementação de glutamina associados a diferentes tamanhos de leitegadas para avaliar o subsequente desempenho reprodutivo das matrizes e o desempenho dos leitões após o desmame.

ABSTRACT

Glutamine, a non essential amino acid has an important role during catabolism and stress periods and because of the metabolic characteristics of fast absorption and to be a neutral amino acid, transported freely between cellular barriers. The supplementation with glutamine is widely investigated in humans and more recently, in reproductive animals. The aim of these studies was evaluate the glutamine concentration on the blood, muscle and milk in primiparous gilts under glutamine supplementation. The experiment was located at Tangureira Farm, city of Maranguape, metropolitan area of Fortaleza-CE, Brazil and we utilized 45 primiparous gilts with 3 treatments: T1 (control), T2 (2.5% L-glutamine) and T3 (2.5% AminoGut®). The gilts started the supplementation on 30 days before parturition until the weaning. The variables studied were glutamine concentration on the blood, muscle and milk, and live weight and back fatness during 4 periods: 30 days before parturition, parturition, 7 and 21 days after parturition. The piglets were uniformized to 11 piglets per gilts and the data were analyzed to SIGMA STAT® program. The according with variance analysis there is no difference nor muscle neither blood glutamine concentration between the studies groups ($P>0.05$). The glutamine supplementation on the blood and muscle on the supplemented groups were greater than on the control group. The concentration of glutamine on the milk was greater on day seven and the greater concentration of glutamine was observed on 21 days on T3 group ($P<0.01$). More studies should have to evaluate different levels of glutamine supplementation associated with diferentes number of piglets to evaluate reproductive performance of gilts and to evaluate piglet's performance after weaning.

CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA GLUTAMINA SINTETASE (GS) E DA CONCENTRAÇÃO DA GLUTAMINA (GLN) EM MATRIZES SUÍNAS PRIMÍPARAS SUPLEMENTADAS COM GLUTAMINA

1 INTRODUÇÃO

Glutamina sintetase (GS) e glutamina (Gln) participam de diversos processos metabólicos e, de forma mais abundante, quando o organismo se encontra em situações de estresse e/ou em catabolismo. O período de transição entre a gestação e a lactação, com perda de massa muscular, foi bem caracterizado no capítulo II, o que pode justificar o uso da suplementação com glutamina em matrizes de alta produção, com a finalidade de minimizar os efeitos da perda de massa muscular e retardo no retorno ao cio para a gestação subsequente.

O grande desafio deste capítulo foi tentar mostrar os efeitos benéficos da suplementação de glutamina na performance da matriz suína. Existem poucos estudos nesta fase produtiva dos animais, por se tratar da etapa mais onerosa da criação; menos ainda com o uso da suplementação durante esta fase. Como a glutamina é sintetizada por vários tecidos no organismo, tornou-se necessário delinear uma metodologia em que a fêmea pudesse se beneficiar da suplementação na dieta com este aminoácido.

Pode-se trabalhar com a idéia que quando se suplementa com glutamina, diminui-se a quantidade de glutamina endógena e, com isso uma menor síntese de glutamina endógena seria necessária, bem como uma menor proteólise muscular, consequentemente, a suplementação promoveria a síntese protéica.

Estudos feitos por Self *et al.* (2004) demonstraram a síntese da glutamina na placenta de matrizes suínas e encontraram que a atividade da glutamina sintetase aumentou significativamente ($P < 0,01$) entre o 20º e o 40º dia de

gestação, diminuindo entre o 40º e o 60º dia de gestação. Em seguida, permanecendo baixa até o final da gestação.

A glutamina foi o aminoácido livre mais abundante encontrado no plasma fetal (cordão umbilical), sendo responsável por 25, 10, 17 e 19% do total dos α -aminoácidos livres encontrados no 45º, 60º, 90º e 110º dia de gestação, respectivamente. A glutamina foi o aminoácido livre mais abundante no líquido amniótico durante os primeiros meses de gestação, correspondendo a 20, 32, 24 e 20% no 30º, 45º, 60º e 90º dia de gestação, respectivamente (Wu *et al.*, 1996).

Wu *et al.* (1998) estudaram como a deficiência de proteína na matriz suína podia afetar as concentrações de aminoácidos no plasma fetal e no líquido alantoidiano dos leitões, e encontraram que a glutamina foi o aminoácido mais abundante no fluido amniótico do 40º ao 60º dia de gestação, independente do regime alimentar. Para as concentrações dos aminoácidos no plasma dos leitões não foi registrada diferenças significativas em tais concentrações de aminoácidos em relação ao regime alimentar, sendo que os aminoácidos mais abundantes foram alanina, arginina, leucina, isoleucina, valina, cistina, glutamina, glicina, lisina, ornitina, prolina, taurina e treonina.

A suplementação com glutamina não é uma tarefa fácil. Passou-se a trabalhar com um sistema mais complexo, visto que agora se tem a placenta como um sistema interno e regulador da síntese de glutamina.

A glutamina aparece em grandes quantidades no leite de matrizes suínas, culminando com uma redução pronunciada de glutamina na musculatura esquelética de matrizes lactantes. Wu (2005) concluiu que uma suplementação durante a lactação poderia prevenir a perda de massa muscular de matrizes suínas gestantes. Complementando esta afirmação, Lobley *et al.* (2001) acrescentaram que a glutamina pode limitar a produção de proteína no leite, particularmente durante o período inicial da lactação, quando as concentrações de glutamato e glutamina diminuíram em torno de 25%. Neste mesmo período, também ocorreu uma diminuição em torno de 25% de glutamina no músculo das matrizes suínas.

Quando se fala de gestação e lactação de matrizes suínas, não se pode esquecer da arginina. É o aminoácido carreador de N mais abundante nos fetos dos leitões, durante todo o período gestacional, seguido de glicina, glutamato/glutamina e aspartato/asparagina dos 90 aos 114 dias de gestação. A glutamina

aparece ainda como importante mediador inter-órgãos do metabolismo do carbono e nitrogênio dos fetos (Wu *et al.*, 1999).

A premissa para a suplementação é de que a partir do momento que a glutamina exógena seja adicionada, a demanda por glutamina sintetizada pelo organismo (endógena) seja diminuída e, conseqüentemente, reduza a proteólise muscular, que é o principal local de síntese de glutamina em estado de estresse e catabolismo.

A suplementação com a glutamina é uma tarefa delicada. Quando ela é fornecida pura, é de baixa solubilidade. Estudos com humanos foram feitos no intuito de fornecer esse aminoácido na forma de dipeptídeo, tanto por via parenteral (endovenosa) como oral, com vistas a melhorar o processo de absorção e aproveitamento pelos tecidos corporais.

Wilmore (1983) usou uma solução de glutamina (GLN) em pacientes com transplante de osso: 40 g GLN/dia em solução transparental (TPN). Os pacientes tratados se recuperaram mais rápido do que aqueles do grupo controle (29 dias com Gln vs 36 dias sem GLN, representando uma economia de US\$ 25,000 por paciente).

Griffiths *et al.* (1997) estudaram 84 pacientes em estado crítico e registraram um aumento para seis meses no tempo de vida, reduzindo os custos hospitalares quando esses pacientes foram suplementados com glutamina. Powell-Tuck (1999) avaliaram 168 pacientes sob efeito de suplementação com glutamina e constataram uma redução no tempo de internamento no hospital para aqueles pacientes que realizaram cirurgia.

Num estudo com 24 pacientes na UTI, com metástase de câncer cólon-retal, Decker-Baumann *et al.* (1999) observaram que quando esses pacientes foram suplementados com glutamina houve uma redução nas ulcerações das mucosas gástrica e duodenal.

Watford (2004) citou um estudo feito no norte da Inglaterra com 84 pacientes (42 em cada grupo), os quais apresentaram severas infecções, porém obtiveram bons resultados. Para o grupo Gln, foram curados 24 pacientes ao final de seis meses (50%), enquanto que no grupo controle houve um total de 14 pacientes curados ao final de seis meses (33%).

Tjader *et al.* (2004) estudaram a administração endovenosa de Gln em pacientes de UTI e encontraram que a Gln foi capaz de diminuir a excreção da 3

metil-histidina. A 3 metil-histidina é um marcador de proteólise que, uma vez liberada, não é incorporada a nenhum sistema, sendo lançada no sistema circulatório para ser excretada.

Até o presente momento, o único estudo conhecido na espécie suína, durante as fases de gestação e lactação, foi conduzido por Kitt *et al.* (2004), no qual estudaram o efeito da suplementação com 2,5% de glutamina (Gln), na dieta da matriz suína, em substituição ao farelo de soja. Como resultados encontraram 17% e 36% a mais nas concentrações plasmáticas de glutamina no 7^o e no 21^o dia de lactação, respectivamente, quando comparadas com as matrizes suínas mantidas com dieta controle. Os autores acrescentaram ainda que as matrizes suínas suplementadas com 2,5% de Gln no 7^o e 21^o dias de lactação obtiveram 46% e 265% a mais nas concentrações de glutamina no leite, respectivamente, quando comparadas com àquelas do grupo controle.

Considerando esta aplicação nos animais de produção, recentemente a Ajinomoto Biolatina lançou o AminoGut®. Este produto composto de glutamina e ácido glutâmico, em proporções iguais, passa a ser objeto do presente estudo.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação com L-glutamina e AminoGut® sobre as concentrações sanguínea, muscular e láctea de matrizes suínas, no terço final da gestação e durante a lactação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais experimentais

Foram utilizadas 45 matrizes suínas primíparas da linhagem Toppigs do Brasil, genética Dalland, alojadas na Granja Tangureira, localizada no município de Maranguape, região metropolitana da cidade de Fortaleza no estado do Ceará. As fêmeas foram divididas em três grupos de 15 animais de acordo com os tratamentos. Após a cobertura, foram acompanhadas e monitoradas através da determinação do peso vivo e da mensuração da espessura de toucinho no 30^o dia antes do parto, no dia do parto, e no 7^o e 21^o dia de lactação (data do desmame). As leitegadas foram uniformizadas até 2 dias após o parto, para 10 e/ ou 11 leitões.

2.2 Dietas experimentais

Nos 30 dias antes do parto (terço final da gestação), as matrizes consumiram 2,0 kg de ração/ dia fracionados em duas refeições (manhã e tarde). Após o parto, o consumo foi aumentando gradativamente e, após sete dias de lactação, as fêmeas passaram a consumir, em média, 4,0 kg de ração/dia, fracionados em duas refeições. As rações foram isoprotéicas, isocalóricas, isocálcicas, isofosfóricas e isolisínicas e obedeceram as exigências nutricionais propostas para cada uma dos estados fisiológicos, formuladas pela NUTRON Alimentos LTDA, e estão representadas na Tabela 2. As matrizes consumiram água à vontade.

As rações foram fornecidas em comedouros automáticos individualizados, conforme mostrado na Figura 15.

Tabela 2 - Composição química e participação dos ingredientes (%) nas rações comerciais

<i>Ingredientes</i>	<i>Fase de gestação</i>	<i>Fase de lactação</i>
Macro Ingredientes (kg)		
Milho (grão)	534,000	574,000
Farelo de trigo	320,000	40,000
Farelo de soja	81,000	132,000
Soja integral extrusada	-----	186,000
Farinha carne	50,000	12,000
Açúcar Cristal	-----	20,000
Sal Branco Comum	5,000	5,000
Calcáreo 38%	4,000	9,000
Fosfato Bicálcico	-----	16,000
Micro Ingredientes		
Premix Micromineral	0,500	0,500
Cromo	1,000	1,000
DL-Metionina 98%	-----	0,198
L-Lisina 80%	0,381	0,356
Penicilina 98%	-----	0,200
Premix Reprodução	4,000	4,000
Total (Kg)	1.000,00	1.000,00
Nutrientes		
Proteína Bruta (%)	15,476	19
Fibra Bruta (%)	4,662	3,653
Cinza (%)	5,279	6,136
Cálcio (%)	0,8	0,963
Fósforo total (%)	0,72	0,709
Energia Metabolizável (Kcal/kg)	2.900,49	3.348,28

Fonte: Nutron Alimentos LTDA



Figura 15 – Comedouro individual automático para fornecimento da ração na fase de gestação de matrizes suínas primíparas.

2.3 Suplementação das matrizes suínas primíparas

A suplementação foi iniciada aos 30 dias antes da data provável do parto e continuou até o desmame dos leitões (21 dias). As matrizes do Grupo T1 (Controle) não foram suplementadas, as do Grupo T2 receberam 2,5% de suplementação com glutamina e as do Grupo T3 receberam 2,5% de suplementação com AminoGut® (produto comercial da Ajinomoto) do total da dieta. A composição da ração foi similar, exceto quanto à suplementação. É importante salientar o baixo percentual de glutamina em rações comerciais dispensando assim um análise de glutamina na ração comercial utilizada. Os comedouros das matrizes eram individualizados o que facilitou o controle do consumo total do suplemento. A glutamina e o AminoGut® foram previamente pesados e colocados nos comedouros durante o arraçãoamento (Figura 16).



Figura 16 – Distribuição do suplemento em comedouros individuais na fase de lactação de matrizes suínas primíparas.

2.4 Coleta das amostras

Foram coletadas amostras de músculo através da biópsia do glúteo superficial; a coleta do sangue foi feita na veia auricular, seguida da aplicação de 0,5 mL de ocitocina (Prolacton da Tortuga 1:10000) na veia auricular para a coleta de leite. Em seguida, as matrizes foram avaliadas para se estimar o peso vivo e mensurada da espessura de toucinho na região da décima costela, através da ultrasonografia em tempo real com transdutor de 5 MHz (Pie Medical 450 classic). Para as amostras de tecido muscular, leite e sangue foram analisadas as concentrações de glutamina.

As amostras das matrizes foram colhidas no 30^o dia antes do parto, no dia do parto e no 7^o e 21^o dia após o parto.

2.4.1 Coleta e análise do músculo

A amostra de músculo foi colhido através do uso de agulhas de biópsia, na região do músculo glúteo superficial (Figura 17).



Figura 17 – Biópsia muscular em matrizes suínas primíparas.

Inicialmente, foi feito, uma pequena incisão na pele e no tecido adiposo, no local da biópsia, para facilitar a introdução da agulha, sendo a amostra de músculo colhida a uma profundidade de cerca 8 cm, tendo-se o cuidado de ultrapassar a camada de gordura.

Após a coleta, a amostra do músculo foi imediatamente congelada, em gelo seco, e transferida para freezer -80°C para posterior homogeneização e análise.

As amostras do músculo (100 a 200 mg) foram utilizadas para determinação da concentração da glutamina. Inicialmente, as amostras foram homogeneizadas com triturador de músculo (TISSUE TEAROR[®]) em solução de ácido perclórico (PCA) a 10% e, em seguida, centrifugadas a 2000 rpm durante cinco minutos. O sobrenadante foi coletado e neutralizado com 1,0 M KOH. As amostras foram acondicionadas à -20°C para posterior leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda 340 nm, segundo a técnica descrita por Watford (2003) para determinação das concentrações de glutamina e glutamato e previamente descrita no Capítulo II, item 2.5 desta tese.

2.4.2 Coleta e análise do sangue

O sangue foi coletado numa das veias da região auricular utilizando-se tubos vacutainer heparinizados (BD, 7,0 mL). Após a coleta, o sangue foi resfriado, imediatamente desproteinizado em solução de ácido perclórico (PCA) a 10% e neutralizado com 1,0 M de hidróxido de potássio (KOH). As amostras foram acondicionadas à -20°C para leitura no espectrofotômetro com comprimento de onda 340 nm, segundo a técnica descrita por Watford (2003) para determinação das concentrações de glutamina e glutamato e previamente descrita no Capítulo II, item 2.5 desta tese.

2.4.3 Coleta e análise do leite

O leite foi coletado das tetas abdominais e acondicionado em tubos de Eppendorff (Figura 18). Após a coleta, o leite foi resfriado, imediatamente desproteinizado em solução de ácido perclórico a 10% e neutralizado com 1,0 M de hidróxido de potássio (KOH). As amostras foram acondicionadas à -20°C para

leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda 340 nm, segundo a técnica descrita por Watford (2003) para determinação das concentrações de glutamina e glutamato e previamente descrita no Capítulo II, item 2.5 desta tese.



Figura 18 – Coleta do leite em matrizes suínas primíparas.

2.4.4 Avaliação do peso vivo

Devido à dificuldade no manejo das matrizes suínas em razão do elevado peso e o avançado estado de gestação, foi feita uma estimativa de peso através de medidas de comprimento corporal e perímetro torácico, utilizando fita métrica, conforme a fórmula abaixo descrita pela NUTRON Alimentos LTDA (2002).

$$\text{Peso do corpo} = [(\text{PC})^2 \times \text{CC}] \times 69,3$$

Onde:

PC = perímetro torácico

CC = comprimento do corpo

69,3 = constante

2.4.5 Avaliação da espessura de toucinho

A mensuração da espessura de toucinho foi feita na altura da região da décima costela (P2), através de ultrasonografia em tempo real com o transdutor de 5 MHz, e determinada em milímetros, conforme ilustrada na Figura 19.



Figura 19 - Mensuração da espessura de toucinho com o emprego da ultrassom.

* D (espessura de toucinho) = 15 mm

2.5 Análise estatística

As matrizes suínas primíparas foram distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado, inicialmente com 45 animais distribuídos em 3 tratamentos, 15 repetições e 4 períodos, sendo a unidade experimental representada por uma matriz.

Com o avançar da lactação, tivemos algumas eliminações das matrizes que não conseguiram manter o nível de 10 e 11 leitões durante toda a lactação. Com

isso, no final do experimento ficou-se com 19 animais sendo 6 matrizes no T1, 5 matrizes no T2 e 8 matrizes no T3.

Para a análise da concentração de glutamina no sangue, no leite e no músculo das matrizes utilizou-se 5 matrizes para cada período. Para determinação do peso vivo e espessura de toucinho foram utilizadas todas as matrizes com 10 e 11 leitões, ou seja, 6 matrizes no T1, 5 matrizes no T2 e 8 matrizes no T3.

As médias nos diferentes dias de coletas foram analisadas usando análise de variância comparando os vários grupos, sendo cada grupo constituído do tratamento mais o período. As diferenças entre as médias foram identificadas usando-se o teste Tukey em nível de 5%. A hipótese nula foi rejeitada quando o $P > 0,05$. Utilizou-se o programa SigmaStat 3 software Jandel Scientific, San Rafael, CA (2003) para proceder a análise computacional.

O modelo estatístico utilizado foi o seguinte:

$$Y_{ij} = \mu + g_i + e_{ijk}$$

Onde:

Y = características estudadas;

μ = média;

g = efeito do i-ésimo grupo (i = 1.... 12);

e_{ij} = erro residual.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Concentração da glutamina (Gln) muscular de matrizes suínas primíparas

Os resultados da concentração de glutamina no músculo das matrizes suínas primíparas de acordo com os tratamentos experimentais estão ilustrados na Figura 20. Conforme a análise de variância, não houve diferenças estatísticas significativas para a concentração de glutamina nos diferentes grupos experimentais durante os períodos estudados ($P>0,05$). Apesar de não ter havido diferenças estatísticas, deve-se salientar o efeito da glutamina e do AminoGut no sétimo dia de lactação. Tanto a glutamina quanto o AminoGut foram capazes de aumentar a concentração da glutamina muscular das matrizes no período da lactação e, conseqüentemente, ambos podem ser considerados como agentes minimizadores da proteólise muscular durante o período estudado.

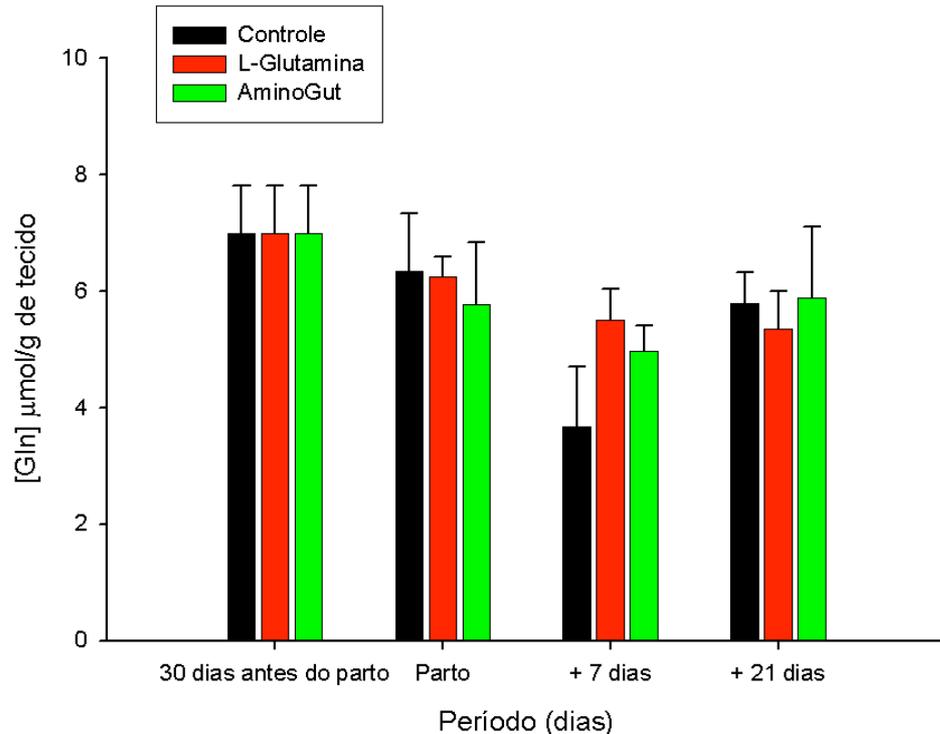


Figura 20 – Concentração da glutamina (Gln) muscular de matrizes suínas primíparas dos 30 dias antes do parto ao desmame

* 30 dias antes do parto, parto (dia do parto), +7 dias (7 dias após o parto) e +21 dias (21 dias após o parto).

A suplementação de matrizes suínas gestantes e lactantes, com aminoácidos, tem sido alvo de muitas pesquisas nos últimos 30 anos. A falta de tabelas ajustadas às exigências de aminoácidos durante as fases do ciclo produtivo - gestação e lactação-, faz com que sejam agilizadas as pesquisas, acerca de exigências aminoacídicas adaptadas a estas fases produtivas, sem que seja preciso extrapolar os dados obtidos dos animais nas fases de crescimento e terminação.

Nos atuais sistemas de produção, muitas fêmeas entram em reprodução ainda em um estado de imaturidade fisiológica. O percentual de proteína mobilizado deve garantir as necessidades de manutenção e reprodução, suprimindo também a demanda dos fetos. Ji *et al.* (2005) constataram que um ganho insuficiente de peso, durante a gestação, resulta num baixo peso após o desmame e no retardamento do cio nas fêmeas; por outro lado, um ganho excessivo de gordura durante a gestação, diminui o consumo voluntário de ração durante a lactação e, conseqüentemente, a produção de leite da matriz.

Outro aspecto importante na concentração da glutamina muscular e sua relação com a proteólise e performance reprodutiva de matrizes suínas foi demonstrado por Clowes *et al.* (2004). Estes autores avaliaram a mobilização de proteína no decorrer da lactação e observaram um aumento na concentração de glutamina livre no músculo ao final da lactação, tendo sido esse aumento relacionado com o nível de perda de proteína. Eles também observaram um aumento da glutamina plasmática e da glutamina livre no leite das matrizes.

A importância do aumento da concentração da glutamina muscular deve-se ao fato de estar associado a uma diminuição da proteólise muscular para atender a demanda protéica. Com isso, Clowes *et al.* (2004) afirmaram que a perda protéica é acompanhada de uma diminuição na função ovariana. Essas mudanças podem retardar ou ainda prevenir o próximo cio das matrizes.

Com relação à expressão da glutamina sintetase, sem a suplementação e de acordo com os resultados apresentados no capítulo I, a concentração da glutamina apresentou uma correlação negativa com a expressão da glutamina sintetase. Esses resultados também estão de acordo com aqueles mostrados por Manso Filho (2005) que encontrou uma correlação negativa entre a concentração muscular de glutamina e a expressão muscular da glutamina sintetase em éguas lactantes.

Tendo em vista estes resultados e o fato de não ter sido encontrada diferenças estatísticas significativas na concentração de glutamina, pode-se

especular que também não houve diferenças estatísticas para a expressão muscular da glutamina sintetase.

3.2 Concentração da glutamina (Gln) sanguínea de matrizes suínas primíparas

As concentrações de glutamina no sangue das matrizes suínas primíparas estão representadas na Figura 21. Não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) no efeito da glutamina suplementada sobre a concentração de glutamina sanguínea durante os períodos estudados.

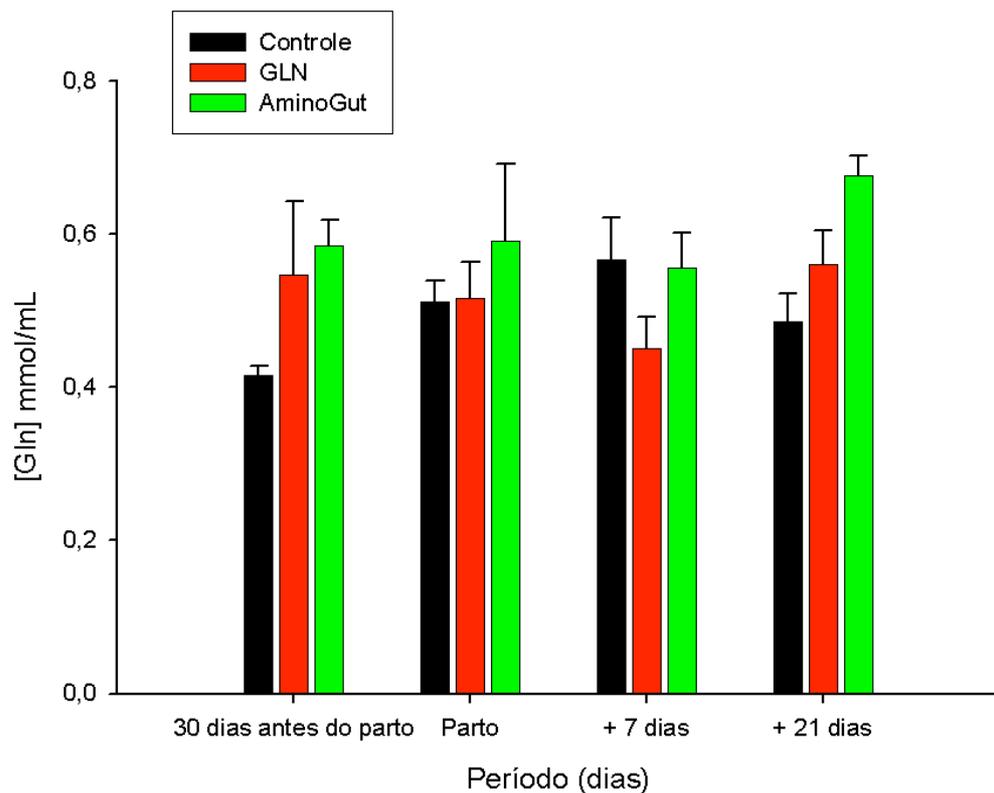


Figura 21 – Concentração da glutamina (Gln) no sangue de matrizes suínas primíparas dos 30 dias antes do parto ao desmame

* 30 dias antes do parto, parto (dia do parto), +7 dias (7 dias após o parto) e + 21 dias (21 dias após o parto).

Estes resultados podem ser considerados dentro da expectativa, uma vez que a coleta de sangue foi realizada quatro a cinco horas após o arraçoamento. Os

resultados deste estudo foram compatíveis com aqueles de Harris e Harris (2003) que demonstraram que após seis horas do fornecimento da suplementação da glutamina, a concentração sanguínea deste aminoácido retornou aos níveis basais.

Apesar dessas evidências, Kitt *et al.* (2004) encontraram diferenças estatísticas no dias 7^o e 21^o dia de lactação quando suplementaram matrizes suínas com 2,5 % de glutamina em substituição à mistura milho e farelo de soja.

3.3 Concentração da glutamina (Gln) no leite de matrizes suínas primíparas

Os dados da concentração de glutamina no leite das matrizes suínas primíparas são mostrados na Figura 22.

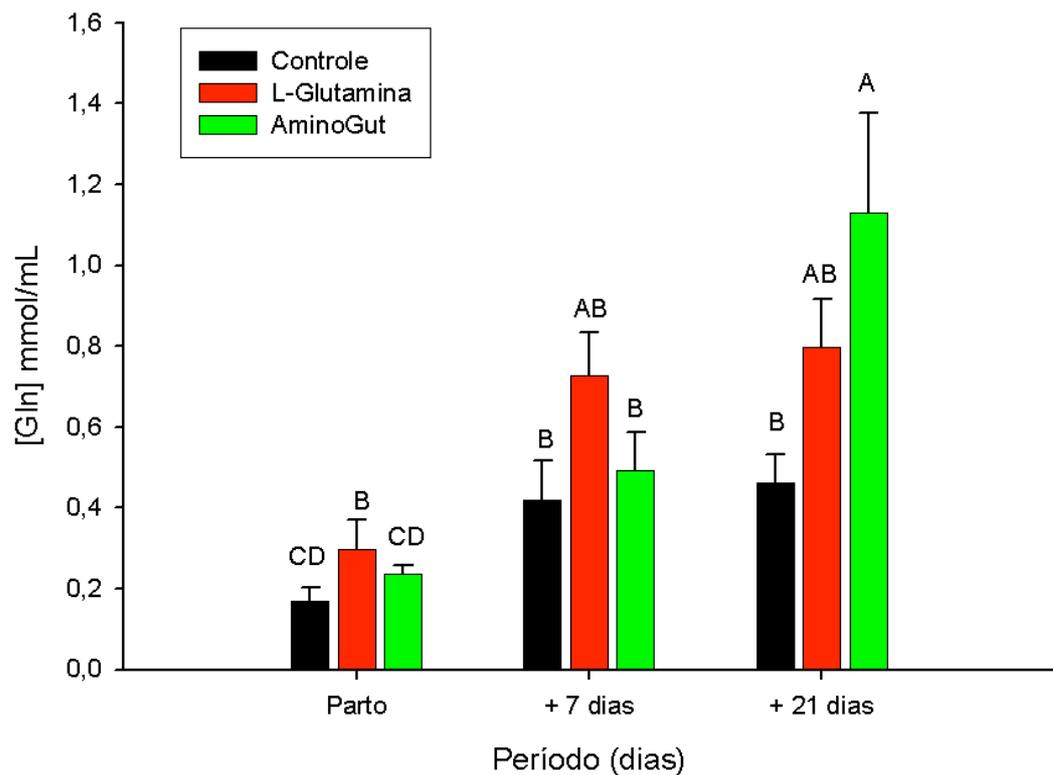


Figura 22 – Concentração da glutamina (Gln) no leite de matrizes suínas primíparas do parto ao desmame

* médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($P < 0,01$)

** parto (dia do parto), +7 dias (7 dias após o parto) e + 21 dias (21 dias após o parto).

Ocorreu efeito significativo ($P < 0,01$) da suplementação da glutamina no leite das matrizes no vigésimo primeiro dia de lactação das matrizes

suplementadas com AminoGut, quando comparadas com as matrizes do grupo controle e as matrizes suplementadas com AminoGut no 7^o dia de lactação.

Aos 21 dias de lactação, não houve efeito significativo ($P > 0,05$) entre as matrizes dos grupos suplementados com glutamina e com AminoGut, porém houve efeito significativo ($P < 0,01$) em relação ao grupo controle. Esse aumento na concentração de glutamina nos grupos T2 (Glutamina) e T3 (AminoGut) poderá ter efeito benéfico no período do desmame dos leitões, prevenindo ou minimizando o efeito do estresse provocado pelo desmame

Aos 7 dias de lactação, a concentração da glutamina no T3 (AminoGut) passou de 0,5 $\mu\text{mol/mL}$ de leite para 1,1 $\mu\text{mol/mL}$ de leite, configurando um aumento de 110% na concentração de glutamina no leite. Aos 7 dias de lactação a concentração de glutamina foi maior e significativa quando comparada com aquelas matrizes do grupo controle e as matrizes do T3 (AminoGut). Esta mesma tendência se repetiu no dia do parto. Com estes resultados, podemos indicar a importância da glutamina no leite, nos períodos mais críticos, tanto para matriz como para o leitão. Tanto no dia do parto, como aos 7 dias após o parto, altas concentrações de glutamina podem aumentar a imunidade dos leitões, assim como favorecer ao desenvolvimento das vilosidades e criptas. A importância da glutamina nos períodos caracterizados como de estresse e de catabolismo, fazendo com que a glutamina seja utilizada de forma mais rápida e de forma emergencial.

Por outro lado, Kitt *et al.* (2004) encontraram um aumento de 46% na concentração de glutamina no leite com sete dias de lactação ($P < 0,08$) e 265% aos 21 dias de lactação ($P < 0,01$), quando suplementaram as matrizes suínas com 2,5% de glutamina em substituição à mistura milho e farelo de soja.

A concentração da glutamina no leite é de extrema importância para a vitalidade, estabelecimento do sistema imune dos leitões e funções intestinais. Sabe-se que os leitões são altamente sensíveis a diarreias, principalmente após desmame, o que pode comprometer os parâmetros produtivos dos leitões e o seu estado sanitário.

Quando os leitões são acometidos com a diarreia, as vilosidades e as criptas intestinais sofrem atrofia e comprometem a absorção de nutrientes. Com isso, Kitt *et al.* (2002) estudaram o efeito da glutamina no crescimento de leitões e no comprimento das vilosidades intestinais e não encontraram diferença significativa para o comprimento das vilosidades intestinais; porém, a

suplementação com glutamina melhorou a eficiência alimentar e as estruturas e funções intestinais como um todo.

Os leitões neonatais não consomem alimentos sólidos, sendo o leite a única fonte de alimentos para eles. O leite é também a fonte exógena de aminoácidos para a síntese de proteínas, neurotransmissores e hormônios (Wu e Knabe, 1994). Estes mesmos autores avaliaram a composição do leite de matrizes suínas e encontraram que aos oito e aos 22 dias de lactação a glutamina foi o α -aminoácido livre mais abundante no leite. Wu e Knabe (1994), citaram vários autores que observaram que a predominância de glutamina livre e de glutamina associada à proteína do colostro e do leite de matrizes suínas pode indicar que a glutamina possui um papel fundamental no crescimento e no desenvolvimento do trato gastrointestinal dos neonatos (Wu e Knabe, 1994).

Buscando salientar a importância da glutamina para os leitões, deve ser lembrado que a glutamina é uma importante fonte de energia para os enterócitos, além de importante precursor para a síntese de purinas e pirimidinas que atuam na divisão celular (Wu e Knabe, 1994).

O aumento da taxa de oxidação da glutamina nos enterócitos aumenta com o crescimento dos leitões e coincide com o aumento da concentração de glutamina livre no leite (Wu e Knabe, 1994).

Uma outra informação importantíssima foi sugerida por Neu (2001), que estudando o metabolismo da glutamina salientou a importância do nitrogênio amido da Gln na biossíntese da glucosamina, precursora de todas as hexosaminas. As hexosaminas são componentes das glicoproteínas e dos amino-açúcares, importantes componentes na manutenção da absorção e das barreiras imunológicas através da mucina. É através deste processo bioquímico que uma maior concentração da glutamina no leite pode prevenir a atrofia das vilosidades intestinais nos leitões após o desmame.

A informação constatada por Neu (2001) foi confirmada por Kitt *et al.* (2004) que estudaram o efeito da suplementação com glutamina no desempenho da matriz suína e no desenvolvimento intestinal dos leitões, e encontraram que os leitões de matrizes suplementadas com glutamina tinham a altura das vilosidades intestinais 12% superiores quando comparados com os leitões das fêmeas submetidas a uma dieta controle e sem a suplementação com glutamina.

3.4 Avaliação do peso vivo de matrizes suínas primíparas

Os dados de peso vivo das matrizes suínas primíparas encontram-se na Figura 23.

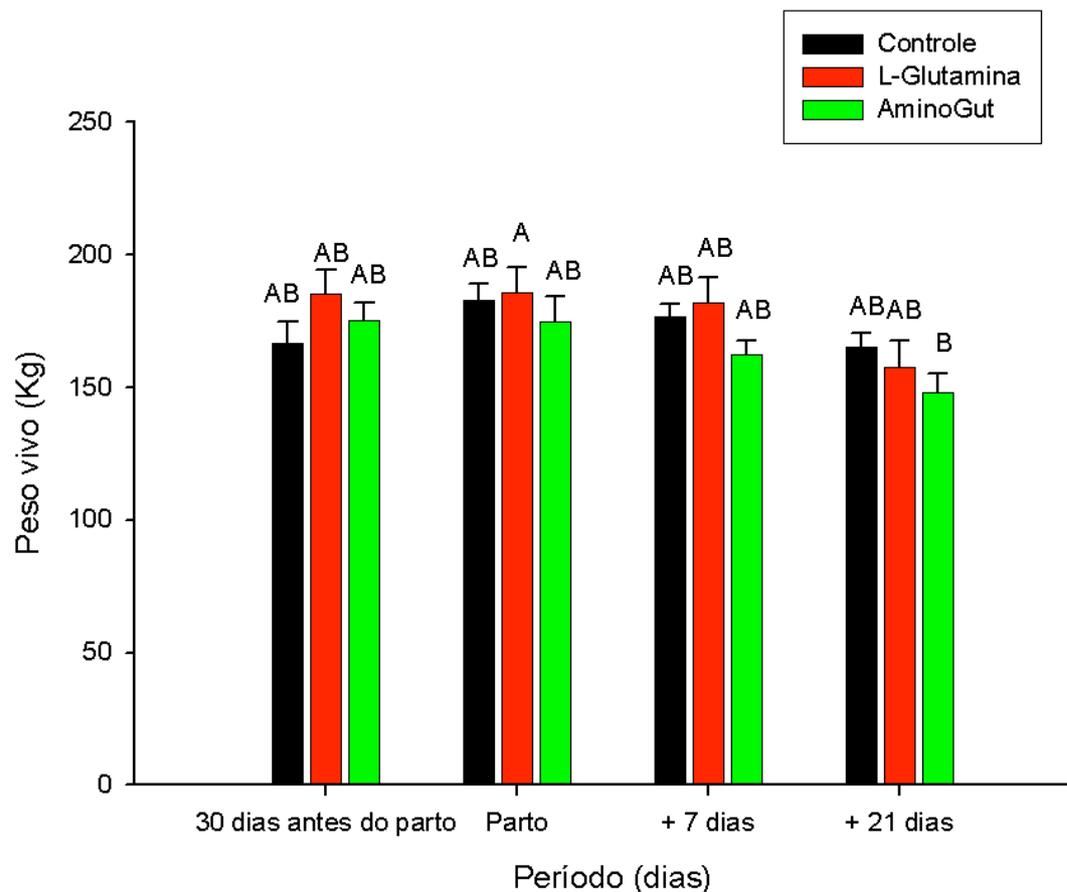


Figura 23 – Avaliação do peso vivo de matrizes suínas primíparas dos 30 dias antes do parto ao desmame

* médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($P < 0,01$)

** 30 dias antes do parto, parto (dia do parto), +7 dias (7 dias após o parto) e + 21 dias (21 dias após o parto).

O resultado da análise de variância mostrou que houve um efeito significativo ($P < 0,01$) entre o peso vivo das matrizes suplementadas com glutamina (T2) no dia do parto e as matrizes suplementadas com AminoGut (T3) aos 21 dias de lactação. Não houve diferença estatística para os demais períodos estudados.

Deve-se levar em consideração a condição corporal das matrizes suínas após o desmame. Como as matrizes suínas foram primíparas, ainda se encontravam em desenvolvimento muscular e endócrino, em crescimento, existem evidências que quando as matrizes desmamam caquéticas, demoram a entrar em cio e, conseqüentemente, aumentam o intervalo entre a desmama e o próximo cio.

Essas observações foram confirmadas por Quesnel *et al.* (2004) quando estudaram o efeito da restrição protéica (lisina) no desempenho reprodutivo pós-desmame e encontraram que essa restrição retardou o retorno ao cio nas matrizes suínas com 170 e 190 kg, mas este retardamento não foi observado nas matrizes suínas com 240 Kg de peso vivo. A restrição protéica também afetou a taxa de ovulação nas matrizes mais leves, sendo este efeito também diminuído nas matrizes suínas mais pesadas.

Jones e Stahly (1999) estudaram o efeito da suplementação com aminoácidos durante a lactação e na composição do leite e demonstraram que, as matrizes suínas que consumiam uma dieta com baixo teor de proteína mobilizavam os nutrientes tanto do músculo como da gordura, representando 43% da perda de peso da matriz, enquanto que as matrizes suínas que consumiam uma dieta com alto teor de proteína mobilizavam os nutrientes da gordura, representando 310% da perda de peso da matriz.

Os resultados acima mencionados e comparados com os resultados deste trabalho permitem concluir que neste experimento, nos 3 tratamentos, as matrizes suínas estavam consumindo ração com teor de proteína adequado para minimizar a perda de massa muscular durante a lactação. Quando as matrizes submetidas a dietas com alto teor de proteína perderam menos massa muscular, confirmado pela excreção do 3 metil-histidina (Jones e Stahly, 1999).

Outro fator que também pode afetar a perda de massa muscular é o tamanho da leitegada. Estudos feitos por Kim e Easter (2001) demonstraram que as matrizes com 12 leitões possuíam 84 g a menos de proteína quando comparadas com matrizes com 6 leitões aos 21 dias de lactação. Este efeito não foi observado no presente experimento, uma vez que as leitegadas foram uniformizadas para 11 leitões e, com isso, pôde-se avaliar o real efeito da suplementação da glutamina na prevenção da perda de massa muscular.

3.5 Avaliação da espessura de toucinho de matrizes suínas primíparas

Os dados obtidos e submetidos à análise de variância para espessura de toucinho de matrizes suínas primíparas encontram-se na Figura 24.

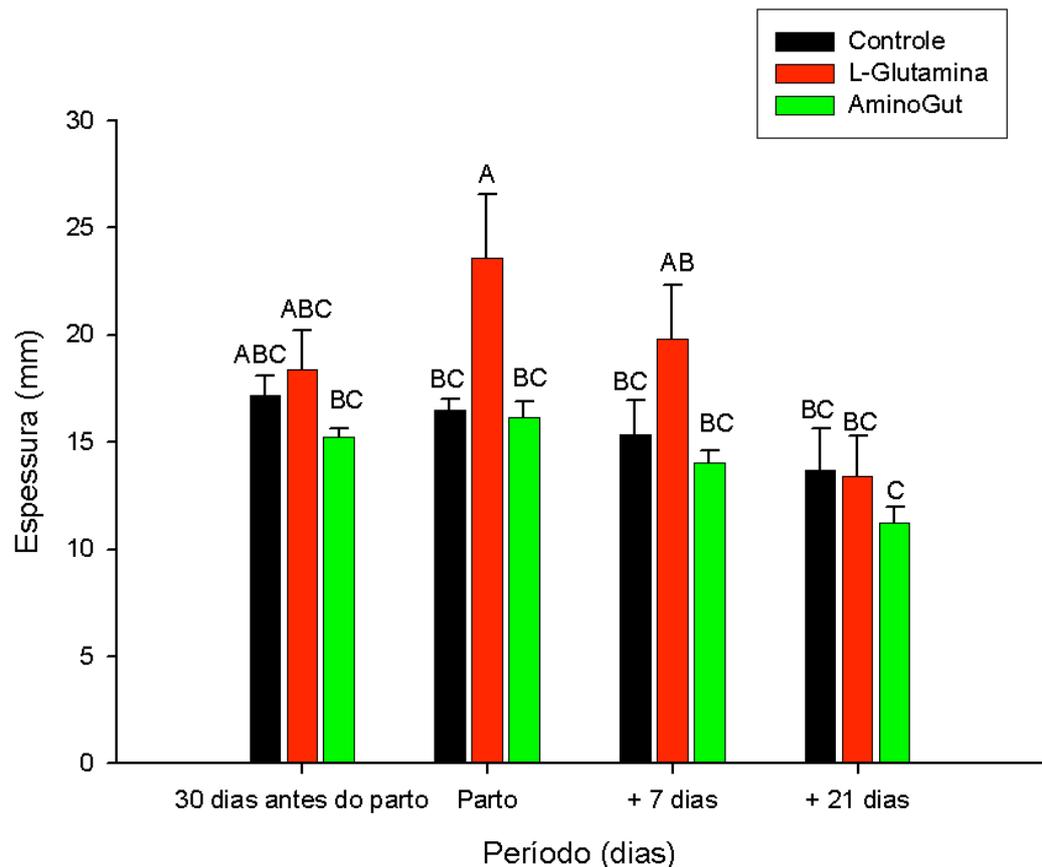


Figura 24 – Espessura de toucinho de matrizes suínas primíparas dos 30 dias antes do parto até o desmame

* médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($P < 0,01$)

**30 dias antes do parto, parto (dia do parto), +7 dias (7 dias após o parto) e +21 dias (21 dias após o parto).

Houve diferença significativa ($P < 0,01$) na espessura de toucinho no dia do parto para matrizes suínas alimentadas com glutamina (T2), quando comparadas com as matrizes do grupo controle (T1) e as fêmeas suplementadas com AminoGut (T3).

Aos 7 e 21 dias após o parto, não houve diferenças estatísticas ($P>0,05$) entre os tratamentos.

Para o grupo T1 (controle) e o grupo T3 (AminoGut) não houve diferenças estatísticas ($P>0,05$) na espessura de toucinho aos 30 dias antes do parto até o desmame. Para o grupo T2 (Glutamina), a espessura de toucinho foi estatisticamente semelhante aos 30 dias antes do parto, dia do parto e aos 7 dias após o parto, diferindo significativamente dos 21 dias após o parto.

Não existem na literatura trabalhos científicos estudando o efeito da suplementação de glutamina sobre a espessura de toucinho de matrizes suínas lactantes, porém existem alguns estudos com o efeito da suplementação de outros aminoácidos sobre o depósito de gordura na carcaça.

Um fator que também pode afetar o percentual de mobilização dos nutrientes é o número de leitões. Kim e Easter (2001) estudaram a mobilização de nutrientes de acordo com o tamanho da leitegada e encontraram que o percentual de gordura na carcaça era maior ($P<0,05$) nas matrizes com 9 leitões quando comparada com o das matrizes com 12 leitões, justificando assim que as matrizes com 12 leitões possuíam um nível de mobilização de nutrientes maior do que as fêmeas com 9 leitões. O peso do leitão não afetou o percentual de gordura durante os 21 dias de lactação.

4 CONCLUSÕES

A concentração de glutamina (GLN) no músculo apresentou uma tendência para um efeito positivo da suplementação tanto para a L-glutamina pura (T2) como para o AminoGut (T3) aos 7 e 21 dias de lactação, respectivamente, de matrizes suínas primíparas.

Para a concentração de glutamina (GLN) no sangue, o AminoGut teve a tendência em ser capaz de manter os níveis mais altos de glutamina sanguínea em relação aos demais tratamentos, do período pré-parto até os 21 dias de lactação de matrizes suínas primíparas.

O efeito significativo da suplementação ficou demonstrado para a concentração da glutamina no leite. A suplementação com a L-glutamina (T2) mostrou-se a tendência de ser mais eficiente aos 7 dias de lactação, enquanto que a suplementação com o AminoGut (T3) mostrou-se mais eficiente aos 21 dias de lactação em relação ao grupo controle de matrizes suínas primíparas.

5 REFERÊNCIAS

CLOWES, E. J.; AHERNE, F.X.; BARACOS, V.E. Skeletal muscle protein mobilization during the progress of lactation. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v.288, p.E564-E572, 2005.

DECKER-BAUMANN, C. et al. Reduction of chemotherapy-induced side-effects by parenteral glutamine supplementation in patients with metastatic colorectal cancer. **European Journal of Cancer**, v.35, p.202-207, 1999.

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.

HARRIS, R.C.; HARRIS, P.A. Supplementation of equine feedstuffs. **Patent**. USA, 2003.

JI, F. et al. Changes in weight and composition in various tissues of pregnant gilts and their nutrition implications. **Journal of Animal Science**, v.83, p.366-375, 2005.

JONES, D.B.; STAHLY, T.S. Impact of amino acid nutrition during lactation on body nutrient mobilization and milk nutrient output in primiparous sows. **Journal of Animal Science**, v.77, p.1513-1522, 1999.

KIM, S.W.; EASTER, R.A. Nutrient mobilization from body tissues as influenced by litter size in lactating sows. **Journal of Animal Science**, v.79, p.2179-2186, 2001.

KITT, S.J. ET AL. Effects of glutamine on growth performance and small intestine villus height in weanling pigs. **Nebraska Swine Report**, p.29-32, 2002.

KITT, S.J.; MILLER, P.S.; FISCHER, R.L. Effects of sow dietary glutamine supplementation on sow and litter performance, subsequent weanling pig performance and intestinal development after an immune challenge. **Nebraska Swine Report**, p.14-17, 2004.

LOBLEY, G.E.; HOSKIN, S.O.; MCNEIL, C.J. Glutamine in Animal Science and Production. **Journal of Animal Science**, v.131, p.525S-2531S, 2001.

NEU, J. Glutamine in the fetus and critically ill low birth weight neonate: Metabolism and mechanism of action. **Journal of Nutrition**, v.131, p.2585S-2589S, 2001.

NUTRON Alimentos, Revista de comunicação técnica da Nutron, a qual recebe o nome de Suinews citada como fonte: Adaptado de The PigSite.com. Suinews nº 15 março/abril 2002 - **Boletim Técnico** para funcionários e clientes da Nutron Alimentos.

POWELL-TUCK J. Total parenteral nutrition with glutamine dipeptide shortened hospital stays and improved immune status and nitrogen economy after major abdominal surgery. **Gut**, v.44(2), p.155, 1999.

QUESNEL, H.; MEIJA-GUADARRAMA, C.; PASQUIER, A.; et al. Dietary protein restriction during lactation in primiparous sow with different live weights at farrowing: Consequences on reproductive performance and interactions with metabolic status. **Reproduction, Nutrition and development – INRA**, v.45, p.57-68, 2005.

SELF, J. T.; SPENCER, T.E.; JOHNSON, G.A et al. Glutamine synthesis in the development porcine placenta. **Biology of Reproduction**, v.70, p.1444-1451, 2004.

SIGMA STAT Software, versão 3.0, Jandel Scientific, San Rafael, CA 337p., 2003.

TJADER, I.; ROOYACKERS, O.; FORSBERG, A. et al. Effects on skeletal muscle of intravenous glutamine supplementation to ICU patients. **Intensive Care Medicine**, v.30, p.266-275, 2004.

WATFORD, M. Keep your brain happy. **Lecture Notes**, Rutgers University, New Brunswick, USA, 81p., 2004.

WILMORE, D.W. Alterations in protein, carbohydrate and fat metabolism in injured and septic patients. **Journal American College of Nutrition**, v.2, p. 3-13, 1983.

WU, G.; KNABE, D.A. Free and protein-bound amino acids in sow's colostrum and milk. **Journal of Nutrition**, v.124, p.415-424, 1994.

WU, G.; BAZER, F.W.; TUO, W. et al. Unusual abundance of arginine and ornithine in porcine allantoic fluid. **Biology of Reproduction**, v.54, p.1261-1265, 1996.

WU, G.; POND, W.G.; OTT, T.L. et al. Maternal dietary protein deficiency decreases amino acid concentrations in fetal plasma and allantoic fluid of pigs. **Journal of Nutrition**, v.128, p.894-902, 1998.

WU, G. et al. Amino acid composition of fetal pig. **Journal of Nutrition**, v.129, p.1031-1038, 1999.

WU, G. Nutrição da glutamina em suínos: da pesquisa básica à suinocultura. Disponível em: <www.lisina.com.br>. Acesso em: 26 de dez. 2005.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na primeira parte de nossa pesquisa ficou evidente a importância sobre o conhecimento do metabolismo da glutamina para fêmeas durante a lactação como aminoácido condicionalmente essencial para períodos de estresse ou quando o animal entrar em catabolismo quer seja por doença ou até mesmo por inabilidade do organismo em atender as necessidades nutricionais em tempo hábil.

A suplementação com glutamina (GLN), quer seja de forma pura como na forma de dipeptídeo, no presente caso associado ao ácido glutâmico, teve efeito benéfico nas 3 variáveis estudadas. No músculo a concentração da glutamina teve um efeito positivo sobre suplementação durante a lactação de matrizes suínas primíparas. Esse efeito positivo pode influenciar nas condições musculares que a matriz venha à desmamar e conseqüentemente efeito no retorno ao cio. Uma maior concentração de glutamina muscular poderá influenciar na performance reprodutiva subsequente das matrizes suínas primíparas.

Para a concentração de glutamina (GLN) no sangue, o AminoGut foi capaz de manter os mais altos níveis de glutamina sanguínea em relação aos demais tratamentos, do período pré-parto até os 21 dias de lactação de matrizes suínas primíparas. Esse efeito pode influenciar a homeostasia das matrizes de forma geral mantendo um nível de higidez das matrizes não só durante a lactação como também na recuperação do pós-desmame.

O efeito significativo da suplementação ficou demonstrado para a concentração da glutamina no leite. A suplementação com a L-glutamina (T2) mostrou-se mais eficiente aos 7 dias de lactação, enquanto que a suplementação com o AminoGut (T3) mostrou-se mais eficiente aos 21 dias de lactação de matrizes suínas primíparas. O 7º dia de lactação foi o ponto chave de máximo catabolismo por parte da leitoa e mais uma vez a glutamina se mostrou eficiente em suprir as demandas nutricionais em tempo hábil devido a sua facilidade de absorção e de suas características bioquímicas por se tratar de um aminoácido neutro, sem cargas, sendo transportado livremente entre as membranas plasmáticas.

Aos 21 dias de lactação, o AminoGut proporcionou uma maior concentração de glutamina no leite. A glutamina láctea aos 21 dias pode ter um

efeito positivo durante e após o desmame dos leitões. Devido as características da glutamina de conferir imunidade e poder prevenir a atrofia das vilosidades e criptas, comuns ao desmame, pode-se assim melhorar absorção de nutrientes por parte dos leitões.

ANEXO

Tabela 1 – Análise da variância da expressão da glutamina sintetase (GS) no fígado de camundongos fêmeas primíparas

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Entre os animais	3	3163.554	1054.518	
Entre os tratamentos	6	5925.265	987.544	2.791*
Resíduo	18	6367.830	353.768	
Total	27	15456.649		

* P<0,05

Tabela 2 - Análise da variância da expressão da glutamina sintetase (GS) no fígado dos filhotes camundongos

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Entre os animais	3	4405.421	1468.474	
Entre os tratamentos	7	31381.368	4483.053	56.822**
Resíduo	21	1656.819	78.896	
Total	31	37443.608		

** P<0,01

Tabela 3 - Análise da variância da expressão do glutamato desidrogenase (GDH) no fígado de camundongos fêmeas primíparas

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Entre os animais	3	2236.112	745.371	
Entre os tratamentos	6	26573.714	4428.952	3.051 NS
Resíduo	18	26125.400	1451.411	
Total	27	54935.227		

Tabela 4 - Análise da variância da expressão da glutamina sintetase (GS) no músculo camundongos fêmeas primíparas

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Entre os animais	2	13 05.405	652.703	
Entre os tratamentos	8	12314.621	1539.328	4.908 **
Resíduo	16	5017.981	313.624	
Total	26	18638.007		

**P<0,01

Tabela 5 - Análise da variância da expressão da glutamina sintetase (GS) na glândula mamária de camundongos fêmeas primíparas

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Entre os animais	3	139.355	46.452	
Entre os tratamentos	6	926.398	154.400	3.439*
Resíduo	17	763.181	44.893	
Total	26	1847.999	71.077	

*P<0,05

Tabela 6 - Análise da variância da concentração da glutamina (GLN) no músculo de camundongos fêmeas primíparas

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Entre os animais	3	5.526	1.842	
Entre os tratamentos	6	101.131	16.855	5.707**
Resíduo	17	50.205	2.953	
Total	26	156.795	6.031	

**P<0,01

Tabela 7 - Análise da variância da concentração da glutamina (GLN) no sangue de camundongos fêmeas primíparas

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Entre os animais	3	64890.029	21630.010	
Entre os tratamentos	6	109151.934	18191.989	0.967 NS
Resíduo	13	244651.371	18819.336	
Total	22	411515.911	18705.269	

Tabela 8 - Análise da variância do peso vivo de camundongos fêmeas primíparas

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Entre os animais	3	8.186	2.729	
Entre os tratamentos	7	1566.920	223.846	48.861**
Resíduo	21	96.206	4.581	
Total	31	1671.312		

**P<0,01

Tabela 9 – Análise da variância da concentração de glutamina no sangue de matrizes suínas primíparas

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Entre os grupos	11	0,263	0,0239	1,659 NS
Resíduo	48	0,691	0,0144	
Total	59	0,954		

Tabela 10 - Análise da variância da concentração de glutamina no músculo de matrizes suínas primíparas

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Entre os grupos	9	32,167	3,574	1,207 NS
Resíduo	38	112,564	2,962	
Total	47	144,731		

Tabela 11 - Análise da variância da concentração de glutamina no leite de matrizes suínas primíparas

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Entre os grupos	8	3,749	0,469	7,273**
Resíduo	35	2,255	0,0644	
Total	43	6,005		

**P<0,01

Tabela 12 - Análise de variância do peso vivo de matrizes suínas primíparas

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Entre os grupos	11	10051,592	913,781	2,411*
Resíduo	64	24253,536	378,961	
Total	75	34305,127		

* P<0,01

Tabela 13 – Análise de variância da ultrasson da espessura de toucinho de matrizes suínas primíparas

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Entre os grupos	11	684,133	62,194	5,312**
Resíduo	64	749,275	11,707	
Total	75	1433,408		

**P<0,01