

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIRURGIA**

Paulo Roberto Cavalcante de Vasconcelos

**EFEITO DA L-GLUTAMINA E DA L-ALANIL-GLUTAMINA NA EXPRESSÃO DE
RNA MENSAGEIRO DAS ENZIMAS CHAVES DA LANÇADEIRA MALATO
ASPARTATO EM RATOS SUBMETIDOS A ISQUEMIA/REPERFUSÃO
INTESTINAL**

FORTALEZA

2009

Paulo Roberto Cavalcante de Vasconcelos

**EFEITO DA L-GLUTAMINA E DA L-ALANIL-GLUTAMINA NA EXPRESSÃO DE
RNA MENSAGEIRO DAS ENZIMAS CHAVES DA LANÇADEIRA MALATO
ASPARTATO EM RATOS SUBMETIDOS A ISQUEMIA/REPERFUSÃO
INTESTINAL**

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Cirurgia pelo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães

FORTALEZA

2009

Paulo Roberto Cavalcante de Vasconcelos

**EFEITO DA L-GLUTAMINA E DA L-ALANIL-GLUTAMINA NA EXPRESSÃO DE
RNA MENSAGEIRO DAS ENZIMAS CHAVES DA LANÇADEIRA MALATO
ASPARTATO EM RATOS SUBMETIDOS A ISQUEMIA/REPERFUSÃO
INTESTINAL**

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Cirurgia pelo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães

FORTALEZA

2009

Vasconcelos, Paulo Roberto Cavalcante

Efeito da l-glutamina e da l-alanil-glutamina na expressão de RNA mensageiro das enzimas chaves da lançadeira malato aspartato em ratos submetidos a isquemia/reperfusão intestinal/ Vasconcelos, Paulo Roberto Cavalcante. – Fortaleza, 2009.

1 xx f.:

Orientador. Prof. Dr. Sergio Botelho Guimarães

Paulo Roberto Cavalcante de Vasconcelos

**EFEITO DA L-GLUTAMINA E DA L-ALANIL-GLUTAMINA NA EXPRESSÃO DE
RNA MENSAGEIRO DAS ENZIMAS CHAVES DA LANÇADEIRA MALATO
ASPARTATO EM RATOS SUBMETIDOS A ISQUEMIA/REPERFUSÃO
INTESTINAL**

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Cirurgia pelo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cláudio Miguel da Costa Neto
Universidade de São Paulo/Ribeirão Preto

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães
Universidade Federal do Ceará

FORTALEZA

2009

Aos meus pais Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos e Dione Maria Cavalcante de Vasconcelos.

*A minha Isabela, razão maior de nossa vida.
A minha esposa, Arysa Cavalcante Gonçalves de Vasconcelos*

Aos meus irmãos Marcelo Cavalcante de Vasconcelos, Gustavo Cavalcante de Vasconcelos e Raquel Cavalcante de Vasconcelos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Doutor Sérgio Botelho Guimarães que sempre me apoiou e ajudou bastante na revisão deste texto.

Tenho de agradecer ao meu grande mestre, pai e amigo, Professor Doutor Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos que teve a bondade de compartilhar comigo sua vasta sabedoria sobre o assunto desta tese e ser sempre o meu orientador na principal tese, a tese da vida.

Gostaria de também de agradecer ao Prof. Cláudio Miguel da Costa Neto pela gentileza de ter me cedido seu laboratório, material de pesquisa e sua amizade.

Não existem palavras que possam ser ditas a respeito da pessoa do Dr. Pedro Souza que me introduziu no mundo da biologia molecular e celular e mostrou-me, principalmente, que a vida apesar de ser complexa, existe a amizade que a torna simples.

A ajuda inestimável dos acadêmicos de medicina, Raquel Cavalcante de Vasconcelos (Minha irmã), Alberico Ximenes do Prado Neto, Camila Menezes Rabelo e Marcelo Pinho Pessoa de Vasconcelos ajudaram bastante na fase cirúrgica deste trabalho.

Quero também agradecer o corpo docente do Departamento de Cirurgia que proporcionaram um excelente curso de Pós-graduação.

Agradeço as secretarias do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Sra. Maria Luciene Vieira de Oliveira e Sra. Magda Gomes Fontenele, pela ajuda e apoio durante esta trajetória.

Ajuda financeira do CNPq foi primordial para execução deste trabalho, e sempre contribuiu para minha formação acadêmica

Gostaria também de agradecer a minha filha e esposa que me dão suporte para que eu continue vivo e feliz.

Ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da UFC, pela minha formação na pesquisa.

À todos aqueles que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização desta tese, meu agradecimento.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO.....	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
Isquemia/Reperusão e radicais livres de oxigênio	2
Glutamina e L-alanil-glutamina	4
2. OBJETIVO.....	11
3. MATERIAL E MÉTODO	12
3.1. Animais e ambientes de experimentação.....	12
3.2. Desenho do Estudo.....	13
3.3. Procedimentos	14
3.4. Estrato do RNA total.....	16
3.5. Tratamento das amostras com DNA	18
3.6. Transcrição reversa (RT).....	18
3.7. Desenho de oligonucleotídeos	19
3.8. Real-Time-PCR.....	20
3.9. Análise estatística.....	21
4. RESULTADOS	22
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÕES	51
7. REFERÊNCIAS.....	52

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
GRÁFICO 01 - Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 1, nos Grupos de estudo que utilizaram caseinato de cálcio.....	22
GRÁFICO 02 - Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 1, nos Grupos de estudo que utilizaram L-glutamina.	23
GRÁFICO 03 - Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 1, nos diferentes grupos de estudo - Sham isquemia.	25
GRÁFICO 04 - Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 1, nos diferentes grupos de estudo - Sham reperfusão	26
GRÁFICO 05 - Concentrações de Piruvato ($\mu\text{mol/ml}$) no tecido isquemiado nos grupos Salina e L-Alanil-Glutamina, comparadas aos diferentes tempos de reperfusão	27
GRÁFICO 06 - Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 1, nos diferentes grupos de estudo - Isquemia.	28
GRÁFICO 07 - Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 1, nos diferentes grupos de estudo - Reperfusão.	29
GRÁFICO 08 - Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 1, nos diferentes grupos de estudo	30
Gráfico 9 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 2, nos Grupos de estudo que utilizaram L-glutamina.	31
GRÁFICO 10 - Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 2, nos Grupos de estudo que utilizaram L-alanil-glutamina	32
GRÁFICO 11 - Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 2, nos diferentes grupos de estudo - Sham isquemia	33
GRÁFICO 12 - Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 2, nos diferentes grupos de estudo - Sham reperfusão	34

GRÁFICO 13 - Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 2, nos diferentes grupos de estudo - isquemia	35
GRÁFICO 14 - Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 2, nos diferentes grupos de estudo - Reperfusão	36
GRÁFICO 15 - Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 2, nos diferentes grupos de estudo.	37
GRÁFICO 16 - Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 1, nos Grupos de estudo que utilizaram caseinato de cálcio.	38
GRÁFICO 17 - Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 1, nos Grupos de estudo que utilizaram L-glutamina.	39
Gráfico 18 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 1, nos Grupos de estudo que utilizaram L-alanil-glutamina.	40
Gráfico 19 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 1, nos diferentes grupos de estudo - Sham isquemia.	41
Gráfico 20 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 1, nos diferentes grupos de estudo - Sham reperfusão.	42
Gráfico 21 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 1, nos diferentes grupos de estudo - Isquemia.	43
Gráfico 22 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 1, nos diferentes grupos de estudo - Reperfusão.	44
Gráfico 23 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 1, nos diferentes grupos de estudo.	45
Gráfico 24 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 2, nos Grupos de estudo que utilizaram caseinato de cálcio.	46
Gráfico 25 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 2, nos Grupos de estudo que utilizaram L-glutamina.	47

Gráfico 26 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 2, nos Grupos de estudo que utilizaram L-alanil-glutamina.	48
Gráfico 27 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 2, nos diferentes grupos de estudo - Sham isquemia	49
Gráfico 28 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 2, nos diferentes grupos de estudo - Sham reperfusão.	50
Gráfico 29 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 2, nos diferentes grupos de estudo - Isquemia	51
Gráfico 30 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 2, nos diferentes grupos de estudo - Reperfusão.	52
Gráfico 31 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 2, nos diferentes grupos de estudo.	53

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 01 – Principais interações da glutamina no organismo	06
FIGURA 02 – Lançadeira Malato-Aspartato.	09
FIGURA 03 – Laparotomia de aproximadamente 5 centímetros	14
FIGURA 04 – Exposição do intestino e contagem de 5 cm distalmente do ceco.	15
FIGURA 05 – Intestino clampeado com neuroclamps.	15
FIGURA 06 – Foto demonstrando segmento intestinal isquêmico	16
FIGURA 07 – Retirada de 1cm cúbico de intestino na área de estudo	17
FIGURA 08 – Cuba de eletroforese	18
FIGURA 09 – Seqüência de oligonucleotídeos utilizados no <i>Real-time PCR</i> para os diferentes genes. O programa utilizado foi o <i>Primer Express da (Applied Biosystems, EUA)</i> .	19
FIGURA 10 – Equipamento ABI Prim 5700	20

EFEITO DA L-GLUTAMINA E DA L-ALANIL-GLUTAMINA NA EXPRESSÃO DE RNA MENSAGEIRO DAS ENZIMAS CHAVES DA LANÇADEIRA MALATO ASPARTATO EM RATOS SUBMETIDOS A ISQUEMIA/REPERFUSÃO INTESTINAL

A lançadeira malato aspartato, que tem como componente principal o glutamato, proveniente da glutamina, permite que elétrons oriundos do cofator NADH produzido no citosol, principalmente da primeira etapa da glicólise, alcancem a cadeia transportadora de elétrons gerando assim energia na forma de ATP. O objetivo deste estudo foi determinar o efeito oral de L-glutamina e L-alanil-glutamina na expressão de RNA mensageiro das enzimas chaves da lançadeira malato aspartado em intestino submetidos a 30 minutos de isquemia e 30 minutos de reperfusão. Para análises dos RNA mensageiros de MDH 1 e 2 e GOT 1 e 2, enzimas chaves da lançadeira, foi utilizada a técnica de PCR em tempo real. Os resultados mostraram estatisticamente não haver alteração no padrão de expressão das enzimas comparada com o grupo controle suplementado com caseinato de cálcio.

ABSTRACT

The effect of glutamine on the mRNA level of key enzymes of malate-aspartate shuttle in the rat intestine subjected to ischemia reperfusion.

The malate-aspartate shuttle allows the hydrogen ions of the cofactor NADH produced in the cytosol to reach the electron transport chain in the mitochondria and generate energy. The objective of this study was to determine the effects of oral L-glutamine and the stable dipeptide, L-alanyl-glutamine, on the expression of the mitochondrial key enzymes of the malate-aspartate shuttle in rat distal small intestine on 30 minutes of ischemia followed by 30 minutes of reperfusion. In order to demonstrate the possible changes in (malate deshydrogenase) MDH 1, 2 and (aspartate deshydrogenase) GOT 1, 2 in the rat intestine tissues, the mRNA levels for those enzymes were analyzed by real-time PCR. Results showed that although there were fluctuations in tissue MDH and GOT values of the samples assessed with glutamine versus L-alanyl-glutamine supplementation versus a calcium caseinate supplementation, no significant differences were observed.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

A oclusão mesentérica foi descrita, pela primeira vez por Benivieni no século XV. Entretanto, somente quatro séculos depois surgiram os primeiros relatos que consideravam essa doença clinicamente relevante. Os primeiros estudos experimentais, consistindo na ligadura dos vasos mesentéricos foram realizados por Litten em 1875. Coube a Conclman, em 1894, o primeiro relato de isquemia intestinal crônica (PATERNO; LONGO, 2008).

A isquemia intestinal, em humanos, é uma doença que ocorre na ausência ou diminuição do fluxo sanguíneo arterial e/ou venoso intestinal, por obstrução aguda ou crônica das artérias e/ou veias viscerais, notadamente do tronco celíaco, da artéria mesentérica superior, da artéria mesentérica inferior, ou obstruções combinadas afetando as várias artérias (SIMI, 2002).

1.2 Isquemia e Reperfusão

A isquemia é um fenômeno caracterizado pela restrição parcial ou total do aporte sanguíneo arterial a uma determinada área do organismo. As conseqüências desta restrição dependem das características metabólicas do tecido atingido, da existência de circulação colateral e do tempo de restrição (Campos e Timo-laria, 1975).

Quatro componentes estruturais e funcionais são particularmente sensíveis à hipóxia decorrente da isquemia:

1. A membrana celular, responsável principal pelo equilíbrio iônico e osmótico.
2. A respiração aeróbica, que compreende, entre outros eventos, a fosforilação oxidativa e a produção de ATP (adenosina-trifosfatada).

3. A síntese de proteínas estruturais e enzimáticas.
4. O componente genético (cromatina) responsável pela reprodução celular (COTRAN *et al.*, 1996).

Na luta pela sobrevivência, o organismo lança mão da respiração anaeróbica com a finalidade de manter as fontes de energia celular. Assim, há diminuição de ATP celular e aumento de AMP, estimulando as atividades enzimáticas da fosfofrutoquinase e da fosforilase, o que resulta no aumento da taxa de glicólise anaeróbica com geração de ATP a partir do glicogênio, cujas fontes são rapidamente exauridas. A opção da via anaeróbica e a conseqüente glicólise propiciam o acúmulo de ácido láctico e fosfatos inorgânicos pela hidrólise de ésteres de fosfato. Esse processo reduz o pH intracelular, ocorrendo, neste período inicial, uma aglomeração da cromatina nuclear, aparentemente causada pelo pH reduzido (COTRAN *et al.*, 1996).

Classicamente as repercussões da isquemia estão associadas a alterações morfológicas e funcionais resultantes da necrose tecidual. Nas últimas décadas têm-se, também, estudado os aspectos de morte celular programada. As alterações provocadas pela falta de aporte sangüíneo desencadeiam processos metabólicos celulares e moleculares que induzem a célula a sua autodestruição sem a característica reação inflamatória, conhecido como fenômeno de apoptose (TOLDY *et al.*, 2008). Parks e Granger (1986) demonstraram que lesões relativamente pequenas ocorrem na isquemia e que a maioria se desenvolvem durante a reperfusão. Estes autores promoviam isquemia mantendo o fluxo em 20% do normal durante 3 horas e reperfundiam por 1 hora. Descreveram que as lesões encontradas ao final eram mais graves do que aquelas vistas após 4 horas de isquemia. Justificaram que as lesões iniciadas pela reperfusão envolvem a formação de oxidantes citotóxicos derivados do oxigênio molecular.

No intestino delgado, a concentração de oxigênio resulta do arranjo anatômico dos vasos sangüíneos nas vilosidades intestinais, isto é, o vaso central supre os

vasos que se estendem como capilares subepiteliais (LUNDGREN; HAGLUND, 1978). Disto resulta diminuição da tensão de oxigênio do ápice da vilosidade comparada com a base (BOHLEN, 1980). Assim, durante o período de isquemia observam-se hipóxias severas que levam, primeiramente, à morte as células dos ápices das vilosidades dando origem às lesões típicas da isquemia (AHREN; HAGLUND, 1973).

Koike *et al.* (1992) descreveram que a isquemia seguida de reperfusão ativa a fosfolipase A2 independentemente da xantino-oxidase e que a mesma libera o fator ativador de plaquetas (PAF) e outros derivados eicosanóides que agem como quimiotáticos. Adicionalmente, a aderência de polimorfonucleares no endotélio libera grânulos contendo NADPH-oxidase dependente dos metabólitos reativos do oxigênio ou uma variedade de proteases e elastases que interagem sinergicamente para produzir lesão endotelial como relataram Weiss *et al.* (1989). Este padrão de lesão pode ser local ou atingir órgãos distantes a partir da isquemia intestinal a qual é reportada como base na vasoconstricção esplâncnica desproporcional que ocorre no choque hipovolêmico.

Pogetti *et al.* (1992) desenvolveram, em ratos, um modelo de isquemia e reperfusão intestinal no qual a artéria mesentérica superior foi ocluída por um período de 30 minutos e logo em seguida reperfundida pelo mesmo período. Neste modelo, observou-se aumento de polimorfonucleares circulantes, aumento da permeabilidade vascular e aumento da atividade da fosfolipase intestinal.

A lesão de reperfusão é um termo usado para descrever as alterações funcionais e estruturais, que se tornam aparentes durante o restabelecimento do fluxo após um período de isquemia. O afluxo de sangue oxigenado aos tecidos previamente desprovidos de oxigênio é fundamental para o reinício do metabolismo aeróbico. Paradoxalmente, associado ao efeito benéfico da reperfusão, ocorrem fenômenos deletérios: necrose de células irreversivelmente lesadas, acentuado edema celular e restauração não-uniforme do fluxo para todas as porções dos tecidos. Essa restauração caótica do fluxo tissular é conhecida como fenômeno do “não refluxo”, no qual interagem múltiplos fatores, tais como um círculo vicioso de

disfunção endotelial vascular, a redução da perfusão local e acentuação do edema (EVORA *et al.*, 1996).

Durante a reperfusão, ocorre formação excessiva de radicais livres de oxigênio. São moléculas compostas de oxigênio parcialmente reduzido, com elétron não pareado na capa externa, altamente instáveis e reativas, podendo causar intensa ação tóxica aos componentes celulares. Os radicais livres de oxigênio que são liberados no momento da reperfusão são responsáveis pela lise celular, além de ativar o processo peroxidativo das biomembranas lipídicas, levando, assim, ao dano tecidual. Em condições de homeostase, estes radicais são produzidos em pequena quantidade e prontamente inativados antes de provocar danos significativos (COTRAN *et al.*, 1996).

A lesão de reperfusão, diferentemente da lesão isquêmica, é capaz de produzir alteração sistêmica, e não apenas nos locais acometidos pelo fenômeno. Portanto, o restabelecimento do fluxo sanguíneo para uma área isquêmica pode ocasionar lesão em todo o organismo.

1.3 Modelos experimentais de isquemia intestinal

Os estudos experimentais sobre isquemia e reperfusão são caracterizados por duas fases distintas: uma fase de isquemia, com oclusão de um vaso, ou dos vasos nutridores de um determinado órgão ou tecido; e uma segunda fase, a de reperfusão, com a desobstrução do vaso previamente ocluído, de forma a reperfundir adequadamente o tecido até então isquêmico.

Diversos animais tem sido uso em estudos experimentais, mas a preferência recai sobre o rato; o pequeno tamanho do animal e sua maior disponibilidade, propiciam uma maior utilização do roedor como animal experimental. Por outro lado, animais de maior porte, como gatos porcos e o cão, são menos frequentemente utilizados pelos pesquisadores (PARKS; GRANGER, 1986; MONTGOMERY; BORGSTRÖM; HAGLUND, 1992; BOROS *et al.*, 1992; HARWARD *et al.*, 1994).

Vários métodos podem ser utilizados para obter-se a isquemia: obstrução arterial por meio de pinçamento vascular, fitas cirúrgicas para liberação programada de fluxo sanguíneo, choque hipovolêmico e hipotermia. Um estudo de revisão da literatura mostrou que a preferência dos pesquisadores pelo pinçamento vascular,

seguindo-se de estenose ou compressão vascular extrínseca (RIBEIRO; YOSHIDA, 2005).

Teke et al. (2008) estudaram os efeitos da isquemia intestinal sobre o pulmão, em ratos. A isquemia, com 60 minutos de duração, foi induzida por pincamento de ramos da artéria cólica direita e artéria jejunal. Os animais foram sacrificados após 3 horas de reperfusão.

Kuzu et al. (2000) estudaram os efeitos da isquemia-reperfusão sobre a cicatrização de anastomose colônica em ratos e concluíram que a obstrução arterial de importantes artérias, com restauração do fluxo sanguíneo produz alterações significativas na cicatrização intestinal.

1.4 A glutamina

Nos idos de 1833, os pesquisadores Schultze e Bosshard descreveram uma substância extraída da beterraba, degradável quando aquecida em meio ácido em ácido glutâmico e amônia, denominado-a glutamina. Anos mais tarde Ritthausen (1866) anunciou a descoberta de “uma nova substância” encontrada em proteínas do tremoço e da amêndoa, obtida da ebulição do glúten na presença do ácido sulfúrico e que seria “um ácido monobásico contendo nitrogênio” (MARINHO, 1995). A substância descoberta, consagrada como uma amina é, na realidade uma amida, sendo o seu nome correto glutamida (FELTRE, 1998). Todavia, tempo e uso consagraram a denominação equivocada.

A glutamina é um ácido carboxílico biaminado, característica que compartilha com asparagina e a lisina (ROSKOSKI, 1997), alinhando-se na categoria dos aminoácidos com grupos polares sem carga, (LEHNINGER, 2000).

Krebs, em 1935, demonstrou a capacidade de síntese da glutamina e sua degradação, por hidrólise, nos tecidos animais. A glutamina é um aminoácido com características únicas dentre os demais aminoácidos que compõem o corpo humano. Considerada um aminoácido não essencial, mercê de sua síntese no organismo vivo, a glutamina pode, em condições especiais, tornar-se aminoácido essencial, quando as disponibilidades se tornam inferiores às necessidades do organismo, exigindo um aporte externo.

A glutamina é abundantemente distribuída no organismo, sendo o aminoácido de maior concentração no sangue e tecidos sob a forma livre (L-glutamato), onde participa de inúmeros processos metabólicos. A importância específica da glutamina para a economia orgânica foi documentada por Krebs que encontrou diferentes concentrações das enzimas fundamentais para o seu metabolismo: glutaminase, presente principalmente no fígado e glutamina-sintetase no tecido muscular esquelético (KREBS, 1935).

A glutamina, ou mais especificamente, a L-glutamina, é importante como precursora da síntese de peptídios e proteínas, açúcares aminados, purina e pirimidina, ácido nucléico e nucleotídeos além de fornecer o elemento carbono para processos oxidativos nas células. Sob a ação da enzima glutaminase, encontrada em altas concentrações na mitocôndria das células que utilizam o metabólito com maior avidéz, notadamente o fígado (NEWSHOLME *et al.*, 2003). **A FIGURA 1** resume as principais interações da glutamina no organismo.

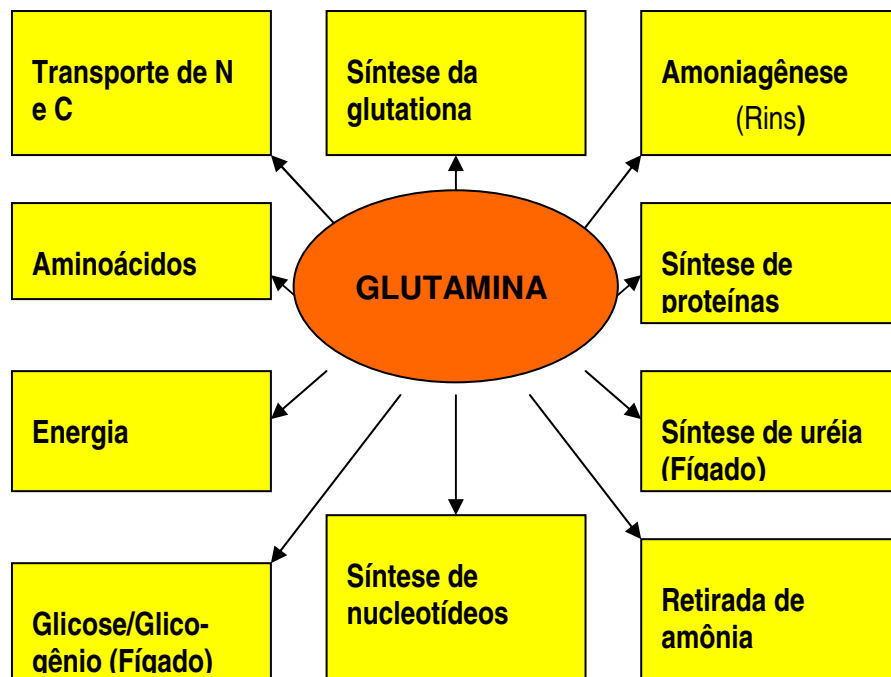


FIGURA 1– Principais interações da glutamina no organismo

A L-glutamina não pode atravessar a barreira imposta pela membrana celular, devido a carga elétrica total de (-1) em pH 7,4. Por outro lado, os aminoácidos

capazes de realizar o transporte do L-glutamato para o interior da célula apresentam reduzida concentração na membrana celular exceto nas células especializadas na utilização desse substrato, localizadas no sistema nervoso central (PITHON-CURI, 2002).

A glutamina insere-se no ciclo do ácido cítrico através do ácido α -cetoglutárico em que pode converter-se pela ação da glutaminase. É parcela constitutiva da glutathione juntamente com a cisteína e a glicina, contribuindo para o importante processo de detoxificação dos radicais livres oxidantes (COTRAN, 1996) e para o transporte de aminoácidos no nefro e no jejuno (ROSKOSKI, 1997). É ainda parte do complexo sistema carreador (lançadeira) malato-aspartato que promove a produção de NAD intra-mitochondrial (LEHNINGER, 2000).

Muitos trabalhos científicos confirmam que o trato gastrointestinal é o principal consumidor da glutamina (GLN). A oferta desse aminoácido durante as situações de estresse (ex: quimioterapia, radioterapia e isquemia) ajuda a manter a integridade da mucosa e melhora as funções imunológicas (SOUBA *et al.*, 1990). Estudos estabeleceram que a glutamina, um aminoácido de cinco carbonos, é o principal responsável pela manutenção energética dos enterócitos. Foi demonstrado que os carbonos derivados da glutamina contribuem com quarenta e seis por cento do dióxido de carbono eliminado por segmentos isolados perfundidos do jejuno do rato. Além do papel energético importantíssimo, a glutamina é um dos principais substratos para a síntese de ácidos nucléicos destes tecidos (WINDMUELLER; SPAETH, 1980).

A forma livre de glutamina (L-glutamina), tem sido normalmente utilizada em suporte nutricional enteral ou oral. Esta forma livre, no entanto, possui pobre solubilidade em solução aquosa e baixa estabilidade em pH baixo e temperaturas elevadas. Além disso, do ponto de vista metabólico, a L-glutamina sofre conversão espontânea formando piroglutamato e amônia, produtos tóxicos ao organismo humano (STEHLE *et al.*, 1989). Essas importantes limitações no uso e na eficácia da glutamina livre têm motivado estudos cujos resultados recomendam a administração deste aminoácido na forma de dipeptídeo. Os dipeptídeos glicil-glutamina ou alanil-glutamina apresentam alta solubilidade em água e estabilidade durante os

procedimentos de preparo, armazenamento e administração das soluções nutricionais.

A glutamina pode se tornar um aminoácido “condicionalmente essencial” durante condições inflamatórias como infecção e agressão, bem como durante o fenômeno de isquemia/reperfusão. Apresenta, nestas, funções metabólicas específicas e importantes, especialmente em lesões como infecções ou ferimentos, ou nos casos de doenças com processos catabólicos (NEWSHOLME, 2001).

Trabalhos experimentais têm demonstrado efeito pró-glicolítico da l-glutamina ou do dipeptídeo l-alanil-glutamina quando ofertadas em doses nutracêuticas (BARBOSA *et al.*, 2006). A l-alanil-glutamina promoveu aumento da utilização de glicose em doentes graves. (DECHELOTTE *et al.*, 2006) e reduziu resistência insulínica em doentes traumatizados (BAKALAR *et al.*, 2006). Trabalhos demonstraram que, em pacientes portadores de isquemia crítica de membros inferiores, a infusão pré-operatória (durante 3 horas imediatamente antes do ato operatório) de l-alanil-glutamina, em dose nutracêutica de 50g do dipeptídeo, promoveu redução de lactato desidrogenase (LDH) e lactato indicando aumento da oxidação de glicose no membro que sofrera isquemia/reperfusão (FORTE, 2003).

É necessário buscar explicações via regulação gênica como a glutamina agiria promovendo a queima da glicose. Uma das maneiras de fazê-lo seria pela quantificação de RNA mensageiro das enzimas chaves da lançadeira malato-aspartato. O papel fundamental desta lançadeira bioquímica é regenerar o NAD^+ no citosol, promovendo a transformação de uma molécula de glicose em duas moléculas de piruvato (primeira fase da glicólise).

A lançadeira malato-aspartato é um sistema enzimático que o NADH citosólico reduz o oxalacetato a malato pela malato-desidrogenase extramitocondrial (MDH 1). O malato transpõe a membrana mitocondrial interna onde é reoxidado a oxalacetato pela malato desidrogenase mitocondrial (MDH 2) que utiliza o NAD^+ como coenzima. Pela reoxidação do malato na matriz, ocorre a transferência dos equivalente reduzidos provenientes do citosol. O oxalacetato, por meio da aspartato transaminase (GOT 2) é transformado em aspartato que pode atravessar a membrana. Este sai da mitocôndria e, no citosol, regenera o oxalacetato por meio de

outra enzima chave, o aspartato transaminase citosólico (GOT 1). O NADH regenerado transfere os elétrons para a cadeia mitocondrial transportadora de elétrons, onde forma ATP. A operação necessita o retorno do oxalacetato para o citosol (Monty Krieger; Matthew P Scott; Matsudaira, 2004)(Figura 2).

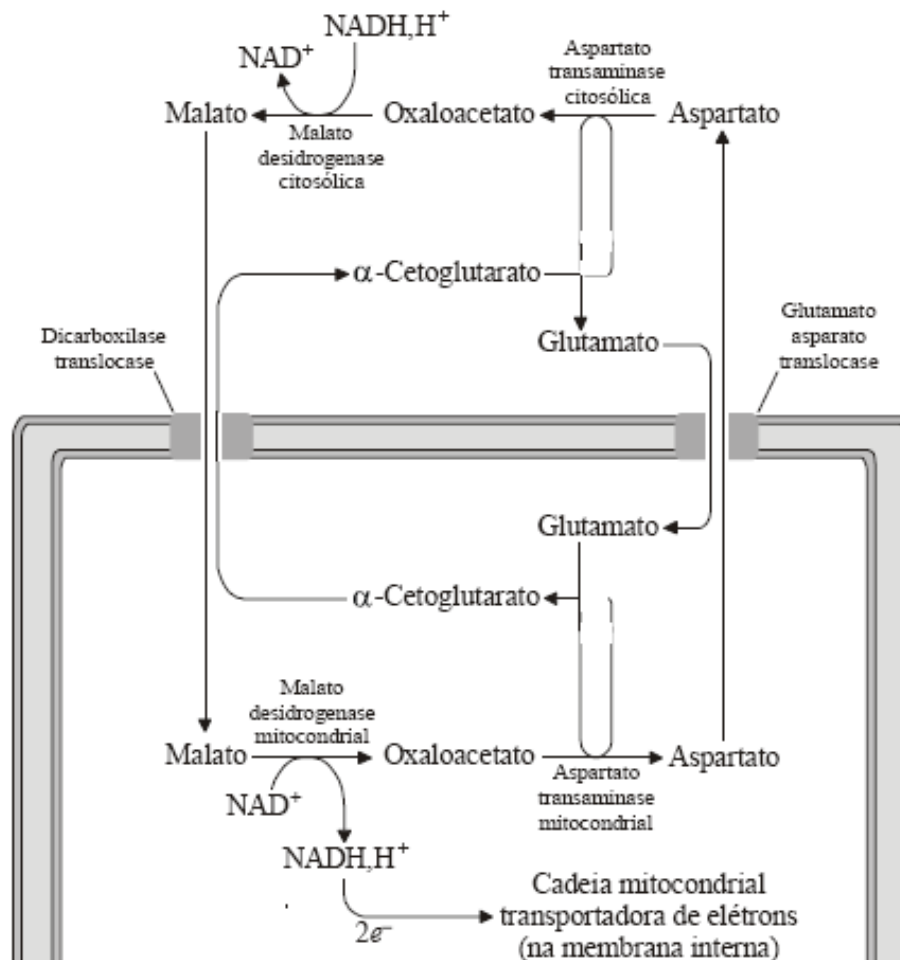


Figura 2 - Lançadeira Malato-Aspartato.

A glutamina, ofertada seria transformada em glutamato, e este promoveria a ativação das enzimas chaves desta lançadeira, vez que o glutamato é fator crucial nesta lançadeira. Com a presença de oxigênio, o piruvato advindo da glicose seria convertido em acetil-CoA, que seria utilizado no ciclo de Krebs para produção de ATP, CO₂ e água (glicólise aeróbica). Em situações de isquemia relativa ou absoluta o piruvato oriundo da glicose seria reduzido a lactato pela enzima lactato desidrogenase (glicólise anaeróbica) (Filho Guimarães, 2004).

Há necessidade de estudos, dosando a expressão das enzimas-chave da lançadeira malato-aspartato (MDH 1 e 2 e GOT 1 e 2) em tecidos de hospedeiros pré-tratados com doses nutracêuticas de L-glutamina e L-alanil-glutamina para elucidar este possível mecanismo de ação pró-glicolítica deste aminoácido.

2. OBJETIVO

Estudar o eventual efeito da L-alanil-glutamina e da glutamina sobre a isquemia/reperfusão intestinal, em modelo experimental no rato, pela expressão tecidual do RNA mensageiro das enzimas chaves da lançadeira malato-aspartato: GOT 1, GOT 2, MDH 1e MDH 2 no intestino.

3. MÉTODO

3.1 Animais e ambientes de experimentação

Foram utilizados 72 ratos (*Ratus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da variedade *Wistar*, machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Para acimatação, os ratos foram colocados em comunidades de 2 ratos por gaiola e mantidos no Laboratório de Cirurgia Experimental em ciclos de 12 horas de claro/escuro em temperatura constante. Os animais receberam água e ração para ratos com a seguinte composição básica do produto: farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicalcico, cloreto de sódio, premix, vitamínico-mineral e de aminoácidos, nos quais continham em relação ao quilo do produto: umidade(max) 12,50%; proteína bruta(min) 22,00%; extrato etéreo(min) 4,00%; material mineral(max) 10,00%;matéria fibrosa(max) 8,00%; cálcio (max) 1,40%;fósforo(min) 0,80%; vitaminas: vitamina A 12.000UI; vitamina D3 1.880UI;vitamina E 30,00mg; vitamina K3 3,00mg; vitamina B 5,00mg; vitamina B2 6,00mg;vitamina B6 7,00mg; vitamina B12 20,00mg; niacina 60 mg;ácido pantotênico 20,00mg; ácido fólico 1,00 mg; biotina 0,05mg; colina 600.00 mg; microelementos minerais: ferro 50,00mg;zinco 60mg; cobre 10,00mg; iodo 2,00mg; manganês 60,00mg;selênio 0,05 mg; cobalto 1,50mg; aminoácidos: DL-metionina 300,00mg;lisina 100,00mg; aditivos: antioxidante: 100,00mg. Essa alimentação era ofertada *ad libitum* até uma semana antes do início do experimento cirúrgico. O peso dos animais variou entre 300 e 350 gramas.

As dosagens laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo-USP.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: grupo sham e grupo experimento.

Grupo experimento: Constituídos de 36 animais distribuídos aleatoriamente em 6 sub-grupos de 6 ratos que foram estudados nos tempos 0' e 30' após a isquemia e reperfusão.

Sub-grupos:

Isquemia - L –glutamina

Isquemia – L-alanil-glutamina

Isquemia – Caseinato de Cálcio

Reperfusion – L-glutamina

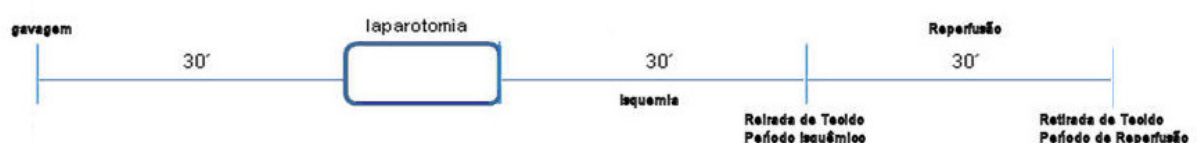
Reperfusion – L-alanil-glutamina

Reperfusion – Caseinato de Cálcio

Trinta minutos antes do estabelecimento da isquemia foi realizada a gavagem de L-alanil-glutamina na dose de 0,75g/kg de peso corporal, gavagem de L-glutamina na dose de 0,5g/kg de peso corporal e gavagem de 0,5g/kg de Caseinato de Cálcio em um total de 2 ml de veículo aquoso.

Grupo sham: Constou de igual número de animais que foram divididos nos mesmos número de sub-grupo e submetidos ao mesmo procedimento de gavagem, porém, não foram submetidos a isquemia e nem reperfusão, apenas uma laparotomia exploradora em mesmo tempo cirúrgico. Os sub-grupos foram nominados de modo semelhante ao grupo experimento.

3.2 O desenho do estudo:



3.3 Procedimentos

Antes da realização do experimento, o projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFC – FM /, sob o protocolo 06/2007.

Após terem sido pesados, os animais foram anestesiados com uma associação de xilazina (10 mg/Kg) e cetamina (60 mg/Kg) por via intraperitoneal. O animal foi considerado anestesiado quando ocorreu perda dos reflexos córneo-palpebrais e de retirada da pata traseira contralateral, ao estímulo doloroso por preensão.

Em seguida, cada animal foi acomodado em bancada cirúrgica, durante todo o procedimento. Para a realização das dissecções, foi utilizado instrumental microcirúrgico adequado. Foi realizada laparotomia mediana, a partir do apêndice xifóide em direção caudal, com 5 cm de extensão (figura 3).

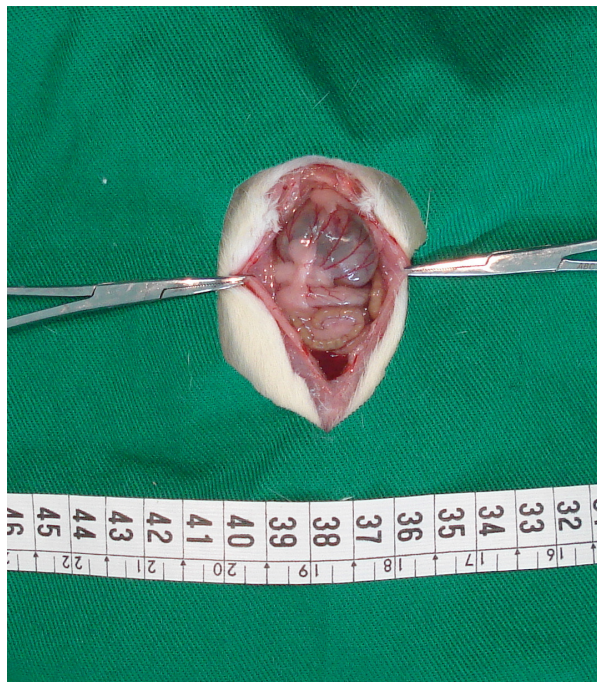


Figura 3 – Laparotomia de aproximadamente 5 centímetros

Exatamente após 30 minutos da gavagem de L-alanil-glutamina na dose de 0,75g/Kg ou de l-glutamina na dose de 0,5g/kg ou de 0,5g/kg de caseinato de cálcio no grupos experimentos, um segmento de 5cm de intestino delgado, distalmente 5 cm do ceco era isolado e uma isquemia estabelecida através de clampeamento com

pinça neurovascular atraumática durante trinta minutos (período de isquemia)
(Figuras 4 e 5)



Figura 4 – Exposição do intestino e contagem de 5 cm distalmente do ceco.

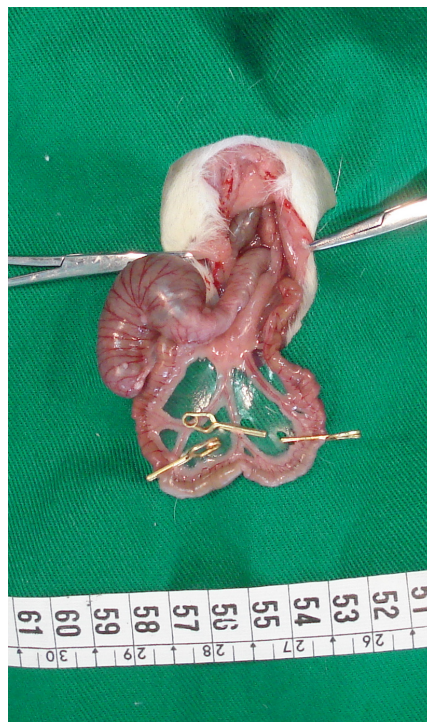


Figura 5 – Intestino clampeado com neuroclamps.

A eficiência da isquemia era confirmada pela palidez e hipotermia do segmento de intestino isquêmico, pela percepção visual do desaparecimento das pulsações dos vasos do mesentério que são facilmente visíveis.

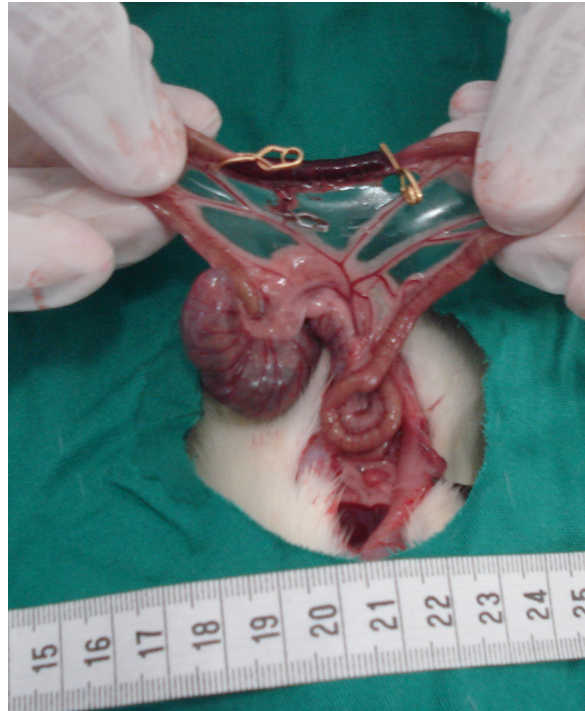


Figura 6 – Foto demonstrando segmento intestinal isquêmico

3.4 Extração de RNA total

Para o segmento de aproximadamente 1 centímetro cúbico de intestino obtido da porção medial dos 5 centímetros anteriormente submetida ao processo de isquemia/reperfusão ou isquemia ou sham foi utilizado a extração de RNA total pelo kit RNAqueous-4PCR® (Ambion), seguindo as recomendações do fabricante (Figura 7).

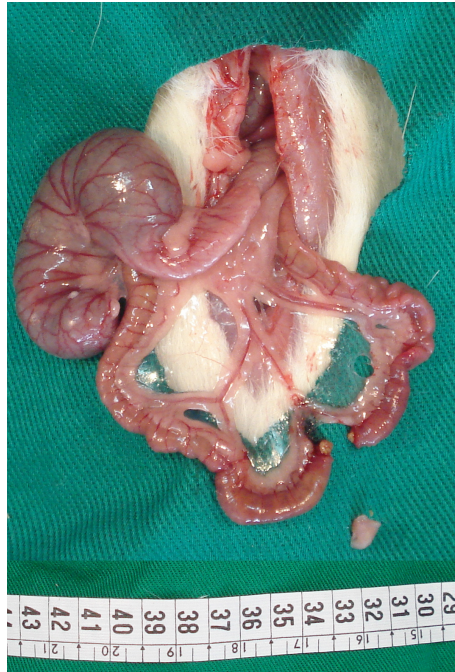


Figura 7 – Retirada de 1cm cúbico de intestino na área de estudo

A concentração de RNA total nas amostras foi determinada por diluição do RNA (fator de diluição conhecido) e leitura em cubetas de quartzo em espectrofotômetro DU 640 (*Beckman Coulter*, Estados Unidos) no comprimento de onda de 260 nm (A_{260}), com fator de diluição igual a 50, sendo o resultado expresso em $\mu\text{g/mL}$.

A qualidade do RNA total nas amostras foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, com observação da integridade da subunidade RNA ribossômico.

Para preparar o gel de agarose 1%, foram dissolvidos 0,3 g de agarose a 30 mL de tampão TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8.0) preparado com água tratada com DEPC (0,1%). A agarose foi aquecida em forno de microondas até completa dissolução e logo após foram adicionados 4 μL da solução de brometo de etídio (10 mg/mL). Foi preparado um gel no sistema de eletroforese horizontal, aguardando-se a polimerização por uma hora. Foram adicionados 2 μL do tampão de corrida a 1 μL de amostra de RNA (concentrado 10X: glicerol 50%, EDTA 1 mM e azul de bromofenol 0,4%), procedendo-se o carregamento do gel com todas as amostras. A eletroforese foi realizada em tampão TAE 1X, e a seguir as amostras

foram visualizadas em transluminador e fotodocumentadas (*Sistema EDAS 290 KODAK*, Estados Unidos) (Figura 8)

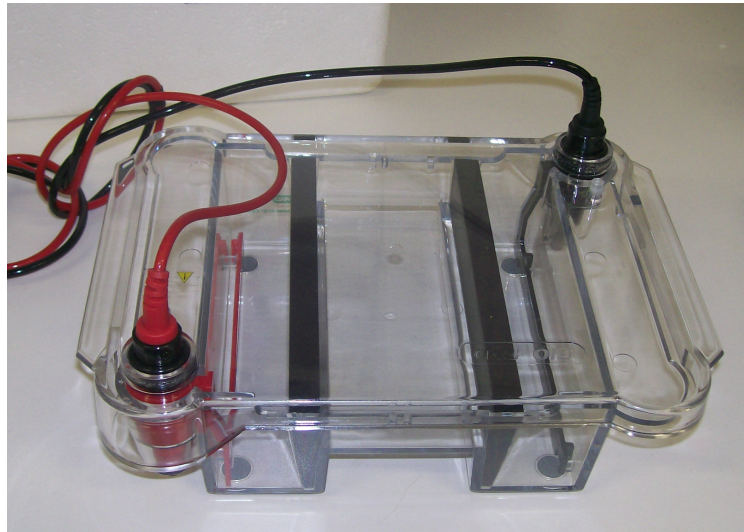


Figura 8 – Cuba de eletroforese

3.5 Tratamento das amostras com DNAase

Todas a amostras de RNA total foram tratadas com *DNAase I Amplification Grade* para que os resultados não apresentassem um falso positivo por causa da amplificação do DNA restante e não do cDNA gerado.

Em um tubo de centrífuga foram adicionados 1 μg de RNA total, 1 μL de tampão DNAase I (10X), 1 μL de enzima *DNAase I Amp. Grade* (0,1U/ μL) e água com DEPC (0,1%) para o volume final de 10 μL . A reação foi incubada por 15 min à temperatura ambiente. Após incubação, foi adicionado 1 μL de EDTA (25 mM) e a reação foi incubada por 10 min a 65 °C. Após o período de incubação a reação foi colocada no gelo para a utilização em seguida ou armazenada em -70 °C para utilização posterior.

3.6 Transcrição reversa (RT).

O RNA total foi utilizado para a síntese de cDNA num processo denominado transcrição reversa, a qual foi realizada num volume de reação de 20 μL utilizando-se 1 μg de RNA total previamente tratado com DNAase. As transcriptases reversas

catalisam a reação de formação de fitas de DNA (cDNA) a partir de um molde de RNA.

Foi utilizado o protocolo para a enzima *Improm II (Promega)*. Dentro do tubo para centrífuga onde o RNA total foi tratado com DNAase foi misturado 1 μL de Oligo-dT (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). A reação foi incubada por 5 min a 70 °C e logo após, transferida para o gelo por 5 min. Foram acrescentados: 4 μL de tampão (5x), 2,4 μL de MgCl_2 (25 mM), 1 μL de dNTPmix com DEPC (10 mM) e 1 μL de enzima (1U/ μL). A reação foi incubada por 5 min a temperatura ambiente e em seguida incubada a 42 °C por 60 minutos. Após o tempo de 60 minutos a reação foi incubada a 70 °C por 15 e minutos e em seguida transferida para o gelo. O cDNA foi estocado a -20 °C até a utilização.

3.7 Desenho de oligonucleotídeos

Os oligonucleotídios utilizados para amplificação dos genes que codificam GOT 1 e 2, MDH 1 e 2, RPL13A foram desenhados pelo programa *Primer Express (Applied Biosystems, EUA)* baseados nas seqüências depositadas no *GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)*. As seqüências dos oligonucleotídeos e o tamanho dos fragmentos amplificados estão listados a seguir (Figura 9).

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
GOT 1	TGCCTGGGCTATTCGCTATTT	AATCCGGTCAGCCATTGTCTT
GOT 2	ATCGAGCAGGGCATCAATGT	AGGCCCATGTTCTTGGCATA
MDH 1	GGGAAATCATTTCATCAACCCA	TTCCTTGCAATTTACCTTGG
MDH 2	TTGCATCATTTCCAACCCAG	TGAAAACCTTCGGCTGTGATGG

Figura 9: Seqüência de oligonucleotídeos utilizados no *Real-time PCR* para os diferentes genes. O programa utilizado foi o *Primer Express da (Applied Biosystems, EUA)*.

3.8 Real-Time PCR

Para o *Real-time* PCR foi utilizado cDNA sintetizado por transcrição reversa. Todas as reações de PCR em tempo real foram feitas usando *ABI Prism 5700* Sistema de detecção de seqüência (*Applied Biosystems*, Estados Unidos). O processo de ciclagem térmica consiste de 2 min a 50 °C, em seguida 2 min a 95 °C para a transcrição reversa e 40 ciclos a 95 °C por 15 s seguido de 57 °C por 30 s e 60 °C por 30 s. Em todos os experimentos foram feitos controles negativos para excluir possibilidades de contaminação por RNA ou DNA genômico. As condições do *Real-Time* PCR foram otimizadas para cada alvo com concentrações ideais de oligonucleotídeos, ausência de formação de dímeros dos oligonucleotídeos e eficiente amplificação dos genes alvos e dos genes controles β -actina. Para a reação do *Real-time* PCR foi utilizado o mix *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX*, 1 μ L (10 μ M) de cada oligonucleotídeo específicos para cada gene amplificado e 1 pg de cDNA das diferentes amostras. Os níveis relativos da expressão dos genes foram calculados de acordo com as instruções da *Applied Biosystems*, utilizando RPL13A como gene normalizador (Figura 10).



Figura 10 – Equipamento ABI Prim 5700

Os dados foram expressos usando o método de Ciclo limite (Ct ou *Cycle threshold*), ou seja, o número de ciclos no qual a curva logarítmica de PCR cruza uma linha de corte arbitrariamente calculada. O cálculo da média do Δ Ct da duplicata das amostras (Ct do gene alvo menos o Ct do gene normalizador) foi submetido a regressão linear.

O primeiro parâmetro utilizado é o valor de limiar da curva de amplificação obtida pela amplificação do cDNA alvo (Ct). Houve a normalização dos valores subtraindo-

se o Ct obtido da amplificação específica do gene alvo pelo Ct do gene normalizador (ΔCt). Devido à característica logarítmica desse valor, houve utilização do parâmetro $2^{-\Delta Ct}$, para a expressão dos dados (Kubista, Andrade *et al.*, 2006)(figura).

3.9 Análise Estatística

Todos os dados foram expressos em médias \pm DP (desvio padrão). Para a análise dos resultados foram aplicados os testes segundo a natureza das variáveis.

Para a análise dos resultados foi aplicado o seguintes teste: 1 way ANOVA com o teste de Bonferroni. Fixou-se o nível de rejeição da hipótese de nulidade em 0,05 ou 5% ($P < 0,05$).

4 RESULTADOS

L-alanil-glutamina, L-glutamina e Caseinato de Cálcio não induziram um aumento significativo nos níveis de RNA mensageiro da amostra de RNA total no valores de MDH 1, MDH 2, GOT 1 e GOT 2 conforme mostrado nos gráficos abaixo (Gráficos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9).

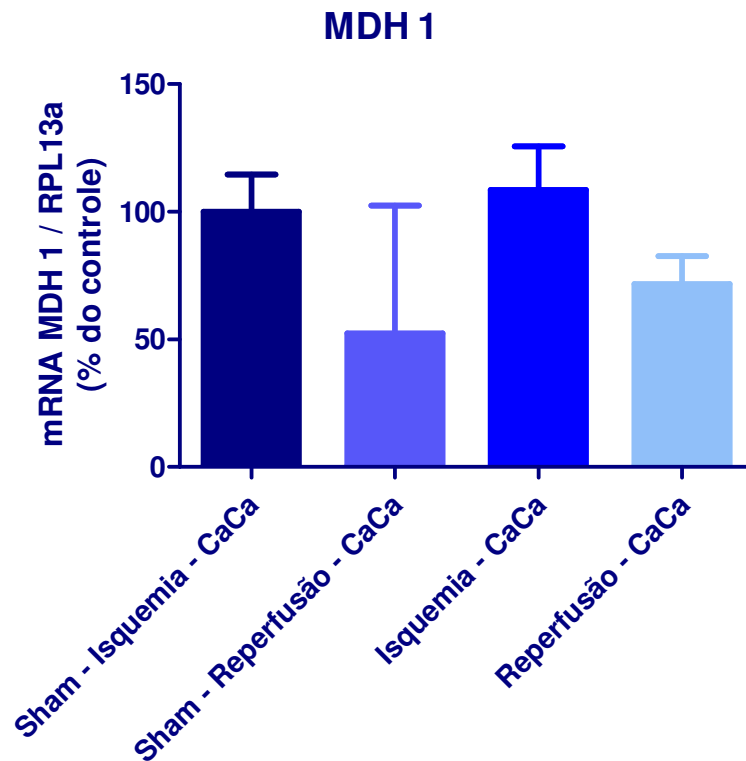


Gráfico 1 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 1, nos Grupos de estudo que utilizaram caseinato de cálcio.

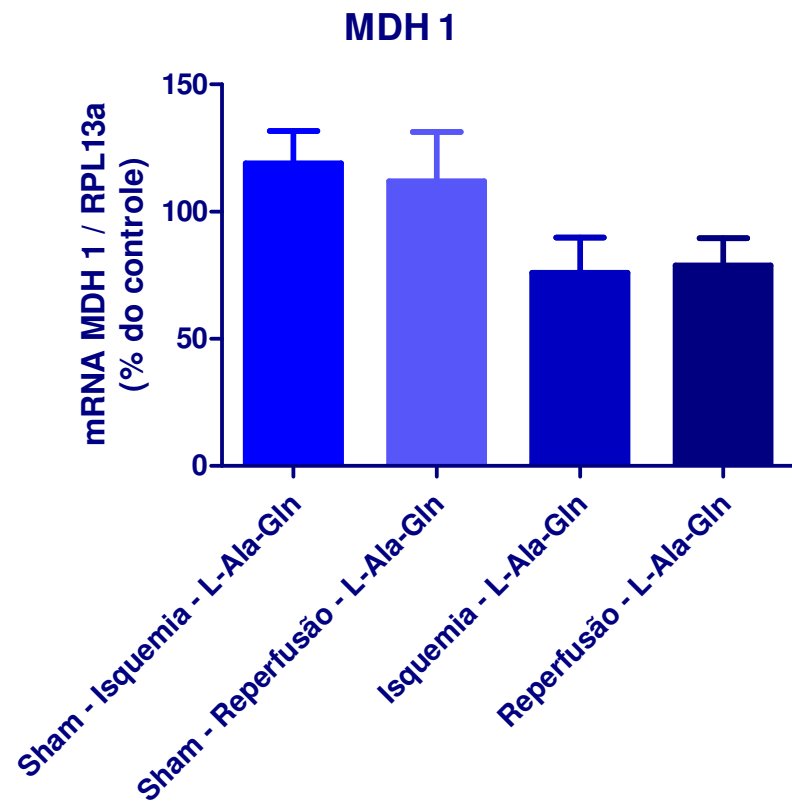


Gráfico 2 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 1, nos Grupos de estudo que utilizaram L-glutamina..

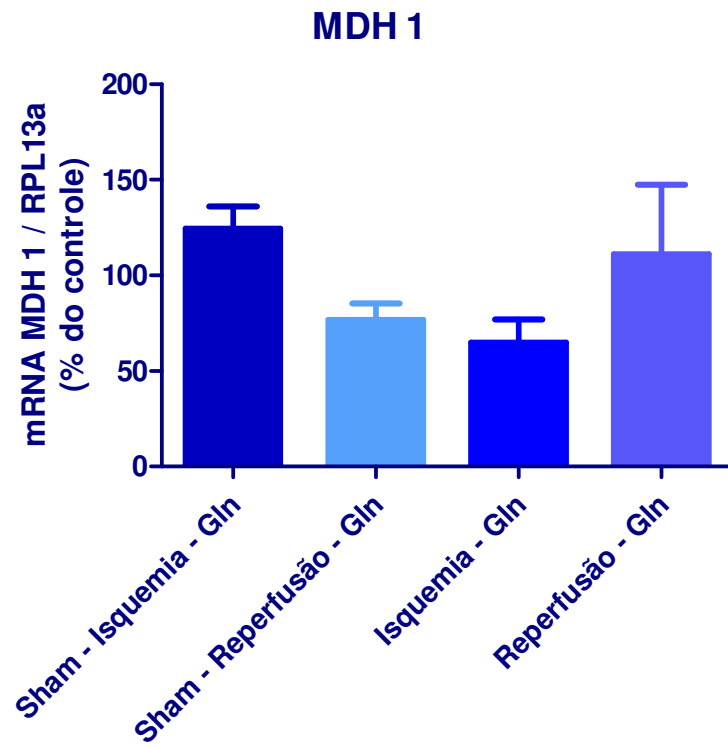


Gráfico 2 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 1, nos Grupos de estudo que utilizaram L-alanil-glutamina

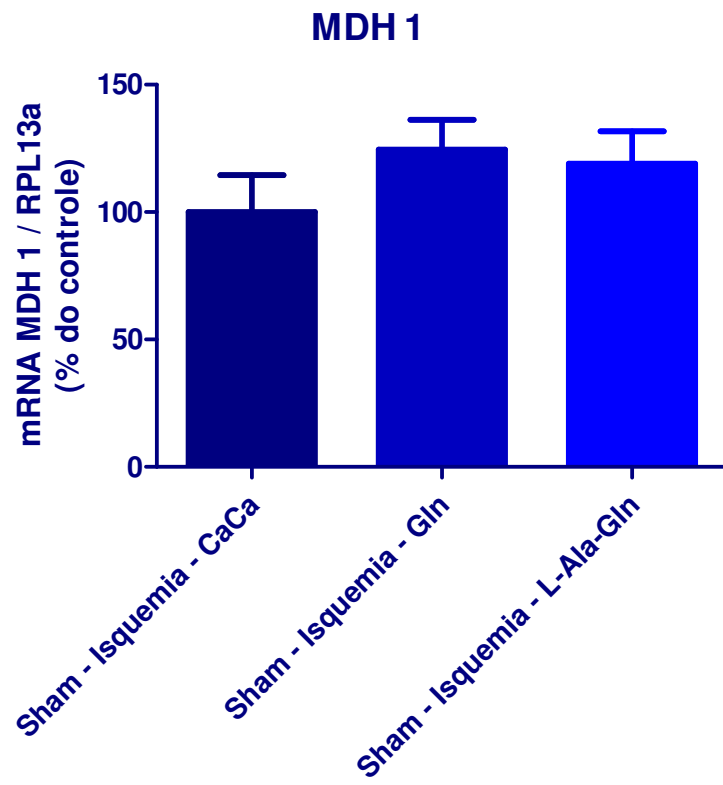


Gráfico 3 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 1, nos diferentes grupos de estudo - Sham isquemia.

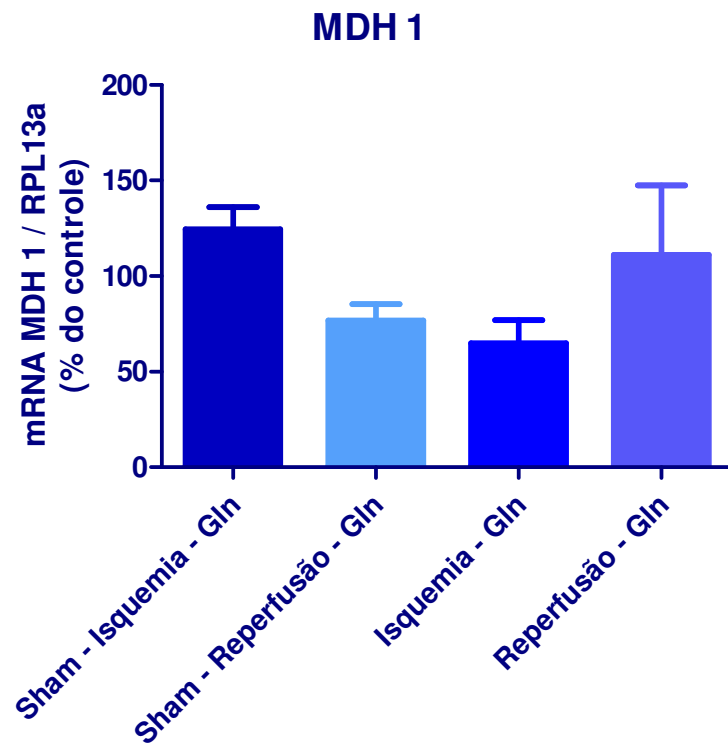


Gráfico 4 - Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 1, nos diferentes grupos de estudo - Sham reperusão.

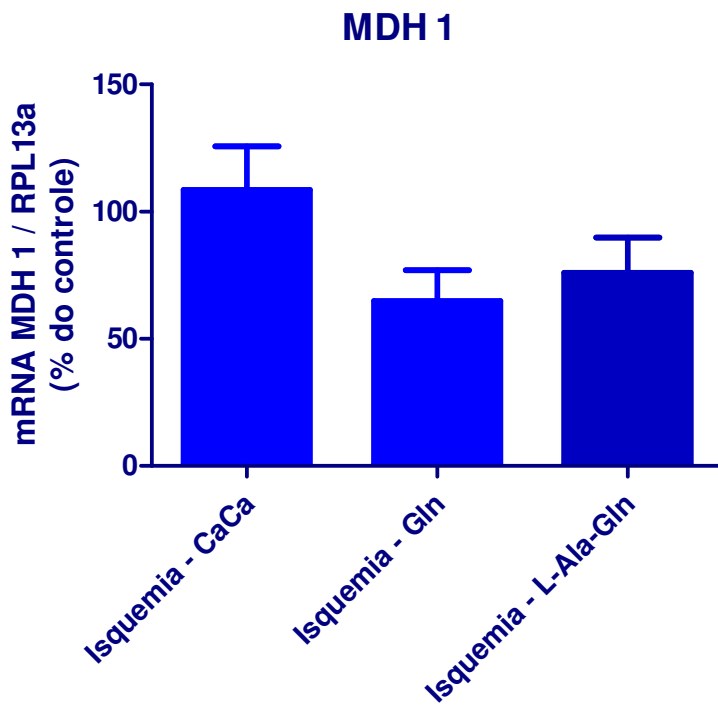


Gráfico 5 –Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 1, nos diferentes grupos de estudo - Isquemia.

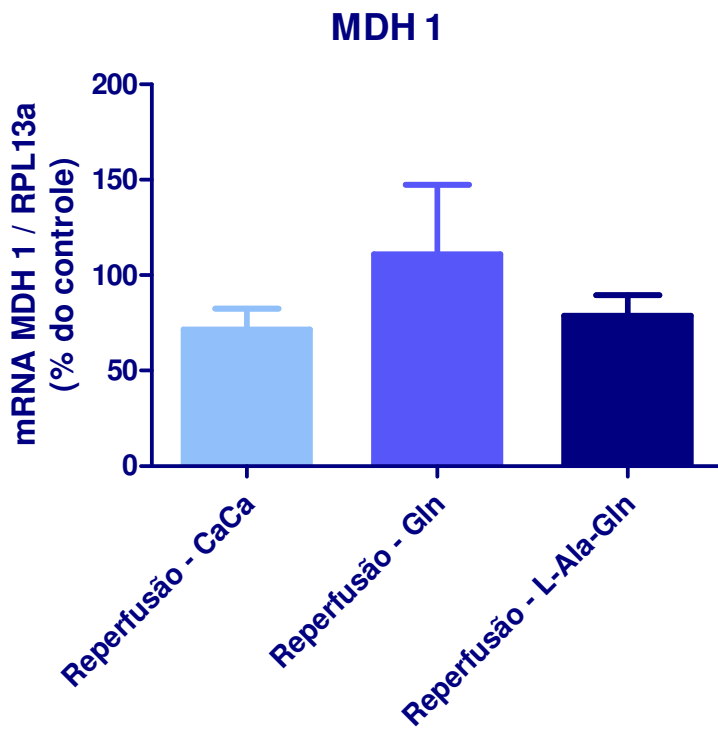


Gráfico 6 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 1, nos diferentes grupos de estudo - Reperusão.

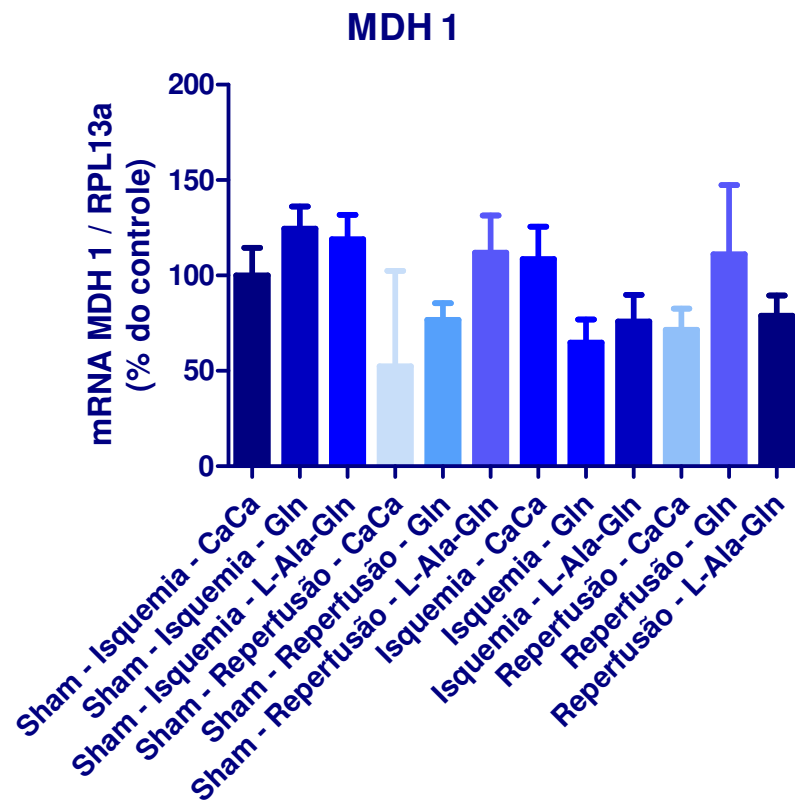


Gráfico 7 –Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 1, nos diferentes grupos de estudo.

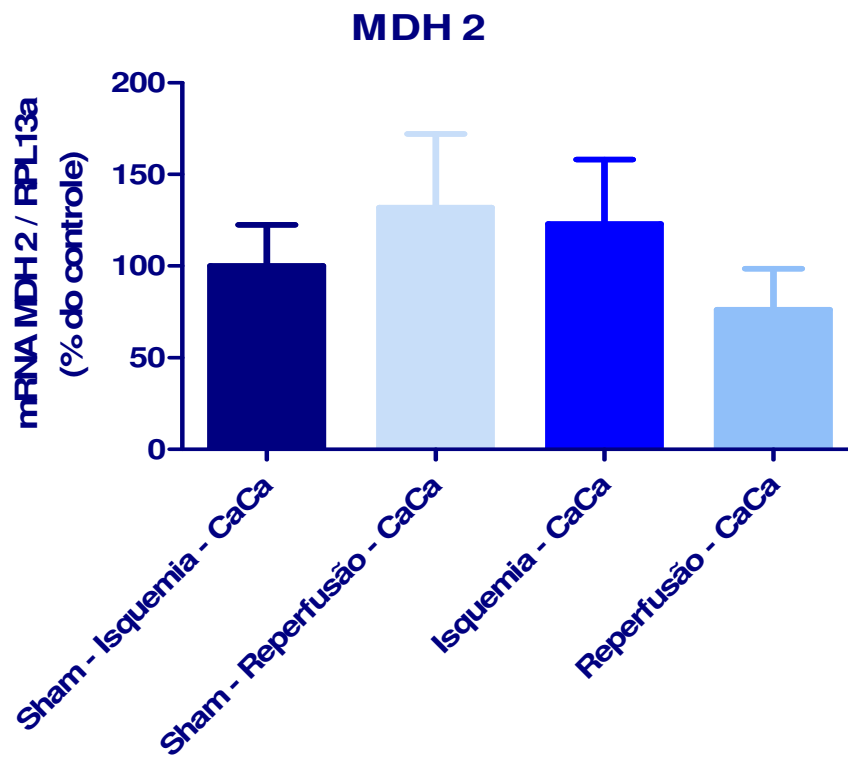


Gráfico 8 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 2, nos Grupos de estudo que utilizaram caseinato de cácio.

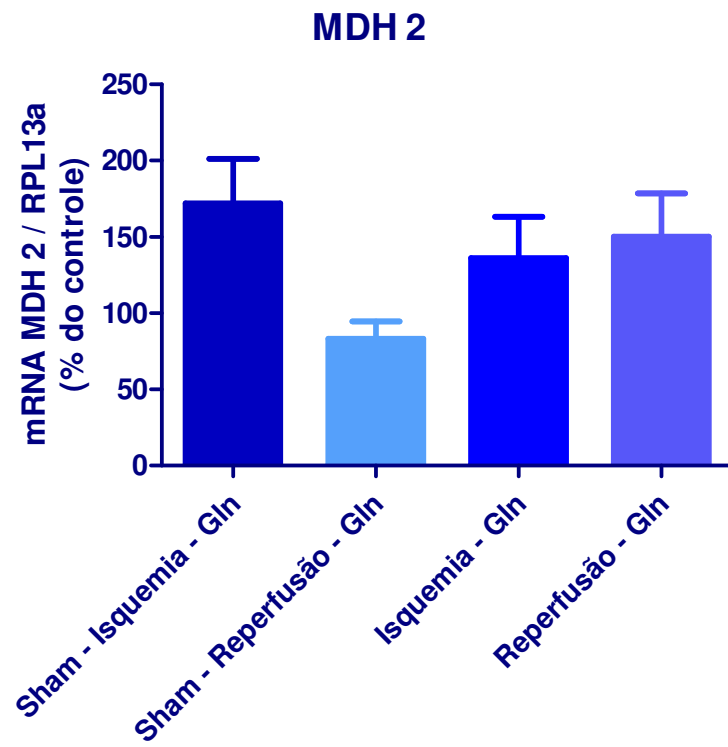


Gráfico 9 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 2, nos Grupos de estudo que utilizaram L-glutamina.

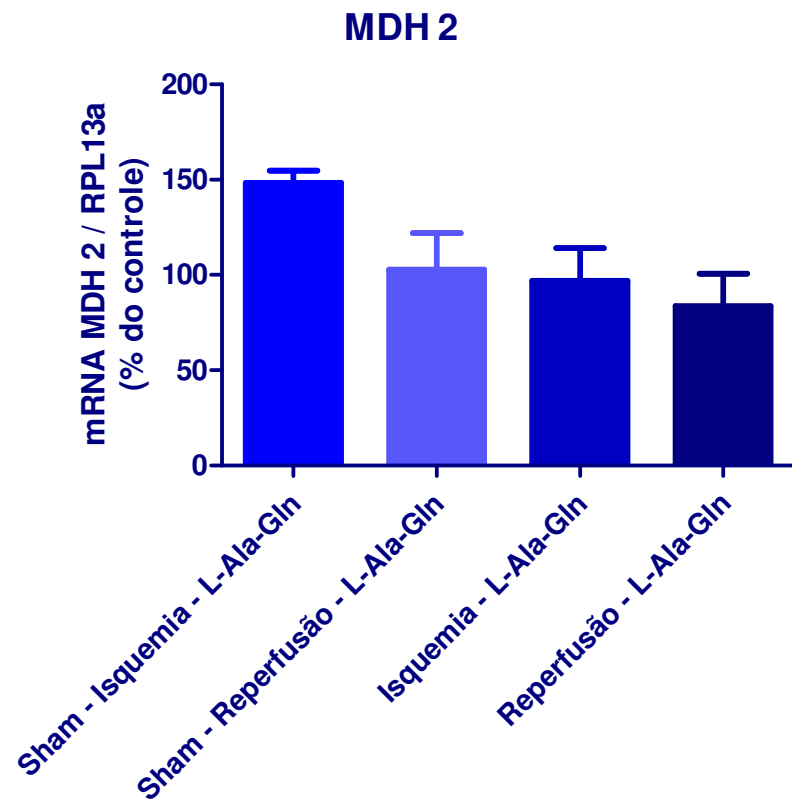


Gráfico 10 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 2, nos Grupos de estudo que utilizaram L-alanil-glutamina

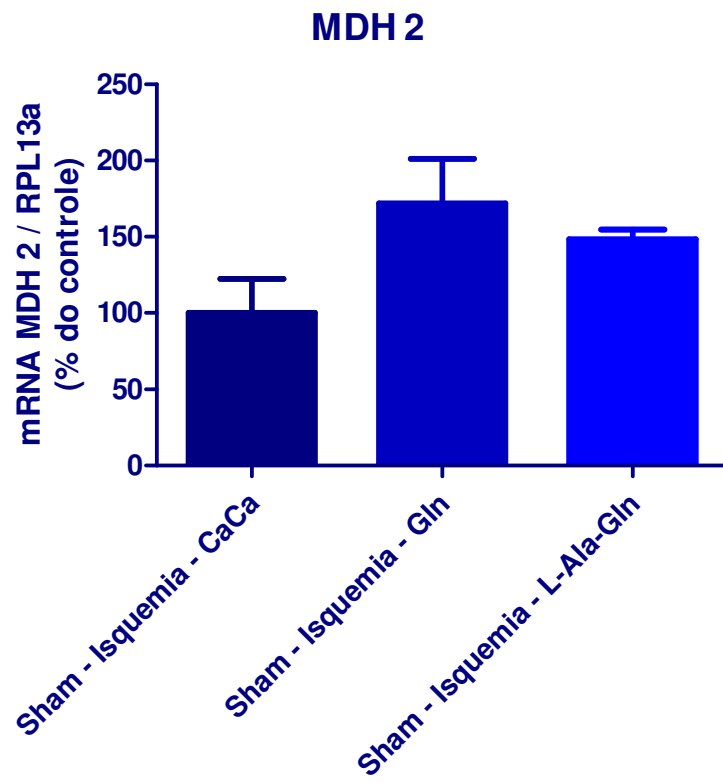


Gráfico 11 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 2, nos diferentes grupos de estudo - Sham isquemia

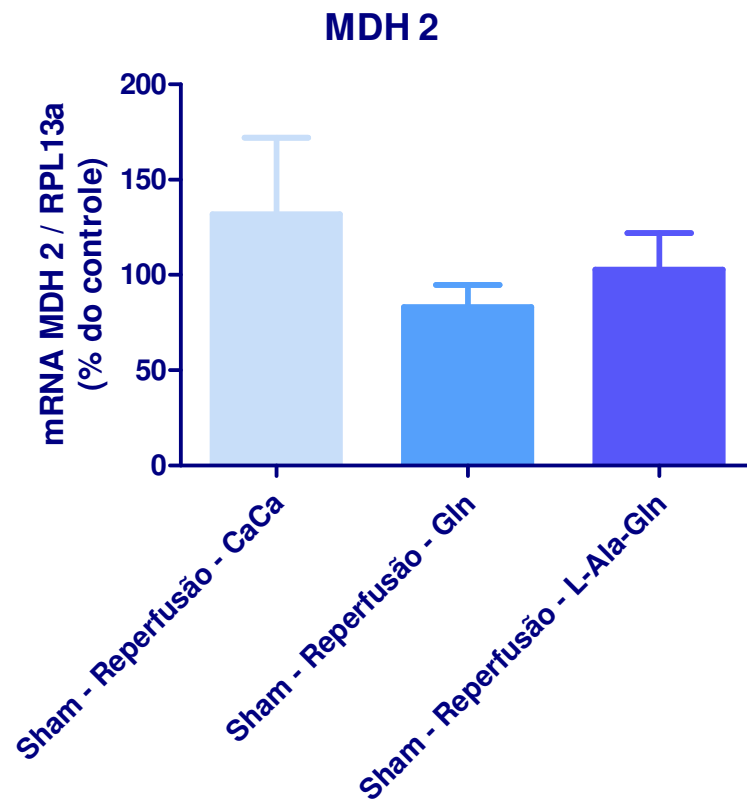


Gráfico 12 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 2, nos diferentes grupos de estudo - Sham reperusão

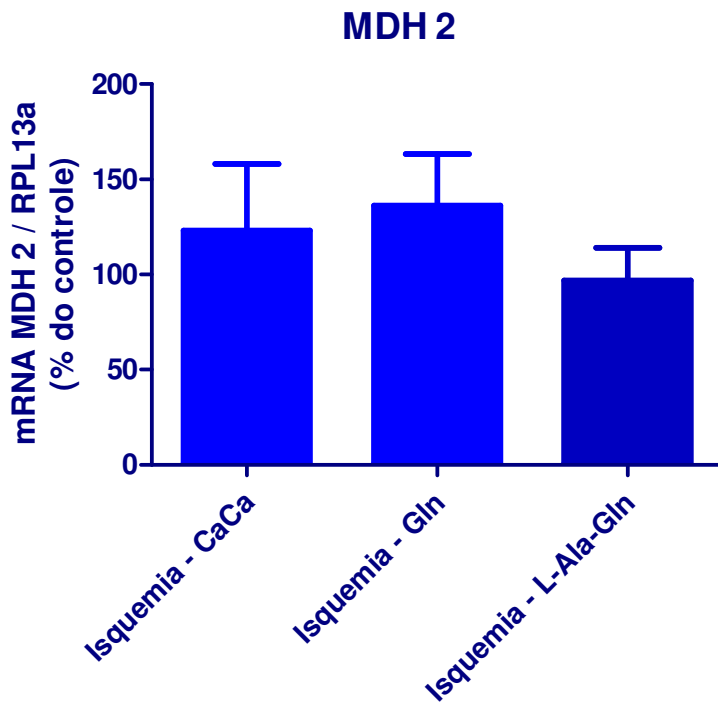


Gráfico 13 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 2, nos diferentes grupos de estudo - isquemia

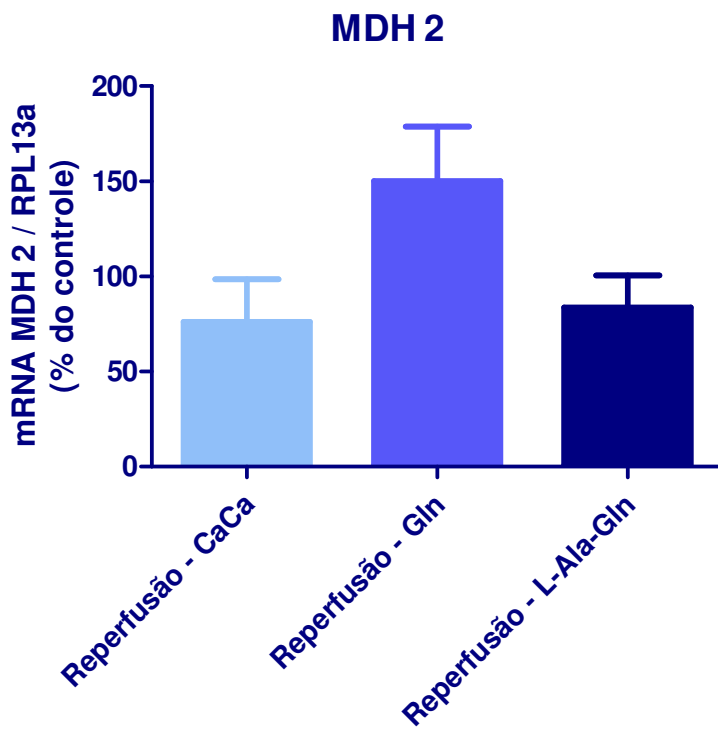


Gráfico 14 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 2, nos diferentes grupos de estudo - Reperusão

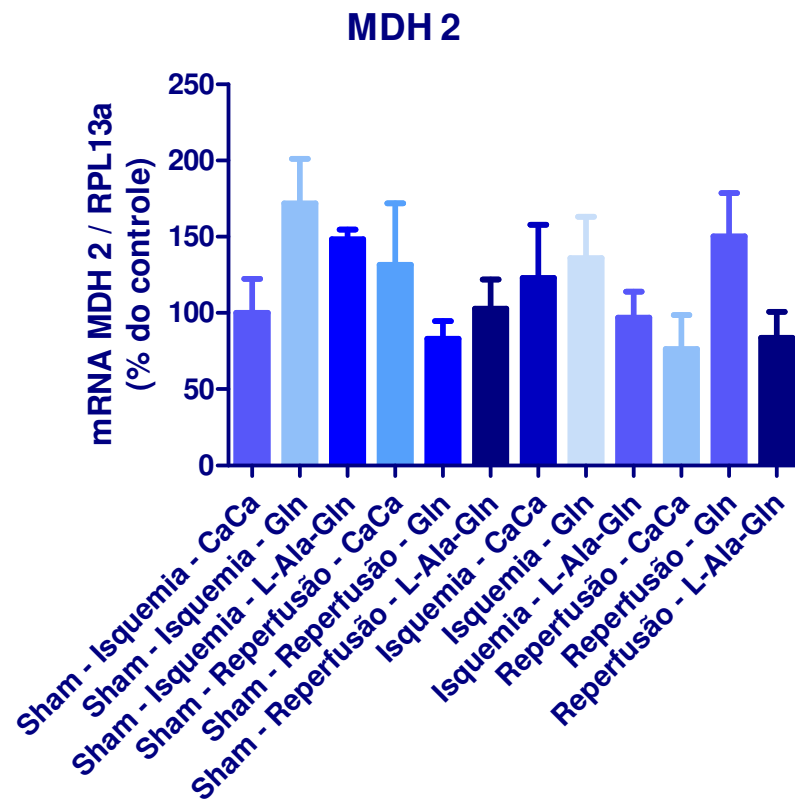


Gráfico 15 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, MDH 2, nos diferentes grupos de estudo.

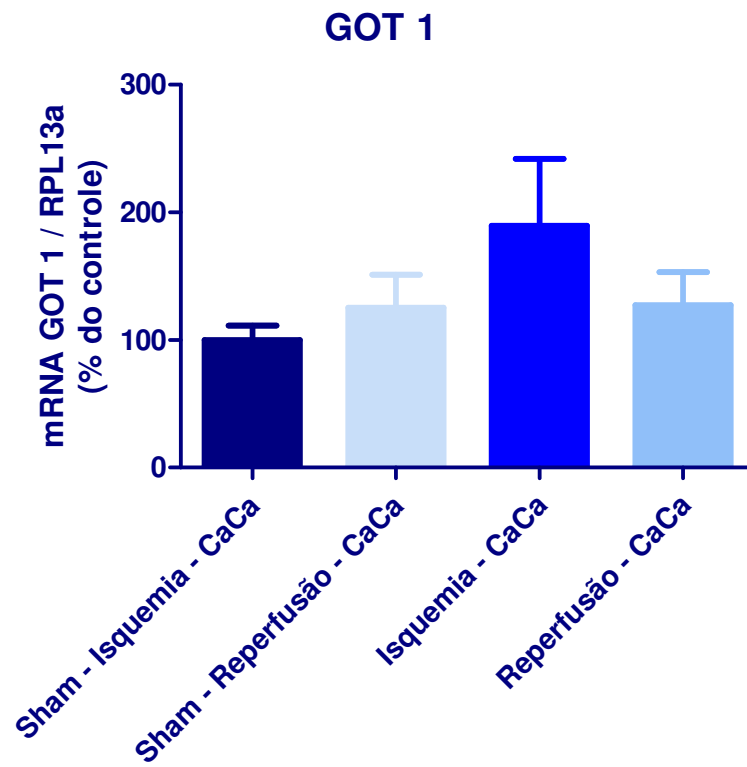


Gráfico 16 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 1, nos Grupos de estudo que utilizaram caseinato de cálcio.

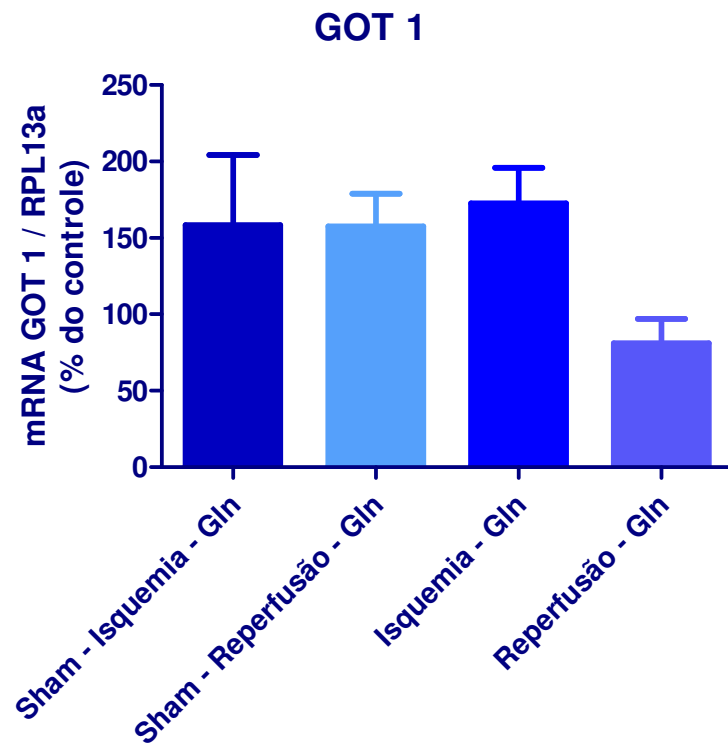


Gráfico 17 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 1, nos Grupos de estudo que utilizaram L-glutamina.

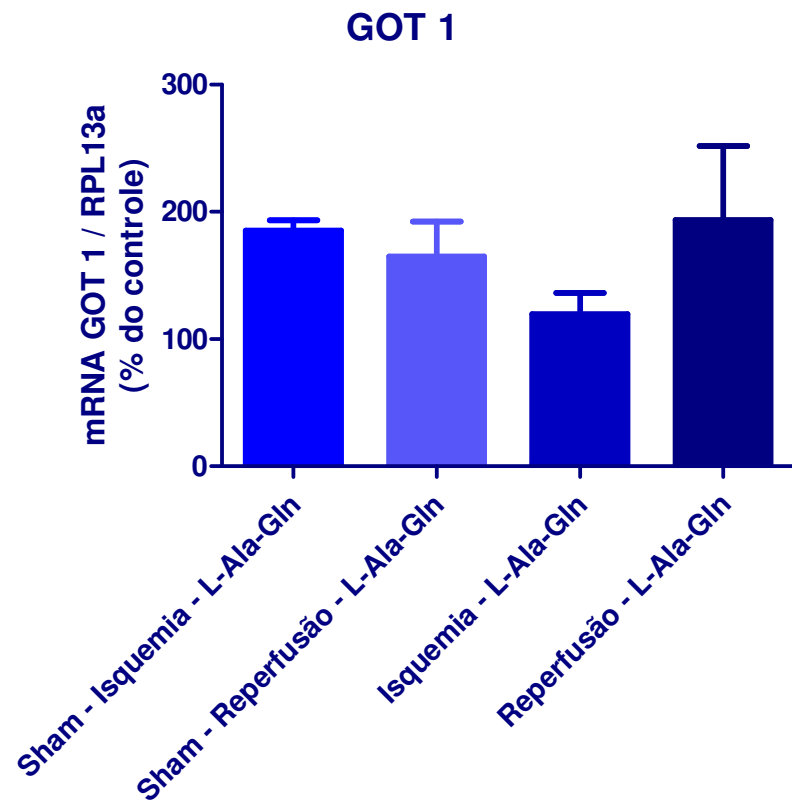


Gráfico 18 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 1, nos Grupos de estudo que utilizaram L-alanil-glutamina.

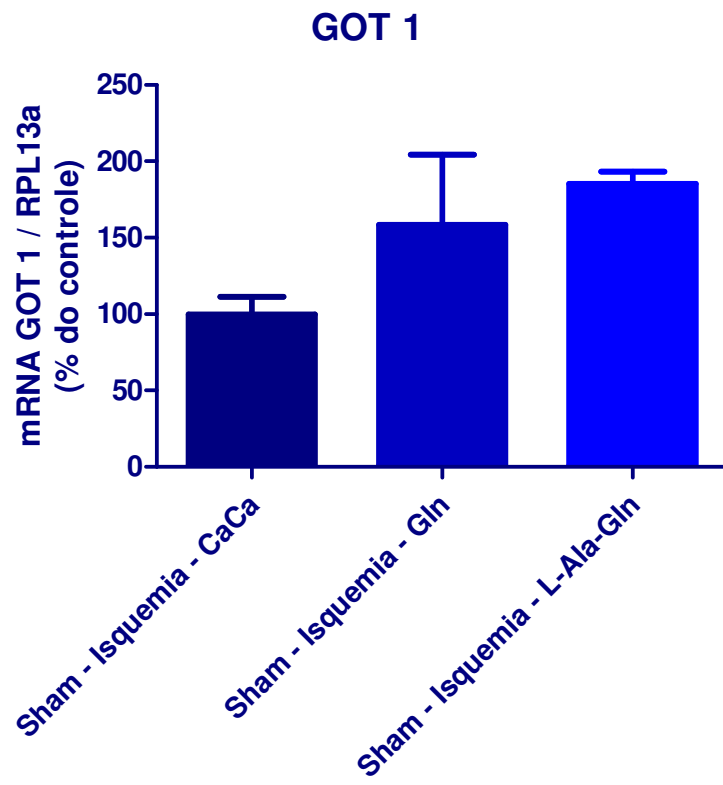


Gráfico 19– Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 1, nos diferentes grupos de estudo - Sham isquemia.

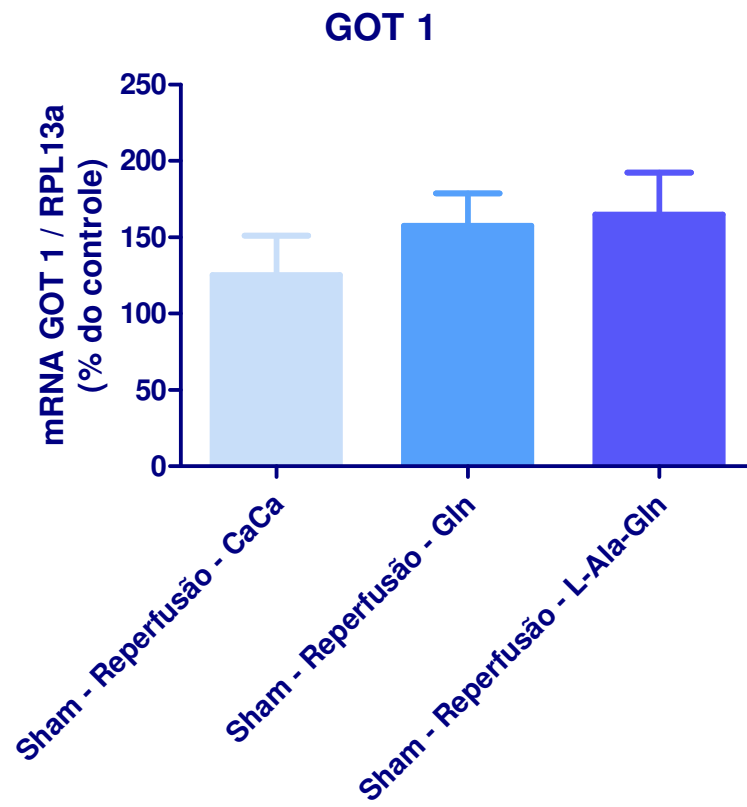


Gráfico 20– Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 1, nos diferentes grupos de estudo - Sham reperusão.

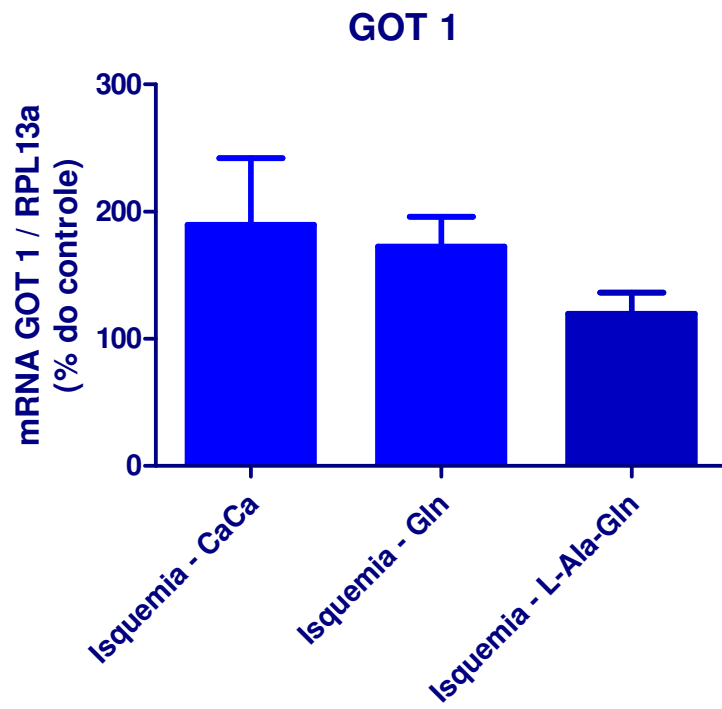


Gráfico 21– Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 1, nos diferentes grupos de estudo - Isquemia.

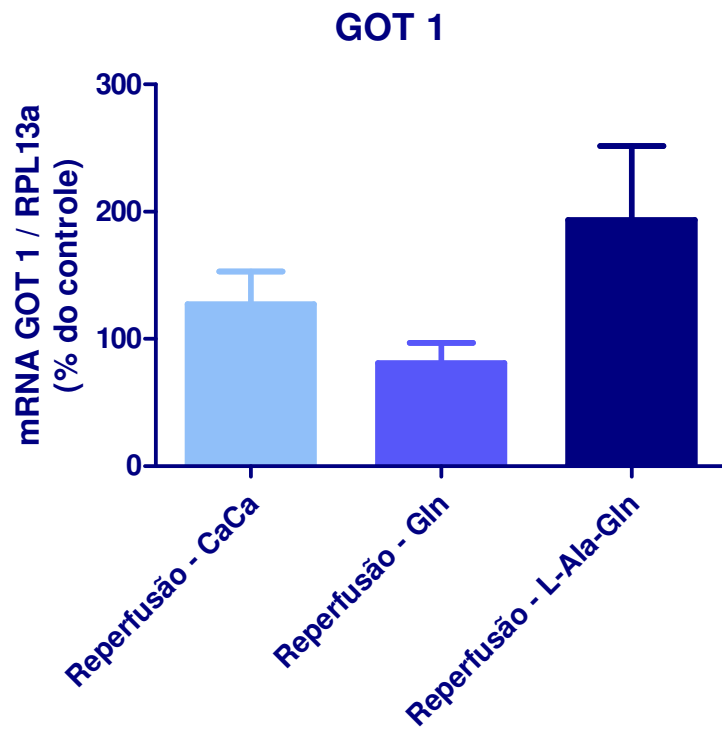


Gráfico 22– Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 1, nos diferentes grupos de estudo - Reperusão.

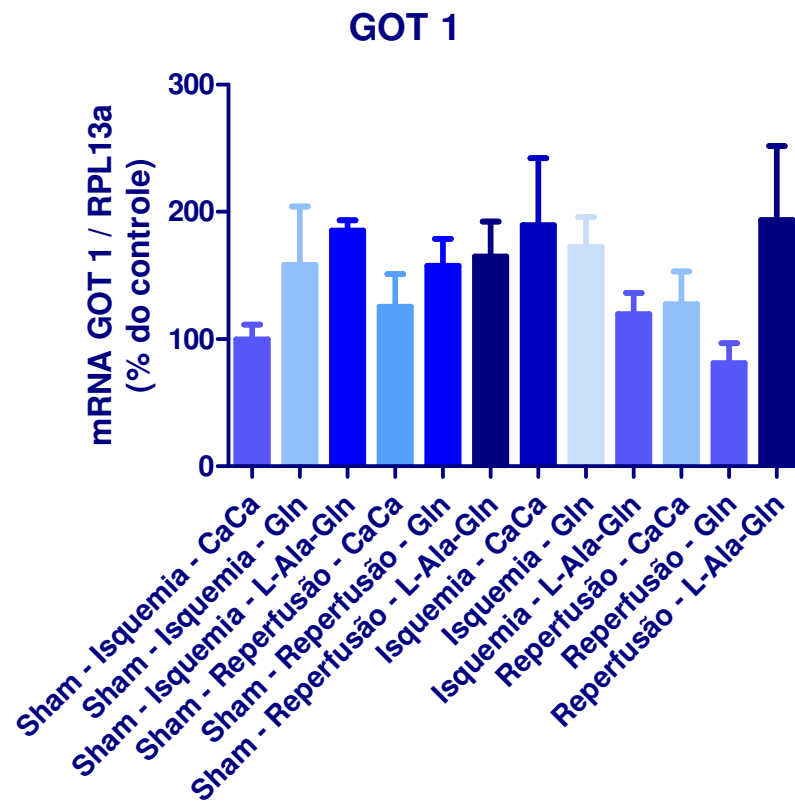


Gráfico 23– Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 1, nos diferentes grupos de estudo.

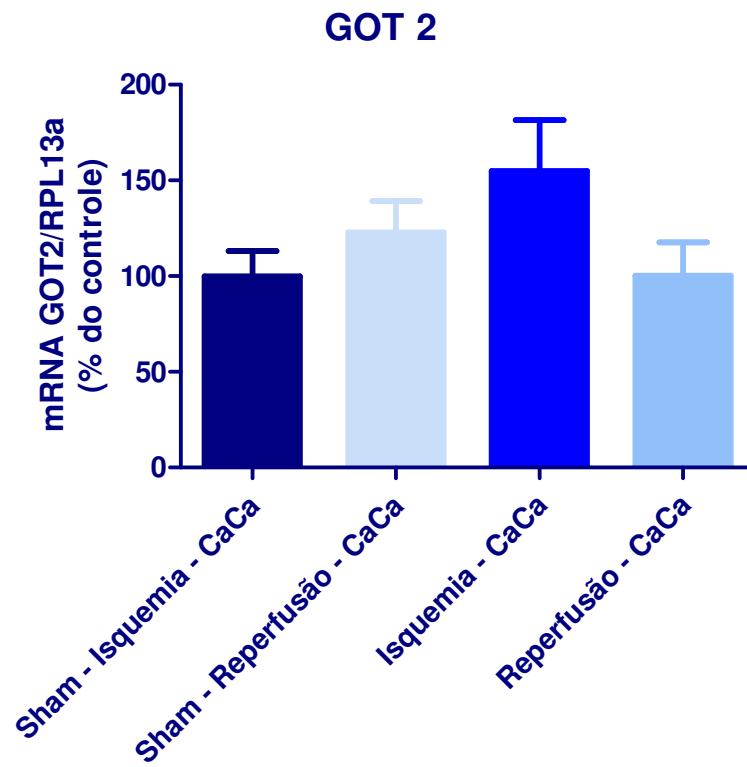


Gráfico 24 – Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 2, nos Grupos de estudo que utilizaram caseinato de cálcio.

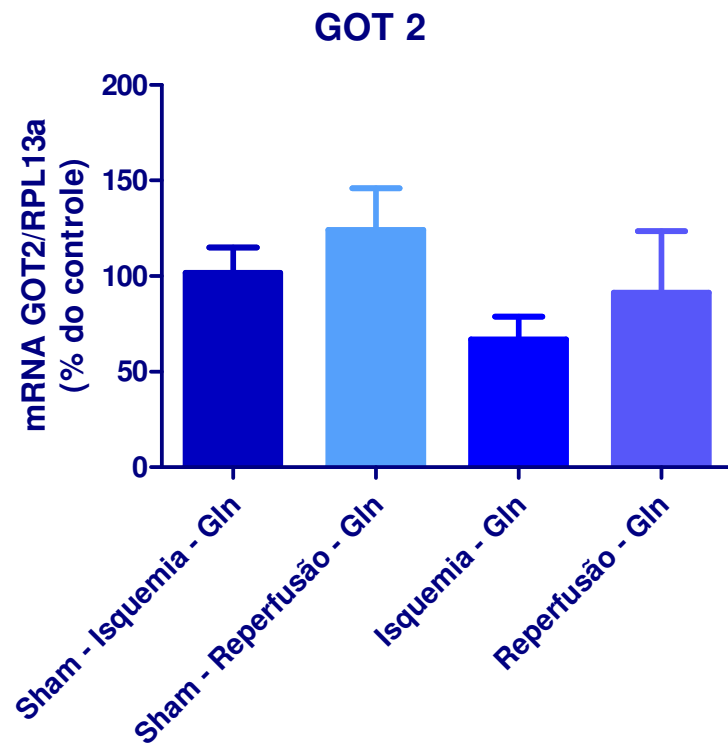


Gráfico 25– Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 2, nos Grupos de estudo que utilizaram L-glutamina.

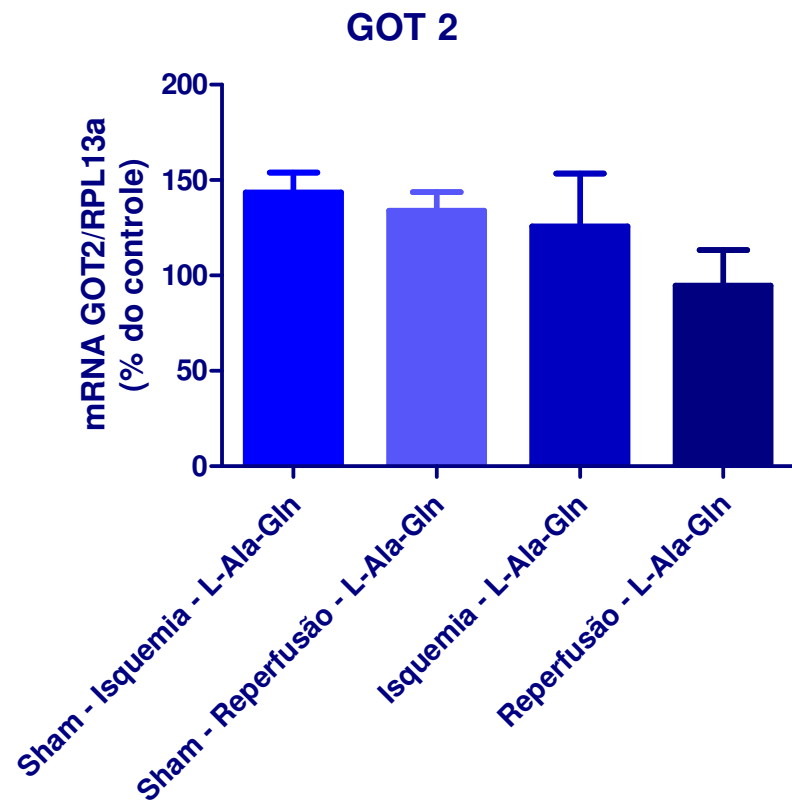


Gráfico 26– Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 2, nos Grupos de estudo que utilizaram L-alanil-glutamina.

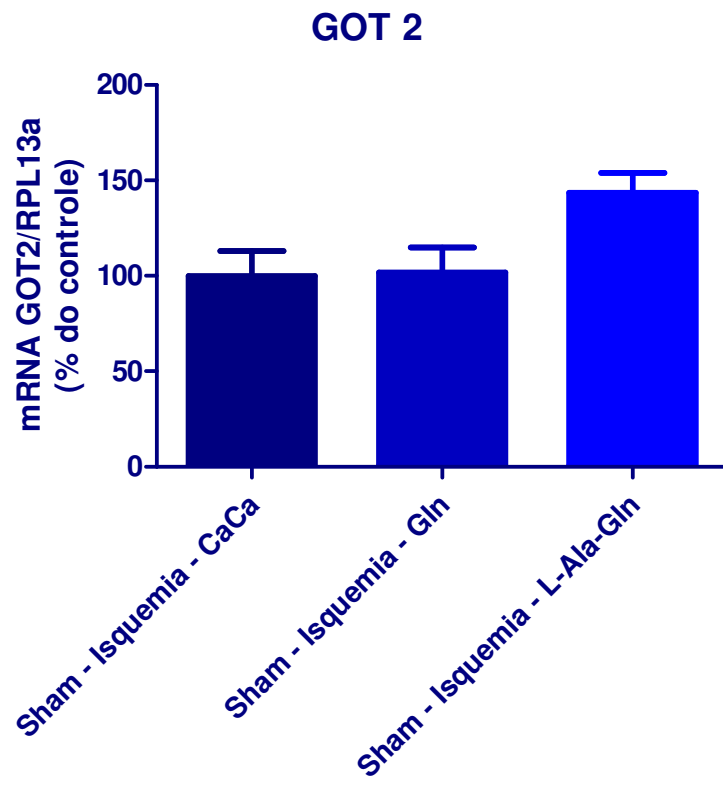


Gráfico 27– Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 2, nos diferentes grupos de estudo - Sham isquemia

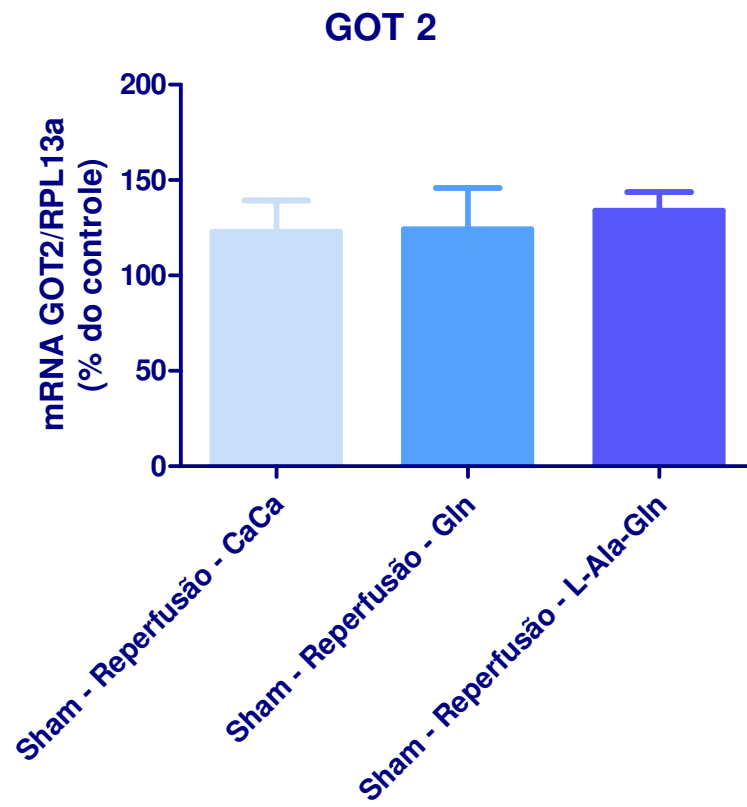


Gráfico 28– Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 2, nos diferentes grupos de estudo - Sham reperusão.

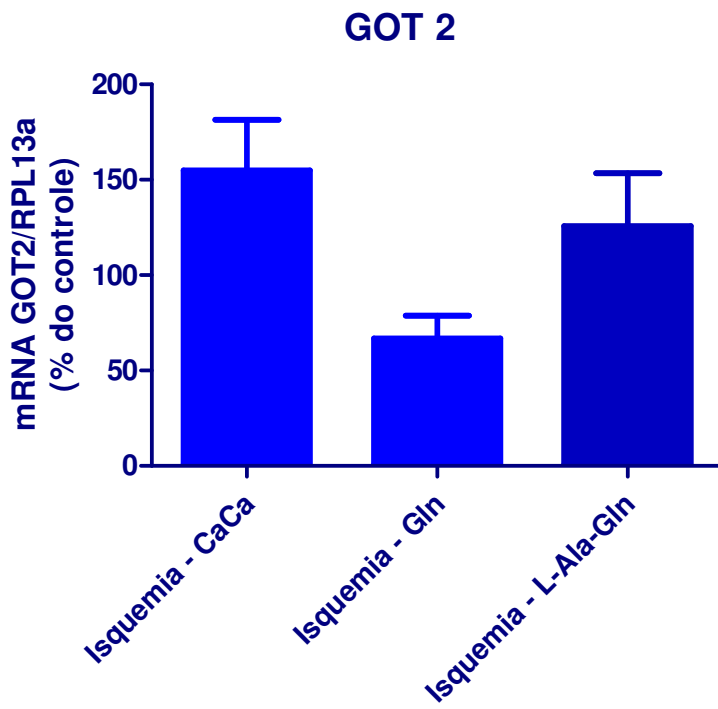


Gráfico 29– Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 2, nos diferentes grupos de estudo - Isquemia

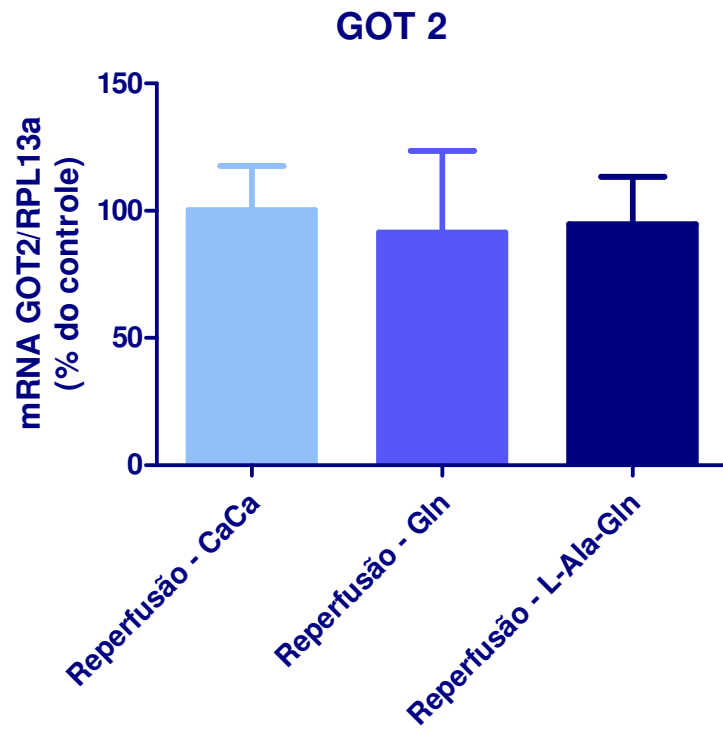


Gráfico 30– Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 2, nos diferentes grupos de estudo - Reperusão.

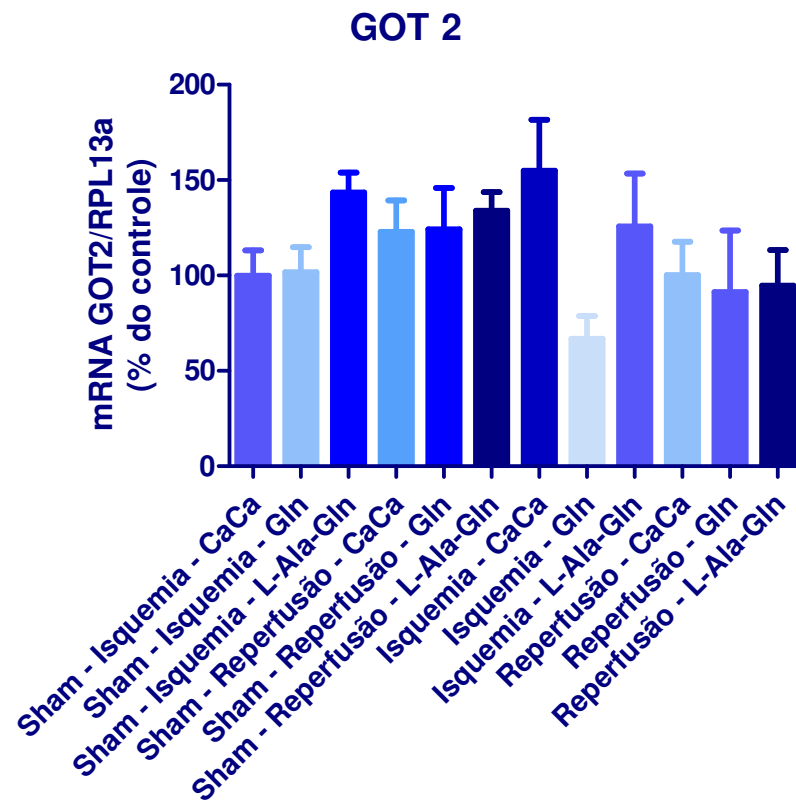


Gráfico 31– Porcentagem de RNAm em relação ao RPL13a, GOT 2, nos diferentes grupos de estudo.

5 DISCUSSÃO

As lesões teciduais e celulares provocadas pela isquemia/reperfusão têm sido amplamente estudadas principalmente em modelos experimentais. Também a literatura médica é abundante em estudos que buscam substâncias capazes de impedir ou minimizar as lesões da isquemia/reperfusão. Entretanto, são pouquíssimos os trabalhos que abordam a ação destas substâncias através de estudos envolvendo biologia molecular, como se propõe a presente dissertação. Neste estudo, são discutidas alterações nas concentrações, nos tecidos do intestino delgado submetidos a isquemia/reperfusão, de RNA mensageiro das enzimas malato desidrogenase e aspartato desidrogenase, após trinta minutos de isquemia normotérmica, em ratos, seguida de mais trinta minutos de reperfusão, após a oferta de L-alanil-glutamina (Ala-Gln), l-glutamina e caseinato de cálcio por via de gavagem.

O revestimento epitelial intestinal é um dos tecidos de mais rápida proliferação no organismo, renovando-se a cada 3 a 8 dias. Sua homeostase é conseguida através do equilíbrio entre a proliferação celular nas criptas e a eliminação celular, via apoptose, a qual ocorre tanto ao nível das criptas quanto de vilosidades. Várias condições podem influenciar a célula a iniciar o processo de apoptose, como a ocorrência de danos físicos ou de agentes químicos, condições que levem ao estresse celular, do tipo formação de radicais livres de oxigênio ou a privação ou diminuição de glutamina. A glutamina pode, portanto prevenir a apoptose no intestino, constituindo-se numa fonte essencial de energia na manutenção do ATP celular (BARTLETT *et al.*, 1998).

Estudos experimentais demonstraram que a oferta de L-alanil-glutamina, por via endovenosa (0,75g/kg peso), trinta minutos antes da lesão de isquemia/reperfusão (meia hora de isquemia e meia hora de reperfusão), causou elevação nas concentrações de lactato no intestino delgado e no rim de ratos, sugerindo aumento da glicólise anaeróbica (Campos *et al.*, 2003; Bezerra *et al.*, 2003). Estudo clínico em pacientes portadores de isquemia crítica de membros inferiores, submetidos a revascularização por bypass fêmoro-poplíteo, e que receberam administração prévia de L-alanil-glutamina (0,75g/kg peso durante 3 horas no pré-operatório imediato) apresentaram redução nas concentrações arterial e venosa do sangue colhido dos

vasos femorais de lactato e glicose, além de diminuição da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), também sugerindo aumento da atividade glicolítica, desta vez de forma aeróbica (Forte, 2004). Outros pesquisadores, utilizaram a infusão de L-alanil-glutamina, de forma associada à nutrição parenteral, em pacientes de UTI (Dechelote et al,2006) e em pacientes portadores de lesão traumática (Bakalar et al,2006) demonstrando terem tanto o amino ácido como o dipeptídeo terem causado aumento da utilização de glicose e redução da glicemia nestes pacientes, como nos estudos acima citados.

Já que a oferta L-alanil-glutamina, prévia à lesão de isquemia/reperfusão, induziu aumento tanto da atividade glicolítica aeróbica quanto anaeróbica, é provável que o mecanismo indutor da maior utilização de glicose ocorra na primeira fase da via glicolítica, ou seja, na conversão de uma molécula de glicose em duas moléculas de piruvato. A consecução da primeira fase da glicólise depende da disponibilidade do co-fator NAD^+ no citosol. Uma das principais vias metabólicas responsável pela oferta de NAD^+ no citosol e de NADH na mitocôndria, para que possa ocorrer a primeira fase da glicólise no citosol acasalada com a respiração celular na mitocôndria, é a lançadeira Malato-Aspartato. A hipótese levantada, no presente trabalho, foi de que a oferta prévia à lesão de isquemia/reperfusão, tanto de L-glutamina quanto de L-alanil-glutamina, propiciaria maior disponibilidade de glutamato para tecidos ricos em glutaminase, tais como o intestino delgado, causando maior ativação desta lançadeira, tendo como consequência maior atividade da primeira fase da via glicolítica nestes tecidos. Portanto, para esclarecer o papel da lançadeira Malato-Aspartato na ação pró-glicolítica da glutamina, tentou-se avaliar via PCR-RT o RNA mensageiro das enzimas chaves desta lançadeira, os RNA de GOT 1 e 2 e MDH 1 e 2. Porém, através deste estudo, a expressão do RNA mensageiro destas enzimas não foi alterada a nível genômico com significado estatístico, nem com a prévia oferta de L-glutamina, nem com a administração prévia de L-alanil-glutamina. Não foram encontrados na literatura consultada estudos semelhantes investigando o mecanismo pró-glicolítico, tanto deste aminoácido glutamina quanto do dipeptídeo glutamina, para que houvesse possibilidade de cotejamento com os resultados do presente estudo.

Apesar de ser um tema relativamente complexo para aqueles que atuam na prática clínica, é um verdadeiro consenso a expectativa de que os estudos baseados em biologia molecular venham a oferecer os necessários avanços na compreensão da fisiopatologia e da própria fisiologia. Talvez em decorrência desta expectativa, ocorre freqüentemente a frustrante sensação de que apesar do grande volume de pesquisas realizadas ao longo dos últimos anos, permanece ainda distante da obtenção de resultados relevantes capazes de transformar estas esperanças em uma realidade para uso clínico.

Por *proteômica* compreende-se os estudos que buscam relacionar a atividade tecidual ao conjunto de proteínas expressas em determinado momento. Ou seja, olhar o produto da expressão gênica. Apesar das dificuldades para estender os benefícios, novos e fascinantes horizontes têm sido abertos pela biologia molecular, em particular no que diz respeito aos estudos relacionados à *proteômica*.

Todas as células somáticas apresentam o mesmo DNA em seu núcleo, contendo os mesmos genes, os quais são, no entanto, ativados (ou expressos) de forma seletiva de acordo com o tecido e a função desempenhada. Estes genes sofrem um processo de *transcrição* em RNA mensageiro, o qual, por sua vez é *traduzido* em uma nova proteína. Estas proteínas irão então executar suas funções específicas, definindo o comportamento biológico da célula e do tecido no qual ela está inserida.

Desta forma, o presente estudo iniciou esta grande procura de entender o mecanismo da hipótese da ação glicolítica da glutamina através da lançadeira malato-aspartato, mas, somente com novos estudos utilizando-se de técnicas mais sensíveis em termos de proteômica é que poder-se-á dizer se realmente estas enzimas estão alteradas. Uma das maneiras de a expressão protéica destas enzimas chaves da lançadeira Malato-Aspartato seria a utilização da eletroforese bidimensional. Nesta técnica pode-se saber se determinada enzima ou proteína está “up or down regulated” a nível de proteínas, além do processo de traducional (www.proteomika.com).

Outro fator importante nessa empreitada é que no presente momento vizualiza-se apenas a ponta do “iceberg”, pois a maioria dos trabalhos estuda as

mesmas proteínas, ou seja, as mais expressas. Um exemplo disso é o estudo do sangue, onde a albumina é expressa na ordem dos 40mg/ml enquanto que citocinas são analisadas em pg/ml.

O esclarecimento dessas alterações genéticas e, porque não, proteômicas presentes nos intestinos estudados que sofreram alterações devido a isquemia/reperfusão é de fundamental importância para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para amenizar os efeitos desta lesão, a fim de no futuro utilizar-se substâncias protetoras eficazes neste processo de lesão celular, e dentre elas aquelas precursoras de glutamato, tais como a L-glutamina, seus dipeptídeos e outros compostos precursores como a ornitina-alfa-ceto-glutarato.

Outro caminho a ser seguido, utilizando-se também técnicas de biologia molecular e de proteômica, é o da determinação do papel dos transportadores mitocondriais de glutamato, tais como o ARALAR 1, no pâncreas, e a citrina, no intestino. Rubi et al (2004) demonstraram ser o ARALAR 1 um mecanismo importante na ativação da via glicolítica pancreática, via utilização de glutamato, ajudando a lançar luz sobre o papel secretagogo de insulina da glutamina na ilhotas de Langerhans. Portanto, a oferta exógena de glutamina, em doses nutracêuticas (0,5g/kg/dia ou 30g/dia em adultos), elevando a disponibilidade de glutamato para tecidos ricos em glutaminase, teria dois possíveis mecanismos: um central, ao nível pancreático, aumentando a liberação de insulina; e outro periférico ao nível de tecidos periféricos, ricos em glutaminase, exercendo ação pró-glicolítica. Os resultados do presente trabalho não oferecem suporte à hipótese da ação periférica deste aminoácido.

6 CONCLUSÕES

6.1 A expressão intestinal de RNA mensageiro das enzimas chaves da lançadeira malato-aspartato (MDH 1, MDH 2, GOT 1 e GOT 2) tanto na isquemia, quanto na isquemia/reperfusão, não se encontra alterada significativamente usando a técnica de PCR em tempo real.

6.2 A gavagem prévia tanto de L-glutamina, quanto de L-alanil-glutamina, não modifica o comportamento da expressão de RNA mensageiro das enzimas chaves da lançadeira malato-aspartato nem na isquemia nem na isquemia/reperfusão..

7. REFERÊNCIAS

AHREN, C.; HAGLUND, U. Mucosal lesions in the small intestine of the cat during low flow. **Acta Physiol. Scand.**, v. 88, p.541-550, 1973.

Bakalar, B., F. Duska, *et al.* Parenterally administered dipeptide alanyl-glutamine prevents worsening of insulin sensitivity in multiple-trauma patients. **Crit Care Med**, v.34, n.2, Feb, p.381-6. 2006.

Barbosa, R. C., S. B. Guimaraes, *et al.* Metabolic effects of l-alanyl-glutamine in burned rats. **Burns**, v.32, n.6, Sep, p.721-7. 2006.

BOHLEN, G. Intestinal tissue PO₂ and microvascular responses during glucose exposure. **Am. J. Physiol.**, v. 238, p. H164-171, 1980.

BOROS, M.; KASZAKI, J.; BAKÓ, L.; NAGY, S. Studies on the relationship between xanthine oxidase and histamine release during intestinal ischemia-reperfusion. **Circ. Shock**, v. 38, p. 108-114, 1992.

Campos, S. T. e C. Timo-laria. The direct potential of the intestinal wall. Its change in ischemia and revascularization. An experimental study in the rat. **Rev Bras Pesqui Med Biol**, v.8, n.5-6, Sep-Dec, p.481-7. 1975.

COTRAN, R.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. **Robbins' Patologia** estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

Dechelotte, P., M. Hasselmann, *et al.* L-alanyl-L-glutamine dipeptide-supplemented total parenteral nutrition reduces infectious complications and glucose intolerance in critically ill patients: the French controlled, randomized, double-blind, multicenter study. **Crit Care Med**, v.34, n.3, Mar, p.598-604. 2006.

EVORA, P. R. B.; PEARSON, P. J.; SECCOMBE, J. F.; SCHAFF, H. V. Lesão de Isquemia-Reperfusão. Aspectos Fisiopatológicos e a Importância da Função Endotelial. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 66, n. 4, p. 239-245, 1996.

Filho, A. G. G., S.B.; Vasconcelos, P.R.C.; Vasconcelos, P.R.L. Efectos metabólicos de la oferta intravenosa de L-alanil-glutamina en la sangre e

hígado de ratas sometidos a hepatectomia parcial. **Rev Bras Nutr Clin**, v.19, n.2, p.54-58. 2004.

Fortes, W. A. G., S.B.; Vasconcelos, P.R.C.; Vasconcelos, P.R.L. Repercussões da L-alanil-glutamina sobre as concentrações de lactato e lactato-desidrogenase (LDH) em pacientes com isquemia crítica dos membros inferiores e revascularização distal. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, n.3, p.209-215. 2003.

HARWARD T.R.; COE, D.; SOUBA, W.N. et al. Glutamine reserves but glutathione levels during intestinal ischemia and reperfusion. **J. Surg. Vasc.**, v. 56, p. 351-355, 1994.

KOIKE, K.; MOORE, E.E.; MOORE, F.A.; FRANCIOSE, R.J.; FONTES, B.; KIM, F.J. CD11b blockade prevents lung injury despite neutrophil priming after gut ischemia/reperfusion. **J. Trauma**, v. 39, p. 23-27, 1995.

KREBS, H. A. Metabolism of aminoacids. IV. The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. **Biochem. J.**, v. 29, p. 1951, 1935.

Kubista, M., J. M. Andrade, *et al.* The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med, v.27, n.2-3, Apr-Jun, p.95-125. 2006.

KUZU, M.A.; TANIK, A.; KALE, I.T.; ASLAR, A.K.; KOKSOY, C.; TERZI, C. Effect of ischemia/reperfusion as a systemic phenomenon on anastomotic healing in the left colon. **World J. Surg.**, v. 24, p. 990–994, 2000.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L; COX, M.M. A Glicólise e o Catabolismo das Hexoses. In: **Princípios da Bioquímica**. São Paulo, Sarvier, 2. ed., cap.14, 2000(a), p.297-330.

LUNDGREN, O.; HAGLUND, U. The pathophysiology of the intestinal counter-current exchanger. **Life Sci**. v. 23, p. 1411-1122, 1978.

MARINHO, H.S.P.C. Metabolismo do glutathione no fígado de rato normal e no fígado de rato hepatomizado. TESE (DOUTORADO em Bioquímica). Universidade de Lisboa; 1995, 115 p.

MONTGOMERY, A.; BORGSTRÖM, A.; HAGLUND, U. Pancreatic proteases and intestinal mucosal injury after ischemia and reperfusion in the pig. **Gastroenterology**, v. 102, p. 216-22, 1992.

Monty Krieger; Matthew P Scott; Matsudaira, P. T. L., Harvey F.; Darnell, James E.; Lawrence Zipursky; Kaiser, Chris; Arnold Berk. **Molecular Cell Biology**. San Francisco. 2004.

Mustafa, N. A., M. Yandi, *et al.* Effect of pentoxifylline on the ischemia-reperfusion injury of the intestine. **Int Surg**, v.80, n.2, Apr-Jun, p.152-5. 1995.

NEWSHOLME, P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of immune system in health, postinjury, surgery or infection? **J. Nutrition**, v. 131, p. 2615-2522, 2001.

Newsholme, P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? **J Nutr**, v.131, n.9 Suppl, Sep, p.2515S-22S; discussion 2523S-4S. 2001.

NEWSHOLME, P.; LIMA, M. M. R.; PROCOPIO, J.; PITHON-CURI, T. C.; DOI, S. Q.; BAZOTTE, R. B.; CURI, R. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, n. 2, p. 153-163, 2003.

PARKS, D.A.; GRANGER, N. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. **Am. J. Physiol.**, v. 250, p.G749-753, 1986.

PATERNO, F.; LONGO, W.E. The etiology and pathogenesis of vascular disorders of the intestine. **Radiol. Clin. North Am.**, v. 46, n.5, p. 877-885, 2008.

PITHON-CURI, T.C.; LEVADA, A.C.; LOPES, L.R.; DOI, S.Q.; CURI, R. Glutamine plays a role in superoxide production and the expression of p47phox, p22phox and gp91phox in rat neutrophils. **Clin. Sci.**, v. 103, p. 403-408, 2002.

POGGETTI, R.S.; MOORE, F.A.; MOORE, E.E.; BANERJEE, A. Simultaneous ischemia/reperfusion induced intestinal dysfunction occurs despite sustained oxygen consumption. **J. Surg. Res.**, v. 52, p.467-471, 1992.

RIBEIRO, M.E.; YOSHIDA, W.B. Lesões intestinais decorrentes de isquemia e reperfusão: fisiopatologia e modelos experimentais. **J. Vasc. Br.**, v. 4, n.2, p.183-194, 2005.

ROSKOSKI JR., R. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

Rubi B, del Arco A, Bartley C, Satrustegui J, Maechler P. The malate-aspartate NADH shuttle member Aralar1 determines glucose metabolic fate, mitochondrial activity, and insulin secretion in beta cells. **J Biol Chem**. 2004 Dec 31;279(53):55659-66. 2004.

SIMI, A.C. Isquemia intestinal in MAFFEI, F.H.A. Doenças vasculares periféricas. Rio de Janeiro: MEDSI; p. 1239-1257, 2002.

Souba, W. W., K. Herskowitz, *et al.* Gut glutamine metabolism. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v.14, n.4 Suppl, Jul-Aug, p.45S-50S. 1990.

Stehle, P., I. Ratz, *et al.* In vivo utilization of intravenously supplied L-alanyl-L-glutamine in various tissues of the rat. **Nutrition**, v.5, n.6, Nov-Dec, p.411-5. 1989.

STONEY, R.J.; CUNNINGHAN, C.G. Acute mesenteric ischemia. **Surgery**, v.114, p. 489-490, 1993.

Toldy, A., M. Atalay, *et al.* The beneficial effects of nettle supplementation and exercise on brain lesion and memory in rat. **J Nutr Biochem**, Dec 12. 2008.

WEISS, R.L.; SISLEY, A.C.; HARIG, J.M. Neutrophil depletion attenuates human intestinal reperfusion injury. **J. Surg. Res.**, v. 57, p. 192-197, 1989.

Windmueller, H. G. e A. E. Spaeth. Respiratory fuels and nitrogen metabolism in vivo in small intestine of fed rats. Quantitative importance of glutamine, glutamate, and aspartate. **J Biol Chem**, v.255, n.1, Jan 10, p.107-12. 1980.