



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

MÁRCIA ANDRÉA DA SILVA CARVALHO SOMBRA

**L-ALANIL-GLUTAMINA EM MODELO EXPERIMENTAL DE
LESÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA POR TRAUMA
MUSCULAR ESQUELÉTICO**

FORTALEZA
2009

MÁRCIA ANDRÉA DA SILVA CARVALHO SOMBRA

**L-ALANIL-GLUTAMINA EM MODELO EXPERIMENTAL DE
LESÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA POR TRAUMA
MUSCULAR ESQUELÉTICO**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

FORTALEZA

2009

MÁRCIA ANDRÉA DA SILVA CARVALHO SOMBRA

L-ALANIL-GLUTAMINA EM MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO AGUDA
PULMONAR INDUZIDA POR TRAUMA MUSCULAR ESQUELÉTICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor.

Aprovada em : ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Antônio Wilson Vasconcelos
Universidade Estadual do Ceará-UECE
Membro da Banca Examinadora

Prof. Dr. Rodrigo Dornfeld Escalante
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)
Membro da Banca Examinadora

Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fachine
Universidade Federal do Ceará
Membro da Banca Examinadora

Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães
Universidade Federal do Ceará
Membro da Banca Examinadora

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará
Presidente da Banca Examinadora

**Ao meu Senhor e único
DEUS.**

À minha família, em
especial ao meu amado esposo,
Edeoney, e aos meus filhos
Gabriela e Lucas.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos, Coordenador do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC) pela dedicação que foi imprescindível à realização desse trabalho.

Ao professor Dr. Rodrigo Dornfeld Escalante, professor da Faculdade de Medicina da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) por sua atenção, orientação e constante incentivo.

Ao professor Dr. Antonio Wilson Vasconcelos, professor da Universidade Estadual do Ceará, médico patologista, pela responsabilidade e competência dispensadas ao estudo histopatológico deste trabalho.

Ao Professor Dr. Francisco Vagnaldo Fachine, pelas sugestões e pelo companheirismo.

Ao professor Dr. Antônio Ribeiro da Silva Filho, Coordenador do Curso de Medicina da Faculdade Christus pelo encorajamento e incentivo à pesquisa.

Ao professor Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC) por ter cedido o Laboratório de Farmacologia e permitir que pudesse ser realizada uma etapa prática desta pesquisa.

A estagiária Úrsula Maria Lima Pessoa, aluna do curso de fisioterapia da Faculdade Christus pelo grande interesse na pesquisa e fundamental participação neste estudo.

Aos estagiários José Reniclebson Feitosa de Souza, Lorena Bezerra Martins, Marcos Aurélio Barroso Aguir Filho, Levy Paes Aguiar e Renata Patrícia Besera pela participação com responsabilidade neste estudo.

Aos amigos e colaboradores Jand-Venes Rolim Medeiros e Vilma Leite Pires de Souza.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da UFC, Maria Luciene Vieira de Oliveira e Magda Maria Gomes Fontinele, pela constante atenção e dedicação.

A Sra. Maria José Raposo Rodrigues, coordenadora dos laboratórios da Faculdade Christus.

A Sra. Maria Divina Pereira Bibliotecária da Faculdade Christus

À Faculdade Christus pelo apoio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Ministério da Ciência e Tecnologia pelo financiamento da pesquisa.

Confie no SENHOR de todo o teu coração e não se estribes no teu próprio entendimento. Reconhece-o em todos os teus caminhos, e Ele endireitará as tuas veredas.

(Provérbios 3: 5 e 6)

RESUMO

L-ALANIL-GLUTAMINA EM MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA POR TRAUMA MUSCULAR ESQUELÉTICO. MÁRCIA ANDRÉA DA SILVA CARVALHO SOMBRA. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia. Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão Vasconcelos

Nesse estudo procurou-se validar um modelo de lesão aguda pulmonar (LAP) induzida por um trauma muscular cirúrgico que tenta reproduzir as condições de um trauma muscular esquelético que ocorre em seres humanos e com isso proporcionar um melhor entendimento da doença e das suas alternativas de tratamento. Na primeira etapa foi avaliado o efeito do modelo experimental. Trinta e seis ratos machos Wistar, com peso médio de 250g, foram distribuídos em 6 grupos. Grupo Salina (n=6): os animais receberam apenas 2 ml de salina (i.v.) nos mesmos tempos do grupo salina e trauma; Grupo Salina e trauma (n=6): os animais receberam salina 30 minutos antes do trauma muscular e novamente às 6 e 12 horas depois do trauma. Grupo Dexametasona (n=6): os animais receberam 2 doses de Dexametasona 2mg/kg i.p. nos mesmos tempos do grupo Dexametasona e trauma; Grupo Dexametasona e trauma (n=6): os animais receberam 2 doses, 2 horas antes da ocorrência do trauma e 10 horas depois do trauma, esse grupo foi utilizado como controle positivo. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia tribromethanol 2,5% (1 ml/100g de peso do animal). A operação de indução do trauma foi realizada na coxa do animal e toda musculatura foi descolada desde o joelho até a articulação do quadril. Após 24 h do trauma, retiraram-se os pulmões para avaliar mieloperoxidase (MPO), glutathione (GSH), infiltração neutrofílica, congestão, edema, necrose e hemorragia. No plasma foi dosado apenas GSH. Observou-se que o trauma muscular mostrou ser capaz de induzir LAP por promover uma redução significativa GSH ($8,53 \pm 1,22$ versus $18,87 \pm 7,35$ p <0,01), aumento significativo na atividade de MPO ($23,96 \pm 4,86$ versus $24,50 \pm 7,45$ p <0,001), do infiltrado neutrofílico ($71,00$ versus $19,64 \pm 28,50 \pm 7,63$ p <0,001), no grau de congestão, edema, necrose, hemorragia (p <0,01), quando comparamos com grupo salina sem trauma. No grupo Dexametasona e trauma quando comparado ao grupo salina e trauma, a Dexametasona um inibidor do gene inflamatório, foi capaz de modular a resposta inflamatória em quase todos os parâmetros avaliados. Posteriormente avaliou-se o efeito da L-alanil-glutamina (L-Ala-Gln) sobre a lesão aguda pulmonar induzida por trauma muscular cirúrgico. 24 h após o trauma comparou-se o grupo tratado com L-Ala-Gln e trauma (n=6) com o grupo salina e trauma e verificou-se que a L-Ala-Gln promoveu uma redução estatisticamente significativa na infiltração neutrofílica ($71,00$ versus $19,64 \pm 28,50 \pm 7,63$ p <0,001), na atividade de MPO ($23,96 \pm 4,86$ versus $12,90 \pm 2,01$, p <0,001), e um aumento significativo na concentração de GSH ($36,79 \pm 7,31$ versus $8,53 \pm 1,22$ p <0,001) no pulmão. Na avaliação histopatológica também foi observada uma redução significativa (p < 0,01) no grau de edema, hemorragia e necrose no tecido pulmonar nos grupos acima avaliados. Os possíveis mecanismos para justificar os efeitos da L-Ala-Gln em modular a resposta inflamatória no pulmão deve-se ao fato da glutamina ser precursora de glutathione, funciona como substrato energético para células do sistema imune, aumenta as expressões de proteínas de choque térmico (HSP) e impede a infiltração neutrofílica. Esses resultados sugerem que o tratamento com L-Ala-Gln tem potencial para reduzir o processo inflamatório agudo no pulmão induzido por trauma muscular esquelético cirúrgico.

Palavras chaves: Lesão pulmonar, Cirurgia, Glutamina. Ratos.

ABSTRACT

L-ALANYL-GLUTAMINA IN EXPERIMENTAL MODEL OF ACUTE LUNG INJURY INDUCED BY SKELETAL MUSCLE TRAUMA. MÁRCIA ANDRÉA DA SILVA CARVALHO SOMBRA. (Doctorate) Thesis. *Stricto Sensu* Post-Graduate Program for PhD in Surgery. Supervisor: Professor Doctor Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

In this study we aimed to validate a model of acute lung injury (ALI) induced by surgical muscle trauma, which attempts to reproduce the conditions of a skeletal muscle trauma that occurs in humans and, therefore, to provide a better understanding of this disease and its treatments' alternatives. In the first step we evaluated the effect of the experimental model. Thirty-six male Wistar rats with average weight of 250g, were divided into 6 groups. In the first step we evaluated the effect of the experimental model. Saline Group (n = 6): animals received 2 ml of saline (i.v) at the same times of the Saline and trauma group; Saline and Trauma Group (n = 6): animals received saline 30 minutes before the induction of muscle trauma and again at 6 and 12 hours after the trauma; Dexamethasone Group (n = 6): animals received 2 doses of dexamethasone 2 mg / kg (i.p) at the same times of Dexamethasone and Trauma Group; Dexamethasone and Trauma Group (n = 6): animals received 2 doses, 2 hours before the occurrence of trauma and 10 hours after the trauma - this group was used as positive control. Surgical procedures were performed under anesthesia of tribromethanol 2.5% (1 ml/100g body weight). The induced trauma surgery was performed in the thigh of the animal and every muscle was detached from the knee to the hip joint. After 24 h of injury, the lungs were retreated to evaluate myeloperoxidase (MPO), glutathione (GSH), neutrophil infiltration, congestion, edema, necrosis and hemorrhage. In plasma only GSH was measured. It was observed that the muscle trauma was shown to induce ALI by promoting a significant reduction in GSH (8.53 ± 1.22 versus 18.87 ± 7.35 p <0.01) and a significant increasing activity of MPO (23.96 ± 4.86 versus 24.50 ± 7.45 p <0.001), neutrophil infiltration (71.00 versus $19.64 \pm 28.50 \pm 7.63$ p <0.001), degree of congestion, edema, necrosis and hemorrhage (p <0.01), when compared with Saline Group without trauma. In Dexamethasone and Trauma Group, when compared to Saline and Trauma Group, Dexamethasone, by being an inhibitor of inflammatory gene, was able to modulate the inflammatory response in almost all parameters. Subsequently we evaluated the effect of L-alanyl-glutamine (L-Ala-Gln) on acute lung injury induced by muscle trauma surgery. 24 h after trauma it was made a comparison between the group treated with L-Ala-Gln and trauma (n = 6) and the saline and trauma group, and it was found that L-Ala-Gln promoted a statistically significant reduction in neutrophil infiltration (19.64 ± 71.00 versus 28.50 ± 7.63 p <0.001), in MPO activity (23.96 ± 4.86 versus 12.90 ± 2.01 , p <0.001) and a significant increase in concentration of GSH (36.79 ± 7.31 versus 8.53 ± 1.22 p <0.001) in the lung. In histopathological evaluation it was also observed a significant decrease (p <0.01) in the degree of edema, hemorrhage and necrosis in lung tissue of the evaluated groups above. The possible mechanism to justify the observed effects could be that glutamine enhanced glutathione levels, the energy substrate for immune cells, and, additionally, increased the expression of heat shock proteins (HSP) and, as such, prevented the infiltration of neutrophils in tissues. These results suggest that the Ala-Gln treatment has the potential to reduce the inflammatory reaction that was installed in lungs after skeletal muscle trauma.

Key-words: Lung injury. Surgery. Glutamine. Rats.

LISTA DE FIGURAS

1 – Esquema da distribuição dos animais nos diversos grupos de estudo.	30
2 – Quadro de distribuição dos grupos de estudo, número de animais, tratamentos e concentrações das soluções, material a ser coletado e substâncias a serem analisadas.	30
3 – Delineamento temporal do experimento referente ao tratamento com salina ou L-Alanil-Glutamina.	31
4 – Delineamento temporal do experimento referente ao tratamento de Dexametasona.	31
5 – Procedimento de administração dos tratamentos pela via intravenosa.	32
6 – Indução do modelo experimental do trauma muscular.	33
7 – Sutura da pele e anti-sepsia após indução do trauma.	33
8 – Técnica de lavagem do pulmão.	35
9 – Quantificação da atividade de mieloperoxidase no pulmão nos grupos tratados com salina sem trauma e nos grupos tratados com salina e Dexametasona ambos submetidos ao trauma.	40
10 – Avaliação neutrófilica em tecido pulmonar de ratos comparando-se os grupos tratados com salina sem trauma e os grupos tratados com salina e Dexametasona ambos submetidos ao trauma.	41
11 – Quantificação da concentração de glutathiona no pulmão dos grupos tratados com salina sem trauma, salina e Dexametasona ambos submetidos ao trauma.	42
12 – Quantificação da concentração de glutathiona no plasma dos grupos tratados com salina sem trauma, salina e Dexametasona ambos submetidos ao trauma.	43
13 – Avaliação histopatológica do grau de congestão no pulmão de ratos dos grupos tratados com salina sem trauma e nos grupos tratados com salina ou Dexametasona ambos submetidos ao trauma.	45
14– Avaliação histopatológica do grau de edema no pulmão de ratos dos grupos tratados com salina sem trauma e nos grupos tratados com salina ou Dexametasona ambos submetidos ao trauma.	45
15– Avaliação histopatológica do grau de hemorragia no pulmão de ratos dos grupos tratados com salina sem trauma e nos grupos tratados com salina ou Dexametasona ambos submetidos ao trauma.	46
16 – Avaliação histopatológica do grau de necrose no pulmão de ratos dos grupos	47

tratados com salina sem trauma e nos grupos tratados com salina ou Dexametasona ambos submetidos ao trauma.

- 17 – Fotomicrografia de pulmões de ratos. No grupo tratado com salina e não submetido a trauma muscular. No grupo tratado com salina e submetido a trauma muscular e no grupo tratado com Dexametasona e submetido a trauma muscular. 48
- 18 – Quantificação da atividade de mieloperoxidase no pulmão dos grupos tratados com salina, l-alanil-glutamina ou Dexametasona submetidos e não submetidos ao trauma. 50
- 19 – Representação da contagem do número de neutrófilos registrados em cinco campos por lâmina de tecido pulmonar dos grupos tratados com salina, L-alanil-glutamina ou Dexametasona submetidos e não submetidos ao trauma. 51
- 20 – Representação das concentrações de GSH no pulmão de ratos submetidos e não submetidos ao trauma e tratados com salina, L-alanil-glutamina ou Dexametasona. 52
- 21 – Representação das concentrações de GSH no plasma de ratos submetidos e não submetidos ao trauma e tratados com salina, L-alanil-glutamina ou Dexametasona. 53
- 22 – Avaliação histopatológica do grau de congestão nos pulmões de ratos submetidos e não submetidos a trauma e tratados com salina, L-alanil-glutamina ou Dexametasona 55
- 23 – Avaliação histopatológica do grau de edema nos pulmões de ratos submetidos e não submetidos a trauma e tratados com salina, L-alanil-glutamina ou Dexametasona. 56
- 24 – Avaliação histopatológica do grau de hemorragia nos pulmões de ratos submetidos e não submetidos a trauma e tratados com salina, L-alanil-glutamina ou Dexametasona. 58
- 25 – Avaliação histopatológica do grau de necrose nos pulmões de ratos submetidos e não submetidos a trauma e tratados com salina, L-alanil-glutamina ou Dexametasona. 59
- 26 – Fotomicrografias de pulmões de ratos. Grupos tratados com salina, L-alanil-glutamina e Dexametasona, submetidos ou não a trauma muscular. 61

LISTA DE TABELAS

1 – Atividade da mieloperoxidase (MPO) no pulmão comparando-se os grupos salina e trauma com salina (controle), Dexametasona com salina, ambos submetidos ao trauma.	39
2 – Contagem de neutrófilos registrados em tecido pulmonar comparando-se os grupos salina e trauma com salina sem trauma (controle), Dexametasona com salina, ambos submetidos ao trauma.	41
3 – Concentração de glutathione no pulmão comparando-se os grupos salina e trauma com salina sem trauma (controle), Dexametasona com salina ambos submetidos ao trauma.	42
4 – Concentração de glutathione no plasma comparando-se os grupos salina e trauma com salina sem trauma (controle), Dexametasona com salina ambos submetidos ao trauma.	43
5 – Avaliação do grau de congestão no pulmão comparando-se os grupos salina e trauma com salina (controle), Dexametasona com salina ambos submetidos ao trauma.	44
6 – Avaliação do grau de edema intersticial no pulmão comparando-se os grupos salina e trauma com salina (controle), Dexametasona com salina ambos submetidos ao trauma.	45
7 – Avaliação do grau de hemorragia no pulmão comparando-se os grupos salina e trauma com salina (controle), Dexametasona com salina ambos submetidos ao trauma.	46
8 – Avaliação do grau de necrose no pulmão comparando-se os grupos salina e trauma com salina (controle), Dexametasona com salina ambos submetidos ao trauma.	47
9 – Atividade da mieloperoxidase (U MPO/mg) no pulmão de ratos comparando-se os grupos tratados com salina, L-alanil-glutamina, Dexametasona submetidos ao trauma com os grupos não submetidos.	49
10 – Número de neutrófilos registrados em cinco campos por lâmina de tecido pulmonar de ratos não submetidos a trauma muscular comparando-se os grupos submetidos e tratados com salina, L-alanil-glutamina ou Dexametasona.	51
11 – Concentrações de GSH ($\mu\text{mo/g}$) no pulmão de ratos comparando-se os grupos submetidos a trauma muscular e não submetidos tratados com salina, L-alanil-glutamina ou Dexametasona.	52
12 – Concentrações de GSH ($\mu\text{Mol/ml}$) no plasma de ratos submetidos a trauma muscular comparando-se os grupos não submetidos e tratados com salina, L-alanil-glutamina, ou Dexametasona.	53

13 – Avaliação do grau de congestão no pulmão de ratos comparando-se os grupos tratados com salina, L-alanil-glutamina ou Dexametasona submetidos ao trauma com os grupos não submetidos.	54
14 – Avaliação do grau de edema intersticial no pulmão de ratos comparando-se os grupos tratados com salina, L-alanil-glutamina ou Dexametasona submetidos ao trauma com os grupos não submetidos.	56
15 – Avaliação do grau de hemorragia no pulmão de ratos comparando-se os grupos tratados com salina, L-alanil-glutamina ou Dexametasona submetidos ao trauma com os grupos não submetidos.	57
16 – Avaliação do grau de necrose no pulmão de ratos comparando-se os grupos tratados com salina, L-alanil-glutamina ou Dexametasona submetidos ao trauma com os grupos não submetidos.	59
17 – Efeito da L-alanil-glutamina e da Dexametasona sobre os escores histopatológicos para lesão pulmonar em ratos comparando-se os grupos submetidos ao trauma com os não submetidos.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	aminoácido
ACTH -	Hormônio adrenocorticotrópico
ARDS -	Síndrome da doença respiratória aguda
ATP -	Adenosina trifosfato
CAMs -	Moléculas de adesão celular
ERO	Espécie reativa do oxigênio
GABA	Ácido gama - amino butírico
Gln -	Glutamina
GSH -	Glutathiona reduzida
HSP -	Proteína de choque térmico
HOCl -	Ácido hipocloroso
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
i.p -	intraperitoneal
i.v -	intravenosa
L-Ala-Gln	L-alanil-glutamina
LAP-	Lesão aguda pulmonar
LBA -	Lavado broncoalveolar
LFA-1	Antígeno associado à função leucocitária-1
LPS -	Lipopolissacarídeo
MPO -	Mieloperoxidase
NADPH -	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo-Fosfato reduzido
NH ₂	Amina
SNC -	Sistema nervoso central
PAF -	Fator de ativação plaquetária

PECAM-1	Molécula de adesão plaqueta-célula endotelial
PMNs -	Polimorfonucleares
PVPI -	Polivinilpirrolidona
SARA -	Síndrome da angústia respiratória aguda
SIRS -	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1.	Alterações inflamatórias em resposta ao trauma.....	17
1.2.	Aspectos gerais do processo inflamatório agudo.....	21
1.3.	Glutamina em situação de estresse inflamatório.....	23
2	OBJETIVO.....	26
3	MÉTODO.....	27
3.1.	Amostra.....	27
3.2.	Delineamento do estudo.....	27
3.3.	Procedimento anestésico.....	30
3.4.	Procedimento de preparação e administração das drogas.....	31
3.5.	Modelo experimental do trauma muscular.....	32
3.6.	Coleta do material para análise.....	33
3.6.1.	Coleta de sangue.....	33
3.6.2.	Coleta do tecido pulmonar.....	34
3.7.	Técnica Laboratorial.....	35
3.7.1.	Processamento histológico e critérios para análise histológica do pulmão.....	35
3.7.2.	Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....	36
3.7.3.	Determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos (glutathiona-GSH).....	37
3.8.	Análise Estatística.....	38
4	RESULTADOS.....	39
4.1.	Validação do modelo de lesão aguda pulmonar induzida por trauma muscular cirúrgico.....	39
4.1.1.	Avaliação do efeito do trauma na atividade da enzima mieloperoxidase (U MPO/mg) no tecido pulmonar de ratos tratados com salina ou Dexametasona.....	39
4.1.2.	Avaliação do efeito do trauma no infiltrado neutrofílico em tecido pulmonar de ratos tratados com salina ou Dexametasona.....	40
4.1.3.	Avaliação do efeito do trauma na concentração de Glutathiona ($\mu\text{mol/g}$) no tecido pulmonar de ratos tratados com salina ou Dexametasona.....	41
4.1.4.	Avaliação do efeito do trauma na Concentração de Glutathiona ($\mu\text{mol/mL}$) no plasma de ratos tratados com salina ou Dexametasona.....	42
4.1.5.	Avaliação do efeito do trauma na análise do parâmetro histopatológico congestão em tecido pulmonar de ratos tratados com salina ou Dexametasona.....	43
4.1.6.	Avaliação do efeito do trauma na análise do parâmetro histopatológico edema intersticial em tecido pulmonar de ratos tratados com salina ou Dexametasona.....	45
4.1.7.	Avaliação do efeito do trauma na análise do parâmetro histopatológico hemorragia em tecido pulmonar de ratos tratados com salina ou Dexametasona.....	46

4.1.8.	Avaliação do efeito do trauma na análise do parâmetro histopatológico necrose em tecido pulmonar de ratos tratados com salina ou Dexametasona.	47
4.2.	Avaliação do efeito da L-alanil-glutamina na lesão aguda pulmonar induzida por trauma muscular cirúrgico	49
4.2.1.	Efeito da L-alanil-glutamina e da Dexametasona nas dosagens da atividade enzimática de mieloperoxidase (U MPO/mg) no tecido pulmonar de ratos.....	49
4.2.2.	Efeito da L-alanil-glutamina e da Dexametasona na contagem do número de neutrófilos em tecido pulmonar de ratos.	50
4.2.3.	Efeito da L-alanil-glutamina e da Dexametasona sobre as concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$) no pulmão de ratos.	51
4.2.4.	Efeito da L-alanil-glutamina e da Dexametasona sobre as concentrações de GSH ($\mu\text{mol/mL}$) no plasma de ratos.	53
4.2.5.	Efeito do tratamento da L-alanil-glutamina ou da Dexametasona sob o grau de congestão avaliado no pulmão de ratos.	54
4.2.6.	Efeito do tratamento da L-alanil-glutamina ou da Dexametasona sob o grau de edema intersticial avaliado no pulmão de ratos.....	55
4.2.7.	Efeito do tratamento da L-alanil-glutamina ou da Dexametasona sob o grau de hemorragia avaliado no pulmão de ratos.....	57
4.2.8.	Efeito do tratamento da L-alanil-glutamina ou da Dexametasona sob o grau de necrose avaliado no pulmão de ratos.....	58
5	DISCUSSÃO.....	62
6	CONCLUSÃO.....	71
7	REFERÊNCIAS	72
8	APÊNDICE A – MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	80
9	APÊNDICE B – Curva padrão para cálculo da atividade da enzima de mieloperoxidase (MPO)	82
10	APÊNDICE C – Curva padrão para cálculo da concentração de glutathione (GSH) ..	83
11	APÊNDICE D – Dados Brutos	84
	ANEXO A – Declaração do Comitê de Ética em Pesquisa Animal.....	88
	ANEXO B – Participação em congresso e premiação.....	89

1 INTRODUÇÃO

1.1. Alterações inflamatórias em resposta ao trauma

O trauma é uma das principais causas de morte na população, ocupando o terceiro lugar se consideradas todas as idades, sendo a primeira na faixa etária até os 44 anos de vida. Os pacientes vítimas de lesões traumáticas graves podem evoluir para um estado inflamatório generalizado com séria repercussão sistêmica (SGARBI, 2005).

O sistema músculo-esquelético dos mamíferos é, proporcionalmente, o de maior peso e massa tecidual do organismo. As lesões nesse sistema, na fase aguda, não estão diretamente relacionadas à morte e, muitas vezes, o seu tratamento aguarda a resolução cirúrgica (SGARBI, 2005). A lesão da célula muscular está associada à liberação maciça de íons cálcio e potássio, proteínas como a mioglobina, radicais livres, leucotrienos bem como retenção de líquido no espaço extracelular, os quais podem causar alterações cardio-respiratórias, renais e choque hipovolêmico (MICHAELSON, 1992). Esses mecanismos são desencadeados imediatamente após o trauma e podem interferir negativamente na evolução do paciente (SGARBI; SILVA JÚNIOR; HUNGRIA NETO, 2006). Entretanto, um fator ainda não claramente definido é o papel da lesão músculo-esquelética na resposta sistêmica do organismo.

O trauma cirúrgico pode induzir um estado generalizado de imunodepressão e mudanças fisiológicas profundas que são caracterizadas pelo hipermetabolismo, lipólise acelerada e alterações no metabolismo das proteínas e nos níveis de glicose. Estas anormalidades metabólicas acontecem principalmente em decorrência da secreção de hormônios e mediadores inflamatórios produzidos por células do sistema imune e por uma variedade de outros tecidos (YEH *et al.*, 2005). Com os avanços da medicina e da biologia molecular tornou-se possível caracterizar estas reações inflamatórias, as quais são iniciadas logo após o trauma cirúrgico (GRANGER; KUBES, 1994; GIANNOUDIS *et al.*, 2002).

A resposta imuno-inflamatória inicia-se, portanto, imediatamente após o trauma e torna-se o cenário em que leucócitos polimorfonucleares (PMNs), células endoteliais, macrófagos e linfócitos, se modificam por ativação a partir da secreção de vários mediadores, como as interleucinas e outras moléculas: óxido nítrico, fator de ativação plaquetária (PAF), radicais livres e fatores de crescimento (CIPOLLE; PASQUALE; CERRA, 1993).

Estudos relacionam principalmente a ação das interleucinas com a indução da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) pós-trauma (FOEX, 1999). As interleucinas são definidas como polipeptídeos que apresentam uma ação moduladora da resposta imunoinflamatória. Elas podem apresentar ação sobre a própria célula produtora (atividade autócrina) ou agir sobre as células vizinhas (atividade parácrina) e, por último, ter ação em órgãos distantes da região em que foi produzida (atividade endócrina) (GIANNOUDIS et al, 2004). Admite-se uma classificação adicional em quimiocinas e citocinas. As quimiocinas teriam uma ação principal como fator quimiotático na sinalização para a infiltração tecidual e intersticial de células leucocitárias; as citocinas teriam uma ação predominante sobre as células inflamatórias modificando e regulando suas respostas. As interleucinas têm ação no local da inflamação, porém, em algumas situações podem passar à corrente sanguínea e terem ação sistêmica (SGARBI; SILVA JÚNIOR; HUNGRIA NETO, 2006).

A resposta inflamatória sistêmica do organismo (SRIS) ou estado inflamatório sistêmico, é uma entidade clínica bem definida, que pode ocorrer em decorrência de diversos tipos de agressões, como grandes cirurgias, traumas, queimaduras, sepse, choque prolongado, hipotermia profunda e circulação extracorpórea, causando altas taxas de mortalidade nos pacientes quando não controlada (MEERAN, 2001; TSUDA *at al.*, 2004; YEH, *at al.*, 2005).

Um estudo proposto por Waitzberg, em 2001, relatou a ação das citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 e seu papel patogênico após um estímulo traumático. O fator de necrose tumoral (TNF- α) e a IL-1 estimulam uma série de outros mediadores biológicos que ocasionam neutrofilia, inflamação, ações mitogênica e angiogênica, lipólise, febre, hematopoese e proteólise. A IL-1 induz a liberação do conteúdo dos grânulos específicos de neutrófilos e também é responsável pela indução de outras interleucinas como a IL-6. A IL-6 está fortemente relacionada à produção e liberação das proteínas ou reagentes de fase aguda das células hepáticas (proteína reativa C) e expressão de selectinas, além de estimular a produção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), que promove alteração no metabolismo dos carboidratos, de proteínas e gorduras e, conseqüentemente, o aparecimento de um estado hiperglicêmico. A IL-8, outra interleucina pró-inflamatória, é um potente agente quimiotático para neutrófilos e outros leucócitos, fazendo com que eles migrem ativamente para o sítio da lesão.

Para contrabalançar os efeitos indesejáveis das citocinas pró-inflamatórias existe um sistema de regulação por glicosaminoglicanos de membranas em células endoteliais ligados à superfície celular, que mantêm essas interleucinas armazenadas e concentradas no local da região afetada. Um estímulo traumático promove uma perturbação no equilíbrio entre

as citocinas pró- e anti-inflamatórias. O sistema de contenção que normalmente mantém as citocinas pró-inflamatórias confinadas não mais funciona ou torna-se menos eficaz, fazendo com que seus níveis sistêmicos aumentem. O aumento da concentração sérica das interleucinas pró-inflamatórias no organismo é esperado em grandes cirurgias, e complicações ocorrem se este aumento for exacerbado (MOURA; POMERANTZEFF; GOMES, 2001).

Múltiplas alterações nas funções inflamatórias têm sido demonstradas em situações clínicas e experimentais logo após trauma. Lesões traumáticas, dependendo da sua magnitude, podem levar a uma inflamação sistêmica. Contudo, se esta resposta inflamatória for exagerada ou perpetuada, os pacientes entram em um estado moderado ou grave de SIRS, quando então vários órgãos podem ser afetados. Primeiramente ocorre o comprometimento pulmonar, depois outros órgãos como os rins, coração, fígado e cérebro (FAYMONVILLE, 1991). A presença de uma lesão aguda inflamatória no pulmão aparece geralmente dentro de 24 a 48 horas pós-trauma, podendo mesmo evoluir para a síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA). Sua duração e intensidade podem variar consideravelmente de paciente para paciente (DAVID; KAUFMAN, 2006).

Na lesão aguda pulmonar estudos demonstraram que os neutrófilos migram rapidamente para o parênquima pulmonar depois de um choque hipovolêmico, SIRS, sepse, isquemia com reperfusão do intestino. Os neutrófilos são importantes componentes da resposta inflamatória que caracteriza a lesão aguda pulmonar (ABRAHAM, 2003; GIANNOUDIS, 2003).

Matute-Bello, Frevert e Martins (2008), relataram em seus estudos a importância central dos neutrófilos na patogênese da lesão pulmonar observada em vários modelos experimentais de lesão aguda pulmonar induzida por endotoxina bacteriana (lipopolissacarídeo), hiperóxia, aspiração de ácido, isquemia/reperfusão e ligação com perfuração do ceco. Neutrófilos polimorfonucleares ativados por interações leucócito-endoteliais produzem mediadores químicos como radicais livres (espécies reativas do oxigênio), proteases, mediadores vasoativos derivados do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos), os quais causam alterações microvasculares no fluxo sanguíneo e aumento da permeabilidade endotelial com conseqüente infiltração de neutrófilos para o interstício pulmonar, por sua vez causando uma lesão tecidual aguda de natureza inflamatória (ABRAHAM, 2003; GREGA *et al.*, 2004).

Os neutrófilos sozinhos, entretanto, não são suficientes para causar lesões pulmonares intersticiais agudas, mas suas interações com citocinas pró-inflamatórias e com células endoteliais e/ou epiteliais (alveolares) ativadas ou danificadas constituem os

elementos chaves que agem em conjunto para produzir a disfunção pulmonar por dano tecidual citotóxico difuso. Segundo Goodman *et al.* (2003), a depleção ou o bloqueio do recrutamento de neutrófilos atenua a lesão pulmonar.

A lesão pulmonar aguda (LPA) e a sua forma mais grave, a síndrome da angústia respiratória aguda (SARA), são definições de insuficiência respiratória aguda causada por um dano difuso do parênquima pulmonar, depois de horas ou dias, em geral decorrentes de agressões locais ou sistêmicas (WANG; BODENSTEIN; MARKSTALLER, 2008). Apesar dos grandes avanços na compreensão da patogênese da LPA / SARA e na medicina de cuidados intensivos, as taxas de mortalidade persistem entre 40 e 60% (ROCCO; ZIN, 2005).

A lesão pulmonar aguda caracteriza-se por lesão do endotélio capilar e do epitélio pulmonar com resposta inflamatória aguda intersticial e conseqüente perda da integridade da membrana alvéolo-capilar. Em geral, sua patogênese consiste em duas vias: a primeira considera os efeitos diretos de uma lesão nas células epiteliais pulmonares, e a segunda, uma resposta inflamatória sistêmica que inclui componentes celulares e humorais e tecidos-alvo (ANTONIAZZI *et al.*, 1998).

A resposta celular envolve neutrófilos, macrófagos/monócitos e linfócitos, os quais têm um papel importante no processo que ativa complexas e cruciais interações leucócito-endoteliais mediadas por pares complementares de moléculas de adesão (selectinas/mucinas e integrinas/imunoglobulinas de membrana endotelial). Os eventos envolvidos na resposta inflamatória sistêmica incluem alterações plasmáticas (sistema complemento, coagulação/fibrinólise e cininas), mediadores gerados por células efetoras ativadas (citocinas, mediadores lipídicos prostanóides, espécies reativas do oxigênio, proteases ácidas e neutras, óxido nítrico e neuropeptídeos) e indução de síntese protéica por ativação do fator nuclear NF-kB, sendo, portanto, o estágio precoce na produção de citocinas pró-inflamatórias (CONTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2008).

Em 1994, “The American-European Consensus Conference on ARDS” classificou como lesão direta (pulmonar ou primária) eventos que afetam diretamente o parênquima pulmonar como: aspiração, inalação tóxica, toxicidade pelo oxigênio, embolia gordurosa e infecção pulmonar bacteriana ou viral. A lesão indireta (extrapulmonar ou secundária) é resultante de uma resposta sistêmica inflamatória como a sepse e trauma (ANTONIAZZI, *et al.*, 1998).

As lesões agudas no pulmão podem ser investigadas mediante modelos experimentais que envolvem: fratura de fêmur, hiperóxia, aspiração de ácido, lavagem com salina, isquemia e reperfusão, injeção de ácido oléico ou lipopolissarídeos (TIMILIN *et al.*,

2004; MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTINS, 2008; WANG; BODENSTEIN; MARKSTALLER, 2008).

1.2. Aspectos gerais do processo inflamatório agudo

Inflamação é a reação de um tecido e de sua microcirculação a uma lesão patogênica. Caracteriza-se pela produção de mediadores inflamatórios e movimentação de líquido, proteínas e leucócitos do sangue para os tecidos extravasculares. As células leucocitárias, no contexto da resposta inflamatória, são classificadas em dois grupos: linfomononucleares (linfócitos, monócitos e macrófagos) e polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos). Na inflamação aguda ocorre um aumento de duas a três vezes no número de leucócitos no sangue periférico, sendo que os neutrófilos são quase sempre as células predominantes (leucocitose com neutrofilia) (RUBI; FARBER, 2002).

Marginação leucocitária e migração transendotelial referem-se ao conjunto de etapas das complexas interações leucócito-endoteliais que resultam no egresso dos leucócitos do lúmen dos vasos sanguíneos microcirculatórios para a matriz conectiva intersticial. Essa migração ocorre em condições fisiológicas normais. Entretanto, é acentuadamente magnificada, no sítio da lesão, na presença de um estímulo inflamatório de natureza quimiotático. O acúmulo de neutrófilos ativados no espaço intersticial dos compartimentos extravasculares pode ocasionar lesão tecidual em decorrência da abundante liberação de substâncias tóxicas como proteases, mediadores lipídicos derivados do metabolismo do ácido araquidônico e espécie reativas de oxigênio, resultando no desenvolvimento ou agravamento de doenças por dano tecidual neutrófilo-induzido (CONTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2008). No pulmão, a migração celular transendotelial com intensa infiltração do tecido intersticial da membrana alvéolo-capilar por neutrófilos está relacionada com a patogenia de doenças inflamatórias como a lesão aguda pulmonar e a SARA (VALOIS, 2006).

A reação inflamatória aguda representa um conjunto de eventos microcirculatórios e celulares que ocorre no sítio da lesão e nas regiões próximas, desencadeada e modulada por fatores neurais, vasculares, humorais, celulares e hormonais (VOLTARELLI, 1994). O processo inflamatório é inicialmente caracterizado pela agregação de numerosos polimorfonucleares neutrófilos no leito microvascular expandido e congesto, no local da lesão. Normalmente, em condições hemodinamicamente fisiológicas, os neutrófilos

encontram-se na região mais central da coluna de sangue nos vasos da microcirculação. Fatores produzidos pelo endotélio como as moléculas de adesão intercelular (ICAM-1 e VCAM-1) e *selectinas* P e E, fazem com que os neutrófilos, ao deixarem a região central do fluxo sanguíneo, lentificado pela estase venular, sejam deslocados para a periferia da corrente sanguínea (marginação leucocitária). Essa aproximação dos neutrófilos com as células endoteliais ativadas e aderentes, é marcada, também, pela expressão na superfície leucocitária das moléculas de adesão (*L-selectinas*) e de integrinas transmembranas ativadas e com grande avidéz de interação com ligantes da família das imunoglobulinas à nível endotelial. O resultado final destes eventos celulares (leucócitos e células endoteliais ativadas por citocinas e quimiocinas) da reação inflamatória aguda é ensejar uma adesão firme dos neutrófilos à célula endotelial, qualificando-os aos fenômenos subseqüentes da transmigração e quimiotaxia (SGARBI, 2005).

Quatro etapas podem ser observadas durante a rolagem e a migração transendotelial dos neutrófilos, são elas: 1- marginação, onde os neutrófilos assumem uma posição periférica ao longo da superfície das células endoteliais (modificações hemodinâmicas decorrentes da congestão, aumento de permeabilidade e estase microvascular); 2- captura e rolamento, onde ocorre adesão transitória dos neutrófilos ao endotélio (mediada por *selectinas*); 3- adesão firme, onde ocorre a firme união dos neutrófilos às células endoteliais (mediadas pelas integrinas e seus ligandos da família das imunoglobulinas: LFA-1/ICAM-1); 4- diapedese, mediada por moléculas de adesão tipo PECAM-1, onde ocorre a passagem ativa dos leucócitos por entre as células endoteliais, em direção à matriz intersticial do tecido conectivo (VALOIS, 2006).

Uma vez desencadeado todo o processo, o neutrófilo é dito “ativado”, o que significa um aumento da produção de enzimas intracelulares como a mieloperoxidase (MPO) e expressões de peptídeos e secreção de interleucinas, com função parácrina. O neutrófilo ativado apresenta uma modificação no seu metabolismo intermediário e passa a consumir avidamente oxigênio (“burst” respiratório) e glicose, ao mesmo tempo em que ocorre ativação da enzima multimolecular NADPH oxidase, com desacoplamento da cadeia de elétrons mitocondrial, havendo assim, um aumento na produção de espécie reativas de oxigênio. A reação entre o peróxido de hidrogênio, gerado pela dismutação de dois íons superóxidos (espécie reativa de oxigênio inicial), e o íon cloreto (hálido), sob a ação catalítica da MPO, forma o ácido hipocloroso (HOCl), poderoso agente oxidante e antimicrobiano. Este elemento químico tem intensa ação citotóxica contra microorganismo, porém, em

concentrações elevadas, pode causar dano tecidual (ROBBINS; CONTRAN, 2008; SGARBI, 2005).

Na etapa seguinte, após a infiltração neutrofílica dos tecidos, ocorre a aderência e migração de células inflamatórias da linhagem monocítica, com maior potencial fagocítico e de mobilização dos elementos fibroreparativos. Nos tecidos, os monócitos tornam-se macrófagos exsudativos, passam por graus crescentes de ativação celular e têm como principal atividade realizar imunofagocitose com lise intracelular de material desvitalizado ou estranho ao organismo. Ademais, fazem o processamento do material endocitado e potencialmente antigênico e podem funcionar como célula apresentadora de antígeno. Essas células inflamatórias podem produzir e secretar uma ampla gama de mediadores inflamatórios como interleucinas, quimiocinas, fatores de coagulação e fibrinolíticos, fatores de crescimento e angiogênicos, bem como proteases e metaloproteinases, enzimas que apresentam uma ação que modula a resposta inflamatória e promove o remodelamento tecidual (CONTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2008).

Na fase aguda da inflamação, alguns fenômenos merecem destaque a nível microscópico: a dilatação de arteríolas, capilares e vênulas, com aumento do fluxo sanguíneo regional e exudação protéica por aumento de permeabilidade vascular, seguida da migração de neutrófilos para o foco inflamatório tecidual. Esses fenômenos são orquestrados por um grande número de mediadores oriundos do plasma e de vários tipos celulares, formando assim uma rede de sinalização e de citocinas, seja de modo autócrino ou parácrino, ou mesmo, endócrino (NASCIMENTO, 2004). Tais cascatas de sinalização com liberação de ondas sucessivas de interleucinas (IL-1, TNF- α , IL-6, NO e outras) podem comprometer seriamente a perfusão tecidual sistêmica em decorrência da insuficiência microcirculatória e ocasionar falência de múltiplos órgãos (RUBIN; FABER, 2002).

1.3. Glutamina em situação de estresse inflamatório.

A glutamina (Gln) no corpo humano representa cerca de 20% do total dos aminoácidos livres no plasma e mais de 60% de *pool* de aminoácidos livres totais no músculo. Na sua composição química encontramos carbono (41,09%), hidrogênio (6,9%), oxigênio (32,84%) e nitrogênio (19,17%), possuindo peso molecular 146,15 KD, sendo o aminoácido mais abundante no plasma e nos tecidos (FONTANA; VALDES; VALDISSERA, 2003).

Dentre os órgãos envolvidos na síntese de glutamina podemos destacar o músculo esquelético, pulmões, fígado e possivelmente o tecido adiposo, os quais contêm atividade da enzima glutamina sintetase, que cataliza a conversão da glutamina a partir de amônia e glutamato, na presença de ATP. Os tecidos que são primariamente consumidores de glutamina são: células da mucosa intestinal, do túbulo renal e os leucócitos por possuírem elevada atividade da enzima glutaminase, responsável pela hidrólise da glutamina e conversão em glutamato e amônia (BORGES; ROGERO; TIRAPEGUI, 2008).

Os pulmões são geralmente vistos como órgãos de trocas gasosas, mas comprovadamente possuem um papel crucial na manutenção da homeostasia de aminoácidos, principalmente de glutamina. A glutamina é requerida para o desempenho funcional de vários órgãos, incluindo os pulmões, sendo que alterações no metabolismo deste aminoácido são características de doenças críticas. Por exemplo, após situações como trauma, infecções e cirurgias, os pulmões liberam grandes quantidades de glutamina na circulação sistêmica. Nessas condições, a liberação de glutamina e alanina pelos pulmões e músculos esqueléticos auxiliam a manter as concentrações circulantes de glutamina (CURI, 2000).

Em algumas condições como trauma, septicemia, câncer, esforço físico extremo, cirurgia e infecção, a concentração de glutamina intracelular e do plasma diminuem em até 50%, ocasionando um quadro de deficiência, posto que o consumo é maior que a produção. Por essa razão esse aminoácido é considerado condicionalmente essencial (WISCHMEYER, 2001). A glutamina é um importante aminoácido gliconeogênico por ser fonte energética para síntese de outras macromoléculas e por estar presente em muitas proteínas.

Entre as várias funções metabólicas da glutamina podemos citar: combustível metabólico para as células, está relacionada com a manutenção do equilíbrio ácido-básico, precursora de glutamato e GABA no SNC, doa (NH_2) para síntese de outros aa, como purinas e pirimidinas, e funciona como precursora de glutatona (ALVES, 2004; CURI, 2000; PACÍFICO, 2005).

Existem hipóteses que a deficiência da glutamina pode limitar tanto a produção de proteínas na resposta inflamatória como a síntese de glutatona, comprometendo as defesas antioxidantes do organismo (PACÍFICO, 2005). A GSH é composta de glicina, ácido glutâmico e cisteína atuando na proteção celular contra os efeitos tóxicos das espécies reativas de oxigênio (ERO). Sua síntese endógena depende dos estoques desses aminoácidos presentes nos diferentes órgãos como fígado, músculos, pulmões, rins, células do sistema imunológico, glóbulos vermelhos e do trato gastrointestinal. A GSH é produzida em todos os órgãos especialmente no fígado. Está em um estado de constante “turnover” metabólico. Em

situações de estresse o “turnover” da GSH aumenta como um mecanismo de defesa contra ERO produzidas por infecções, trauma, isquemia e reperfusão (GALERA, 2008).

Experimentos realizados *in vivo* têm dado nova luz ao papel da glutamina no adequado funcionamento da resposta inflamatória. Estudos realizados por Ockenga *et al.*, em 2002, demonstraram que a glutamina presente na nutrição parenteral de pacientes com pancreatite grave reduziu os níveis de IL-8 em comparação com os controles em condições clínicas similares, tal fato assume destaque quando sabe-se que a IL-8 contribui para uma resposta sistêmica inflamatória (DE BEAUX *et al.*, 1998). Wischmeyer *et al.*, (2001) relataram que a glutamina administrada via endovenosa reduz a concentração de proteína C reativa (PCR), em grandes queimados. Houdijk *et al.*, (1998) mostraram que a glutamina por via enteral reduz a concentrações de receptores solúveis de TNF- α no plasma em pacientes politraumatizados.

Num modelo experimental de doença inflamatória intestinal (colite), observou-se que a glutamina reduziu a atividade de mieloperoxidase e as concentrações de IL-8 e TNF- α no intestino inflamado, além de promover melhora do aspecto geral dos escores microscópicos da inflamação, como redução do infiltrado inflamatório celular (NASCIMENTO, 2004). A suplementação de Gln por via endovenosa demonstrou ser eficaz em reduzir os níveis plasmáticos de IL-8, concentração sérica de bactérias, e aumentar as expressões das proteínas de choque térmico citoprotetoras HSPs 27, 70, 72 em animais que receberam LPS (DING; LI, 2003; WISCHMEYER *et al.* 2001).

Modelos de lesão aguda pulmonar induzida por sepse, hiperóxia, isquemia e reperfusão demonstraram que a suplementação de Gln é capaz de exercer um efeito anti-inflamatório (HARKIN *et al.*, 2002; PERNG *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009). Desta forma, avaliou-se o efeito da L-alanil-glutamina na lesão aguda pulmonar induzida por trauma muscular.

Até o presente momento não foi relatado na literatura nenhum modelo de lesão aguda pulmonar induzida por trauma muscular cirúrgico, conferindo, assim, o ineditismo e relevância a esse estudo, que além de abordar um modelo de LAP, em que o trauma exerce um efeito remoto, possibilita um melhor entendimento da causa da doença e alternativas de prevenção.

2 OBJETIVO

Avaliar os efeitos da L-alanil-glutamina num modelo de lesão inflamatória aguda pulmonar induzida por trauma muscular esquelético.

3 MÉTODO

O projeto de pesquisa foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em pesquisa animal – CEPA, da Universidade Federal do Ceará, em 21 de setembro de 2007, sob o número 083/07, obedecendo às normas estabelecidas e preceitos do colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (Anexo A).

3.1. Amostra

Foram utilizados 36 ratos adultos saudáveis com idade variando entre 60 a 65 dias, machos (*Rattus norvegicus*: var. *albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*), pesando entre 200 a 300 g, da linhagem Wistar procedentes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará.

Os ratos foram aclimatados por um período de 7 dias antes da realização do experimento no Biotério do Departamento de Cirurgia, e albergados em caixas de plástico de polipropileno providas de grade metálica e forradas com raspa de madeira e mantidos em ciclo circadiano de claro/escuro, com 12 horas de luz, com baixa luminosidade, e 12 horas de escuridão, antes e após os procedimentos cirúrgicos, com temperatura variando entre 18 e 27 °C. Eles tiveram livre acesso à água e à ração *ad libitum*, próprias para a espécie antes e depois do experimento.

3.2. Delineamento do estudo

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará. Esse estudo compreende duas análises: na primeira, avaliou-se o efeito remoto do trauma muscular cirúrgico na indução de alterações inflamatórias agudas pulmonares, e na segunda avaliou-se o efeito da L-alanil-glutamina na resposta inflamatória aguda pulmonar após trauma muscular cirúrgico.

Trata-se de um estudo experimental, controlado e comparativo. Os 36 ratos foram distribuídos em seis grupos numericamente iguais (Figura 1):

O grupo **Salina**: constituído por 6 ratos, os quais foram anestesiados antes de serem tratados com 3 doses de salina, 2,0 ml via intravenosa, independente do peso do animal, administrada na veia femoral direita. Esse grupo não foi submetido a nenhum procedimento cirúrgico e os tempos de administração da salina foram os mesmos do grupo salina e trauma.

O grupo **Salina e trauma**: constituído por 6 ratos, os quais foram anestesiados antes dos tratamentos e procedimentos cirúrgicos. Eles receberam 2,0 ml de salina administrada na veia femoral direita, independente do peso do animal, 30 minutos antes da indução do trauma muscular, e novamente às 6 e 12 horas depois do trauma (Figuras 3).

O grupo **L-alanil-glutamina**: constituído por 6 ratos, que foram anestesiados antes dos tratamentos e receberam 3 doses de solução de L-alanil-glutamina 0,75g/Kg de peso corporal, completando-se para um volume de 2,0 ml com solução salina que foi administrada por via intravenosa na veia femoral direita, esse grupo não foi submetido nenhum procedimento cirúrgico. Os tempos de administração da L-alanil-glutamina foram os mesmos do grupo L-alanil-glutamina e trauma.

O grupo **L-alanil-glutamina e trauma**: constituído por 6 ratos que receberam 3 aplicações de solução de L-alanil-glutamina, pelo mesmo procedimento, mesmas doses e volumes do grupo L-alanil-glutamina sem trauma, 30 minutos antes da indução do trauma muscular, e novamente às 6 e 12 horas depois do trauma (Figura 3).

O grupo **Dexametasona (Dexa)**: constituído por 6 ratos, os quais receberam 2 administrações de Dexa na dose 2mg/kg i.p. Esse grupo não foi submetido ao procedimento de indução do trauma muscular, entretanto os tratamentos ocorreram nos mesmos tempos do grupo Dexametasona e trauma.

O grupo **Dexametasona e trauma**: constituído por 6 ratos, que foram anestesiados antes do procedimento cirúrgico de indução do trauma, e foram tratados com 2 doses de Dexametasona (2mg/kg i.p.), 2 horas antes da ocorrência do trauma e 10 horas depois da primeira dose. Esse grupo serviu de controle positivo para validação do modelo (Figura 4).

Passadas 24 horas da indução ou não indução do trauma os animais foram anestesiados e realizou-se coletas de amostras de tecidos pulmonar e sangue para realização das análises laboratoriais (Figura 2). O pulmão foi dividido em dois segmentos, uma parte foi para as dosagens da enzima mieloperoxidase (MPO) e concentrações de glutathione (GSH) e a segunda para avaliação histopatológica. No plasma sanguíneo foi dosada apenas a concentração de glutathione.

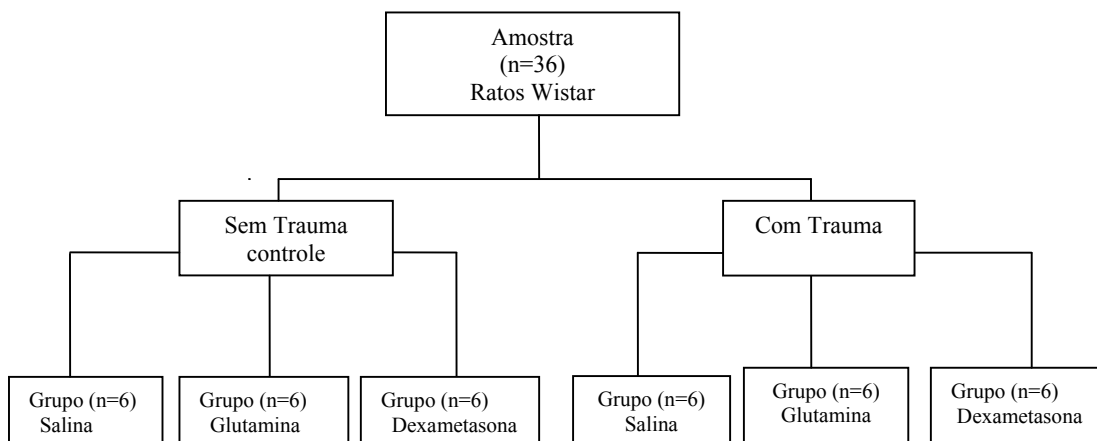


FIGURA 1- Esquema da distribuição dos animais nos diversos grupos de estudo.

Grupos	Substância Utilizada	Tempo de Pré-Tratamento	Procedimento	Tempo de Tratamento	Material Coletado*	Substâncias Dosadas
Salina (n=6)	Salina (i.v)	- 30 min	-	6 e 12 horas	Sangue e tecido pulmonar	GSH, MPO
Salina e trauma (n=6)	Salina (i.v)	- 30 min.	Trauma muscular	6 e 12 horas	Sangue e tecido pulmonar	GSH, MPO
L-Ala-Gln (n=6)	L-Ala-Gln 0,75 g/Kg (i.v)	- 30 min.	-	6 e 12 horas	Sangue e tecido pulmonar	GSH, MPO
L-Ala-Gln e trauma (n=6)	L-Ala-Gln 0,75 g/Kg (i.v)	- 30 min.	Trauma muscular	6 e 12 horas	Sangue e tecido pulmonar	GSH, MPO
Dexa (n=6)	Dexa 2 mg/Kg (i.p)	- 2 horas	-	10 horas	Sangue e tecido pulmonar	GSH, MPO
Dexa e trauma (n=6)	Dexa 2 mg/Kg (i.p)	- 2 horas	Trauma muscular	10 horas	Sangue e tecido pulmonar	GSH, MPO

Figura 2 – Quadro de distribuição dos grupos de estudo, número de animais, tratamentos e concentrações das soluções, tempo de tratamento, material a ser coletado e substâncias a serem analisadas. * Os ratos foram sacrificados 24 horas após o trauma e para os fins desta pesquisa o tempo corresponde ao trauma. Parte do tecido pulmonar foi para avaliação histopatológica.

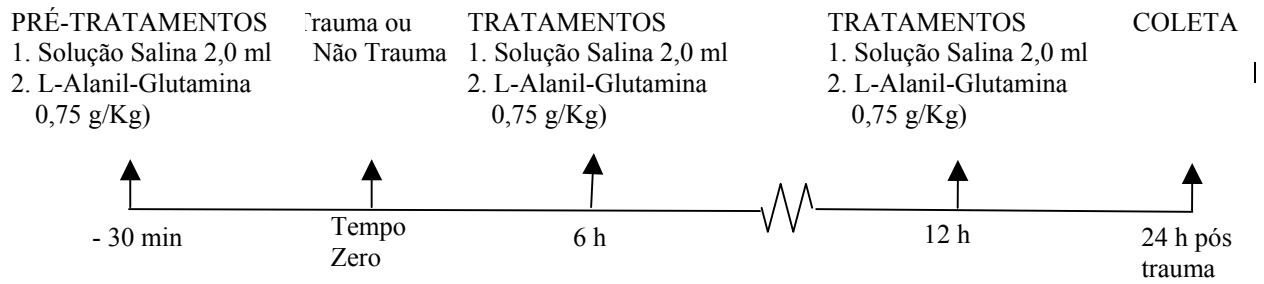


FIGURA 3 - Delineamento temporal dos experimentos referentes aos tratamentos de salina e L-Alanil-Glutamina.

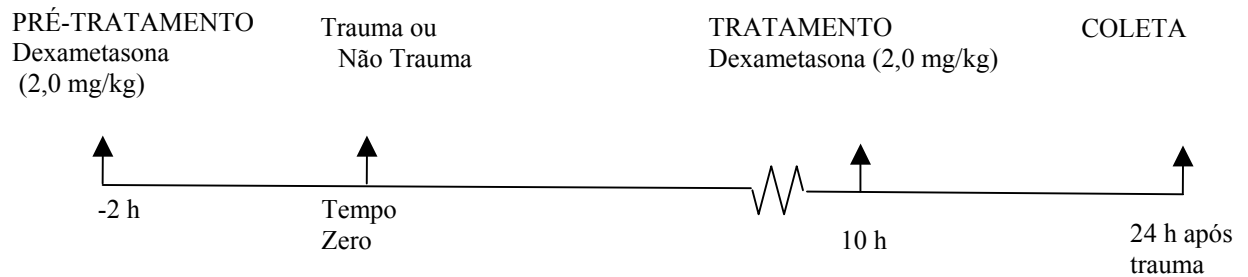


FIGURA 4 - Delineamento temporal do experimento referente ao tratamento de Dexametasona

3.3. Procedimento anestésico

Os animais foram pesados e submetidos à anestesia geral com injeção intraperitoneal de solução tribromethanol 2,5% na dose de (1 mL/100g de peso). Os ratos foram considerados anestesiados após a constatação da perda de reação aos estímulos mecânicos.

3.4. Procedimento de preparação e administração das drogas

A glutamina tem uma baixa solubilidade sendo instável se for exposta ao calor. Neste estudo, utilizou-se o Dipeptiven[®], do Laboratório Fresenius, uma solução altamente estável contendo dipeptídeo (L-alanil-glutamina), que é bastante solúvel em água e resistente ao calor, que tem sido largamente utilizado em pesquisas clínicas e experimentais (LABOW, 2000). O dipeptídeo quando administrado no sangue por veias periféricas, sofre hidrólise liberando moléculas de aminoácidos livres alanina e glutamina (SOUBA, 1993). Um frasco de vidro com 100 ml contém 8,2g de L-alanina e 13,46g de L-glutamina. A L-Ala-Gln foi administrada na dose 0,75g/Kg de peso do animal, completando-se com solução salina para obtenção do volume total 2,0 ml. As doses de glutamina usadas neste estudo foram selecionadas de acordo com investigações prévias de Singleton e Wischmeyer (2007). A solução de cloreto de sódio 0,9% utilizada no estudo foi produzida pela Farmax produtos farmacêuticos (Divinópolis, MG).

A solução de L-alanil-glutamina a 20% ou solução salina foi administrada por via intravenosa num volume total de 2,0 ml. A aplicação foi realizada com seringa de 5,0 ml com scalpe pediátrico 27G. O animal sob anestesia foi posicionado em decúbito dorsal, imobilizado pelas patas com tiras de fita adesiva presas à mesa operatória, seguida da anti-sepsia com polivinilpirrolidona (PVPI - Povidine[®]). Uma incisão longitudinal mediana foi realizada com bisturi de lâmina 15, com aproximadamente 10 mm de extensão, interessando a pele que recobre a pata direita para punção da veia femoral (Figura 5). Após a aplicação dos tratamentos, realizou-se sutura da pele com fio de algodão 3.0 e anti-sepsia com polivinilpirrolidona (PVPI - Povidine[®]).

A Dexametasona (Decadron Injetável – fosfato dissódico de Dexametasona 2 mg) utilizada neste estudo foi produzida pelo Aché, Laboratórios Farmacêuticos S.A. É uma droga clássica com forte poder antiinflamatório, bastante usada em pesquisas clínicas e experimentais. A dose utilizada nesta pesquisa foi de 2 mg/kg de peso do animal administrada via intraperitoneal. As doses foram previamente descritas por Shiue e Thrall (1991), sendo administradas em 2 momentos: o primeiro 2 horas antes da indução do trauma e o segundo 10 h depois da aplicação da primeira dose.

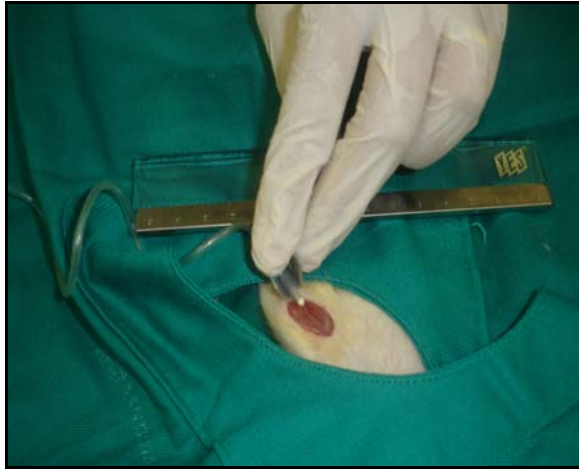


FIGURA 5- Procedimento de administração dos tratamentos pela via intravenosa.

3.5. Modelo experimental do trauma muscular

As operações foram realizadas no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Esse modelo experimental tenta reproduzir as condições de um trauma do músculo esquelético, que ocorre em seres humanos, e com isso proporcionar um melhor entendimento de suas repercussões e alternativas de tratamento. Com o animal sob anestesia, posicionado em decúbito dorsal e imobilizado pelas patas com tiras de fita adesiva à mesa operatória, realizou-se a epilação da coxa esquerda e anti-sepsia com polivinilpirrolidona (PVPI - Povidine[®]), seguida da colocação dos campos operatórios esterilizados para isolar o campo operatório. Uma incisão longitudinal mediana com bisturi de lâmina 15, com 20 mm de extensão foi realizada, interessando a pele, a tela subcutânea abrindo toda região que recobre a musculatura da coxa. Após o afastamento da pele, todo o grupamento muscular, do compartimento anterior da coxa no nível do joelho até articulação do quadril, foi descolado, preservando-se o osso, nervos, artérias e veias. Em seguida foi passado uma pinça Kelly entre o compartimento muscular da região posterior e o fêmur (Figura 6). Na sequência realizou-se sutura da pele com fio de algodão 3.0 e anti-sepsia com polivinilpirrolidona (PVPI - Povidine[®]) (Figura 7). Os animais foram colocados em gaiolas individuais sob calor de lâmpadas incandescentes até a recuperação da anestesia, sendo, então, observados por um período de vinte quatro horas, com dieta e água a vontade.

Foram considerados para o estudo os animais que permaneceram vivos durante todo o experimento: de um total de 36 animais ocorreram 3 óbitos, por dificuldade técnica durante a coleta do sangue. Estes animais foram repostos para compor o total de 6 ratos por grupo.



FIGURA 6 - Indução do modelo experimental do trauma muscular.

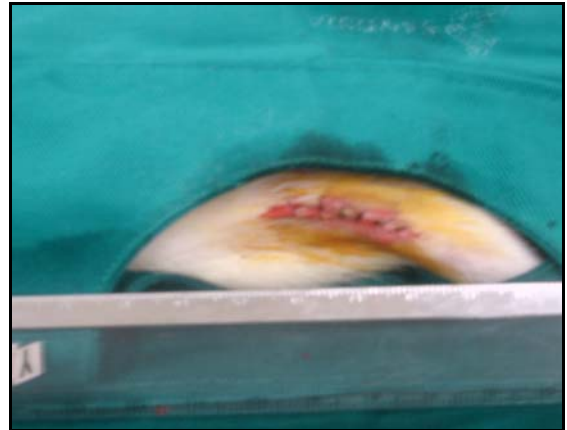


FIGURA 7 - Sutura da pele e anti-sepsia após indução do trauma.

3.6. Coleta do material para análise

Vinte quatro horas após a indução do trauma muscular ou não indução do trauma para os grupos controles, os animais foram anestesiados e submetidos à laparotomia para a coleta de sangue e tecido pulmonar.

3.6.1. Coleta de sangue

Uma laparotomia mediana em cada animal foi feita com bisturi lâmina 15, interessando pele, tela subcutânea e linha aponeurótica mediana de aproximadamente 4 cm, com exposição e afastamento lateral das alças intestinais para a direita, seguida de dissecação e isolamento da aorta abdominal. Em seguida, procedeu-se à colheita do sangue por punção

direta da artéria aorta em sentido céfalo-caudal à 45° com agulha hipodérmica 25x7 (0,7mm x 25mm, 22Gx1”, NIPRO®, Sorocaba-SP) acoplada em seringa de 5mL (BD Plastiplak®, Curitiba-PR) heparinizada. Foram colhidas amostras de sangue de aproximadamente 2,0 ml de cada animal.

Logo depois de colhido, o sangue foi colocado em tubos de ensaio, com capacidade para 10 ml, contendo 5,0 ml de ácido perclórico 0,75 M e imerso em gelo no interior de um recipiente de isopor. A imersão neste ácido provoca inativação e precipitação rápida das proteínas que foram removidas por centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos. Desprezou-se o precipitado, e o sobrenadante foi novamente colocado em tubos de ensaio previamente pesados que mais uma vez foram pesados para obtenção do volume final e depois congelados a -70° C para análise da concentração de glutatona.

3.6.2. Coleta do tecido pulmonar

Após o sacrifício do animal por exangüinação foi realizada uma toracotomia mediana com retirada do esterno, após 24 horas da indução ou não do trauma, expondo os pulmões e o coração. O pulmão direito foi clampado com uma pinça Kelly e retirado um fragmento de aproximadamente 1 cm³ para dosagem de glutatona um antioxidante endógeno, o restante foi para análise histopatológica. Em seguida, procedeu-se a punção do átrio direito com seringa 60 ml e agulha 0,7 x 25mm para lavagem do pulmão esquerdo com solução salina 0,9% até obter-se tecido pulmonar com coloração esbranquiçada. Reservou-se uma amostra de tecido mais descorada para dosar MPO um índice sensível da infiltração tecidual de neutrófilos, método descrito por Timlin *et al.*, (2004) (Figuras 8). Após o mergulho em nitrogênio líquido, o fragmento foi acondicionado em tubo tipo Eppendorf a -70°C. Amostras foram mantidas congeladas em freezer a -70°C até o ensaio. Tecidos perdem aproximadamente 15% de sua atividade de MPO por semana, portanto, ensaios foram realizados o mais rápido possível após coleta.

A amostra retirada do pulmão direito que foi prensada e mergulhada em nitrogênio líquido a cerca de -190 °C. Esta técnica baixa a temperatura tissular à aproximadamente -80°C em um tempo inferior a 0,1 segundo. Os fragmentos foram colocados em tubos de ensaio e armazenados a -70° C até sua utilização para dosagem de GSH.

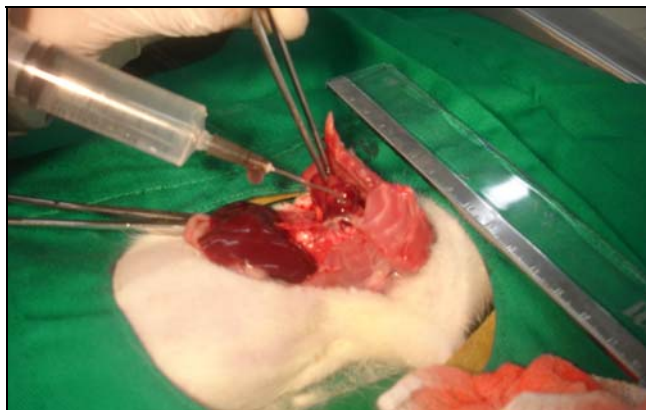


FIGURA 8 - Técnica de lavagem do pulmão

3.7. Técnica Laboratorial

3.7.1. Processamento histológico e critérios para análise histológica do pulmão

O pulmão foi seccionado no plano frontal e imerso em formol tamponado a 10% (para cada litro de formol adicionou-se quatro gramas de fosfato monobásico anidro e 6,5 gramas de fosfato de sódio dibásico anidro) observando-se a relação do volume da solução 10 vezes o volume da amostra tecidual a ser fixada. No processamento histológico foi realizada a desidratação sucessiva em álcoois etílicos, em concentrações crescentes, até o álcool absoluto; diafanização com xilol e impregnação com parafina histológica para emblocamento. Um micrótomo rotativo foi utilizado para realizar cortes finos de cerca de 4 μ m, que foram montados sobre lâmina de vidro com extremidade fosca, devidamente identificada. Os cortes montados seguiram para desparafinização em estufa a 56°C.

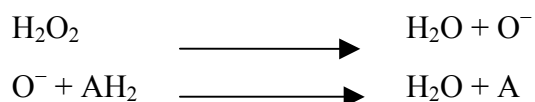
Após nova desparafinização com xilol, hidratação com álcoois sucessivos, em concentrações decrescentes, o material foi lavado em água corrente e corado com hematoxilina por cinco a dez minutos. O excedente do corante foi retirado com banhos em água corrente comum. Após rápida desidratação em álcool absoluto, os cortes foram corados pela eosina por oito minutos; diferenciados em sucessivos álcoois, em concentrações crescentes; diafanizados em xilol e montados com lamínula e bálsamo de Canadá e Etela.

As lâminas foram analisadas à microscopia óptica (microscópio Nikon E 200) pelo patologista sem prévio conhecimento sobre o grupo a que pertencia cada rato

As análises morfométricas foram determinadas por uma modificação dos critérios descritos por Greca *et al.*, (2004): congestão, edema intersticial, hemorragia e necrose. Os parâmetros foram graduados em: ausente (-) quando não apresentar nenhuma alteração, discreto (+) quando estiverem presentes somente alterações focais, moderado (+ +) quando estiverem presentes alterações multifocais, e intensa (+ + +) quando estiverem presentes alterações difusas. Para fins de cálculo estatístico foram atribuídos escores aos critérios descritos anteriormente: 0 (ausente), 1 (discreto), 2 (moderado) e 3 (intenso). A infiltração neutrofílica foi avaliada pela contagem do número de neutrófilos em cinco campos aleatórios visualizados em aumento de 400 X.

3.7.2. Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente nos grânulos intracelulares dos neutrófilos. Essa enzima pode ser utilizada, portanto, como marcador para o conteúdo de neutrófilos dos tecidos. A ação da MPO está explicitada abaixo:



Neste ensaio, a H_2O_2 é clivada por MPO liberada de amostras de tecido por homogeneização com tampão de HTAB (detergente). O radical oxigênio (O^-) resultante se combina com diidrocloreto de O-dianisidina, o doador de hidrogênio (AH_2), que é convertido a um composto colorido (A). O aparecimento deste composto, ao longo do tempo, é medido por espectrofotômetro para determinar o conteúdo de MPO de um tecido.

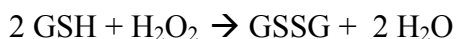
Os reagentes utilizados no ensaio da dosagem de MPO foram: tampão fosfato de potássio, tampão de brometo de cetil trimetil amônio (HTAB), peróxido de hidrogênio (1%) e Diidrocloreto de O-dianisidine.

Para avaliação da MPO utilizou-se aproximadamente 50 mg de tecido pulmonar, as amostras foram pesadas e seus pesos anotados e durante todo o experimento foram mantidas no gelo. Em seguida foram colocadas em tubos de ensaio e adicionado 1,0mL de tampão HTAB. Cada amostra foi homogeneizada com um homogeneizador de tecidos por 15s. Após essa etapa, mais tampão HTAB é adicionado para compor 1,0mL de tampão para

cada 50mg de amostra. Os tubos foram levados ao vortex e, depois, o conteúdo das amostras foi centrifugado a 4500 rpm por 20min a 4°C, passado o processo de centrifugação recolhe o sobrenadante para tubos eppendorf e armazena no gelo, para em seguida prepara a solução reveladora de e colocou-se 7µl da amostra do sobrenadante em duplicata. Por último, acrescentou 200 µl da solução reveladora de o-dianisidine para fazer a leitura no leitor de Elisa em absorvância de 450 nm. As leituras das absorvâncias foram realizadas no tempo zero e um minuto. A atividade de MPO foi expressa em Unidade de MPO por miligramas de tecido (MPO U/mg) e foi determinado por uma modificação do método de Bradley, *et al* (1982). Obtêm-se a concentração final de MPO comparando-se o valor da absorvância com uma tabela padrão de MPO, preparada previamente (APÊNDICE B). As concentrações de MPO foram expressas em unidade / mg de tecido pulmonar.

3.7.3. Determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos (glutathiona-GSH)

Para a determinação da glutathiona (GSH), calculou-se o teor dos grupos sulfidrílicos não protéicos pelo método de Sedlak & Lindsay (SEDLAK; LINDSAY, 1968) que é baseado na reação do 5-5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB, reagente de Ellman) com o tiol livre, dando origem a um dissulfeto misto mais ácido (2-nitro-5-tiobenzóico). Utilizando os reagentes Ácido Etilenodiaminotetraacético (EDTA), Ácido Tricloroacético (ATC) 50%, Tampão TRIS 0,4M pH 8,9, DTNB 0,5M, Metanol, GSH 1mg/mL e lembrando das reações



A amostra de tecido (500 mg) foi pesada e homogeneizada em 5 ml de EDTA 0,02M gelado para preparar um homogenato a 10%, retiram-se 4mL de cada amostra e adicionam-se 3,2 mL de água destilada e 0,8 mL de solução aquosa de ATC 50%. Os tubos são então centrifugados em 3.000 rotações por minuto por 15 minutos e em seguida retiram-se 2mL do sobrenadante e adiciona-se 4mL de TRIS 0,4mL (pH 8,9) e 0,1 mL de DTNB 0,01M. A mistura é agitada visando homogeneização e, após 5 minutos da adição do DNTB, as absorvâncias são lidas no espectrofotômetro a 412 nm.

A determinação da glutathiona (GSH) no sangue é semelhante a do tecido, amostra de plasma foi pesada e desproteinizada. Em seguida 1,0 ml da amostra é retirada e misturada com 3,2 ml de água destilada e 0,8 ml de ácido tricloroacético a 50%. O tubo é agitado e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. As etapas seguintes são as mesmas empregadas na dosagem do tecido. A concentração de GSH é finalmente obtida pela comparação do valor da absorbância com uma tabela padrão de GSH previamente estipulada (APÊNDICE C). As concentrações de GSH foram expressas em $\mu\text{mol/g}$ de tecido e $\mu\text{mol/ml}$ de sangue.

3.8. Análise Estatística

Para os cálculos estatísticos utilizou-se os programas *GraphPad Prism*® versão 5.00 para *Windows* (*GraphPad Software, San Diego, Califórnia, U.S.A., www.graphpad.com*). Para todas as variáveis estudadas, efetuou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação da distribuição de normalidade. Diante da presença de normalidade, os dados foram expressos como média acompanhada pelo seu desvio padrão (Média \pm DPM). Para comparação entre três ou mais grupos, aplicou-se o teste Análise de Variância (Anova) com pós-teste de Bonferroni. As comparações entre dois grupos foram realizadas utilizando-se o teste *t*. Quando os parâmetros de normalidade não foram atingidos com aplicação do teste de Kolmogorov-Smirnov, os testes utilizados foram de Kruskal-Wallis/ Dunn para comparar três ou mais grupos, os dados foram expressos como mediana, intervalo interquartil, valores mínimo e máximo (Box-Plot). Para comparar dois grupos utilizou-se o teste de Mann-Whitney. Em todos os casos foi adotado o nível de significância de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1. Validação do modelo de lesão aguda pulmonar induzida por trauma muscular cirúrgico.

4.1.1. Avaliação do efeito do trauma na atividade da enzima mieloperoxidase (U MPO/mg) no tecido pulmonar de ratos tratados com salina ou Dexametasona.

Analisou-se o efeito do trauma muscular cirúrgico e verificou-se um aumento significativo ($p < 0,001$) na atividade de mieloperoxidase (MPO), no grupo salina, submetido ao trauma muscular, quando comparado ao grupo salina (controle). Também foi constatado uma redução de MPO significativa ($p < 0,001$) no grupo Dexametasona comparado com o grupo salina, ambos submetidos ao trauma. Observou-se que não houve diferença significativa na atividade de MPO entre o grupo salina (controle) comparado com o grupo Dexametasona submetido ao trauma (Tabela 1, Figura 9).

TABELA 1– Atividade da mieloperoxidase (MPO) no pulmão comparando-se os grupos salina e trauma com salina (controle), Dexametasona com salina, ambos submetidos ao trauma.

GRUPOS	m (dp)
Salina - controle	1,35 ± 1,45
Salina e trauma	23,96 ± 4,86 ***
Dexametasona e trauma	5,52 ± 1,91 ^{†††}

Testes: Anova / Bonferroni em 6 ratos por grupo (Média ± D.P.)

*** $p < 0,001$ comparado ao grupo salina sem trauma

^{†††} $p < 0,001$ comparado ao grupo salina e trauma

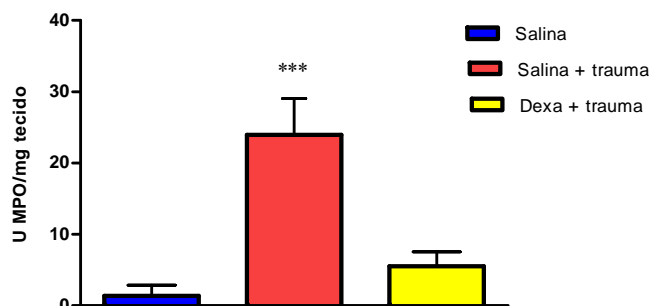


FIGURA 9: Quantificação da atividade de mieloperoxidase no pulmão dos grupos tratados com salina sem trauma, salina e Dexametasona ambos submetidos ao trauma. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 6 animais. Anova /Bonferroni. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo salina sem trauma, quando comparado com o grupo dexa mais trauma.

4.1.2. Avaliação do efeito do trauma no infiltrado neutrofílico em tecido pulmonar de ratos tratados com salina ou Dexametasona.

Analisou-se o efeito do trauma e verificou-se um aumento significativo ($p < 0,001$) no número de neutrófilos no grupo salina, submetido ao trauma, quando comparado ao grupo salina (controle). Constatou-se uma redução significativa ($p < 0,001$) no infiltrado neutrofílico no grupo Dexametasona quando comparado com grupo salina, ambos submetidos ao trauma. Observou-se que não houve diferença significativa no número de neutrófilos entre o grupo que recebeu salina (controle) comparado com o grupo Dexametasona e trauma (Tabela 2, Figura 10).

TABELA 2 – Contagem de neutrófilos registrados em tecido pulmonar comparando-se os grupos salina e trauma com salina sem trauma (controle), Dexametasona com salina, ambos submetidos ao trauma.

GRUPOS	m (dp)
Salina - controle	24,50 ± 7,45
Salina e trauma	71,00 ± 19,64***
Dexametasona e trauma	21,50 ± 5,36 ^{†††}

Testes: Anova / Bonferroni em 6 ratos por grupo (Média ± D.P.)

*** $p < 0,001$ comparado ao grupo salina sem trauma

^{†††} $p < 0,001$ comparado ao grupo salina e trauma

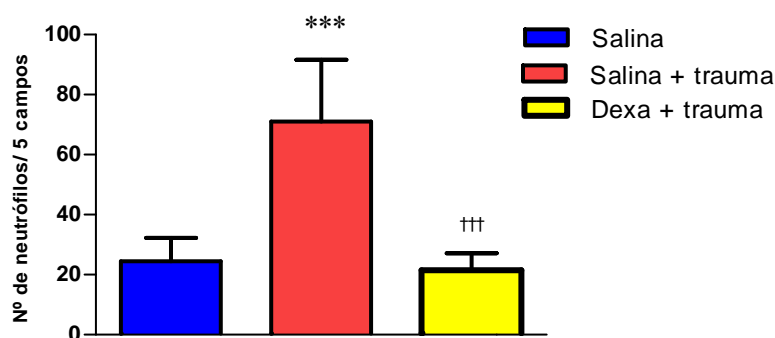


Figura 10: Avaliação neutrofílica em tecido pulmonar de ratos comparando-se os grupos tratados com salina sem trauma e os grupos tratados com salina e Dexametasona ambos submetidos ao trauma. Dados expressos como média e desvio padrão, das medições efetuadas em 6 animais. Anova / Bonferroni. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo salina sem trauma, ^{†††} $p < 0,001$ comparado ao grupo salina e trauma.

4.1.3. Avaliação do efeito do trauma na concentração de Glutathiona ($\mu\text{mol/g}$) no tecido pulmonar de ratos tratados com salina ou Dexametasona.

Analisou-se o efeito do trauma e verificou-se uma redução significativa ($p < 0,01$) na concentração de glutathiona (GSH), no grupo submetido a trauma muscular e tratado com salina quando comparado ao grupo salina (controle). Também foi constatado um aumento de GSH significativo ($p < 0,01$) no grupo tratado com Dexametasona comparado com o grupo tratado com salina, ambos submetidos ao trauma. Observou-se que não houve diferença

significante na GSH entre o grupo tratado com salina (controle) comparado com o grupo Dexametasona submetido ao trauma (Tabela 3, Figura 11).

TABELA 3 – Concentração de glutathiona ($\mu\text{mol/g}$) no pulmão comparando-se os grupos salina e trauma com salina sem trauma (controle), Dexametasona com salina ambos submetidos ao trauma.

GRUPOS	m (dp)
Salina - controle	$18,87 \pm 7,35$
Salina e trauma	$8,53 \pm 1,22$ **
Dexametasona e trauma	$19,12 \pm 2,88$ ††

Testes: Anova / Bonferroni em 6 ratos por grupo (Média \pm D.P.)

** $p < 0,01$ comparado ao grupo salina sem trauma

†† $p < 0,01$ comparado ao grupo salina e trauma

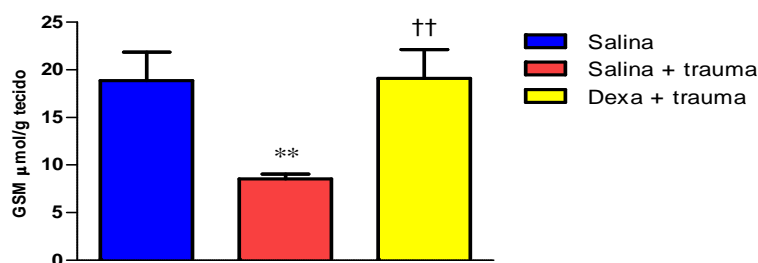


Figura 11: Quantificação da concentração de glutathiona do pulmão nos grupos tratados com salina sem trauma, salina e Dexametasona ambos submetidos ao trauma. Dados expressos como média e desvio padrão, das medições efetuadas em 6 animais. Anova /Bonferroni. ** $p < 0,01$ comparado ao grupo salina sem trauma.

†† $p < 0,01$ comparado ao grupo salina e trauma.

4.1.4. Avaliação do efeito do trauma na Concentração de Glutathiona ($\mu\text{mol/mL}$) no plasma de ratos tratados com salina ou Dexametasona.

Analisou-se o efeito do trauma e verificou-se que não houve diferença significativa na concentração de glutathiona GSH no grupo submetido a trauma muscular e tratado com salina quando comparado ao grupo tratado com salina (controle). Contudo, observou-se uma diminuição de GSH significativa ($p < 0,05$) no grupo tratado com Dexametasona quando

comparado com o grupo tratado com salina (controle). Observou-se que não houve diferença significativa de GSH entre os grupos tratados com salina e Dexametasona, ambos submetidos ao trauma (Tabela 4, Figura 12).

TABELA 4 – Concentração de glutatona ($\mu\text{mol/mL}$) no plasma comparando-se os grupos salina e trauma com salina sem trauma (controle), Dexametasona com salina ambos submetidos ao trauma.

GRUPOS	m (dp)
Salina - controle	15,96 \pm 2,01
Salina e trauma	12,76 \pm 3,82
Dexametasona e trauma	9,08 \pm 5,07 *

Testes: Anova / Bonferroni em 6 ratos por grupo (Média \pm D.P.)

* $p < 0,05$ comparado ao grupo salina sem trauma

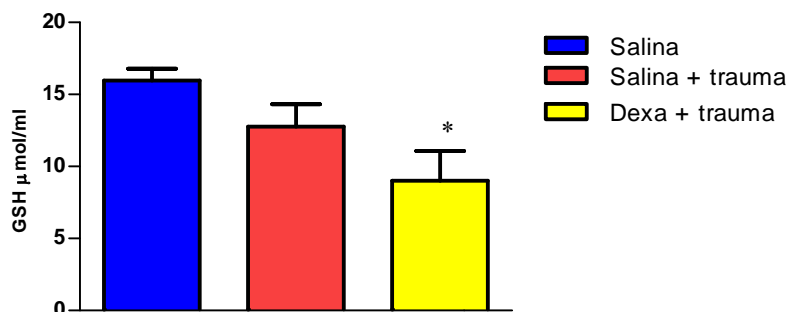


Figura 12: Quantificação da concentração de glutatona no plasma dos grupos tratados com salina sem trauma, salina e Dexametasona ambos submetidos ao trauma. Dados expressos como média e desvio padrão, das medições efetuadas em 6 animais. Anova /Bonferroni. * $p < 0,05$ comparado o grupo salina sem trauma.

4.1.5. Avaliação do efeito do trauma na análise do parâmetro histopatológico congestão em tecido pulmonar de ratos tratados com salina ou Dexametasona.

Analisou-se o efeito do trauma sobre o grau de congestão no grupo tratado com salina quando comparado com o grupo não submetido ao trauma (controle), nessa comparação observou-se que o trauma aumentou significativamente ($p=0,0043$) a intensidade da congestão. Na comparação dos grupos Dexametasona com salina, ambos submetidos ao trauma,

observou-se uma redução significativamente ($P=0,0045$) na congestão. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos tratados com salina (controle) e Dexametasona submetido a trauma (Tabela 5, Figuras 13 e 17).

TABELA 5 – Avaliação do grau de congestão no pulmão comparando-se os grupos salina e trauma com salina (controle), Dexametasona com salina ambos submetidos ao trauma.

GRUPOS	(0-3) Escores	<i>P</i>
Salina - controle	0 (0-1)	–
Salina e trauma	2,5 (2-3)**	0,0043
Dexametasona e trauma	0 (0-1) ^{††}	0,0045

Teste: Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney na comparação entre dois grupos.

** $p<0,01$ comparado ao grupo salina (controle), ^{††} $p<0,01$ comparado ao grupo salina e trauma,

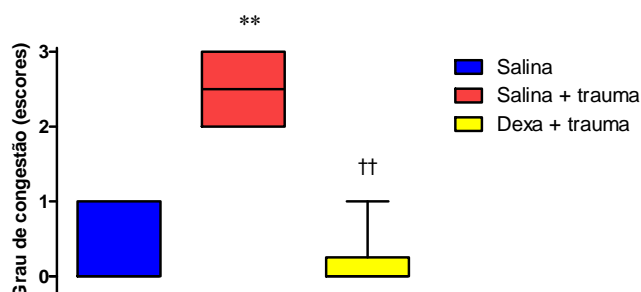


FIGURA 13 – Avaliação histopatológica do grau de congestão no pulmão dos grupos tratados com salina sem trauma e nos grupos tratados com salina ou Dexametasona ambos submetidos ao trauma. Conforme os critérios: 0 – ausente, 1 – leve, 2 – moderado, 3 – intenso. Os escores são expressos em mediana, intervalo interquartil, valores mínimo e máximo. Teste de Kruskal-Wallis/Dunn em 6 ratos por grupo. ** $p<0,01$ comparado ao grupo salina, ^{††} $p<0,01$ comparado ao grupo salina e trauma.

4.1.6. Avaliação do efeito do trauma na análise do parâmetro histopatológico edema intersticial em tecido pulmonar de ratos tratados com salina ou Dexametasona.

Analisou-se o efeito do trauma sobre o grau de edema no grupo tratado com salina quando comparado com o grupo não submetido ao trauma (controle), nessa comparação observou-se que o trauma aumentou significativamente ($p=0,0043$) a intensidade do edema. Na comparação dos grupos Dexametasona com salina, ambos submetidos ao trauma, observou-se uma redução significativamente ($p<0,001$) no grau de edema. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos tratados com salina (controle) e Dexametasona submetido a trauma (Tabela, 6 e Figuras 14, 17)

TABELA 6 – Avaliação do grau de edema intersticial no pulmão comparando-se os grupos salina e trauma com salina (controle), e Dexametasona com salina, ambos submetidos ao trauma.

GRUPOS	(0-3) Escores	P
Salina - controle	0 (0-1)	–
Salina e trauma	2,5 (2-3)**	0,0043
Dexametasona e trauma	0 (0-1) ^{†††}	< 0,001

Teste: Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney na comparação entre dois grupos. ** $p<0,01$ comparado ao grupo salina (controle), ^{†††} $p<0,001$ comparado ao grupo salina e trauma.

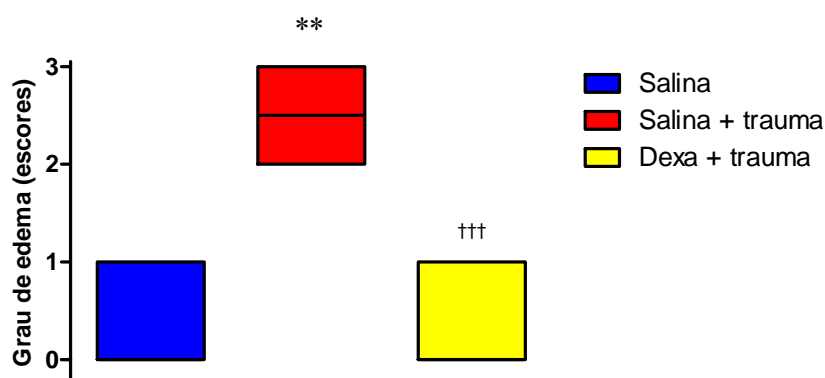


FIGURA 14 – Avaliação histopatológica do grau de edema no pulmão dos grupos tratados com salina sem trauma e nos grupos tratados com salina ou Dexametasona ambos submetidos ao trauma. Conforme os critérios: 0 – ausente, 1 – leve, 2 – moderado, 3 – intenso. Os escores são expressos em mediana, intervalo interquartil, valores mínimo e máximo. Teste de Kruskal-Wallis/Dunn em 6 ratos por grupo. ** $p<0,01$ comparado ao grupo salina, ^{†††} $p<0,001$ comparado ao grupo salina e trauma.

4.1.7. Avaliação do efeito do trauma na análise do parâmetro histopatológico hemorragia em tecido pulmonar de ratos tratados com salina ou Dexametasona.

Analisou-se o efeito do trauma sobre o grau de hemorragia no grupo tratado com salina quando comparado com o grupo não submetido ao trauma (controle), nessa comparação observou-se que o trauma aumentou significativamente ($p=0,0043$) a intensidade da hemorragia. Na comparação dos grupos Dexametasona com salina, ambos submetidos a trauma, observou-se uma redução significativamente ($P=0,0037$) no grau de hemorragia. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos salina (controle) e Dexametasona submetido a trauma (Tabela 7, Figuras 15 e 17).

TABELA 7 – Avaliação do grau de hemorragia no pulmão comparando-se os grupos salina e trauma com salina (controle), Dexametasona com salina ambos submetidos ao trauma.

GRUPOS	(0-3) Escores	<i>P</i>
Salina - controle	0 (0-1)	–
Salina e trauma	3 (2-3)**	0,0037
Dexametasona e trauma	0 (0-1) ^{††}	0,0043

Teste: Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney na comparação entre dois grupos. ** $p<0,01$ comparado ao grupo salina (controle), ^{††} $p<0,01$ comparado ao grupo salina e trauma.

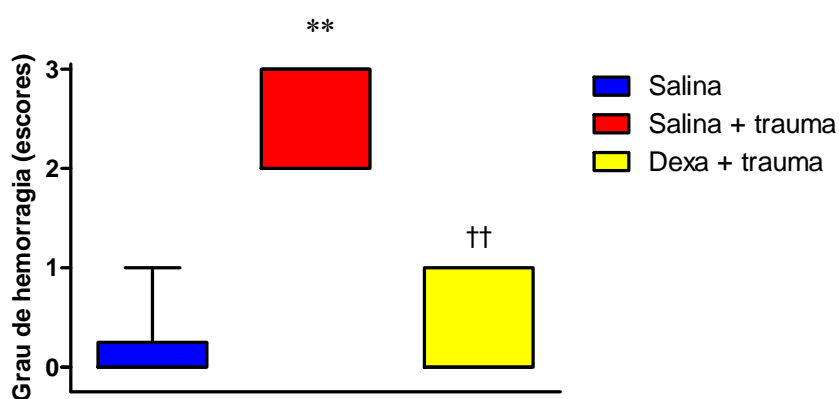


FIGURA 15 – Avaliação histopatológica do grau de hemorragia no pulmão dos grupos tratados com salina sem trauma e nos grupos tratados com salina ou Dexametasona ambos submetidos ao trauma. Conforme os critérios: 0 – ausente, 1 – leve, 2 – moderado, 3 – intenso. Os escores são expressos em mediana, intervalo interquartil, valores mínimo e máximo. Teste de Kruskal-Wallis/Dunn em 6 ratos por grupo. ** $p<0,01$ comparado ao grupo salina sem trauma, ^{††} $p<0,01$ comparado ao grupo salina e trauma.

4.1.8. Avaliação do efeito do trauma na análise do parâmetro histopatológico necrose em tecido pulmonar de ratos tratados com salina ou Dexametasona.

Verificou-se o efeito do trauma no grau de necrose e observou-se que no grupo tratado com salina e submetido a trauma, o grau de necrose foi significativamente maior ($P < 0,01$) comparado ao grupo salina (controle). Nos grupos submetidos a trauma observou-se uma redução significativamente ($p=0,0037$) no grau de hemorragia quando tratados com Dexametasona comparado com os tratados com salina. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos tratados com salina (controle) e Dexametasona submetido a trauma (Tabela 8, Figuras 16 e 17).

TABELA 8 – Avaliação do grau de necrose no pulmão comparando-se os grupos salina e trauma com salina (controle), Dexametasona com salina ambos submetidos ao trauma.

GRUPOS	(0-3) Escores	P
Salina - controle	0 (0-0)	–
Salina e trauma	3 (2-3)	–
Dexametasona e trauma	0 (0-1)**	0,0037

Teste: Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney na comparação entre dois grupos. ** $p < 0,01$ comparado ao grupo salina e trauma.

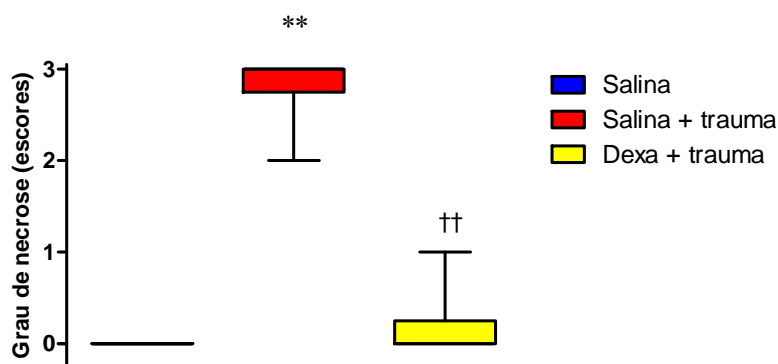


FIGURA 16– Avaliação histopatológica do grau de necrose no pulmão dos grupos tratados com salina sem trauma e nos grupos tratados com salina ou Dexametasona ambos submetidos ao trauma. Conforme os critérios: 0 – ausente, 1 – leve, 2 – moderado, 3 – intenso. Os escores são expressos em mediana, intervalo interquartil, valores mínimo e máximo. Teste de Kruskal-Wallis/Dunn em 6 ratos por grupo ** $p < 0,01$ comparado ao grupo salina, †† $p < 0,01$ comparado ao grupo salina e trauma.

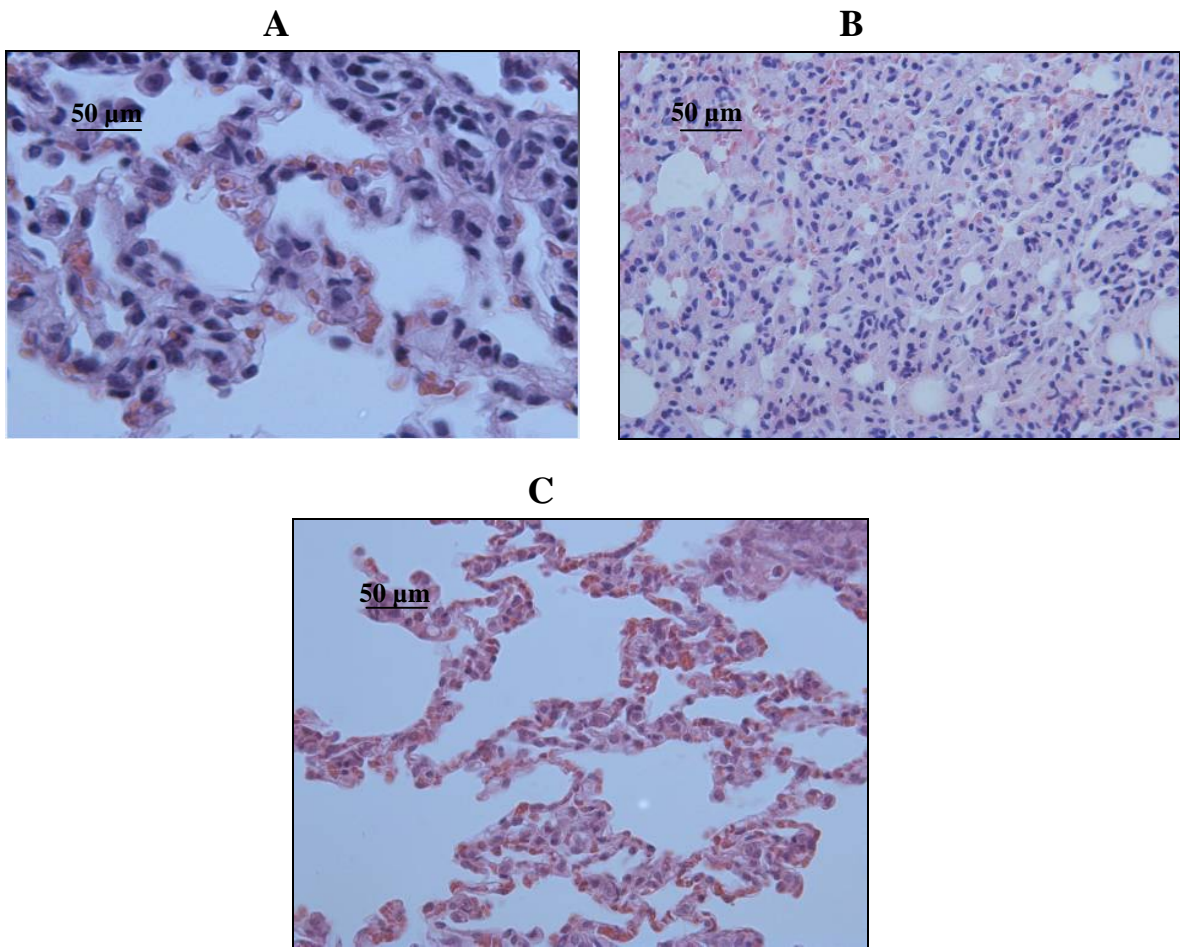


Figura 17– Fotomicrografia de pulmões de ratos. Controle **A** - grupo tratado com salina e não submetido a trauma muscular. **B**- grupo tratado com salina e submetido a trauma muscular, **C**- grupo tratado com Dexametasona e submetido a trauma muscular. Em **A** observa-se a presença de leve congestão, leve edema intersticial. Ausência de hemorragia e necrose. Em **B** observa-se intensa congestão, edema intersticial, hemorragia e necrose. Em **C** observa- leve presença de congestão, edema intersticial discreto e ausência de hemorragia e necrose.(coloração hematoxilina/ Eosina. Magnificação de 400x).

4.2. Avaliação do efeito da L-alanil-glutamina na lesão aguda pulmonar induzida por trauma muscular cirúrgico

4.2.1. Efeito da L-alanil-glutamina e da Dexametasona nas dosagens da atividade enzimática de mieloperoxidase (U MPO/mg) no tecido pulmonar de ratos.

Analisou-se inicialmente o efeito do trauma muscular na atividade da MPO. Verificou-se que o trauma aumentou significativamente a atividade da MPO nos grupos tratados com salina ($p < 0,001$) e L-Alanil-Gln ($p < 0,001$) e menos intensamente no grupo dexta ($p = 0,0013$) quando comparados aos respectivos grupos controles, sem trauma (Tabela 9).

Nos grupos submetidos ao trauma e tratados com L-alanil-glutamina ou Dexametasona houve uma redução significativa ($p < 0,001$) na atividade de MPO, quando comparado ao grupo tratado com salina e submetido ao trauma. Observou-se que houve redução significativa ($p < 0,001$) na atividade de MPO no grupo Dexametasona, submetido ao trauma, quando comparado ao grupo tratado com L-alanil-glutamina, também submetido ao trauma. Na comparação entre o grupo salina (controle), com L-alanil-glutamina e Dexametasona, ambos sem intervenção do trauma muscular, não foram encontradas diferenças significativas nas dosagens de MPO (Figura 18).

TABELA 9 – Atividade da mieloperoxidase (U MPO/mg) no pulmão de ratos comparando-se os grupos tratados com salina, L-alanil-glutamina, Dexametasona submetidos ao trauma com os grupos não submetidos.

Grupos (n= 6)	Sem trauma (controle)	Com trauma	*p
Salina	1,35 ± 1,45	23,16 ± 4,87	<0,0001
L-alanil-glutamina	0,89 ± 0,98	12,90 ± 2,01	<0,0001
Dexametasona	1,13 ± 1,52	5,52 ± 1,91	0,0013

Testes: Dados analisados pelo teste *t* para variáveis não emparelhadas. As medições foram efetuadas em 6 animais. * grupo com trauma *versus* grupo sem trauma.

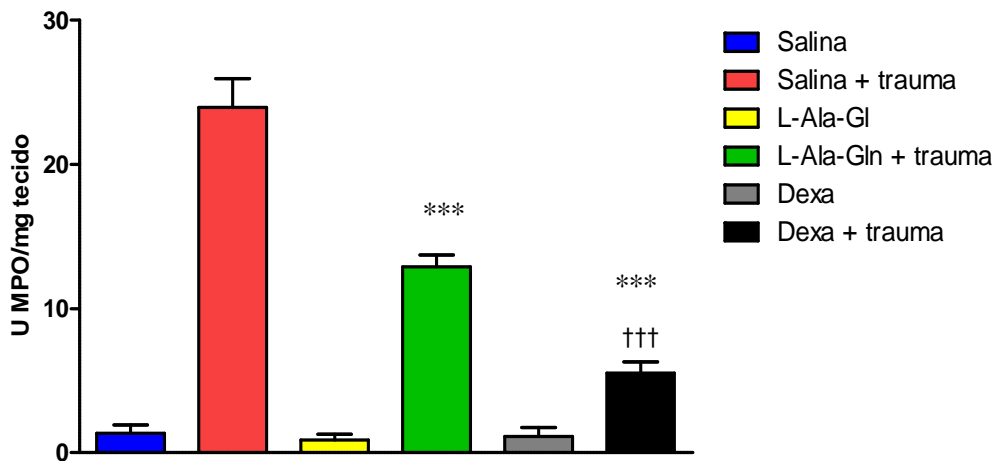


Figura 18 – Quantificação da atividade de mieloperoxidase no pulmão dos grupos tratados com salina, l-alanil-glutamina ou Dexametasona submetidos e não submetidos ao trauma. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 6 animais. Teste Anova /Bonferroni. *** $p < 0,001$ comparado ao grupo salina e trauma, ††† $p < 0,001$ comparado ao grupo L-alanil-glutamina e trauma.

4.2.2. Efeito da L-alanil-glutamina e da Dexametasona na contagem do número de neutrófilos em tecido pulmonar de ratos.

Analisou-se o efeito do trauma muscular sobre o número de neutrófilos e verificou-se uma infiltração neutrofílica. Observou-se que o trauma aumentou significativamente número de neutrófilos nos grupos salina ($p=0,0003$) e L-alanil-glutamina ($p=0,0130$) e menos intensamente no grupo Dexametasona ($p=0,0004$) quando comparados aos respectivos grupos controles, sem trauma (Tabela 10).

Nos grupos L-alanil-glutamina e Dexametasona, ambos submetidos ao trauma, ocorreu uma redução significativa ($p < 0,001$) no número de neutrófilos quando comparado ao grupo tratado com salina e submetido ao trauma. Entretanto, observou-se que não houve diferença significativa no grupo Dexametasona comparado com o grupo L-alanil-glutamina, ambos submetidos ao trauma. Na comparação entre os grupos salina (controle), L-alanil-glutamina e Dexametasona, que não sofreram intervenção do trauma muscular, não foram encontradas diferenças significativas nas contagens dos números de neutrófilos (Figura 19).

TABELA 10 – Número de neutrófilos registrados em cinco campos por lâmina de tecido pulmonar de ratos não submetidos a trauma muscular comparando-se os grupos submetidos e tratados com salina, L-alanil-glutamina ou Dexametasona.

Grupos (n= 6)	Sem trauma (controle)	Com trauma	* <i>p</i>
Salina	24,50 ± 7,45	71,00 ± 19,64	0,0003
L-alanil-glutamina	18,17 ± 3,49	28,50 ± 7,63	0,0130
Dexametasona	8,83 ± 2,71	21,50 ± 5,36	0,0004

Testes: Dados analisados pelo teste *t* para variáveis não emparelhadas. As medições foram efetuadas em 6 animais. * grupo com trauma *versus* grupo sem trauma.

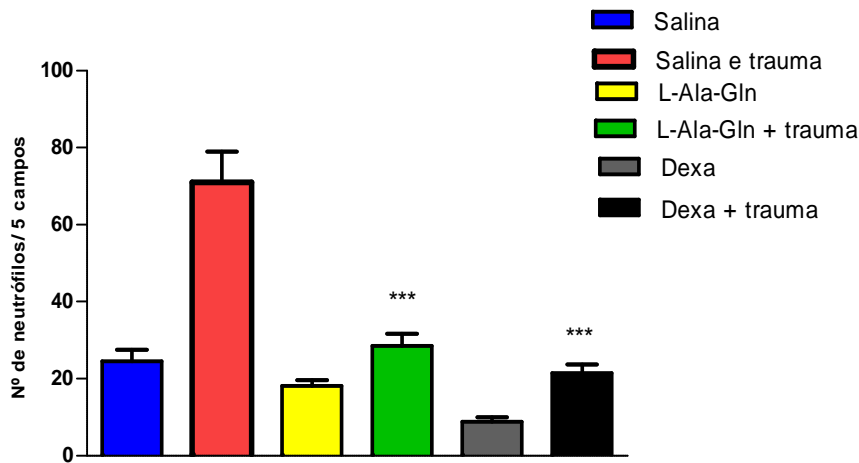


Figura 19 – Representação da contagem do número de neutrófilos registrados em cinco campos por lâmina de tecido pulmonar dos grupos tratados com salina, L-alanil-glutamina ou Dexametasona submetidos e não submetidos ao trauma. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 6 animais. Teste Anova /Bonferroni. *** $p < 0,001$ comparado ao grupo salina e trauma.

4.2.3. Efeito da L-alanil-glutamina e da Dexametasona sobre as concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$) no pulmão de ratos.

Analisou-se o efeito do trauma muscular na concentração de glutathiona (GSH) no pulmão. Verificou-se que o trauma reduziu significativamente a concentração de GSH no grupo salina ($p=0,0068$) e aumentou significativamente nos grupos tratados com L-Alanil-Gln ($p=0,0001$) e Dexametasona ($p=0,0291$) quando comparados aos respectivos grupos controles, sem trauma (Tabela 11).

Observou-se também um aumento significativo nas concentrações de GSH dos grupos submetidos a trauma e tratados com L-alanil-glutamina ($p < 0,001$) ou Dexametasona ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo tratado com salina e submetido a trauma. Verificou-se uma redução significativa ($p < 0,001$) da concentração de GSH no grupo Dexametasona quando comparado com o grupo L-alanil-glutamina, ambos submetidos ao trauma. Não foram encontradas diferenças significativas de GSH nos pulmões de ratos nas comparações entre os grupos salina (controle), L-alanil-glutamina e Dexametasona não submetidos ao trauma (Figura 20).

TABELA 11 – Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$) no pulmão de ratos comparando-se os grupos submetidos a trauma muscular e não submetidos tratados com salina, L-alanil-glutamina ou Dexametasona.

Grupos (n= 6)	Sem trauma (controle)	Com trauma	* <i>p</i>
Salina	18,87 \pm 7,35	8,53 \pm 1,22	0,0068
L-alanil-glutamina	10,88 \pm 2,00	36,79 \pm 7,31	0,0001
Dexametasona	12,52 \pm 5,66	19,12 \pm 2,88	0,0291

Testes: Dados analisados pelo teste *t* para variáveis não emparelhadas. As medições foram efetuadas em 6 animais. * grupos com trauma *versus* grupos sem trauma.

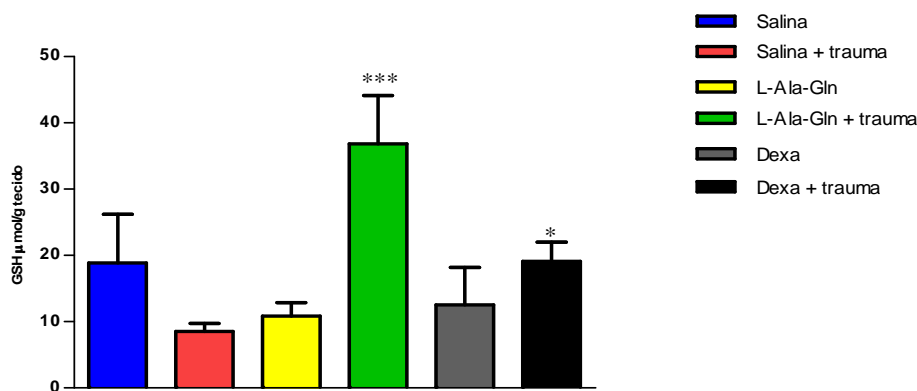


Figura 20 – Representação das concentrações de GSH no pulmão de ratos dos grupos tratados com salina, L-alanil-glutamina ou Dexametasona submetidos e não submetidos ao trauma. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 6 animais. Teste Anova /Bonferroni. *** $p < 0,001$ comparado ao grupo salina e trauma e quando comparado ao grupo Dexametasona e trauma, * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina e trauma.

4.2.4. Efeito da L-alanil-glutamina e da Dexametasona sobre as concentrações de GSH ($\mu\text{mol/mL}$) no plasma de ratos.

Não houve alterações significativas das concentrações de GSH no plasma quando compara-se os grupos salina e L-alanil-glutamina, submetidos ao trauma, com os não submetidos. Na comparação entre os grupos Dexametasona, submetido ao trauma, como o grupo Dexametasona, sem trauma, observou-se um aumento nas concentrações de GSH no plasma (Tabela 12, Figura 21).

TABELA 12 – Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/mL}$) no plasma de ratos submetidos a trauma muscular comparando-se os grupos não submetidos e tratados com salina, L-alanil-glutamina, ou Dexametasona.

Grupos (n= 6)	Sem trauma (controle)	Com trauma	* <i>p</i>
Salina	15,96 \pm 2,01	11,09 \pm 3,50	0,1320
L-alanil-glutamina	14,43 \pm 4,83	8,06 \pm 3,67	0,1320
Dexametasona	9,02 \pm 5,07	12,22 \pm 3,75	0,0411

Testes: Dados analisados pelo teste *t* para variáveis não emparelhadas. * grupos com trauma *versus* grupos sem trauma. Dados expressos como mediana e intervalo interquartil.

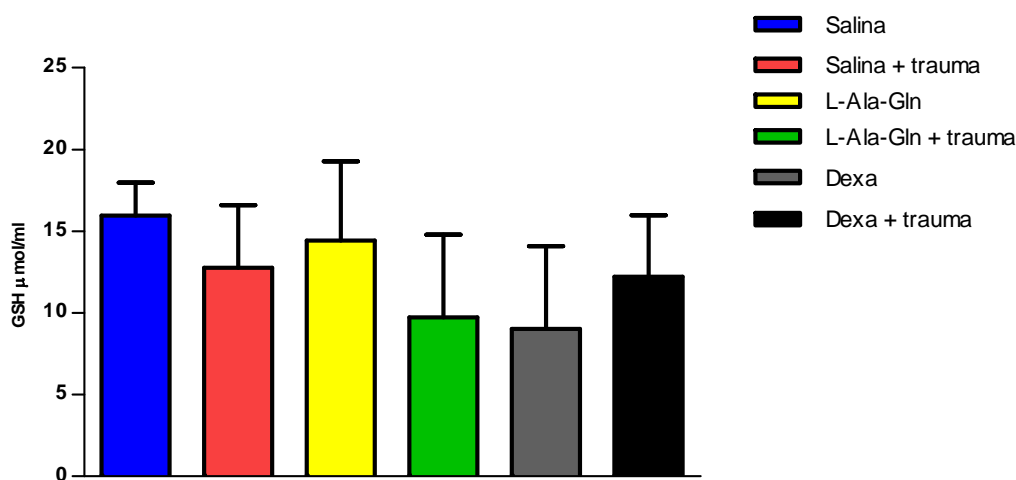


Figura 21 – Representação das concentrações de GSH ($\mu\text{mol/mL}$) no plasma de ratos submetidos e não submetidos ao trauma e tratados com salina, L-alanil-glutamina ou Dexametasona. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 6 animais. Teste Anova /Bonferroni.

4.2.5. Efeito do tratamento da L-alanil-glutamina ou da Dexametasona sob o grau de congestão avaliado no pulmão de ratos.

Analisou-se o efeito do trauma muscular sob o grau de congestão. Verificou-se que o trauma aumentou significativamente a intensidade da congestão nos grupos salina ($p=0,0043$) e L-Alanil-Gln ($p=0,0383$) quando comparados aos seus respectivos controles, grupos sem trauma. Nos grupos tratados com Dexametasona não foram observadas nenhuma alteração (Tabela 13).

Na comparação entre os grupos L-alanil-glutamina e salina, ambos submetidos ao trauma, não ocorreu nenhuma diferença significativa. Entretanto, observou-se uma redução significativa ($p<0,001$) no grau de congestão no grupo Dexametasona quando comparado com o grupo salina, ambos submetidos ao trauma. Na comparação entre os grupos salina, L-alanil-glutamina e Dexametasona, que não sofreram o processo de indução ao trauma, não ocorreu diferença significativa no grau de congestão (Tabela 17, Figura, 22 e 26).

TABELA 13 – Avaliação do grau de congestão no pulmão de ratos comparando-se os grupos tratados com salina, L-alanil-glutamina ou Dexametasona submetidos ao trauma com os grupos não submetidos.

Grupos (n= 6)	Sem trauma (controle)	Com trauma	*P
Salina	0 (0-1)	2,5 (2-3)	0,0043
L-alanil-glutamina	0,5 (0-1)	1,0 (1-2)	0,0383
Dexametasona	0 (0-1)	0 (0-1)	0,5948

Teste: Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney na comparação entre dois grupos. * grupos com trauma *versus* grupos sem trauma.

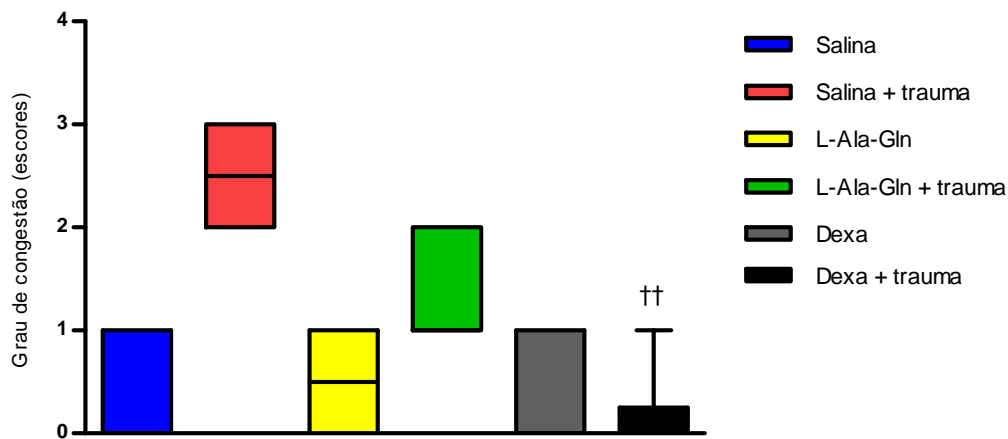


FIGURA 22 – Avaliação histopatológica do grau de congestão nos pulmões de ratos submetidos e não submetidos a trauma e tratados com salina, L-alanil-glutamina ou Dexametasona conforme os seguintes critérios: 0 – ausente, 1 – leve, 2 – moderado, 3 – intenso. Os escores expressos em mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo. Teste de Kruskal-Wallis/Dunn em 6 ratos por grupo. ** $P < 0,01$ comparado ao grupo salina, †† $p < 0,01$ comparado ao grupo salina e trauma.

4.2.6. Efeito do tratamento da L-alanil-glutamina ou da Dexametasona sob o grau de edema intersticial avaliado no pulmão de ratos.

Analisou-se o efeito do trauma muscular sob o grau de edema. Verificou-se que o trauma aumentou significativamente a intensidade do edema no grupo salina ($p=0,0043$) quando comparado ao seu respectivo controle, salina sem trauma. Nos grupos L-Alanil-Gln e Dexametasona não foram observadas nenhuma alteração (Tabela 14).

Contudo, constatou-se uma redução significativa do grau de edema nos grupos L-Alanil-Gln ($p < 0,05$) e Dexametasona ($P < 0,05$), ambos submetidos ao trauma, quando comparado ao grupo salina também submetido ao trauma. Contudo, nos grupos tratados com essas mesmas substâncias, que não foram submetidos ao trauma, não foram encontradas diferenças significativas no grau de edema (Tabela 17 e Figura 23 e 26).

TABELA 14 – Avaliação do grau de edema intersticial no pulmão de ratos comparando-se os grupos tratados com salina, L-alanil-glutamina ou Dexametasona submetidos ao trauma com os grupos não submetidos.

.Grupos n= 6	Sem trauma (controle)	Com trauma	* <i>P</i>
Salina	0 (0-1)	2,5 (2-3)	0,0043
L-alanil-glutamina	0 (0-1)	0 (1-2)	0,5271
Dexametasona	0 (0-1)	0 (0-1)	0,5948

Teste: Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney na comparação entre dois grupos.

* grupos com trauma *versus* grupos sem trauma.

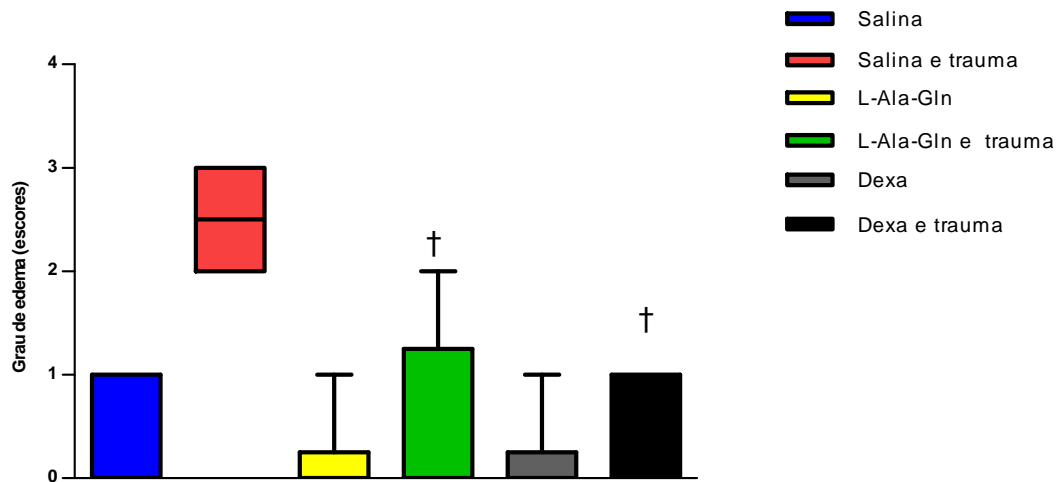


FIGURA 23 – Avaliação histopatológica do grau de edema nos pulmões de ratos submetidos e não submetidos a trauma e tratados com salina, L-alanil-glutamina ou Dexametasona conforme os seguintes critérios: 0 – ausente, 1 – leve, 2 – moderado, 3 – intenso. Os escores expressos em mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo. Teste de Kruskal-Wallis/Dunn em 6 ratos por grupo. **P* < 0,05 comparado ao grupo salina, † *p* < 0,05 comparado ao grupo salina e trauma

4.2.7. Efeito do tratamento da L-alanil-glutamina ou da Dexametasona sob o grau de hemorragia avaliado no pulmão de ratos.

Analisou-se o efeito do trauma muscular sob o grau de hemorragia. Verificou-se que o trauma aumentou significativamente a intensidade de hemorragia no grupo salina ($p=0,0037$) quando comparado ao seu respectivo controle, salina sem trauma. Nos grupos L-Alanil-Gln e Dexametasona não foram observadas nenhuma alteração quando comparados aos seus respectivos controles (Tabela 15).

Observou-se uma redução significativa no grau de hemorragia nos grupos L-alanil-glutamina ($p<0,01$) e Dexametasona ($P< 0,01$), ambos submetidos ao trauma, quando comparados ao grupo salina, submetido ao trauma. Contudo, não foi encontrada diferença significativa no grau de hemorragia entre os grupos tratados com as mesmas substâncias e que não foram submetidos ao trauma (Tabela 17, Figura 24 e 26).

TABELA 15 – Avaliação do grau de hemorragia no pulmão de ratos comparando-se os grupos tratados com salina, L-alanil-glutamina ou Dexametasona submetidos ao trauma com os grupos não submetidos.

Grupos n= 6	Sem trauma (controle)	Com trauma	*P
Salina	0 (0-1)	3 (2-3)	0,0037
L-alanil-glutamina	0 (0-0)	0 (0-1)	-
Dexametasona	0 (0-0)	0 (0-1)	-

Teste: Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney na comparação entre dois grupos.

* grupos com trauma *versus* grupos sem trauma.

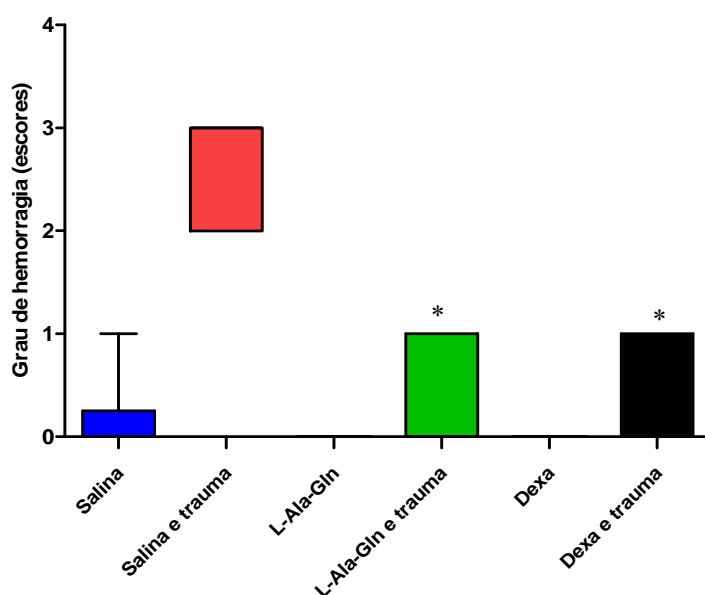


FIGURA 24 – Avaliação histopatológica do grau de hemorragia nos pulmões de ratos submetidos e não submetidos a trauma e tratados com salina, L-alanil-glutamina ou Dexametasona conforme os seguintes critérios: 0 – ausente, 1 – leve, 2 – moderado, 3 – intenso. Os escores expressos em mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo. Teste de Kruskal-Wallis/Dunn em 6 ratos por grupo. **P < 0,01 comparado ao grupo salina sem trauma, *P < 0,05 comparado ao grupo salina e trauma.

4.2.8. Efeito do tratamento da L-alanil-glutamina ou da Dexametasona sob o grau de necrose avaliado no pulmão de ratos.

Analisou-se o efeito do trauma muscular sob o grau de necrose e observou-se um aumento no grupo salina e uma menor intensidade do grau nos grupos L-alanil-glutamina e Dexametasona.

Comparando-se os grupos submetidos ao trauma com os seus grupos controle, não submetidos ao trauma, não observou-se nenhuma alteração significativa (Tabela 16).

Posteriormente constatou-se uma redução significativa do grau de necrose nos grupos L-alanil-glutamina ($p < 0,001$) e Dexametasona ($P < 0,05$), ambos submetidos ao trauma, quando comparado ao grupo salina submetido ao trauma. Nenhuma diferença significativa foi encontrada no grau de necrose entre os grupos tratados com as mesmas substâncias e que não foram submetidos ao trauma (Tabela 17, Figura 25 e 26).

TABELA 16 – Avaliação do grau de necrose no pulmão de ratos comparando-se os grupos tratados com salina, L-alanil-glutamina ou Dexametasona submetidos ao trauma com os grupos não submetidos.

Grupos n= 6	Sem trauma (controle)	Com trauma	*P
Salina	0 (0-0)	3 (2-3)	-
L-alanil-glutamina	0 (0-0)	0 (0-1)	-
Dexametasona	0 (0-0)	0 (0-1)	-

Teste: Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney na comparação entre dois grupos.

* grupos com trauma *versus* grupos sem trauma.

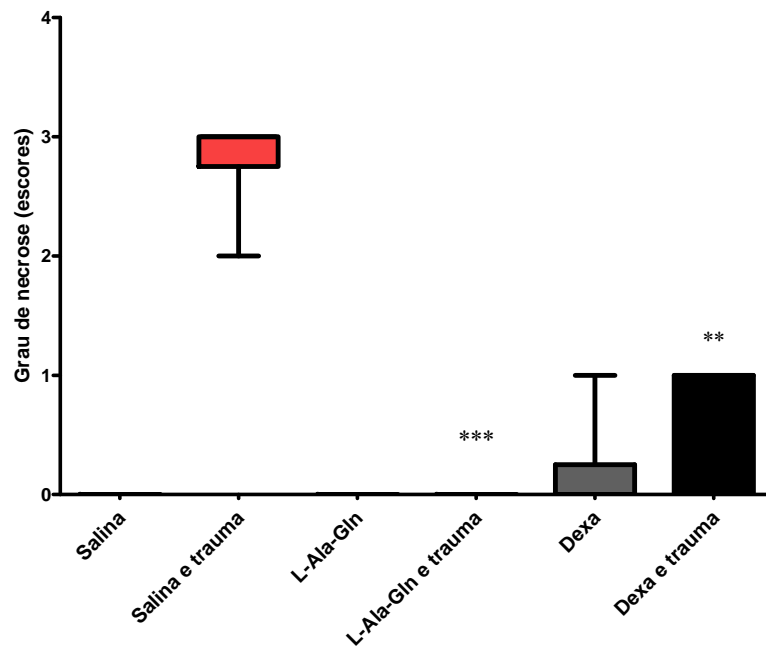


FIGURA 25 – Avaliação histopatológica do grau de necrose nos pulmões de ratos submetidos e não submetidos a trauma e tratados com salina, L-alanil-glutamina ou Dexametasona conforme os seguintes critérios: 0 – ausente, 1 – leve, 2 – moderado, 3 – intenso. Os escores expressos em mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo. Teste de Kruskal-Wallis/Dunn em 6 ratos por grupo. ***P < 0,001 comparado salina sem trauma, ^{†††}P < 0,001 comparado ao grupo salina e trauma, **P < 0,01 comparado ao grupo salina e trauma.

TABELA 17 – Efeito da L-alanil-glutamina e da Dexametasona sobre os escores histopatológicos para lesão pulmonar em ratos comparando-se os grupos submetidos ao trauma com os não submetidos.

Alterações Histológicas	Salina (0-3 escores)		L-alanil-glutamina (0-3 escores)		Dexametasona (0-3 escores)	
	Sem Trauma	Com Trauma	Sem Trauma	Com Trauma	Sem Trauma	Com Trauma
Congestão	0 (0-1)	2,5 (2-3) **	0,5 (0-1)	1,0 (1-2)	0 (0-1)	0 (0-1) ††
Edema	0 (0-1)	2,5 (2-3) *	0 (0-1)	0 (0-2) †	0 (0-1)	0 (0-1) †
Hemorragia	0 (0-1)	3 (2-3) **	0 (0-0)	0 (0-1) †	0 (0-0)	0 (0-1)
Necrose	0 (0-0)	3 (2-3) ***	0 (0-0)	0 (0-0) †††	0 (0-1)	0 (0-1) †

Os escores são expressos em mediana e valores mínimo e máximo conforme os critérios: 0 – ausente, 1 – leve, 2 – moderado, 3 – intenso. Teste de Kruskal-Wallis/Dunn em 6 ratos por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina sem trauma, ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo salina sem trauma, *** $p < 0,001$ comparado ao grupo salina sem trauma, † $p < 0,01$ comparado ao grupo salina e trauma, †† $p < 0,01$ quando comparado ao grupo salina e trauma, ††† $p < 0,001$ quando comparado ao grupo salina e trauma

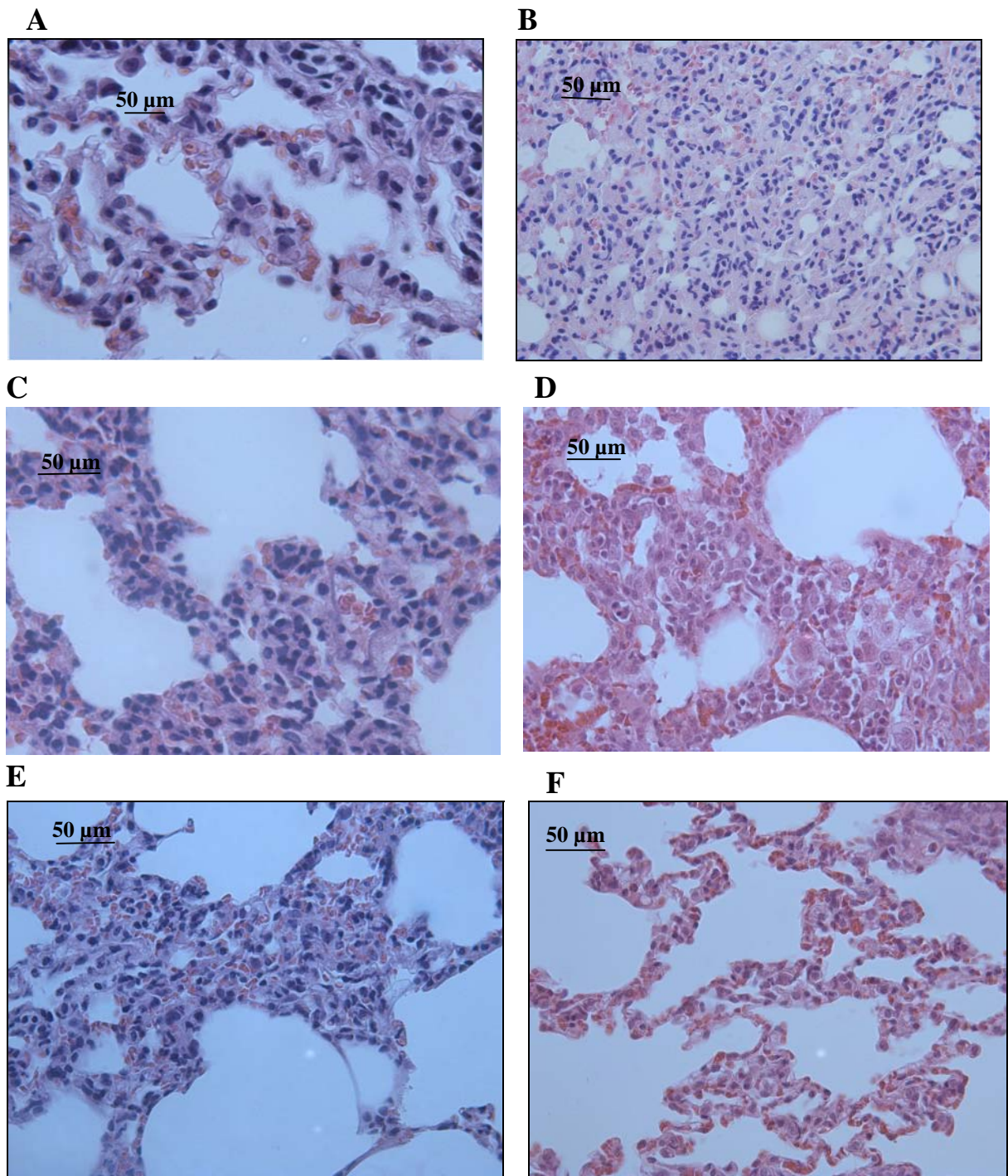


Figura 26 – Fotomicrografia de pulmões de ratos. A- grupo tratado com salina e não submetido a trauma muscular. B - grupo tratado com salina e submetido a trauma muscular. C- grupo tratado com L-alanil-glutamina e não submetido a trauma muscular, D- grupo tratado com L-alanil-glutamina e submetido a trauma muscular. E - grupo tratado com Dexametasona e não submetido a trauma muscular. F grupo tratado com Dexametasona e submetido a trauma muscular. Em A, C e E observa-se leve presença de congestão, discreto edema, e ausência de hemorragia e necrose. B - observa-se intensa presença de congestão, de edema intersticial, de hemorragia e necrose. D e F observa-se moderada congestão, leve presença de edema intersticial, de hemorragia e ausência de necrose (coloração hematoxilina/ Eosina. Magnificação de 400x).

5 DISCUSSÃO

A maioria dos modelos que utilizam animais para indução da lesão pulmonar aguda (LAP) são baseados em distúrbios clínicos que estão associados com LAP e síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) em seres humanos. Os distúrbios mais frequentes incluem sepse, transfusões múltiplas, grandes cirurgias, politrauma, aspiração do conteúdo gástrico, reperfusão de tecidos isquêmicos e exposição a altas concentrações de oxigênio (HUDSON *et al*, 1995).

Hipóteses geradas em estudos com humanos podem ser testadas diretamente em modelos com animais, podendo-se obter resultados de forma mais simples. Sem os modelos com animais, não haveria maneira de testar hipóteses clínicas geradas em pacientes e não haveria maneira de validar a importância dos achados laboratoriais. Os estudos em modelos com animais são mais úteis se as características forem do ponto de vista fisiopatológico relevantes para os seres humanos (MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTIN, 2008).

O animal de experimentação escolhido nessa pesquisa foi o rato *Wistar* albino, macho, com o peso variando entre 200 a 300g. Esse animal é bastante utilizado em estudos experimentais por apresentar baixo custo de aquisição e manutenção, fácil manuseio e elevada resistência à infecção e ao trauma cirúrgico, bem como primorosa hemostasia (FESTING, 1979). Quanto ao procedimento anestésico, optou-se pela administração intraperitoneal (i.p) de solução tribromoethanol 2,5% na dose de 1 ml/100g de peso do animal. Trata-se de um procedimento de fácil execução com o mínimo de equipamento e bem tolerada pelo animal, sem intubação traqueal e sem o emprego de suporte ventilatório.

Vários modelos experimentais referidos na literatura são utilizados para induzir lesão aguda pulmonar como: administração de ácido oléico, instilação endotraqueal de ácido clorídrico, injeção endovenosa de endotoxina, lavagem broncoalveolar com solução salina, lavagem com surfactante, ligadura e perfuração cecal, fratura de fêmur, hiperóxia e modelos de isquemia e reperfusão (OKUTAN, *et al.*, 2004; TIMLIN, *et al.*, 2005; WANG; BONDENSTEIN; MARKSTALEER, 2008; MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTIN, 2008). Esses modelos visam estudar as características e buscar novas abordagens de tratamento da lesão. Entretanto, muitos desses modelos envolvem sofrimento no animal e elevados custos.

Em 2008, Matute-Bello, Frevert e Martin realizaram um estudo de revisão em 1.441 artigos indexados no PubMed, na literatura em língua inglesa, entre o período de 2003 a 2007, para identificar as principais vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de modelos com animais que foram e são usados para estudar os mecanismos e tratamento da lesão aguda pulmonar (LAP). Eles deram ênfase especial aos modelos que tentam reproduzir uma neutrofilia aguda na microvasculatura pulmonar semelhante à observada em humanos. Com base nessas pesquisas nenhum modelo de indução de LAP por trauma muscular foi identificado até o presente momento.

O trauma muscular induz uma resposta inflamatória e ativa várias citocinas (TNF- α , IL1- β , IL-6 e IL-8) e mediadores pró-inflamatórios, os quais podem agir no local da inflamação, podendo ainda ter ação sistêmica e atingir órgãos distantes como o pulmão, ativando neutrófilos e macrófagos alveolares. A ativação de neutrófilos significa, entre outros eventos, um aumento da produção e ativação de enzimas como a mieloperoxidase, um marcador fidedigno de inflamação (SGARBI; SILVA JÚNIOR; HUNGRIA NETO, 2006; LIU; WANG T; WANG W, 2008).

Na fase inicial deste estudo, para tentar conhecer os mecanismos de funcionamento de uma lesão indireta no pulmão, foi testado um novo modelo experimental de indução de lesão aguda pulmonar, causada por trauma muscular cirúrgico em coxas de ratos. No primeiro piloto, avaliou-se apenas a atividade enzimática de mieloperoxidase no pulmão, tendo-se obtido resultados satisfatórios. Num segundo experimento piloto, mediante avaliação histopatológica do tecido pulmonar, outros parâmetros inflamatórios foram observados, como infiltração neutrofilica, edema intersticial, hemorragia e necrose. Verificou-se, também, a concentração de glutathiona no pulmão e sangue.

Realizou-se outros pilotos para investigar o efeito da L-Ala-Gln na lesão pulmonar aguda induzida por trauma muscular, sendo utilizada uma solução de L-Ala-Gln na dose 0,75g/Kg de peso do animal. Elegeu-se essa dose baseado no estudo de Singleton e Wischmeyer (2007), que avaliaram o efeito protetor da glutamina na lesão aguda pulmonar induzida por sepse; e por Perng *et al.*, (2009), que observaram o efeito protetor da L-Ala-Gln na lesão aguda pulmonar induzida por hiperóxia. Com base nos resultados positivos dos experimentos pilotos procurou-se validar o modelo.

Investigou-se o potencial do novo modelo experimental de indução de lesão aguda no pulmão, uma resposta metabólica ao trauma, utilizando um procedimento de trauma muscular cirúrgico. Para validação do modelo, alguns parâmetros inflamatórios foram observados nos pulmões dos animais 24 horas após indução do trauma, como dosagem da

atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), concentração de glutatona e avaliação histopatológica, sendo que nesta última foram avaliados os seguintes critérios: número de neutrófilos (infiltrado inflamatório), grau de congestão vascular, edema intersticial, hemorragia e necrose tecidual. Todos esses parâmetros também foram avaliados no grupo controle, onde os animais foram tratados com salina e não foram submetidos ao trauma.

Adotou-se o tempo de 24 h porque microscopicamente as alterações microcirculatórias, tipo congestão, dilatação venular e edema intersticial, já estão presentes entre 4 a 6 horas após o trauma. A exsudação neutrofílica através da barreira endotelial já pode ser visualizada à microscopia após 8 horas da lesão tecidual. Portanto, os achados de alterações microvasculares e, principalmente, a infiltração neutrofílica intersticial, a nível histológico, estão praticamente no seu ápice, após 24 horas (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2008).

A MPO é uma enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos ativados. Ultimamente, tem sido empregada como marcador quantitativo da infiltração neutrofílica em diversos tecidos acometidos por processo inflamatório. A atividade da MPO é aceita como um padrão fidedigno da infiltração de neutrófilos ativados em tecidos inflamados (BRADLEY, 1982; SGARBI *et al.*, 2005). Determinou-se a atividade da mieloperoxidase (MPO) pulmonar para avaliar atividade dos neutrófilos exudativos e conseqüente análise da inflamação aguda pulmonar como efeito remoto e indireto induzido pelo trauma muscular.

Em situações de estresse, tais como infecções, hipoperfusão, lesão aguda pulmonar, isquemia e reperfusão, o “turnover” da GSH atua como mecanismo de defesa contra as espécies reativas de oxigênio (ERO). A GSH funciona como antioxidante para manutenção das membranas celulares e também atua no reparo dos danos teciduais ocasionados por um estresse oxidativo. Existem evidências de que a depleção de GSH está associada com estados de doença grave (GALERA, 2008).

Neste estudo observou-se que o efeito do trauma promoveu um aumento na atividade de MPO no pulmão do grupo tratado com salina quando comparado ao grupo tratado com salina e não submetido ao trauma (controle) e uma redução na concentração de GSH (**Tabelas 1 e 3, Figuras 9 e 11**). Na análise histopatológica do pulmão, observou-se uma elevação no número de neutrófilos e nos graus de congestão, edema, hemorragia e necrose (**Tabelas 2, 5 a 8, Figuras 10, 13 a 17**).

Os resultados dessa etapa mostraram uma associação entre o aumento da atividade de MPO e o aumento da infiltração de neutrófilos no pulmão, sugerindo assim, que a atividade da enzima está relacionada com a presença de células inflamatórias nos septos

alveolares, em concordância com os resultados histopatológicos que exibem a presença de uma alteração de natureza inflamatória aguda no pulmão, como já descrita por Abraham (2003) e Goodman *et.al.*, (2003).

A Dexametasona é um fármaco com potente efeito antiinflamatório. Terapias com essa droga são potentes em inibir a ação dos genes inflamatórios (gene NF-kB). Elas inibem a transcrição de diversas citocinas que estão envolvidas na geração da LAP, incluindo as interleucinas IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α e o fator estimulante de macrófagos. A Dexametasona também apresenta um efeito inibitório na fibrogênese, age como antagonista do receptor da IL-1 e promove uma estimulação de interleucinas antiinflamatórias como IL-4, IL-10, e IL-13, com função de modular a resposta inflamatória. Outros efeitos, também comprovados, são a estimulação da apoptose de células T, de eosinófilos e dos monócitos bem como inibição da ativação de neutrófilos. Tais efeitos são importantes na manutenção da integridade do endotélio e da permeabilidade vascular, exercendo, dessa forma, um efeito regulatório e protetor na resposta inflamatória (FERNANDES; ZIN; ROCC, 2005).

Observou-se que no grupo tratado com Dexametasona, utilizado como controle para validação deste modelo, esse fármaco foi capaz de exercer um efeito protetor no pulmão por diminuição no grau de congestão, edema, hemorragia e necrose, além da redução da atividade de MPO e do infiltrado neutrofílico, bem como o aumento da síntese de glutatona, quando comparado com o grupo tratado com salina, ambos submetidos ao trauma (**Tabelas 1 a 3 e 5 a 8; Figuras 9 a 11 e 13 a 17**). Um estudo proposto por Labow *et.al.*,(2007), mostrou que durante o período de estresse no pulmão a Dexametasona regula de forma rápida e específica o aumento da expressão enzimática da glutamina sintetase e esta catalisa a síntese de glutamina, que é uma precursora da glutatona, um antioxidante endógeno.

Nenhuma alteração nos parâmetros avaliados foi observada quando comparou-se o grupo Dexametasona seguido do trauma com o grupo salina sem trauma. Esses achados, somados com os resultados citados anteriormente, levantam uma hipótese positiva de que esse modelo é capaz de causar lesão aguda no pulmão.

O processo inflamatório deflagrado pelo efeito remoto do trauma, quando as citocinas e os mediadores pró-inflamatórios saem do controle, ativa sobremaneira os polimorfonucleares na microvasculatura pulmonar, fato este central para o desenvolvimento de lesão pulmonar aguda, na síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS). Sabe-se que a diminuição dos polimorfonucleares pulmonares mostra-se protetora de tal lesão (HARKIN *et al.*, 2002; LANDIM, 2008).

O trauma muscular cirúrgico proposto neste estudo foi capaz de causar danos à membrana alvéolo-capilar por promover desenvolvimento de congestão microvascular, edema alveolar intersticial, hemorragia, necrose, ativação e recrutamento de neutrófilos no interstício pulmonar, além de induzir ao aumento da atividade da enzima MPO, caracterizando assim a instalação de uma reação pulmonar inflamatória aguda.

A glutamina (GLn) tem sido foco de grande interesse no vasto campo das pesquisas científicas, por possuir numerosas propriedades fisiológicas. Um estudo realizado por Wischmeyer *et al.*, (2001), relatou que a glutamina atenuava a resposta inflamatória em quadros clínicos de grande estresse como: cirurgias cardíacas, vasculares e transplantes, além de lesões graves como traumas e grandes queimaduras, reduzindo a morbidade e a mortalidade de pacientes graves.

Pesquisas em animais que envolvem modelos de lesões e doenças também demonstraram que o suplemento de glutamina melhora a sobrevivência e modula a função imune. Em um estudo desenvolvido por Ding e Li (2003), em que os animais foram tratados com glutamina e submetidos a trauma cirúrgico (laparotomia) seguido da administração intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS), observou-se uma redução na concentração de IL-6 e no dano intestinal quando comparado ao grupo controle que não recebeu glutamina.

Hayashi *et al.*, (2002) verificaram que o pré-tratamento com glutamina antes da cirurgia cardíaca em pacientes que utilizaram circulação extracorpórea foi capaz de aumentar a expressão da proteína de choque térmico 70 (HSP70, heat shock protein 70). Durante as cirurgias cardíacas é comum a utilização de circulação extracorpórea que pode desencadear uma reação inflamatória sistêmica regida por uma produção anormal de citocinas inflamatórias e de óxido nítrico. Nesse contexto, o estímulo à expressão da HSP70 foi capaz de produzir inibição da enzima óxido nítrico sintetase, atenuando a resposta inflamatória.

Em 2001, Wischmeyer *et al.* mostraram que a glutamina é provável indutora das HSP72 e 27, as duas principais variedades de HSP citoprotetoras em ratos com sepse induzida por lipopolissacarídeo (LPS). De forma semelhante, a glutamina estimula a expressão de HSP 72 em ovelhas com endotoxemia. Esses estudos levantam a hipótese de que a GLn pode modular o processo inflamatório por aumentar a expressão das HSPs, por regular a produção de NO e de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α , IL-8. O mecanismo proposto para essa regulação seria a inibição do processo de transcrição dos genes das citocinas e inibição da enzima óxido nítrico sintetase (NASCIMENTO, 2004).

Nakamura *et al.* (1997), Labow *et al.*, (1998), Liu *et al.*, (2008) e Zhang *et al.*, (2009) demonstraram que a administração endovenosa de alanil-glutamina em ratos exerceu

efeito protetor na lesão aguda pulmonar induzida por LPS. Perng *et al.*, (2009) relataram que a glutamina sob a forma alanil-glutamina, quando aplicada durante a hiperóxia em camundongos, exerceu um efeito protetor da lesão pulmonar aguda, além de melhora da sobrevida.

Conforme registro na literatura, observa-se que a glutamina exerce um papel na regulação da atividade de células inflamatórias, motivo esse que avaliou-se o efeito da L-alanil-glutamina na lesão aguda pulmonar induzida por trauma muscular cirúrgico.

No segundo momento desse estudo, procurou-se avaliar o efeito da L-alanil-glutamina na resposta inflamatória pulmonar aguda após o trauma muscular cirúrgico. Concomitantemente, avaliou-se a atividade da MPO no pulmão, a concentração de glutathione no sangue e no pulmão, e, mediante avaliação histopatológica, o número de neutrófilos, o grau de congestão, o edema intersticial, a hemorragia e a necrose.

A administração do nutracêutico L-alanil-glutamina e do fármaco Dexametasona, no pulmão de ratos não submetidos ao processo de indução do trauma foi o primeiro passo a ser investigado. Os resultados demonstraram que não foram encontradas diferenças significativas, entre os grupos testados, na atividade de MPO, nas concentrações de GSH (sangue e pulmão), no número de neutrófilos, nos graus de congestão, edema, hemorragia bem como ausência de necrose no tecido pulmonar (**Tabelas 9 a 13 e Figuras 18 a 26**). Diante do exposto, verificou-se que a administração endovenosa de três doses de L-alanil-glutamina (0,75g /Kg de peso), nos tempos citados na metodologia (Figura 3), não provocou lesão aguda pulmonar. No grupo tratado com Dexametasona também não foi observada nenhuma alteração decorrente da administração, posto que sabe-se que essa droga quando usada em períodos curtos, não possui efeito imunossupressor (SHIUE; THRALL, 1991).

Este estudo, quando comparou o grupo tratado com Ala-GLn com o grupo tratado com salina, ambos submetidos a trauma, revelou que o tratamento endovenoso com a L-alanil-glutamina reduziu a atividade de MPO e da infiltração neutrofílica no tecido pulmonar além de promover um aumento da síntese de GSH no pulmão. Entretanto, não foi observada nenhuma alteração na concentração de glutathione no sangue, sugerindo que a glutamina exerce um efeito protetor no pulmão e não necessariamente a nível sistêmico (**Tabela 8 e Figura 21**). Na avaliação histopatológica, observou-se uma diminuição no grau de edema e de hemorragia, bem como ausência de necrose (**Tabelas 9 a 13 e Figuras 18 a 26**). Esses resultados corroboram com o encontrado na literatura, na qual a glutamina também promoveu uma redução na atividade de MPO, no infiltrado neutrófilico, aumento de GSH, em modelos

de lesão pulmonar induzida por lipopolisacarídeo e hiperóxia (LIU *et al.*, 2008; PERNG *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009).

Existem alguns mecanismos propostos na literatura para explicar a forma pela qual a L-alanil-glutamina regula a resposta inflamatória aguda no pulmão decorrente do trauma muscular. O primeiro mecanismo proposto é o fato de a glutamina ser um aminoácido gliconeogênico e funcionar como substrato energético para células do sistema imune (linfócitos, macrófagos e neutrófilos). Estas células são de fundamental importância não só na elicitação da reação inflamatória como também na modulação e regulação da inflamação, sendo importante em condições clínicas de trauma, sepse, queimaduras e recuperação cirúrgica (CURI *et al.*, 1998).

Um segundo mecanismo proposto para modulação da inflamação pela glutamina relaciona-se ao fato de a Ala-GLn reduzir significativamente a expressão de CD11b/CD18, membros da família das integrinas, na membrana dos neutrófilos e atividade de MPO no tecido pulmonar. Em modelos de lesão aguda pulmonar induzidos por isquemia/reperfusão e polissacarídeos, em ratos e camundongos, observou-se que esse mecanismo é explicado pelo fato de a glutamina impedir o recrutamento e a infiltração dos neutrófilos, protegendo assim a barreira alveolar do dano neutrofilico induzido, atenuando assim a resposta inflamatória (ZHANG *et al.*, 2009). O aumento da expressão das moléculas de adesão CD11b/CD18, durante a inflamação pulmonar, fixa os neutrófilos na microcirculação pulmonar por influência de mediadores quimiotáticos como a IL-8. Os neutrófilos ativados por pares de moléculas de adesão atravessam ativamente a barreira endotelial por diapedese, onde geram espécies reativas de oxigênio e outros elementos tóxicos que lesionam o tecido pulmonar por um dano alveolar difuso (ZHAO *et al.*, 2005).

Um terceiro mecanismo, refere-se ao aumento da capacidade antioxidante do pulmão pela elevação da síntese de glutathione (GSH). A glutathione é um antioxidante importante em muitos tipos de células, incluindo células do fígado, hemácias e células epiteliais alveolares. Também tem sido implicada na modulação de respostas imune e inflamatória. Estudos mostraram que as doenças inflamatórias como a asma, SARA, doença pulmonar obstrutiva crônica, alveolite fibrosante e fibrose cística estão associadas com alterações nas concentrações de GSH no lavado broncoalveolar (LBA) ou nas células epiteliais pulmonares. Após a captação nessas células, GLn é convertida em glutamato e amônia. O glutamato é um substrato necessário para a síntese de glutathione. A glutathione é um tripeptídeo composto de glutamato, glicina e cisteína. Ela desempenha um papel essencial como agente antioxidante em lesões que envolvem estresse oxidativo (ZHANG, *et al.*, 2009).

Zhang *et al.*, (2009), mostraram que o pré tratamento com L-Ala-Gln aumentou a síntese de glutatona no pulmão em modelo de LAP induzida por LPS. Esses resultados corroboram com o encontrado neste estudo.

Outro mecanismo proposto para modulação da inflamação pela glutamina refere-se aos estudos experimentais que têm demonstrado que a indução de HSP oferece proteção contra uma variedade de danos nos tecidos, incluindo a lesão pulmonar aguda induzida por embolia, sepse e choque. A glutamina é um indutor bem documentado de HSP. Dados em animais demonstram que a glutamina aumenta a expressão de HSP e melhora a sobrevivência após sepse, lesão pulmonar aguda e reperfusão cardíaca. Além disso, a melhor expressão de HSP atenua as concentrações plasmáticas de TNF- α e IL-1 *in vivo* (HIRATSUKA *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 2003).

No estudo desenvolvido por Perng *et al.*, (2009), observou-se que a administração de glutamina aumentou a expressão da HSP70 no pulmão exposto a hiperóxia. Esse resultado é comparável com os estudos anteriormente citados, mostrando que a administração de glutamina reforça a expressão de HSP nos tecidos dos animais experimentais. A HSP70 é uma das principais proteínas citoprotetoras induzidas por choque térmico em mamíferos. A expressão da HSP, após traumas, pode induzir uma proteção contra lesões potencialmente letais.

Diante desse contexto, esses mecanismos descritos corroboram e confirmam o efeito protetor da L-alanil-glutamina na lesão pulmonar aguda induzida por trauma muscular.

Ambas as lesões, direta e indireta, na membrana alvéolo-capilar, têm sido utilizadas em vários modelos experimentais para se estudar a LAP. Vários estudos utilizando modelos, como sepse, aspiração, LPS, ácido oléico, que causam lesão pulmonar aguda têm mostrado que os corticóides promovem uma diminuição na intensidade da resposta inflamatória (FERNANDES; ZIN; ROCCO, 2005).

Para demonstrar o efeito protetor da glutamina, utilizou-se a Dexametasona como controle positivo. Quando comparou-se o grupo que recebeu Dexametasona com o grupo que recebeu salina, ambos submetidos a trauma muscular, os resultados demonstraram que a Dexametasona, além de promover um aumento na concentração de GSH, foi capaz de exercer um efeito protetor no pulmão por reduzir a atividade de MPO e do infiltrado neutrofílico, bem como reduziu os graus de congestão, de edema intersticial, de hemorragia e ausência de necrose (**Tabelas 5 a 9 e Figuras 18 a 26**). Observou-se também que não houve alterações significativas das concentrações de GSH no sangue entre esses grupos

Na comparação dos resultados entre os grupos Dexametasona com L-Aln-Gln, ambos submetidos ao trauma, a L-Ala-Gln conferiu um efeito protetor semelhante ou superior à Dexametasona nos parâmetros: concentração de glutathione no pulmão, infiltração neutrofílica, grau de edema intersticial e de hemorragia. Nos parâmetros MPO, congestão e necrose a Dexametasona protegeu mais que a L-alanil-glutamina. A Dexametasona estimula a síntese de enzimas necessárias para diminuir a resposta inflamatória. Sua eficácia primária é a de ser um potente antiinflamatório. O mecanismo proposto para explicar o efeito protetor da Dexametasona é o mesmo citado anteriormente.

Trabalhou-se com a hipótese de que uma reação inflamatória sistêmica pode acompanhar grandes lesões musculares. O trauma muscular cirúrgico, modelo experimental desse estudo, induziu uma resposta inflamatória aguda no pulmão, por promover uma redução na concentração de glutathione, um aumento da atividade de MPO e do infiltrado neutrofílico, bem como por uma elevação no grau de congestão microvascular, de edema intersticial, de hemorragia e de necrose no tecido pulmonar.

O modelo de LAP induzido por trauma muscular cirúrgico pode ajudar a compreender mecanismos fisiopatológicos que afetam órgãos distantes da musculatura lesada.

O tratamento com L-Aln-Gln exerceu um efeito protetor na lesão aguda pulmonar induzida por trauma muscular por promover um aumento na síntese de glutathione, redução da atividade de MPO e diminuição do infiltrado neutrofílico, bem com redução da intensidade do edema intersticial, da hemorragia e ausência de necrose no tecido pulmonar.

Por fim, ressalte-se que a lesão pulmonar aguda induzida por trauma é complexa e novos estudos são necessários a fim de elucidar os mecanismos protetores da glutamina e de outras substâncias nesse novo modelo. Pesquisas adicionais que utilizem dosagens de citocinas, tais como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α , e determinem a expressão das proteínas de choque HSP70, HSP72 e HSP27 no tecido pulmonar, no lavado brônquico e no sangue permitirão uma avaliação mais precisa do potencial protetor da L-alanil-glutamina.

6 CONCLUSÃO

O modelo de lesão muscular esquelético cirúrgico proposto nesse estudo é capaz de induzir uma reação inflamatória aguda no pulmão. A intensidade dessa lesão foi reduzida pelo tratamento de L-alanil-glutamina.

7 REFERÊNCIAS

ABRAHAM, E. Neutrophils and acute lung injury. **Crit. Care Méd.**, v. 31, n. 4, p. 195- 199, 2003.

ALVES, W. F. **Efeitos da L-alanil-glutamina sobre as concentrações sanguíneas e teciduais in vivo de metabólicos e enzimas em pacientes com isquemia dos membros inferiores submetidos e revascularização distal.** 2004. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

ALVES, W. F.; GUIMARÃES, S. B.; DIAS, D. A.; VASCONCELOS, P.R.C.; COELHO, V. P. M.; Efeitos da L-alanil-glutamina sobre os parâmetros bioquímicos do sangue e do rim no rato submetido à isquemia/reperfusão do membro pélvico. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 6, p. 445-449, 2005.

ALVES, W. F.; GUIMARÃES, S. B.; VASCONCELOS, P. R. C.; VASCONCELOS, P. R. L. Repercurssão da L-alanil- glutamina sobre as concentrações de lactato e lactato desidrogenase (LDH) em pacientes com isquemia crítica dos membros inferiores submetidos a revascularização distal. **Acta Cir. Bras.**, v. 18, n. 3, p. 209- 215, 2003.

ANTONIAZZI, P.; PEREIRA, G. A. J.; MARSON, F.; ABEID, M.; BALDISSEROTTO, S.; BASILE, A. F. Síndrome da angústia respiratória aguda (SARA). **Med Rib Preto**, v. 31, p. 493-506, 1998.

BALDWIN S. R.; SIMON R. H.; GRUM C. M.; KETAIL L.H.; BOXER L. A.; DEVALL, K. J. Oxidant activity in expired breath of patients with the adult respiratory distress syndrome. **Lancet**, v. 4, p. 11-4, 1986.

BARBOSA, R. C. C.; GUIMARÃES, S. B.; VASCONCELOS, P. R. C.; CHAVES, C.R.; VASCONCELOS, P. R. L. Efeito metabólico da glutamina em ratos submetidos à queimaduras por água fervente (escaldura). **Acta Cir. Brás.**, v. 18, n. 2, p. 527-533, 2003.

BORGES, M. C.; ROGERO, M. M.; TIRAPEQUI, J. Suplementação enteral e parenteral com glutamina em neonatos pré-termo e com baixo peso ao nascer. **Braz J Pharmac Sci.**, v. 44, n. 1, jan/mar, 2008.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Celullar and extracellular mieloperoxidase In pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, p. 618-22, 1982.

BURNS, A. R.; SMITH, C. W.; WALKER, D. C. Unique Structural Features That Influence Neutrophil Emigration Into the Lung. **Physiol. Rev.**, v. 83, p. 309-336, 2003.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica Ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, 1996.

CIPOLLE, M. D. ; PASQUALE, M. D. ; CERRA, F. B. Secondary organ dysfunction: from clinical perspectives to molecular mediators. **Crit Care Clin.**, v.9, p. 261-97, 1993.

COHEN, S. M; SIDDIQI, F. A.; DARAKCHIEV, B.; FANTINI, G. A.; HAIRI, R. J.; BARIE, P.S. Attenuation of acute lung injury caused by hind-limb ischemia-reperfusion injury by butylactone anti-inflammatory agent FL 1003. **J Trauma.**, v. 43, n. 2, p. 247-52, 1997.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Robbins Pathologic Basis of Disease**. 8 th edition. Philadelphia. 2008. p. 44-69.

CURI, R. **Glutamina – Metabolismo e aplicações clínicas e no esporte**. Rio de Janeiro: Sprint, 2000.

CURI, R., NEWSHOLME, P., PITHON-CURI, T. C, PIRES DE MELO, M., GARCIA, BITTENCOURT, J. R, GUIMARÃES, A. R. P. Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages nad neutrophils. **Braz J Med Biol Res.**, v. 32, p.15-21, 1999.

CURTHOYS, N. P.; WATFORD, M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 15, p. 133-159, 1995.

DAVID, A.; KAUFMAN, M. D.; **ADAM Health Illustrated Encyclopedia**, 2006.

DE BEAUX, A. C.; ROSS, J.; FEARON, K.; CARTER, D. Severe acute pancreatitis is associated with prolonged blood monuclear cell interleukin-6 and interleukin-8 release. **HPB Surg**, v. 9, p. 1998.

DESBOROUGH, J. P. The stress response to trauma and surgery. **Brit J Anaesth**, v. 85, n. 1, p. 109-117, 2000.

DIESTEL, C. F.; LOPES PAULO, F; MARQUES, R. G. *et al.* Efeito da suplementação oral de l-glutamina na parede colônica de ratos submetidos à irradiação abdominal. **Acta Cir. Brás.**, v. 20, n. 2, p. 134-139, 2005.

DING, L. A.; LI, J. S. Effects of glutamine on intestinal permeability and bacterial translocation in TPN-rats with endotoxemia. **World J Gastroenterol**, v.9, p.1327-32, 2003.

DUAN, X.; BERTHIAUME, F.; YARMUSH, D.; YARMUSH, M.L. Proteomic analysis of altered protein expression in skeletal muscle of rats in a hypermetabolic state induced by burn sepsis. **Biochem. J.**, v. 397, p. 149–158, 2006.

FAYMONVILLE, M. E.; PINCEMAIL, J.; DUCHATEAU, J. *et al.* Myeloperoxidase and elastase as markers of leukocyte activation during cardiopulmonary bypass in humans. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 102, p. 309-17, 1991.

FERNANDES, A. B. S.; ZIN, W.A.; ROCCO, P. R. M. Corticosteroids in acute respiratory distress syndrome. **Braz J Med Biol Res.**, v.38, p. 147-159, 2005.

FERREIRA, A. L. A.; XMATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FESTING, M. F. W. Suitability of the rat for different investigation. In: laboratory animals, mouse and rat. **Bethesda Fed Am Soc Exp Biol.**, v.1, p. 237-238, 1979.

FOEX, B. A. Systemic responses to trauma. **Brit Med Bull**, v. 55, p. 726-743, 1999.

FONTANA, K. E.; VALDES, H.; VALDISSERA, V. Glutamina como suplemento ergogênico. **R. bras. Ci e Mov.**, v. 11, n. 3, p. 91-96, 2003.

GALERA, S.C. **Efeitos da suplementação oral de glutamina sobre o estresse oxidativo em indivíduos de meia-idade e idosos.** 2008. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

GIANNOUDIS, P.V. Current concepts of the inflammatory response after major trauma: an update. **Injury, Int. J. Care Injured**, v. 34, p. 397–404, 2003.

GIANNOUDIS, P. V.; PAPE, H. C.; COHEN, A. P.; KRETTEK, C.; SMITH, R. M. Systemic Effects of Femoral Nailing – Review. **Clin Orthop Rel Res.**, n. 404, p. 378–386, 2002.

GIANNOUDIS, P. V.; HILDEBRAND, F.; PAPE, H. C. Inflammatory serum markers in patients with multiple trauma. Can they predict outcome? **J Bone & Joint Surg**, v. 86, n.3, p. 313-323, 2004.

GOODMAN, R. B.; PUGIN, J.; LEE, J. S.; MATTHAY, M. A. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. **Cytokine & Growth Fac Rev**, v. 14, p. 523-535, 2003.

GRANGER, D. N.; KUBES, P. The microcirculation and inflammation: Modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. **J Leukoc Biol**, v. 55, p. 662-675, 1994.

GRECA, F.H.; GONÇALVES, N. M. F. M.; SOUZA, Z. A. F.; SILVA, A. P. G.; MIMA, W. H.; MIMA, H. H. The role of the methylene blue as a lung protector after intestinal ischemia and reperfusion. **Acta Cir. Bras.**, v. 19, n. 4, 2004.

HARKIN, D. W.; D'SA, A. A. B. B.; MCCALLION, K.; HOPER, M.; CAMPBELL, F. C. Ischemic preconditioning before lower limb ischemia-reperfusion protects against acute lung injury. **J Vas Surg**, v. 35, p 1264-1273, 2002.

HAYASHI, Y.; SAWA, Y.; FUKUYMA, N.; NAKAZAWA, H.; MATSUDA, H. Preoperative glutamine administration induces heat-shock protein 70 expression and attenuates cardiopulmonary bypass-induced inflammatory response by regulation nitric oxide synthase activity. **Circulation**, v. 106, p. 2602-07, 2007.

HOUDJIK, A. P. J.; RIJNSBURGER, E. R.; JANSEN, J.; WESDORP, R. I. C.; WIESS, J. K.; MCCAMISH, M. A.; TEERLINK, T.; MEUWISSEN, S. G. M.; HAARMAN, H. J. T. H. M.; THIJIS, J. G.; VAN LEEUWEN, P. A. M. Randomized trial of glutamine-enriched enteral nutrition on infectious morbidity in patients with multiple trauma. **Lancet**, v. 352, p. 772-76, 1998.

HIRATSUKA, M., YANO, M., MORA, B. N., NAGAHIRO, I., COOPER, J.D., PATTERSON, G.A. Heat shock pretreatment protects pulmonary isografts from subsequent ischemia-reperfusion injury. **J Heart Lung Transplant.**, v. 17, p. 1238-46, 1998.

HUANG, K. L, WU C. P., CHEN, Y. L, KANG, B.H, LIN, Y. C. Heat stress attenuates air bubble-induced acute lung injury: a novel mechanism of diving acclimatization. **J Appl Physiol.**, v. 94, p. 1485-90, 2003

HUDSON, L. D, MILBERG, J. A, ANARDI, D., MAUNDER, R. J. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 151, p. 293-301, 1995.

KAIRALLA, R. A.; FRANCA, S. A. Ventilação mecânica na síndrome da angústia respiratória aguda: impacto da utilização de volume corrente baixo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 46, n. 4, p. 289-311, 2000.

LANDIM, E. R. **Efeito do pré-tratamento com L-alanil-glutamina e condicionamento isquêmico em modelo de isquemia / reperfusão de membros pélvicos em ratos.** 2008. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

LIU, J. C.; WANG, H. T.; WANG, W. Protective effects of alanyl-glutamine on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in rats. **J Cent Suth Univ (Med Sci)**, v. 33, n. 12, p. 1095-06, 2008.

MATUTE-BELLO, G.; FREVERT C. W.; MARTINS, T. R. Animal models of acute lung injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 295, p 379-399, 2008.

MCPHERRON, A. C.; LAWLER A. M.; LEE S. J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. **Nature**, v. 387, p. 83-90, 1997.

MEERAN, H. The systemic inflammatory response syndrome. **Trauma**, v. 3, p. 89-100, 2001.

MELO, J. U. S. **Ácidos graxos ômega-3 e ômega-6, dimetilsulfóxido e Ternatina na regeneração hepática e no estresse oxidativo em ratos.** 2006. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

MICHAELSON, M. Crush injury and crush syndrome. **Worl J Surg**. v. 16, p. 899-903, 1992

MOURA, H. V; POMERANTZEFF, P. M. A; GOMES, W. J. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas. **Rev Bras Cir Cardiovas**, v.16, n. 4, p. 376-387, 2001.

NASCIMENTO, S. B. **Estudo do efeito da variação da concentração sérica de glutamina sobre o edema leucócito-dependente e a migração de polimorfonucleares.** 2004. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

OKUTAN, H.; SAVAS, C.; OZGUNER, F.; YONDEN, Z.; EREN, V. C.; DELIBAS, N. Lung injury after aortic occlusion-reperfusion in rats: the role of gadolinium chloride. **Tohoku J Exp. Med.**, v. 203, p. 267-273, 2004.

OLIVEIRA, R. H. R.; BASILLE, A. F. Incidência de lesão pulmonar aguda e síndrome da angústia respiratória aguda no centro de tratamento intensivo de um hospital universitário: um estudo prospectivo. **J. Bras. Pneumol.**, v. 32, n. 1, 2006.

PACIFICO, S. L.; LEITE, H. P.; CARVALHO, W. B. A suplementação de glutamina é benéfica em crianças com doenças graves? **Ver. Nutr.**, v. 18, n. 1, p. 95-104, 2005.

PERNG, W. C.; HUANG, K. L.; LI, M. H.; HSU, C. W.; TSAI, S.H.; CHU, S. J.; CHANG, D. M. Glutamine attenuates hyperoxia-induced acute lung injury in mice. **Clin Exp Pharm Phy.**, v. 9999, n. 999A, 2009.

RIVKIND, A. I. ; SIEGEL, J. H.; LETTLETON, M.; DE GAETANO, A.; MAMANTOV, T. ; LAGHI, F. *et al.* Neutrophil oxidative burst activation and the pattern of respiratory physiologic abnormalities in the fulminant post-traumatic adult respiratory distress syndrome. **Circulatory Shock**, v. 33, p. 48-62, 1991.

RUBIN, E.; FABER, J. L. **Patologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Ed. Ganabara Koogan, 2003.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. – Estimation of Total Protein-Bound, Non-Protein Sulphydril Group in Tissue with Ellman's Reagent. **Anal. Biochem.**, v. 25, p.192-205, 1968.

SENA, J. I. N. **L- Alani-glutamina, ômega-6 e ômega-3 na Resposta Metabólica e no Estresse Oxidativo em Ratos Submetidos ao Trauma e a Sepsis**. 2006. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

SGARBI, M. W. M. **Síndrome do esmagamento: análise dos seus mecanismos em modelos experimentais**. 2005. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SGARBI, M. W. M.; SILVA, B. A. J.; NETO, J. S. H. The importance of systemic inflammatory response (SIRS) in the prognosis of polytraumatized patients. **Rev Bras Ortop.**, v.41, n.1, p. 1-6, 2006.

SHIUE, S. T.; THRALL, R. S. Effect of corticosteroid therapy on the acute injury and recovery stage of oleic acid induced lung injury in the rat. **Exp Lung Res**, v.17, p. 629-638, 1991.

SINGLETON, K. D.; WISCHMEYER, P. E.; Glutamine's protection against sepsis and lung injury is dependent on heat shock protein 70 expression. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 292, p. 1839-45, 2007.

SLEIN *apud* VASCONCELOS, P.R.L. **Hepatic Metabolism During Sepsis**. Tese (PhD) – Oxford University. England, 1998.

SOUBA, W. W. Intestinal glutamine metabolism and nutrition. **J. Nutr. Biochem.**, v. 4, p. 2-9, 1993.

STAHEL, P., SMITH., W, MOORE, E. Papel de modificadores biológicos que regulam a resposta imunológica após o trauma. **Ferimento.**, v. 38, p.1409-1422, 2001.

TERUYA, R. **Estudo de aspectos morfológicos e funcionais do rim de ratos submetidos à isquemia e reperfusão de músculo esquelético, sob a ação da pentoxifilina**. 2006. Dissertação de mestrado – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2006.

TIMLIN M, CONDRO C, TOOMEY D, POWER C, THORNES B, KEARNS S, STREET J, MURRAY P, BOUCHIER-HAVES D. N-acetylcysteine attenuates lung injury in a rodent model of fracture. **Acta Orthop Scand.** v. 75 (1), p. 61-65, 2004.

UCHIYAMA, M.; MIHARA, M. Determination of Malonaldehyde in Tissues by Thiobarbituric Acid Test. **Analyt. Biochem.**, v. 86, p.271-78,1978.

VALOIS, C. R. A. **Estudo da expressão de moléculas de adesão celular durante a migração transendotelial dos leucócitos no pulmão de camundongos tratados com nanopartículas magnéticas recobertas com DMSA**. 2006. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

WAITZBERG, D. L. **Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2009.

WANG, H. M. W.; BODENSTEIN, M.; MARKSTALLER, K. Overview of the pathology of three widely used animal model s of acute lung in jury. **Eur Surg Res**, v. 40, p 305-316, 2008.

WARE, L. B.; MATTHAY, M. A. The Acute Respiratory Distress Syndrome. **N. Eng. J. Med**, v. 342, n.18, p. 1334-1349, 2000.

WILLIAMSON, D. H.; MELLANBY, J.; KREBS, H. A. Enzimic determination of the D-Beta-hydroxybutiric acid and acetoacetic acid in blood. **Biochem. J.**, v. 82, p. 90-96, 1962.

WISCHMEYER, P. E.; KAHANA, M.; WOLFSON, R.; REN, H.; MUSCH, M. M.; CHANG, E.B. Glutamine induces heat shock protein and protects against endotoxin shock in the rat. **J Appl Physiol.**, v. 90, n.6. p. 2403-2410, 2001.

WISCHMEYER, P. E. Glutamine and shock protein expression. **Nutrition**, v. 18, n.3, p. 225-227, 2002.

WISCHMEYER, P. E.; RIEHM, J.; SINGLETON, K.D.; REN, H.; MUSCH, M.W.; KAHANA, M.; CHANG, E. B. Glutamine attenuates tumor necrosis factor-alpha release and enhances heat shock protein 72 in human peripheral blood mononuclear cells. **Nutrition**, v. 19, n.1, p.1-6, 2003.

WISCHMEYER, P. E. Glutamine: mode of action in critical illnes. **Crit Care Med.**, v. 31, n. 9, p. 541-544, 2007.

YASSIN, M. M.; HARKIN, D.W.; BARROS D'SA, A. A.; HALLIDAY, M. I.; ROWLANDS, B. J. Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. **World J Surg**, v. 26, n. 1, p. 115-121, 2002.

YASUHIRO, T.; TAKAHASHI, H.; KOBAYASHI, M.; HANAFUSA, T.; HERNDON, D. N.; SUZUKI, F. CCL2, a product of mice early after systemic inflammatory response syndrome (SIRS), induces alternatively activated macrophages capable of impairing antibacterial resistance of SIRS mice. **J.Leukoc. Biol.**, v. 76, p. 368-373, 2004.

YEH, S. L.; LAI, Y. N.; SHANG, H. F.; LIN, M. T.; CHIU, W. C.; CHEN, W. J. Effects of glutamine supplementation on splenocyte cytokine mRNA expression in rats with septic peritonitis. **World Journal of gastroenterology**, v.11, n. 12, p. 1742-1746, 2005.

ZHANG, F.; WANG, X.; PAN, L.; WANG, W.; LI, N., LI, J. Glutamine attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Nutrition**, v.25, p. 692-698, 2009.

ZHEUTLIN, L. M.; THONOR, E. J.; JACOBS E. R. Plasma elastase levels in the adult respiratory distress syndrome. **Crit Care Med**, v. 1, p. 39-44, 1986.

8 APÊNDICE A – MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

1. Drogas, soluções e reagentes

- Ácido Tricloroacético (ATC) 50%
- Álcool absoluto e álcool etílico
- Bálsamo Canadá e Etela
- Decadron Injetável – fosfato dissódico de Dexametasona - Aché, Laboratórios Farmacêuticos S.A.
- Diidrocloreto de O-dianisidine (Sigma)
- (DTNB) 5,5`-ditiobis (2-ácido nitrozenzóico)
- EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético)
- Formol tamponado 10%
- Glutathione -GSH
- Heparina (Roche)
- L-alanil- glutamina (Dipeptiven ®, do Laboratório Fresenius)
- Metanol
- Parafina histológica
- Polivinilpirrolidona (PVPI - Povidine[®])
- Quite H&E
- Solução salina (solução de NaCl a 0,9%)
- TRIS (Hidroximetil) Aminometano (C₄H₁₁NO₃)
- Tampão de brometo de cetil trimetil amônio (HTAB)
- Tampão fosfato de potássio
- Xilol

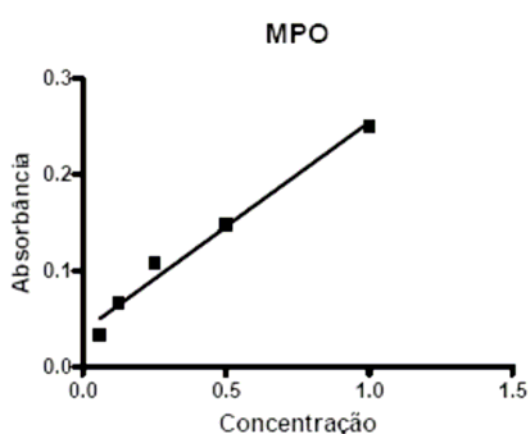
2. Aparelhagem

- Balança analítica (modelo H5, Mettler, Suíça)
- Balança para analítica (tara de 0 a 2000g, Mettler P3. USA)
- Centrífuga para tubo e Eppendorf
- Espectrofotômetro (modelo DU, Beckman, Fullerton, CA, USA) com medidor de absorvância digital (Modernization System, Gilford, Oberlin, Ohio, USA)
- Estufa
- Freezer – 70°
- Medidor de pH micronal (pH - metro B374)
- Micrótomo rotativo
- Microscópio
- Vortex

3. Diversos

- Cubetas para leitura ultravioleta
- Indicador de pH universal
- Nitrogênio líquido
(White Martins, São Paulo – SP, Brasil)
- Tubos de ensaio de vidro de 10ml
- Pipeta automática de 5 a 1000 microlitros
- Ponteiras descartáveis para pipeta automática
- Provetas
- Garrafa térmica de 3 litros para acondicionar nitrogênio líquido durante o experimento
- Seringas de 3ml e 5ml
- Material cirúrgico: pinças diversas, bisturi, tesouras, fios de sutura
- Luvas de procedimento (Blowtex, USA)
- Gazes e algodão
- Lâminas ,lamínula,

9 APÊNDICE B – CURVA PADRÃO PARA CÁLCULO DA ATIVIDADE DA ENZIMA DE MIELOPEROXIDASE (MPO)



Best-fit values

Slope 0.2170 ± 0.01860

Y-intercept when X=0.0 0.03682 ± 0.009598

X-intercept when Y=0.0 -0,1697

1/slope 4,608

95% Confidence Intervals

Slope 0.1578 to 0.2762

Y-intercept when X=0.0 0.006281 to 0.06736

X-intercept when Y=0.0 -0.4049 to -0.02398

Goodness of Fit

r^2 0,9784

Sy.x 0,01420

Is slope significantly non-zero?

F 136,1

DFn, DFd 1.000, 3.000

P value 0,0014

Deviation from zero? Significant

Data

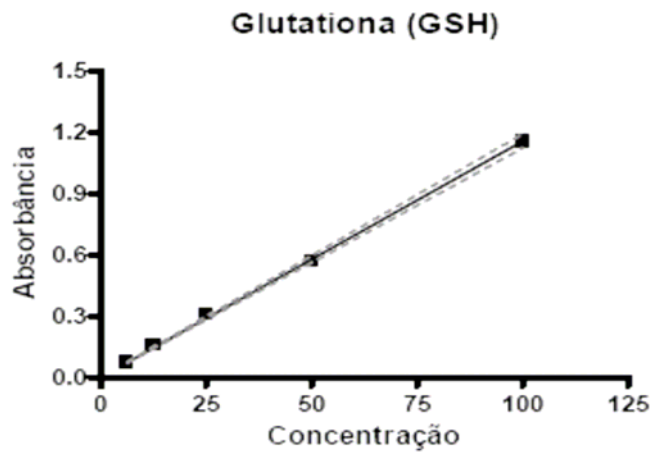
Number of X values 5

Maximum number of Y replicates 1

Total number of values 5

Number of missing values 0

10 APÊNDICE C – CURVA PADRÃO PARA CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA (GSH)



Absorbância	
Best-fit values	
Slope	0.01156 ± 0.0001251
Y-intercept when X=0.0	0.0000
X-intercept when Y=0.0	0.0000
1/slope	86.50
95% Confidence Intervals	
Slope	0.01121 to 0.01191
Goodness of Fit	
Sy.x	0.01443
Is slope significantly non-zero?	
t	92.44
DF	4.000
P value	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	5
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	5
Number of missing values	0

11 APÊNDICE D – DADOS BRUTOS

Dosagens da enzima mieloperoxidase (U MPO/mg) no tecido pulmonar de ratos não submetidos a um trauma muscular.

SALINA	L-ALANIL-GLUTAMINA	DEXAMETASONA
3.413401	1.815423	2.022756
0.000000	1.700379	1.769912
0.000000	1.849558	0.000000
1.264223	0.000000	0.000000
0.6321113	0.000000	0.000000
2.781290	0.000000	0.000000

Dosagens da enzima mieloperoxidase (U MPO/mg) no tecido pulmonar de ratos submetidos a um trauma muscular.

SALINA	L-ALANIL-GLUTAMINA	DEXAMETASONA
21.238940	13.400760	6.953224
27.812890	10.872310	3.792668
20.227560	12.262960	7.332490
21.491780	11.504430	4.930468
20.859670	16.561320	7.206068
32.111250	12.768650	2.907712

Avaliação do Número de neutrófilos registrados em cinco campos por lâmina de tecido pulmonar nos grupos submetidos a um trauma muscular.

SALINA	L-ALANIL- GLUTAMINA	DEXAMETASONA
106	30	26
56	33	22
64	18	27
79	36	14
52	20	16
69	34	24

Avaliação do Número de neutrófilos registrados em cinco campos por lâmina de tecido pulmonar nos grupos não submetidos a um trauma muscular.

SALINA	L-ALANIL- GLUTAMINA	DEXAMETASONA
30	18	13
21	20	9
33	24	10
12	17	5
27	14	9
24	16	7

Concentrações de glutathione (U GSH μ Mol/ml) no pulmão de ratos não submetidos a trauma muscular.

SALINA	L-ALANIL-GLUTAMINA	DEXAMETASONA
11.573	13.193	8.990
27.093	9.800	8.023
25.493	9.960	8.343
14.163	13.353	12.870
11.160	10.607	13.983
23.737	8.343	22.890

Concentrações de glutathione (U GSH μ Mol/ml) no pulmão de ratos submetidos a trauma muscular.

SALINA	L-ALANIL-GLUTAMINA	DEXAMETASONA
10.123	34.527	20.303
9.800	42.443	16.263
7.053	45.837	14.810
7.537	35.817	20.627
8.327	37.433	22.243
8.350	24.667	20.467

Concentrações de glutathione (U GSH μ Mol/ml) no plasma de ratos não submetidos a trauma muscular.

SALINA	L-ALANIL-GLUTAMINA	DEXAMETASONA
12.867	6.870	12.387
15.737	17.997	10.287
14.443	11.653	10.607
17.997	13.677	19.637
17.673	20.503	10.770
17.067	15.877	9.637

Concentrações de glutathione (U GSH μ Mol/ml) no plasma de ratos submetidos a trauma muscular.

SALINA	L-ALANIL-GLUTAMINA	DEXAMETASONA
7.537	4.587	7.373
17.533	6.767	6.407
12.870	16.890	7.053
12.547	12.483	6.567
9.637	12.807	7.377
16.427	4.847	19.333

Tabela dos dados brutos - Avaliação dos parâmetros histológicos no tecido pulmonar em 5 campos por lâmina do pulmão retirado vinte quatro horas após indução ou não indução do trauma cirúrgico.

Parâmetros	Salina	Salina + Trauma	L-Ala-Gln	L-Ala-Gln +Trauma	Dexa	Dexa + Trauma
Congestão						
• Ausente	4	0	3	0	4	5
• Leve	2	0	3	4	2	1
• Moderado	0	3	0	2	0	0
• Intenso	0	3	0	0	0	0
Edema intersticial						
• Ausente	4	0	5	4	5	4
• Leve	2	0	1	1	1	2
• Moderado	0	3	0	1	0	0
• Intenso	0	3	0	0	0	0
Hemorragia						
• Ausente	5	0	0	4	6	5
• Leve	1	0	0	2	0	1
• Moderado	0	1	0	0	0	0
• Intenso	0	5	0	0	0	0
Necrose						
• Ausente	6	0	6	6	6	5
• Leve	0	0	0	0	0	1
• Moderado	0	1	0	0	0	0
• Intenso	0	5	0	0	0	0

ANEXO A– Declaração do Comitê de Ética em Pesquisa Animal.

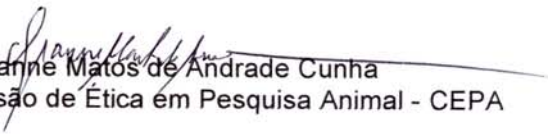
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366-8331 Fax (85) 3366-8333

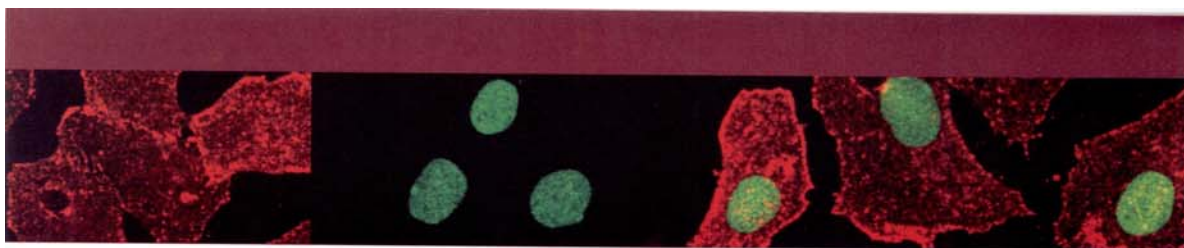
DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 083/07, sobre o projeto intitulado: **“L-ALANIL-GLUTAMINA E TERNATINA NAS ALTERAÇÕES PULMONARES AGUDAS INDUZIDA POR TRAUMA MUSCULAR EM RATOS”** de responsabilidade de Márcia Andréa da Silva Carvalho Sombra, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal CEPA em reunião realizada em 19 de setembro de 2007.

Fortaleza, 21 de setembro 2007.


Prof. Dra. Geanne Matos de Andrade Cunha
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA

ANEXO B – Participação em congresso e premiação.

III Reunião Regional FeSBE 2008

29 de maio a 01 de junho de 2008
Fortaleza – Ceará

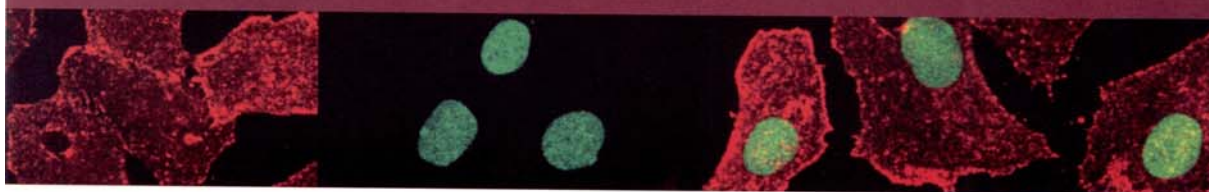
CERTIFICADO DE HONRA AO MÉRITO

A FeSBE tem a grande satisfação de conferir este certificado de Honra ao Mérito pela brilhante apresentação do trabalho

28.063 - AVALIAÇÃO DA L-ALANIL-GLUTAMINA NAS LESÕES PULMONARES AGUDAS INDUZIDAS POR TRAUMA MUSCULAR CIRÚRGICO de autoria 1Sombra, M. A. da S. C. ; 2Medeiros, J. V. R. ; 3Pessoa, Ú. M. L. ;
1Departamento de Cirurgia, FM - UFC.

na III Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, realizada na cidade de Fortaleza - Ceará - CE, de 29 de maio a 01 de junho de 2008.


Comissão Organizadora



III Reunião Regional FeSBE 2008

29 de maio a 01 de junho de 2008
Fortaleza – Ceará

CERTIFICADO

Certificamos que

O trabalho número: 28.063 intitulado AVALIAÇÃO DA L-ALANIL-GLUTAMINA NAS LESÕES PULMONARES AGUDAS INDUZIDAS POR TRAUMA MUSCULAR CIRÚRGICO ¹Sombra, M. A. da S. C. ; ²Medeiros, J. V. R. ; ³Pessoa, Ú. M. L. ; ¹Depto de Cirurgia, FM - UFC. foi apresentado sob a forma de painel na

III Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, realizada na cidade de Fortaleza - Ceará - CE, de 29 de maio a 01 de junho de 2008.

A handwritten signature in black ink, appearing to be a stylized name, possibly 'M. A. da S. C.' or similar, written over a white background.

Comissão Organizadora