



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**INFLUENCIA DA L-GLUTAMINA EXÓGENA NAS DEFESAS ANTIOXIDANTES E NA
CURVA DE TOLERÂNCIA À GLICOSE, EM MODELO ANIMAL**

CSELE VAND SAND

Florianópolis – Santa Catarina- Brasil

Abril de 2005

CSELE VAND SAND

**INFLUENCIA DA L-GLUTAMINA EXÓGENA NAS DEFESAS ANTIOXIDANTES E NA
CURVA DE TOLERÂNCIA À GLICOSE, EM MODELO ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de **MESTRE EM FARMÁCIA**. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos/ Análises Clínicas.

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa

Co-Orientadora: Profa. Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva

Florianópolis

2005

S213i Sand, Csele Vand

Influência da L-Glutamina exógena nas defesas antioxidantes e na curva de tolerância à glicose, em modelo animal / Csele Vand Sand ; orientadora Tânia Beatriz Creczynski-Pasa. – Florianópolis, 2005.

141f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, 2005.

Inclui bibliografia

1. L-Glutamina. 2. Glutationa. 3. Defesas antioxidantes endógenas. 4. Estresse oxidativo. I. Creczynski-Pasa, Tânia Beatriz. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU: 615.12

Catálogo na fonte por: Onélia Silva Guimarães CRB-14/071

*Este trabalho é dedicado aos meus pais Arnólido e
Nílsa, e a minha família, obrigada pelo apoio,
compreensão e amor!*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa, por me acolher em seu grupo de pesquisa e incentivar o ingresso no programa de pós-graduação em Farmácia, e me inicializar na pesquisa acadêmica. Assim como, pelo conhecimento repassado, compreensão e amizade.

À Profa. Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva, pela co-orientação deste trabalho, dedicação, conhecimento e amizade.

Ao Prof. Danilo Wilhelm Filho e Tiago, pelo empréstimo do laboratório e apoio na realização dos experimentos.

À Profa. Viviane da Histologia, pela instrução na coleta e análise dos tecidos.

A todos os colegas dos laboratórios que sempre estiveram presentes no decorrer deste período, e acima de tudo, pela amizade, convivência e companheirismo: Vânia, Carla Charão, Luisa, Carine, Heloisa, Rober, Claudriana, Juliana, Adriana, e em especial ao Tiago pelo apoio incondicional na realização dos experimentos.

À CAPES, pelo financiamento de parte dos experimentos.

Ao Biotério Central, pelo fornecimento dos animais.

Aos companheiros da Murara e Support Produtos Nutricionais Ltda: Salete, Sr. Mauro, Damaris, Lizandra, Bernadete e Inez, pelo fornecimento das substâncias, compreensão e amizade.

Às minhas amigas, Beatrice, Cyntia, Daniela, Karina e Regina pelo carinho, respeito e companheirismo.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Estrutura do aminoácido L-glutamina..... | 20 |
| Figura 2 – Esquema representativo do metabolismo da L-glutamina e L-glutamato em células mamárias..... | 23 |
| Figura 3 - Elevação na concentração plasmática de insulina após um súbito aumento da glicose sangüínea | 36 |
| Figura 4 - Micrografia da porção jejunal do intestino delgado de rato, aumento de 40 x..... | 57 |
| Figura 5 – Micrografia da parte jejunal do intestino delgado de rato em aumento de 100 x..... | 58 |
| Figura 6 - Concentração de GSH intestinal de ratos normais..... | 61 |
| Figura 7 - Concentração de GSH hepática de ratos normais | 64 |
| Figura 8 - Concentração de GT no fígado de ratos normais | 65 |
| Figura 9 - Concentração de GT intestinal de ratos normais | 66 |
| Figura 10 - Concentração de GSH hepática em ratos sob estresse oxidativo | 68 |
| Figura 11 - Concentração de GSH plasmática em ratos sob estresse oxidativo | 70 |
| Figura 12 - Concentração de GSH renal em ratos sob estresse oxidativo .. | 71 |
| Figura 13 – Determinação da concentração de TBARS no tecido hepático, após tratamento com paraquat | 74 |
| Figura 14 – Determinação da concentração de TBARS no tecido renal, após tratamento com paraquat..... | 75 |
| Figura 15 – Dosagem de glicemia do grupo basal e curvas de tolerância à glicose dos grupos Hg e no efeito da administração de insulina 0,5 UI | 78 |
| Figura 16 – Curvas de tolerância à glicose dos grupos: basal, Hg e nos grupos onde a L-glutamina foi administrada na concentração de 1 M | 79 |
| Figura 17 – Curvas de tolerância à glicose dos grupos: basal, Hg e nos grupos em que a L-glutamina foi administrada na concentração de 5 M | 81 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 18 – Comparação das curvas de tolerância à glicose dos grupos Hg, glutamina e glutamina 5 M..... | 82 |
| Figura 19 – Curvas de tolerância à glicose dos grupos: Hg e nos grupos tratados com aminoácidos ramificados isolados (AAR) e combinados à glicose e L-glutamina | 85 |
| Figura 20 – Curvas de tolerância à glicose dos grupos: basal, Hg, glutamina e nos grupos tratados com aminoácidos ramificados combinados à glicose e L-glutamina | 86 |
| Figura 21 – Curvas de tolerância à glicose dos grupos: Hg e nos grupos tratados com vitamina D ₃ combinada à glicose e a L- glutamina..... | 87 |
| Figura 22 – Curvas de tolerância à glicose dos grupos: basal, Hg, glutamina e no grupo tratado com vitamina D ₃ combinada à glicose e L- glutamina..... | 88 |
| Figura 23 – Curvas de tolerância à glicose dos grupos: Hg, glutamina e nos grupos tratados com aminoácidos ramificados e vitamina D ₃ combinados à glicose e L-glutamina | 90 |
| Figura 24 – Variações das concentrações de insulina dos grupos: basal Hg, controle glutamina e glutamina 1 M | 93 |
| Figura 25 – Variações das concentrações de insulina dos grupos: Hg, glutamina 1 M e grupos tratados com os aminoácidos ramificados | 94 |
| Figura 26 – Variações das concentrações de insulina dos grupos: Hg, glutamina 1 M e grupos tratados com a vitamina D ₃ | 97 |

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Etapas de um elétron na redução do oxigênio, levando à formação das espécies reativas de oxigênio, superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila24

LISTA DE TABELAS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – Tabela dos valores de GSSG e a relação GSH/GSSG hepática | 67 |
| Tabela 2 - Tabela dos valores de GSSG e a relação GSH/GSSG intestinal | 67 |
| Tabela 3 – Valores de insulina dos diferentes tratamentos nos 4 (quatro) tempos analisados | 92 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1 – Funções biológicas da L-glutamina | 21 |
| Quadro 2 – Exemplos de espécies reativas de oxigênio e de espécies reativas de nitrogênio | 26 |
| Quadro 3 – Fontes celulares de geração de espécies reativas de oxigênio | 27 |
| Quadro 4 – Presença de glutathione e enzimas em diferentes tecidos..... | 31 |
| Quadro 5 - Quadro das substâncias e meio de dissolução utilizadas nos ensaios animais..... | 44 |
| Quadro 6 - Quadro de grupos e substâncias administradas, no tratamento crônico sem indução do estresse oxidativo | 47 |
| Quadro 7 - Quadro de grupos e substâncias administradas, no tratamento com indução do estresse oxidativo mediado por paraquat..... | 48 |
| Quadro 8 - Quadro dos grupos e substâncias administradas por via oral, nas curvas de tolerância à glicose | 52 |
| Quadro 9 - Grupos e nomenclaturas utilizadas nos gráficos das curvas de tolerância à glicose..... | 52 |

LISTA DE REAÇÕES

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Reação 1 – Reação de Fenton | 25 |
| Reação 2 – Reação de Haber-Weiss..... | 25 |
| Reação 3 – Reação da ação seqüencial de γ -glutamil cisteína sintetase e GSH | 30 |
| Reação 4 – Reação da ação enzima sintetase..... | 30 |
| Reação 5 – Formação de GSH pela ação da enzima GSSG redutase..... | 30 |
| Reação 6 – Reação do radical paraquat na redução do ferro (Fe III) e quelatos de Fe III..... | 33 |
| Reação 7 - Reação do radical paraquat com O_2 | 33 |
| Reação 8 – Reação do Fe^{2+} -quelato com H_2O_2 | 33 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – Trifosfato de adenosina
AAR – Aminoácidos ramificados
AGEs – Produtos finais por glicação avançada da glicose
CAT - Catalase
EROs - Espécies reativas de oxigênio
ERNs - Espécies reativas de nitrogênio
GABA - Ácido δ -aminobutírico
GLU – L-glutamina
GPx - Glutaciona peroxidase
GRd - Glutaciona redutase
GSH - Glutaciona reduzida
GSSG – Glutaciona oxidada (dissulfeto de glutaciona)
GSTs - Glutacionas S-transferases
GT – Glutaciona total
 H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo
 O_2 - Oxigênio
 $O_2^{\bullet-}$ - Superóxido
 $\bullet OH$ - Radical hidroxila
 $PQ^{\bullet+}$ - Radical paraquat
RLOs - Radicais livres de oxigênio
SNC – Sistema nervoso central
SOD - Superóxido dismutase
 NO^{\bullet} - Óxido nítrico
NOS - Óxido nítrico sintase

RESUMO

A L-glutamina (glu) é um aminoácido envolvido em diversos processos metabólicos, sendo re-classificada como condicionalmente essencial em situações de maior demanda metabólica, onde o estresse oxidativo também está presente. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar a influência da glu nas defesas antioxidantes endógenas, assim como, conhecer seu efeito na resposta da curva de tolerância à glicose, e na secreção de insulina. Os modelos experimentais utilizados constituíram em: i) propriedades antioxidantes através de testes *in vitro*; ii) dosagens *ex vivo* das defesas antioxidantes (glutathiona reduzida - GSH e total - GT) e peroxidação lipídica (TBARS); iii) curvas de tolerância à glicose e dosagem de insulina. As dosagens das defesas antioxidantes e estresse oxidativo foram realizados em dois grupos experimentais: i) no metabolismo normal pelo tratamento crônico com glu e/ou glicose; ii) em modelo de estresse oxidativo no tratamento agudo induzido por paraquat. As curvas de tolerância à glicose foram realizadas utilizando-se a glu nas concentrações de 1 M e 5 M, assim como associações com aminoácidos ramificados e com a vitamina D₃. A glu não apresentou potencial intrínscico como molécula antioxidante nos testes realizados *in vitro*. Entretanto, nas defesas antioxidantes endógenas, a glu, apresentou efeito tempo-resposta, o qual está relacionado à presença ou não do estresse metabólico, e ao tecido ou fluído analisado. No tratamento crônico, a glu combinada à administração de glicose proporcionou a manutenção dos níveis de GSH do tecido intestinal e hepático. Nos tratamentos sob estresse oxidativo, a utilização de glu aumentou o nível de GSH no plasma, no entanto, o mesmo não foi observado no tecido hepático e renal. Nas curvas de tolerância à glicose a administração de glu na menor concentração (1 M) aumentou as concentrações de glicose nos tempos iniciais observados, assim como houve um rápido retorno aos valores do tempo zero. As curvas de tolerância dos aminoácidos ramificados e da vitamina D₃ com glu, apresentaram efeitos similares, ou seja, o aumento na glicemia observado pela administração das substâncias estendeu-se até o último tempo analisado. Os níveis de insulina apresentaram um aumento no grupo que recebeu glu isolada, sugerindo um efeito *per se*. As associações dos aminoácidos ramificados e glu, no modelo de hiperglicemia, promoveu um aumento na concentração de insulina. A vitamina D₃ elevou a concentração de insulina quando combinada à glicose, no entanto, a presença de glu não otimizou o aumento dos níveis de insulina. Assim, a glu parece contribuir para o aumento ou a manutenção das defesas antioxidantes em uma condição de estresse oxidativo. Além disso, parece ter um efeito na rápida diminuição da glicose sanguínea quando administrada juntamente com glicose, assim como, um efeito *per se* no aumento da concentração de insulina plasmática. Assim, concluímos que na utilização de modelos animais, em que as interações metabólicas são preservadas, a glu na concentração de 1 M administrada por via oral apresentou um efeito *per se* relevante na concentração de glutathiona nos experimentos realizados sob estresse oxidativo, assim como, na concentração de insulina plasmática. Ainda, nas curvas de tolerância à glicose a molécula apresentou um perfil significativo na rápida redução das concentrações de glicose sanguínea.

ABSTRACT

L-glutamine (gln) is involved in more metabolic process than any other amino acid, and has been classified as an essential amino acid in demanding metabolic conditions when the oxidative stress is also present. Thus, the objective of this work is to investigate if gln would have some influence in endogenous antioxidant defenses, as well as exert some effect on the glucose concentration and insulin secretion. The experimental models used in this work are: i) antioxidant properties through *in vitro* determinations; ii) *ex vivo* measurements of antioxidant defenses (reduced glutathione – GSH and total glutathione - GT) and lipid peroxidation (TBARS); iii) glucose tolerance curves and insulin plasma concentration. The antioxidant defenses and the oxidative stress measurements were carried out in two experimental groups: i) by the chronic treatment of gln and/or glucose in the normal metabolism; ii) and in an acute oxidative stress model, induced by paraquat. For the glucose tolerance curves experiments gln was administered in two different concentrations (1 M and 5 M), as well as a branched chain amino acid association and vitamin D₃. Gln did not show an intrinsic potential as an antioxidant molecule in *in vitro* analysis. The antioxidant defenses were influenced by gln administration considering the period, the presence or absence of metabolic stress and also the tissue or fluid analyzed. When gln was administered with glucose, in a chronic condition, it was able to maintain the GSH levels in the intestinal and hepatic tissues. Gln was effective increasing the GSH plasma levels in the presence of oxidative stress, but it did not promote the same significant effect on hepatic and renal tissues. Gln 1 M promoted a significant elevation on blood glucose concentration and a fast return to the zero time values, results obtained through the glucose tolerance curves. The administration of gln with the amino acid association or vitamin D₃ showed a similar effect for both combinations and the initial elevation on glucose concentration was maintained until the last time observed. The insulin determination for the group receiving gln isolated was elevated, suggesting an effect of the molecule *per se*. The combination of the amino acid association with gln in the hyperglycemia model, induced an elevation of insulin concentration. Vitamin D₃ administered with glucose (hyperglycemia model) also showed an important augment on plasma insulin, but gln did not improve this effect. Therefore, gln may contribute to the increase or maintenance of the antioxidant defenses in an oxidative stress condition. Also, it could have a fast effect reducing blood glucose concentration when administered with glucose, as a *per se* effect augmenting plasma insulin levels. The present work brings to the related literature the following summarized results: considering the experiments performed in animal models when all metabolic interactions are present, gln orally administered in the concentration of 1 M had a relevant effect *per se* on the glutathione levels under an oxidative stress condition, and also on plasma insulin levels. The gln molecule also had a significant influence reducing blood glucose concentrations.

SUMÁRIO

| | |
|----------------------------------------------------|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 17 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 20 |
| 2.1. A Molécula de L-Glutamina | 21 |
| 2.2. L-Glutamina e L-Glutamato | 22 |
| 2.3. Espécies Reativas e Radicais Livres..... | 24 |
| 2.4. As Defesas Antioxidantes..... | 28 |
| 2.5. L-Glutamina e Glutathiona..... | 29 |
| 2.6. Estresse Oxidativo mediado por Paraquat | 32 |
| 2.7. A Importância do Controle da Glicemia..... | 34 |
| 2.7.1. Os Nutrientes no Controle da Glicemia | 35 |
| 2.7.1.1. A Glicose | 35 |
| 2.7.1.2. Os Aminoácidos | 37 |
| 2.7.1.3. A Vitamina D ₃ | 38 |
| 3. OBJETIVOS | 40 |
| 3.1. Objetivo geral | 40 |
| 3.2. Objetivos específicos | 40 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 42 |
| 4.1. MATERIAIS | 42 |
| 4.1.1. Reagentes | 42 |
| 4.1.2. Equipamentos | 43 |
| 4.1.3. Preparação das substâncias | 43 |
| 4.2. MÉTODOS | 44 |
| 4.2.1. Animais..... | 44 |
| 4.2.2. Procedimento anestésico | 44 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2.3. Modelos experimentais..... | 45 |
| 4.3.2.1. Ensaio <i>IN VITRO</i> | 45 |
| 4.2.3.1a. Monitoramento do radical DPPH | 45 |
| 4.2.3.1b. Produção e monitoramento de radical hidroxila | 45 |
| 4.2.3.1c. Síntese de peroxinitrito | 46 |
| 4.2.3.1c1. Avaliação da lipoperoxidação induzida pelo peroxinitrito | 46 |
| 4.2.3.2. Defesas antioxidantes e estresse oxidativo <i>EX VIVO</i> | 46 |
| 4.2.3.2a. Tratamento crônico sem a indução de estresse oxidativo..... | 47 |
| 4.2.3.2b. Tratamento agudo com a indução de estresse oxidativo | 47 |
| 4.2.3.2.1. Preparação das amostras de tecido..... | 48 |
| 4.2.3.2.1a. Preparação do homogenato | 49 |
| 4.2.3.2.1b. Preparação do extrato ácido | 49 |
| 4.2.3.2.2. Avaliação da lipoperoxidação tecidual..... | 50 |
| 4.2.3.2.3. Análise das defesas antioxidantes não-enzimáticas | 50 |
| 4.2.3.2.3a. Dosagem do conteúdo de GSH | 50 |
| 4.2.3.2.3b. Dosagem do conteúdo de GT e GSSG | 51 |
| 4.2.3.3. Curvas de tolerância à glicose | 51 |
| 4.2.3.3.1. Coleta das amostras de sangue | 53 |
| 4.2.3.3.2. Preparação das amostras de soro | 53 |
| 4.2.3.3.2a. Soro sanguíneo | 53 |
| 4.2.3.3.2b. Determinação da glicemia | 53 |
| 4.2.3.3.2c. Dosagens de Insulina | 54 |
| 4.2.3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA | 55 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 56 |
| 5.1. Avaliação Histológica | 57 |
| 5.2. Defesas Antioxidantes e Estresse Oxidativo | 58 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.2.1. Ensaio <i>in vitro</i> | 58 |
| 5.2.2. Dosagens <i>ex vivo</i> | 60 |
| 5.2.2.1. Dosagens de glutathiona no tratamento crônico sem indução de estresse oxidativo | 60 |
| 5.2.2.1a. Concentração de GSH nos tecidos hepático e intestinal..... | 60 |
| 5.2.2.1b. Concentração de GT no tratamento crônico sem estresse oxidativo | 65 |
| 5.2.2.2. Dosagens de GSH e TBARS no tratamento crônico com indução de estresse oxidativo..... | 67 |
| 5.2.2.2a. Concentração de GSH no tratamento agudo com estresse oxidativo | 68 |
| 5.2.2.2b. Peroxidação lipídica nos tecidos hepático e renal após a indução de estresse oxidativo..... | 73 |
| 5.3. Curvas de tolerância à glicose | 76 |
| 5.3.1. Tratamento hiperglicêmico e grupos glutamina..... | 76 |
| 5.3.2. Tratamentos com aminoácidos ramificados | 84 |
| 5.3.3. Tratamentos com a vitamina D ₃ | 87 |
| 5.4. Dosagens de insulina | 91 |
| 6. CONCLUSÕES | 99 |
| 7. PERSPECTIVAS..... | 102 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 103 |
| 9. ANEXOS | 114 |
| 9.1 Protocolo da CEUA – UFSC..... | 115 |
| 9.2 Artigo enviado à publicação no “European Journal of Nutrition”..... | 117 |
| 9.3 Lista de trabalhos apresentados em eventos..... | 139 |

1 INTRODUÇÃO

O aminoácido L-glutamina (glu), utilizado como um nutriente suplementado em diversas situações clínicas, tem recebido grande atenção como medida terapêutica. A molécula de L-glutamina participa intensivamente da manutenção dos níveis de aminoácidos circulantes, sendo o que circula em maior quantidade no organismo. A manutenção da sua concentração sangüínea é de extrema importância para a homeostasia entre os órgãos. Em condições de injúria metabólica, a utilização da L-glutamina está aumentada, fato que, nestas condições, levou a mesma a ser considerada como um aminoácido condicionalmente essencial.

Atualmente, muitos trabalhos têm investigado o papel da L-glutamina em diferentes tipos celulares em condições fisiológicas e patológicas. A participação deste aminoácido na prevenção e/ou avanço de doenças neurodegenerativas, câncer, diabetes, AIDS, assim como, nas defesas antioxidantes e estresse oxidativo teciduais, caracterizam a multifuncionalidade da molécula.

As defesas antioxidantes endógenas atuam intensivamente no controle da agressão produzida por espécies reativas, que são constantemente geradas no metabolismo normal e estão presentes em maior proporção em condições de injúria metabólica, permeando diversas patologias. Dentre as defesas antioxidantes endógenas, o tripeptídeo glutathiona encontra-se extensivamente distribuído nas células mamárias, e, é fundamental no combate às espécies reativas formadas e tem como precursor a L-glutamina na síntese celular.

Nesta dissertação, primeiramente avaliou-se o potencial intrínscico da molécula de L-glutamina como um possível antioxidante, e seqüestrador de espécies reativas *in vitro*. Ainda, em função da L-glutamina ser metabolicamente muito ativa, optou-se por experimentos com modelos animais. Para tal, foram realizados os tratamentos agudo e crônico, no metabolismo normal e em uma condição de injúria metabólica induzida por toxicidade, promovida pelo uso do paraquat ou por hiperglicemia.

O estresse oxidativo, que está presente em muitas patologias, é um fator relevante na rápida progressão das doenças, como observado nas complicações do diabetes melito. Nesta patologia, os altos níveis de glicose circulantes afetam a homeostasia celular. A formação de espécies reativas está relacionada à autoxidação direta da glicose, glicação não enzimática, inibição ou ativação de rotas enzimáticas importantes, entre outras. Ainda, as defesas antioxidantes são depletadas, e as reposições comprometidas.

L-glutamina é um nutriente importante para a célula pancreática, como substrato para o metabolismo energético basal e parece exercer alguma função no processo de secreção de insulina. Considerando-se que o diabetes melito é uma patologia crônico-degenerativa, extensivamente disseminada na população mundial, a descoberta de tratamentos que possam beneficiar o controle dos níveis glicêmicos é de grande interesse na comunidade científica.

Em vista disto, nesta dissertação, foi também investigada a influência da L-glutamina em curvas de tolerância à glicose, e na secreção do hormônio insulina. Os tratamentos foram realizados em modelo animal *in vivo*, em que a administração das substâncias utilizadas foi por via oral. Inicialmente, pretendia-se realizar o estudo em um modelo de diabetes induzida, no entanto, a funcionalidade das células β -pancreáticas seria perdida, e o processo normal de secreção de insulina interrompido. Contudo, o modelo escolhido para a investigação da L-glutamina na homeostasia da glicose, foi o de hiperglicemia, em condições de metabolismo normal. Assim, a L-glutamina poderia estar atuando em ambas as situações: no controle da agressão gerada pelas espécies reativas, através da síntese de glutathione; e como nutriente coadjuvante no processo de controle da concentração de glicose sangüínea e secreção de insulina.

Devido ao efeito potencializador na secreção de insulina do aminoácido ramificado leucina, foram realizados experimentos com uma associação de aminoácidos ramificados e L-glutamina na curva de tolerância à glicose e secreção de insulina.

Alem disso, a vitamina D₃, em estudos previamente realizados em células β-pancreáticas apresentou um efeito insulínico, assim, a mesma foi também testada na curva de tolerância à glicose e secreção de insulina.

Por fim, nesta dissertação serão discutidos os resultados de duas abordagens experimentais com a utilização de L-glutamina, nos testes de estresse oxidativo *in vitro* e defesas antioxidantes *ex vivo*, assim como, nas curvas de tolerância à glicose e na secreção de insulina *in vivo*, em que a L-glutamina, aminoácidos ramificados e vitamina D₃ foram combinados ao modelo de hiperglicemia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Molécula de L-Glutamina

A L-glutamina (Figura 1) é o aminoácido mais abundante encontrado nos tecidos corporais, e tem a maior concentração plasmática dentre os aminoácidos (tipicamente 0.6 mmol/l) (VAN ACKER *et al.*, 1999; CHWALS, 2004), ocupando 30-35% do total dos aminoácidos livres circulantes (MATILA *et al.*, 2000). A mesma representa aproximadamente metade do conteúdo de aminoácidos livres no músculo esquelético, e sob condições normais é considerado um aminoácido não essencial, pois pode ser produzido endogenamente em quantidades suficientes para atingir as necessidades corporais (VAN ACKER *et al.*, 1999).

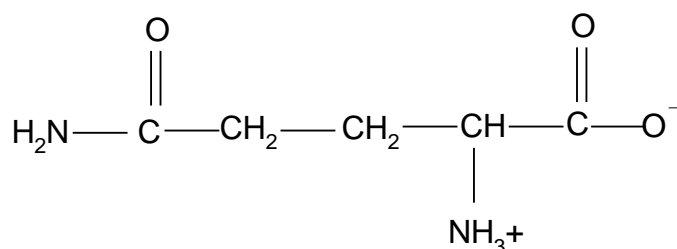


Figura 1- Estrutura do aminoácido L-glutamina (DEVLIN, 2003).

Atualmente, sabe-se que um grande número de tecidos e células utiliza L-glutamina em níveis altos, sendo essencial para o funcionamento dos mesmos. Esses tecidos e células incluem fígado, intestino, rins, neurônios específicos do SNC, células do sistema imune e células β -pancreáticas (NEWSHOLME *et al.*, 2003). A molécula de L-glutamina é o maior transportador de nitrogênio entre as células e importante fonte de energia para as células de divisão rápida, como as

células do sistema imune e gastrointestinal. Ainda, é importante na síntese de ácidos nucleicos, glutatona, citrulina, arginina, GABA, e glicose (CHWALS, 2004).

A L-glutamina está envolvida em muitos processos metabólicos como pode ser observado no Quadro 1.

Quadro 1 – Funções biológicas da L-glutamina

- Transporte de nitrogênio entre os órgãos e doador intracelular de nitrogênio (síntese de amônia renal e uréia hepática)
- Combustível oxidativo (eritrócitos, células do sistema imune)
- Substrato e estimulador da síntese de glicogênio e gliconeogênese
- Manutenção do balanço ácido básico
- Regulador potencial de síntese protéica
- Precursor de ácido δ -aminobutírico no cérebro
- Inibidor de lipólise e cetogênese em animais
- Relevante para a nutrição parenteral total

Adaptado de STUMVOLL *et al.* (1999)

A molécula de L-glutamina é fornecedora de energia através da oxidação parcial na glutaminólise. Além disso, é doadora de carbono e nitrogênio como precursores da síntese de nucleotídeos, glicose hepática e amônia urinária (ANDREWS & GRIFFITHS, 2002) e participa na homeostasia da glutatona.

Devido à extensiva utilização de L-glutamina por vários sistemas, e a marcante redução na concentração plasmática durante injúrias graves, este aminoácido tem sido considerado como condicionalmente essencial. Dos aminoácidos liberados pelo músculo esquelético, a L-glutamina e a alanina, representam 50-70% do nitrogênio exportado para outros tecidos. Ambas L-glutamina e alanina fornecem suporte para a gliconeogênese aumentada que pode ocorrer na injúria metabólica (TAPIERO *et al.*, 2002).

2.2 L-Glutamina e L-Glutamato

L-glutamina e L-glutamato, assim como prolina, histidina, arginina e ornitina, somam 25% na ingestão de aminoácidos dietéticos e constituem a “família glutamato” de aminoácidos, os quais, estão disponíveis para a conversão à L-glutamato. Assim, a L-glutamina via L-glutamato é convertida a α -cetoglutarato, um componente integral do ciclo do ácido cítrico, e componente da glutathione (TAPIERO *et al.*, 2002).

A L-glutamina é prontamente convertida a L-glutamato ao entrar na célula, pela ação da enzima L-glutaminase, que ocorre em altas concentrações e está associada à mitocôndria nas células que utilizam a L-glutamina. L-glutamato é o aminoácido intracelular mais abundante (variando de 2 a 20 mM) e L-glutamina está mais presente no meio extracelular (0,7 mM comparando com aproximadamente 20 μ M para o L-glutamato) (NEWSHOLME *et al.*, 2003).

A síntese de L-glutamato, via L-glutamina, pode ocorrer pela transaminação com o piruvato, formando alanina, pela ação da enzima glutamato-piruvato aminotransferase. A alanina por sua vez, pode ser utilizada para a síntese de glicose hepática na gliconeogênese. Tanto o piruvato quanto o L-glutamato podem ser formados no processo de glutaminólise, nas células do epitélio intestinal, liberando assim, grandes quantidades de alanina na corrente sanguínea. A oxidação parcial da L-glutamina nos enterócitos fornece energia e moléculas precursoras para a síntese de pirimidinas e purinas, com os carbonos e amino grupos remanescentes sendo liberados de volta na corrente sanguínea, em parte como alanina e NH_4^+ (DEVLIN, 2003). Em alguns tecidos como o hepático, o muscular esquelético e em algumas células como os astrócitos, L-glutamato e NH_4^+ podem ser combinados pela ação de L-glutamina sintetase para produzir L-glutamina; que é então exportada da célula (NEWSHOLME *et al.*, 2003).

Abaixo, a representação esquemática mostra as vias de utilização de L-glutamato tendo a molécula de L-glutamina como precursora (Figura 2).

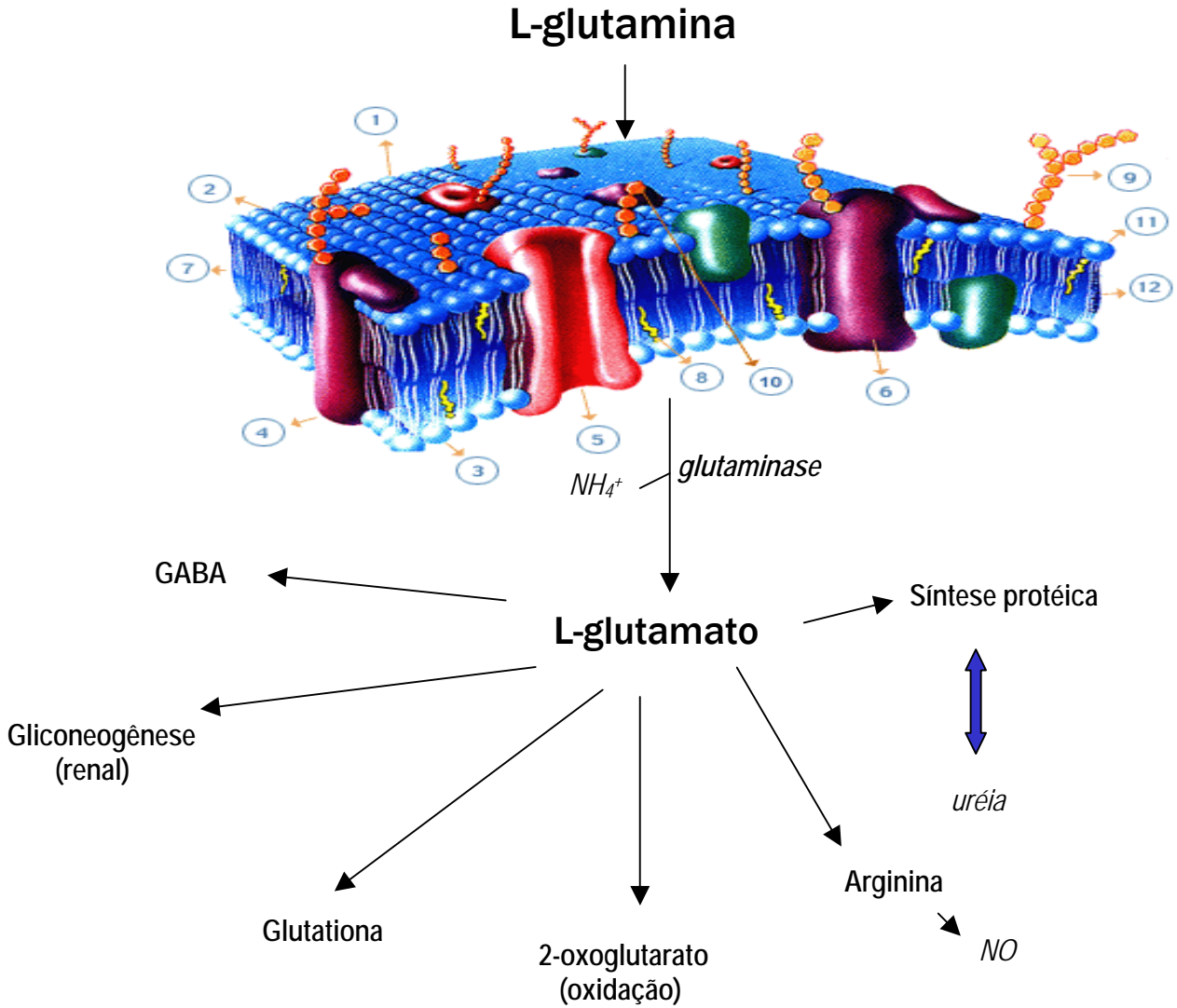
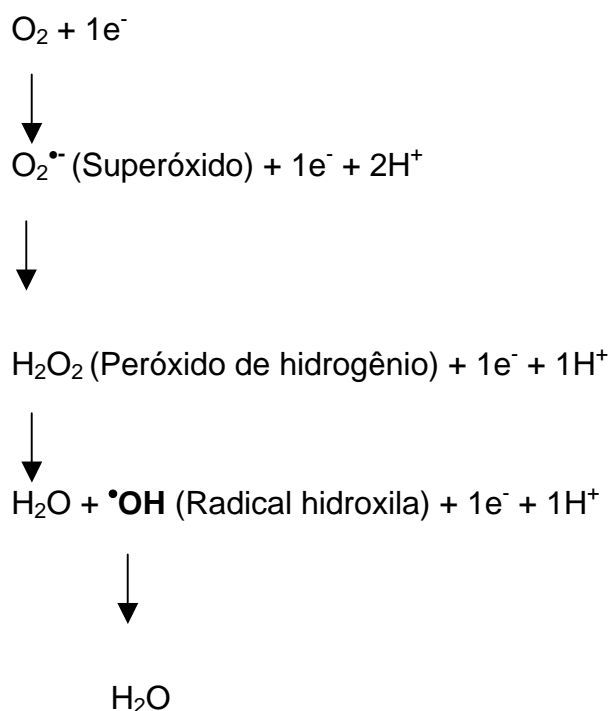


Figura 2 - Esquema representativo do metabolismo da L-glutamina e L-glutamato em células mamárias (NEWSHOLME *et al.*, 2003).

2.3 Espécies Reativas e Radicais Livres

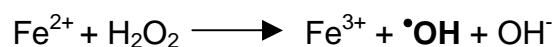
O oxigênio é o elemento mais abundante na crosta terrestre e o percentual na atmosfera é de 21%. A evolução dos organismos que utilizam o O₂ como aceptor terminal de elétrons durante o processo respiratório constitui-se num paradoxo, pois se por um lado o metabolismo aeróbico fornece energia, por outro a redução de O₂ até água pode levar à formação de espécies intermediárias altamente reativas e danosas ao organismo, chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs). Dentre as EROs estão incluídos os radicais livres de oxigênio (RLOs) que são definidos como espécies reativas capazes de independência própria e que contém um ou mais elétrons não pareados no último orbital. Eles são formados através da redução parcial do oxigênio até água, que ocorre através de sucessivas reações univalentes, descritas no Esquema 1 (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).



Esquema 1- Etapas de um elétron na redução do oxigênio, levando à formação das espécies reativas de oxigênio, superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. Adaptado de DEVLIN (2003).

O elétron desemparelhado altera a reatividade química do respectivo átomo, tornando-o mais reativo em relação à forma não-radicalar (AHSAN, ALI & ALI, 2003). Assim, são características dos radicais livres a instabilidade, a alta reatividade e o paramagnetismo (KEHRER, 1993; FLESCHEIN *et al.*, 2000). A transferência de um elétron para o O₂ produz o primeiro intermediário reativo, o radical superóxido (O₂^{•-}) que sofre dismutação espontânea a peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Qualquer reação posterior requer a quebra das ligações entre os átomos de O₂ para formar radical hidroxila (•OH), que pode ser catalisada por metais de transição (Reação de Fenton) ou pela combinação do O₂^{•-} com o H₂O₂ (Reação de Haber-Weiss), reações 1 e 2 (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Desses intermediários na redução de O₂ a água, o radical hidroxila é, sem dúvida, o radical livre mais reativo, uma vez que está envolvido em reações como peroxidação de lipídeos e geração de outras espécies reativas tóxicas.

Reação 1: Reação de Fenton



Reação 2: Reação de Haber-Weiss



O termo espécie reativa é utilizado para descrever não somente radicais livres, mas também outras moléculas não-radicalares que, em condições fisiológicas, podem promover reações de oxidação ou de redução (KEHRER, 1993). As espécies reativas biológicas podem ser classificadas em espécies reativas de oxigênio (EROs), como já foi mencionado, e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), de acordo com as moléculas a partir das quais foram originadas. Exemplos de espécies reativas são apresentados na Quadro 2 (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).

O Quadro 3 apresenta algumas fontes celulares de produção de diversas espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio.

EROs

Radicais

Superóxido, $O_2^{\bullet-}$

Hidroxila, $^{\bullet}OH$

Peroxil, RO_2^{\bullet}

Alcoxil, RO^{\bullet}

Hidroperoxil, HO_2^{\bullet}

Não radicais

Peróxido de Hidrogênio, H_2O_2

Ácido hipocloroso, $HOCl$

Ozônio, O_3

Oxigênio singlete, 1O_2

ERNs

Radicais

Monóxido de Nitrogênio, NO^{\bullet}

Dióxido de Nitrogênio, NO_2^{\bullet}

Não radicais

Ácido Nitroso, HNO_2

Trióxido de dinitrogênio, N_2O_3

Íon nitrônio, NO_2^+

Ânion Nitroxil, NO^-

Tetróxido de Dinitrogênio, N_2O_4

Peroxinitrito, $ONOO^-$

Quadro 2 - Exemplos de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).

Quadro 3 - Fontes celulares de geração de espécies reativas de oxigênio.

| FONTES CELULARES DE PRODUÇÃO DE EROs | | |
|---------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------|
| | FONTES | EROs |
| ENDÓGENAS | Mitocôndria | $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$ |
| | Citocromo P-450 | $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 |
| | Macrófagos/ células inflamatórias | $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OCI^- |
| | Peroxisomos | H_2O_2 |
| EXÓGENAS | Metais | $\cdot OH$ |
| | Radiação | $\cdot OH$ |

Adaptado de KLAUNIG & KAMENDULIS (2004).

Componentes celulares, como lipídeos, proteínas e DNA são alvos do dano oxidativo mediado por EROs/ERNs (NORDBERG & ARNER, 2004). Diversos efeitos associados às espécies reativas podem ser desencadeados no organismo, como: modificação de aminoácidos, alteração de atividades enzimáticas, quebra de ligações peptídicas, modificações em glicoproteínas, perda de metal em metaloproteínas, aumento na susceptibilidade a proteólise, oxidação de grupos tióis para pontes dissulfetos e alterações nos receptores e no caráter antigênico, dentre outros (STADTMAN, 1992; SIES, 1993; KLAUNIG & KAMENDULIS, 2004).

Com isso, as espécies reativas estão extensivamente ligadas a origem e/ou progressão de uma grande variedade de patologias. Doenças crônico-degenerativas como o diabetes melito, desenvolvem complicações visuais e nefrológicas associadas à alta formação de espécies reativas promovidas por altas taxas de glicose sanguínea (BAYNES & THORPE, 1999; OBROSOVA, 2003; MARTIN-GALÁN *et al.*, 2003; POWELL *et al.*, 2004). Espécies reativas de oxigênio podem interagir com o ácido desoxiribonucleico (DNA), induzindo mutações nas bases nitrogenadas e câncer (FLESCHEIN, 2000; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000; BARTSCH & NAIR, 2004). Doenças cardiovasculares

(WANG *et al.*, 2004) e neurológicas, como as doenças de Alzheimer e Parkinson também são moduladas pelo equilíbrio redox da célula (MOREIRA *et al.*, 2004).

2.4 As Defesas Antioxidantes

O desequilíbrio entre a produção de EROs e/ou ERNs e o sistema de defesa antioxidante endógeno é o fator predominante para causar uma série de mudanças fisiológicas, chamadas de estresse oxidativo.

Para minimizar os efeitos deletérios associados à constante formação das EROs, oriundas da presença e da utilização do oxigênio nos tecidos, os organismos aeróbicos foram dotados, ao longo do tempo evolutivo, de distintas defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas.

Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada com o substrato oxidável, são capazes de retardar ou inibir a oxidação deste substrato (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

As espécies antioxidantes podem ser classificadas segundo o mecanismo de ação em: i) inibidoras da produção de radicais livres, induzidas por metais de transição; ii) inibidoras de reações em cadeia; e iii) espécies que atuam por dois ou mais mecanismos sinérgicos, também conhecidos por “mecanismos mistos de ação” (HUANG, TEOH & MAN, 1999; PINCHUK & LICHTENBERG, 2002).

As defesas antioxidantes, podem ter origem: i) enzimática; ii) endógena não-enzimática, iii) exógena (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). Dentre as defesas enzimáticas destacam-se as enzimas catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), a glutatona redutase (GRd), a glutatona peroxidase (GPx) e o conjunto das glutationas S-transferases (GSTs). As glutationas S-transferases, embora não atuem diretamente contra os radicais livres, são importantes na defesa celular, pois estão associadas à biotransformação de xenobióticos, como herbicidas, inseticidas e agentes carcinogênicos. Estas enzimas catalisam a reação de conjugação do tripeptídeo glutatona na forma reduzida (GSH) com

esses compostos, aumentando a solubilidade e facilitando a excreção. Dentre os antioxidantes não enzimáticos menciona-se os endógenos como a GSH, que têm como função remover radicais livres tóxicos ou convertê-los em produtos intermediários não tóxicos (REITER *et al.*, 1998), e os exógenos como a vitamina E, C, A e carotenóides (licopeno e β -caroteno). Além de compostos fenólicos, como flavonóides e outras moléculas derivadas de fontes vegetais (KEHRER, 1993).

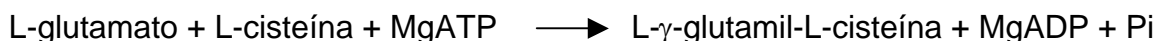
2.5 L-Glutamina e Glutathione

Uma das funções importantes da L-glutamina é participar como molécula precursora indireta na síntese de glutathione. O papel da L-glutamina na síntese de glutathione é dado ao fato de que a molécula L-glutamato, que é um precursor direto da glutathione, apresenta carga negativa e desta forma ser pouco transportada através da membrana plasmática. A L-glutamina, no entanto, é facilmente captada pela célula e desaminada, servindo como um precursor indireto da glutathione (FÜRST, ALTEHELD & STEHLE, 2004).

Os aminoácidos L-glutamina (via glutamato), cisteína e glicina são precursores na síntese do tripeptídeo glutathione, L- γ -glutamil-cisteinilglicina, que está presente nas células nas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). A razão GSH/GSSG é um dos reguladores mais importantes do potencial redox da célula. A síntese de GSH pode ser alterada pela administração de precursores de glutathione ou pela atividade das enzimas GSH peroxidase e redutase (ROTH *et al.*, 2002).

A GSH é o tiol de menor peso molecular predominante nas células mamárias e desempenha um papel central contra o estresse oxidativo e nitrosativo. A molécula de GSH é sintetizada a partir de seus aminoácidos constituintes pela ação seqüencial de γ -glutamil cisteína sintetase (γ -GCS) e GSH sintetase, conforme mostrado nas reações 3 e 4 (GRIFFITH, 1999).

Reação 3: Reação da ação da enzima γ -glutamil cisteína sintetase



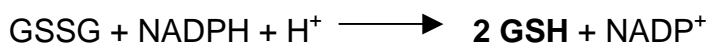
Reação 4: Reação da ação enzima sintetase



A molécula de GSH é conhecida por ter múltiplas funções fisiológicas incluindo a defesa antioxidante, detoxificação de xenobióticos eletrofílicos, modulação redox da transdução de sinais, armazenamento e transporte de cisteína, regulação da proliferação celular, entre outras. O mecanismo chave para as propriedades regulatórias, metabólicas e celulares da glutathione é o equilíbrio de troca tiol-dissulfeto. Assim, a cadeia lateral do resíduo sulfidril (-SH) da cisteína na molécula de glutathione é fundamental para a maior parte das propriedades fisiológicas (SEN, 1997).

GSH reage rapidamente e não enzimaticamente com radical hidroxila, produto citotóxico da reação de Fenton, com N_2O_3 e peroxinitrito, produtos citotóxicos formados pela reação do óxido nítrico (NO) com O_2 e radical ânion superóxido, respectivamente. Em reações catalizadas por muitas isoformas de GSH peroxidases, a GSH também participa na detoxificação de peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos. Cada uma das reações leva direta ou indiretamente à formação de dissulfeto de glutathione (GSSG), uma espécie que é reduzida intracelularmente à GSH pela Glutathione reductase em reação que requer NADPH, fornecido pela via das pentose fosfato, descrita na reação 5.

Reação 5: Reação de formação de GSH pela ação da enzima GRd



As concentrações de GSH celulares são o reflexo de um equilíbrio entre a síntese e a utilização, sendo a meia vida da molécula estimada em 4 dias nos eritrócitos humanos e 3 dias em hepatócitos de ratos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A síntese de GSH inclui síntese *de novo* através dos aminoácidos constituintes, assim como, a formação de GSH pela redução da molécula oxidada de GSSG; sendo a síntese *de novo* de maior influência nos níveis celulares de GSH. A síntese *de novo* de GSH é regulada por pelo menos três fatores: i) o nível de γ -GCS presente na célula; ii) a disponibilidade dos substratos, particularmente L-cisteína e iii) o controle de retroalimentação inibitório de GSH na enzima γ -GCS (GRIFFITH, 1999).

No Quadro 4 estão apresentadas as concentrações do sistema GSH/GSSG nos principais tecidos e fluídos orgânicos de mamíferos.

Quadro 4 - Presença de glutatona e enzimas em diferentes tecidos

| Sistema | [GSH] | GSH/GSSG | [GPx] | [GRd] |
|------------------------|----------------------------|----------|----------|----------|
| Tecidos Ratos | | | | |
| Fígado | 7-8 mM | >10/1 | Alta | Alta |
| Eritrócitos | 2 mM | >10/1 | Moderada | Moderada |
| Pulmão | 2 mM | >10/1 | Moderada | Moderada |
| Rim | 4 mM | >10/1 | Moderada | Moderada |
| Plasma sangüíneo | 20-30 μ M | ~5/1 | Baixa | Traços |
| Tecidos Humanos | | | | |
| Fígado | 4 μ mol/g peso seco | >10/1 | Alta | Alta |
| Rim | 2 μ mol/g | >10/1 | Alta | Alta |
| Eritrócitos | 240 μ g/mL | >10/1 | Moderada | Moderada |
| Sangue total | ~1 mM | >10/1 | Alta | Alta |
| Plasma sangüíneo* | 1-3 μ M | varia | Baixa | Ausente |

* Virtualmente toda GSH no sangue total humano está nas células, especialmente eritrócitos. Adaptado por HALLIWELL & GUTTERIDGE (1999).

Alterações no metabolismo da GSH são encontradas em pacientes com intoxicações, diabetes, uremia, sepsis, processos de inflamações pulmonares, doença coronariana, câncer e estados de imunodeficiência (AMORES-SÁNCHEZ & MEDINA 1999; DINCER *et al.*, 2002; ROTH *et al.*, 2002; JOHNSON *et al.*, 2003). Grandes injúrias estão associadas à depleção das reservas de glutathione hepática, muscular e no plasma, resultando em dano oxidativo e capacidade antioxidante reduzida (MATILA *et al.*, 2000).

Em situações em que o hipercatabolismo está instalado (jejum prolongado, cirurgias, queimaduras, grandes injúrias) há uma deficiência intracelular de L-glutamina, com efluxo acelerado de L-glutamina do músculo e fígado, e dano ao epitélio intestinal (FÜRST, ALTEHELD & STEHLE, 2004); PAN, 2004). A suplementação de L-glutamina melhora o balanço nitrogenado, a síntese protéica e preserva a integridade da mucosa intestinal (VAN DER HULST *et al.*, 1996; MATILA *et al.*, 2000; KOGAR, *et al.*, 2004).

2.6 Estresse Oxidativo mediado por Paraquat

Para a indução de um modelo experimental de estresse oxidativo em animais, e determinação das alterações oxidativas nos tecidos, foi utilizada uma substância agressora não seletiva, o paraquat.

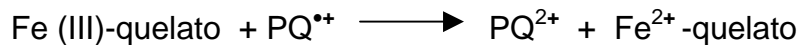
Paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinium) é um herbicida não seletivo e extremamente tóxico para humanos e animais de laboratório. O paraquat acumulado em órgãos é submetido a um ciclo de reações redox no qual o mesmo é metabolizado pelo citocromo P-450 NADPH redutase, ao intermediário reduzido, radical paraquat. Este intermediário produz espécies reativas de oxigênio durante sua oxidação com o oxigênio molecular (NAKAGAWA *et al.*, 1998).

O pulmão é o alvo de maior dano causado por paraquat, pois muitos tipos celulares do pulmão acumulam ativamente a substância, contra um gradiente de concentração, e ainda, o órgão possui uma alta concentração interna de O_2 . Outros tecidos como fígado e rins também são danificados pela ação do paraquat,

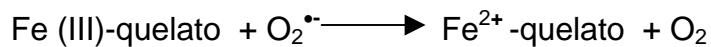
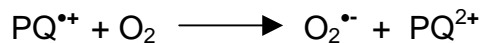
no entanto, de forma mais lenta. Frações microssomais de pulmão (e outros tecidos animais) reduzem o paraquat na presença de NADPH, e o radical paraquat ($PQ^{\bullet+}$) reage então com O_2 para formar $O_2^{\bullet-}$.

O radical paraquat ($PQ^{\bullet+}$) é um agente redutor potente, muito mais do que $O_2^{\bullet-}$. A maioria dos $PQ^{\bullet+}$ pode reduzir o ferro (Fe III) e quelatos de Fe III diretamente (Reação 6), ou mesmo pode reagir com O_2 para formar $O_2^{\bullet-}$ (Reação 7).

Reação 6: Reação do radical paraquat na redução do ferro (Fe III) e quelatos de Fe III



Reação 7: Reação do radical paraquat com O_2



O Fe^{2+} -quelato pode então reagir com H_2O_2 para formar OH^{\bullet} pela reação de Fenton, conforme Reação 8.

Reação 8: Reação do Fe^{2+} -quelato com H_2O_2



As concentrações de O_2 podem favorecer a Reação 7. O paraquat pode também contribuir para a disponibilização de íons metálicos necessários para a formação de OH^{\bullet} , pois não apenas o $O_2^{\bullet-}$ mas também o $PQ^{\bullet+}$ podem liberar íons de ferro da molécula de ferritina.

Injeções intraperitoniais de paraquat em ratos causam uma rápida ativação do ciclo das pentoses no tecido pulmonar, presumidamente pela ação da enzima SOD na conversão de $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 e NADPH estar sendo consumido pela

glutathion redutase. Ainda, NADPH é requerido para a síntese de ácidos graxos (necessários para repor as membranas lipídicas danificadas) e surfactantes. Assim, a diminuição de NADPH pode contribuir para o dano, a síntese de ácidos graxos é diminuída em pulmões tratados com paraquat e há um acúmulo de “dissulfetos mistos” formados entre os grupos proteína-SH e GSSG.

Alem disso, a injúria celular causada pelo estresse oxidativo mediado pelo paraquat pode aumentar os níveis celulares de cálcio (Ca^{2+}) livre intracelular, o que pode promover ativação de enzimas envolvidas na produção de NO^{\bullet} e xantina oxidase, contribuindo para o dano causado pelo paraquat.

A toxicidade de herbicidas bupiridil aos outros tecidos, que não apenas o pulmonar, provavelmente também é mediada pelo ciclo redox, devido a alta distribuição nos tecidos animais do sistema citocromo P-450 NADPH redutase (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

2.7 A Importância do Controle da Glicemia

A hiperglicemia é uma condição que está freqüentemente presente no hipermetabolismo, como visto em doenças agudas severas, injúrias, assim como, em doenças crônicas degenerativas, como o diabetes (MARTINEZ-RIQUELME & ALLISON, 2003). Os altos níveis de glicose podem causar uma alta produção de EROs gerados pelo processo de auto-oxidação direta da glicose, glicação não enzimática e progressiva de proteínas com conseqüente aumento da formação de produtos finais por glicação avançada da glicose, ativação de NAD(P)H oxidases, Óxido Nítrico Sintase (NOS) e ativação de xantina oxidase, que produz espécies oxidantes e subseqüente estresse oxidativo (MARTIN-GALLÁN *et al.*, 2003). Tem-se sugerido que o estresse oxidativo na hiperglicemia, particularmente devido a produção de superóxido na mitocôndria, é responsável pelo aumento de atividade na rota do sorbitol, glicação/glicooxidação não enzimática e ativação de proteína quinase C (OBROSOVA, 2003).

Com isso, a hiperglicemia pode interromper os mecanismos naturais de defesa antioxidantes, por alterar fatores como na diminuição dos níveis de GSH nos tecidos, redução da atividade de enzimas protetoras como SOD, CAT e glutatona redutase, entre outros (JAIN & MCVIE, 1994; OBROSOVA, 2003; POWELL *et al.*, 2004).

O papel da hiperglicemia durante injúrias graves está atualmente recebendo grande atenção. Tem-se demonstrado que a manutenção dos níveis de glicose sanguínea em 6 mmol/L (110 mg%) ou abaixo, leva a uma redução significativa nos índices de morbi-mortalidade (FÜRST, ALTEHELD & STEHLE, 2004).

Finalmente, o controle da glicemia é de essencial importância na homeostasia dos tecidos, e é coordenado pela liberação e atividade do hormônio pancreático, insulina. A liberação do hormônio é controlada por diversos fatores, e diferentes nutrientes exercem algum efeito neste processo, como por exemplo, a glicose, que é reconhecida por ser o nutriente de maior efeito na resposta insulínica. No entanto, atualmente tem-se investigado a influência de outros nutrientes no controle da glicemia sanguínea, dentre eles estão diferentes aminoácidos, como a L-glutamina e aminoácidos de cadeia ramificada (AAR), como a leucina; e também vitaminas, como a vitamina D₃.

2.7.1 Os Nutrientes no Controle da Glicemia

2.7.1.1 A Glicose

A glicose é o estimulante da secreção de insulina de maior importância nos seres humanos, embora muitos outros mecanismos de controle metabólicos, endócrinos e neuronais também atuem (BEARDSALL *et al.*, 2003). Como a insulina estimula, por sua vez, o uso de glicose, essa combinação substrato-hormônio forma um sistema de retroalimentação para a regulação precisa dos níveis plasmáticos de glicose (BERNE & LEVY, 2000).

No nível normal de glicose sangüínea no jejum, a secreção de insulina é mínima, na ordem de 25 ng/min/kg de peso corporal, um nível de atividade fisiológica apenas discreta. Quando a concentração sangüínea de glicose aumenta subitamente de duas a três vezes e mantém-se elevada, a secreção de insulina aumenta acentuadamente em duas etapas, como demonstrado na Figura 3.

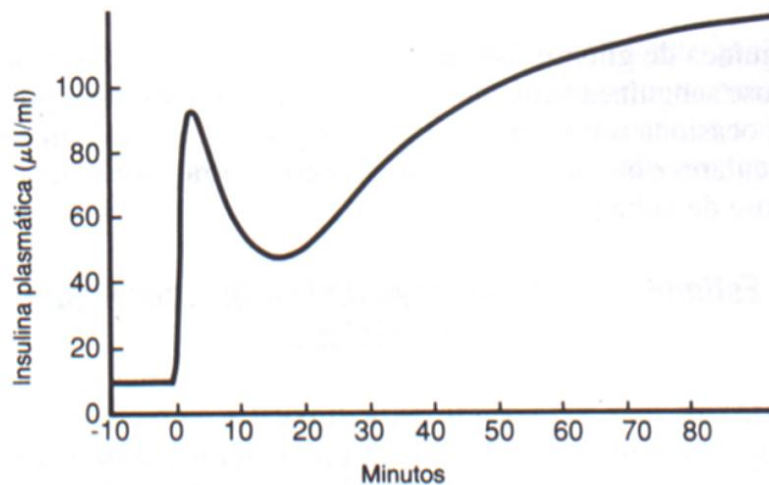


Figura 3 - Elevação na concentração plasmática de insulina após um súbito aumento da glicose sangüínea. Nota-se um rápido aumento inicial, de duas a três vezes o nível normal, seguido do aumento tardio, com início em 15 a 20 minutos, mais intenso e contínuo. Adaptado de GUYTON & HALL, (1998).

Na primeira etapa, a concentração plasmática de insulina aumenta quase 10 vezes entre 3 e 5 minutos, pela liberação imediata de insulina pré-formada pelas células betas das ilhotas de Langerhans. No entanto, essa elevada secreção inicial não se mantém, em vez disso, num período de 5 a 10 minutos, a concentração de insulina diminuiu pela metade. Na segunda etapa, após cerca de 15 minutos, a secreção de insulina se eleva uma segunda vez e atinge um novo platô em 2 a 3 horas. Essa secreção decorre tanto da liberação adicional da insulina pré-formada como da ativação do sistema enzimático que sintetiza e libera o hormônio das células (GUYTON & HALL, 1998).

A glicose administrada por via oral, induz uma maior resposta referente a insulina do que quando administrada por via intravenosa. Essa maior resposta à glicose por via oral é explicada pelo fato de que um ou mais hormônios gastrointestinais, são liberados em resposta a uma refeição, sendo capazes de potencializar a secreção de insulina estimulada por glicose. Este mecanismo gastrointestinal imediato da insulinogênese modera a elevação inicial da glicose plasmática que acompanha a ingestão e absorção de refeição rica em carboidratos (BERNE & LEVY, 2000).

2.7.1.2 Os Aminoácidos

A secreção de insulina também é estimulada pelos aminoácidos que resultam da ingestão de proteínas contidas em uma refeição. Os aminoácidos básicos, arginina e lisina, são os estimulantes mais potentes; leucina, alanina e outros contribuem moderadamente para este efeito.

A glicose e alguns aminoácidos são os estimulantes sinérgicos da liberação de insulina, razão pela qual a elevação da insulina plasmática, que acompanha uma refeição, representa muito mais que o simples efeito aditivo do conteúdo em carboidratos e proteínas (BERNE & LEVY, 2000).

Alguns trabalhos já reportaram a pouca influência de determinados aminoácidos em exercer um efeito fisiológico significativo na secreção de insulina. No entanto, muitos estudos mostram que o mecanismo de secreção do hormônio pode ser potencializada pela presença de aminoácidos em combinação com a glicose. Esta condição é comumente encontrada tanto em tratamentos de animais, como na administração de dietas ou suplementação para humanos, em que a fórmula dietética é de composição nutricional mista ou completa. Ainda, a via rotineiramente utilizada é a oral ou enteral, assim, fatores como por exemplo, a liberação de hormônios gastrointestinais, estarão atuando no complexo mecanismo da liberação de insulina, e conseqüentemente, no controle da glicemia.

Entre os aminoácidos que possuem alguma função na secreção de insulina, o aminoácido leucina, classificado como um aminoácido ramificado, possui um efeito já conhecido. A utilização de uma combinação dos também classificados como ramificados, isoleucina, leucina e valina, no tratamento pode também exercer alguma influência neste efeito.

Adicionalmente, a L-glutamina também já foi referida como tendo ação na liberação de insulina pancreática potencializando o efeito da glicose (GAO *et al.*, 1999; TANIZAWA *et al.*, 2002). Ainda, conforme observado nos trabalhos de Ballard *et al.* (1996) e Boral *et al.* (1998), a L-glutamina adicionada à nutrição parenteral em humanos, apresentou melhora nos níveis de glicemia, desta forma, estudos experimentais sugerem que a L-glutamina é um aminoácido essencial durante condições associadas com a intolerância à glicose. Assim, a L-glutamina parece possuir algum potencial futuro como um nutriente adjuvante durante situações críticas associadas com a resistência insulínica, como no diabetes, sepsis, trauma (FÜRST, ALTEHELD & STEHLE, 2004).

A influência no controle da glicose sanguínea utilizando-se uma combinação dos aminoácidos ramificados com a L-glutamina em um modelo de hiperglicemia é investigada nesta dissertação.

2.7.1.3 A Vitamina D₃

A vitamina D₃ é formada dos precursores 7-Desidrocolesterol (colecalfiferol), encontrado na pele e fontes animais, e ergosterol, encontrado em leveduras (adicionado para enriquecer alimentos), por irradiação UV. A potência da vitamina D é medida em termos de miligrama de colecalfiferol (1 mg de colecalfiferol ou ergociferol = 40 UI). Ambos são metabolizados identicamente no fígado, formando o derivado 25-hidroxicolecalfiferol, que é o principal derivado circulante da vitamina D. Este por sua vez, é convertido em 1 α ,25-hidroxicolecalfiferol (1 α ,25(OH)₂ Vit. D₃), biologicamente ativo, nos túbulos contornados proximais do rim. O composto ativo em conjunto com o hormônio da

paratireóide (PTH) age de modo sinérgico na reabsorção óssea (desmineralização), através do estímulo da formação e atividade de osteoblastos. Ainda, inibem a excreção de cálcio pelo rim, por meio do estímulo de reabsorção nos túbulos distais renais (HAWKINS *et al.*, 2003; HODSMAN *et al.*, 2005).

A vitamina D₃ na forma ativa 1 α ,25(OH)₂ Vit. D₃, facilita a translocação de cálcio através das células da mucosa intestinal, através da síntese da proteína calbinden, necessária ao transporte do mineral (NORMAN & LITWACK, 1997). Este hormônio está também envolvido em várias funções fisiológicas não relacionados a homeostasia mineral, tais como, crescimento e diferenciação celular. Além disso, a caracterização de receptores de alta afinidade da vitamina D₃ nas células β -pancreáticas levantou hipóteses para um papel da vitamina D como agente insulínico (KAJIKAWA *et al.*, 1999). Kajikawa *et al.* (1999) demonstrou o efeito de um análogo da vitamina D, 1 α ,25(OH)₂ lumisterol₃, nas células β -pancreáticas, aumentando a liberação de insulina, induzida por altas concentrações de glicose, junto com uma aceleração no influxo de cálcio (KAJIKAWA *et al.*, 1999). Estes resultados, associados ao estudo do mecanismo de ação (semelhante ao descrito para a glicose na liberação de insulina) reforçam o papel deste análogo como um agente insulínico.

Com isso, as duas substâncias, L-glutamina e vitamina D₃, utilizadas em experimentos de forma combinada, mediadas pela adição de glicose, sugerem um possível efeito potencializador na secreção de insulina; condição esta, que deve ser melhor investigada.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial antioxidante *in vitro* e *ex vivo* do aminoácido L-glutamina, e a influência na manutenção dos níveis de glicose sangüínea.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Relacionados ao potencial antioxidante

- Avaliar o potencial antioxidante e sequestrador de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio *in vitro* da L-glutamina, avaliando a reatividade com o radical DPPH, radical hidroxila e ânion peroxinitrito, bem como na peroxidação lipídica.
- Determinar o efeito do tratamento com L-glutamina e/ou glicose nas concentrações do antioxidante glutathiona em diferentes tecidos de ratos, submetidos ao tratamento crônico no metabolismo normal, e ao tratamento agudo com injúria metabólica induzida por toxicidade.
- Determinar o efeito da L-glutamina contra a peroxidação lipídica nos tecidos, após o tratamento agudo tóxico.

3.2.2 Nas curvas de tolerância à glicose

- Observar o comportamento da administração de L-glutamina na curva de tolerância à glicose em ratos hiperglicêmicos.
- Verificar o efeito agudo da administração da associação de aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina e valina) e da vitamina D₃, combinados à L-glutamina, na curva de tolerância à glicose em ratos hiperglicêmicos.

3.2.3 Na dosagem de insulina plasmática

- Determinar os níveis plasmáticos do hormônio pancreático insulina nos diferentes tratamentos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Reagentes

L-Glutamina – (GLUTAMIN[®]) e os Aminoácidos Ramificados – (Aminoácidos Ramificados[®]), foram cortesia da empresa Support Produtos Nutricionais Ltda. A apresentação dos mesmos foi de envelopes de 10 g, Glutamin (10 g de L-glutamina) e aminoácidos ramificados (3 g de isoleucina, 4,55 g de leucina e 2,45 g de valina).

Glicose PAP – Kit utilizado para dosagem da glicemia pelo método enzimático da glicose oxidase da Labtest[®].

Rat linsulin Ria Kit – LINCO Research (www.lincoresearch.com) utilizado nas dosagens de insulina.

Ácido dietileno-triamino-pentacético (DPTA), albumina sérica bovina (BSA), ácido 2-nitrobenzóico (DTNB), ácido tiobarbitúrico (TBA), brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTMAB), 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), deoxirribose, 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH), 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridium (Paraquat), glutationa redutase (GR), nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida (NADPH), O-dianisidina-2HCl, reagente de Folin, ter-butilhidroperóxido (t-BuOOH), triton X-100, Vitamina D₃, foram adquiridos da Sigma[®].

Ácido etileno-dinitrilo-tetracético (EDTA), carbonato de sódio (Na₂CO₃), cloreto de ferro (FeCl₃), cloreto de sódio (NaCl), éter etílico, fosfato de potássio

(K_3PO_4), fosfato dibásico de sódio (Na_2HPO_4), fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4), fosfato monobásico de sódio (NaH_2PO_4), hidróxido de sódio (NaOH), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sulfato de cobre ($CuSO_4$), tartarato de sódio, foram adquiridos da Merck[®].

Reagentes adquiridos de outras marcas: ácido nitrilotriacético (NTA) - VETEC[®], ácido tricloroacético (TCA) – Synth[®], D – Glicose Anidra - Synth[®], Tris - Riedel de Haën[®].

Todos os reagentes utilizados foram do mais alto grau de pureza disponível no mercado.

4.1.2 Equipamentos

Agitador magnético – Fisatom[®], balança analítica - Sartorius[®], banho maria – Quimis[®], centrífuga - Fanem[®], centrífuga refrigerada - Hitachi[®], espectrofotômetro - Hitachi[®], espectrofotômetro - Pharmacia[®], freezer - Prosdócimo[®], freezer $-70^{\circ}C$ - Harris[®], homogeneizador – Glas-Col[®], microcentrífuga - Eppendorff[®], pH metro – Schott[®], refrigerador - Clímax[®], vortex – Biomatic[®].

4.1.3 Preparação das substâncias

No Quadro 5 são apresentadas as substâncias e os meios de dissolução utilizados nos experimentos animais.

Quadro 5 – Quadro das substâncias e meio de dissolução utilizados nos ensaios animais.

| Substancia (s) | Meio de dissolução |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------|
| <i>Substâncias administradas via oral</i> | |
| Glicose | solução de NaCl 9 g/L |
| L glutamina | água destilada |
| AAR (L-leucina, L-valina e L- isoleucina) | água destilada |
| Vitamina D ₃ | água destilada e 1% de etanol |
| <i>Sustância administrada via subcutânea</i> | |
| Paraquat | solução de NaCl 9 g/L |

Todas as substâncias foram preparadas imediatamente antes da utilização.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Animais

Nos modelos experimentais foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob o protocolo de números **0251/CEUA** – 23080.027439/2003-93/UFSC (anexo 1), com 42-54 dias de idade e pesando de 160 a 200 g. Os animais foram alojados em caixas plásticas em grupos de 5, e permaneceram por 3 dias para adaptação antes do início dos experimentos. Os animais receberam água e comida (ração comercial) *ad libitum*. A temperatura ambiente variou entre 22 e 25°C, e foi utilizado o ciclo claro-escuro de 12 h, (06-18 h luzes acesas, 18-06 h luzes apagadas).

4.2.2 Procedimento Anestésico

Antecedendo o início das coletas de sangue e na administração das substâncias, os animais foram anestesiados em câmara etérea.

4.2.3 Modelos Experimentais

Os animais foram submetidos a um jejum de 14 h antes do início dos experimentos. Todas as substâncias foram administradas aos animais pela via oral por gavagem, mantendo-se um volume máximo de 500 μL , com exceção da administração do paraquat onde a via subcutânea foi a escolhida. Os animais foram previamente divididos em grupos conforme o tratamento e/ou experimento a ser procedido.

Devido à utilização de diferentes metodologias e tratamentos, os modelos experimentais serão apresentados em 3 (três) partes:

4.2.3.1 ENSAIOS *IN VITRO*

Nos ensaios realizados *in vitro* foram utilizadas as concentrações de 1 M e 10 M de L-glutamina.

4.2.3.1a Monitoramento do radical DPPH

O radical DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) é considerado um radical estável, o mesmo é utilizado como ferramenta para estudar a ação de compostos como seqüestradores de radicais livres, e a técnica é independente de qualquer atividade enzimática (VIVOT *et al.*, 2001).

4.2.3.1b Produção e monitoramento de radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$)

A formação e monitoramento dos radicais $\cdot\text{OH}$ foram determinados pelo método da deoxirribose de acordo com GUTTERIDGE & HALLIWELL (1988). Os radicais $\cdot\text{OH}$ são produzidos pela reação do peróxido de hidrogênio com o ferro, levando a oxidação da deoxirribose. Inicialmente foi incubado por 10 min a 25°C, 25 μM de cloreto de ferro (FeCl_3) e 100 μM de ácido nitrilotriacético (NTA). Em

seguida, foram adicionados água deionizada, 10 mM de tampão fosfato de potássio pH 7.4, 2,8 mM de deoxirribose e 1,4 mM de peróxido de hidrogênio e incubados por 20 min à 37°C. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 2,8%, seguida da adição de 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1% em NaOH 0,05 N. Por fim, foram incubados por 15 min à 100°C, e 5 min em gelo. A absorvância das soluções foi medida em 532 nm.

4.2.3.1c Síntese de peroxinitrito (ONOO⁻)

O peroxinitrito foi sintetizado a partir da mistura de 6,6 mL de uma solução de nitrito de sódio 2 M com igual volume de uma solução de H₂O₂ 2,11 M em ácido nítrico 1,85 M utilizando um T de vidro, sendo o produto coletado sobre 6 mL de uma solução de NaOH 4,2 M. O H₂O₂ residual foi removido através da adição de óxido de manganês. A concentração final do peroxinitrito foi determinada pela leitura da D.O. na absorvância à 302 nm em NaOH 1N utilizando um coeficiente de extinção de 1670 M⁻¹cm⁻¹ (RADI *et al.*,1991; e KU, 1996).

4.2.3.1c1 Avaliação da lipoperoxidação induzida pelo peroxinitrito (ONOO⁻)

O ensaio foi realizado em 1M de tampão Tris-HCl (pH=7,4) e ânion peroxinitrito na concentração de 2,64 mM, em microsomas (preparados pelo método descrito por SCHENKMAN & CINTI (1978), conforme o método descrito por RADI *et al.* (1991) e KU (1996) .

4.2.3.2 DOSAGENS DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES E ESTRESSE OXIDATIVO EX VIVO

Para a realização dos testes *ex vivo* foram utilizados 2 (dois) tipos de tratamentos, conforme descrito nos itens 4.2.3.2a e 4.2.3.2b.

A escolha da quantidade de L-glutamina a ser administrada nos tratamentos foi definida após testes realizados para a determinação de uma rápida redução na glicemia na curva de tolerância à glicose. Ainda, tendo em vista a recomendação de 30 g de L-glutamina suplementada via oral para humanos adultos de aproximadamente 70 Kg, em caso de estresse metabólico. Contudo, a concentração definida e adaptada para ratos adultos foi de 1 M, com isso, obtivemos um bom perfil glicêmico e uma ótima dissolução para uso oral. REFFFF

4.2.3.2a Tratamento crônico sem a indução de estresse oxidativo

Para o conhecimento da influência dos diferentes tratamentos nos tecidos e na glicemia de animais normais, sem a indução de estresse oxidativo, um tratamento crônico com duração de 8 (oito) dias foi realizado. Os animais foram divididos em 3 (três) grupos, conforme apresentado no Quadro 6 e mantidos nas condições normais do biotério, sendo as substâncias administradas diariamente, no mesmo horário.

Quadro 6 – Quadro de grupos e substâncias administradas, no tratamento crônico sem indução do estresse oxidativo.

| GRUPO | Substância(s) | Siglas nos gráficos |
|---------------------------|--------------------------------------------|----------------------------|
| Controle n= 05 | Água destilada | c |
| Controle Glicose n= 05 | Glicose - 4 g/kg peso | gli |
| Controle Glutamina n= 05 | Glutamina - 1 M | glu |
| Glicose e Glutamina n= 05 | Glicose - 4 g/kg peso e Glutamina - 1 M | glu+gli |

4.2.3.2b Tratamento agudo com a indução de estresse oxidativo mediado por paraquat

Para a indução do estresse oxidativo, fez-se a aplicação de paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridim), na dosagem de 30 mg/kg de peso do animal. A substância foi dissolvida e administrada diariamente pela via subcutânea, completando o tratamento em 48 h. Os grupos e tratamentos são descritos no Quadro 7 abaixo.

Quadro 7 – Quadro de grupos e substâncias administradas, no tratamento com indução do estresse oxidativo mediado por paraquat.

| GRUPO | Administração via oral | Administração subcutânea | Siglas gráficos |
|--------------------------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------|
| Controle n= 05 | Água destilada | solução de NaCl 9 g/L | c |
| Paraquat Controle n= 05 | Água destilada | Paraquat 30 mg/Kg | pc |
| Controle Glutamina n= 05 | Glutamina 1 M | solução de NaCl 9 g/L | glu |
| Paraquat Glutamina n= 05 | Glutamina 1 M | Paraquat 30 mg/kg | pglu |
| Controle Glicose n= 05 | Glicose 4 g/kg peso | solução de NaCl 9 g/L | gli |
| Paraquat Glicose n= 05 | Glicose 4 g/kg peso | Paraquat 30 mg/kg | pgli |

4.2.3.2.1 Preparação das Amostras de tecido

Extração dos tecidos do intestino delgado, fígado, rins e pulmão

As porções dos órgãos extraídos foram lavadas em solução de NaCl 9 g/L imediatamente após a sua retirada e mantidos em gelo para avaliação do peso. Porções de aproximadamente 0,1 g dos tecidos do intestino, fígado, rins e pulmão foram pesados. Em seguida, foi realizado o preparo dos homogenatos e extratos ácidos, para dosagem das defesas antioxidantes e estresse oxidativo.

Preparação das lâminas para avaliação histológica

Devido à intensa utilização e captação da L-glutamina ocorrer preferencialmente na região jejunal do intestino delgado, alguns experimentos foram também realizados nesta porção do tecido. Para a identificação da porção

jejunal foram realizadas coletas em diferentes partes do intestino delgado, e posteriormente caracterizadas pela histologia para a correta localização da porção desejada.

O material foi coletado e cortado em pedaços de 5 mm de espessura e fixado em Bouïn durante 24 h. A desidratação foi feita em série crescente de álcool e incluído em paraplast, para o processamento histológico de rotina. Cortes de 5 µm de espessura foram corados em Hematoxilina-Eosina (H&E), que cora os núcleos em azul escuro e o citoplasma em rosa. A documentação forográfica foi realizada em microscópio ótico Nikon, para a elaboração do laudo histopatológico.

O processamento e análise do material foram realizados pela Prof^a. Dra. Viviane Maria Woehel do Departamento de Ciências Morfológicas - Histologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Para a realização dos experimentos nos tecidos dos animais nos diferentes tratamentos, foram preparadas soluções para a obtenção final de homogenatos e extratos ácidos das amostras, detalhados a seguir.

4.2.3.2.1a Preparação do homogenato

As alíquotas dos tecidos foram adicionadas ao tampão de fosfato de sódio 20 mM, pH 7.4 contendo 0,1% de Triton X-100 e 150 mM de NaCl (1:20 p/v). A homogeneização foi mantida a 4°C, com cerca de 20 impactos em homogeneizador, seguidos de centrifugação a 10000 g durante 10 min. Dos sobrenadantes foram realizadas as análises de lipoperoxidação dos tecidos, por espectrofotometria.

4.2.3.2.1b Preparação do extrato ácido

As alíquotas dos tecidos foram precipitadas com TCA 12% (1:20p/v) e homogeneizadas com cerca de 20 impactos em homogeneizador, seguidos de centrifugação a 10000g durante 10 min. Imediatamente após a centrifugação, a determinação espectrofotométrica dos tióis não-proteicos (glutathiona reduzida e glutathiona total) foi realizada nos sobrenadantes.

4.2.3.2.2 Avaliação da lipoperoxidação tecidual

As substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram medidas nos tecidos de ratos nos diversos tratamentos. O teste usado para avaliar o dano celular é descrito por OHKAWA, OSHISHI & YAGI (1979) e BIRD & DRAPER (1984). Os homogenatos dos tecidos foram precipitados pela adição de TCA 12% e agitados vigorosamente por 5 s (1 mL de TCA 12% para 100µl da amostra). Em seguida foram incubados por 60 min a 100°C na presença de 0,9 mL de tampão Tris-HCl 60 mM, pH 7.4 (0,1 mM DPTA) e 1 mL de TBA 0,76%. Após a incubação, o material foi resfriado durante 30 min a 5°C e posteriormente centrifugado por 5 min a 10000 g. A leitura foi realizada em 535 nm e a absorbância expressa em $\mu\text{mol.g}^{-1}$. Cálculo: $\text{TBARS } (\mu\text{mol.g}^{-1}) = (A_{535}/153) \times \text{fatores de diluição (homogenato} \times \text{tubo de ensaio)}$. Os fatores de diluição utilizados foram 20x para o homogenato (0,1 g de fígado em 1,9 mL de tampão) e 30 x para o tubo de ensaio (0,1 mL do homogenato em 3 mL de volume final).

4.2.3.2.3 Análise das Defesas Antioxidantes Não-Enzimáticas

4.2.3.2.3a Dosagem do Conteúdo de Glutathiona Reduzida (GSH)

A concentração de GSH foi determinada pelo método de BEUTLER, DURON & KELLY (1963). Com a adição de 0,2 mL de ácido 2-nitrobenzóico

(DTNB) 2,5 mM nas cubetas contendo 1,9 mL de tampão fosfato 0,2 M, pH 8.0 e 0,1 mL do extrato ácido, após 3 min, obtem-se a formação máxima do ânion tiolato (TNB), de cor amarela, mensurável em 412 nm. As concentrações foram expressas em mM de glutathiona reduzida. Cálculo: $GSH \text{ (mM)} = (A_{412} / 14,1) \times \text{diluições (extrato ácido} \times \text{cubeta} \times \text{DTNB)}$, em que A_{412} corresponde à absorvância em 412 nm e 14,1 ao coeficiente de extinção molar do ânion tiolato (TNB). Os fatores de diluição utilizados foram: 20x para o homogenato (0,1 g de fígado em 1,9 mL de tampão), 20x para a cubeta (0,1 mL do homogenato em 2 mL de volume final) e 1,1x do DTNB (0,2 mL do DTNB em 2,2 mL de volume final).

4.2.3.2.3b Dosagem do conteúdo de Glutathiona Total e Glutathiona Oxidada

Para esta análise foi utilizado o método de TIETZE (1969), na qual a taxa de oxidação do NADPH utilizado na redução da glutathiona oxidada (GSSG), que é catalisada pela glutathiona redutase (GR), permite avaliar indiretamente a concentração da glutathiona total (GT) presente no extrato ácido. As amostras foram neutralizadas com K_3PO_4 2 M e retirados 20 μ l e adicionados a um meio de reação contendo 920 μ l de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8.0, 30 μ l de NADPH 3 mM, 20 μ l de DTNB 2,525 mM e 0,06 U de glutathiona redutase. Os valores de K (valor da cinética da reação) foram calculados no programa (kinetics-gbcuv) em um computador acoplado ao espectrofotômetro. Na cubeta de referência a amostra foi substituída pelo tampão. Os valores da glutathiona oxidada foram calculados em equivalentes ($2GSH \Leftrightarrow 1GSSG$), a partir da concentração da glutathiona total e as concentrações expressas em mM. Cálculo: $GT \text{ (mmol.mg}^{-1}) = (K/15,65.10^{-6}) \times \text{diluições (extrato ácido} \times \text{cubeta} \times \text{neutralização}) \times \text{equivalente}$, onde $15,65.10^{-6}$ é a constante padrão para 1 mM de GSSG e 2 é o número de equivalentes.

4.2.3.3 Curvas de tolerância à glicose

Para a obtenção das curvas de tolerância na glicemia os animais foram divididos em grupos e as substâncias administradas por via oral. As dosagens da glicemia foram realizadas nos tempos 0, 15, 30, 60, 120 e 180 min. No Quadro 8 estão apresentados os grupos e as substâncias utilizadas em cada tratamento, e no Quadro 9 as respectivas nomenclaturas utilizadas nos gráficos.

Quadro 8 – Quadro dos grupos e substâncias administradas por via oral, nas curvas de tolerância à glicose.

| GRUPO | Substância (s) | Concentração administrada |
|----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------|
| Basal n= 05 | água destilada | - |
| Controle hiperglicêmico n= 05 | glicose | 4 g/kg peso |
| Controle Glutamina n= 05 | glutamina | 1 e 5 M |
| Glutamina 1 e 5 M n= 05 | glicose e glutamina | 4 g/kg e 1 e 5 M |
| Controle aminoácidos ramificados (AAR) n= 05 | glicose e AAR | 4 g/kg e 0,1 M |
| Aminoácidos ramificados (AAR) n= 05 | glicose, glutamina e AAR | 4 g/kg, 1 e 5 M e 0,1 M |
| Controle Vitamina D ₃ n= 05 | glicose e vitamina D ₃ | 4 g/kg e 0,1 µg/mL |
| Vitamina D ₃ n= 05 | glicose, glutamina e vitamina D ₃ | 4 g/kg, 1 M e 0,1 µg/mL |

Quadro 9 – Grupos e nomenclaturas utilizados nos gráficos das curvas de tolerância à glicose.

| Grupo | Substância (s) | Nomenclatura nos gráficos |
|----------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------|
| Basal (normoglicêmico) | água destilada | Basal |
| Controle hiperglicêmico | glicose | Hg |
| Controle Glutamina | L-glutamina | Controle Glutamina |
| Glutamina 1 M | glicose e L-glutamina 1 M | Glutamina |
| Controle Glutamina 5 M | glicose e L-glutamina 5 M | Controle Glutamina 5 M |
| Glutamina 5 M | glicose e L-glutamina 5 M | Glutamina 5 M |
| Controle AAR | glicose e AAR | AAR |
| AAR | glicose, L-glutamina e AAR | Tratado 1 |
| Controle Vitamina D ₃ | glicose e vitamina D ₃ | Vit. D₃ |
| Vitamina D ₃ | glicose, L-glutamina e vitamina D ₃ | Tratado 2 |

4.2.3.3.1 Coleta das amostras de sangue

As coletas de sangue foram realizadas por capilaridade, pela veia do plexo retro-orbital, para determinação da glicemia e dosagem hormonal. O sangue foi coletado em tubos de ensaio tipo eppendorf.

4.2.3.3.2 Preparação das amostras de soro

4.2.3.3.2a Soro Sanguíneo

O sangue foi centrifugado a 6000 g por 10 min para obtenção do soro.

4.2.3.3.2b Determinação da glicemia

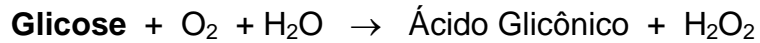
Uma primeira coleta de sangue foi realizada para a determinação da glicemia de jejum (tempo zero), seguida da administração das substâncias aos grupos, e subseqüentes coletas para a composição da curva de tolerância à glicose.

As dosagens foram realizadas em alíquotas de 10 μ L de soro, em duplicatas. Para a determinação da glicemia nas amostras foi aplicado o método enzimático da glicose oxidase, conforme descrito por VARLEY *et al.* (1976), apresentado abaixo. As amostras foram incubadas por 15 min a 37 °C e as absorbâncias lidas em espectrofotômetro em 505 nm. Os testes foram realizados dentro de uma hora após a coleta do sangue e os resultados expressos em mg/dL de glicose.

Princípio do método

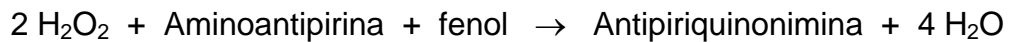
A glicose oxidase (GOD) catalisa a oxidação da glicose de acordo com a seguinte reação:

GOD



O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol sob a ação catalisadora da peroxidase (POD), através de uma reação oxidativa de acoplamento que forma uma antipiriquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra.

POD



Através da fórmula,

$$\text{Glicose} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 100,$$

o resultado foi expresso em mg/dL.

4.2.3.3.2c Dosagens de Insulina

Uma primeira coleta de sangue foi realizada para a determinação da concentração inicial de insulina, seguida da administração das substâncias. Os grupos utilizados neste experimento estão detalhados no Quadro 8, exceto os grupos de Glutamina 5 M, que foram excluídos destas coletas. As subseqüentes coletas foram realizadas nos tempos 15, 30 e 60 min, para a obtenção de aproximadamente 1 mL de soro em cada tempo.

As dosagens de insulina das amostras foram realizadas pelo método de radioimunoensaio (RIA) no Centro de Radioimunoensaio de São Paulo (CRIESP), utilizando-se o kit para dosagem de insulina de ratos (Rat Insulin RIA Kit). As determinações foram realizadas em uniplicatas, em amostras de n=01.

4.2.3.4 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. As comparações estatísticas foram realizadas através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni e/ou Tukey, pelo programa INSTAT versão 3.06. Também foi utilizado em algumas análises o teste “t” de Student. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “p” igual ou menor que 0,05.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A apresentação dos resultados seguirá a ordem descrita pelo item materiais e métodos. Assim os mesmos serão divididos em 3 (três) partes, conforme descrito abaixo.

5.1 Avaliação Histológica

5.2 Defesas Antioxidantes e Estresse Oxidativo

5.2.1 Ensaio *in vitro*

5.2.2 Dosagens *ex vivo*

5.3 Curvas de tolerância à glicose

5.3.1 Dosagem de insulina

5.1 Avaliação Histológica

Primeiramente é apresentado o resultado das análises histológicas realizadas para a confirmação da localização da área de interesse bioquímico, a porção jejunal do intestino delgado dos animais, mostrado na Figura 4 e 5.

Os tecidos foram obtidos de ratos normais após o jejum noturno. A confirmação da região jejunal se fez necessária por ser está a área de maior absorção e utilização da L-glutamina no intestino delgado. Ainda, a porção jejunal foi posteriormente utilizada na determinação da concentração de GSH intestinal após os tratamentos prévios com L-glutamina e/ou glicose.

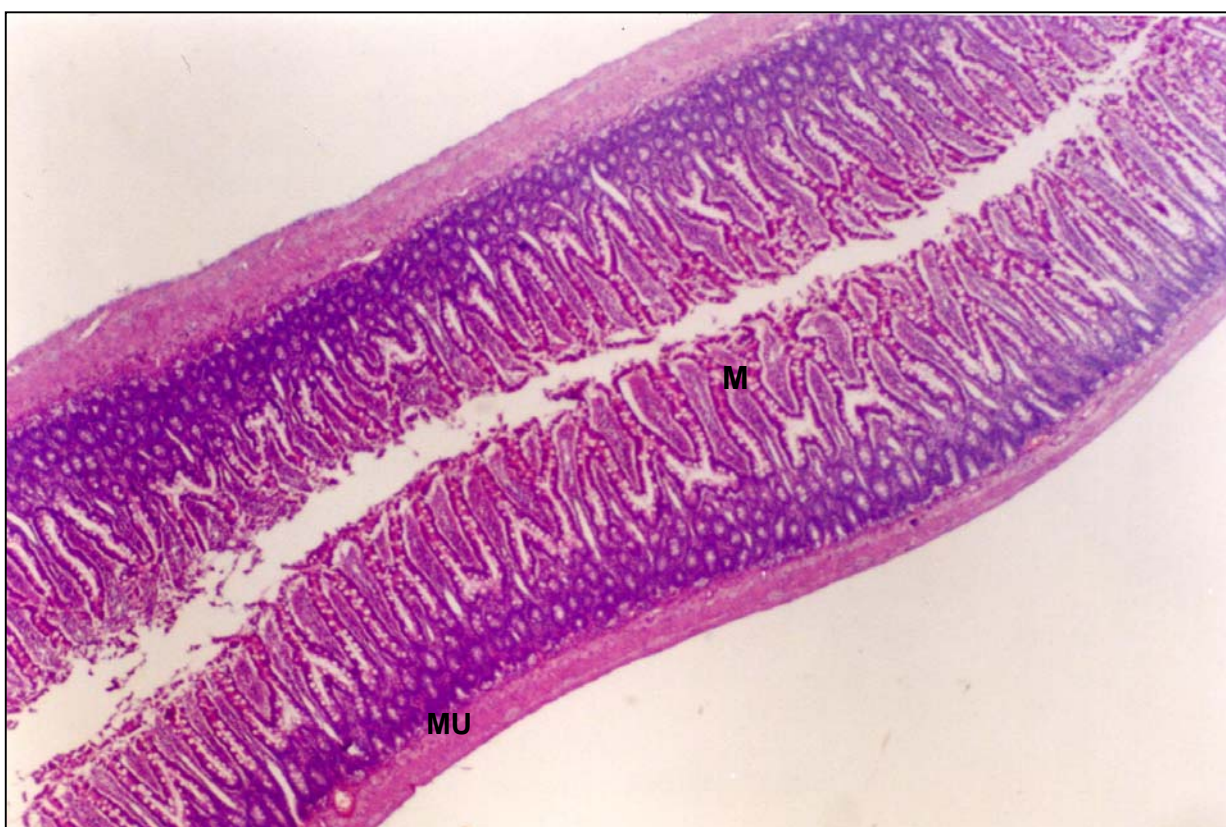


Figura 4 – Micrografia da porção jejunal do intestino delgado de rato, coloração de H.E. em aumento de 40x. A mucosa (M) e as camadas musculares (MU) do jejuno são representadas nessa micrografia.

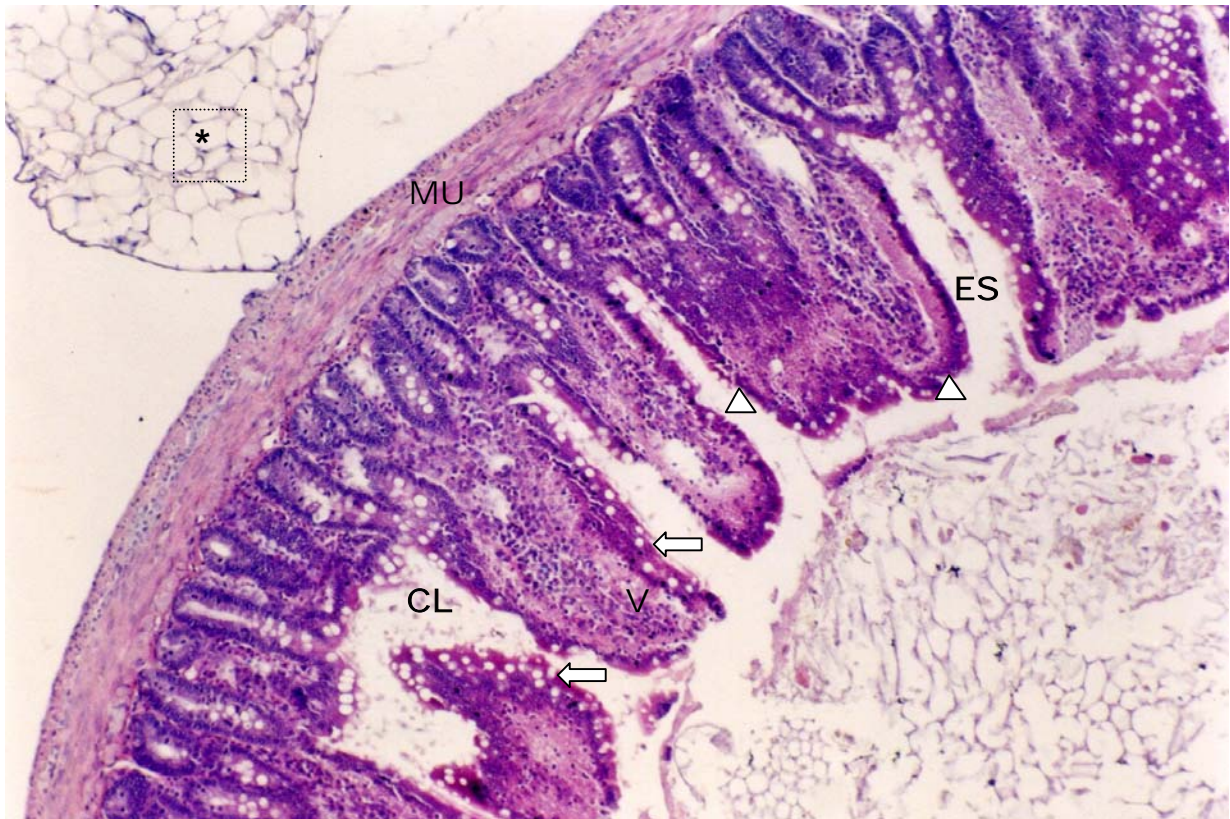


Figura 5 – Micrografia da parte jejunal do intestino delgado de rato em aumento de 100 x. As vilosidades (V) desta região apresentam muitas células caliciformes (setas) e são revestidas por células absortivas (cabeça de seta), em epitélio cilíndrico simples com microvilosidades. As criptas de Lieberkühn (CL) abrem-se para os espaços intervilosos (ES). As túnicas musculares interna e externa (MU) são evidenciadas. * restos de conteúdo intestinal.

5.2 Defesas antioxidantes e estresse oxidativo

5.2.1 Ensaios *in vitro*

Nos ensaios *in vitro* para a determinação do potencial intrínscio da L-glutamina como antioxidante, foram realizados os testes de reatividade com DPPH

e na proteção contra a lipoperoxidação mediada pelo peroxinitrito e radical hidroxila.

Os resultados não serão apresentados, pois em nenhuma das determinações acima a L-glutamina demonstrou propriedades antioxidantes. Os resultados obtidos não apresentaram diferenças quando comparados aos resultados obtidos nos grupos controle. Sugere-se então, que o aminoácido L-glutamina, não apresenta um potencial intrínscico como uma molécula antioxidante, para os testes realizados *in vitro*.

No entanto, por ser extensivamente utilizada endogenamente pelo organismo, a L-glutamina pode necessitar de alterações metabólicas prévias, para então participar ativamente do metabolismo redox das células. Portanto, nesta dissertação foi investigado o comportamento das reservas endógenas do antioxidante glutatona, em condições metabólicas normais e patológicas, assim como, a participação da L-glutamina na redução do estresse oxidativo tecidual.

Como já mencionado na revisão bibliográfica, as EROs estão indiscutivelmente associadas a várias patologias, inclusive na diabetes, patologia cuja conseqüência primária é a constância dos altos níveis de glicose na circulação. A manutenção da glicemia alta tem como conseqüência o estabelecimento de um estado de estresse oxidativo pela geração de produtos glicosilados (advanced glucation end products - AGEs), bem como altas concentrações de espécies reativas combinadas, com ativação de rotas enzimáticas distintas (OBROSOVA, 2003).

Nesta dissertação, utilizou-se o modelo de hiperglicemia para a caracterização dos efeitos da L-glutamina nas concentrações de glicose, assim como a combinação das mesmas a outros nutrientes, como os aminoácidos ramificados e a vitamina D₃.

A preferência por um modelo sem a indução de diabetes nos animais foi devido ao interesse em preservar o mecanismo normal de secreção de insulina. Os modelos para a indução de diabetes descritos na literatura, em que é utilizado aloxana ou estreptozotocina, promovem a destruição das células β -pancreáticas, produtoras de insulina. Com isso, o metabolismo não apenas da glicose, mas também de outros nutrientes sofrem alterações importantes. Portanto, para

observar a influência dos tratamentos nas concentrações de glicose sanguínea, optou-se por um modelo em que a funcionalidade pancreática estivesse preservada, sendo o modelo escolhido o de hiperglicemia.

Contudo, nesta dissertação, foram realizados experimentos em modelos animais, em que se pode observar o comportamento da administração da L-glutamina e glicose em diferentes tratamentos, no metabolismo normal e também em animais sob estresse metabólico induzido. Assim como, na curva de tolerância à glicose.

5.2.2 Dosagens *ex vivo*

5.2.2.1 Dosagens de glutathiona no tratamento crônico sem indução de estresse oxidativo

Primeiramente foram determinados os níveis de glutathiona (reduzida – GSH e total - GT) no tecido hepático e do intestino delgado, após tratamento de 8 dias sem indução de estresse oxidativo.

5.2.2.1a Concentração de glutathiona reduzida (GSH) nos tecidos hepático e intestinal

Inicialmente será apresentado o comportamento da administração de L-glutamina e/ou glicose nas concentrações de GSH no intestino delgado dos diferentes grupos, conforme mostrado pela Figura 6.

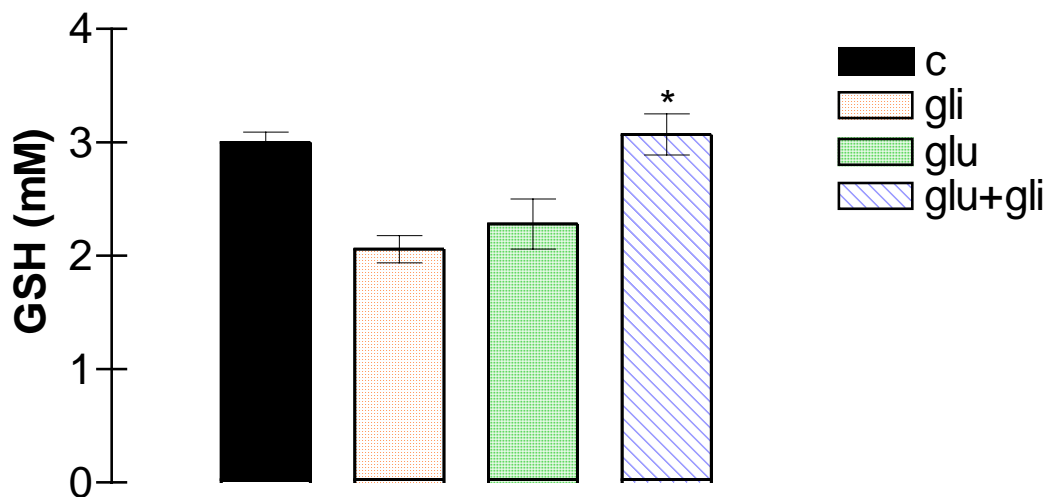


Figura 6 - Concentração de GSH intestinal de ratos normais, nos grupos controle (c), glicose (gli), glutamina (glu) e glutamina e glicose (glu+gli). Os valores expressos são as médias \pm EPM de experimentos realizados em triplicata (n=5). * $P < 0,001$ com relação ao grupo glicose (gli) e ao grupo glutamina (glu).

Pode-se observar na Figura 6 que as concentrações intestinais de GSH sofreram uma redução significativa quando ambos os nutrientes, L-glutamina e glicose, foram administrados de forma isolada. No entanto, a concentração foi completamente restabelecida quando os nutrientes foram combinados no tratamento, como observado no grupo glutamina e glicose (glu+gli).

O intestino delgado é o órgão que participa predominantemente na entrada de L-glutamina exógena para a homeostasia, a qual é regulada por vários fatores locais e sistêmicos. Como o principal combustível para o epitélio intestinal, a L-glutamina é utilizada pelos enterócitos, assim como, liberada na circulação como aminoácido livre ou metabólitos para repor os níveis basais de glutamina (PAN, 2004). Assim, a L-glutamina tem o intestino delgado como o maior sítio de metabolização, sendo o substrato respiratório quantitativamente mais importante para os enterócitos do que a glicose. Isto é observado até mesmo em animais recém nascidos, apesar da captação ser similar à da glicose, nesse tecido. Essa alta taxa de metabolização parece estar relacionada à afinidade da glutaminase dependente de fosfato pelo substrato (SOUBA, 1993).

A taxa de captação de L-glutamina pelo intestino representa uma renovação de toda a glutamina plasmática. No rato, a cada 4,6 minutos aproximadamente 15% da taxa de glutamina no organismo é renovada. A utilização de L-glutamina é 28% mais baixa no íleo do que no jejuno, sendo equivalente à taxa de utilização da glicose nestes segmentos intestinais, 44 e 112%, respectivamente (CURI, 2000).

Muitos trabalhos sugerem que a suplementação de L-glutamina, por via oral ou parenteral, melhora o balanço nitrogenado e a atrofia intestinal pós-trauma, mantém a permeabilidade e altura dos vilos intestinais, assim como, a capacidade absorptiva em pacientes críticos, além de preservar os níveis de GSH intestinal (VAN DER HULST *et al.*, 1996; FÜRST, POGAN & STEHLE, 1997; JOHNSON & KAUFMANN, 2003).

O período de 8 dias de suplementação de L-glutamina e glicose isoladamente pode ter contribuído para a diminuição dos níveis de GSH no intestino (Figura 6).

A síntese *de novo* de GSH, é regulada pelo nível de γ -GCS presente na célula, pela disponibilidade dos substratos, particularmente de L-cisteína, e pelo controle inibitório de GSH sobre a enzima γ -GCS. Os níveis intracelulares de aminoácidos variam com a espécie, tecido e estado nutricional. No entanto, os níveis de L-cisteína circulantes, de forma geral são constantes e menores do que os níveis de L-glutamato e glicina, os quais também são substratos precursores da síntese de GSH.

A forma predominante de L-cisteína no plasma é na forma oxidada, como dissulfeto (CySS), L-cistina, que é convertida intracelularmente à L-cisteína. O fato de o L-glutamato e a L-cistina compartilharem o Sistema transportador X_c^- , significa que o L-glutamato pode afetar a captura de L-cistina, e assim, sua disponibilidade para a síntese de GSH. O Sistema X_c^- é um transportador Na^+ -independente que faz a troca de L-glutamato intracelular por L-cistina extracelular, facilitando assim, a síntese de GSH pela L-cisteína formada pela redução intracelular de L-cistina. Por outro lado, se os níveis extracelulares de L-glutamato são altos, a captação de L-cistina é competitivamente inibida (GRIFFITH, 1999).

Contudo, a utilização crônica de L-glutamina isoladamente no grupo (glu), pode ter levado a uma elevação descompensada de L-glutamato intracelularmente, e com isso, a redução da síntese *de novo* de GSH.

A diminuição dos níveis de GSH intestinal também foi observada no grupo glicose (gli), condição em que a glicose foi administrada diariamente em uma dose indutora de hiperglicemia. Atualmente sabe-se, que a hiperglicemia pode provocar uma alta na produção de espécies reativas, alterando assim, o equilíbrio redox da célula, assim como, causar a inativação de enzimas envolvidas da redução de GSSG, como a glutathiona redutase e glutathiona peroxidase (DINCER *et al.*, 2002). Além disso, a glicose pode interferir na síntese de GSH pela diminuição da expressão de γ -GCS, enzima chave para a síntese de GSH, como também promover a inibição da glicose-6-fosfato dehidrogenase, enzima responsável pelo fornecimento de NADPH para a redução de GSSG (WINIARSKA *et al.*, 2003).

Quando administradas em associação, a L-glutamina e a glicose (glu+gli), o efeito redutor nas concentrações de GSH não foi observado. Este fato pode estar associado ao melhor aproveitamento da molécula de L-glutamina na síntese *de novo* de GSH, deixando de ser o nutriente a ser predominantemente oxidado como fonte energética. Assim como, apesar da presença de glicose poder estar promovendo uma maior formação de espécies reativas, a mesma pode estar aumentando o fornecimento de ATP e NADPH intracelular, que estariam envolvidos tanto na síntese, quanto na conversão de GSSG à GSH, contribuindo assim, para a manutenção das concentrações de GSH no tecido intestinal.

Contudo, sugere-se que para um período prolongado, 8 dias, a suplementação de L-glutamina para a manutenção dos níveis de GSH do intestino delgado, é otimizada quando em combinação com a glicose, no metabolismo de ratos adultos normais.

Na Figura 7 estão apresentados os resultados dos níveis de GSH hepática.

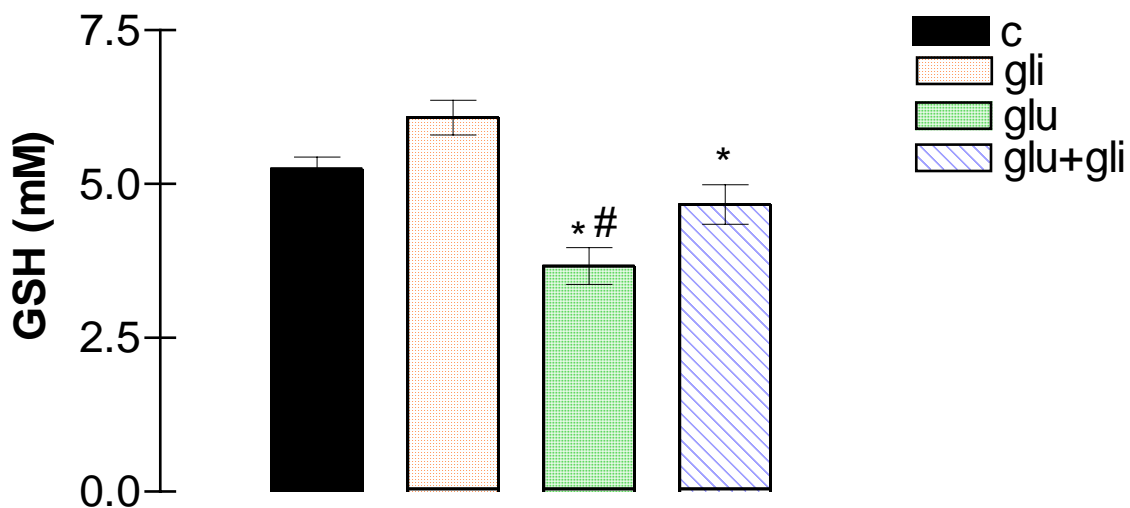


Figura 7 - Concentração de GSH hepática de ratos normais, nos grupos controle (c), glicose (gli), glutamina (glu) e glutamina e glicose (glu+gli). Os valores expressos são as médias \pm EPM de experimentos realizados em triplicata (n=5). * $P < 0,01$ com relação ao grupo glicose (gli) e # $p < 0,01$ com relação ao grupo controle (c).

Os grupos que receberam L-glutamina ou glicose apresentaram diferenças significativas nas concentrações de glutathiona hepática, se comparados ao grupo controle. A suplementação de L-glutamina isolada (grupo glu), aos animais submetidos a um tratamento crônico, sem indução de estresse oxidativo, não foi eficiente na manutenção dos níveis de GSH hepático. No entanto, quando a mesma foi combinada à administração de glicose, como observado no grupo glu+gli, os níveis de GSH permaneceram em valores normais, semelhante às concentrações encontradas no grupo controle (c). A administração de glicose isolada, como mostrado pelo grupo gli, manteve os níveis de GSH altos e semelhantes ao grupo controle (c).

Contudo, sugere-se que os níveis de GSH no tecido hepático, assim como no tecido intestinal, no tratamento crônico por via oral, em um modelo animal, são otimizados com a utilização de L-glutamina combinada à glicose.

5.2.2.1b Concentração de glutatona total (GT) no tratamento crônico sem estresse oxidativo

As dosagens do conteúdo de glutatona total foram realizadas no tecido hepático e intestinal, em animais submetidos ao tratamento crônico sem a indução de estresse oxidativo. As concentrações de GT no fígado são apresentadas na Figura 8, abaixo.

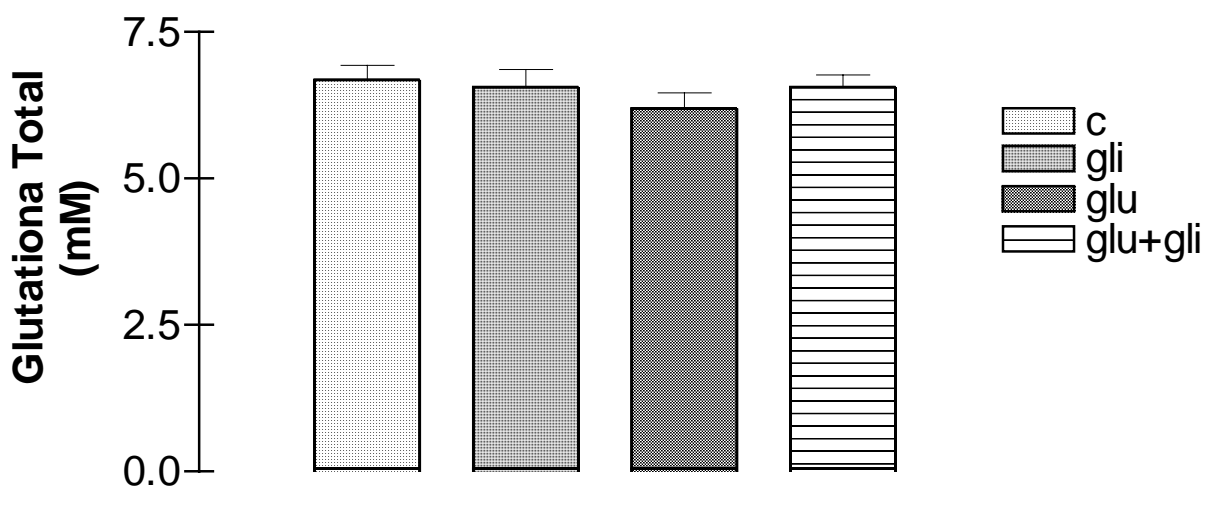


Figura 8 - Concentração de GT no fígado de ratos normais, os valores expressos são as médias \pm EPM de experimentos realizados em triplicata (n=5).

As concentrações de GT no tecido hepático dos diferentes grupos não apresentaram variações significativas, independentes do tratamento utilizado os níveis mantiveram-se estáveis.

Na Figura 9 estão apresentados os resultados obtidos referentes aos níveis de GT intestinal.

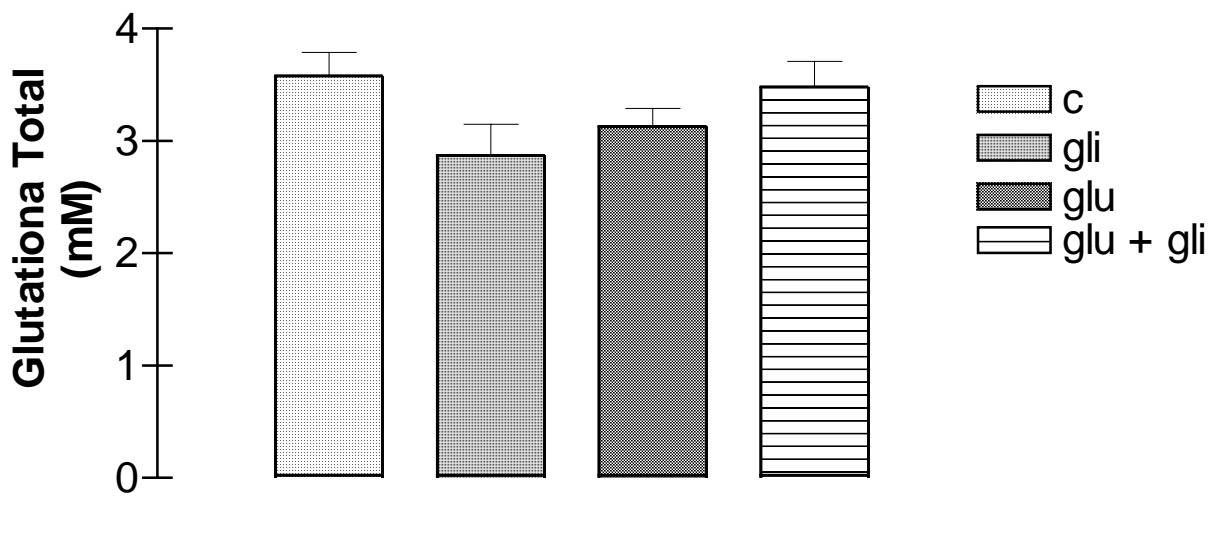


Figura 9 - Concentração de GT intestinal de ratos normais, os valores expressos são as médias \pm EPM de experimentos realizados em triplicata (n=5).

As concentrações de GT intestinal nos diferentes tecidos não apresentaram variações significativas, os níveis mantiveram-se estáveis independentes do tratamento utilizado.

As determinações das concentrações de GT, foram realizadas para a confirmação do conteúdo de glutathione do tecido, considerando-se que a concentração de GSH rotineiramente se aproxima do valor de GT. Ainda, conhecendo-se as concentrações de glutathione total (GT) e glutathione reduzida (GSH) nos tecidos, pode-se extrair os valores de glutathione oxidada (GSSG), e com isso, obter-se a relação GSH/GSSG.

Nas tabelas 1 e 2, a seguir, estão expressos os valores obtidos de GT, GSH e GSSG, assim como a relação GSH/GSSG no tecido hepático e da região jejunal do intestino.

Tabela 1 – Tabela dos valores de GSSG e a relação GSH/GSSG hepática

| Siglas dos grupos nos gráficos | GT (média±EPM) | GSH (média±EPM) | GSSG (mM) | Relação GSH/GSSG |
|--------------------------------|----------------|-----------------|-----------|------------------|
| GLI | 6,56 mM±0,3 | 6,08 mM ±0,28 | 0,476 | 12,7/1 |
| GLU | 6,2 mM ±0,26 | 3,669 mM ±0,3 | 2,531 | 1,45/1 |
| CONTROLE | 6,68 mM ±0,25 | 5,247 mM ±0,2 | 1,433 | 3,67/1 |
| GLI+GLU | 6,56 mM ±0,21 | 4,668 mM ±0,32 | 1,892 | 2,47/1 |

Tabela 2 – Tabela dos valores de GSSG e a relação GSH/GSSG intestinal

| Siglas dos grupos nos gráficos | GT (média±EPM) | GSH (média±EPM) | GSSG (mM) | Relação GSH/GSSG |
|--------------------------------|----------------|-----------------|-----------|------------------|
| GLI | 2,87 mM ±0,28 | 2,058 mM ±0,12 | 0,814 | 2,53/1 |
| GLU | 3,13 mM ±0,16 | 2,28 mM ±0,2 | 0,855 | 2,67/1 |
| CONTROLE | 3,58 mM ±0,21 | 3,0 mM ±0,09 | 0,585 | 5,13/1 |
| GLI+GLU | 3,48 mM ±0,23 | 3,07 mM ±0,18 | 0,41 | 7,49/1 |

A relação GSH/GSSG é encontrada na razão de 10/1 em tecidos e 5/1 no plasma de mamíferos (GRIFFITH, 1999). As relações encontradas neste trabalho, para o tecido hepático e intestinal, ficaram abaixo das concentrações relatadas na literatura, somente no tecido hepático o grupo que recebeu glicose (GLI) apresentou valores próximos aos referidos. No entanto, os valores de referência e os valores obtidos apresentados neste trabalho foram obtidos por técnicas diferentes, HPLC (High Performance Liquid Chromatography) e espectrofotometria, respectivamente, o que pode justificar as diferenças.

5.2.2.2 Dosagens de glutatona reduzida (GSH) e TBARS no tratamento crônico com indução de estresse oxidativo

O modelo de hiperglicemia, utilizado neste trabalho, promove uma condição de hiperglicemia de curta duração (tratamento agudo), com isso, o estresse oxidativo é difícil de ser caracterizado. Então, para obter-se uma condição de

estresse metabólico mais evidente, e com isso observar-se as possíveis alterações mediadas pela administração via oral dos nutrientes, utilizou-se um modelo de indução de estresse oxidativo já bem caracterizado na literatura. O mesmo foi gerado por indução através do oxidante não seletivo paraquat, devidamente caracterizado na revisão bibliográfica deste trabalho.

As dosagens de GSH foram realizadas nos tecidos hepático, renal e no plasma sanguíneo, enquanto que a determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram dosadas nos tecidos hepático e renal.

5.2.2.2a Concentração de glutathiona reduzida (GSH) no tratamento agudo com estresse oxidativo

A Figura 10 mostra os níveis de GSH no tecido hepático após tratamento agudo com paraquat.

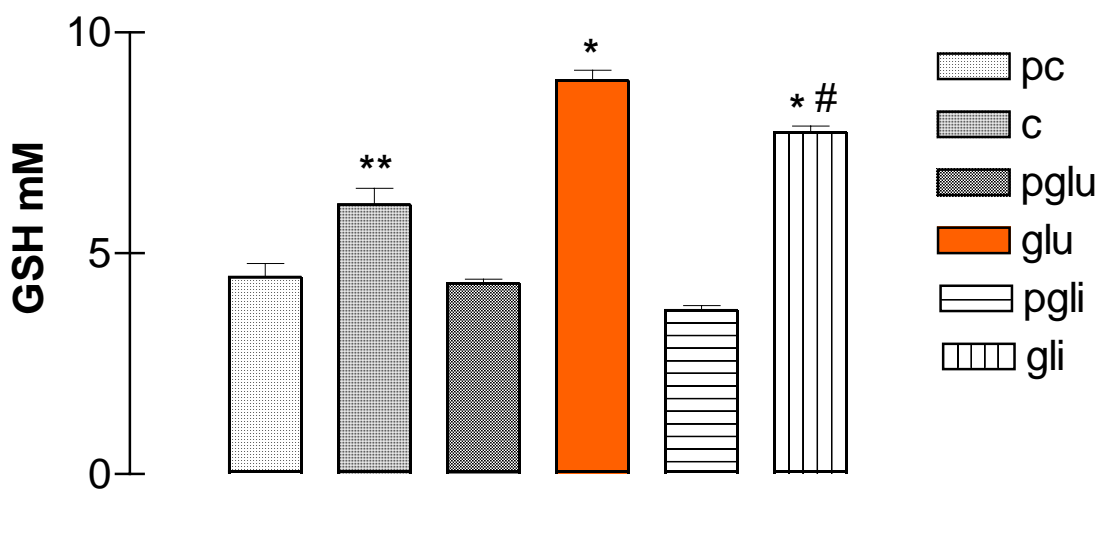


Figura 10 - Concentração de GSH hepática em ratos sob estresse oxidativo, dos grupos paraquat controle (pc), controle (c), paraquat glutamina (pglu), glutamina (glu), paraquat glicose (pgli) e glicose (gli). Os valores expressos são as médias \pm EPM de experimentos realizados em triplicata (n=5). * $P < 0,05$ com relação aos grupos controle (c e pc) e glutamina (glu); # com relação ao grupo glutamina (glu) e ** $p < 0,05$ em relação ao grupo paraquat controle (pc).

O tratamento com paraquat promoveu uma redução significativa ($p < 0,05$) nos níveis de GSH hepático em todos os grupos analisados, conforme Figura 10. Nos grupos não submetidos ao uso do paraquat, a administração de L- glutamina (glu) e glicose (gli) promoveu um aumento importante nas concentrações de GSH, quando comparados ao grupo controle (c). No entanto, a administração de L- glutamina apresentou um efeito significativamente ($p < 0,05$) maior, no grupo tratado, sem a indução de estresse oxidativo (grupo glu).

A metabolização do paraquat pelos tecidos passa pela ativação das enzimas do sistema do citocromo P450, o que contribui para a perda intracelular do conteúdo de GSH. As reações do processo de metabolização estão limitadas à adição espontânea ou catalizada pela molécula de GSH a espécies reativas formadas endogenamente (GRIFFITH, 1999).

A concentração de GSH tecidual depende da utilização e da conversão intracelular de glutationa oxidada (GSSG), assim como, da síntese *de novo* da molécula. A redução de GSSG para GSH é catalisada pela enzima glutationa redutase, presente no citosol e na matriz mitocondrial das células. Esta enzima é dependente da concentração de NADPH, e quando a concentração do mesmo é baixa na célula, há um acúmulo de GSSG, e expulsão do meio intracelular; e assim, uma diminuição do substrato a ser reduzido. A diminuição da concentração de NADPH é observada em condições de estresse oxidativo, como por exemplo, na detoxificação de substâncias, em que há a ativação do sistema citocromo P450; e também em casos de descontrole glicêmico (SEN, 1997; GRIFFITH, 1999).

Ainda, a GSH presente no plasma sangüíneo é originada principalmente do fígado (KAPLOWITZ, 1996; GRIFFITH, 1999), o que pode explicar também a baixa concentração de GSH encontrada no tecido hepático, nos tratamentos com paraquat.

Com a finalidade de manter os níveis de GSH plasmático, para controlar o estresse oxidativo generalizado, os animais que receberam L-glutamina no tratamento com paraquat (grupo pglu), apresentaram valores de GSH plasmática significativamente elevados, conforme observado na Figura 11.

Na Figura 10, observa-se que o grupo controle que recebeu L-glutamina (glu), apresentou a maior concentração de GSH hepática, sugerindo que a L-glutamina foi efetiva no aumento do conteúdo de GSH neste tecido, quando administrada via oral por um período de 48 horas.

Os níveis de GSH no plasma sanguíneo são apresentados na Figura 11, abaixo representada.

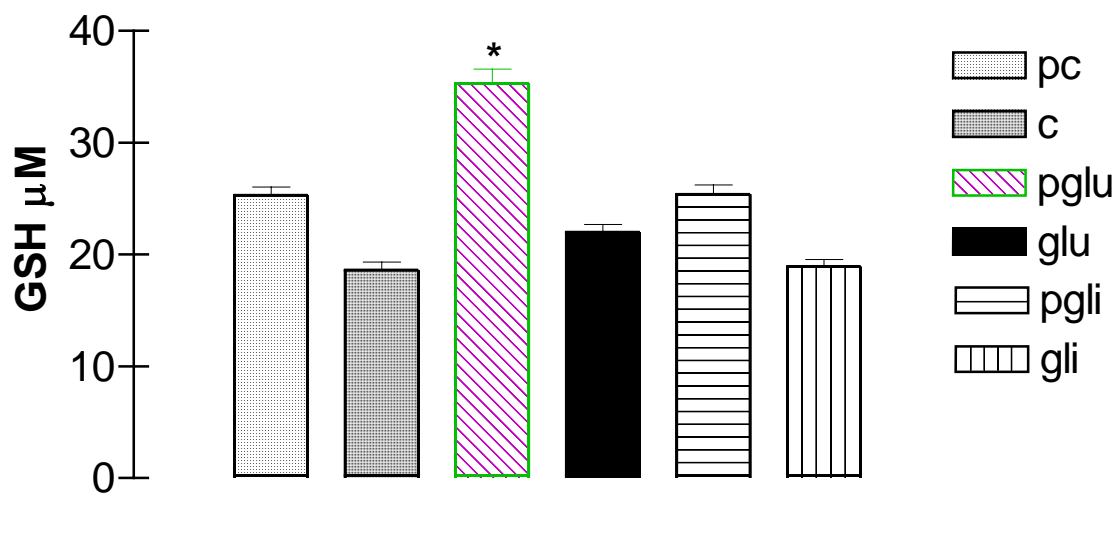


Figura 11 - Concentração de GSH plasmática em ratos sob estresse oxidativo, dos grupos paraquat controle (pc), controle (c), paraquat glutamina (p glu), glutamina (glu), paraquat glicose (p gli) e glicose (gli). Os valores expressos são as médias \pm EPM de experimentos realizados em triplicata (n=5). * $P < 0,001$ do grupo paraquat glutamina (p glu) em relação aos demais grupos.

Na Figura 11, pode-se observar o comportamento da variação dos níveis de GSH no plasma de animais controles e submetidos ao tratamento com paraquat, nas diversas suplementações. Os grupos sob estresse oxidativo apresentaram, de modo geral, os níveis de GSH maiores do que os respectivos grupos controle. Os grupos paraquat controle (pc) e paraquat glicose (p gli) apresentaram níveis de GSH plasmática semelhantes.

No entanto, no grupo paraquat glutamina (pglu) em que a L-glutamina foi administrada isoladamente, observou-se um efeito significativamente importante ($p < 0,001$) no conteúdo de GSH, se comparado aos demais grupos do experimento. Como brevemente discutido anteriormente, a alta concentração de GSH encontrada no plasma pode ser devido ao intenso fornecimento de GSH pelo tecido hepático. Ainda, outros trabalhos como do grupo de SEN (1997), em que foi utilizado a L-glutamina em roedores submetidos a altas doses de quimioterapia, a mesma foi efetiva na manutenção dos níveis de GSH plasmática e tecidual (SEN, 1997),

A seguir, na Figura 12, está apresentado o efeito dos diferentes tratamentos no conteúdo de GSH renal.

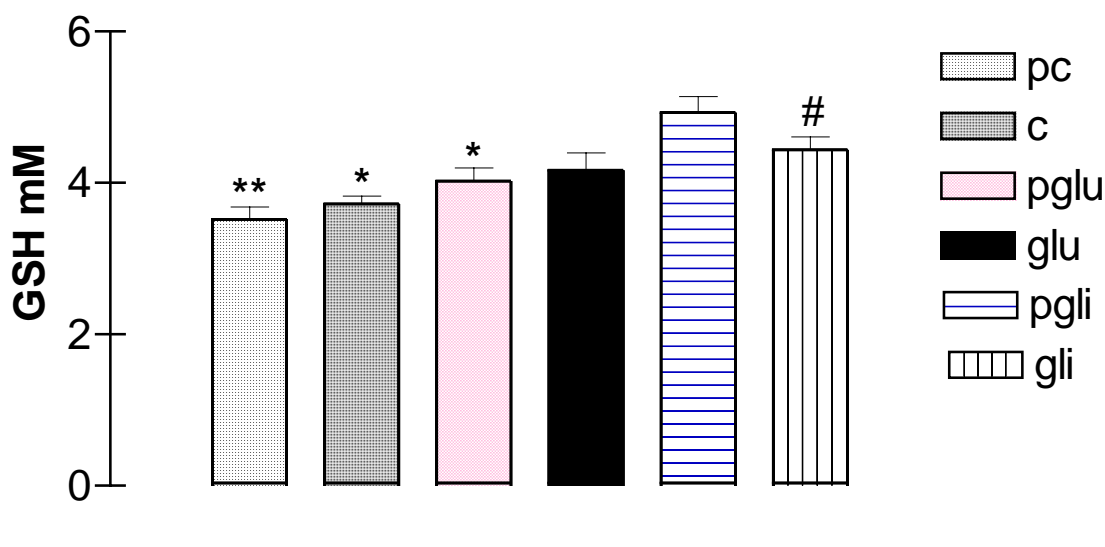


Figura 12 - Concentração de GSH renal em ratos sob estresse oxidativo, dos grupos paraquat controle (pc), controle (c), paraquat glutamina (pglu), glutamina (glu), paraquat glicose (pgli) e glicose (gli). Os valores expressos são as médias \pm EPM de experimentos realizados em triplicata ($n=5$). * $P < 0,05$, ** $p < 0,001$ com relação ao grupo paraquat glicose (pgli); e # $p < 0,05$ com relação ao grupo paraquat controle (pc).

Os níveis de GSH encontrados no tecido renal dos animais não apresentaram diferença significativa entre os grupos tratados com paraquat e os

respectivos grupos controles não tratados. No entanto, os animais do grupo paraquat glicose (pgli) apresentaram um nível de GSH renal significativamente maior. Essa diferença é ainda maior ($p < 0,001$) se comparado ao grupo controle (pc). Os animais dos grupos controles, glutamina (glu) e glicose (gli), também apresentaram níveis altos e semelhantes ao grupo paraquat glicose (pgli), de GSH neste tecido.

A molécula de L-glutamina é fundamental para as células renais, onde participa como a doadora quantitativamente mais importante de NH_3 , que é combinado a H^+ proveniente do ácido carbônico que é dissociado em HCO_3^- e H^+ . Sendo a molécula de HCO_3^- devolvida à circulação, onde é importante na manutenção do pH sangüíneo. Assim, o metabolismo renal da molécula de L-glutamina é essencial para o tamponamento ácido-básico do plasma. Ainda, o esqueleto de carbonos do L-glutamato, é convertido a fosfoenolpiruvato ou piruvato diretamente, via 2-oxoglutarato, fazendo parte da gliconeogênese renal (NEWSHOLME *et al.*, 2003). Em situações em que ocorre acidose metabólica, como em longos episódios de hipoglicemia ou diabetes, a gliconeogênese participa intensivamente da manutenção dos níveis de glicose, como observado também em jejum prolongado e estresse oxidativo. Nessas condições a gliconeogênese hepática, pelos aminoácidos, é gradualmente substituída pela gliconeogênese renal, sendo que, a glicose produzida pelos rins pode somar para mais de 50% da glicose circulante (TAPIERO *et al.*, 2002; NEWSHOLME *et al.*, 2003).

Sendo assim, a molécula de L-glutamina, quando suplementada, parece não alterar de forma importante o conteúdo de GSH neste tecido, talvez por estar envolvida nos processos de tamponamento sangüíneo e/ou manutenção dos níveis de glicose no caso do grupo tratado com paraquat (pglu). Não houve uma diferença significativa entre os grupos controles e os grupos glutamina (pglu e glu).

A glicose quando administrada isoladamente, no grupo paraquat (pgli), apresentou maior nível de GSH quando comparado aos controles (pc e c) e paraquat glutamina (pglu), resultado que seria esperado pela administração de L-glutamina. No entanto, no trabalho de WINIARSKA *et al.* (2003) e colaboradores

foram observados os valores de GSH no córtex renal de coelhos, assim como a influência da adição de precursores da gliconeogênese na cultura celular. Nesse trabalho, constatou-se que a elevação intracelular de glicose-6-fosfato, foi responsável pela formação acelerada de NADPH na célula, via a ativação das enzimas do ciclo da pentose fosfato (glicose-6-fosfato desidrogenase – G6PD). Com o aumento de NADPH disponível na célula, há um aumento da razão GSH/GSSG, possivelmente pela maior disponibilidade de substrato para a redução da GSSG intracelular, neste tecido. Como na oxidação da glicose, o primeiro metabólito disponível é a glicose-6-fosfato, a administração de glicose pode ter contribuído para o resultado obtido nos níveis de GSH renal no tratamento com paraquat.

5.2.2.2b Peroxidação lipídica nos tecidos hepático e renal após a indução de estresse oxidativo

A peroxidação lipídica nos tecidos hepático e renal foi determinada pela dosagem de TBARS conforme apresentado nas Figuras 13 e 14.

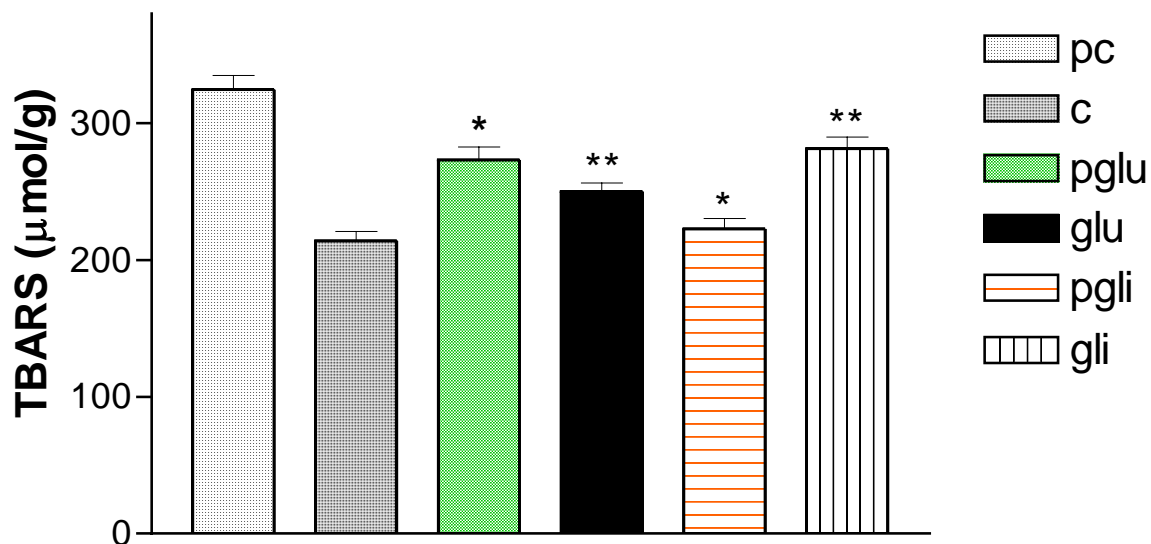


Figura 13 – Determinação da concentração de TBARS no tecido hepático, após tratamento com paraquat, dos grupos paraquat controle (pc), controle (c), paraquat glutamina (pglu), glutamina (glu), paraquat glicose (pgli) e glicose (gli). Os valores expressos são as médias \pm EPM de experimentos realizados em triplicata (n=5). * $P < 0,001$ com relação ao grupo paraquat controle (pc) e ** $p < 0,001$ com relação ao grupo controle (c).

O tratamento com paraquat aumentou significativamente o dano celular medido pelo TBARS no tecido hepático. A utilização de L-glutamina foi efetiva na diminuição do efeito agressor do paraquat, assim como a glicose. A menor agressão tecidual observada, quando administrado a L-glutamina aos animais sob estresse oxidativo, pode-se dar devido ao efeito da mesma na produção (síntese *de novo*) do antioxidante glutathione. Assim, a síntese de glutathione poderia estar promovendo um equilíbrio entre a produção e eliminação das espécies reativas, via aumento da capacidade antioxidante da célula. Quanto aos resultados da glicose no tratamento com paraquat (grupo pgli), pode-se sugerir, conforme discutido acima, que a glicose, pode estar atuando nas concentrações intracelulares de NADPH. Desta forma, a conversão de GSSG a GSH estaria otimizada e o potencial redox da célula hepática alterado.

Nos grupos controle, em que foram administradas glicose (gli) ou L-glutamina (glu), houve um pequeno aumento do dano tecidual, sendo a glicose mais danosa ao tecido em condições fisiológicas.

Com isso, pode-se sugerir que para o tecido hepático sob estresse oxidativo, a administração de L-glutamina ou glicose pode minimizar o efeito agressor do tratamento. No entanto, em condições metabólicas normais a administração das mesmas eleva o níveis de dano celular medido pelo método TBARS.

Na Figura 14 abaixo estão apresentadas as determinações de TBARS no tecido renal.

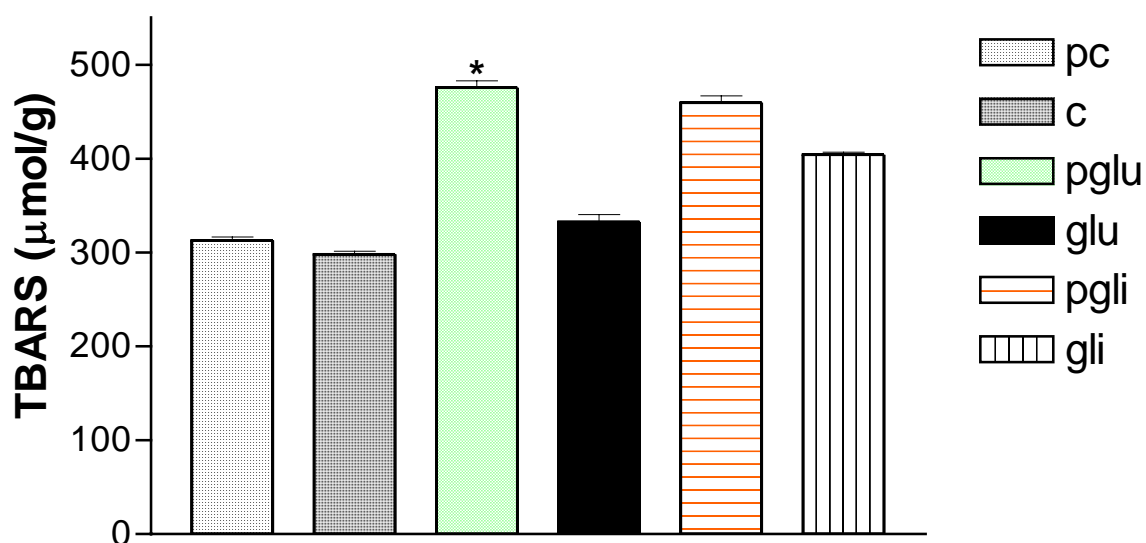


Figura 14 – Determinação da concentração de TBARS no tecido renal, após tratamento com paraquat, dos grupos paraquat controle (pc), controle (c), paraquat glutamina (pglu), glutamina (glu), paraquat glicose (pgli) e glicose (gli). Os valores expressos são as médias \pm EPM de experimentos realizados em triplicata (n=5). * P<0,001 com relação aos demais grupos, exceto para o grupo pgli.

No tecido renal o dano oxidativo causado pelo paraquat, no grupo controle (pc), apresentou pouca diferença quando comparado ao grupo controle (c), em que a administração de paraquat não foi realizada. No entanto, quando o

tratamento com paraquat foi acompanhado da administração de uma das substâncias estudadas, observado nos grupos paraquat glutamina (p_{glu}) ou paraquat glicose (p_{gli}), o nível de estresse oxidativo foi alterado, apresentando um aumento significativo ($p < 0,05$). Contudo, a administração das substâncias combinadas parece estar contribuindo para um incremento no estresse oxidativo. Sugere-se que as mesmas possam estar agindo em diferentes rotas enzimáticas, e não apenas nas concentrações de GSH, responsáveis pela inativação das espécies reativas. Um efeito similar pode ser observado nos grupos controle da glicose (grupo gli), porém com menor intensidade.

Com isso, sugere-se que no tecido renal, a administração preventiva de L-glutamina ou glicose não contribuiu positivamente para a redução do dano oxidativo tecidual causado pelo paraquat.

5.3 Curvas de tolerância à glicose

5.3.1 Tratamento hiperglicêmico e grupos glutamina

Para obter-se um processo mais efetivo na modulação da resposta glicêmica, caracterizando o modelo de hiperglicemia, a glicose foi utilizada como nutriente coadjuvante nos diferentes tratamentos. Primeiramente será mostrada, na Figura 15, o grupo normoglicêmico e as curvas de tolerância do modelo hiperglicêmico e do efeito da administração de insulina 0,5 UI, associada à condição de hiperglicemia (glicose 4 g/kg).

Em seguida, serão apresentados os resultados da influência da administração de L-glutamina, e da mesma combinada aos aminoácidos ramificados e a vitamina D₃, no modelo de hiperglicemia.

Na Figura 15, estão representadas as curvas: basal e de tolerância à glicose pela administração de glicose via oral em ratos normoglicêmicos, e o efeito da administração de insulina intraperitoneal 0,5 UI. Nesta Figura, observa-se que

após a administração da glicose, a glicemia do grupo hiperglicêmico sofreu uma elevação significativa ($p < 0,05$) já nos primeiros 15 minutos, atingindo o pico máximo em 30 minutos. O retorno da glicemia a níveis próximos aos valores do tempo zero é observado após 1 hora de tratamento. Este perfil caracterizou, de maneira reprodutível, a curva de tolerância à glicose neste modelo experimental.

Ainda na Figura 15, a efetividade da ação da insulina exógena (Bioinsulin) administrada pela via intraperitoneal foi demonstrada utilizando-se a dosagem de 0,5 UI, numa condição de hiperglicemia. Nesta curva, a insulina impediu o pico de glicemia característico neste modelo experimental, já aos 15 minutos após a administração do hormônio. Ocorreu uma redução significativa na glicemia nos tempos 60 e 120 minutos em relação ao tempo zero do experimento. O grupo que recebeu insulina manteve a glicemia abaixo dos níveis glicêmicos basais dos animais normoglicêmicos. Com relação a dose e o tempo de ação, estes resultados estão de acordo com os efeitos hipoglicemiantes clássicos já relatados para a insulina (GÖKE, 1998; HEI, 1998; NYSTRIN & QUON, 1999; BEARDSALL *et al.*, 2003).

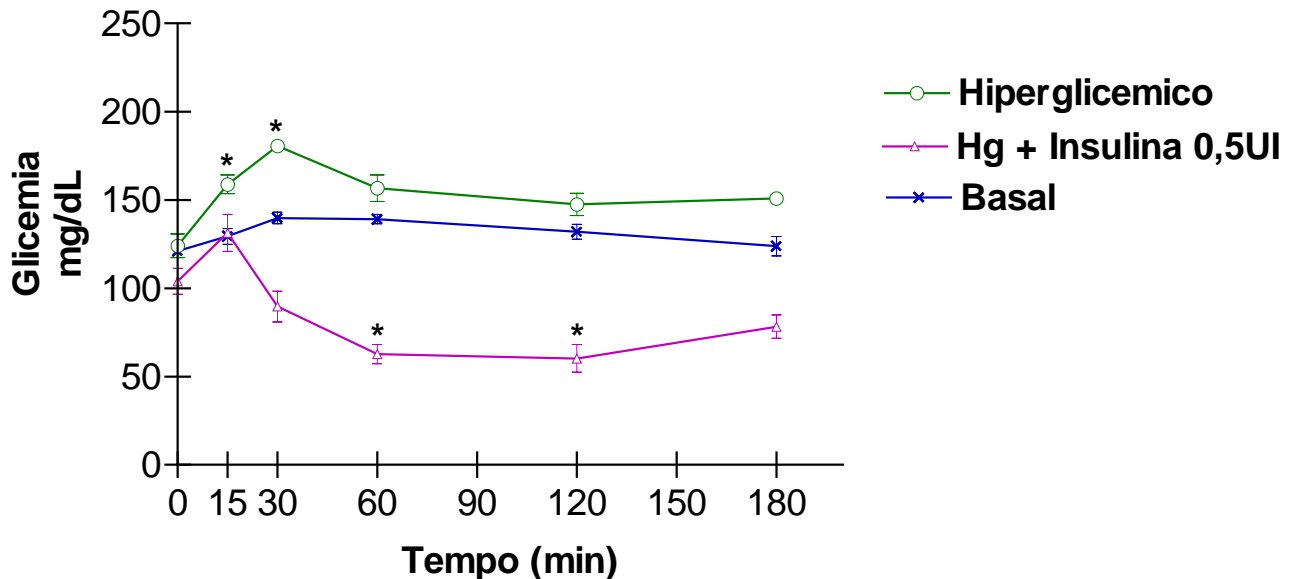


Figura 15 – Dosagem de glicemia observada no grupo basal (normoglicêmico) e curvas de tolerância à glicose dos grupos hiperglicêmico (Hg), após a administração via oral de glicose, e curva do efeito da administração de insulina 0,5 UI via intraperitoneal (grupo Hg + Insulina 0,5 UI). Os valores da glicemia são a média \pm E.P.M. de experimentos realizados em duplicata (n=5). * Significativo para $p < 0,05$ em relação aos respectivos tempos zero.

A concentração de glicose no sangue é regulada pela interação coordenada de vários fatores que atuam na secreção de insulina pancreática. Estes fatores são hormônios gastrointestinais e pancreáticos, neurotransmissores autônomos, assim como a presença de nutrientes como a glicose, aminoácidos, ácidos graxos e corpos cetônicos, que promovem a secreção de insulina.

Na Figura 15, está representado o comportamento padrão das variações na concentração de glicose plasmática, pela administração de glicose por via oral. A glicose constitui o principal estímulo para a secreção de insulina, sendo este estímulo mais efetivo quando a mesma é administrada pela via oral do que por via intravenosa (CURI, 2000).

A glicose penetra na célula β -pancreática por transporte facilitado, o qual é mediado por transportadores específicos. A mesma é então fosforilada, pela glicocinase, modificando a proporção ATP/ADP na célula. Ocorre um bloqueio de

canal K^+ sensível ao ATP e despolarização da membrana plasmática. A ativação compensatória de um canal de Ca^{2+} dependente de voltagem, resulta no influxo de Ca^{2+} para dentro da célula. O Ca^{2+} ativa a fosfolipase A_2 e a fosfolipase C, que provocam a formação de ácido araquidônico, inositol-polifosfatos e diacilglicerol. O inositol-1,4,5-trifosfato mobiliza o Ca^{2+} a partir do retículo endoplasmático da célula β , elevando ainda mais a concentração citosólica do cátion. O Ca^{2+} intracelular atua como secretagogo da insulina (CURI, 2000).

Quando provocada pela glicose a secreção da insulina é bifásica: a primeira fase alcança um nível máximo após 1 a 2 minutos, e é de curta duração, enquanto que a segunda fase apresenta um início tardio, porém com uma duração mais longa, conforme observado na Figura 15.

Na Figura 16, estão representados os grupos basal, hiperglicêmico, controle glutamina 1 M e glutamina 1 M, na resposta glicêmica.

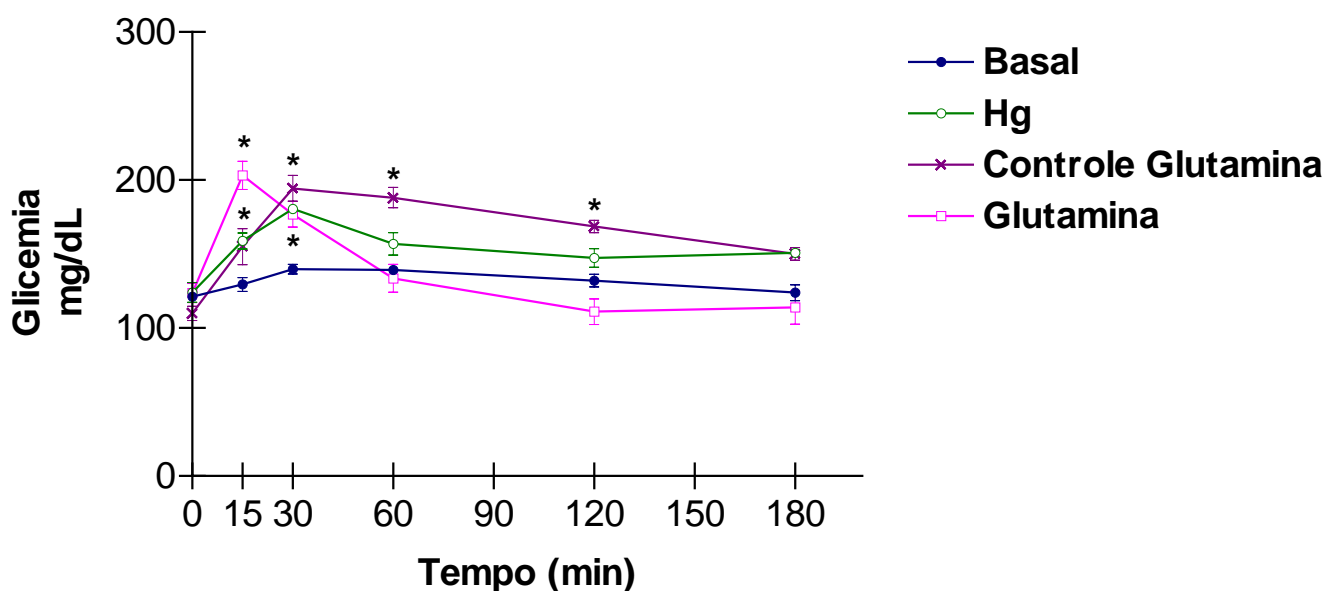


Figura 16 – Curvas de tolerância à glicose dos grupos: basal, hiperglicêmico (Hg), controle glutamina (glutamina 1M) e hiperglicêmico e glutamina 1M (glutamina). Os valores da glicemia são a média \pm E.P.M. de experimentos realizados em duplicata (n=5). * Significativo para $p < 0,05$ com relação ao tempo zero do respectivo grupo.

Nesta Figura, observa-se que o grupo Basal, conforme esperado, manteve os valores de glicemia estáveis durante todo o período observado, de zero a 3 horas. No grupo hiperglicêmico (Hg), o pico máximo na glicemia ocorreu em 30 minutos após a administração de glicose, como já descrito na Figura 15.

No grupo Controle glutamina, a glicemia apresentou uma elevação significativa ($p < 0,05$) já nos primeiros 15 minutos, sendo o pico máximo observado em 30 minutos e a manutenção dos valores altos até a segunda hora, após o tratamento. O perfil da curva se assemelha ao grupo hiperglicêmico até os primeiros 30 minutos, no entanto, a redução da glicemia ocorre de forma mais lenta e duradoura, nos períodos seguintes.

No grupo glutamina, o pico máximo da glicemia ocorreu em 15 minutos após o tratamento, sofrendo uma rápida queda na primeira hora. Os valores encontrados em 15 minutos são significativamente maiores que os mesmos observados para os grupo Hg. Ainda, após a primeira hora, a redução da glicemia continua ocorrendo. Com isso, sugere-se que a presença de L-glutamina na concentração de 1 M no modelo de hiperglicemia, contribuiu para uma maior e mais rápida elevação da concentração de glicose sangüínea. Além disso, parece exercer um forte efeito na redução plasmática de glicose já na primeira hora do tratamento via oral.

Sugere-se que este efeito da administração da L-glutamina isolada (grupo controle glutamina), na concentração de glicose sangüínea, esteja relacionado ao fato da molécula ser um importante substrato precursor de glicose hepática, contribuindo para a síntese e liberação de glicose na circulação, após a administração por via oral (CURI, 2000).

Ainda, cabe salientar que a mesma possui uma taxa de captação intestinal bastante semelhante a da glicose.

Na Figura 17, observa-se o efeito da administração de L-glutamina na concentração de 5 M, na curva de tempo resposta da glicemia.

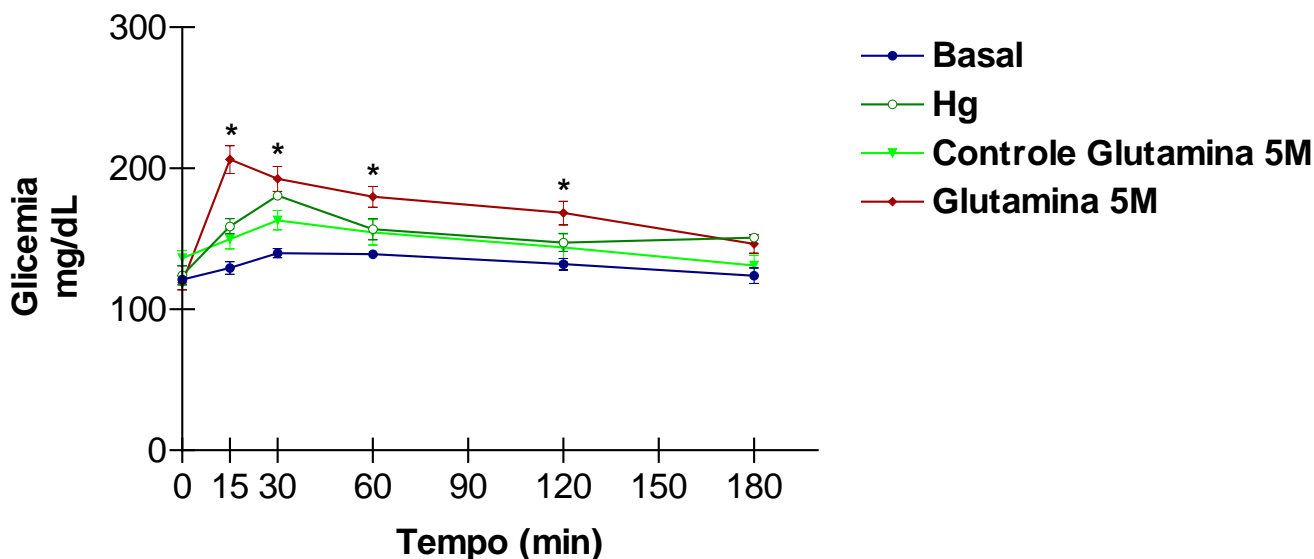


Figura 17 – Curvas de tolerância à glicose dos grupos: basal, hiperglicêmico (Hg), controle glutamina 5M (glutamina 5M) e hiperglicêmico e glutamina 5M (glutamina 5M). Os valores da glicemia são a média \pm E.P.M. de experimentos realizados em duplicata (n=5). * Significativo para $p < 0,05$ com relação ao tempo zero do respectivo grupo.

O grupo controle glutamina 5 M apresentou um perfil linear de glicemia, não apresentando alterações significativas em relação ao tempo zero durante as 3 horas observadas. A L-glutamina (5 M) não parece influenciar na curva de tolerância à glicose.

No grupo glutamina 5 M, o pico de glicemia ocorreu em 15 minutos e os valores mantiveram-se altos em 30 minutos, 1 e 2 horas ($p < 0,05$), retornando a níveis próximos aos iniciais, somente na terceira hora. A L-glutamina na concentração de 5 M combinada à glicose, no grupo glutamina 5 M, apresentou uma curva de tolerância à glicose com valores de glicemia altos, porém extensivamente duradouros.

A L-glutamina administrada à 5 M isoladamente (grupo controle glutamina 5 M), parece não exercer um papel tão importante metabolicamente como observado para uma administração em menor concentração. Alguns trabalhos relatam a melhor funcionalidade da L-glutamina em concentrações próximas a concentração fisiológica de 0,6 mmol/L (CURI, 2000; WEISSNER *et al.*, 2003).

Na Figura 18, estão representados os perfis das curvas de tolerância à glicose na utilização de L-glutamina nas duas concentrações, 1 e 5 M.

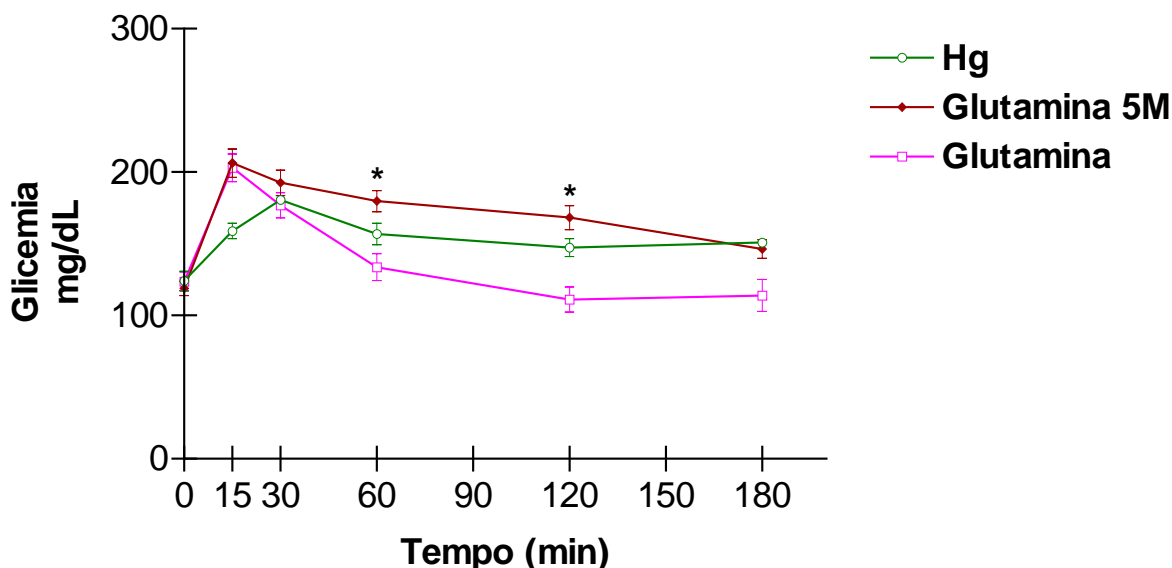


Figura 18 – Comparação das curvas de tolerância à glicose dos grupos: hiperglicêmico (Hg), hiperglicêmico e glutamina 1M (glutamina) e hiperglicêmico e glutamina 5M (glutamina 5M). Os valores da glicemia são a média \pm E.P.M. de experimentos realizados em duplicata (n=5). * Significativo para $p < 0,05$ com relação aos mesmos tempos dos grupos Hg e glutamina.

Utilizando-se a L-glutamina em ambas as concentrações de 1 M ou 5 M, no modelo de hiperglicemia, o pico máximo de glicose sangüínea ocorre nos primeiros 15 minutos ($p < 0,05$), fato não observado na ausência da mesma no tratamento (grupo Hg), em que o pico é observado em 30 minutos ($p < 0,05$) após a administração da glicose isolada.

A influência das concentrações nas curvas de tolerância à glicose, fica evidente após 15 minutos de tratamento, em que o grupo de concentração 1 M apresentou uma redução acentuada nos níveis de glicose sangüínea até a segunda hora. Enquanto que o grupo de maior concentração manteve os valores significativamente altos ($p < 0,05$) até a segunda hora, após o tratamento. Nos

tempos 1, 2 e 3 horas, o grupo glutamina apresentou valores de glicemia significativamente menores do que o grupo glutamina 5 M.

Com isso, pode se sugerir que a utilização de uma concentração menor (1 M) permitiu uma saída mais rápida de glicose da circulação, visto que em 1 h após o tratamento, os níveis glicêmicos voltam aos valores basais (tempo zero) e permanece neste limiar basal durante todo o período estudado. Ambas as concentrações de L-glutamina utilizadas promoveram um aumento maior e mais rápido da glicemia, quando comparados ao tratamento hiperglicêmico sem a adição da mesma.

A oxidação de nutrientes como a glicose, aminoácidos e ácidos graxos nas células β do pâncreas endócrino desempenha um papel importante no controle da secreção de insulina. A presença de L-glutamina 1 M atuou mais efetivamente na redução glicêmica, quando combinada à glicose. Este fato pode estar relacionado a um efeito otimizador desta combinação na secreção pancreática de insulina.

A L-glutamina é um dos nutrientes exógenos mais utilizados pelas células β para manter o gasto energético basal, tanto na presença como na ausência de glicose. O metabolismo da glutamina nas células β diminui a utilização de outros nutrientes intracelulares, como os ácidos graxos, e bloqueia a oxidação da glicose. O bloqueio da oxidação da glicose pode ser devido ao desvio da utilização do piruvato para a reação de transaminação com o glutamato, não permitindo assim, que o piruvato seja convertido em acetil-CoA, inibindo assim, a continuidade do ciclo oxidativo da glicose (CURI, 2000).

O conteúdo de ATP e a relação ATP/ADP não aumentam significativamente acima dos valores basais quando a L-glutamina é administrada isoladamente e, provavelmente devido a estes fatores não estimula a secreção de insulina (MALAISSE *et al.*, 1980; SENER, MALAISSE-LAGAE & MALAISSE, 1982). Quando combinada à leucina ou ao seu análogo não metabolizável (ácido 2-aminobíciclo-2,2,1-heptano-2-carboxílico - BCH), a L-glutamina induz a secreção de insulina. A leucina e o BCH estimulam a secreção de insulina pela ativação alostérica da enzima glutamato dehidrogenase (GDH), que aumenta a oxidação de glutamato e a produção de ATP, provendo o ciclo tricarboxílico (TCA) com α -

cetogluturato e assim, estimulando a secreção de insulina (GAO *et al.*, 1999; TANIZAWA *et al.*, 2002; KELLY *et al.*, 2002).

No presente trabalho, observou-se que a L-glutamina parece potencializar o efeito da glicose na redução da glicemia, entretanto, o mecanismo que a L-glutamina pode estar exercendo neste processo ainda não está bem elucidado. Recentemente, no trabalho de LI *et al.* (2004), foi investigada a influência de L-glutamina e uma mistura de 20 aminoácidos na secreção de insulina, em células pancreáticas normais e com receptor 1 sulfonilúrea – knockout (SUR1^{-/-}) (LI *et al.*, 2004). Crianças com hipoglicemia devido a um defeito no canal de K⁺ sensível ao ATP, podem desenvolver hipoglicemia em resposta a uma refeição protéica. Com isso, o estímulo da secreção de insulina mediada por aminoácidos, pode estar ocorrendo por um mecanismo diferente do classicamente conhecido. Neste trabalho, observou-se que a retirada de L-glutamina da cultura celular reduziu em 60% o efeito na secreção de insulina gerada pela mistura de aminoácidos. Assim, deste trabalho, foi concluído que a L-glutamina tem um importante papel como molécula sinalizadora da secreção de insulina mediada por aminoácidos e glicose, assim como, que a despolarização da célula β e a elevação subsequente do cálcio celular, são necessários para este efeito da L-glutamina (LI *et al.*, 2004).

Como a L-glutamina na concentração de 1 M foi efetiva na redução da glicemia quando combinada à glicose (grupo glutamina) já a partir dos 15 min iniciais, todos os tratamentos a seguir foram realizados com a adição da L-glutamina na concentração de 1 M.

5.3.2 Tratamentos com aminoácidos ramificados (AAR)

Na Figura 19, está demonstrado o efeito dos aminoácidos ramificados (AAR) isolados e combinados à L-glutamina na concentração de 1 M.

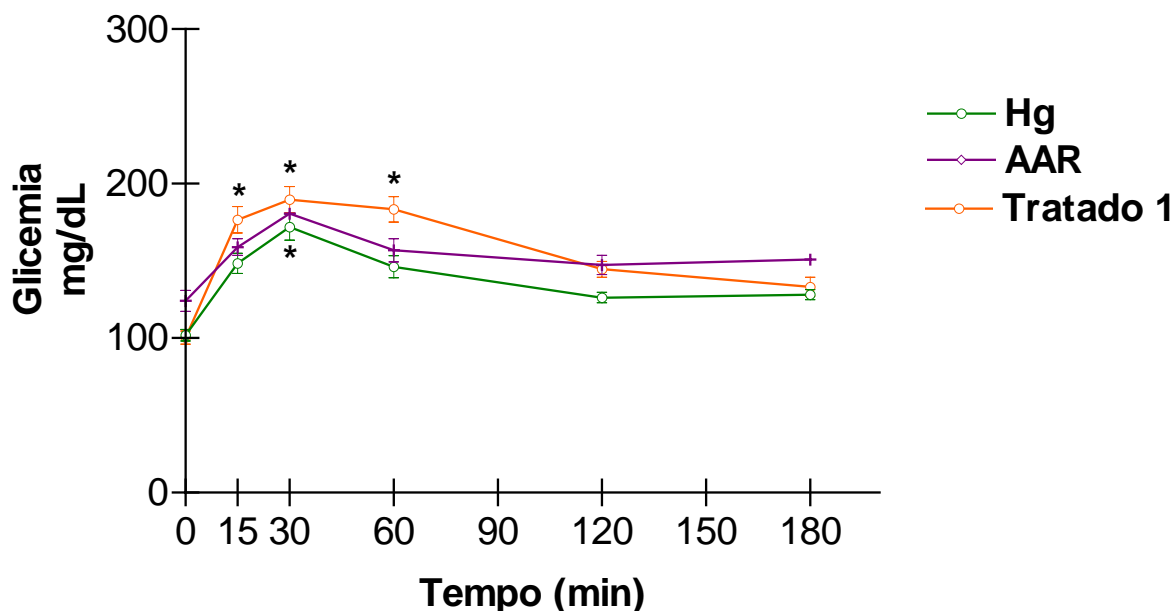


Figura 19 – Curvas de tolerância à glicose dos grupos: hiperglicêmico (Hg), grupos tratados com os aminoácidos ramificados isolados (AAR) e combinados à glicose e L-glutamina (Tratado 1). Os valores da glicemia são a média \pm E.P.M. de experimentos realizados em duplicata (n=5). * Significativo para $p < 0,05$ com relação ao tempo zero do respectivo grupo.

A administração dos AAR e glicose isoladamente não afetaram a curva de tolerância à glicose, assim como, observado para o grupo tratado 1. Outro fato curioso observado neste gráfico é que diferente dos resultados anteriores, quando a mistura de aminoácidos ramificados foi adicionada ao tratamento (grupo tratado 1), a glicemia permaneceu alta até a primeira hora observada.

Na Figura 20, estão demonstrados os efeitos comparativos dos grupos glutamina e tratado 1 em relação ao grupo Hg, na curva de tolerância à glicose.

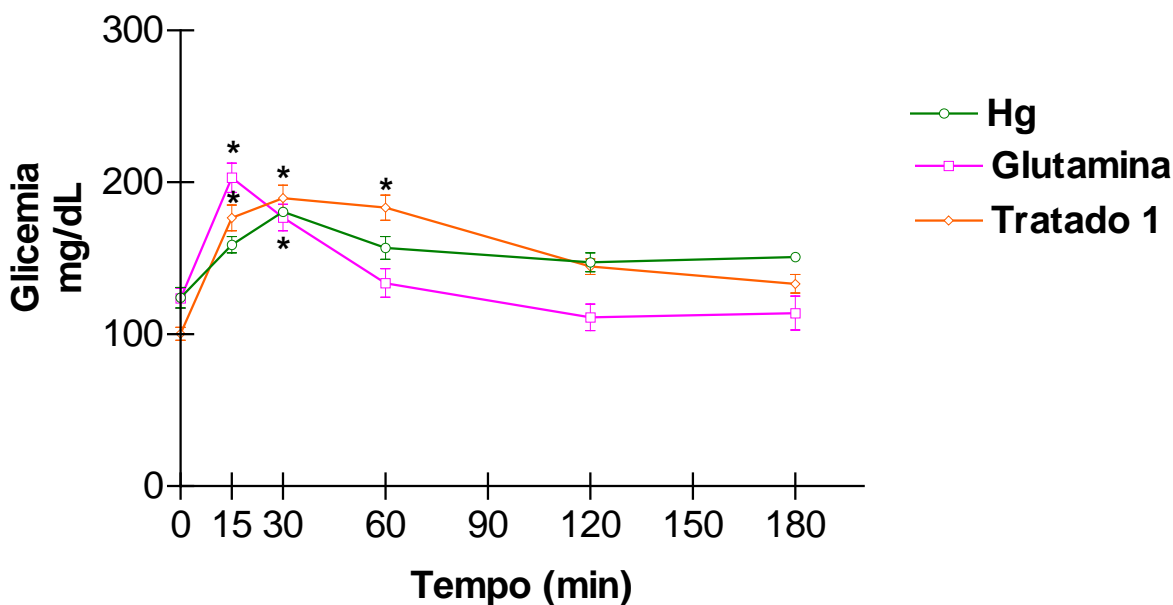


Figura 20 – Curvas de tolerância à glicose dos grupos: hiperglicêmico (Hg), hiperglicêmico e glutamina 1M (glutamina) e no grupo tratado com os aminoácidos ramificados combinados à glicose e L-glutamina (Tratado 1). Os valores da glicemia são a média \pm E.P.M. de experimentos realizados em duplicata (n=5). * Significativo para $p < 0,05$ com relação ao tempo zero do respectivo grupo.

Nos perfis das curvas de tolerância à glicose dos grupos glutamina e Tratado 1, pode-se observar que a presença dos aminoácidos ramificados no tratamento (grupo Tratado 1), proporcionou também uma elevação da glicemia já em 15 minutos, assim como observado no grupo glutamina. No entanto, a presença dos mesmos no tratamento, levou a um aumento da glicemia de 15 a 60 min, enquanto que no grupo glutamina, a glicemia já encontra-se em queda após os primeiros 15 min. Na primeira hora de tratamento, a presença dos aminoácidos ramificados manteve os valores de glicemia altos, enquanto que, no grupo glutamina ocorreu uma rápida saída de glicose da circulação.

Analisando os dados acima apresentados, nas Figuras 19 e 20, pode-se sugerir que utilização dos aminoácidos ramificados nos tratamentos não potencializou o efeito redutor da glicemia promovido pela glicose exógena, no modelo hiperglicêmico. Assim como, quando combinados à L-glutamina, a redução dos níveis de glicose foi ainda prolongada.

A combinação dos aminoácidos leucina, isoleucina e valina, na associação de aminoácidos ramificados administrada aos animais, parece não exercer o efeito secretagogo de insulina que a leucina apresenta quando administrada isoladamente como discutido por GAO *et al.* (1999), e TANIZAWA *et al.* (2002), detalhado na Figura 19.

Concluindo, a L-glutamina combinada à glicose possuiu o melhor perfil de redução glicêmica, e a presença dos aminoácidos ramificados nos tratamentos via oral, não potencializou o efeito das substâncias, L-glutamina e/ou glicose.

5.3.3 Tratamentos com a vitamina D₃

Na Figura 21, observa-se o efeito da vitamina D₃ isolada e combinada à L-glutamina na curva de tolerância à glicose

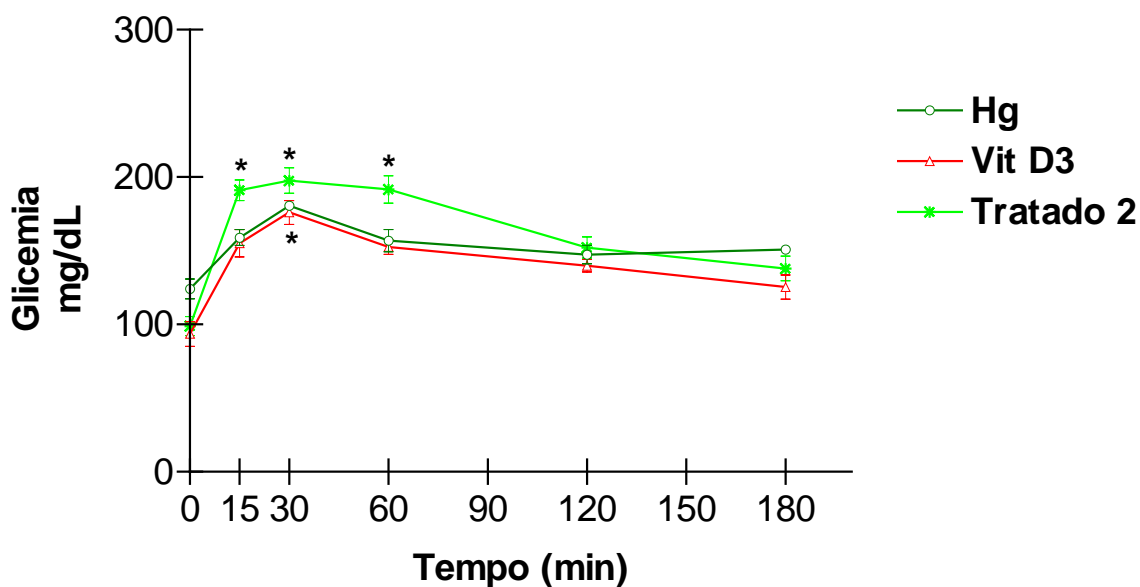


Figura 21 – Curvas de tolerância à glicose dos grupos: hiperglicêmico (Hg), vitamina D₃ combinada à glicose (Vit D3) e com a vitamina D₃, glicose e L-glutamina (Tratado 2). Os valores da glicemia são a média \pm E.P.M. de experimentos realizados em duplicata (n=5). * Significativo para $p < 0,05$ com relação ao tempo zero do respectivo grupo.

Na Figura 21, o grupo Vit D₃ apresentou o pico máximo de glicemia em 30 minutos após o tratamento, e esta curva possui um perfil bastante semelhante ao grupo Hg. Somente na terceira hora, os valores de glicemia do grupo Vit D₃ sofreram uma redução significativa ($p < 0,05$) com relação ao grupo Hg. O grupo Tratado 2 expressou o pico máximo de glicemia em 15 minutos após o tratamento, e manteve os níveis altos até a primeira hora. A presença de L-glutamina no tratamento com vitamina D₃ (grupo Tratado 2) proporcionou uma elevação mais rápida dos níveis de glicemia e promoveu a manutenção dos mesmos por mais tempo.

Na Figura 22, estão demonstrados os efeitos comparativos dos grupos hiperglicêmicos e glutamina e da vitamina D₃ (tratado 2) na curva de tolerância à glicose.

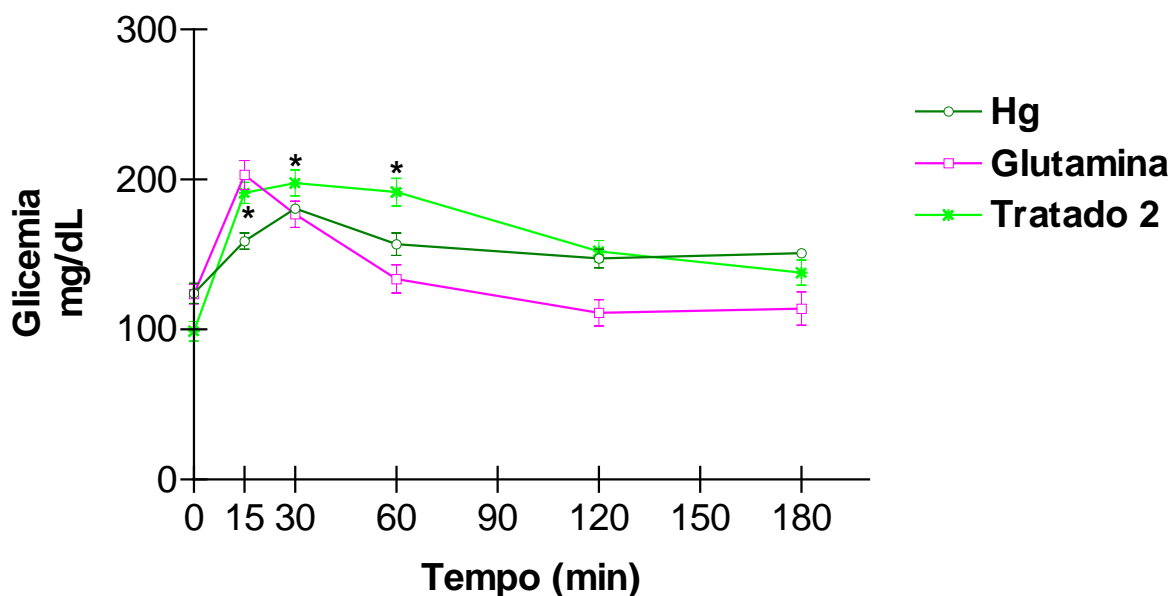


Figura 22 – Curvas de tolerância à glicose dos grupos: hiperglicêmico (Hg), hiperglicêmico e glutamina 1M (glutamina) e no grupo tratado com vitamina D₃ combinada à glicose e L-glutamina (Tratado 2). Os valores da glicemia são a média \pm E.P.M. de experimentos realizados em duplicata ($n=5$). * Significativo para $p < 0,05$ com relação ao tempo zero do respectivo grupo.

Na Figura 22 estão apresentadas as curvas de tolerância à glicose dos grupos glutamina e Tratado 2, as quais sofreram elevação dos valores de glicemia também nos primeiros 15 minutos de tratamento. No entanto, em 30 minutos, enquanto no grupo glutamina, a glicemia já está em queda, no grupo Tratado 2 a mesma ainda está em elevação e mantém-se alta até a primeira hora de tratamento. A presença da vitamina D₃ no tratamento, promoveu uma manutenção mais prolongada dos valores altos de glicemia.

No trabalho realizado por KAJIKAWA *et al.* (2002), o 1 α ,25-dihidroxiesteroide foi utilizado para investigar a ação não genômica da vitamina D, na secreção de insulina em cultura de células. Neste trabalho foi observado que a mesma promoveu um aumento da concentração intracelular de cálcio, fato que está correlacionado ao metabolismo da glicose na célula pancreática. Assim, ambos os fatores, a oxidação da glicose e o aumento da concentração de cálcio na célula, são necessários para a expressão do efeito na secreção de insulina (TANIZAWA *et al.*, 2002).

No experimento realizado neste trabalho na curva de tolerância à glicose, em que a vitamina D₃ foi utilizada por via oral, não houve alteração significativa nas concentrações de glicose sanguínea. Sugere-se que neste modelo, a vitamina D₃, não atue de forma efetiva na promoção de alterações necessárias à secreção de insulina, nas células β pancreáticas, pelo menos neste período estudado.

Assim, conforme demonstrado nas Figuras 21 e 22, a presença da vitamina D₃ no tratamento com a glicose (grupo Vit D₃) não alterou consideravelmente o perfil da curva. Já quando combinadas à L-glutamina (grupo Tratado 2), o perfil da curva foi alterado, porém o efeito potencializador esperado pela combinação das substâncias, não foi observado. Ao contrário, a adição de vitamina D₃ nos tratamentos mascarou o efeito da L-glutamina. Este comportamento também foi observado de forma similar na adição dos aminoácidos ramificados aos tratamentos nas curvas de tempo resposta à glicose, conforme demonstrado abaixo na Figura 23.

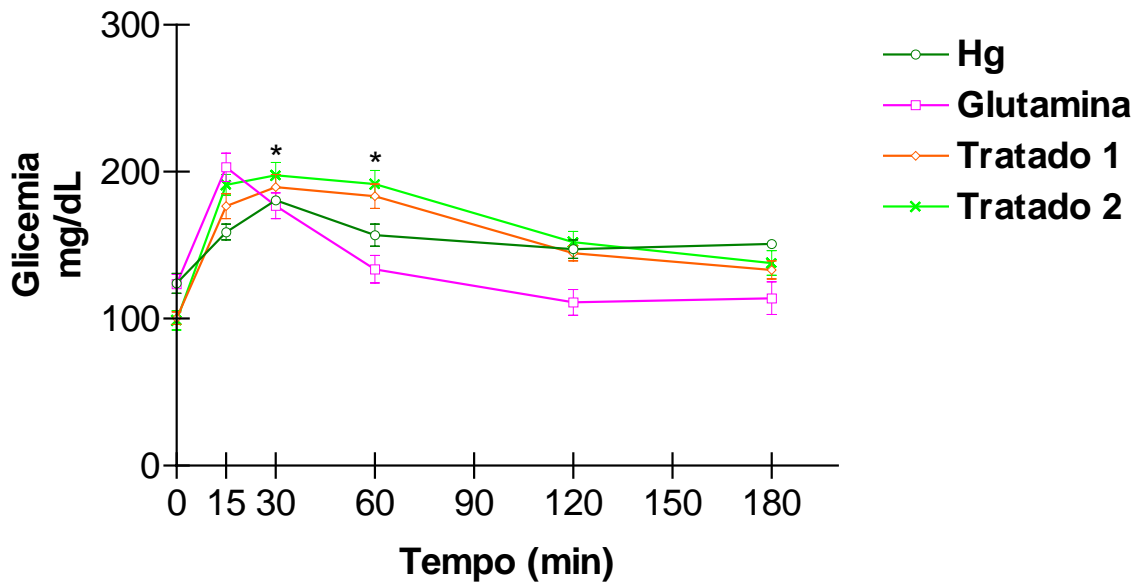


Figura 23 – Curvas de tolerância à glicose dos grupos: hiperglicêmico (Hg), hiperglicêmico e glutamina 1M (glutamina) e nos grupos tratados com aminoácidos ramificados (Tratado 1) e vitamina D₃ (Tratado 2) combinados à glicose e L-glutamina. Os valores da glicemia são a média ± E.P.M. de experimentos realizados em duplicata (n=5). * Significativo para p<0,05 com relação aos grupos glutamina e Hg, para os mesmos tempos de tratamento.

Na Figura 23, podem ser observados os diferentes perfis das curvas de tolerância à glicose, na presença de L-glutamina combinada aos aminoácidos ramificados (Tratado 1) e a vitamina D₃ (Tratado 2). A administração de L-glutamina promoveu uma rápida elevação da glicemia no período inicial do tratamento (primeiros 15 minutos). No entanto, quando a mesma foi combinada aos aminoácidos ramificados ou à vitamina D₃, as glicemias permaneceram mais tempo elevadas.

No tratamento de vitamina D₃ com L-glutamina (Tratado 2) pode-se observar valores significativamente mais altos nos tempos 30 e 60 minutos, com relação aos grupos Hg e glutamina, nos quais a vitamina não foi administrada. No perfil da curva do grupo Tratado 1, com os aminoácidos ramificados, os valores obtidos foram bastante similares ao acima discutido para a vitamina D₃.

Com isso, sugere-se que a utilização de L-glutamina na concentração de 1 M nos tratamentos, leva a uma rápida elevação (15 minutos iniciais) dos níveis de

glicose sangüínea, no modelo de hiperglicemia; assim como, uma rápida redução das concentrações da mesma (início da queda glicêmica em 30 minutos).

Contudo, a L-glutamina na concentração de 1 M apresentou um importante comportamento na redução dos níveis plasmáticos de glicose, quando administrada no modelo hiperglicêmico, pela via oral, em ratos adultos.

5.4 Dosagens de insulina

As concentrações de insulina foram monitoradas conforme os tratamentos utilizados neste trabalho. Os grupos em que foram realizadas as dosagens foram os mesmos das curvas de tolerância à glicose.

A determinação das concentrações de insulina pelo Kit Rat Insulin RIA, possui um limite de sensibilidade que varia de 0,1 a 10 ng/mL, sendo a variação dos resultados recomendável de 0,5 a 2,0 ng/mL (www.lincoresearch.com).

Os valores e as respectivas percentagens de aumento das concentrações de insulina podem ser acompanhados pela Tabela 3.

Tabela 3 – Valores de insulina dos diferentes tratamentos nos tempos analisados.

| Grupo | Concentrações de insulina (ng/mL) | | | |
|-------------------------------|------------------------------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| | Tempo 0 | 15 min | 30 min | 60 min |
| Basal | 0,093 | 0,155 66,67%* | x | x |
| Hg | 0,08 | 0,107 25%* | 0,163 103,7%* | 0,122 52,5%* |
| Controle glutamina | 0,074 | 0,315 325,7%* | 0,123 66,2%* | 0,05 -32,4%* |
| Glutamina | 0,079 | 0,112 41,8%* | 0,109 37,97%* | 0,143 81,0%* |
| AAR | 0,117 | 0,143 22,2%* | 0,158 35,0%* | 0,116 -0,85%* |
| Tratado 1 | 0,07 | 0,122 74,3%* | 0,373 432,8%* | 0,164 134,3%* |
| Vitamina D₃ | X | 0,104 | 0,228 119,2%** | 0,927 791,3%** |
| Tratado 2 | 0,059 | 0,144 144,1%* | 0,286 384,7%* | 0,140 137,3%* |

* Percentagem de aumento da concentração de insulina com relação ao tempo zero do respectivo grupo.

** Percentagem de aumento da concentração de insulina com relação ao tempo 15 min do respectivo grupo.

x Dosagem não realizada.

A seguir, são apresentadas as representações gráficas dos resultados obtidos nas dosagens de insulina. Na Figura 24, estão demonstrados os valores dos grupos basal, hiperglicêmico (Hg) e grupos glutamina (controle glutamina e glutamina) na concentração administrada de 1 M.

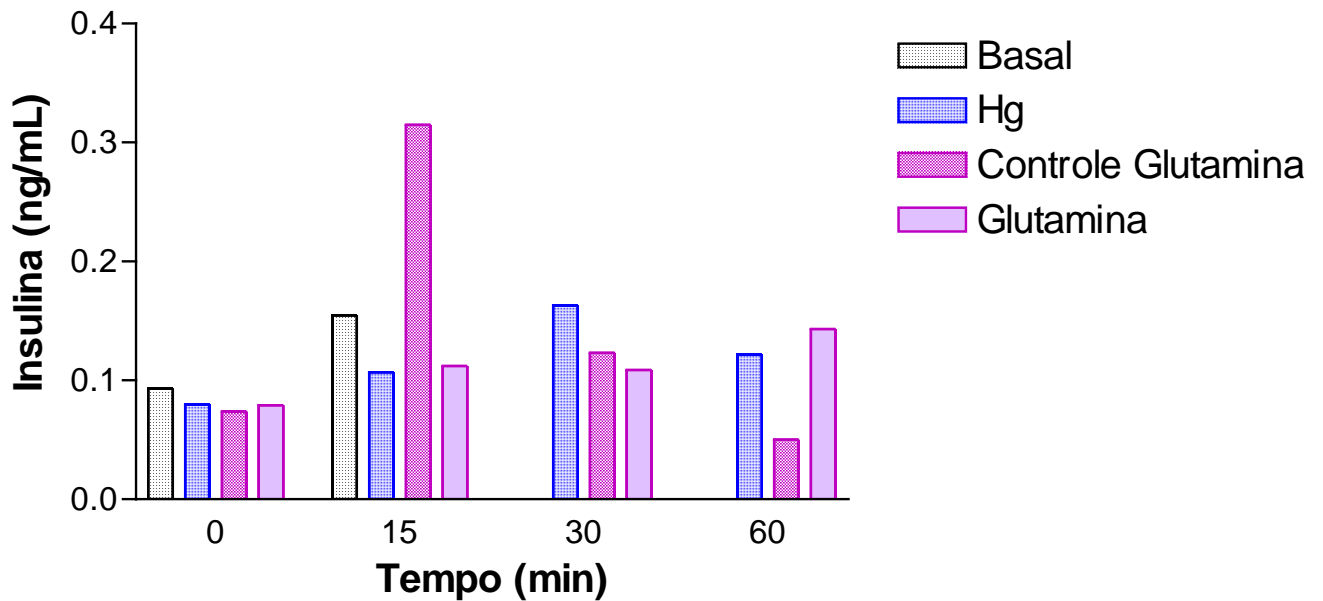


Figura 24 – Variações das concentrações de insulina dos grupos: basal, hiperglicêmico (Hg), glutamina 1M (controle glutamina), hiperglicêmico e glutamina 1M (glutamina).

Para melhor compreensão dos gráficos os resultados serão discutidos considerando-se as variações intragrupos. Conforme demonstrado pela Figura 24, o grupo Hg apresentou um aumento (103,7%) da insulina sérica em 30 min após a administração oral da carga de glicose (4 g/kg). O grupo glutamina, em que administrou-se a L-glutamina a 1 M combinada à glicose, a concentração de insulina sofreu elevação (81,01%) após a primeira hora. Conhecendo-se o comportamento do grupo Hg e glutamina pode-se sugerir que a presença de L-glutamina no tratamento postergou o aumento da concentração de insulina de 30 min para 60 min. Já no grupo controle glutamina em que a L-glutamina foi administrada isoladamente, houve um importante aumento (325,7%) da insulina em 15 min de tratamento. Este resultado sugere um efeito *per se* da L-glutamina 1 M no aumento da insulina sérica.

Na Figura 25, são apresentadas as representações gráficas dos grupos Hg, glutamina e dos grupos com administração de aminoácidos ramificados.

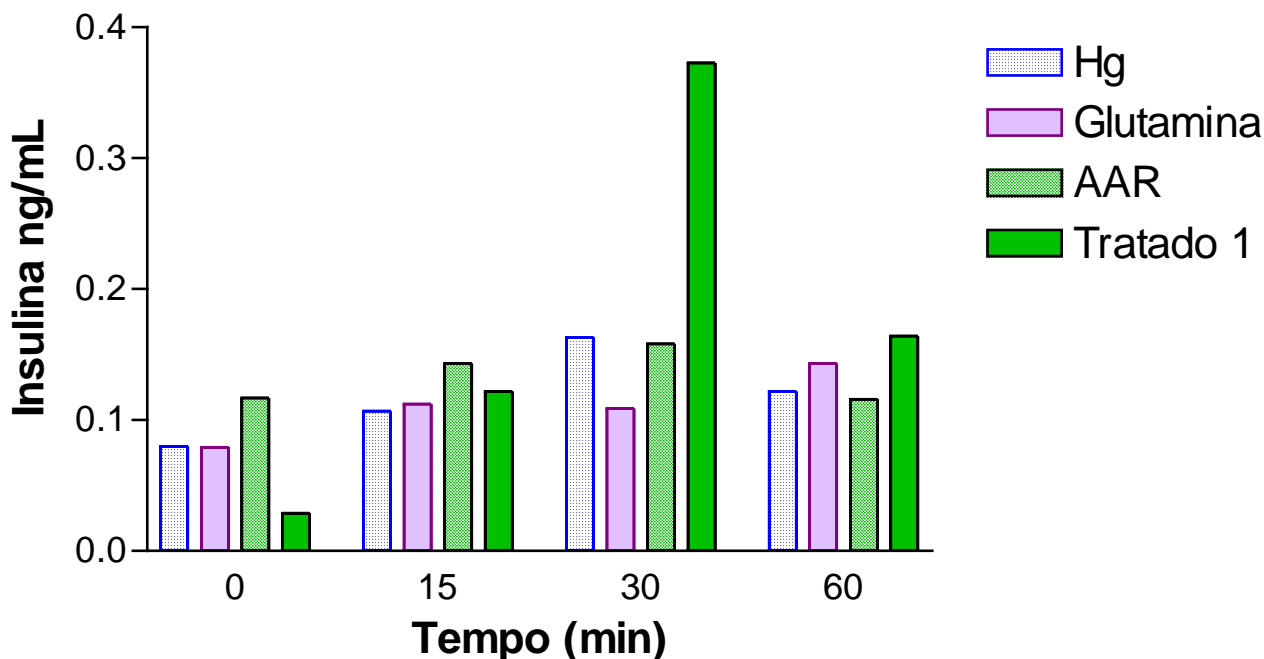


Figura 25 – Variações das concentrações de insulina dos grupos: hiperglicêmico (Hg), hiperglicêmico e glutamina 1M (glutamina), e grupos tratados com os aminoácidos ramificados isolados (AAR) e combinados à glicose e L-glutamina (Tratado 1).

A administração da associação de aminoácidos ramificados combinada à glicose não levou a uma importante alteração nos níveis de insulina nos tempos analisados. No entanto, quando esta combinação é acrescida de L-glutamina 1 M (grupo tratado 1) os níveis de insulina sofreram um aumento (432,8%) em 30 min após a administração. Analisando este resultado, sugere-se que a presença de L-glutamina otimizou o efeito da combinação de aminoácidos ramificados e glicose.

Nas células β -pancreáticas muitos autores são favoráveis ao conceito do fluxo anaplerótico do glutamato à α -cetoglutarato. Conseqüentemente, o glutamato derivado de aminoácidos estimularia a secreção de insulina pela entrada de α -cetoglutarato no ciclo do TCA, levando à geração de ATP mitocondrial, contribuindo para o processo de secreção de insulina. A enzima mitocondrial glutamato desidrogenase (GDH) é importante na desaminação ou aaminação do glutamato. Ainda, muitos estudos têm observado um aumento intracelular de glutamato durante o estímulo da secreção de insulina pela glicose em células β -pancreáticas de ratos, camundongos e humanos, assim como, em cultura de células (BROCA *et al.*, 2003; KELLY *et al.*, 2002).

O papel na secreção de insulina mediada por aminoácidos, como a leucina, parece estar relacionado à ativação alostérica da GDH, resultando na diminuição de glutamato intracelular. No trabalho de BROCA *et al.* (2003), pode-se observar que em cultura de células a leucina em baixa concentração de glicose diminui o conteúdo de glutamato, enquanto que, em 15 mM de glicose a mesma apresentou um efeito estabilizador das concentrações de glutamato. Este resultado demonstra que ambos os nutrientes, glicose e leucina, atuam antagonicamente na ativação da GDH, influenciando assim, as concentrações de glutamato intracelular na célula β -pancreática. Neste trabalho, pode-se ainda confirmar o que foi constatado por outros pesquisadores, quanto ao papel da glicose na regulação da glutaminólise, no aumento de glutamato e na secreção de insulina via inibição de GDH. O aumento de glutamato foi observado pela utilização de glicose marcada em células INS-1E, em que o glutamato foi o maior produto metabólico encontrado após a indução com glicose.

A discussão quanto ao potencial da L-glutamina na secreção de insulina ainda não está completamente elucidada. No entanto, no recente trabalho realizado por LI *et al.* (2004), em cultura de células β -pancreáticas, observou-se que retirando-se a L-glutamina da mistura de aminoácidos, o efeito no aumento da secreção de insulina foi reduzido em 60%, embora a mesma estivesse presente em 16% da composição de 20 aminoácidos utilizada. Assim, os autores sugeriram que a L-glutamina apresenta um efeito *per se* sinalizador na secreção de insulina não previamente reconhecido. Ainda, neste trabalho, foi proposto que para este efeito da L-glutamina não é requerido a deaminação pela glutaminase fosfato dependente (PDG) ou a deaminação oxidativa do glutamato pela GDH, reações que por fim resultam no aumento da produção de ATP. Ainda, a elevação de cálcio intracelular é necessária para o efeito sinalizador da molécula na secreção de insulina ocorrer. O efeito sinalizador da L-glutamina pode resultar tanto do aporte extracelular, como pelo aumento intracelular na síntese de L-glutamina via glutamina sintetase (GS) (LI *et al.*, 2004).

Nas determinações da concentração de insulina desta dissertação pôde-se observar um aumento na concentração do hormônio em 30 min após a

administração de L-glutamina, sugerindo um efeito *per se* da molécula na resposta insulínica.

No trabalho de DOI *et al.* (2003), a administração oral de isoleucina promoveu uma redução significativa nos níveis de glicose plasmática em 30 e 60 min, medido pelo teste de tolerância oral à glicose. No entanto, neste estudo a leucina apresentou um efeito menos significativo na curva de tolerância à glicose quando comparada à isoleucina. Foi sugerido no trabalho que estes resultados possam estar sendo influenciados pelas concentrações plasmáticas encontradas para os mesmos, 0,27 mM para a leucina e 0,89 mM para a isoleucina (DOI *et al.*, (2003). No trabalho de MCDONALD & FAHIEN *et al.* (2000), a L-glutamina, utilizada em cultura de células em combinação com a leucina, promoveu um aumento na secreção de insulina, quase comparável ao estímulo promovido pela glicose isolada. A quantidade de insulina secretada pelo estímulo da leucina isolada foi aproximadamente 1/3 da quantidade secretada por glicose. No entanto, a administração isolada de L-glutamina neste modelo não influenciou a secreção de insulina (MCDONALD & FAHIEN *et al.*, 2000).

Nos tratamentos realizados nesta dissertação utilizou-se uma associação de aminoácidos ramificados, contendo isoleucina, valina e leucina, com isso, ficaria inviável correlacionar o efeito na secreção de insulina a algum aminoácido específico. No entanto, como observado na Figura 25, o grupo tratado 1, no qual administrou-se os aminoácidos ramificados e L-glutamina, no modelo de hiperglicemia, pode-se notar um aumento na concentração de insulina após 30 min de experimento.

Na Figura 26, são apresentados os gráficos dos grupos Hg, glutamina e dos grupos com administração de vitamina D₃.

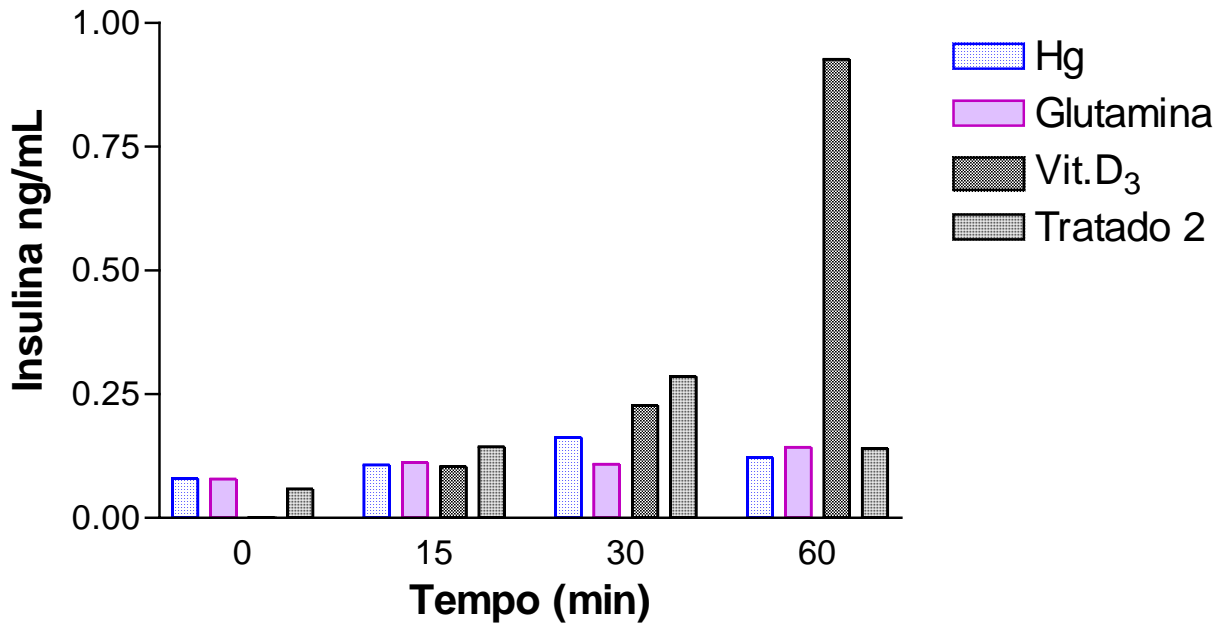


Figura 26 – Variações das concentrações de insulina dos grupos: hiperglicêmico (Hg), hiperglicêmico e glutamina 1M (glutamina), e grupos tratados com a vitamina D₃ e glicose (Vit D₃) e combinados à glicose e L-glutamina (Tratado 2).

A Figura 26 mostra as variações da concentração de insulina nos grupos em que a vitamina D₃ foi utilizada. Após 60 min de tratamento o grupo vit. D₃ (vitamina D₃ e glicose), sofreu uma importante elevação (791,3%) na concentração de insulina. Quando a L-glutamina foi adicionada ao tratamento ocorreu também uma elevação, porém a mesma foi nos primeiros 30 min e em menor intensidade (384,7%).

No trabalho de TAJIKAWA *et al.* (2002) utilizou-se um análogo da vitamina D, foi observado um efeito insulínico da substância, este efeito, foi dependente do aumento do influxo de Ca²⁺ pela membrana. Ainda, este efeito poderia também estar relacionado aos sinais metabólicos derivados da glicose. Também, no trabalho de ISMAIL & NAMALA (2000), a administração de vitamina D e a suplementação de cálcio isoladamente, reverteram a intolerância à glicose e a redução de insulina sérica encontrada em animais com deficiência de vitamina D (ISMAIL & NAMALA, 2000).

Nos resultados obtidos nesta dissertação, a utilização de vitamina D apresentou um aumento importante na secreção de insulina quando administrada em combinação com a glicose, após 60 min de tratamento.

6 CONCLUSÕES

6.1 Ensaio *in vitro*

- No teste de reatividade com o DPPH e na proteção contra a lipoperoxidação tecidual mediada pelo peroxinitrito e radical hidroxila, a L-glutamina não apresentou um potencial intrínscico como molécula antioxidante.

6.2 Dosagens *ex vivo*

Dosagens de glutatona reduzida (GSH) e total (GT) no tratamento crônico com L-glutamina e/ou glicose nos tecidos hepático e intestinal

- No tratamento de 8 dias com L-glutamina a mesma proporcionou a manutenção dos níveis de GSH quando combinada à administração de glicose por via oral. Este comportamento foi observado no conteúdo de GSH do tecido intestinal assim como para o tecido hepático.

Dosagens de glutatona reduzida (GSH) e TBARS no tratamento agudo com L-glutamina sob indução de estresse oxidativo mediado por paraquat

- A administração de paraquat promoveu redução no níveis de GSH hepática.
- No tratamento de 48 h sob estresse oxidativo, a administração de L-glutamina promoveu uma redução nos níveis de GSH hepático, enquanto que, no grupo controle do experimento houve um aumento do conteúdo de GSH pela administração de L-glutamina.

- A suplementação de L-glutamina, em animais submetidos ao estresse oxidativo, foi efetiva no aumento da concentração plasmática de GSH.
- O tratamento com paraquat e glicose aumentou os níveis de GSH renal. O tratamento com L-glutamina não foi efetivo no aumento dos níveis de GSH no tecido renal.
- A administração de L-glutamina ou glicose aos grupos sob estresse oxidativo, reduziu o dano tecidual hepático, determinado pelo TBARS. Em condições normais do metabolismo houve um aumento do dano hepático pela administração de ambas as substâncias.
- A administração de L-glutamina, em animais submetidos ao estresse oxidativo, um aumento nos danos no tecido renal.

6.3 Curvas de tolerância à glicose

- A administração de L-glutamina na concentração de 1 M promoveu um rápido aumento na glicemia e um retorno ao nível basal já na primeira hora após o tratamento via oral, no modelo de hiperglicemia.
- A L-glutamina na concentração de 5 M no modelo de hiperglicemia proporcionou um rápido aumento na glicemia, porém as concentrações de glicose sanguíneas mantiveram-se muito altas, até a segunda hora de tratamento.
- A administração de uma associação de aminoácidos ramificados e vitamina D₃ combinados à L-glutamina, no modelo de hiperglicemia, mantiveram as concentrações de glicose sérica altas pelo período de uma hora. Os perfis observados nas curvas de tolerância à glicose nos dois tratamentos, com os aminoácidos ramificados e vitamina D₃, apresentaram-se de forma

bastante semelhantes. A combinação de ambos os nutrientes à L-glutamina não potencializou o efeito promovido pela administração de L-glutamina isolada nas concentrações de glicose sanguínea.

6.4 Concentração de insulina

- A concentração de insulina sérica no grupo Hg apresentou um aumento de 103,7% em 30 min após a administração oral da carga de glicose (4 g/kg).
- A L-glutamina à 1 M combinada à glicose, elevou 81,01% a concentração de insulina após a primeira hora de tratamento. Já quando a L-glutamina foi administrada isoladamente, houve um aumento de 325,7% em 15 min. Os resultados na utilização de L-glutamina sugerem um efeito *per se* importante no aumento da insulina sérica.
- A administração de uma associação de aminoácidos ramificados combinada à glicose não levou a uma importante alteração nos níveis de insulina. A combinação de L-glutamina no tratamento promoveu um aumento de 432,8% em 30 min nos níveis de insulina.
- A utilização de vitamina D₃ combinada à glicose elevou as concentrações de insulina 791,3% após 60 min. A presença de L-glutamina elevou a concentração de insulina, porém a mesma ocorreu nos primeiros 30 min e em menor intensidade (384,7%).

7 PERSPECTIVAS

- Caracterização dos níveis hormonais dos hormônios gastrointestinais (colecistocinina e VIP) pela administração de L-glutamina pela via oral;
- Utilização de um análogo da vitamina D₃ nos experimentos de curva de tolerância à glicose e na secreção de insulina;
- Dosagem da insulina sérica em tempos mais curtos para os diferentes tratamentos realizados.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHSAN, H.; ALI, A.; ALI, R. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. **Clin Exp Immunol.**, v.131, p. 398-404, 2003.

AMORES-SÁNCHEZ, M.I.; MEDINA, M.A. Glutamine, as a precursor of glutathione, and oxidative stress. **Molecular genetics and metabolism**, v. 67, p. 100-105, 1999.

BALLARD, T.C.; FARAG, G.; BRANUM, G.D.; AKWARI, O.E.; OPARA, E.C. Effect of L-glutamine supplementation on impaired glucose regulation during intravenous lipid administration. **Nutrition**, v. 12, p. 349-354, 1996.

BARTSCH, H.; NAIR, J. Oxidative stress and lipid peroxidation-derived DNA-lesions in inflammation driven carcinogenesis. **Cancer Detect. Prev.**, v. 28, p. 385-391, 2004.

BAYNES, J.W.; THORPE, S.R. Role of oxidative stress in diabetic complications – a new perspective on an old paradigm. **Diabetes**, v. 48, p. 1-9, 1999.

BEARDSALL, K.; YUEN, K.; WILLIAMS, R.; DUNGER, D. Applied physiology of glucose control. **Current Paediatrics**, v. 13, p. 543-548, 2003.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N. **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c2000.1034p.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. v.61, p.882-90, 1963.

- BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods in Enzymology**, v.90, p.105-10, 1984.
- BOREL, M.J.; WILLIAMS, P.E.; JABBOUR, K.; LEVENHAGEN, D.; KAIZER, E.; FLAKOLL, P.J. Parenteral glutamine infusion alters insulin-mediated glucose metabolism. **JPEN**, v. 22, p. 280-285, 1998.
- BROCA, C.; BRENNAN, L.; PETIT, P.; NEWSHOLME, P.; MAECHLER, P. Mitochondria-derived glutamate at the interplay between branched-chain amino acid and glucose-induced insulin secretion. **FEBS Letters**, v. 545, p. 167-172, 2003.
- CURI, R. **Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte**. Rio de Janeiro: Sprint, 2000.
- CHWALS, W.J. Regulation of the cellular and physiological effects of glutamine. **Min. Rev. Med. Chem.**, v. 8, p. 833-838, 2004.
- DEVLIN, T.M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 3 ed. São Paulo: Blücher, 2003.
- DINCER, Y.; AKCAY, T.; ALADEMIR, Z.; LLKOVA, H. Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Metabolism**, v. 51, p. 1360-1362, 2002.
- DOI, M.; YAMAOKA, I.; FUKUNAGA, T.; MAKAYAMA, M. Isoleucine, a potent plasma glucose-lowering amino acid, stimulates glucose uptake in C₂C₁₂ myotubes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 12, p. 1111-1117, 2003.

FÜRST, P.; POGAN, K.; STEHLE, P. Glutamine dipeptides in clinical nutrition. **Nutrition**, v. 13, p. 731-737, 1997.

FÜRST, P.; ALTEHELD, B.; STEHLE, P. Why should a single nutrient glutamine-improve outcome? The remarkable story of glutamine dipeptides. **Clinical Nutrition Supplements**, v. 1, p. 3-15, 2004.

FLESCHIN, S.; FLESCHIN, M.; NITA, S.; PAVEL, E. MAGEARU, V. Free radicals mediated protein oxidation in biochemistry. **Roum. Biotechnol. Lett.**, v. 5, p. 479-495, 2000.

GAO, Z., LI, G., NAJAFI, H., WOLF, B., MATSCHINSKY, M.F. Glucose regulation of glutaminolysis and its role in insulin secretion. **Diabetes**, v. 48(8), p. 1535-1542, 1999.

GÖKE, B. Implications of blood glucose, insulin resistance and β -cell function in impaired glucose tolerance. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 40 (supl), p. S15-S20, 1998.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças**. 6^a edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 639p.

GRIFFITH, OW. Biological and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, p. 922-935, 1999.

GRIFFITHS, R.D.; ALLEN, K.D.; ANDREWS, F.J.; JONES, C. Infection, multiple organ failure, and survival in the intensive care unit: influence of glutamine-supplemented parenteral nutrition on acquired infection. **Nutrition**, v. 18, p. 546-552, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M.C.; ARUOMA, O.I. The deoxyribose method: a simple test-tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. **Anal. Biochem.**, v.165, p. 215-219, 1987.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radical in Biology and Medicine.** 3 ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M.C. **Free radicals in biology and medicine.** New York: Oxford University Press, 2000.

HAWKINS, F.; ESCOBAR-JIMENEZ, F.; JODAR, E.; CAMPOS, M.M.; LOPEZ ALVAREZ, M.B.; MARTINEZ DIAZ-GUERRA, G. Bone mineral density in hypoparathyroid women on LT(4) suppressive therapy. Effect of calcium and 1,25(OH)(2) vitamin D(3) treatment. **J Musculoskelet. Neuronal Interact.**, v. 3(1), p. 71-76, 2003.

HEI, Y.J. Recent progress in insulin signal transduction. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 40, p. 123-135, 1998.

HODSMAN, A.B.; BAUER, D.C.; DEMPSTER, D.; DIAN, L.; HANLEY, D.A.; HARRIS, S.T.; KENDLER, D.; MCCLUNG, M.R.; MILLER, P.D.; OLSZYNSKI, W.P.; ORWOLL, E.; YUEN, C.K. Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use. **Endocr Rev.**, Mar 15, [Epub ahead of print], 2005.

HUANG, M.; LI, J.; TEOH, H.; MAN, R.Y.K. Low concentrations of 17 β -estradiol reduce oxidative modification of low-density lipoproteins in the presence of vitamin C and vitamin E. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, p. 438-441, 1999.

NYSTROM, F.H.; QUON, M.J. Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity. **Cellular Signalling**, v. 11, p. 563-574, 1999.

ISMAIL, A.; NAMALA, R. Impaired glucose tolerance in vitamin D deficiency can be corrected by calcium. **J. Nutri. Biochem.**, v. 11, p. 170-174, 2000.

JAIN, S.K.; MCVIE, R. Effect of glycemic control, race (white versus black) , and duration of diabetes on reduced glutathione content in erythrocytes of diabetic patients. **Metabolism**, v. 43, p. 306-309, 1994.

JOHNSON, A.T.; KAUFMANN, Y.C.; KUO, S.; TODOROVA, V.; KLIMBERG, V.S. Effect of glutamine on glutathione, IGF-1, and TGF- β . **Journal of Surgical Research**, v. 111, p. 222-228, 2003.

KAJIKAWA, M.; ISHIDA, H.; FUJIMOTO, S.; MUKAI, E.; NISHIMURA, M.; FUJITA, J.; TSUURA, Y.; OKAMOTO, Y.; NORMAN, A.W.; SEINO, Y.; Na insulinotropic effect of vitamin D analog with increasing intracellular Ca^{2+} concentration in pancreatic β -cells through nongenomic signal transduction. **Endocrinology**, v. 140, p. 4706-4712, 1999.

KAPLOWITZ, N. et al. GSH transporters: molecular caraterization and role of GSH homeostasis. **Biol. Chem. Hoppe Seyler**, v. 377, p. 267, 1996.

KEHRER, J.P. Free Radicals as Mediators of Tissue Injury and Disease. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 1, n. 23, p. 21–48, 1993.

KELLY, A., LI, C., GAO, Z., STANLEY, C.A., MATSCHINSKI, F.M. Glutaminolysis and insulin secretion. **Diabetes**, v. 51(3), p. S421-S426, 2002.

KETTLE, A.J.; WINTERBOURN, C.C. A kinetic analysis of the catalase activity of myeloperoxidase. **Biochesmitry**, v.40, p.10204-12, 2001.

KOZAR, R.A.; SCHULTZ, S.G.; BICK, R.J.; POINDEXTER, B.J.; DESOIGNIE, R.; MOORE, F.A. Enteral glutamine but not alanine maintains small bowell barrier

function after ischemia/reperfusion injury in rats. **Shock**, v. 21, p. 433-437, 2004.

KU, D.D. Nitric oxide and nitric oxide donor induced relaxation. **Methods in enzymology.**, v.269, p.107-19, 1996.

KLAUNIG, J.E.; KAMENDULIS, L.M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 44, p. 239-267, 2004.

LI, C., BUETTGER, C., KWAGH, J., MATTER, A., DAIKHIN, Y., NISSIM, I.B., COLLINS, H.W., YUDKOFF, M., STANLEY, C.A., MATSHINSKY, F.M. A signaling role of glutamine in insulin secretion. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 13393-13401, 2004.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. v. 193, p. 265-75, 1951.

MACDONALD, M.J.; FAHIEN, L.A. Glutamate is not a messenger in insulin secretion. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 34025-34027, 2000.

MALAISSÉ, W.J., SENER, A., CARPINELLI, A.R., ANJANEYULU, K., LEBRUN, P., HERCHUELZ, A., CHRISTOFÉ, J., The stimulus-secretion role of L-glutamine as a fuel for pancreatic islets. **Mol Cell Endocrinol**, v. 20, p. 171-189, 1980.

MARTIN-GALLÁN, P.; CARRASCOSA, A.; GUSSINYÉ, M.; DOMINGUEZ, C. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 34, p. 1563-1574, 2003.

MARQUEZ, L.A.; DUNFORD, H.B. Kinetics of oxidation of tyrosine and dityrosine by myeloperoxidase compounds I and II. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.30434-30440, 1996.

MARTINEZ-RIQUELME, A.E., ALLISON, S.P. Insulin revisited. **Clinical Nutrition**, v. 22(1), p. 7-15, 2003.

MATILA, B.; ORTÍZ, J.; GONZÁLEZ, P.; GARCÍA-DÍEZ, F.; JORQUERA, F.; CULEBRAS, F.M.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; TUNÓN, M.J. Effects of parenteral nutrition supplemented with glutamine or glutamine dipeptide on liver antioxidant and detoxication systems in rats. **Nutrition**, v. 16, p. 125-128, 2000.

MOREIRA, P.I.; SIEDLAK, S.L.; ALIEV, G.; ZHU, X.; CASH, A.D.; SMITH, M.A.; PERRY, G. Oxidative stress mechanisms and potential therapeutics in Alzheimer disease. **J. Neural Transm.**, dez. 2004.

NAKAGAWA, I.; SUZUKI, M.; IMURA, N.; NAGANUMA, A. Involvement of oxidative stress in paraquat-induced metallothionein synthesis under glutathione depletion. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 24, p. 1390-1395, 1998.

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

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

NORMAN, A.W.; LITWACK, G. **Hormones**. 2 ed. Califórnia: Academic Press, 1997, 558p.

OBROSOVA, I.G. How does glucose generate oxidative stress in peripheral nerve? **International Review of Neurobiology**, v. 50, p. 3-34, 2003.

OHKAWA, H.; OSHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal-tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem.**, v. 95, p. 351-358, 1979.

PAN, M. et al. Stimulation of intestinal glutamina absorption in chronic metabolic acidosis. **Surgery**, v. 136, p. 127-134, 2004.

PINCHUK, I.; LICHTENBERG, D. The mechanism of action of antioxidants against lipoprotein peroxidation, evaluation based on kinetic experiments. **Prog. Lipid Res.**, v. 41, p. 279-314, 2002.

POWELL, L.A.; WARPEHA, K.M.; XU, W.; WALKER, B.; TRIMBLE, E.R. Hight glucose decrease intracellular glutathione concentration and upregulates inducible nitric oxide synthase gene expression in intestinal epithelial cells. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 33, p. 797-803, 2004.

RADI, R.; BECKMAN, J.S.; BUSH, K.M.; FREEMAN, B.A. Peroxynitrite oxidation of sulphhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **Journal of Biological Chemistry**. v.266(7), p.4244-50, 1991.

RAO TS, YU SS, DJURIC SW, ISAKSON PC. Phorbol ester-induced dermal inflammation in mice: evaluatoin of inhibitors of 5-lipooxygenase and antagonists of leukotriene B₄ receptor. **J. Lipid Mediators Cell Signalling**, v.10, p.213-28, 1994.

RAT INSULIN RIA KIT– LINCO Research: Disponível em: www.lincoresearch.com

REITER, R.J.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; TAN, D.X.; BURKHARDT, S. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. **Ann N Y Acad. Science**, v. 939, p. 200-215, 2001b.

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

SEN, C.K. Nutritional biochemistry of cellular glutathione. **Nutritional Biochemistry**, v. 8, p. 660-672, 1997.

SENER, A., MALAISSE-LAGAE, F., MALAISSE, W.J. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Environmental influences on L-glutamine oxidation in pancreatic islets. **Biochem J**, v. 202, p. 309-316, 1982.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.**, v. 215, p. 213-219, 1993.

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

SCHENKMAN, J.B.; CINTI, D.L. Preparation of microsomes with calcium. **Meth. Enzymol.**, v. 52, p. 83-89, 1978.

STADTMAN, E.R. Protein oxidation and aging. **Sci.**, v. 257, p. 1120-1124, 1992.

STUMVOLL, M.; PERRIELLO, G.; MEYER, C.; GERICH, J. Role of glutamine in human carbohydrate metabolism in kidney and other tissue. **Kidney International**, v. 55, p. 778-792, 1999.

TANIZAWA, Y., NAKAI, K., SASAKI, T., ANNO, T., OHTA, Y., INOUE, H., MATSUO, K., KOGA, M., FURUKAWA, S., OKA, Y. Unregulated elevation of glutamate dehydrogenase activity induces glutamine-stimulated insulin secretion: identification and characterization of a GLUD1 gene mutation and insulin secretion studies with MIN6 cells overexpressing the mutant glutamate dehydrogenase. **Diabetes**, v. 51(3), p. 712-717, 2002.

TAPIERO, H.; MATLÉ. G.; COUVREUR. P.; TEW. K.D. Glutamine and glutamate. **Biomed Pharmacother**, v. 56, p. 446-457, 2002.

TIETZE, F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**. v.27, p.502-22, 1969.

WANG, G. MAO, J.M.; WANG, X.; ZHANG, F.C. Effect of homocysteine on plaque formation and oxidative stress in patients with acute coronary syndromes. **Chin. Med. J.**, v. 117, p. 1650-1654, 2004.

WESSNER, B.; STRASSER, E.M.; SPITTLER, A.; ROTH, E. Effect of single and combined supply of glutamine, glycine, N-acetylcysteine, and R,S- α -lipoic acid on glutathione content of myelomocytic cells. **Clinical Nutrition**, v. 22, p. 515-522, 2003.

WINIARSKA, K.; DROZAK, J.; WEGRYNOWICZ, M.; JAGIELSKI, A.K.; BRYLA, J. Relationship between gluconeogenesis and glutathione redox state in rabbit kidney-cortex tubules. **Metabolism**, v. 52, p. 739-746, 2003.

VAN ACKER, B.A.C.; VON MEYENFELDT, M.F.; VAN DER HULST, R.R.W.J.; HULSEWÉ, K.W.E.; WAGENMAKERS, A.J.M.; DEUTZ, N.E.P.; DE BLAAUW, I.; DEJONG, C.H.C.; VAN KREEL, B.K.; SOETERS, P.B. Glutamine: the pivot of our nitrogen economy? **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 23, p. S45-S48, 1999.

VAN DER HULST, R.R.W.J.; MEYENFELDT, M.F.V.; DEUTZ, N.E.P.; STOCKBRÜGGER, R. W. SOETERS, P.B. The effect of glutamine administration on intestinal glutamine content. **Journal of Surgical Research**, v. 61, p. 30-34, 1996.

VARLEY, H.; GOWENLOCK, A.H.; BELL, M. **Practical Biochemistry**, v.1, p. 389-391, 1976.

VIVOT, E.; MUNOZ, J.D.; CRUANES, M.C.; CRUANES, M.J.; TAPIA, A.; HIRSCHMANN, G.S.; MARTINEZ, E.; DI SAPIO, O.; GATTUSO, M.; ZACCHINO, S. Inhibitory activity of xanthine-oxidase and superoxide scavenger properties of *Inga verna* subsp. *affinis*. Its morphological and micrographic characteristics. **Journal of Ethnopharmacology**. v.76, p.65–71, 2001.

9 ANEXOS

9.1 Protocolo da CEUA – UFSC

9.2 Artigo enviado à publicação no “European Journal of Nutrition”

9.3 Lista de trabalhos apresentados em eventos

9.1 Protocolo da CEUA – UFSC

9.2 Artigo enviado à publicação no “European Journal of Nutrition”

L-GLUTAMINE IMPROVES PLASMA GLUTATHIONE LEVELS IN AN OXIDATIVE STRESS MODEL MEDIATED BY PARAQUAT

Csele Vand Sand¹, Tiago Opala Vieira¹, Tiago Bitencourt de Oliveira², Danilo Wilhelm Filho², Fátima Regina Mena Barreto da Silva³, Tânia Beatriz Creczynski-Pasa^{*1}. Departamentos de ¹Ciências Farmacêuticas, ²Ecologia e Zoologia, ³Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

L-GLUTAMINE IMPROVES PLASMA GLUTATHIONE LEVELS IN AN OXIDATIVE STRESS MODEL MEDIATED BY PARAQUAT

Csele Vand Sand¹, Tiago Opala Vieira¹, Tiago Bitencourt de Oliveira², Danilo Wilhelm Filho², Fátima Regina Mena Barreto da Silva³, Tânia Beatriz Creczynski-Pasa*¹

Departamentos de ¹Ciências Farmacêuticas, ²Ecologia e Zoologia, ³Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

Running Title: Effect of glutamine on GSH and TBARS levels under oxidative stress.

*Corresponding author:

Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade,

Caixa Postal: 476

88040-900 Florianópolis, SC Brazil

Email address: taniac@mbox1.ufsc.br

Tel: +55 (48) 3318057

Fax: +55 (48) 2340599

ABSTRACT

Background: L-glutamine (gln) is involved in more metabolic process than any other amino acid, and has been classified as an essential amino acid in demanding metabolic conditions when the oxidative stress is taken place. The amino acids gln (glutamate pathway), cys and gly are the precursors of the tripeptide L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine synthesis, which is present in cells mainly on the reduced form (GSH), one of the most important endogeneous defense front against the oxidative and nitrosative insults. **Aim of the study:** Considering that gln can be used as an oxidative fuel molecule as well as glucose (glu) by the cells, the aim of this work was to investigate the influence of gln and glu on the antioxidant defense (GSH content) and oxidative damage (TBARS levels), in the presence and in the absence of an induced oxidative stress in different tissues. **Methods:** The oxidative stress was induced by a daily subcutaneous injection of paraquat (30 mg/BW) for two days. gln and glucose were administrated by gavage, 1 M and 4 g/BW, respectively. GSH content and oxidative damage were monitored respectively by thiolate anion formation and TBARS method. **Results:** Gln was effective in increasing (~40%) GSH plasma levels in the presence of oxidative stress and decreased (~16%) TBARS levels in the hepatic tissue. However, it did not promote the same significant effect on GSH level in hepatic and renal tissues. On the other hand, either gln or glu increased TBARS levels ~55% for gln and ~ 47% for glu in renal tissue upon oxidative stress. **Conclusions:** Considering the experiments were performed in animal model when all metabolic interactions are present, the present work showed that gln administrated orally promoted a relevant increase in antioxidant protection on plasma and in the hepatic tissue under an oxidative stress condition. However, renal tissue was not protected by supplementation with gln or glu under oxidative stress and it seems that both substances induced tissue damage.

Keywords: L-glutamine, glucose, glutathione, paraquat, plasma.

Introduction

Glutamine (gln) is quantitatively the most abundant amino acid found in human body tissues and has the major plasma concentration among all the amino acids, typically 0.6 mmol/l [1,2], which correspond to 30-35% of total circulating amino acids [3]. Actually, several works have been investigated the function of the L-glutamine in different cells, both in physiological and pathological conditions [4,5,6,7,8].

L-glutamine is involved in more metabolic processes than any other amino acid, participating as interorgan nitrogen transporter and intracellular nitrogen donor (synthesis of renal ammonia and hepatic urea), oxidative fuel (erythrocytes and immune system cells), substrate and stimulator of glycogen synthesis and gluconeogenesis, acid-base homeostasis, potential regulator of protein synthesis, inhibitor of lipolysis and ketogenesis [9]. L-glutamine is also important in nucleic acids, glutathione, citrulline, arginine, GABA and glucose synthesis [2]. The large use of glutamine for many systems and the decreased plasma levels during serious injury lead it to be classified as conditionally essential amino acid [10].

The amino acids L-glutamine (glutamate pathway), cysteine and glycine are the precursors of tripeptide L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine synthesis, which is present in mammalian cells mostly (~99%) in reduced state (GSH) and the small amount (~1%) in oxidized state (GSSG) [6].

The important role of glutamine in glutathione synthesis is due to the fact that the highly charged L-glutamate, one of the direct glutathione precursors, is poorly transported across the cell membrane. L-glutamine is, however, readily taken up by the cell and is deaminated, thus available as an indirect precursor of glutamate [11].

GSH is the predominant low molecular weight thiol in vertebrate and is the main cell antioxidant defense in preventing oxidative and nitrosative stress [12,13]. GSH is synthesized from its constituent amino acids by sequential action of γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) and glutathione synthetase. The de novo synthesis has a greater influence in the cellular levels of GSH [13]. It is regulated by at least three factors: (i) the level of γ -glutamylcysteine synthetase present in the cell; (ii) the availability of its substrates, particularly L-cysteine; and (iii) feedback inhibition of γ -glutamylcysteine synthetase by GSH [14].

GSH is involved in a large number of metabolic processes, including detoxification of electrophilic xenobiotics, modulation of redox regulated signal transduction, cysteine storage and transport, cell proliferation regulation, antioxidant defense, among others [12,13]. A key mechanism that accounts for much of the metabolic and cell regulatory properties of glutathione is the thiol-disulfide exchange equilibrium [12,13,15].

In all the situations where the hypercatabolism is present (prolonged starvation, surgery, burns and other severe injuries) there is an intracellular deficiency of glutamine, speeding up the amino acid efflux from the muscle and liver, resulting in damage to the intestinal epithelium [11,16]. The supplementation of L-glutamine improves the nitrogenated balance, protein synthesis and preserves the intestinal mucosa integrity [4,3,17].

In the present study paraquat a non-selective substance was used for the induction of oxidative stress in animals and for the determination of oxidative alterations in different tissues. Paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium) is a highly toxic non-selective herbicide for humans and other animals. It is known that paraquat accumulated in organs is submitted to a redox cycle reactions and is metabolized by P-450 NADPH reductase, to its reduced intermediary, the paraquat radical, which in turn, produces reactive oxygen species (ROS) during its oxidation by molecular oxygen [18].

Considering that L-glutamine can be used as an oxidative fuel molecule as well as glucose, glucose was used in a hyperglycemia-induced dose to compare the influence of L-glutamine and glucose in tissue GSH and TBARS contents. Hyperglycemia can negatively influence cellular redox status, and may disrupt cell antioxidant mechanisms by altering GSH tissue levels and/or decreasing the expression and activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione reductase (GR) [19-21].

The aim of this study was to investigate the effect of an oral supplementation of L-glutamine and glucose in vivo, on the regulation of GSH levels and the modulation of the tissue damage of animals submitted to metabolic stress mediated by paraquat.

Materials and Methods

Chemicals: L-Glutamine – (GLUTAMIN[®]) was donated by Support Produtos Nutricionais Ltda., São Paulo, Brazil. Dietilen-triamine-pentacetic acid (DPTA), 2-nitrobenzoic acid (DTNB), glutathione reductase (GR), thiobarbituric acid (TBA), Triton[®] X-100, 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium (Paraquat), nicotinamide adenine dinucleotide (NADPH), were purchased from Sigma[®] (St. Louis, MO, USA). All other reagents were of analytical grade.

Animals: Male Wistar rats weighing 160 to 200 g and 42-54 days were maintained in the animal facilities of the Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Brazil. The animals were maintained and used in accordance with ethical recommendations of Brazilian Veterinary Medicine Council and the Brazilian College of Animal Experimentation (protocol number 0251/CEUA – 23080.027439/2003-93/UFSC).

Experimental models

Six experimental groups were used in the present study: 1) paraquat control (pc); 2) control (c); 3) paraquat glutamine (pgl); 4) glutamine (gln); 5) paraquat glucose (pglu) and 6) glucose (glu), containing each group five animals. The experiments were performed after 48 h of treatment and all the substances were orally given to the animals by gavage. Paraquat was administered daily at the dose of 30 mg/kg body weight injected subcutaneously (s.c.). The animals were killed and tissue samples and blood were immediately harvested and submitted to the following experimental procedures.

Homogenate preparation

Portions of liver and kidney were homogenized in a proportion of 1:20 (w/v) in cold buffer containing 20 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl and 0.1% Triton X-100, pH 7.4. The samples were centrifuged to 10000 g for 10 minutes and the supernatant aliquots were used for the lipid peroxidation assay.

Evaluation of lipid peroxidation in tissues

The extent of lipid peroxidation was determined spectrophotometrically at 535 nm in liver and kidney by the thiobarbituric acid method described by OHKAWA, OSHISHI &

YAGI (1979) [22] and BIRD & DRAPER (1984) [23]. The amount of thiobarbituric reactive species (TBARS) was determined using an extinction coefficient of 1.56×10^5 M/cm. Briefly, the method consists in the tissue homogenization with trichloroacetic acid (TCA) followed by the incubation with thiobarbituric acid (TBA) 0.76 %, at 100 °C, for 60 min in a phosphate buffer at pH 7.4 (60 mM Tris-HCl and 0.1 mM diethylenetriaminepentaacetic acid (DPTA)). At room temperature the samples are then centrifuged and analyzed.

Acid extract preparation

Liver and kidney acid extracts were obtained after homogenization with TCA 12% (1:20; w/v). After centrifugation, the determination of non-proteic thiols (reduced glutathione - GSH) was carried out immediately in the supernatants.

Content of reduced glutathione (GSH)

GSH concentration were determined spectrophotometrically at 412 nm in hepatic and renal tissues, as well as in plasma, according to BEUTLER, DURON & KELLY (1963) method [24]. Briefly, the method consists in the reaction of 2-nitrobenzoic acid (DTNB) (2.5 mM) with GSH from the samples, in a phosphate buffer (0.2 M) at pH 8.0, generating the thiolate anion TNB measured at 412nm.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) with paired comparison by Bonferroni complementary test. Differences between means were considered significant when $p < 0.05$.

Results

The GSH values in paraquat treated and in the control groups are summarized on table 1. Figure 1 shows the effect of paraquat and the control groups on hepatic GSH content. Paraquat induced a significant decrease on hepatic GSH content comparing control (c) and paraquat control (pc) groups (6.1 ± 0.4 and 4.5 ± 0.3 mM, respectively). In the figure 1 is possible to observe that there were no significant differences between the

paraquat treated groups, by the administration of L-glutamine and glucose. However, in control groups, when L-glutamine (gln group) and glucose (glu group) were administered to the animals, the GSH content increased, comparing to the control group (c) (8.9 ± 0.2 , 7.7 ± 0.1 and 6.1 ± 0.4 mM, respectively), and L-glutamine showed a slightly higher effect.

Plasma GSH levels showed an opposite response after different treatments (figure 2). The groups under oxidative stress showed higher GSH levels than the control groups. Paraquat control group (pc) and paraquat glucose group (pglu) showed similar results. Paraquat glutamine group (pgln), which received only L-glutamine, promoted a significant elevation on plasma GSH content, comparing to the other groups (25.3 ± 0.7 , 25.4 ± 0.8 and 35.3 ± 1.3 μ M, respectively). The administration of L-glutamine increased the plasma GSH level of paraquat treated animals, but this increase was not statistically significant.

Figure 3 shows the effect of the different treatments on renal GSH content. Paraquat treated groups did not show a significant difference comparing to the untreated control groups, excepting for paraquat glucose group (pglu). This group showed also a significant higher GSH level comparing to its control (pc) (4.9 ± 0.2 and 3.5 ± 0.2 mM, respectively). The control groups glutamine (gln) and glucose (glu) also showed high renal GSH levels and the results were similar to the paraquat glucose group (pglu) (4.2 ± 0.2 , 4.4 ± 0.2 and 4.9 ± 0.2 mM, respectively). The administration of L-glutamine did not show differences between both paraquat glutamine (pgln) and glutamine (gln) groups (4.0 ± 0.2 and 4.2 ± 0.2 mM, respectively). Glucose groups (pglu and glu) showed better results on renal GSH levels compared to control groups (pc e c) (4.9 ± 0.2 , 4.4 ± 0.2 , 3.5 ± 0.2 and 3.7 ± 0.1 mM, respectively).

The TBARS values in paraquat treated (p) and in the control groups (c) are summarized on table 2. Lipoperoxidation levels were analyzed on hepatic and renal tissues as an indicative of tissue damage (figures 4 and 5). Paraquat treatment significantly augmented TBARS levels in hepatic tissue. L-glutamine administered to the rats of the paraquat group (pgln) was effective in decreasing the damage mediated by paraquat, as well as glucose (pglu) compared to paraquat control group (pc) (273.2 ± 9.2 , 222.8 ± 7.5 and 324.5 ± 10.5 μ mol/g, respectively). However, the control group (c) after glucose (glu) or L-

glutamine (gln) administration promoted an increase on TBARS levels (213.9 ± 7.0 , 281.2 ± 8.7 and 250.0 ± 6.2 $\mu\text{mol/g}$, respectively).

The variation in renal TBARS levels are represented in the figure 5. The administration of glucose or L-glutamine in the paraquat treated groups (pglu or pglu) elevated the damage mediated by paraquat compared to paraquat control group (pc) (459.6 ± 7.4 , 475.3 ± 7.5 and 312.8 ± 3.8 $\mu\text{mol/g}$, respectively), and both substances showed similar effects.

Discussion

Paraquat metabolism in tissues undergoes activation through the cytochrome P450 system, which contributes to the intracellular GSH content depletion [25]. The reduced intermediate, paraquat radical, generated during its metabolism produces reactive oxygen species during its oxidation by molecular oxygen [18,25]. The metabolic process reactions are limited to the spontaneous or catalyzed addition of GSH to reactive species endogenously generated [14], and ROS generation mediated by paraquat seems to be elevated in tissues where GSH is depleted [18].

Tissue GSH content depends on its utilization, intracellular conversion of oxidized glutathione (GSSG), as well as GSH de novo synthesis [12,13]. GSSG reduction to GSH is catalyzed by the enzyme glutathione reductase, present in the cytoplasm and mitochondrial matrix [25]. The enzyme is NADPH-dependent and when its concentration is low there is an accumulation of intracellular GSSG. The accumulated GSSG is then driven out the cell, limiting the substrate to be converted to GSH, thereby maintaining low intracellular GSH contents. Low NADPH concentrations also occur during oxidative stress, as detoxification processes, when cytochrome P450 is active [15,14]. Therefore, these conditions will jeopardize the recovery of GSH levels, which are essential to the cell homeostasis [26].

The present work, hepatic GSH levels were not influenced by L-glutamine and paraquat administration (pgln group). Considering a significant elevation on GSH hepatic contents in the group treated with L-glutamine without oxidative stress (gln group) and that most of the plasma GSH level is controlled by hepatic replacement [12,13,27,14], it is possible to suggest that the hepatic GSH content in the paraquat glutamine group (pglu) ended up in plasma. On the effort to maintain plasma GSH levels to control the generalized

oxidative stress, the animals receiving L-glutamine and paraquat (pqln group) showed a significantly elevated plasma GSH levels, as shown in figure 2. Similar results were discussed by Sen (1997), where L-glutamine administered to rodents treated with higher chemotherapeutic doses promoted the maintenance of plasma and tissue GSH levels [15].

Controversially, the administration of L-glutamine in renal tissue seems not to alter the GSH content, in both situations under oxidative stress or in a normal metabolic condition. It can be suggested that in the renal tissue L-glutamine may be enrolled in the acid-base buffering and/or participating in gluconeogenesis [28]. L-glutamine is essential to renal cells as a quantitatively important donor of NH_3 , it combines with exported protons derived from carbonic acid, which dissociates to HCO_3^- and H^+ . HCO_3^- subsequently enters into the circulation where it is important as pH buffer. Therefore, the carbon skeleton of L-glutamate is converted to phosphoenolpyruvate or pyruvate directly via 2-oxoglutarate and then participates in the gluconeogenesis [28]. Renal gluconeogenesis is especially important in conditions where the blood ketone bodies concentration increases, causing metabolic acidosis, as during long periods of hypoglycemia or diabetes. Renal gluconeogenesis also participates replacing glucose concentration in situations of long starvation and oxidative stress. Hepatic gluconeogenesis from amino acids (mainly alanine) is gradually replaced by renal gluconeogenesis. Under these conditions, glucose produced by the kidney means up to 50% of circulating plasma glucose [10,28]. However, Winiarska and co-workers (2003) showed different results in the GSH levels in rabbit renal cortex, and they also tested the addition of gluconeogenesis precursors in cell culture. They observed an intracellular elevation on glucose-6-phosphate, which acts in the formation of cell NADPH activating pentose phosphate enzymes (glucose-6-phosphate dehydrogenase – G6PD) [29]. Increasing intracellular NADPH content also increases the GSH/GSSG rate, possibly because higher substrate levels were available for intracellular GSSG conversion to GSH. The authors showed that in the renal tissue the administration of glucose promoted significant increases in renal GSH levels [28]. Glucose oxidation has glucose-6-phosphate as its metabolite and glucose administration may contribute to the renal GSH content found in the groups. The lower GSH levels found in the group under oxidative stress that received L-glutamine (pqln group) could be correlated to the production of a new molecule, through de novo glutathione synthesis. Thus, glutathione replacement may promote an equilibrium

between ROS production and elimination, increasing the cell antioxidant capacity. The effect of glucose on the paraquat group indicates, as discussed above, that it might increase intracellular NADPH concentration, optimizing GSSG to GSH conversion, and thereby elevating cell GSH content, and altering the cell redox potential. It indicates that in renal tissue glucose may interfere in different enzymic routes and not only in GSH content.

TBARS determinations showed that the hepatic tissue under oxidative stress is influenced by glucose or L-glutamine administration and both substances mitigate the damage caused by paraquat. However, under normal metabolic conditions this protective effect is absent and on the contrary, the tissue damage is increased.

In renal tissue the oxidative damage mediated by paraquat did not show a significant difference in lipid peroxidation when the groups pc and c were compared. After the paraquat groups received either glucose (pglu) or L-glutamine (pglu) oxidative levels showed a significant increase. In renal tissue glucose administration in paraquat treated group (pglu) elevated GSH level but the damage measured by TBARS was not minimized. Therefore, it is possible to suggest that both substances promoted an increase on the oxidative stress state in this tissue.

These results can clearly suggest that when L-glutamine is administered after a stress induction plasma GSH levels are elevated, consequently improving the protection against oxidative stress. However, this seems to be restricted to plasma, while the renal tissue was not protected after glucose and glutamine supplementation.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Brazilian financial agencies CAPES (through the PROF program) and FUNCITEC. They also wish to thank Support Produtos Nutricionais LTDA – Royal Nutricia for the L-Glutamine donation.

References

1. VAN ACKER, BAC, VON MEYENFELDT, MF, VAN DER HULST, RRWJ, HULSEWÉ, KWE, WAGENMAKERS, AJM, DEUTZ, NEP, DE BLAAUW, I, DE JONG, CHC, VAN KREEL, BK, SOETERS, PB (1999) Glutamine: the pivot of our nitrogen economy? *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 23:S45-S48
2. CHWALS, WJ (2004) Regulation of the cellular and physiological effects of glutamine. *Mini Review of Medical Chemistry* 8:833-838
3. MATILLA, B, ORTÍZ, J, GONZÁLEZ, P, GARCÍA-DÍEZ, F, JORQUERA, F, CULEBRAS, FM, GONZÁLEZ-GALLEGO, J, TUNÓN, MJ (2000) Effects of parenteral nutrition supplemented with glutamine or glutamine dipeptide on liver antioxidant and detoxification systems in rats. *Nutrition* 16:125-128
4. VAN DER HULST, RRWJ, MEYENFELDT, MFV, DEUTZ, NEP, STOCKBRÜGGER, RW, SOETERS, PB (1996) The effect of glutamine administration on intestinal glutamine content. *Journal of Surgical Research* 61:30-34
5. VALENCIA, E, MARIN, A, HARDY, G (2002) Impact of oral L-glutamine on glutathione, glutamine, and glutamate blood levels in volunteers. *Nutrition* 18: 367-370
6. ROTH, E, OEHLER, R, MANHART, N,q EXNER, R, WESSNER, B, STRASSER, E, SPITTLER, A (2002) Regulative potential of glutamine – relation to glutathione metabolism. *Nutrition* 18:217-221
7. JOHNSON, AT, KAUFMANN, YC, KUO, S, TODOROVA, V, KLIMBERG, VS (2003) Effect of glutamine on glutathione, IGF-1, and TGF- β . *Journal of Surgical Research* 111:222-228
8. WESSNER, B, STRASSER, EM, SPITTLER, A, ROTH, E (2003) Effect of single and combined supply of glutamine, glycine, N-acetylcysteine, and R,S- α -lipoic acid on glutathione content of myelomocytic cells. *Clinical Nutrition* 22:515-522

9. STUMVOLL, M, PERRIELLO, G, MEYER, C, GERICH, J (1999) Role of glutamine in human carbohydrate metabolism in kidney and other tissues. *Kidney International* 55:778-792
10. TAPIERO, H, MATLÉ, G, COUVREUR, P, TEW, KD (2002) Glutamine and glutamate. *Biomedical Pharmacotherapy* 56:446-457
11. FÜRST, P, ALTEHELD, B, STEHLE, P (2004) Why should a single nutrient glutamine-improve outcome? The remarkable story of glutamine dipeptides. *Clinical Nutrition Supplements* 1:3-15
12. KOSOWER, NS, KOSOWER, EM (1978) The glutathione status of cells. *International Review of Cytology* 54:109-160
13. MEISTER, A, ANDERSON, ME (1983) Glutathione. *Annual Review in Biochemistry* 52:711-760
14. GRIFFITH, OW (1999) Biological and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology & Medicine* 27:922-935
15. SEN, CK (1997) Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *Nutritional Biochemistry* 8:660-672
16. PAN, M (2004) Stimulation of intestinal glutamine absorption in chronic metabolic acidosis. *Surgery* 136:127-134
17. KOZAR, RA, SCHULTZ, SG, BICK, RJ, POINDEXTER, BJ, DESOIGNIE, R, MOORE, FA (2004) Enteral glutamine but not alanine maintains small bowel barrier function after ischemia/reperfusion injury in rats. *Shock* 21:433-437
18. BUS, JS, CAGEN, SZ, OLGARRO, M, GIBSON, JE (1976) A mechanism of paraquat toxicity in mice and rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* 35:501-513
19. JAIN, SK, MCVIE, R (1994) Effect of glycemic control, race (white versus black), and duration of diabetes on reduced glutathione content in erythrocytes of diabetic patients. *Metabolism* 43:306-309
20. OBROSOVA, IG (2003) How does glucose generate oxidative stress in peripheral nerve? *International Review of Neurobiology* 50:3-34
21. POWELL, LA, WARPEHA, KM, XU, W, WALKER, B, TRIMBLE, ER (2004) High glucose decrease intracellular glutathione concentration and upregulates

inducible nitric oxide synthase gene expression in intestinal epithelial cells.
Journal of Molecular Endocrinology 33:797-803

22. OHKAWA, H, OSHISHI, N, YAGI, K (1979) Assay for lipid peroxides in animal-tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95:351-358
23. BIRD, RP, DRAPER, AH (1984) Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. *Methods in Enzymology* 90:105-109
24. BEUTLER, E, DURON, O, KELLY, BM (1963) Improved method for the determination of blood glutathione. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 61:882-90
25. HALLIWELL, B, GUTTERIDGE, JMC (1999) *Free Radical Biology & Medicine*. 3 ed. Oxford University Press, Oxford
26. DALTON, TP, CHEN, Y, SCHNEIDER, SN, HERBERT, DW, SHERTZER, HG (2004) Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. *Free Radical Biology & Medicine* 37:1511-1526
27. KAPLOWITZ N, FERNANDEZ-CHECA JC, KANNAN R, GARCIA-RUIZ C, OOKHTENS M, YI JR. (1996) GSH transporters: molecular characterization and role in GSH homeostasis. *Biological Chemistry*. 377(5):267-273
28. NEWSHOLME, P, LIMA, MMR, PROCOPIO, J, PITHON-CURI, TC, DOI, SQ, BAZOTTE, RB, CURI, R (2003) Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 36:153-163
29. WINIARSKA, K, DROZAK, J, WEGRYNOWICZ, M, JAGIELSKI, AK, BRYLA, J (2003) Relationship between gluconeogenesis and glutathione redox state in rabbit kidney-cortex tubules. *Metabolism* 52:739-746

Table 1: GSH values in paraquat treated and control groups

| | Hepatic GSH mM | Plasma GSH μM | Renal GSH mM |
|-------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Pc | 4.5 ± 0.3 | 25 ± 0.7 | 3.5 ± 0.2 |
| C | 6.1 ± 0.4 | 19 ± 0.7 | 3.7 ± 0.1 |
| PglN | 4.3 ± 0.1 | 35 ± 1.3 | 4.0 ± 0.2 |
| Gln | 8.9 ± 0.2 | 22 ± 0.7 | 4.2 ± 0.2 |
| Pglu | 3.7 ± 0.1 | 25 ± 0.8 | 4.9 ± 0.2 |
| Glu | 7.7 ± 0.2 | 19 ± 0.7 | 4.4 ± 0.2 |

Data are expressed as mean (mM/μM) ± S.E.M of 5 animals.

Table 2:TBARS values in paraquat treated and control groups

| | Hepatic TBARS μmol/g | Renal TBARS μmol/g |
|-------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| Pc | 325 ± 11 | 313 ± 4 |
| C | 214 ± 7 | 298 ± 3 |
| PglN | 273 ± 9 | 475 ± 8 |
| Gln | 250. ± 6 | 333 ± 8 |
| Pglu | 223 ± 8 | 460 ± 7 |
| Glu | 281 ± 9 | 404 ± 3 |

Data are expressed as mean (μmol/g) ± S.E.M of 5 animals.

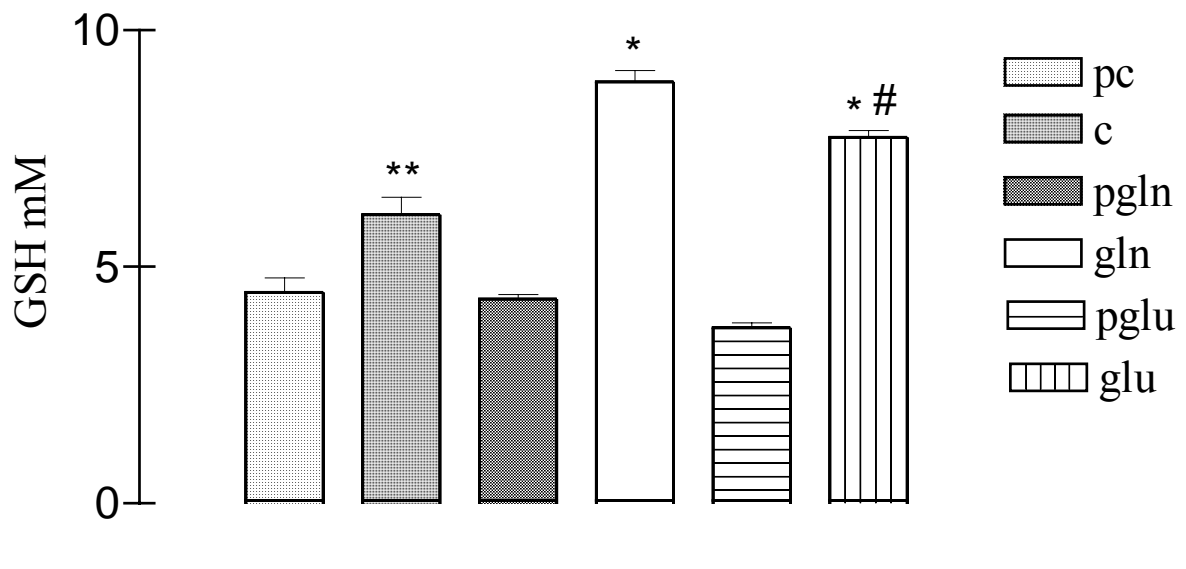


Figure 1

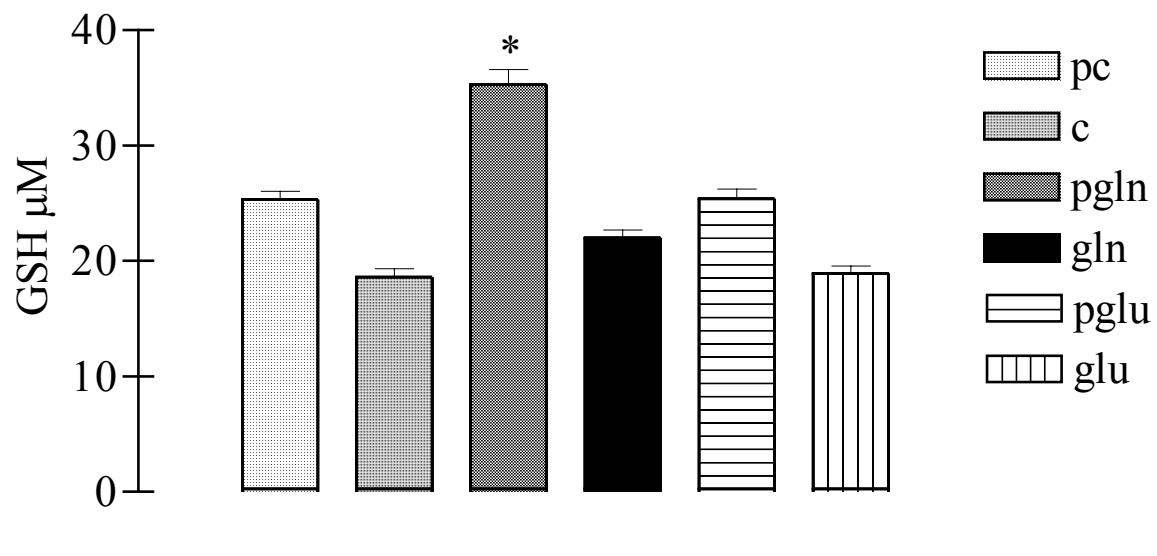


Figure 2

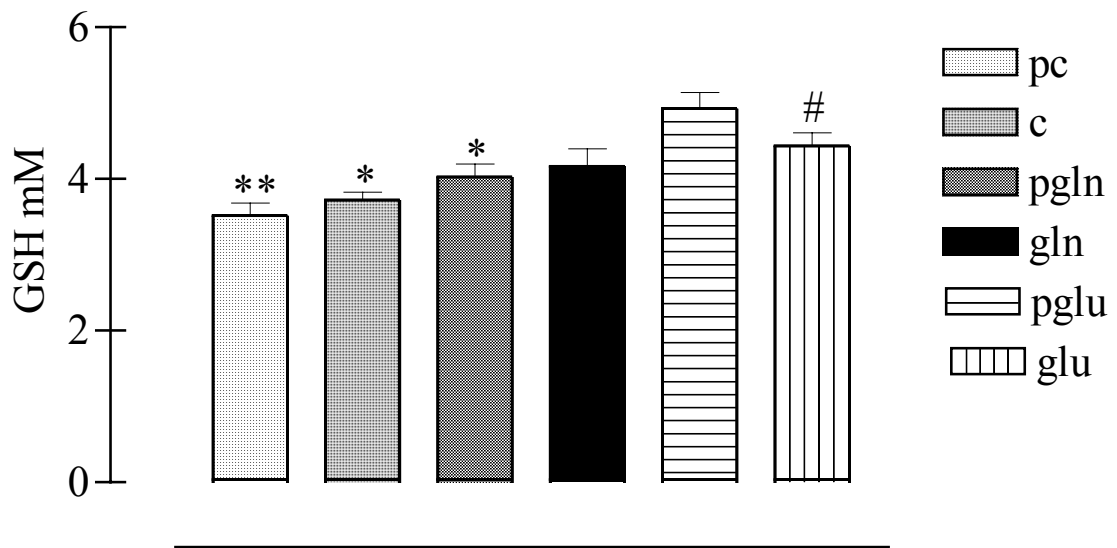


Figure 3

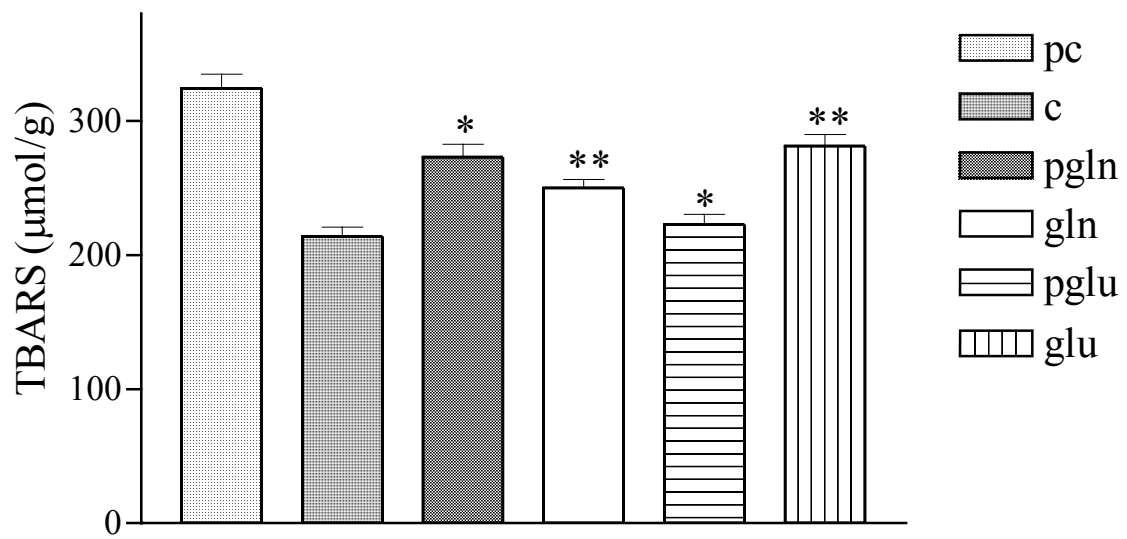


Figure 4

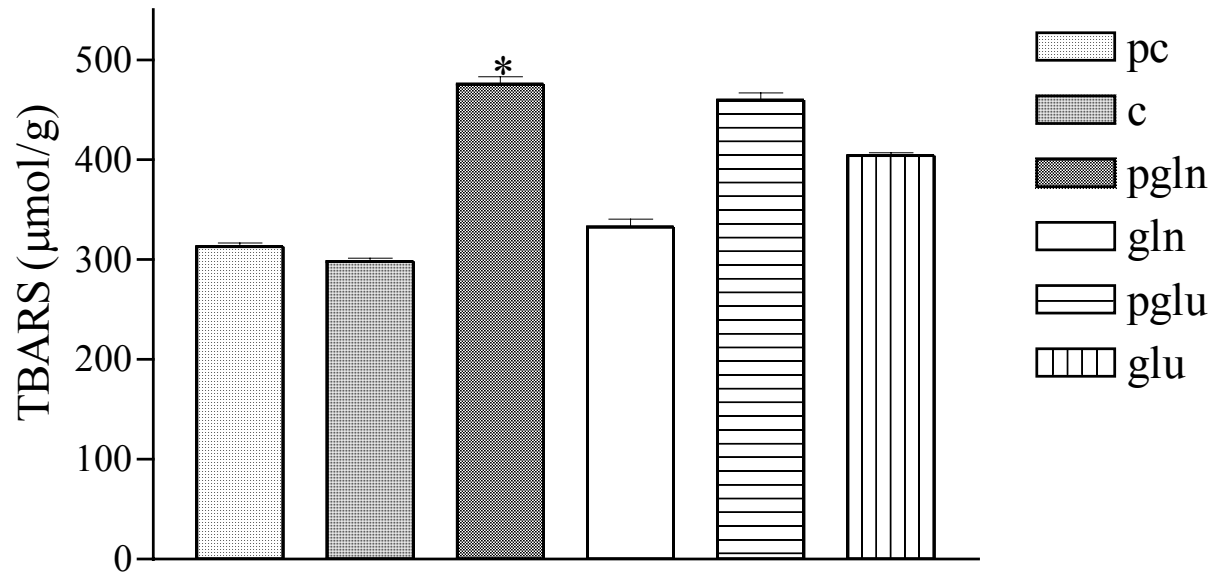


Figure 5

Legends to figures

Figure 1 – Variations of hepatic GSH content after paraquat treatment and the control groups. (pc) paraquat control; (c) control; (pglu) paraquat glutamine; (gln) glutamine; (pglu) paraquat glucose; (glu) glucose. Each value is the mean \pm SEM of 5 animals. * P <0.05 significantly different from control groups (c e pc) and glutamine group (gln), ** p < .05 from paraquat control group (pc), # p < 0.05 from control group.

Figure 2 – Variations of plasmatic GSH content after PQ treatment and the control groups. (pc) paraquat control; (c) control; (pglu) paraquat glutamine; (gln) glutamine; (pglu) paraquat glucose; (glu) glucose. Each value is the mean \pm SEM of 5 animals. * P <0.001 significantly different from all groups analyzed.

Figure 3 – Variations of renal GSH content after PQ treatment and the control groups. (pc) paraquat control; (c) control; (pglu) paraquat glutamine; (gln) glutamine; (pglu) paraquat glucose; (glu) glucose. Each value is the mean \pm SEM of 5 animals. * P <0.05 and ** p <0.001 significantly different from the paraquat glucose group (pglu), # p <0.05 different from control group (c).

Figure 4 – Effect of the L-glutamine administration on paraquat treated and control groups at TBARS hepatic levels. (pc) paraquat control; (c) control; (pglu) paraquat glutamine; (gln) glutamine; (pglu) paraquat glucose; (glu) glucose. Each value is the mean \pm SEM of 5 animals. * P <0.001 significantly different from the paraquat control group (pc) and ** p<0.001 from control group (c).

Figure 5 – Effect of the L-glutamine administration on paraquat treated and control groups at TBARS renal levels. (pc) paraquat control; (c) control; (pglu) paraquat glutamine; (gln) glutamine; (pglu) paraquat glucose; (glu) glucose. Each value is the mean \pm SEM of 5 animals. * P <0.001 significantly different from all groups except the paraquat glucose group (pglu).

9.3 Lista de trabalhos apresentados em eventos

9.3 Lista de trabalhos apresentados em eventos

1. SAND, C.V.; SILVA, F.R.M.B.; VIEIRA, T.O.; WILHELM FILHO, D.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. L-glutamine improves plasma glutathione levels in an oxidative stress model mediated by paraquat. In: **SBBq**, 2005, Águas de Lindóia.
2. SAND, C.V.; SILVA, F.R.M.B.; VIEIRA, T.O.; WILHELM FILHO, D.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. The effect of L-glutamine on glutathione content of intestinal and hepatic tissues and its participation with branched chain amino acids on glucose dose-response curve. In: **Second Workshop on Comparative Aspects of Oxidative Stress in Biological Systems**, 2005, México.
3. SAND, C.V.; SILVA, F.R.M.B.; VIEIRA, T.O.; WILHELM FILHO, D.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Effect of L-glutamine and branched chain amino acids in hyperglycemia: glucose dose-response curve and tissues glutathione content. In: **I Simpósio de Investigação em Ciências Biológicas-UFSC**, 2004, Florianópolis.
4. SAND, C.V.; SILVA, F.R.M.B.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. L-glutamina e aminoácidos ramificados na hiperglicemia: efeito na curva de dose resposta à glicose e no conteúdo de glutathione tecidual. In: **FeSBE**, 2004, Águas de Lindóia.