

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

GILMARA PANDOLFO ZABOT

**A AÇÃO ANTIOXIDANTE DA GLUTAMINA NO TECIDO INTESTINAL E
PULMONAR DE RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO
MESENTÉRICA**

Porto Alegre

2014

GILMARA PANDOLFO ZABOT

**A AÇÃO ANTIOXIDANTE DA GLUTAMINA NO TECIDO INTESTINAL E
PULMONAR DE RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO
MESENTÉRICA**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do Grau de Mestre pelo Programa de
Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde
da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande
do Sul.

Orientador:

Prof. Dr. Gustavo Franco Carvalhal

Porto Alegre

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Z12a Zabet, Gilmara Pandolfo

A ação antioxidante da glutamina no tecido intestinal e pulmonar de ratos submetidos à isquemia e reperfusão mesentéricas / Gilmara Pandolfo Zabet. – Porto Alegre, 2014.

75 f. : il. Graf.

Diss. (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde) – Área de Concentração em Clínica Cirúrgica - Faculdade de Medicina, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Franco Carvalhal.

1. Isquemia. 2. Reperfusão. 3. Glutamina. 4. Lipoperoxidação.
5. Superóxido Dismutase. 6. Mucosa Intestinal/lesões. 7. Pulmão.
8. Ratos Wistar. I. Carvalhal, Gustavo Franco. II. Título.

CDD 616.07

NLM QZ 170

**Ficha Catalográfica elaborada por
Vanessa Pinent
CRB 10/1297**

*Aos meus pais, que sempre acreditaram nos meus sonhos.
A vocês devo tudo o que sou e que conquistei.
Obrigada por ensinar-me a lutar e persistir sempre. Esta conquista, mais do que
minha, é de vocês.*

*Ao meu marido que teve paciência nos meus momentos difíceis, em que eu não
tinha tempo para dar atenção.
Obrigada por participar das minhas
escolhas, das minhas conquistas e por me apoiar nos momentos difíceis.*

*Aos meus filhos, por compreenderem que nem sempre eu poderia estar presente
nas suas atividades. Pelas ausências frequentes.
Obrigada pelo carinho e afeto nos momentos de dificuldade.*

Amo vocês.

Ao Prof. Dr. Gustavo Franco Carvalhal, que aceitou ser o meu orientador e sempre esteve disposto a me ajudar. Obrigada pelo estímulo, apoio e confiança constantes.

Ao Prof. Dr. Henrique Sarubbi Fillmann, que, desde o início, me apoiou na minha decisão de realizar o mestrado. Foi o mentor do meu objeto de estudo, além de ser meu amigo, professor e, acima de tudo, meu mestre. Tens toda a minha admiração.

*Ao Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva, que nunca se negou a me ajudar, tendo paciência de me ensinar algo que eu não dominava.
Obrigada por tudo.*

AGRADECIMENTOS

À **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**, em especial ao **Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde**, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado e pela infraestrutura. Obrigada por ter, ao longo do curso, disponibilizado uma bolsa de estudos.

Ao **Corpo Docente** do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Seus ensinamentos foram um acréscimo inestimável à minha formação.

Ao meu colega **Sergio Albuquerque Frederes**, que me incentivou à realização do mestrado.

Ao funcionário Gilmar, do Biotério, que sempre esteve disponível e prestativo a ajudar no que era preciso.

Ao **Tiago Giulianni**, técnico em histologia, por todo apoio nos procedimentos histológicos.

Ao Rodrigo Bonfanti Erthal, técnico em informática, que teve atuação decisiva nas áreas em que não dominava.

A todos os meus **amigos** que, de alguma forma, alguns talvez até mesmo sem saber, colaboraram para mais esta conquista na minha vida e compreenderam as minhas ausências.

Aos meus **colegas da COLOPROCTO**, que acompanharam principalmente a etapa final deste trabalho, sempre me apoiando e estimulando.

Aos **colegas do curso de Mestrado e Doutorado** que cruzaram por mim nesta jornada e tornaram-se cúmplices e amigos nestes dois anos de estudos.

LISTA DE SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
ALI	Lesão pulmonar aguda
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifostato
COX	Cicloxygenase
DAO	Diamina oxidase
EAO	Espécies ativas de oxigênio
EDRF	Fator de relaxamento derivado do endotélio
FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde – RS
FNT- α	Fator de necrose tumoral alfa
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HSL	Hospital São Lucas
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular-1
IFN-gama	Interferon gama
I κ B	Inibidores kappa beta
IKKS	Complexo inibidores kappa beta
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
i-NOS	Óxido nítrico sintetase
I/R	Isquemia-reperfusão
KCl	Cloreto de potássio
LOX	Lipoxigenase
LT	Leucotrienos
MAPKs	Proteínas kinases ativadas por mitógenos
MOF	Multiple organ failure
MPO	Mieloperoxidase
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase
NEMO	NF- κ B <i>essential modulator</i>
NF- κ B	Fator nuclear kappa beta
NO	Óxido nítrico

OH	Hidroxila
PA-1	Proteína ativadora-1
PG	Prostaglandina
PGI ₂	Prostaciclina
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
ROS	Radicais livres de oxigênio
SARA	Síndrome da angústia respiratória do adulto
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substância reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TIFF	True Image Format File
TX	Tromboxane
VCAM-1	Molécula de adesão da célula vascular-1
XO	Xantina oxidase
XDH	Xantina desidrogenase

LISTA DE SÍMBOLOS

%	percentagem
&	e
α	alfa
γ	gama
κ	kappa
°C	graus celsius
E.P.	erro padrão
GHz	giga hertz
h	hora
mg	miligramas
mg/kg	miligramas/quilogramas
ml	mililitros
mg/mL	miligramas/mililitros
mM	milimol
nm	namômetro
nmol	nanomolar
nmoles/mg	número de moles/miligrama
rpm	rotações por minuto
μ L.	microlitros
U	unidade
USOD/mg	unidade de SOD/miligrama
pH	potencial do hidrogênio
MB	megabites
X	vezes
μ m	micrômetro
mm ²	milímetro ao quadrado
cm	centímetro
=	igual
β	beta
n.º	número
<	menor

RESUMO

Objetivos: O objetivo principal do presente estudo foi avaliar a ação antioxidante da glutamina no tecido intestinal e pulmonar de ratos submetidos à isquemia e reperfusão (I/R) mesentérica. Os objetivos secundários foram: avaliar o estresse oxidativo e atividade inflamatória pela análise da lipoperoxidação; avaliar a atividade de uma enzima antioxidante, a superóxido dismutase (SOD); determinar o papel do Fator de Transcrição Nuclear Kappa B (NF-KB); e da interleucina 6 (IL-6).

Material e Métodos: Ratos machos da raça Wistar foram mantidos em caixas plásticas, em ciclo de 12 horas claro/escuro, com água e ração administradas *ad libitum*. Foram utilizados Vinte ratos divididos, de forma randomizada, em quatro grupos experimentais: (1) grupo controle (Controle) – os ratos foram submetidos à laparotomia exploradora; (2) grupo controle + glutamina (Controle-GLU) – os ratos foram submetidos à laparotomia e tratados, por via intraperitoneal, com glutamina 24h e 48h antes da cirurgia; (3) grupo isquemia/reperfusão (I/R) – os ratos foram submetidos a oclusão da artéria mesentérica superior, durante 30 min seguido por 15 min de reperfusão; e (4) grupo isquemia/reperfusão + glutamina (G + I/R) - os ratos foram tratados, por via intraperitoneal, com glutamina 24h e 48h antes da I/R. As lesões locais e sistêmicas foram determinadas por meio da avaliação dos segmentos intestinais e pulmonares para o estresse oxidativo, através da lipoperoxidação e da atividade da enzima SOD, a interleucina IL-6 e o NF-KB após a I/R mesentérica.

Resultados: A lipoperoxidação da membrana foi mais expressiva no grupo de animais submetidos à I/R ($p < 0.05$). Entretanto, o grupo que recebeu a glutamina 24h e 48h antes do evento I/R, mostrou níveis de lipoperoxidação da membrana, de forma similar aos grupos controles ($p < 0.05$). A atividade da enzima antioxidante SOD estava diminuída no intestino dos animais submetidos à I/R, quando comparada a encontrada nos grupos controles sem a I/R ($p < 0.05$). Por outro lado, o grupo que recebeu a glutamina 24h e 48h antes da I/R, mostrou a atividade da SOD de forma similar a encontrada nos controles (com e sem a glutamina) ($p < 0.05$). A média da área, dosada através do método de imunistoquímica, de expressão do NF-KB para os grupos controles, foi similar. O grupo submetido à I/R mostrou a maior área de concentração do NF-KB. O grupo G + I/R foi o que teve a segunda maior área, porém com valores menores do que os encontrados no grupo do evento

I/R ($p < 0.05$). Para a IL-6, os grupos controles, com e sem a glutamina, mostraram áreas similares. O grupo da I/R apresentou a maior área de expressão da IL-6, seguido pelo grupo G + I/R; porém, esta área foi significativamente menor do que a do grupo submetido à I/R sem a glutamina ($p < 0.05$).

Conclusões: Estes resultados demonstram que, o pré-tratamento com glutamina, previne a lesão da mucosa do intestino e dos pulmões, após I/R mesentérica em ratos.

Palavras-chave: Isquemia-reperfusão. Glutamina. Lipoperoxidação. Superóxido dismutase. Fator nuclear kappa beta. Interleucina 6. Intestino.

ABSTRACT

Aims: The aim of the present study was to evaluate possible preventative effects of glutamine in an animal model of gut ischemia/reperfusion (I/R).

Materials and methods: Twenty male Wistar rats were divided into four experimental groups: (1) control group (Control) – rats underwent exploratory laparotomy; (2) control + glutamine group (Control-GLU) – rats were subjected to laparotomy and treated intraperitoneally with glutamine 24 and 48 h prior to surgery; (3) ischemia/reperfusion group (I/R) – rats were subjected to occlusion of the superior mesenteric artery for 30 min followed by 15 min of reperfusion; and (4) ischemia/reperfusion + glutamine group (G+I/R) – rats were treated intraperitoneally with glutamine 24 and 48 h before I/R. Local and systemic injuries were determined by evaluating intestinal and lung segments for oxidative stress using lipid peroxidation and the activity of superoxide dismutase (SOD), interleukin-6 (IL-6) and nuclear factor kappa beta (NF- κ B) after mesenteric I/R.

Results: The animals from the G+I/R group exhibited reduced levels of lipid peroxidation, IL-6 and NF- κ B and increased SOD activity when compared with the group of rats submitted to I/R without GLU. The findings were statistically significant ($p < 0.05$).

Conclusions: These results demonstrate that pretreatment with glutamine prevents mucosal injury and improves gut and lung recovery after I/R injury in rats.

Keywords: Ischemia-reperfusion. Glutamine. Lipid peroxidation. Superoxide dismutase. Nuclear Factor-kappa beta. Interleukin 6. Intestine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: TBARS Intestino	37
Figura 2: TBARS Pulmão	37
Figura 3: SOD Intestino	38
Figura 4: SOD Pulmão	39
Figura 5: NF-KB Intestino	39
Figura 6: NF-KB Pulmão	40
Figura 7: IL-6 Intestino	40
Figura 8: IL-6 Pulmão	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 MECANISMOS DA LESÃO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO PARADOXOS DO CÁLCIO E DO OXIGÊNIO	16
1.2 RADICAIS LIVRES	17
1.3 LESÃO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL	18
1.4 LESÃO DE REPERFUSÃO MEDIADA POR NEUTRÓFILOS	19
1.5 INFLAMAÇÃO, TROMBOSE E FATORES DE CRESCIMENTO	20
1.5.1 Lesão de órgãos a distância: pulmões	21
1.6 GLUTAMINA	22
1.7 GLUTAMINA E ESTRESSE OXIDATIVO	23
1.8 FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR KAPPA BETA (NF-KB)	24
1.9 ESTRESSE OXIDATIVO E O FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR	26
2 JUSTIFICATIVA	27
3 HIPÓTESES	28
4 OBJETIVOS	29
4.1 OBJETIVO PRIMÁRIO	29
4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	29
5 MATERIAL E MÉTODOS	30
5.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA	30
5.2 ANIMAIS	30
5.3 GRUPOS DE TRATAMENTO	30
5.4 GLUTAMINA	30
5.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	31
5.6 DETERMINAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO	31
5.6.1 Preparação do homogeneizado fresco	31
5.6.2 Proteínas	31
5.6.3 Avaliação da lipoperoxidação	32
5.6.3.1 Substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	32
5.7 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)	32
5.8 AVALIAÇÃO DO NF-KAPPA B E DA INTERLEUCINA 6	33
5.9 ANÁLISE DIGITAL DAS IMAGENS	34

5.10 MORTE DOS ANIMAIS	34
5.11 TAMANHO DA AMOSTRA	35
5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
6 ÉTICA	36
7 RESULTADOS	37
7.1 ESTRESSE OXIDATIVO – LIPOPEROXIDAÇÃO – TBARS	37
7.2 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)	38
7.3 FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR KAPPA B	39
7.4 INTERLEUCINA 6 (IL-6)	40
8 DISCUSSÃO	42
9 CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS	47
APÊNDICE	54
APÊNDICE A – Artigo	54
ANEXOS	72
ANEXO A – Comprovante de submissão de artigo	73
ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	74

1 INTRODUÇÃO

É frequente na prática médica a ocorrência de estados isquêmicos, como oclusões arteriais, transplantes, isquemia mesentérica e choque, os quais acometem número crescente de indivíduos de variadas faixas etárias e determinam alta morbimortalidade. Entretanto, a lesão de reperfusão, diferentemente da lesão isquêmica, é capaz de produzir alteração sistêmica, e não apenas nos locais acometidos pelo fenômeno, de modo que o restabelecimento do fluxo sanguíneo para uma área isquêmica pode ocasionar lesão em todo organismo. A injúria de órgãos à distância é chamada de “falência de múltiplos órgãos pós-trauma” ou *Multiple Organ Failure* (MOF).¹

A isquemia intestinal geralmente resulta da oclusão do tronco celíaco e / ou da artéria mesentérica superior por trombos ou êmbolos e, menos frequentemente, a partir de processos não-oclusivos, tal como no caso de uma diminuição do fluxo de sangue mesentérico que ocorre na insuficiência cardíaca e sepses.² A isquemia seguida de reperfusão é a base para o aparecimento de MOF e o intestino é o órgão desencadeador de todo o processo de lesão em órgãos distantes.⁴ A partir das substâncias pró-inflamatórias liberadas pelo intestino na circulação linfática é iniciada a reação inflamatória sistêmica que afetará principalmente os pulmões, fígado e rins.^{2 5}

O tronco celíaco e a artéria mesentérica superior são responsáveis por aproximadamente 95% do fluxo sanguíneo para o pâncreas, fígado e intestino. A oclusão completa e definitiva destes vasos acarreta choque circulatório, aumento da permeabilidade vascular, ativação de leucócitos, liberação de substâncias pró-inflamatórias, formação de espécies ativas de oxigênio e de nitrogênio. A lesão da mucosa provoca translocação bacteriana e ativação de uma intensa resposta inflamatória no intestino.⁶

Apesar de todos os detalhes moleculares do mecanismo de ação que determinam as lesões nos eventos isquêmicos ainda não estarem bem definidos, sabe-se que as espécies reativas de oxigênio representam um importante papel na patogênese da lesão intestinal após um evento de isquemia-reperfusão (I/R).⁷ Quando o fluxo de oxigênio é restabelecido ao tecido isquêmico, a lesão tecidual é exacerbada. Parks & Granger relataram que a lesão tecidual durante a reperfusão,

em geral, é maior do que a provocada pela isquemia, ocasionando extravasamento microvascular, necrose celular e apoptose.⁸ Há ruptura da barreira mucosa, translocação bacteriana e ativação da cascata inflamatória, além do desequilíbrio ácido-base e hidroeletrólítico. O superóxido e o peróxido de hidrogênio são considerados os principais radicais livres a contribuir com a lesão por I/R. Eles desempenham um papel importante nos mecanismos patofisiológicos das lesões intestinais por I/R. Por isso a importância dos agentes antioxidantes no tratamento e prevenção desta entidade.⁹

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima antioxidante altamente específica para a remoção do superóxido, prevenindo, com isto, a lesão intestinal causada pela I/R.¹⁰

Com o restabelecimento do fluxo sanguíneo para o segmento intestinal isquêmico, há um influxo de cálcio para o interior da célula, levando a um aumento da atividade da fosfolipase A₂. A consequência disto é a secreção de ácido aracônico que é metabolizado pela enzima cicloxigenase (COX), gerando prostaglandina (PG), tromboxane (TX) e prostaciclina (PGI₂), e pela enzima lipoxigenase (LOX), com a produção de leucotrienos (LT). Estas substâncias, por sua vez, promovem vasoconstrição, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, favorecendo a agregação plaquetária e a quimiotaxia de polimorfonucleares.¹¹

O fenômeno inicial na I/R é a lesão endotelial que é considerado o “gatilho” para a reperfusão da área danificada. Ocorre edema intersticial, além do rompimento estrutural e funcional da mucosa. Por muito tempo, o intestino foi considerado o “motor” do processo. Inicialmente, há a aderência e o rolamento de células polimorfonucleares com consequente migração transendotelial.¹² A ativação dos neutrófilos no sítio da lesão resulta numa larga produção de radicais livres de oxigênio, que, por sua vez, irão contribuir para o dano em órgãos à distância. A I/R resulta em alterações na estrutura e função da mucosa intestinal, favorecendo a translocação bacteriana.¹³

A I/R intestinal é uma condição clínica comum em várias situações como transplantes de intestino delgado, choque hipovolêmico, trauma, torções ou encarceramentos de segmentos intestinais. A lesão tecidual causada pela restauração do fluxo sanguíneo para o segmento isquêmico é, por vezes, maior que a causada pelo evento isquêmico propriamente dito. A I/R intestinal causa dano no

segmento afetado caracterizado histologicamente com lesão da mucosa, alteração de integridade da barreira mucosa com perda parcial ou total da sua função. Tendo em vista que o trato gastrointestinal é altamente sensível às lesões por I/R, o dano da I/R mesentérica causa uma taxa considerável de morbidade e mortalidade.¹⁴

Associado a alterações de estrutura de barreira trans-membrana, as mitocôndrias são alvos importantes do dano provocado pelos processos de I/R. Nelas ocorrem diminuição das atividades da nicotinamida adenina dinucleotídeo ligada com hidrogênio (NADH) desidrogenase, do carreador de adenosina difosfato/adenosina trifosfato (ADP/ATP) e da ATP sintetase, além do aumento na atividade da fosfolipase A₂. Ocorre ainda, acentuado acúmulo de cálcio e aumento da geração de radicais livres pelas mitocôndrias. A associação destes eventos pode ser responsável pelas lesões e morte celular, decorrentes da reperfusão, possivelmente por um fenômeno de transição de permeabilidade da membrana mitocondrial interna.¹⁵

1.1 MECANISMOS DA LESÃO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO: PARADOXOS DO CÁLCIO E DO OXIGÊNIO

A lesão de I/R, em um passado recente, foi relacionada, classicamente, a dois fenômenos: o paradoxo do cálcio e o paradoxo do oxigênio. O paradoxo do cálcio foi inicialmente observado após um período de perfusão de corações de ratos com uma solução que não continha este íon. Ao se reperfundir os corações, restaurando-se o cálcio, estes perdiam a contratilidade, resultando uma extensa lesão miocárdica. Os mecanismos do paradoxo do cálcio não são bem conhecidos, mas após a reperfusão há um maciço influxo de cálcio para dentro da célula, provavelmente por alteração da permeabilidade da membrana. A lesão de reperfusão é proporcional ao tempo de perfusão isenta de cálcio, mas já é evidente após três minutos. As lesões iniciais ocorrem na mitocôndria e no sarcolema com subsequente aparecimento de características bandas de contratura. O paradoxo do oxigênio foi constatado quando se observou que a reperfusão com solução oxigenada, após período de hipóxia miocárdica, resultou em significativa lesão maior do que a recuperação, com contratura, sobrecarga de cálcio e necrose celular. A reoxigenação causa lesão do sarcolema, da membrana basal, desorganização mitocondrial e outras alterações tissulares, indicando que a reintrodução do oxigênio inicia um rápido e grave

processo de lesão celular. Consideráveis informações têm sido acumuladas mostrando que este efeito paradoxal da reoxigenação se deva às ações de radicais livres do oxigênio. O papel central destes radicais na lesão de reperfusão tem sido demonstrado por vários investigadores.^{16 17}

1.2 RADICAIS LIVRES

Outro fator que induz lesão intestinal após reperfusão é a geração de radicais livres oriundos de moléculas de oxigênio (ROS), derivados do transporte de elétrons pela mitocôndria, metabolismo da xantina oxidase (XO), células endoteliais, prostaglandinas e neutrófilos ativados. Radicais livres são espécies que apresentam elétrons desemparelhados e, portanto, são altamente reativos.¹⁸

Em situações normais, estes radicais são neutralizados por enzimas antioxidantes endógenas, porém durante a reperfusão há uma concentração excessiva destas espécies, levando a um quadro chamado de estresse oxidativo, com efeito deletério. O ROS se origina quando o O_2 é reintroduzido ao tecido isquêmico durante a reperfusão.¹⁹

Durante a isquemia há um acúmulo de cálcio intracelular, levando à conversão da xantina desidrogenase (XDH) em xantina oxidase. Na reperfusão, o O_2 é reintroduzido aos tecidos, reagindo com a XO, produzindo, com isso, o ânion superóxido (O_2^-), que é transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da enzima SOD e através de uma reação com catalase ou glutadiona peroxidase, H_2O_2 é transformada em H_2O . Na presença de ferro, o superóxido e o H_2O_2 , através da reação de Haber-Weiss e Fenton, formam radical hidroxila (OH), que são altamente reativos e citotóxicos. Este, por sua vez, inicia a lipoperoxidação dos componentes da membrana celular, permitindo a aderência de granulócitos ao endotélio microvascular. Íons de superóxido reagem com óxido nítrico (NO), produzindo peroxinitrito, que, por sua vez, causa acentuada lipoperoxidação, além de modificações protéicas e do DNA, resultando em dano celular. Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação do ROS, porém a membrana é uma das mais afetadas.²⁰

Os radicais livres são lesivos em razão de uma variedade de mecanismos: 1) peroxidação dos ácidos graxos das membranas celulares; 2) oxidação de grupos sulfidríla inativando uma variedade de enzimas; 3) alterações do DNA inibindo a

síntese de ATP e consumindo as reservas de dinucleotídeos adenínicos da nicotinamida; 4) direta inativação do NO comprometendo os relaxamentos vasculares dependentes do endotélio; 5) formação de peroxinitrito, um ânion instável e tóxico, reagindo com o NO; e 6) ativação de citocinas como a interleucina-1. Dentro da luz de vasos reperfundidos, os ânions superóxidos estimulam a agregação plaquetária e iniciam a liberação de variados fatores vasoconstritores, incluindo o ADP, a serotonina e o tromboxane A_2 .^{21 22}

1.3 LESÃO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

O endotélio é o tecido mais vulnerável à reperfusão e exibe disfunção mesmo antes da musculatura lisa vascular. Sabe-se que o comprometimento da liberação do fator de relaxamento derivado de endotélio/óxido nítrico (EDRF/NO), em particular devido à agregação plaquetária, ocorre precoce e tardiamente após isquemia regional e reperfusão. Mesmo artérias reperfundidas com endotélio exibem hipercontratibilidade a plaquetas agregadas. Isto ocorre ao mesmo tempo em que a função da musculatura lisa vascular (habilidade de contrair ou relaxar) mantém-se inalterada. A disfunção endotelial também ocorre durante isquemia global e reperfusão com alteração do fluxo coronariano dependente do endotélio e diminuição da produção de prostaciclina após reperfusão. Estudos histológicos demonstram lesão endotelial como consequência de isquemia e reperfusão. Lesão endotelial e comprometimento da liberação de EDRF e prostaciclina podem levar a aumento da adesividade e agregação plaquetárias, superpostas à ação direta de vasoconstritores liberados pelas plaquetas na musculatura lisa vascular com consequente vasoespasmo. Existe *in vivo* uma correlação direta entre vasoconstrição local e a quantidade de plaquetas depositadas na artéria lesada por trauma. É também possível que a vasoconstrição dependente do endotélio, que ocorre após reperfusão, possa contribuir para o aumento do tono vascular observado após o choque. Após isquemia regional e reperfusão, precoce e tardiamente, o endotélio apresenta vasoconstrição hipóxica. Contração dependente do endotélio potenciada pela hipóxia também é observada em um período precoce após isquemia global e reperfusão. Um aumento da produção de fatores constritores dependentes do endotélio ocorre também após lesão traumática da camada íntima vascular. O provável mediador desta atividade vascular exacerbada é o ânion

superóxido produzido pelo endotélio. O conceito de que mecanismos vasculares locais podem induzir e manter a vasoconstrição é perfeitamente claro em casos descritos de vasoespasmos presentes em corações transplantados totalmente denervados.^{23 24}

1.4 LESÃO DE REPERFUSÃO MEDIADA POR NEUTRÓFILOS

O neutrófilo tem sido implicado como um mediador central da lesão tissular em, virtualmente, todo sistema orgânico susceptível à lesão de reperfusão. Certamente, esta célula sanguínea participa de uma série de mecanismos que são capazes de causar grave destruição tissular. No entanto, tem sido muito difícil demonstrar um papel causal direto para o neutrófilo na lesão de reperfusão. É possível que neutrófilos ativados estejam presentes em tecidos reperfundidos, como uma resposta celular, normal e inespecífica, causada pelos variados tipos de lesão endotelial.

A sequência de migração dos leucócitos inclui o posicionamento na periferia do vaso, o rolamento ao longo do endotélio e, finalmente, a aderência antes da transmigração. A captura do neutrófilo ativado nos pulmões, assim como em outros órgãos, é um passo importante ao surgimento da MOF. No endotélio vascular normal do intestino do rato, há a expressão da molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) e molécula de adesão da célula vascular-1 (VCAM-1). Na resposta à I/R, eles são superexpressos nas células endoteliais vasculares, tecido conjuntivo, lâmina própria e células inflamatórias. Esta superexpressão acentua a adesão leucocitária e promove a sua migração ao intestino lesado durante a I/R.^{25 26}

Os neutrófilos ativados secretam uma variedade de enzimas como a mieloperoxidase (MPO) e a elastase, que podem lesar o parênquima celular, assim como os microvasos. O aumento da MPO pode ser atenuado pelo uso de antioxidantes. Em condições normais, estes radicais são neutralizados por enzimas antioxidantes como a SOD. O estresse oxidativo ocorre quando a produção de oxidantes excede a capacidade do sistema de defesa celular antioxidante ou quando há uma diminuição da eficácia do sistema.

Existem evidências experimentais de que a ação dos neutrófilos não seja uma condição *sine qua non* para a lesão de reperfusão, uma vez que em períodos curtos de reperfusão (20 minutos ou menos), quando já existe disfunção endotelial, não se

observa nenhum acúmulo de neutrófilos ou lesão endotelial. Acresça-se o fato que a lesão de reperfusão foi comprovada em corações isolados perfundidos com soluções tampões cristalóides livres de qualquer elemento sanguíneo. Embora um papel central dos neutrófilos na lesão de reperfusão seja questionado, é importante reconhecer a sua significativa contribuição para a patogênese deste processo. Uma vez ligados à superfície endotelial, os neutrófilos aceleram a disfunção destas células e destruição tissular através de uma variedade de mecanismos citotóxicos. Além disso, ocluindo capilares e pequenas arteríolas, os neutrófilos ativados liberam uma série de substâncias incluindo: radicais livres do oxigênio, enzimas citotóxicas e citocinas. Muitas destas substâncias também recrutam leucócitos adicionais e aumentam a sua adesividade ao endotélio vascular. Estes eventos não são restritos à superfície endotelial. Com o agravamento da lesão, os neutrófilos infiltram os tecidos nos quais enzimas e radicais do oxigênio podem causar lesão tecidual.²⁷

1.5 INFLAMAÇÃO, TROMBOSE E FATORES DE CRESCIMENTO

Estes são processos biológicos que podem influenciar o processo de I/R. O endotélio pode regular a localização de linfócitos e monócitos dentro dos vasos sanguíneos através de variados mecanismos demonstrados laboratorialmente: VCAM-1, proteínas quimiotáticas em resposta a estresses metabólicos, além de citocinas inflamatórias (FNT α , IL-1, IFN-gama). Assim, o endotélio pode ser o ponto focal do início e propagação de respostas inflamatórias. A atividade clínica da doença isquêmica coronariana pode estar relacionada com a autoperpetuação da natureza da resposta inflamatória orquestrada pelo endotélio. Além disso, o endotélio pode se tornar pró-trombogênico ou menos antitrombogênico quando exposto a mecanismos inflamatórios e pelo comprometimento da liberação de prostaciclina, NO e fator tissular ativador do plasminogênio.²⁸

A XO é a maior fonte de geração de oxidantes durante a lesão por I/R. O intestino pode gerar elevadas concentrações de oxidantes durante estados de I/R.²⁹

O NO é sintetizado pela L-arginina e pelas enzimas conhecidas como NO sintetase (i-NOS). Ele encontra-se aumentado durante períodos isquêmicos e diminuído nos estados de reperfusão.²⁴

Tecidos isquêmicos e reperfundidos ativam a família das proteínas quinases que converge o fator nuclear-KB (NF-KB), regulador da expressão de gens

proinflamatórios. O resultado é o surgimento de enzimas (iNOS, fosfolipase A₂, ciclooxigenase), citocinas (FNT- α , IL-1, IL-6) e moléculas de adesão (ICAM-1).³⁰

O NF-KB é mantido na sua forma latente no citoplasma da célula, a partir de estímulos pró-inflamatórios, como sepse, citocinas e estresse oxidativo, e é transportado para o interior do núcleo. Ele coordena a expressão de muitos gens que codificam proteínas envolvidas na síntese e manutenção da resposta inflamatória.³¹

O FNT- α e a IL-6 apresentam níveis elevados em estados de I/R, assim como na MOF. As medidas dos níveis destas endotoxinas plasmáticas são importantes para avaliar os efeitos sistêmicos da I/R intestinal. Os radicais livres de oxigênio (ROS) promovem estresse oxidativo como consequência da produção de citocinas inflamatórias, como o FNT- α e a IL-6, além de promoverem a ativação dos neutrófilos. Os mediadores pró-inflamatórios FNT- α e a IL-6 não apenas induzem diretamente o dano tecidual como também são potentes ativadores dos neutrófilos. Estes, assim como os seus produtos enzimáticos, quando sequestrados no tecido intestinal, causam aumento da permeabilidade microvascular, edema intersticial e perivascular e também lesão a órgãos à distância como edema pulmonar.³²

1.5.1 Lesão a órgãos a distância: pulmões

O dano celular epitelial da mucosa e a apoptose levam à perda da integridade da barreira mucosa, promovendo a translocação bacteriana e a produção de citocinas. A seguir, há a transmissão de mediadores inflamatórios pelo sistema linfático intestinal.³³ O pulmão é o primeiro órgão exposto.

A ligadura do ducto linfático, após a ressuscitação do choque hemorrágico, previne a lesão à distância: é a chamada hipótese linfática intestinal.³⁴ A ligadura do ducto linfático torácico/mesentérico, antes da I/R, protege o pulmão da lesão, além de modular os níveis de endotoxina, D-lactato, diamina oxidase (DAO) e citocinas. A MOF provoca lesão pulmonar aguda (ALI) através da produção de mediadores inflamatórios drenados pelo sistema circulatório. O trato gastrointestinal contém o maior sistema linfático do organismo. Os mediadores liberados pelas células inflamatórias ativadas, durante o evento agudo, são enviados ao interstício que drena predominantemente pelos linfáticos. A ALI é o evento patofisiológico central

no desenvolvimento da Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto (SARA) após trauma grave e/ou cirurgia de revascularização.^{35 36}

1.6 GLUTAMINA

Inúmeras substâncias vêm sendo utilizadas no tratamento e/ou na prevenção de colites experimentais. Os experimentos visam à avaliação de novas drogas sobre o processo inflamatório ou associação de drogas para obtenção de melhores resultados.^{37 38} Para a prevenção, utilizam-se substâncias para inibir ou minimizar o processo inflamatório frente a agentes agressores. Uma das substâncias utilizadas é a glutamina, um aminoácido polar sem carga³⁹.

A glutamina é um aminoácido não essencial ou ocasionalmente essencial, em estados catabólicos, hidrofílico encontrado na superfície das proteínas onde interage com a água. É o aminoácido mais abundante encontrado no sangue periférico. Esta substância foi inicialmente utilizada de forma profilática em pacientes a serem submetidos à radioterapia, nos quais se observou uma diminuição da incidência e da gravidade da enterite actínica.⁴⁰ Observou-se também que a glutamina apresenta um papel fundamental na defesa imunológica da barreira mucosa do intestino através da sua participação na formação de imunoglobulinas, especialmente IgA.⁴¹ Foi demonstrado que a glutamina diminui os efeitos inflamatórios da enterocolite induzida por metotrexato e que diminui a translocação bacteriana em animais com sepse abdominal.⁴² Este aminoácido age sobre a atividade dos macrófagos interferindo na fagocitose em sítios inflamatórios.⁴³

Além de efeitos protetores diretos como os citados acima, a glutamina tem uma importante função em processos inflamatórios intestinais atuando sobre os radicais livres de oxigênio.⁴⁴ Israeli e cols., em estudo publicado em 2004, demonstraram que a glutamina, na presença de inflamação, aumenta o fluxo de glutathione no fígado e no trato gastrointestinal.⁴⁵ É o ingrediente respiratório de muitas células, principalmente dos enterócitos do intestino delgado, participando da divisão celular, assim como da síntese de nucleotídeo, além da propriedade antioxidante através do metabolismo da glutathione, uma vez que é o precursor do glutamato.⁴⁶ Pode atenuar a liberação de interleucinas dependentes do fator de transcrição nuclear NF-KB, reduzindo, com isso, a lesão a órgãos à distância.

O mecanismo pelo qual a glutamina exerce os efeitos benéficos parece estar correlacionado à biossíntese da glutathione, causando uma consequente diminuição da lipoperoxidação da membrana durante a I/R intestinal.⁴⁷

1.7 GLUTAMINA E ESTRESSE OXIDATIVO

A glutamina é um aminoácido multifuncional usado para a síntese hepática de uréia, amoniogênese renal, gliconeogênese e como o principal combustível respiratório para muitas células. Concentrações baixas de glutamina são encontradas durante estresse catabólico e estão associadas à suscetibilidade a infecções.⁴⁸ A glutamina não é somente uma importante fonte de energia para a mitocôndria, mas é também a precursora do neurotransmissor cerebral glutamato. Este, por sua vez, é utilizado na síntese do antioxidante glutathione. A glutamina é, portanto, vital na regulação do equilíbrio oxidativo intracelular.⁴⁹

A glutamina é mais extensamente investigada na sua relação com o estresse oxidativo no exercício físico. Rogero, em 2003, demonstrou que no exercício físico exaustivo ocorre uma diminuição importante da glutamina plasmática.⁵⁰ Esta diminuição é acompanhada de um aumento significativo da atividade inflamatória e dos níveis de estresse oxidativo medido através da taxa de lipoperoxidação. Observou-se uma relação linear entre a diminuição da glutamina plasmática e o aumento da leucocitose em indivíduos submetidos a exercícios intensos e exaustivos. As medidas de lipoperoxidação pela técnica de quimiluminescência no músculo de animais submetidos a exercícios físicos diários mostraram valores superiores aos de grupos tratados previamente com glutamina. A glutamina é requerida para síntese de glutathione, visto que é metabolizada no ciclo γ -glutamil para produção de glutathione. A glutathione é produzida a partir de glutamato, glicina e cisteína.⁴⁸ A glutathione está presente nas células tanto na forma oxidada quanto na forma reduzida. A adição de glutamina em células *in vitro* pode conduzir a um aumento na concentração de glutathione total.

A glutamina tem sido utilizada como suplemento nutricional em pacientes gravemente debilitados com o intuito de diminuir o efeito deletério do estresse oxidativo no seu prognóstico.²⁰ Já foi bem demonstrado que a prevenção do estresse oxidativo em pacientes graves, politraumatizados ou submetidos a grandes cirurgias é benéfico como adjuvante na terapia específica de cada paciente.²³ A

terapia antioxidante melhora o prognóstico e diminui o índice global de complicações em pacientes graves.⁴⁴

He et al.³⁶ descreveram a preservação da ALI através da ligadura do ducto linfático mesentérico e utilização da glutamina, de forma enteral, em animais submetidos à I/R. Pacientes politraumatizados, assim como aqueles submetidos a grandes cirurgias, frequentemente apresentam perdas sanguíneas expressivas, levando a um baixo fluxo mesentérico, com consequente isquemia intestinal. Após a ressuscitação volêmica, há a reperfusão do tecido isquêmico, acompanhada da lipoperoxidação da membrana, ativação do NF-KB, com liberação de citocinas inflamatórias e ROS que entram na corrente circulatória e, através do ducto linfático mesentérico, provocam ALI, observada clinicamente através da SARA. Imunonutrientes como a glutamina controlam a resposta inflamatória e preservam a integridade mucosa, diminuindo, com isso, a translocação bacteriana.³⁶

Observações clínicas demonstram que pacientes que recebiam suplementação dietética de glutamina toleravam melhor as colites secundárias à radioterapia para neoplasias de próstata e colo do útero.⁴¹ A mesma substância foi então utilizada em pacientes portadores de Doença de Crohn (enterocolite granulomatosa) e retocolite ulcerativa. Nestes pacientes foi observada uma melhora do quadro clínico com diminuição da diarreia, aumento na taxa de cicatrização de fístulas e diminuição no uso de medicações.⁵¹

Uma vez que ficou demonstrada a importância das espécies ativas de oxigênio na gênese da colite, passou-se a procurar a relação entre o estresse oxidativo e o suposto efeito clínico benéfico da glutamina nas colites.⁵¹

1.8 FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR KAPPA BETA (NF-KB)

O fator nuclear *Kappa Beta* é um fator da transcrição que desempenha um importante e determinante papel, tanto em situações normais como na coordenação de respostas imunes adaptáveis, regulando a expressão de muitos mediadores celulares.⁵²

Este fator foi descrito primeiramente em 1986 por Sen e Baltimore como sendo capaz de ligar-se a sítios específicos *kappa* nas imunoglobulinas em células B.⁵³ É agora bem reconhecido que NF-KB está expresso na maioria dos tipos celulares sendo constituído por um dímero composto dos membros da família da

Rel. Haddad, em 2002, sugeriu que a ativação do NF-KB controla a balança oxidante/antioxidante.⁵⁴

A família do NF-KB/Rel compreende cinco subunidades, chamadas p50, p52, p65 (RelA), c-Rel, e RelB. Estas subunidades formam homodímeros e heterodímeros em várias combinações. Geralmente, o NF-KB consiste em dois polipeptídeos, um de 50 kDa (p50) e um de 65 kDa (p65). Em células em homeostase, o NF-KB se mantém no citoplasma em sua forma inativa associado com as proteínas inibidoras do sítio kB, chamadas de inibidores kB (IκB). Sete espécies de IκBs são descritas: IκBα, IκBβ, IκBγ, IκBε, Bcl-3, p100, e p105. O NF-κB pode ser ativado por uma variedade dos sinais relevantes à etiologia e à fisiopatologia inflamatória.⁵⁵

Para ativar o NF-KB são necessários estímulos intracelulares e ou extracelulares cujos ativadores podem ser: produtos bacterianos (endotoxinas, peptidoglicanos), vírus e componentes virais, protozoários, citocinas (FNT-α, interleucinas), radicais livres e ou oxidantes.⁵⁶

A ativação do NF-KB requer a fosforilação de seus inibidores fisiológicos (particularmente o IκBα) em resíduos específicos de Serina (Ser-32 e Ser-36). Esta fosforilação é mediada por um complexo protéico. O complexo kinase *kappa* B (IKKs) é composto de três subunidades, duas unidades catalíticas IKK-α, IKK-β, e uma unidade reguladora IKKγ (NF-KB *essential modulator*, NEMO). Após a fosforilação ocorre a subsequente degradação das IκBs através das ubiquitinas, formando um proteossoma 26S.⁵⁷ A degradação proteolítica dos IκBs permite a translocação do NF-KB ao núcleo, regulando a expressão de centenas de genes que são importantes à resposta imune inflamatória.⁵⁸

O mecanismo exato em que a glutamina suprime a ativação do NF-KB na inflamação, ainda é desconhecido. Há várias evidências que o FNT-α contribui para a propagação da extensão da I/R no intestino. A glutamina atenua a produção de FNT-α no plasma e no íleo em ratos submetidos à I/R. Mondello sugere que a inibição da produção de FNT-α pela glutamina pode ser uma consequência da ativação do NF-KB. O tratamento com glutamina não apenas diminui a expressão da aderência molecular no tecido ileal, após I/R em ratos, como também a infiltração de leucócitos, reduzindo o dano tecidual neste órgão. Ainda segundo Mondello, a glutamina diminui a formação de citocinas inflamatórias, a expressão de moléculas

de adesão (ICAM-1 e P-selectina), a degradação do I κ -B e a translocação nuclear do NF- κ B, além de diminuir o grau de apoptose celular.⁵⁹

1.9 ESTRESSE OXIDATIVO E O FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR

O mecanismo pelo qual as espécies ativas de oxigênio participam da resposta inflamatória é iniciado pelo aumento na produção de diversos marcadores inflamatórios oriundos das células de defesa. A síntese de inúmeras citocinas pró-inflamatórias depende de ativação do NF- κ B, a qual depende do potencial redox celular e conseqüentemente pode ser regulada pela relação de glutathiona. As espécies ativas de oxigênio (EAO) estimulam a ativação dos fatores de transcrição celular, como o NF- κ B e as proteínas kinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Com o aumento na produção de citocinas inflamatórias, fator de necrose tumoral alfa (FNT- α) e de diversas interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8) ocorre a resposta inflamatória sistêmica.¹⁸ O NF- κ B possui uma região ácida composta por 300 aminoácidos, conhecida como domínio homólogo Rel, com função de mediar a interação com os inibidores do NF- κ B. Especificamente, é composto por um complexo heterodímico denominado p50 e p65.⁶⁰ Diversos estímulos ativam o NF- κ B através da fosforilação e ativação do complexo I κ B kinase (IKK).

2 JUSTIFICATIVA

Este estudo foi elaborado com o intuito de contribuir para a elucidação dos mecanismos de ação da ocorrência de lesão por reperfusão intestinal em órgãos à distância, mais especificamente, os pulmões. E talvez, poder contribuir com o benefício do uso de um fator de proteção, para este evento, em processos de isquemia intestinal, transplante de intestino delgado e estado de choque circulatório.

Avaliar se a glutamina é capaz de prevenir o dano tecidual local, no intestino, e à distância, mais especificamente, nos pulmões, em situações de isquemia e reperfusão mesentérica.

Até o presente momento, não foram encontrados artigos, na literatura, que descrevam o papel da glutamina no estresse oxidativo do intestino e pulmão em animais submetidos à isquemia e reperfusão em ratos, caracterizando o ineditismo do projeto.

Neste viés, é relevante esclarecer que o ineditismo da pesquisa justifica a oportunidade, a necessidade e a urgência de desenvolver estudos como este, enfatizando, igualmente, sua importância científica.

3 HIPÓTESES

A glutamina é um fator de proteção no estresse oxidativo do intestino e pulmão em animais submetidos à isquemia e reperfusão mesentérica.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliar a ação antioxidante da glutamina no tecido intestinal e pulmonar de ratos submetidos à isquemia e reperfusão mesentérica.

4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Demonstrar o efeito local e sistêmico da isquemia/reperfusão mesentérica (Intestino, Pulmão):
 - Avaliar o estresse oxidativo e atividade inflamatória – Lipoperoxidação;
 - Avaliar a atividade de uma enzima antioxidante – Superóxido dismutase (SOD);
 - Determinar o papel do Fator de Transcrição Nuclear Kappa B; e
 - Determinar a função da Interleucina 6 na atividade inflamatória.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Trata-se de um estudo experimental controlado randomizado. Com este propósito, foi realizada a indução de isquemia intestinal em ratos através do clampeamento da artéria mesentérica superior. Os resultados foram comparados aos dos animais controle não submetidos ao clampeamento e também aos animais que receberam uma substância potencialmente protetora (glutamina).

5.2 ANIMAIS

Foram utilizados 20 ratos machos Wistar, com peso entre 250 e 350 gramas, provenientes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos neste local, durante o experimento, em caixas plásticas de 47x34x18cm forradas com maravalha, em ciclo de 12 horas claro/escuro e temperatura entre 20 e 25°C. A água e a ração são administradas *ad libitum*.

5.3 GRUPOS DE TRATAMENTO

Os animais foram distribuídos em quatro grupos de cinco, escolhidos de forma randomizada.

- Grupo 1: Clampeamento;
- Grupo 2: Controle;
- Grupo 3: Glutamina + Clampeamento; e
- Grupo 4: Glutamina.

5.4 GLUTAMINA

A glutamina foi administrada por via intraperitoneal, na dose 25 mg/kg, 48h e 24h antes do clampeamento, baseada em estudos prévios.^{61 62}

5.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de xilazina a 2% 50 mg/Kg de peso corporal e cloridrato de quetamina 100mg/Kg de peso corporal intraperitonealmente. Foi realizada uma tricotomia manual da região abdominal, seguida da intervenção cirúrgica, que iniciou com uma laparotomia mediana ventral e a exposição das alças intestinais. Durante o procedimento, elas foram mantidas cobertas por gazes embebidas em solução fisiológica a 0,9%. O tronco celíaco e a artéria mesentérica superior foram identificados e clampeados, na origem, com pinças vasculares hemostáticas, resultando numa oclusão completa por 30 min. Após este período, os clampes foram removidos, seguidos de uma reperfusão por 15 min antes da remoção dos órgãos.¹⁴

5.6 DETERMINAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

5.6.1 Preparação do Homogeneizado Fresco

Utilizou-se 9 ml de solução tampão fosfato (KCl 140mM) por grama de tecido (intestino e pulmão). O órgão é homogeneizado em Ultra-Turrax durante um minuto à temperatura de 2 graus Celsius. É então, centrifugado por 10 minutos a 3.000 rpm em centrífuga refrigerada. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante retirado e congelado no freezer a -70 graus Celsius para posterior utilização nas dosagens.

5.6.2 Proteínas

A concentração de proteínas no homogeneizado do intestino grosso distal foi determinada utilizando como padrão uma solução de albumina bovina 1mg/mL. Para a curva de concentração utilizada no cálculo foram utilizados volumes de 50, 100 e 150 μ L. Colocou-se uma alíquota do homogeneizado (20 μ L) em 780 μ L de água destilada e 2,0 mL do reativo C que foi preparado com 50 mL de NaHCO₃ (reativo A), adicionado com 0,5 mL do reativo B1 (CuSO₄. 5H₂O 1%) e 0,5mL do reativo B2 (tartarato de sódio e potássio 2%). Após a adição do reativo C, aguardou-se 10 minutos e colocou-se 0,2 mL de reativo de Folin-Ciocalteau diluído na proporção 1:3

em água destilada. Após 30 minutos aparece a coloração azulada que é então medida no espectrofotômetro a 625nm.⁶³

5.6.3 Avaliação da Lipoperoxidação

5.6.3.1 Substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A técnica de TBARS consiste no aquecimento do homogeneizado com ácido tiobarbitúrico e na consequente formação de um produto corado, medido em espectrofotômetro a 535 nm. O aparecimento da coloração ocorre devido à presença do malondialdeído e outras substâncias provenientes da peroxidação lipídica no material biológico.

As amostras de tecido foram colocadas em tubos de ensaio, nesta ordem de adição: 0,75 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10%; 0,25 mL do homogeneizado; 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%; e 0,25 mL de água destilada. O TBA reage com produtos da lipoperoxidação formando uma base de *Schiff*, e o TCA foi utilizado para desnaturar as proteínas presentes, além de acidificar o meio da reação. Agitou-se cada tubo e eles foram aquecidos a uma temperatura de 100 graus Celsius. Após, os tubos foram resfriados e acrescentado 1,5 mL de álcool n-butílico para extrair o pigmento formado. Eles então foram colocados em agitador (Biomatic) por 45 segundos e centrifugados por 10 minutos a 3.000 rpm (1110 x g). Por último, o produto corado, presente na fração superior foi lido em espectrofotômetro (CARY 3E – UV) com um comprimento de onda de 535 nm. A concentração de TBARS obtida foi expressa em nmol por mg de proteína.^{64 65}

5.7 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE

A superóxido dismutase citosólica é medida de acordo com Mirsa e Fridovich a 30°C. O índice de auto-oxidação da epinefrina é inibido progressivamente de acordo com um aumento das doses de SOD no homogeneizado monitorizado no espectrofotômetro a 560 nm. A quantidade de enzima que inibe a auto-oxidação da epinefrina a 50% da dose máxima é definida como 1 U de atividade da SOD.^{66 19}

5.8 AVALIAÇÃO DO NF-KAPPA B E DA INTERLEUCINA 6

Para o preparo das lâminas e posterior análise imunistoquímica, foram feitas secções de 3 um de espessura, obtidas com o auxílio de um micrótomo (Leica, SM 2000R, Alemanha). Os cortes foram colocados em lâminas pré-tratadas com Histogrip (Zymed, USA) e levados à estufa a 60°C por 24 horas.

Os cortes foram desparafinizados por incubação em xileno por 10 minutos por três vezes, seguido da re-hidratação dos cortes em sequência de etanol em concentrações decrescentes, começando com etanol absoluto, 90%, 80% e 70% por 3 minutos em cada diluição. A seguir, os cortes foram lavados três vezes em água destilada.

A exposição do antígeno, através da metodologia de recuperação antigênica induzida por calor à alta temperatura, foi realizada em plataforma pTLINK (DAKO) por 40 minutos a 98°C, com a solução Envision Flex solução de recuperação antigênica, pH alto (DAKO). Logo após este período, foi realizada a lavagem das lâminas em tampão PBS, pH 7.2. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de 3% de H₂O₂ em álcool metílico em duas incubações de 15 minutos seguido de três ciclos de lavagem com tampão PBS, pH 7.2.

O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado com a solução comercial Protein Block Serum-Free (Dako, USA) por 30 minutos em temperatura ambiente.

Os cortes foram incubados pela metodologia de capilaridade através da estação de imunocoloração Sequenza (Thermo Shandon, USA) *overnight* em temperatura entre 2°C e 6°C e diluídos em solução de diluição (*Antibody Diluent with background reducing componentes*, Dako, USA) para os seguintes anticorpos: Anti-NFκβ (Santa Cruz Biotechnology, USA) 1:100, Anti-IL-6 (Santa Cruz Biotechnology, USA) 1:100. Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados por três passagens de tampão PBS, pH 7.2. Para amplificação da reação antígeno-anticorpo utilizou-se para anti-IL-6 o sistema Advance HRP (Dako, USA) utilizado de acordo com as recomendações do fabricante e para NFκβ o anticorpo secundário *rabbit anti-goat* IgG-HRP, diluído em 1:300 em tampão PBS, pH 7.2 por 30 minutos a temperatura ambiente. A seguir, as lâminas foram lavadas com tampão PBS, pH 7.2 e incubadas com solução de diaminobenzidina (Dako Liquid DAB Substrate Chromogen System, USA) por 5 minutos. Após lavagem em água destilada, as lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris por 1

minuto seguido de lavagem em água corrente até remoção completa do corante, e incubadas em uma solução de amônia 37 mM por 15 segundos. Para finalizar, as lâminas foram desidratadas em álcool etílico absoluto (quatro incubações de 2 minutos) e após dois tratamentos com xileno por 5 minutos. As lâminas foram montadas com meio sintético Entellan (Merck, Alemanha).^{67 68}

5.9 ANÁLISE DIGITAL DAS IMAGENS

Foi utilizado um sistema de análise digital composto por microscópio óptico Zeiss Axioskop 40 (Oberkochen, Alemanha), com lentes neofluares, conectado através de uma vídeocâmera Roper Scientific (Media Cybernetics, Rockville, EUA) a um microcomputador Pentium IV 2.2 GHz com 512 MB de memória RAM, disco rígido de 160 GB e placa de captura Image Pro Capture Kit (Media Cybernetics, Rockville, EUA). Para a análise digital das imagens foi utilizado o programa Image Pro Plus versão 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, EUA), que permite a captura digital da imagem e marcação e contagem da área de interesse. As imagens foram capturadas no formato TIFF (*True Image Format File*) sem compressão, pelo mesmo examinador com uma intensidade de luz padrão para todas as fotos. A captura das imagens foi realizada no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São Lucas (HSL) da PUCRS. Foram capturadas imagens de pelo menos quinze campos aleatórios não sobrepostos de cada lâmina histológica com magnificação de 200X (44 pixel = 1 um). As lâminas com positividade focal para os marcadores tiveram os campos selecionados pelo método de *hot spot*. O tamanho médio das biópsias, realizadas por agulha, variou entre 2 e 4 mm². A seleção de cores foi realizada de forma interativa através da concordância ente três observadores treinados e, após, aplicada à leitura de todas as amostras pelo sistema de análise de imagens digital automatizado. A área inicial considerada foi 0,01 cm.

5.10 MORTE DOS ANIMAIS

A morte dos animais controles e experimentais foi realizada da seguinte maneira: o processo iniciou com a anestesia do animal mediante a administração de fármacos anestésicos e seu posicionamento para cirurgia. Foi utilizada uma mistura de Cloridrato de Xilazina 2% 50 mg/Kg de peso corporal e Cloridrato de Quetamina

100 mg/Kg de peso corporal intraperitonealmente. Foi realizada uma tricotomia manual da região abdominal, seguida de intervenção cirúrgica, que iniciou com uma laparotomia mediana ventral e a exposição das alças intestinais, para retirada de um segmento de 10 cm de intestino delgado. Após foi realizado o pneumotórax para a retirada do pulmão e morte do animal.

5.11 TAMANHO DA AMOSTRA

Para detectar uma diferença entre as médias dos grupos, de magnitude de dois desvios-padrão, estimou-se que seriam necessários 5 ratos por grupo, para um nível de significância de $\alpha=0,05$ e poder estatístico $(1-\beta)=0,90$. Deste modo, considerando os 4 grupos experimentais, o tamanho total da amostra foi de 20 ratos.

5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos foram inicialmente descritos por média e desvio-padrão. Para comparação dos grupos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA). Para dados categóricos, utilizamos contagens e comparações baseados no procedimento exato de Fisher.

A verificação dos resultados do NF-KB e da IL-6, entre os grupos, foi realizada pela análise de variância com erros-padrão robustos (Welch).

O nível de significância para o experimento foi de $\alpha=0,05$. Os dados foram analisados com o auxílio do programa SPSS versão 21.0.

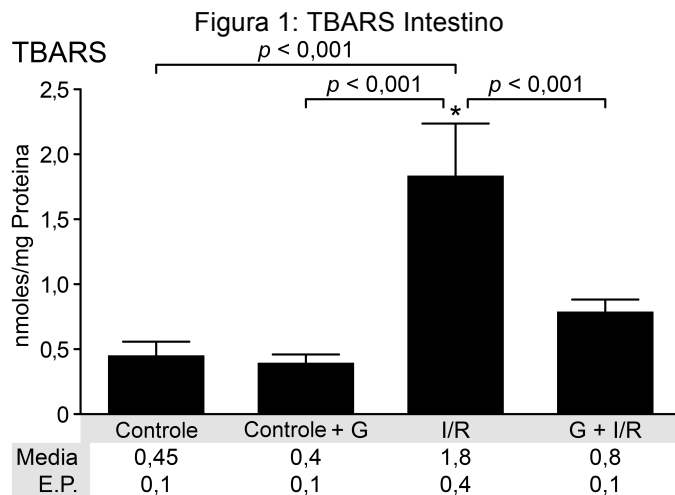
6 ÉTICA

Os procedimentos com os animais foram realizados de acordo com os preceitos preconizados pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) pela Resolução Normativa n.º 04/1997.⁶⁹

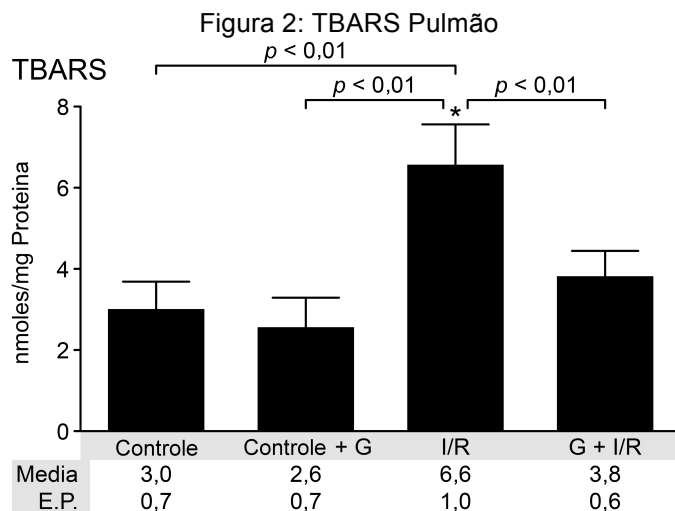
7 RESULTADOS

7.1 ESTRESSE OXIDATIVO – LIPOPEROXIDAÇÃO – TBARS

A Lipoperoxidação da membrana, no intestino, assim como no pulmão, ocorreu de forma mais acentuada, com valores estatisticamente significativos, no grupo de animais submetidos a I/R. Por outro lado, o grupo que recebeu a glutamina 48h e 24h antes do procedimento de I/R apresentou achados de lipoperoxidação bem mais discretos, assemelhando-se aos grupos controles (animais não submetidos a I/R e também em relação ao grupo que recebeu a glutamina sem a I/R). Estes dados, quando comparados, obtiveram significância estatística.



Fonte: dados do estudo (2013).



Fonte: dados do estudo (2013).

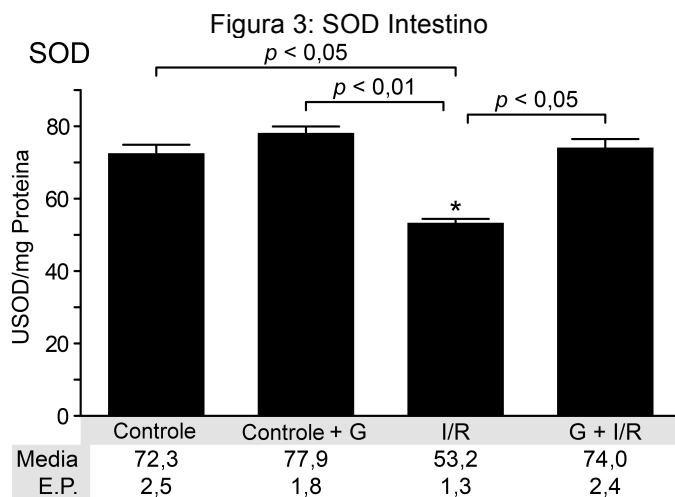
7.2 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A concentração da enzima antioxidante superóxido dismutase estava diminuída no intestino dos animais submetidos a I/R. Estes achados foram estatisticamente significativos, quando comparados ao grupo controle, ou seja, animais não submetidos a I/R.

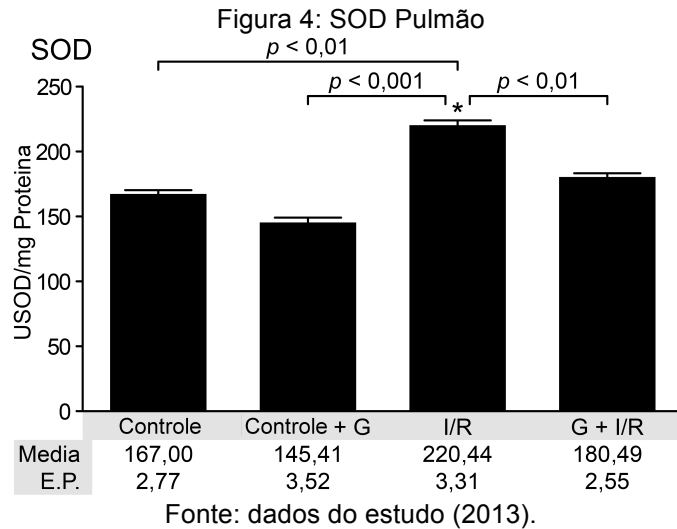
Por outro lado, o grupo que recebeu a glutamina 48h e 24h antes da I/R apresentou concentração desta enzima de forma semelhante aos grupos controles, tanto ao grupo não submetido a I/R como ao grupo que recebeu a glutamina 48h e 24h antes da laparotomia exploradora, porém sem serem submetidos à I/R.

Na comparação entre os grupos de animais submetidos a I/R com os que receberam a glutamina antes da I/R, no intestino, os achados apresentaram significância estatística, sugerindo que a glutamina é capaz de prevenir a redução da enzima SOD nos estados de I/R mesentérica.

Por outro lado, na avaliação da lesão a órgãos a distância, pelo estudo dos pulmões, a SOD estava em concentrações mais elevadas no grupo que sofreu a I/R. Já o grupo que recebeu a glutamina antes do evento I/R apresentou concentrações semelhantes aos grupos controles. Na comparação entre os grupos, os achados apresentaram diferença estatisticamente significativa.

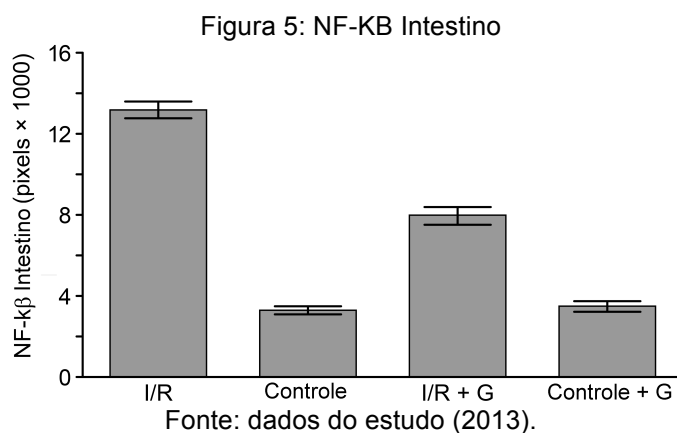


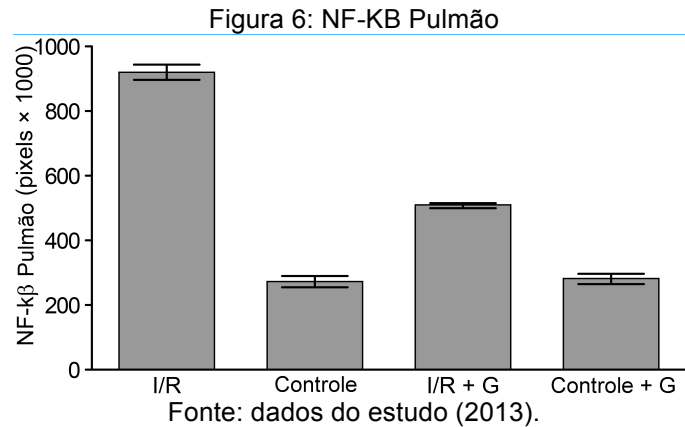
Fonte: dados do estudo (2013).



7.3 FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR KAPPA B

Para a análise digital das imagens foi utilizado o programa *Image Pro Plus* versão 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, EUA). Elas foram capturadas em formato TIFF (*True Image File Format*), com pelo menos quinze campos, sem a sobreposição ao acaso, para cada lâmina histológica, com 200X (44 pixel = 1 μ m). As lâminas com positividade focal para os marcadores foram selecionados pelo método de *hot spot*. A área inicial considerada foi de 0,01 cm. Calculou-se a área média dos ratos, bem como a dos grupos. Os grupos Controle e Controle-GLU apresentaram áreas com médias semelhantes. O grupo I/R foi o que apresentou a maior área. O segundo grupo foi o I/R-GLU, mas com valores bem mais baixos que os do grupo de I/R. Foram observadas as mesmas diferenças entre os dois grupos, tanto no intestino como no pulmão. Estes resultados foram estatisticamente significativos.





7.4 INTERLEUCINA 6 (IL-6)

A análise das imagens digitais, capturadas das lâminas com material testado para a IL-6, por método imunohistoquímico, foi realizada de forma semelhante à aplicada ao NF-KB. Aqui, mais uma vez, os grupos Controle e Controle-GLU mostraram áreas com médias semelhantes. O grupo com área de positividade maior foi o de animais submetidos a I/R, seguido pelo grupo que recebeu a glutamina 48h e 24h antes da I/R (I/R-GLU). Na comparação entre os grupos, houve diferenças com significância estatística.

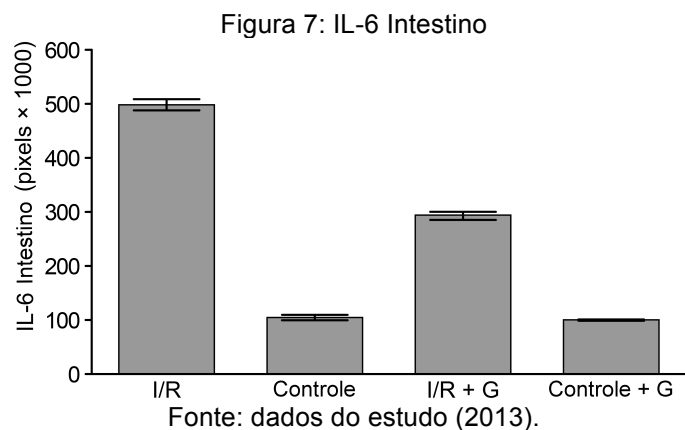
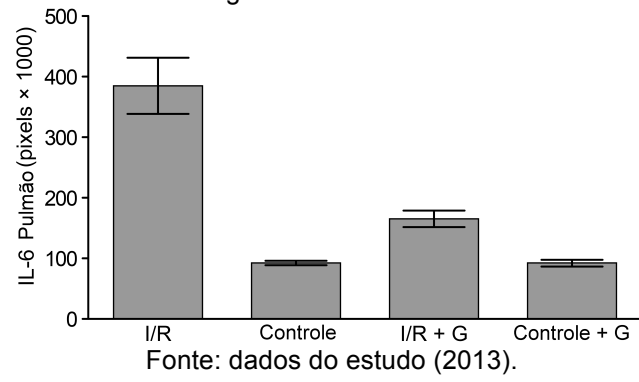


Figura 8: IL-6 Pulmão



8 DISCUSSÃO

A I/R mesentérica é uma síndrome clínica que cursa com uma série de situações na prática médica diária, como oclusão intestinal aguda, choque hipovolêmico secundário a trauma, cirurgias de grande porte, assim como transplantes de intestino delgado. Acomete indivíduos de variadas faixas etárias e determina alta morbimortalidade.¹

Este estudo ratifica o que já foi citado em outros artigos, no sentido de que em estados de I/R há uma destruição da barreira mucosa, através da lipoperoxidação, assim como uma diminuição da atividade da enzima antioxidante SOD.^{4 9 10}

A glutamina é considerada um aminoácido essencial durante situações de estresse catabólico. Uma série de estudos tem demonstrado que a glutamina pode atenuar a liberação de interleucinas inflamatórias, assim como minimizar a MOF.^{36 43}
70 71

Este estudo demonstra que a utilização da glutamina, na dose de 25 mg/kg, de forma intraperitoneal, 48h e 24h antes da ocorrência de 30 minutos de isquemia, seguida de 15 minutos de reperfusão mesentérica, em ratos, exerce um importante efeito protetor nas lesões desencadeadas pela MOF, no intestino e nos pulmões. Nossos dados fornecem evidências de que a glutamina atenua: (1) a lipoperoxidação da membrana da mucosa do intestino e também dos pulmões; (2) a diminuição da atividade da SOD, no intestino; (3) a expressão do NF-KB; e (4) também da IL- 6, tanto no intestino como nos pulmões.

Nos estados de I/R há uma destruição da barreira mucosa, através da lipoperoxidação, com conseqüente translocação de bactérias e a ativação de uma resposta inflamatória.³³

Em nosso estudo, a ocorrência da lipoperoxidação da membrana foi maior no grupo de animais submetidos à I/R. A adição de glutamina diminuiu significativamente este desfecho. Outros autores, tais como Mondello et al.⁵⁹ e He et al.³⁶ também observaram resultados benéficos com o uso da glutamina para a I/R com diferentes metodologias. Mondello et al. induziram a isquemia intestinal em ratos por clampeamento da artéria mesentérica superior e tronco celíaco por 30 min, em seguida, promoveram a reperfusão durante 1h . A glutamina foi administrada 15 minutos antes da reperfusão na dose de 1,5 mg / kg , i.v. Seus resultados mostraram

uma redução da: (1) infiltração de neutrófilos no íleo, (2) formação de citocinas pró-inflamatórias (3) expressão de moléculas de adesão como a ICAM-1 e P-selectina (4) degradação do I κ B- α e a translocação do NF- κ B e (6) formação de nitrotirosina. He et al. também utilizaram um modelo animal de I/R, porém administraram a glutamina entericamente antes e depois de uma isquemia de 60 minutos; adicionalmente, em um subgrupo, o ducto linfático mesentérico foi ligado antes da produção da isquemia intestinal. Eles concluíram que tanto a administração enteral de glutamina como a ligadura do ducto linfático mesentérico impediram a permeabilidade intestinal, atenuando reações inflamatórias sistêmicas e lesão pulmonar.³⁶ Em contraste, Fukatsu et al.⁷¹ demonstraram que, em um modelo murino de I/R intestinal, a infusão intravenosa de glutamina, durante a isquemia intestinal, foi prejudicial, em termos de sobrevivência e também de lesões a órgãos como o intestino, em associação com o aumento de células mielóides na corrente circulatória.⁷¹

Em nosso estudo, a atividade da SOD, no intestino, foi diminuída em animais submetidos à I/R. Nos grupos Controle e Controle-GLU, a diminuição da atividade da SOD foi muito mais baixa e semelhante entre os dois grupos. A adição da glutamina a animais submetidos à I/R, produziu uma redução, que não foi tão significativa, mas menor do que a encontrada no grupo de I/R sem o aminoácido. Nos pulmões, a SOD estava em concentrações mais elevadas no grupo da I/R, comparativamente aos demais. Provavelmente isto se deva ao fato de que, no nosso trabalho, o tempo estipulado de reperfusão foi relativamente curto (15 minutos) e, muito provavelmente, os espécimes de tecido pulmonar foram retirados no momento em que esta enzima antioxidante estava sendo ativada, pelo estresse oxidativo, a controlar os ROS. A tendência natural é que, após haver um desequilíbrio da balança antioxidante/ROS, as concentrações da SOD, no grupo submetido à I/R, devam, assim como visualizado no intestino, cair.

Os primeiros autores a descrever o papel da SOD no estresse oxidativo foram Misra e Fridovich⁶⁶, em meados de 1971. Neste estudo piloto, SOD foi preparada a partir de eritrócitos bovinos, sendo capaz de inibir a auto-oxidação da epinefrina a um pH = 10,2. Recentemente, Salman et al.⁷² administraram glutamina enteral a ratos Sprague-Dawley, a uma dose de 1 g / kg durante 10 dias anteriores à I/R intestinal, e estudaram dano tecidual em segmentos de intestino e pulmão. Estes autores mediram os níveis intestinais e pulmonares da SOD, em adição aos níveis

séricos de FNT- α e IL-6. A conclusão foi de que o pré-tratamento com bolus de glutamina enteral foi capaz de minimizar a extensão de ALI em ratos.⁷²

O tecido isquêmico e reperfundido ativa a família das proteinoquinases, que, por sua vez, é responsável pela conversão dos fatores de transcrição específicos [proteína ativadora-1 (PA-1) e NF-KB], sendo este, o regulador da expressão dos gens proinflamatórios. No nosso estudo, a atividade do NF-KB foi mais elevada em ambos, intestino e pulmão, do grupo submetido à I/R. No entanto, no grupo de animais que receberam, profilaticamente, a glutamina, i.p. 24h e 48h antes da I/R, os níveis de NF-KB foram mais baixos. Esta diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa. Sen e Baltimore⁵³, em 1986, publicaram o primeiro artigo sobre o NF-KB, sugerindo seu importante papel na resposta inflamatória celular a lesões. No entanto, o papel exato deste fator de transcrição permanece controverso. De acordo com Haddad et al.⁵⁴, o NF-KB parece desempenhar uma importante função na geração e na resolução das lesões em decorrência à I/R intestinal, como um fator de transcrição que é diretamente influenciado por espécies reativas e sinais pró-inflamatórios. Bowie e O'Neill⁵⁶, em um artigo de revisão sobre o estresse oxidativo e ativação do NF-KB, determinaram que, na maioria dos casos, o papel do estresse oxidativo na ativação do NF-KB, é muito mais um facilitador do que propriamente o fator causal, se é que existe um papel como um todo. Ipsilantis et al.⁵⁸ testaram a hipótese de que a ação de 2-mercaptoetano-sulfonato (mesna) é mediada pela inibição de NF-KB, estudando o stress oxidativo em um modelo de I/R em ratos, analisando a glutatona, a concentração de malondialdeído, SOD e NF-KB. Estes autores concluíram que a profilaxia com o mesna impede o stress oxidativo induzido por I/R no intestino através da inibição da ativação do NF-KB.

No nosso estudo, a ativação do NF-KB foi maior no grupo de animais submetidos à I/R, tanto nos espécimes de intestino como pulmão. Entretanto, no grupo que recebeu a glutamina intraperitoneal 48h e 24h antes da I/R, a ativação deste fator de transcrição foi menor, com diferença, entre estes grupos, estatisticamente significativa.

Como já foi citado anteriormente, os ROS são mediadores do estresse oxidativo, levando a um conseqüente aumento da produção das interleucinas inflamatórias, como FNT- α e IL-6, além da ativação dos neutrófilos, que, por sua vez, têm um papel crucial na patogênese da I/R. O FNT- α e a IL-6 não apenas levam ao dano tecidual, como também são potentes ativadores dos neutrófilos. Estes, e seus

produtos enzimáticos, quando sequestrados no tecido intestinal, causam aumento da permeabilidade micro e perivascular, edema intersticial, além de lesão a órgãos à distância como edema pulmonar.⁵⁶ Cuzzocrea et al.³² estudaram o processo inflamatório secundário à I/R, em um modelo de ratos knock-out, e verificaram, pelo método imunistoquímico, que a IL-6 desempenha um papel importante nas lesões seguidas à I/R, sugerindo que a inibição da IL-6 pode, na verdade, representar uma nova e possível estratégia na prevenção de lesões provocadas pela I/R.

No nosso estudo, semelhantemente ao encontrado com o NF-KB, a IL-6 apresentou concentrações mais elevadas, tanto no intestino como no pulmão, no grupo de animais submetidos à I/R. Os grupos Controle e Controle–GLU apresentaram resultados semelhantes entre eles, sendo estes menores do que em relação ao grupo da I/R. Em contrapartida, o grupo que recebeu o fator potencialmente protetor, a glutamina antes do evento I/R, mostrou valores superiores aos controles, porém inferiores ao grupo da I/R. Estes resultados também apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

9 CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que a glutamina, administrada na dose de 25mg/kg, de forma intraperitoneal, 48h e 24h antes dos animais serem submetidos a 30 min de isquemia mesentérica e 15 min de reperfusão, mostrou-se eficaz como fator de proteção à lipoperoxidação da membrana em espécimes de tecido intestinal e pulmonar, assim como na preservação da atividade da SOD no intestino.

A ativação do NF-KB e da IL-6 também pode ser reduzida com a administração deste aminoácido em modelos de I/R em ratos.

Como perspectivas futuras, assim como, para melhorar o embasamento teórico e confirmar o papel protetor da glutamina no estresse oxidativo, em eventos de isquemia e reperfusão mesentérica, serão necessários outros estudos, principalmente em humanos, que ratifiquem os resultados desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- 1 CERQUEIRA, N. F.; HUSSNI, C. A.; YOSHIDA, W. B. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. **Acta Cir Bras**, v. 20, n. 4, p. 336-43, 2005 Jul-Aug 2005. ISSN 0102-8650. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16186955>>.
- 2 DING, Y. et al. Observation of mesenteric microcirculatory disturbance in rat by laser oblique scanning optical microscopy. **Sci Rep**, v. 3, p. 1762, May 2013. ISSN 2045-2322. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23640310>>.
- 3 MOORE, E. E. et al. The postischemic gut serves as a priming bed for circulating neutrophils that provoke multiple organ failure. **J Trauma**, v. 37, n. 6, p. 881-7, Dec 1994. ISSN 0022-5282. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7996599>>.
- 4 DEITCH, E. A. The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. **Arch Surg**, v. 125, n. 3, p. 403-4, Mar 1990. ISSN 0004-0010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2407230>>.
- 5 DOIG, C. J. et al. Increased intestinal permeability is associated with the development of multiple organ dysfunction syndrome in critically ill ICU patients. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 158, n. 2, p. 444-51, Aug 1998. ISSN 1073-449X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9700119>>.
- 6 KOZAR, R. A. et al. Superior mesenteric artery occlusion models shock-induced gut ischemia-reperfusion. **J Surg Res**, v. 116, n. 1, p. 145-50, Jan 2004. ISSN 0022-4804. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14732361>>.
- 7 BILECOVÁ-RABAJDOVÁ, M. et al. Analysis of changes in pro (Gadd153) and anti apoptotic (Grp78) gene expression after ischemic-reperfusion injury of the small intestine. **Prague Med Rep**, v. 111, n. 4, p. 249-56, 2010. ISSN 1214-6994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21189163>>.
- 8 PARKS, D. A.; GRANGER, D. N. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. **Am J Physiol**, v. 250, n. 6 Pt 1, p. G749-53, Jun 1986. ISSN 0002-9513. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3717337>>.
- 9 BATINIĆ-HABERLE, I.; REBOUÇAS, J. S.; SPASOJEVIĆ, I. Superoxide dismutase mimics: chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. **Antioxid Redox Signal**, v. 13, n. 6, p. 877-918, Sep 2010. ISSN 1557-7716. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20095865>>.
- 10 DESHMUKH, D. R. et al. Intestinal ischemia and reperfusion injury in transgenic mice overexpressing copper-zinc superoxide dismutase. **Am J**

- Physiol**, v. 273, n. 4 Pt 1, p. C1130-5, Oct 1997. ISSN 0002-9513. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9357755>>.
- 11 CERQUEIRA, N. F. et al. Systemic evaluation on ischemia and reperfusion injury of splanchnic organs in rats. **Acta Cir Bras**, v. 24, n. 4, p. 290-5, 2009 Jul-Aug 2009. ISSN 1678-2674. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19705028>>.
- 12 DOMINGUEZ, J. A.; COOPERSMITH, C. M. Can we protect the gut in critical illness? The role of growth factors and other novel approaches. **Crit Care Clin**, v. 26, n. 3, p. 549-65, x, Jul 2010. ISSN 1557-8232. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20643306>>.
- 13 DAS, S. et al. Oxidative stress in lymphocytes, neutrophils, and serum of oral cavity cancer patients: modulatory array of L-glutamine. **Support Care Cancer**, v. 15, n. 12, p. 1399-405, Dec 2007. ISSN 0941-4355. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17593404>>.
- 14 OZKAN, O. V. et al. Resveratrol, a natural antioxidant, attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. **Tohoku J Exp Med**, v. 218, n. 3, p. 251-8, Jul 2009. ISSN 1349-3329. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19561396>>.
- 15 ARUMUGAM, T. V. et al. The role of the complement system in ischemia-reperfusion injury. **Shock**, v. 21, n. 5, p. 401-9, May 2004. ISSN 1073-2322. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15087815>>.
- 16 TEKE, Z. et al. Pyrrolidine dithiocarbamate prevents 60 minutes of warm mesenteric ischemia/reperfusion injury in rats. **Am J Surg**, v. 194, n. 2, p. 255-62, Aug 2007. ISSN 1879-1883. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17618816>>.
- 17 MALLICK, I. H. et al. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. **Dig Dis Sci**, v. 49, n. 9, p. 1359-77, Sep 2004. ISSN 0163-2116. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15481305>>.
- 18 CLOSA, D.; FOLCH-PUY, E. Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. **IUBMB Life**, v. 56, n. 4, p. 185-91, Apr 2004. ISSN 1521-6543. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15230345>>.
- 19 GUTIÉRREZ, M. B. et al. Oxidative stress induced by Cremophor EL is not accompanied by changes in NF-kappaB activation or iNOS expression. **Toxicology**, v. 222, n. 1-2, p. 125-31, May 2006. ISSN 0300-483X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16533553>>.
- 20 HEYLAND, D. K. et al. REDucing Deaths due to OXidative Stress (The REDOXS Study): Rationale and study design for a randomized trial of glutamine and antioxidant supplementation in critically-ill patients. **Proc Nutr**

- Soc**, v. 65, n. 3, p. 250-63, Aug 2006. ISSN 0029-6651. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923310>>.
- 21 RÖTH, E. et al. The role of free radicals in endogenous adaptation and intracellular signals. **Exp Clin Cardiol**, v. 9, n. 1, p. 13-6, 2004. ISSN 1205-6626. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19641690>>.
- 22 WILLIAMS, J. G.; HUGHES, L. E.; HALLETT, M. B. Toxic oxygen metabolite production by circulating phagocytic cells in inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 31, n. 2, p. 187-93, Feb 1990. ISSN 0017-5749. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2311976>>.
- 23 ZHANG, Y. et al. Effects of penehyclidine hydrochloride in small intestinal damage caused by limb ischemia-reperfusion. **World J Gastroenterol**, v. 17, n. 2, p. 254-9, Jan 2011. ISSN 1007-9327. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21246001>>.
- 24 TAKIZAWA, Y. et al. Effects of nitric oxide on mucosal barrier dysfunction during early phase of intestinal ischemia/reperfusion. **Eur J Pharm Sci**, v. 42, n. 3, p. 246-52, Feb 2011. ISSN 1879-0720. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21134443>>.
- 25 MULLANE, K. M.; KRAEMER, R.; SMITH, B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. **J Pharmacol Methods**, v. 14, n. 3, p. 157-67, Nov 1985. ISSN 0160-5402. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2997548>>.
- 26 WANDERER, A. A. Proposed pathobiologic mechanisms of hypoxia-ischemia-reperfusion in corticosteroid-resistant neutrophilic asthma and consideration of interleukin 1 targeted therapy. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 106, n. 1, p. 69-72, Jan 2011. ISSN 1534-4436. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21195948>>.
- 27 WEISS, S. J. Tissue destruction by neutrophils. **N Engl J Med**, v. 320, n. 6, p. 365-76, Feb 1989. ISSN 0028-4793. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2536474>>.
- 28 LANE, J. S. et al. Interleukin-10 reduces the systemic inflammatory response in a murine model of intestinal ischemia/reperfusion. **Surgery**, v. 122, n. 2, p. 288-94, Aug 1997. ISSN 0039-6060. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9288134>>.
- 29 GRISHAM, M. B.; HERNANDEZ, L. A.; GRANGER, D. N. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. **Am J Physiol**, v. 251, n. 4 Pt 1, p. G567-74, Oct 1986. ISSN 0002-9513. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3020994>>.
- 30 ROLLWAGEN, F. M. et al. Microvascular effects of oral interleukin-6 on ischemia/reperfusion in the murine small intestine. **Am J Pathol**, v. 156, n. 4,

- p. 1177-82, Apr 2000. ISSN 0002-9440. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10751342>>.
- 31 VERMA, I. M. et al. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. **Genes Dev**, v. 9, n. 22, p. 2723-35, Nov 1995. ISSN 0890-9369. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7590248>>.
- 32 CUZZOCREA, S. et al. IL-6 knock-out mice exhibit resistance to splanchnic artery occlusion shock. **J Leukoc Biol**, v. 66, n. 3, p. 471-80, Sep 1999. ISSN 0741-5400. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10496318>>.
- 33 DEITCH, E. A. Role of the gut lymphatic system in multiple organ failure. **Curr Opin Crit Care**, v. 7, n. 2, p. 92-8, Apr 2001. ISSN 1070-5295. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11373517>>.
- 34 DEITCH, E. A.; XU, D.; KAISE, V. L. Role of the gut in the development of injury- and shock induced SIRS and MODS: the gut-lymph hypothesis, a review. **Front Biosci**, v. 11, p. 520-8, 2006. ISSN 1093-4715. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16146750>>.
- 35 HE, G. Z. et al. [Effect of mesenteric lymphatic duct ligation on the system inflammation during the intestinal ischemia-reperfusion]. **Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi**, v. 11, n. 5, p. 469-71, Sep 2008. ISSN 1671-0274. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18803053>>.
- 36 HE, G. Z. et al. Lymph duct ligation during ischemia/reperfusion prevents pulmonary dysfunction in a rat model with ω -3 polyunsaturated fatty acid and glutamine. **Nutrition**, v. 27, n. 5, p. 604-14, May 2011. ISSN 1873-1244. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20817408>>.
- 37 CURI, R. et al. Molecular mechanisms of glutamine action. **J Cell Physiol**, v. 204, n. 2, p. 392-401, Aug 2005. ISSN 0021-9541. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15795900>>.
- 38 SEGUÍ, J. et al. Down-regulation of endothelial adhesion molecules and leukocyte adhesion by treatment with superoxide dismutase is beneficial in chronic immune experimental colitis. **Inflamm Bowel Dis**, v. 11, n. 10, p. 872-82, Oct 2005. ISSN 1078-0998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16189416>>.
- 39 IKEDA, S. et al. Total parenteral nutrition supplementation with glutamine improves survival after gut ischemia/reperfusion. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 26, n. 3, p. 169-73, 2002 May-Jun 2002. ISSN 0148-6071. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12005457>>.
- 40 KLIMBERG, V. S. et al. Prophylactic glutamine protects the intestinal mucosa from radiation injury. **Cancer**, v. 66, n. 1, p. 62-8, Jul 1990. ISSN 0008-543X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2354410>>.

- 41 KLIMBERG, V. S.; MCCLELLAN, J. L. Claude H. Organ, Jr. Honorary Lectureship. Glutamine, cancer, and its therapy. **Am J Surg**, v. 172, n. 5, p. 418-24, Nov 1996. ISSN 0002-9610. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8942537>>.
- 42 GIANOTTI, L. et al. Oral glutamine decreases bacterial translocation and improves survival in experimental gut-origin sepsis. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 19, n. 1, p. 69-74, 1995 Jan-Feb 1995. ISSN 0148-6071. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7658604>>.
- 43 DE AGUILAR-NASCIMENTO, J. E.; DOCK-NASCIMENTO, D. B.; BRAGAGNOLO, R. Role of enteral nutrition and pharmaconutrients in conditions of splanchnic hypoperfusion. **Nutrition**, v. 26, n. 4, p. 354-8, Apr 2010. ISSN 1873-1244. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20004079>>.
- 44 DEMIRKAN, A.; SAVAŞ, B.; MELLI, M. Endotoxin level in ischemia-reperfusion injury in rats: effect of glutamine pretreatment on endotoxin levels and gut morphology. **Nutrition**, v. 26, n. 1, p. 106-11, Jan 2010. ISSN 1873-1244. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19596185>>.
- 45 ISRAELI, E. et al. Prophylactic administration of topical glutamine enhances the capability of the rat colon to resist inflammatory damage. **Dig Dis Sci**, v. 49, n. 10, p. 1705-12, Oct 2004. ISSN 0163-2116. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15573931>>.
- 46 MEDEIROS, A. C. et al. Glucan and glutamine reduce bacterial translocation in rats subjected to intestinal ischemia-reperfusion. **J Invest Surg**, v. 19, n. 1, p. 39-46, 2006 Jan-Feb 2006. ISSN 0894-1939. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16546928>>.
- 47 TRS, H. Glutamine preserves gut glutathione levels during intestinal ischemia-reperfusion. D, C.: **J Surg Res**. 56: 351-55 p. 1994.
- 48 MATÉS, J. M. et al. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 34, n. 5, p. 439-58, May 2002. ISSN 1357-2725. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11906817>>.
- 49 CALDER, P. C.; YAQOUB, P. Glutamine and the immune system. **Amino Acids**, v. 17, n. 3, p. 227-41, 1999. ISSN 0939-4451. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10582122>>.
- 50 ROGERO, M.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre glutamina e exercício. **Nutrição em Pauta**, 58: 34-40, 2003.
- 51 PRAVDA, J. Radical induction theory of ulcerative colitis. **World J Gastroenterol**, v. 11, n. 16, p. 2371-84, Apr 2005. ISSN 1007-9327. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15832404>>.

- 52 ZINGARELLI, B.; SHEEHAN, M.; WONG, H. R. Nuclear factor-kappaB as a therapeutic target in critical care medicine. **Crit Care Med**, v. 31, n. 1 Suppl, p. S105-11, Jan 2003. ISSN 0090-3493. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12544984>>.
- 53 SEN, R.; BALTIMORE, D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. **Cell**, v. 47, n. 6, p. 921-8, Dec 1986. ISSN 0092-8674. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3096580>>.
- 54 HADDAD, J. J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. **Cell Signal**, v. 14, n. 11, p. 879-97, Nov 2002. ISSN 0898-6568. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12220615>>.
- 55 BAEUERLE, P. A.; BALTIMORE, D. NF-kappa B: ten years after. **Cell**, v. 87, n. 1, p. 13-20, Oct 1996. ISSN 0092-8674. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8858144>>.
- 56 BOWIE, A.; O'NEILL, L. A. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. **Biochem Pharmacol**, v. 59, n. 1, p. 13-23, Jan 2000. ISSN 0006-2952. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10605930>>.
- 57 YAMAOKA, S. et al. Complementation cloning of NEMO, a component of the I kappa B kinase complex essential for NF-kappa B activation. **Cell**, v. 93, n. 7, p. 1231-40, Jun 1998. ISSN 0092-8674. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9657155>>.
- 58 YPSILANTIS, P. et al. Prophylaxis with mesna prevents oxidative stress induced by ischemia reperfusion in the intestine via inhibition of nuclear factor-kappa B activation. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 23, n. 2, p. 328-35, Feb 2008. ISSN 1440-1746. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17868332>>.
- 59 MONDELLO, S. et al. Glutamine treatment attenuates the development of ischaemia/reperfusion injury of the gut. **Eur J Pharmacol**, v. 643, n. 2-3, p. 304-15, Sep 2010. ISSN 1879-0712. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20599905>>.
- 60 KARIN, M. The beginning of the end: I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B activation. **J Biol Chem**, v. 274, n. 39, p. 27339-42, Sep 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10488062>>.
- 61 SÖZEN, S. et al. The effects of glutamine on hepatic ischemia reperfusion injury in rats. **Hippokratia**, v. 15, n. 2, p. 161-6, Apr 2011. ISSN 1790-8019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22110300>>.
- 62 MARQUES, C. et al. Glutamine prevents gastric oxidative stress in an animal model of portal hypertension gastropathy. **Ann Hepatol**, v. 10, n. 4, p. 531-9,

- 2011 Oct-Dec 2011. ISSN 1665-2681. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21911895>>.
- 63 JOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, J.; FARR, A. L. Protein measurement with the foline reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-75, 1951.
- 64 BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 52, p. 302-10, 1978. ISSN 0076-6879. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/672633>>.
- 65 FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 114-21, 1984. ISSN 0076-6879. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727659>>.
- 66 MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v. 247, n. 10, p. 3170-5, May 1972. ISSN 0021-9258. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4623845>>.
- 67 GROOTJANS, J. et al. Human intestinal ischemia-reperfusion-induced inflammation characterized: experiences from a new translational model. **Am J Pathol**, v. 176, n. 5, p. 2283-91, May 2010. ISSN 1525-2191. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20348235>>.
- 68 DUTRA, R. C. et al. Preventive and therapeutic euphol treatment attenuates experimental colitis in mice. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27122, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22073270>>.
- 69 GOLDIN, J. R.; RAYMUNDO, M. M. **Pesquisa em saúde e direitos dos animais**. 2. ed. Porto Alegre: HCPA, 1997.
- 70 SUKHOTNIK, I. et al. Dietary glutamine supplementation prevents mucosal injury and modulates intestinal epithelial restitution following ischemia-reperfusion injury in the rat. **Dig Dis Sci**, v. 52, n. 6, p. 1497-504, Jun 2007. ISSN 0163-2116. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17404857>>.
- 71 FUKATSU, K. et al. Glutamine infusion during ischemia is detrimental in a murine gut ischemia/reperfusion model. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 27, n. 3, p. 187-92; discussion 192, 2003 May-Jun 2003. ISSN 0148-6071. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12757112>>.
- 72 SELMAN, AE. et al. The impact of pretreatment with bolus dose of enteral glutamine on acute lung injury induced by oleic acid in rats. **J Anesth**. 2013 Nov 24. [ahead of print]. DOI 10.1007/s00540-013-1745-y>.

APÊNDICE A – Artigo**THE ROLE OF GLUTAMINE IN OXIDATIVE STRESS IN THE GUT AND LUNGS
OF ANIMALS UNDERGOING MESENTERIC ISCHEMIA AND REPERFUSION**

Gilmara Pandolfo Zobot¹; Gustavo Franco Carvalhal, MD²; Henrique Sarubbi Fillmann, MD³;
Norma Possa Marroni, PhD⁴; Renata Minuzzo Hartmann, MS⁵; Vinicius Duval da Silva, MD⁶

¹ São Lucas University Hospital (Hospital São Lucas - HSL) of the Pontifical Catholic
University of Rio Grande do Sul (Pontificia Universidade do Rio Grande do Sul - PUCRS),
Duque de Caxias Street, 1012/19, Marechal Rondon, Canoas, RS, Brazil 92020-040; e-mail:
gilmarapandolfo@terra.com.br

² HSL/PUCRS, Ipiranga Avenue, 6690, Porto Alegre – RS – Brazil, e-mail:
gcarvalhal@terra.com.br

³ HSL/PUCRS, Ipiranga Avenue, 6690, Porto Alegre – RS – Brazil, e-mail:
Henrique@fillmann.com.br

⁴ Teaching Hospital of Porto Alegre (*Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA*), Porto
Alegre – state of Rio Grande do Sul - RS - Brazil

⁵ HCPA, Porto Alegre – RS – Brazil, e-mail: re_minuzzo@ig.com.br

⁶ HSL/PUCRS, Ipiranga Avenue, 6690, Porto Alegre – RS – Brazil, e-mail:
vinicius.duval@puers.br

***Corresponding Author:**

Gilmara Pandolfo Zobot, e-mail: gilmarapandolfo@terra.com.br

Abstract

Background and Aims: The aim of the present study was to evaluate possible preventative effects of glutamine in an animal model of gut ischemia/reperfusion (I/R).

Methods: Twenty male Wistar rats were divided into four experimental groups: (1) control group (Control) - rats underwent exploratory laparotomy; (2) control + glutamine group (Control-GLU) - rats were subjected to laparotomy and treated intraperitoneally with glutamine 24 and 48 h prior to surgery; (3) ischemia/reperfusion group (I/R) - rats were subjected to occlusion of the superior mesenteric artery for 30 min followed by 15 min of reperfusion; and (4) ischemia/reperfusion + glutamine group (G+I/R) - rats were treated intraperitoneally with glutamine 24 and 48 h before I/R. Local and systemic injuries were determined by evaluating intestinal and lung segments for oxidative stress using lipid peroxidation and the activity of superoxide dismutase (SOD), interleukin-6 (IL-6) and nuclear factor kappa beta (NF- κ B) after mesenteric I/R.

Results: The animals from the G+I/R group exhibited reduced levels of lipid peroxidation, IL-6 and NF-KB and increased SOD activity when compared with the group of rats submitted to I/R without GLU. The findings were statistically significant ($p < 0.05$).

Conclusions: These results demonstrate that pretreatment with glutamine prevents mucosal injury and improves gut and lung recovery after I/R injury in rats.

Keywords: Ischemia-reperfusion, Glutamine, Lipid peroxidation, Superoxide dismutase, Nuclear Factor-kappa beta, Interleukin 6

Introduction

Ischemic conditions such as arterial occlusions, transplants, mesenteric ischemia and shock occur commonly in medical practice and affect a growing number of individuals of various ages, leading to high morbidity and mortality [1].

Gut ischemia usually results from occlusion of the celiac trunk and the superior mesenteric artery by thrombi or emboli and, more frequently, from non-occlusive processes [2].

However, unlike ischemic injury, reperfusion injury not only alters the affected areas but also may also produce systemic changes, so that restoring the blood flow to an ischemic area may result in damage to the entire body. The damage to remote organs is termed post-traumatic multiple organ failure (MOF). Ischemia followed by reperfusion is required to develop MOF, and the gut is the organ that triggers the injury process in distant organs [3]. Parks & Granger reported that the tissue damage that occurs during reperfusion is greater than injury that occurs during ischemia. Rupture of the mucosal barrier, bacterial translocation and activation of the inflammatory response, as well as acid-base balance and electrolyte disorders, were observed [4]. Superoxide dismutase (SOD) is an antioxidant enzyme highly specific for superoxide elimination, thus reducing gastrointestinal lesions caused by I/R [5].

Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells (NF- κ B) is a transcription factor that plays a crucial role not only in normal states but also in the coordination of adaptive immune responses by regulating the expression of many cell mediators [6]. This factor, which was first described in 1986 by Sen and Baltimore [7]. In 2002, Haddad suggested that NF- κ B activation controls the oxidant/antioxidant balance [8]. TNF- α and interleukin (IL)-6 levels are elevated in I/R as well as in MOF. Measurements of plasma levels of these endotoxins are important to assess the systemic effects of gut I/R. When sequestered in the intestinal tissue, these mediators and their enzymatic products promote increased microvascular permeability, interstitial and perivascular edema, MOF and pulmonary edema. The lung is the first exposed organ [9].

After resuscitation from hemorrhagic shock, lymph duct ligation prevents remote lung injury, the so-called "gut-lymph hypothesis" [10]. MOF causes acute lung injury (ALI) through the

production of inflammatory mediators drained through the circulatory system. The gastrointestinal tract has the largest lymphatic system of the body [11].

Several substances have been used for the treatment and/or prevention of experimental colitis. The experiments aimed to evaluate new drugs for the treatment of inflammatory processes or combinations of drugs to achieve better results [12]. Substances that inhibit or minimize the inflammatory process caused by aggressive agents, such as glutamine, have been used for prevention purposes. This substance was initially used prophylactically in patients undergoing radiation therapy, leading to a reduction in the incidence and severity of actinic enteritis. Clinical observations have shown that patients receiving dietary glutamine supplementation had a better tolerance to colitis resulting from radiation therapy for prostate and cervical neoplasias [13]. Glutamine decreases the inflammatory effects of methotrexate-induced enterocolitis and reduces bacterial translocation in animals with abdominal sepsis [14]. Glutamine has been used as a nutritional supplement in severely debilitated patients to reduce the deleterious effects of oxidative stress. It has been shown that preventing oxidative stress in patients with severe conditions or multiple traumas or undergoing major surgery is useful as a treatment adjunct [15]. The glutamine was then used in patients with Crohn's disease (granulomatous enterocolitis) and ulcerative rectocolitis. Because of the importance of active oxygen species in the genesis of colitis, the relationship between oxidative stress and the supposed beneficial clinical effect of glutamine in colitis has become a subject of research [16].

The aim of our study was to investigate the effects of glutamine treatment in an animal model of mesenteric I/R.

2 Materials and methods

2.2 Animals

Male Wistar rats (250-300 g; State Foundation for Production and Health Research (Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde-FEPPS)) were housed in a controlled environment and allowed access to food and water *ad libitum*. Animal care was in compliance with the normative resolution 04/97 of the Research and Ethics Committee of the Health Research Group and Graduate Teaching Hospital of Porto Alegre (Hospital de Clínicas de Porto Alegre-HCPA) [17].

2.3 Surgical procedures

After trichotomy, rats were anesthetized with ketamine and xylazine solution (45 mg/kg intraperitoneally (i.p.)). After midline laparotomy, the celiac and superior mesenteric arteries were isolated near their aortic origins. During this procedure, the intestinal tract was placed between gauze pads soaked with warm 0.9% NaCl solution. The superior mesenteric artery and the celiac trunk were clamped, resulting in total occlusion of these arteries for 30 min to induce splanchnic artery occlusion injury. After occlusion, the clamps were removed, and after 15 min of reperfusion, intestinal segments (10 cm) and pieces of the lung were removed for histological examination and biochemical studies.

2.3 Experimental groups

Rats were randomly allocated into the following groups:

1. Ischemia/Reperfusion (I/R): rats were subjected to splanchnic artery occlusion injury (30 min) followed by reperfusion (15 min) (n=5);
2. Ischemia/Reperfusion + Glutamine group (G+I/R): identical to the Ischemia/Reperfusion group but were treated with glutamine (25 mg/kg i.p.) 24 and 48 h before I/R (n=5);
3. Control group (Control): rats were subjected to identical surgical procedures as the above groups, except the blood vessels were not occluded and the rats were maintained under anesthesia for the duration of the experiment (n=5);

4. Control + Glutamine group (Control-GLU): identical to the Control group except for the administration of glutamine (25 mg/kg i.p.) 24 and 48 h before identical surgical procedures (n=5).

The glutamine treatment dose of 25 mg/kg i.p was chosen based on previous studies [18] .

2.4 Assessment of lipid peroxidation

2.4.1 Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

Tissue samples were placed in test tubes; solutions were added in the following order: 0.75 ml of 10% trichloroacetic acid (TCA), 0.25 ml of homogenate, 0.5 ml of 0.67% thiobarbituric acid (TBA), and 0.25 ml of distilled water.

TBARS consists of heating the homogenate with thiobarbituric acid and measuring the consequent formation of a colored product in a spectrophotometer at 535 nm. The coloration is due to the presence of malondialdehyde and other substances from biological lipid peroxidation [19].

2.5 SOD activity

SOD was measured according to Misra and Fridovich. The rate of auto-oxidation of epinephrine, which is inhibited by SOD, is measured in the presence of progressively increasing doses of SOD with a spectrophotometer at 560 nm. The amount of enzyme that inhibits auto-oxidation of epinephrine at 50% of the maximum dose is defined as 1 U SOD [20].

2.6 Evaluation of NF- κ B and IL-6

To prepare slides for subsequent immunohistochemical analysis, tissue was sectioned at 3- μ m thickness using a microtome (Leica SM 2000R, Germany). The sections were placed on slides pretreated with HistoGrip (Zymed, USA) and incubated in an oven at 60°C for 24 h.

Sections were deparaffinized by incubating in xylene three times for 10 min, followed by rehydration of the sections using decreasing concentrations of ethanol. Antigen exposure was performed using the pTLINK platform (DAKO) for 40 min at 98°C with the Envision Flex antigen retrieval solution, high pH (DAKO). The slides were then immediately washed in

phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2. The blocking of endogenous peroxidases was performed with two 15-min incubations in a 3% solution of H₂O₂ in methyl alcohol, which were followed by three washes with PBS, pH 7.2. Non-specific binding was blocked using the commercial solution Serum-Free Protein Block (Dako, USA) for 30 min at room temperature. The sections were incubated using the immunostaining Sequenza station (Thermo Shandon, USA) overnight at 2°C and 6°C and with the following primary antibodies diluted in Antibody Diluent with Background Reducing Components (Dako, USA): anti-NF-κB (Santa Cruz Biotechnology, USA) at 1:100 and anti-IL-6 (Santa Cruz Biotechnology, USA) at 1:100. After incubation with the primary antibody, sections were washed three times in PBS, pH 7.2. To amplify the antigen-antibody reaction, the Advance system HRP was used for IL-6 (Dako, USA) according to the manufacturer's recommendations, and for NF-κB, goat anti-rabbit IgG-HRP secondary antibody was used at 1:300 in PBS for 30 min at room temperature. Next, the slides were washed with PBS and incubated with diaminobenzidine (Dako Liquid DAB Substrate Chromogen System, USA) for 5 min. After washing with distilled water, slides were counterstained with Harris hematoxylin for 1 min, washed with water until complete removal of the dye and incubated in a 37 mM ammonia solution for 15 sec. Finally, the slides were dehydrated in absolute ethanol (four incubations of 2 min) and two treatments with xylene for 5 min. The slides were mounted with Entellan synthetic medium (Merck, Germany) [21].

2.7 Analysis of digital images

We used a digital analysis system composed of a Zeiss Axioskop 40 microscope (Oberkochen, Germany) with Neofluar lenses connected by a Roper Scientific video camera (Media Cybernetics, Rockville, USA) to a computer with an Image Capture Pro kit (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA) capture card. Image Pro Plus version 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, USA) was used to analyze digital images. The images were captured

in TIFF (True Image File Format) format without compression by the same examiner with a light intensity pattern for all photos. Images were captured of at least fifteen random, nonoverlapping fields for each histological slide at 200X magnification (44 pixel = 1 μ m). The hot spot method was used to select fields on slides with focal positivity for the markers. Color selection was performed interactively by three trained observers and was then applied to all samples by the automated digital image analysis system. The initial area considered was 0.01 cm.

2.8 Data analysis

Quantitative data were initially described by mean and standard deviation. To compare groups, we used analysis of variance (ANOVA). For categorical data, we used scores and comparisons based on Fisher's exact test.

Analysis of variance with robust standard errors (Welch) was used to verify NF- κ B and IL-6 results between groups.

The significance level for the experiments was $p < 0.05$. Data were analyzed with SPSS version 21.0.

3 Results

3.1 Evaluation of oxidative stress by analysis of lipid peroxidation

Lipid peroxidation of the membrane was increased in both the gut and the lung in the animals subjected to I/R ($p < 0.05$). However, the group that received glutamine 24 and 48 h before the I/R procedure showed levels of lipid peroxidation similar to the control groups (animals not subjected to I/R and also the group receiving glutamine without I/R) that were significantly different from animals who only received I/R ($p < 0.05$).

3.2 SOD activity

The activity of the antioxidant enzyme SOD was decreased in the gut of animals subjected to I/R. These findings were statistically significant ($p < 0.05$) when compared with the control

group of animals not subjected to I/R. However, the group that received glutamine 24 and 48 h before I/R showed similar SOD activity to both control groups not subjected to I/R. There was a significant difference between the group of animals subjected to I/R and the group that received glutamine before I/R, suggesting that glutamine is a protective factor for mesenteric I/R.

3.3. NF- κ B transcription factor

Image Pro Plus version 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, USA) was used to analyze digital images. The images were captured in TIFF (True Image File Format) format without compression by the same examiner with a light intensity pattern for all photos. Images were captured at of least fifteen random, nonoverlapping fields for each histological slide at 200X magnification (44 pixel = 1 μ m). The hot spot method was used to select fields on slides with focal positivity for the marker. We calculated the mean area of NF- κ B staining for each of the groups. The Control and Control-GLU groups presented similar mean areas. The I/R group showed the largest area of staining. The G+I/R group had the second highest amount of staining, but the mean value was much lower than that of the I/R group. The same differences were observed among groups in the large intestine and the lung. These findings were statistically significant ($p < 0.05$).

3.4 Evaluation of IL-6

Images of IL-6 staining were analyzed in the same method as those stained for NF- κ B. Again, the Control and Control-GLU groups showed similar areas of staining. The I/R group contained the largest area of staining, followed by the G+I/R animals; however, this area was significantly lower than that of the group that underwent I/R without glutamine ($p < 0.05$).

4 Discussion

Intestinal injury resulting from I/R is common in a variety of clinical conditions, such as small bowel transplantation, heart or aortic surgery and septic shock. I/R affects individuals of different age groups and causes high mortality [1].

This study demonstrates that glutamine treatment exerts important protective effects against splanchnic artery occlusion injury. Our data provide evidence that glutamine attenuates: (1) the lipid peroxidation of gut mucosa, (2) the decrease in SOD activity and the increases in (3) NF- κ B expression and (4) IL-6 expression that occur after I/R.

Glutamine is an amino acid considered essential during catabolic stress situations. A number of studies have shown that glutamine may attenuate the release of inflammatory interleukins and minimize MOF following trauma [15].

In the I/R state, there is a destruction of the mucosal barrier by lipid peroxidation, with consequent bacterial translocation and the activation of inflammatory responses [3].

In our study, the amount of lipid peroxidation was greater in the group of animals subjected to I/R. The addition of glutamine significantly decreased lipid peroxidation compared with animals that underwent I/R without glutamine treatment. Mondello and He observed similar beneficial results of glutamine for I/R [11, 22]. However, in contrast, Fukatsu revealed that IV infusion of glutamine during gut ischemia was detrimental in terms of survival and organ injury in a murine gut I/R model due to increased priming of circulating myeloid cells [23].

We also assessed SOD activity. During I/R, oxygen-derived free radicals are generated. Under normal conditions, these radicals are neutralized by endogenous antioxidant enzymes such as SOD. However, oxidative stress occurs when the production of oxidants exceeds the capacity of the antioxidant defense systems of the cell or when effectiveness of the oxidant defense system decreases [5].

In our study, SOD activity was decreased in animals receiving I/R. In the Control and Control-GLU groups, the decrease in SOD activity was much lower and similar between the

two groups. The addition of glutamine to animals receiving I/R produced a decrease that was not as significant but lower than that found in the I/R group. The first authors to describe the role of SOD in oxidative stress were Misra and Fridovich [20]. Since then, several authors have cited the importance of this antioxidant enzyme in situations of oxidative stress [16].

Sen and Baltimore published the first report on NF- κ B, and the role of this transcription factor in development remains controversial [7]. Tissue I/R activates families of protein kinases that converge on specific transcription factors (protein activator-1 (PA-1) and NF- κ B) that regulate the expression of proinflammatory genes. According to Haddad et al., NF- κ B appears to perform an important function in the generation and resolution of intestinal I/R lesions [8]. Bowie and O'Neill determined that in the most cases, the role of oxidative stress in NF- κ B activation is at best facilitatory rather than causal, if a role exists at all [24]. Ypsilantis et al. concluded that prophylaxis with mesna prevents oxidative stress induced by I/R in the intestine via inhibition of NF- κ B activation [25].

In our study, the activity of NF- κ B was higher in both the intestine and the lung in the group subjected to I/R. However, in the group of animals that received prophylactic glutamine i.p. 24 and 48 h before I/R, the levels of NF- κ B were lower. This difference between groups was statistically significant.

As cited, ROS-mediated oxidative injury as a consequence of increased production of inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6 and neutrophil activation play critical roles in the pathogenesis of I/R. TNF- α and IL-6 not only directly induce tissue damage but are also potent activators of neutrophils. The neutrophils and their enzymatic products cause increased microvascular permeability, perivascular and interstitial edema, and even remote organ injury such as pulmonary edema when sequestered in intestinal tissue. Cuzzocrea et al. demonstrated that IL-6 plays an important role in I/R injury and allows the hypothesis that inhibition of IL-6 may represent a novel and possible strategy [9].

In our study, similarly to NF- κ B, IL-6 was found to be high in animals that underwent I/R in both the intestine and the lung. The Control and Control-GLU groups showed similar results, with observed levels well below those of the I/R group. However, the group that received a potentially protective factor, glutamine, before I/R showed higher values than the Control and Control-GLU groups but levels that were statistically inferior to the I/R group.

5 Conclusion

In conclusion, this study demonstrates that i.p. administration of glutamine at a dose of 25 mg/kg 24 and 48 h before animals are subjected to 30 min of mesenteric ischemia and 15 min of reperfusion effectively protected against lipid peroxidation and preserved SOD activity.

The activity of NF- κ B and IL-6 were also reduced upon i.p. administration of glutamine 24 and 48 h prior to I/R in rats.

References

- 1 Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir Bras*. 2005;20:336-343.
- 2 Ding Y, Zhang Y, Peng T, et al. Observation of mesenteric microcirculatory disturbance in rat by laser oblique scanning optical microscopy. *Sci Rep*. 2013;3:1762.
- 3 Moore EE, Moore FA, Franciose RJ, Kim FJ, Biffl WL, Banerjee A. The posts ischemic gut serves as a priming bed for circulating neutrophils that provoke multiple organ failure. *J Trauma*. 1994;37:881-887.
- 4 Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol*. 1986;250:G749-753.
- 5 Gutiérrez MB, Miguel BS, Villares C, Gallego JG, Tuñón MJ. Oxidative stress induced by Cremophor EL is not accompanied by changes in NF-kappaB activation or iNOS expression. *Toxicology*. 2006;222:125-131.
- 6 Zingarelli B, Sheehan M, Wong HR. Nuclear factor-kappaB as a therapeutic target in critical care medicine. *Crit Care Med*. 2003;31:S105-S111.
- 7 Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*. 1986;47:921-928.
- 8 Haddad JJ. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell Signal*. 2002;14:879-897.
- 10 Cuzzocrea S, De Sarro G, Costantino G, et al. IL-6 knock-out mice exhibit resistance to splanchnic artery occlusion shock. *J Leukoc Biol*. 1999;66:471-480.
- 10 Deitch EA, Xu D, Kaise VL. Role of the gut in the development of injury- and shock-induced SIRS and MODS: the gut-lymph hypothesis, a review. *Front Biosci*. 2006;11:520-528.

- 11 He GZ, Dong LG, Chen XF, Zhou KG, Shu H. Lymph duct ligation during ischemia/reperfusion prevents pulmonary dysfunction in a rat model with ω -3 polyunsaturated fatty acid and glutamine. *Nutrition*. 2011;27:604-614.
- 12 Curi R, Lagranha CJ, Doi SQ, et al. Molecular mechanisms of glutamine action. *J Cell Physiol*. 2005;204:392-401.
- 13 Klimberg VS, Souba WW, Dolson DJ, et al. Prophylactic glutamine protects the intestinal mucosa from radiation injury. *Cancer*. 1990;66:62-68.
- 14 Gianotti L, Alexander JW, Gennari P, Babcock GF. Oral glutamine decreases bacterial translocation and improves survival in experimental gut-origin sepsis. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 1995;19:69-74.
- 15 Demirkan A, Savaş B, Melli M. Endotoxin level in ischemia-reperfusion injury in rats: effect of glutamine pretreatment on endotoxin levels and gut morphology. *Nutrition*. 2010;26:106-111.
- 16 Pravda J. Radical induction theory of ulcerative colitis. *World Journal of Gastroenterology*. 2005;11: 2371-2384.
- 17 Goldim JR, Raymundo MM. *Research in health and animal rights*. Porto Alegre: Hospital da Clínicas de Porto Alegre; 1995.
- 18 Marques C, Mauriz JL, Simonetto D, et al. Glutamine prevents gastric oxidative stress in an animal model of portal hypertension gastropathy. *Ann Hepatol*. 2011;10:531-539.
- 19 Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1984;105:114-121.
- 20 Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972;247:3170-3175.

- 21 Grootjans J, Lenaerts K, Derikx JP, et al. Human intestinal ischemia-reperfusion-induced inflammation characterized: experiences from a new translational model. *Am J Pathol.* 2010;176:2283-2291.
- 22 Mondello S, Galuppo M, Mazzon E, et al. Glutamine treatment attenuates the development of ischaemia/reperfusion injury of the gut. *Eur J Pharmacol.* 2010;643:304-315.
- 23 Fukatsu K, Ueno C, Hashiguchi Y, et al. Glutamine infusion during ischemia is detrimental in a murine gut ischemia/reperfusion model. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2003;27:187-192.
- 24 Bowie A, O'Neill LA. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol.* 2000;59:13-23.
- 25 Ypsilantis P, Tentes I, Lambropoulou M, et al. Prophylaxis with mesna prevents oxidative stress induced by ischemia reperfusion in the intestine via inhibition of nuclear factor-kappaB activation. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23:328-335.

Figure Legends

Figure 1. TBARS GUT/LUNG

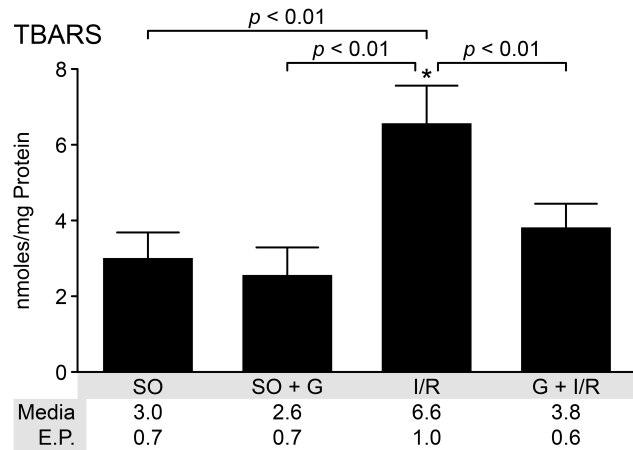
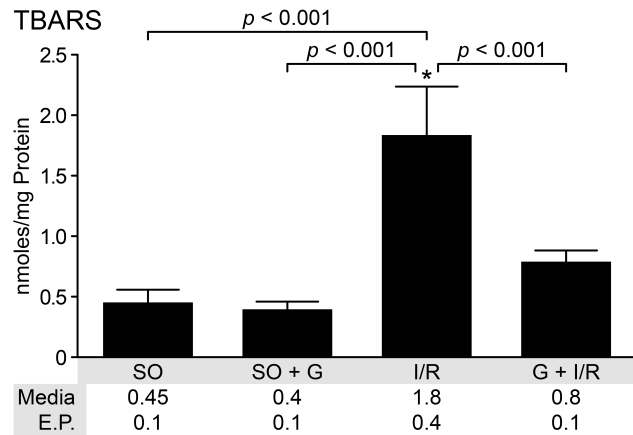
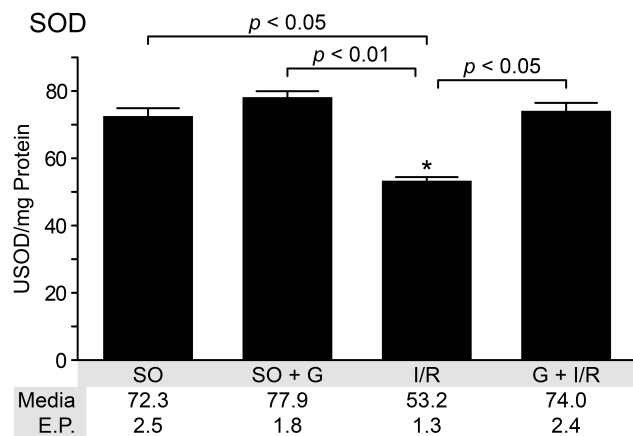


Figure 2. SOD GUT/LUNG



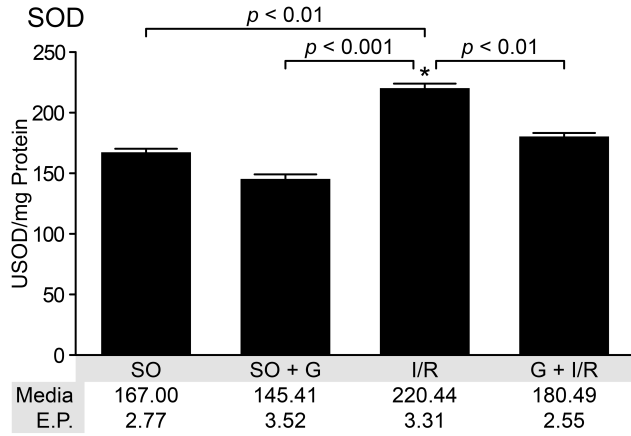


Figure 3. NF-KB GUT/LUNG

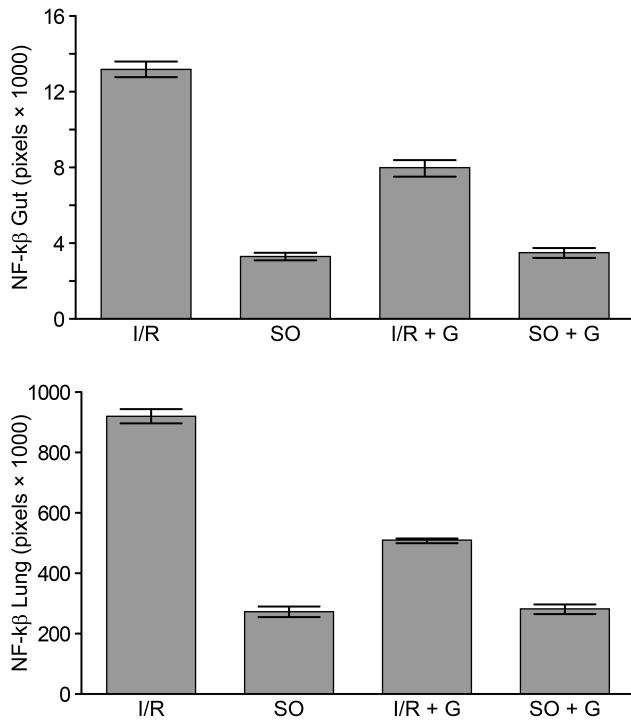
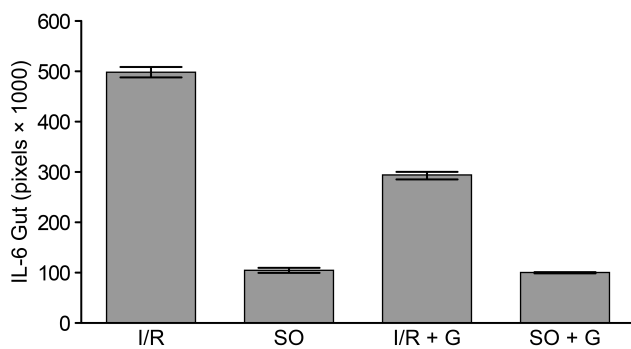
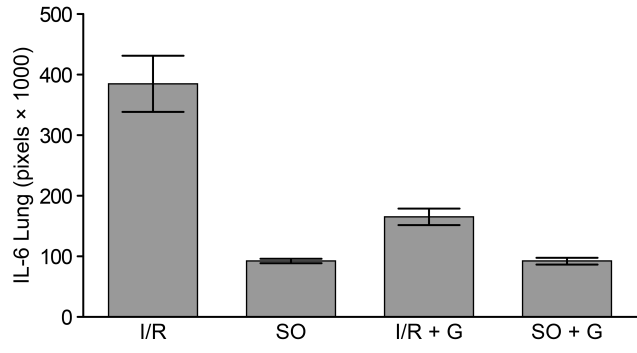


Figure 4. IL-6 GUT/LUNG





ANEXOS

ANEXO A – Comprovante de submissão do artigo

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO A – Comprovante de submissão do artigo

Dear Gilmara:

Thank you once again for the submission of your manuscript "THE ROLE OF GLUTAMINE IN OXIDATIVE STRESS IN THE GUT AND LUNGS OF ANIMALS UNDERGOING MESENTERIC ISCHEMIA AND REPERFUSION" to Digestive Diseases and Sciences. Your manuscript has been assigned to an editor and given the following manuscript number: DDSJ-D-13-01743.

During the review process, you can keep track of your manuscript's status by accessing the following website:

<http://ddsj.edmgr.com/>

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 0120/12 – CEUA

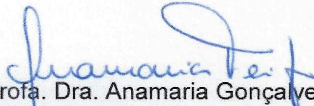
Porto Alegre, 05 de outubro de 2012.

Senhor Pesquisador:

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 12/00291, **“O papel da glutamina no estresse oxidativo do intestino e pulmão em animais submetidos à isquemia e reperfusão mesentérica”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,


Profª. Dra. Anamaria Gonçalves Feijó
Coordenadora da CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.
Profª Gustavo Franco Carvalhal
FAMED
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314
CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br

