



## EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM L-GLUTAMINA A 2% SOBRE A NEOGLICOGÊNESE INTESTINAL EM RATOS PORTADORES DE CAQUEXIA DO CÂNCER

Mariana Inocencio Manzano<sup>1</sup>, Larissa dos Santos Fávaro<sup>1</sup>, Heber Amilcar Martins<sup>2</sup>, Taisa Valques Lorencete<sup>3</sup>

**RESUMO:** O papel da neoglicogênese hepática e renal em condições fisiológicas e fisiopatológicas encontra-se bem estabelecido, porém a participação da neoglicogênese intestinal nestas condições é pouco compreendida, particularmente no que se refere ao jejum prolongado e a caquexia no câncer. O intestino delgado expressa como enzimas chave da neoglicogênese a glicose-6-fosfatase (G6Pase) e a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), sendo a G6Pase a principal enzima desta via, apresentando como precursores neoglicogênicos a glutamina e o glicerol. Além disso, a neoglicogênese intestinal é suprimida pela ação da insulina, dando a este órgão o status de insulino-sensível e o reconhecimento como o terceiro órgão neoglicogênico. O câncer, por sua vez, é considerado o maior problema de saúde pública no mundo e a manifestação mais frequente no avanço maligno da doença é a caquexia, condição resultante do predomínio de vias catabólicas, inibição de vias anabólicas e anorexia. A presença de tumor de Walker-256 prejudica o metabolismo da L-glutamina, principal precursor neoglicogênico no intestino delgado e rins. Desta forma, o intestino, em particular, é seriamente afetado pela redução da utilização de seu principal substrato energético, a L-glutamina. Frente ao quadro exposto, este trabalho objetiva avaliar o impacto da caquexia do câncer sobre o processo da neoglicogênese intestinal em ratos portadores de tumor de Walker-256. Utilizaremos quatro grupos experimentais: C- Animais controle; CG- Animais controle suplementados com L-glutamina; TW- Animais portadores de tumor de Walker-256; TWG- Animais portadores de tumor de Walker-256 suplementados com L-glutamina. Os animais serão acompanhados por 5 dias e submetidos ao jejum de 48 horas ao final do período de suplementação para avaliação da expressão e quantificação da enzima PEPCK através da intensidade de brilho emitido nas imunomarcações, tomando como objeto de estudo o duodeno. Através dos dados obtidos espera-se avaliar o impacto da presença do câncer, bem como das alterações metabólicas sobre a neoglicogênese intestinal que poderá estar diminuída, uma vez que esta interfere diretamente no metabolismo energético deste órgão, prejudicando principalmente a via da L-glutamina, ou estar aumentada, pois estudos demonstraram a existência de um ciclo entre as células tumorais e o fígado, estimulando a neoglicogênese hepática, não deixando de levar em consideração a suplementação com L-glutamina, que pode potencializar a via neoglicogênica no intestino delgado, o que poderia levar a duas situações distintas, a melhora na perda de massa corporal mediada pela caquexia ou uma piora do quadro neoplásico.

**PALAVRAS-CHAVE:** Caquexia no câncer; L-glutamina; Neoglicogênese intestinal.

### 1 INTRODUÇÃO

#### 1.1 O CÂNCER COMO UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA

O câncer é considerado o maior problema de saúde pública em diversos países, representa a segunda causa de morte no Brasil, segundo dados do Inca, (2009), Estados Unidos e Europa, como demonstra Argilés, (2005), em seu trabalho. No âmbito global, o câncer foi responsável por 13% das mortes ocorridas no mundo em 2005, e as estimativas apontam para o surgimento de novos casos anuais na ordem de 15 milhões em 2020, dos quais 60% ocorrerão em países em desenvolvimento (Inca, 2007).

#### 1.2 CAQUEXIA

A perda de peso é uma manifestação freqüente em doenças inflamatórias crônicas, incluindo o câncer, representando cerca de 22% das causas de morte de pacientes portadores de câncer quando a perda de massa corpórea supera 30%. Neste contexto, a perda de massa muscular é o fator mais impactante na perda de peso corporal total, sendo reflexo tanto da anorexia quanto da má absorção de nutrientes mediadas pelas células tumorais, um processo complexo e multifatorial, a caquexia, que pode representar cerca de 5% da perda de massa corporal total em um período de seis meses, sendo mais comum em idosos e crianças, tornando-se mais pronunciada à medida que a neoplasia evolui (Guarnier et al., 2010).

<sup>1</sup> Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR



### 1.3 NEOGLICOGÊNESE

O sinal para a deflagração de mecanismos que atuam sobre a homeostase glicêmica é a própria concentração de glicose no sangue, detectada por células especializadas (glicoreceptores) presentes na parede da veia porta e que levam a informação ao sistema nervoso central (SNC) via conexão vagal aferente para o hipotálamo ou para os núcleos do trato solitário, tendo como resposta vários mecanismos de contra-regulação, como a sensação de fome e a neoglicogênese (Mithieux, 2005; Mithieux et al., 2009; Mithieux, 2009).

Para que não ocorra interrupção do suprimento de glicose, o organismo possui mecanismos de manutenção da glicemia no jejum (Watford, 2005). À medida que a glicemia declina na ausência de refeições, o fígado inicia a degradação do glicogênio, mantendo a glicemia em valores normais

#### 1.3.1 o intestino delgado como órgão neoglicogênico

O principal produtor de glicose nos mamíferos é o fígado, e, em menor proporção, os rins, em ratos, humanos e cães (Mithieux et al., 2006). Recentemente, estudos em ratos demonstraram a participação do intestino delgado na produção endógena de glicose no jejum prolongado e diabetes, sendo classificado como o terceiro órgão neoglicogênico (Croset et al., 2001; Mithieux et al., 2004a; Mithieux et al., 2004b; Mithieux et al., 2005; Mithieux, 2005; Haldol et al., 2005; Watford, 2005). Em contraste com o fígado, a neoglicogênese intestinal tem como precursores a L-glutamina e o glicerol (Croset et al., 2001).

Estudos em ratos onde a PEPCK hepática encontra-se inibida e em humanos durante a fase anepática do transplante de fígado verifica-se a importância da neoglicogênese extra-hepática. Além disso, há estudos evidenciando que mesmo na ausência e/ou deficiência da PEPCK hepática, ocorre uma adaptação ao jejum, isto é, manutenção da glicemia,

#### 1.4 A G6PASE NO INTESTINO DELGADO

A expressão do gene da G6Pase é encontrada no duodeno, jejuno e íleo de ratos e humanos, estando a proporção de mRNA da G6Pase aumentada cerca de seis a oito vezes em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, com aumento de 300% na atividade da G6Pase em relação a ratos não diabéticos durante o jejum prolongado (Rajas et al., 1999).

A indução da expressão e da atividade da G6Pase no intestino delgado ocorre através da resposta hormonal deflagrada pelo SNC, através do aumento na concentração de glucagon e glicocorticóides e redução da concentração insulina no sangue (Chatelain et al., 1998; Rajas et al., 1999). Este mecanismo, embora não seja o único envolvido, desempenha papel crucial na indução e controle das enzimas neoglicogênicas no intestino delgado.

#### 1.5 L-GLUTAMINA

A L-glutamina é um importante precursor de peptídeos, proteínas, açúcar, purina, pirimidina e conseqüentemente, síntese de ácidos nucléicos e nucleotídeos (Newsholme et al., 2003a; Newsholme et al., 2003b). Em adição, a L-glutamina tem um papel fundamental no controle do estresse oxidativo, considerando sua importância na formação de glutathione, um poderoso anti-oxidante endógeno envolvido na neuroproteção frente ao DM além de constituir a principal fonte de energia para a migração celular e proliferação da mucosa intestinal (Tashima et al., 2007; Alves et al., 2010).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 OBTENÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO

Serão utilizados neste estudo o duodeno e o jejuno de ratos adultos machos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), gentilmente cedidos pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Jacqueline Nelisis Zanoni, do Departamento de Ciências Morfológicas, da Universidade Estadual de Maringá, cujo protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá sob o Parecer 062/2012.

Os ratos então com 54 dias de idade, foram disponibilizados para o período experimental que terá duração de 5, 10 e 14 dias. Portanto, serão distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, contendo 12 animais cada, segundo os tratamentos a que serão submetidos (Tabela 1):

---

<b>Grupo C</b>	Animais controle
<b>Grupo CG</b>	Animais controle suplementados com L-glutamina a 2%
<b>Grupo TW</b>	Animais portadores de tumor de Walker-256

---

**Grupo TWG** Animais portadores de tumor de Walker-256 suplementados com L-glutamina a 2%**Tabela 1.** Divisão dos grupos experimentais.

Os animais dos grupos TW e TWG foram inoculados com uma suspensão de células tumorais Walker-256 (8,0 x 10<sup>7</sup> células tumorais viáveis em 0,5 mL em tampão fosfato salino (PBS) 16,5 mM, pH 7,5 por animal) injetado no flanco direito traseiro. Os animais controle, inoculados com PBS 16,5 mM, pH 7,5 no mesmo local (Guarnier et al., 2010). Células tumorais de Walker-256 foram gentilmente cedidas pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Flávia Guarnier do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina.

Os animais não suplementados (grupos C e TW) receberam ração padrão balanceada Nuvilab (Nuvital, Colombo, PR, Brasil) enquanto nos animais suplementados (grupos CG e TWG), a L-glutamina (Ajinomoto Interamericana Ind. e Com. Ltda, Limeira, SP, Brasil) foi incorporada à ração padrão na proporção de 2 g/100 g de ração. A ração deverá ser moída e acrescentada a L-glutamina, em seguida reconfecionada em pellets e então posteriormente secos em estufas (Alves et al, 2010).

## 2.2 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL

Ao final do período experimental os animais suplementados e não suplementados foram submetidos a um período de jejum de 48 horas, sendo em seguida pesados e anestesiados com tiopental sódico (Laboratórios Abbott, Chicago, IL, EUA) via intraperitoneal (40 mg/kg), sendo mortos sob aproveitamento de anestésico. Duas horas antes da eutanásia dos animais, foram injetados via intravenosa, 0,5 mg/Kg de peso corporal de sulfato de vincristina (Tecnocris®, Zodiac Produtos Farmacêuticos S/A, Pindamonhangaba, SP, Brasil) em cada animal, para o estudo da mucosa intestinal. O sangue será coletado por punção cardíaca para mensuração dos parâmetros plasmáticos. Após celiotomia os segmentos de duodeno, jejuno e íleo serão coletados e processados segundo as técnicas analíticas em que serão submetidos a Cortes histológicos para a análise quantitativa das células da mucosa imunomarcadas para G6Pase e da PEPCK; Cortes histológicos para análise da expressão da G6Pase e da PEPCK através da intensidade de brilho.

## 2.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DA PEPCK PELA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA

### 2.3.1 preparação das amostras para imunohistoquímica

1. Fixação imediata em solução de Zamboni (paraformaldeído 4% e ácido pícrico 0,4% em tampão fosfato), por 6 horas a 4°C;
2. Lavagens repetidas com PBS 0,1M pH 7,4, por 12 horas;
3. Crioproteção em solução de sacarose 18% em PBS 0,1M pH 7,4, por 12 horas;
4. Congelamento em nitrogênio líquido, após terem sido envolvidos em meio de embebição para tecidos congelados (OTC);

#### 2.3.2 Imunohistoquímica

As reações serão realizadas para PEPCK, em lâminas distintas, como segue:

- 1<sup>o</sup> dia: 1. As lâminas serão trazidas à temperatura ambiente e lavadas por três vezes, durante 10 minutos cada, com PBS 0,1M pH 7,4, e escorridas;
2. Aplicar-se-á 200 µL de soro de cabra (1:10) sobre as lâminas, sendo então encubadas em temperatura ambiente por 30 minutos em câmara úmida;
3. As lâminas serão escorridas;
4. Aplicar-se-á 200 µL de anticorpo primário anti-PEPCK (1:200) produzidos em coelho ou controle negativo, sendo então incubadas a 4°C por 24 horas em câmara úmida.

## 2.4 ANÁLISE DA INTENSIDADE DE BRILHO EMITIDO NAS IMUNOMARCAÇÕES COM G6PASE E PEPCK

A quantificação do brilho emitido nas imunomarcações para G6Pase e PEPCK será realizada através de imagens obtidas por amostragem utilizando 25 imagens por segmento (duodeno e jejuno) por animal com aumento de 20X (Zanoni e Pereira, 2008).

As imagens serão capturadas por câmera de alta resolução Moticam® 2500 5.0 Mega Pixel (Motic China Group Co., Shanghai, China) acoplada ao microscópio óptico de fluorescência Olympus® BX40 (Olympus Co., Japão), transferidas para microcomputador através do software Motic Images Plus® 2.0ML (Motic China Group Co., Shanghai, China) e gravadas.

## 3 RESULTADOS ESPERADOS



Baseados nos dados da literatura esperamos avaliar o impacto da presença do câncer, bem como das alterações metabólicas, sobre a neoglicogênese intestinal, que aparente pode ser influenciada de duas formas: a) estar diminuída, uma vez que interfere de maneira direta no metabolismo energético deste órgão, prejudicando principalmente a via da L-glutamina, o principal substrato energético para o intestino delgado e, o principal precursor neoglicogênico neste tecido; b) estar aumentada, pois os estudos demonstraram a existência de um ciclo entre as células tumorais e o fígado, estimulando a neoglicogênese hepática, se a mesma relação ocorrer entre o tumor e o intestino delgado. Vale a pena destacar, o papel da suplementação com L-glutamina, que pode potencializar a via neoglicogênica no intestino delgado, o que poderia levar a duas situações distintas, a melhora na perda de massa corporal mediada pela caquexia ou uma piora do quadro neoplásico, considerando que o incremento de glicose sanguínea pode ser captado pelas células tumorais, potencializando o seu desenvolvimento.

## REFERÊNCIAS

BATTEZZATI, A.; CAUMO, A.; MARTINO, F.; SERINI, L. P.; COPPA, J.; ROMITO, R.; AMMATUNA, M.; REGALIA, E.; MATTHEWS, D. E.; MAZZAFERRO, V.; LUZI, L. Nonhepatic glucose production in humans. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v. 286, n. 1, p. 129-35, 2004.

INCA. Instituto Nacional De Câncer. **Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro. 2009.

MITHIEUX, G.; ANDRELLI, F.; MAGNAN, C. Intestinal gluconeogenesis: key signal of central control of energy and glucose homeostasis. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 12, n. 4, p. 419-23, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

RAMOS LIMA, M. M.; de MELLO, M. A.; CURI, R. Walker 256 tumour growth causes marked changes of glutamine metabolism in rat small intestine. **Cell Biochemistry and Function**, v. 20, n. 2, p. 107-113, 2002.

TIJERINA, A. J. The biochemical basis of metabolism in cancer cachexia. **Dimensions of Critical Care Nursing**, v. 23, n. 6, p. 237-243, 2004.