

KÁTIA ANUNCIÇÃO COSTA

**EFEITO DA ARGININA DIETÉTICA NA
PERMEABILIDADE INTESTINAL E
TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA INDUZIDAS
POR EXERCÍCIO FÍSICO PROLONGADO NO
CALOR**

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2012

KÁTIA ANUNCIÇÃO COSTA

**EFEITO DA ARGININA DIETÉTICA NA
PERMEABILIDADE INTESTINAL E
TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA INDUZIDAS
POR EXERCÍCIO FÍSICO PROLONGADO NO
CALOR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso

Co-orientador: Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra

Colaboradores: Prof. Dr. Samuel Penna Wanner

Prof^a. Dra. Simone O. F. Diniz

Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli

Prof. Dr. Flaviano S. Martins

Prof. Dr. Geovanni D. Cassali

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2012

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dedico este trabalho aos meus pais e às minhas irmãs, sempre presentes, acreditando e incentivando meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela luz, força e persistência;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso, mentor deste estudo, pela confiança, amizade, por transmitir todo entusiasmo e alegria pela pesquisa e por fornecer todas as condições necessárias à realização deste trabalho;

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra, por permitir o estudo deste modelo experimental, abrindo portas para novos trabalhos;

Ao Prof. Dr. Samuel Penna Wanner, que também co-orientou este trabalho, de forma preciosa, se fazendo sempre presente e cuidando de cada detalhe, com muita paciência e dedicação, sem medir esforços;

À Prof^a. Dra. Simone Odília Antunes Fernandes, pela colaboração e ensinamentos no Radioisótopos, e pelo fornecimento de todos os materiais necessários ao trabalho;

Ao Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli pela disponibilização do seu laboratório para a execução da dosagem de slgA;

Ao Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins, pela atenção e ajuda na dosagem de slgA;

Ao Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali pela dedicação com as análises histológicas;

À grande amiga e companheira de pesquisa, Anne Danieli Nascimento Soares, que somou eficiência ao trabalho. Sem a sua ajuda, não seria possível chegar ao fim desta etapa.

Aos colegas do laboratório de Fisiologia e Farmacologia do ICB, pela divisão da salinha;

A todos os alunos e amigos do laboratório de Radioisótopos, em especial aos doutorandos Iara Pacífico Quirino e Leonardo Lima Fuscaldi pelos ensinamentos e ajuda com a manipulação dos animais e com as técnicas de laboratório;

À doutoranda Rosana das Graças Carvalho dos Santos, pelos preciosos conselhos e ideias, e pela paciência ao ensinar as técnicas de laboratório, imprescindíveis para que o trabalho fosse realizado da melhor forma;

Aos alunos de Iniciação Científica do Radioisótopos, em especial à Brenda de Melo, Igor Murta e Pedro Vitor Fernandes, e à mestranda Maria Emília Rabelo, pela grande ajuda no cuidado com os animais e procedimentos do laboratório;

Ao Vanderli Pacheco, por providenciar materiais e equipamentos prontamente, e por cuidar da organização, segurança e conforto do ambiente de trabalho;

À Etna, pela companhia, alegria e pelos cafezinhos;

Aos funcionários do Biotério da FAFAR/UFMG, Adelaide e Batista, pela atenção, ajuda e carinho;

Às funcionárias da secretaria do Programa de Ciência de Alimentos, Marilene e Úrsula, pela disponibilidade;

A todos os colegas de mestrado do Programa de Ciências de Alimentos, em especial a Aline Cristina Pinheiro, Helem Sena, Juliana Almeida, Nádia Reis, Natália Caldeira, Natália Teixeira, Sílvia F. Maurício e Tatiana Bering, pela amizade, incentivo e apoio durante o mestrado;

Aos meus pais Edmar Eustáquio e Ângela Rita, por acreditarem e apoiarem meu trabalho, e pela compreensão nos momentos de ausência;

Às minhas irmãs, Kênia e Keila, pelo estímulo, paciência e companhia;

Ao Fernando, pelo amor e carinho durante todos esses anos;

Às minhas queridas amigas de faculdade, pelos conselhos, incentivos e pela torcida;

A CAPES, pelo apoio financeiro;

A todos que, de alguma forma, estiveram presentes e contribuíram para a realização deste trabalho!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Arginina.....	19
2.1.1 Síntese	20
2.1.2 Catabolismo.....	21
2.1.2.1 Óxido Nítrico.....	22
2.1.3 Atuação da Arginina na Resposta Imunológica	24
2.2.1 Microbiota Intestinal.....	27
2.2.2 Mucosa e Epitélio Intestinal	28
2.2.2.1 Testes de Permeabilidade Intestinal	30
2.2.3 Alterações do Sistema Imunológico	31
2.2.4 Determinação da Translocação Bacteriana.....	32
2.2.5 Arginina e Translocação Bacteriana	33
2.3 Hipertermia.....	34
2.3.1 Patogênese.....	34
2.3.2 Fisiopatologia	35
2.3.3 Hipertermia e Translocação Bacteriana	37
2.3.4 Efeitos da Arginina no Exercício e Estresse Térmico	37
3 OBJETIVOS	39
3.1 Objetivos gerais.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1 Material.....	40
4.1.1 Animais e Rações.....	40
4.2 Métodos.....	40
4.2.1 Implante de Sensor de Temperatura	40
4.2.2 Preparo das Rações	40
4.2.3 Tratamento dos Animais	41
4.2.4 Familiarização ao Exercício Físico.....	41
4.2.5 Modelo Experimental de Hipertermia Induzida pelo Exercício.....	42
4.2.5.1 Padronização da Intensidade do Exercício em Camundongos	42
4.2.5.2 Situação Experimental de Hipertermia	44
4.2.6 Estudo da Permeabilidade Intestinal	45

4.2.6.1 Marcação do DTPA com ^{99m} Tc.....	45
4.2.6.2 Determinação da Permeabilidade Intestinal.....	45
4.2.7 Estudo da Translocação Bacteriana.....	46
4.2.7.1 Marcação da E. coli com ^{99m} Tc	46
4.2.7.2 Determinação da Translocação Bacteriana	47
4.2.8 Histologia do Íleo.....	47
4.2.9 Concentração Intestinal de Imunoglobulina A Secretória (slgA)	48
4.2.10 Análises Estatísticas.....	48
5 RESULTADOS	50
5.1 Padronização da Intensidade do Exercício Físico em Esteira Rolante.....	50
5.2 Ganho de Peso, Consumo Diário de Ração, e Ingestão Calórica, Nitrogenada e de Arginina	52
5.3 Temperatura Abdominal Durante os Experimentos de Hipertermia	53
5.4 Permeabilidade Intestinal	55
5.5 Translocação Bacteriana	55
5.6 Histologia do Íleo.....	56
5.7 Concentrações de slgA no Fluido Intestinal	57
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÃO	64
7.1 PERSPECTIVAS.....	64
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

LISTA DE TABELAS

1	Ordem das situações experimentais de exercício físico - Quadrado latino.....	43
2	Ganho de peso, consumo diário de ração, e ingestão calórica, de nitrogênio e de arginina	53
3	Biodistribuição da <i>Escherichia coli</i> marcada com tecnécio-99m 4 horas após o término dos procedimentos experimentais	56

LISTA DE FIGURAS

1	Estrutura Química da Arginina.....	19
2	Síntese da Arginina	21
3	Vias principais do metabolismo da arginina.....	22
4	Amostragem de bactérias intestinais e mecanismos imunológicos.....	27
5	Transporte paracelular e componentes das junções <i>tight</i>	30
6	Alterações fisiopatológicas provocadas pela hipertermia que levam à disfunção sistêmica.....	35
7	Exercício físico em esteira rolante com ambiente aquecido (34°C)	44
8	Efeito da temperatura ambiente sobre a velocidade máxima durante o exercício com aumento progressivo da velocidade	50
9	Exercícios com aumento progressivo da velocidade em esteira com 5% de inclinação.....	51
10	Influência do ambiente e da velocidade da esteira sobre a temperatura abdominal e o tempo de exercício.....	52
11	Temperatura abdominal durante repouso (24°C) e exercício com velocidade constante de 8 m/min a 34°C (5% de inclinação da esteira).....	53
12	Temperatura abdominal dos animais tratados com dieta padrão ou suplementada com arginina durante exercício com velocidade constante de 8 m/min a 34°C (5% de inclinação da esteira).....	54
13	Temperatura abdominal dos animais tratados com dieta padrão ou suplementada com arginina durante repouso a 24°C.....	54
14	Permeabilidade intestinal 1, 4 e 6 horas após o término das situações experimentais.....	55
15	Análises histológicas do íleo.....	56
16	Concentrações de sIgA no fluido intestinal.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^{99m}Tc	- 99m Tecnécio
^{99m}Tc - DTPA	- DTPA marcado com 99m Tecnécio
^{99m}Tc - <i>E.coli</i>	- <i>Escherichia coli</i> marcada com tecnécio
^{99}Mo	- Molibdênio
AGAT	- Arginina-glicina-aminotransferase
AIN-93G	- Ração recomendada pelo <i>American Institute of Nutrition</i>
ASL	- Argininossuccinato liase
ASS	- Argininossuccinato sintase
ATP	- Adenosina trifosfato
C-Arg	- Situação controle – dieta suplementada com arginina
C-NS	- Situação controle – dieta não suplementada
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DTPA	- Ácido dietileno-triaminopentacético
<i>E.coli</i>	- <i>Escherichia coli</i>
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS	- Óxido nítrico sintase endotelial
GALT	- Tecido linfóide associado à mucosa gastrintestinal
GAMT	- Guanidino-acetato-metiltransferase
HCl	- Ácido clorídrico
H-Arg	- Situação hipertermia – dieta suplementada
H-NS	- Situação hipertermia – dieta não suplementada
IgA	- Imunoglobulina A
IGF	- Fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1	- Interleucina-1
IL-10	- Interleucina-10
IL-12	- Interleucina-12
IL-4	- Interleucina-4
INF- γ	- Interferon-gama
iNOS	- Óxido nítrico sintase indutiva
MBq	- Megabequerel
$\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$	- Pertecnetato de sódio
NADPH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NAG	- N-acetil-glutamato
NAGS	- N-acetil-glutamato-sintetase
NO	- Óxido nítrico
NOS	- Óxido nítrico sintase
<i>n</i> NOS	- Óxido nítrico sintase neuronal
OAT	- Ornitina aminotransferase
OTC	- Ornitina transcarbamilase
ODC	- Ornitina descarboxilase
P5C	- Pirrolina-5-carboxilase
PBS	- Tampão fosfato salina
slgA	- Imunoglobulina A secretória
SIRS	- Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
TLR	- Receptor <i>Toll-like</i>
TNF- α	- Fator de necrose tumoral- α
UFC	- Unidades formadoras de colônia

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o possível papel protetor da arginina na redução da permeabilidade intestinal e translocação bacteriana (TB) em camundongos submetidos a exercício físico prolongado em ambiente quente. Experimentos preliminares foram conduzidos para se determinar as alterações da temperatura corporal interna dos camundongos induzidas pelo exercício em esteira rolante. Os exercícios realizados em ambiente quente (34°C) induziram maiores aumentos de temperatura abdominal ($39,97 \pm 0,11^\circ\text{C}$), em relação aos exercícios realizados em ambiente temperado (24°C; temperatura abdominal de $38,59 \pm 0,07^\circ\text{C}$). Verificou-se também que, no ambiente quente, a velocidade de 8 m/min permitiu maior duração do exercício (60 min), diferentemente da duração observada a 10 m/min (42 ± 6 min). Considerando esses resultados, a corrida na velocidade de 8 m/min, durante 60 min, em ambiente quente, foi selecionada como modelo experimental para induzir a hipertermia nos experimentos subsequentes. Os animais foram divididos em 3 grupos e tratados durante 7 dias: Controle (C-NS) e Hipertermia (H-NS), ambos tratados com ração padrão AIN-93G, e Hipertermia tratado com ração AIN-93G suplementada com arginina 2% do valor calórico total (H-Arg). Posteriormente, os animais dos grupos H-NS e H-Arg foram submetidos a exercício físico em esteira rolante em ambiente quente. Os animais do grupo C-NS foram mantidos em repouso a 24°C. Para avaliação da permeabilidade intestinal ou TB os animais receberam, por gavagem, DTPA marcado com tecnécio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) ou $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -*E. coli*, respectivamente. O grupo H-NS apresentou maior permeabilidade intestinal em relação aos grupos C-NS e H-Arg. Da mesma forma, a TB foi maior para sangue e fígado nos animais desse grupo (H-NS), quando comparada com os demais grupos investigados. A suplementação com arginina durante 7 dias, período pré-tratamento, reduziu para níveis fisiológicos a permeabilidade intestinal e a TB para sangue e fígado. Concentrações estatisticamente mais elevadas de sIgA foram encontrados nos grupos H-NS e H-Arg em relação ao grupo C-NS. As análises histológicas não mostraram alteração significativa no epitélio intestinal entre os animais dos diversos grupos investigados. O exercício em ambiente quente (34°C) contribuiu para o aumento da permeabilidade intestinal e translocação bacteriana. A suplementação com arginina, a 2% do valor calórico total, reduziu a permeabilidade intestinal e a TB para níveis fisiológicos.

Palavras-chave: Hipertemia, Imunonutriente, Permeabilidade Intestinal, Tecnécio-99m, Translocação Bacteriana.

ABSTRACT

The aim of present study was to evaluate the possible protective role of the arginine in the reduction of the intestinal permeability and bacterial translocation (BT) in mice subjected to prolonged physical exercise in a warm ambient. Preliminary experiments were conducted to determine the changes in the core body temperature of mice induced by treadmill exercise. The exercises performed at 34°C induced higher increases of abdominal temperature ($39.97 \pm 0.11^\circ\text{C}$), compared to the exercises performed in the temperate environment ($38.59 \pm 0.07^\circ\text{C}$). It was also observed that, in a warm ambient, the velocity of 8 m/min allowed for more prolonged exercise duration (60 min), differently from those performed at 10 m/min (42 ± 6 min). Considering these results, the 60 min-treadmill running at a velocity of 8 m/min was selected as the experimental model to produce hyperthermia in the subsequent experiments. The mice were divided in three groups and treated for seven days: Control (C-NS) and Hyperthermia (H-NS), both treated with standard AIN-93G diet and Hyperthermia treated with AIN-93G diet supplemented with arginine 2% of the total caloric content (H-Arg). Then, the animals of the H-NS and H-Arg groups were subjected to physical exercise on a treadmill in a warm environment. The animals of the C-NS group were allowed to move freely at 24°C. To investigate the occurrence of intestinal permeability and BT, the animals received, by gavage, DTPA labeled with technetium-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$) or $^{99\text{m}}\text{Tc-E. coli}$, respectively. The H-NS group presented higher intestinal permeability, when compared with C-NS and H-Arg groups. Similarly, the BT was higher in the blood and liver of the animals from this group (H-NS), when compared to the other groups investigated. The supplementation with arginine during 7 days, pre-treatment period, reduced to physiological levels both the intestinal permeability and the BT to the blood and liver. Statistically higher concentrations of the sIgA were found in H-NS and H-Arg groups, compared to C-NS group. Histological analysis showed no significant change in the intestinal epithelium among animals of different groups investigated. The exercise in the heat (34°C) contributed to the increase of the intestinal permeability and bacterial translocation. Moreover, the supplementation with arginine, 2% of the total caloric content, reduced the intestinal permeability and BT to physiological levels.

Key words: Bacterial Translocation; Hyperthermia; Immunonutrient; Intestinal Permeability; Technetium-99m.